

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 670**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/49** (2006.01)

**C12N 15/863** (2006.01)

**A61K 39/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06778467 .8**

96 Fecha de presentación: **25.07.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1921146**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2008**

54 Título: **Vectores recombinantes basados en el virus modificado de Ancara (MVA) como vacunas preventivas y terapéuticas contra el sida**

30 Prioridad:

**27.07.2005 ES 200501841**

**23.03.2006 ES 200600762**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**12.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**12.12.2012**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (100.0%)  
SERRANO, 117  
28006 MADRID, ES**

72 Inventor/es:

**HEENEY, JONATHAN;  
MOOIJ, PETRA;  
GÓMEZ RODRÍGUEZ, CARMEN ELENA;  
NÁJERA GARCÍA, JOSÉ LUIS;  
JIMENEZ TENTOR, VICTORIA y  
ESTEBAN RODRIGUEZ, MARIANO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 392 670 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Vectores recombinantes basados en el virus modificado de Ankara (MVA) como vacunas preventivas y terapéuticas contra el SIDA

### Campo de la Invención

La presente invención se refiere a virus recombinantes que expresan antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), diseñados para utilizarse como vacunas preventivas y terapéuticas contra el SIDA. Más concretamente, la invención se refiere a virus recombinantes basados en el virus Vaccinia Modificado de Ankara (MVA) que expresan simultáneamente la proteína de la envuelta gp120 y una proteína quimérica resultante de la fusión de Gag, Pol y Nef. La invención se refiere también a virus recombinantes basados en el virus Vaccinia Modificado de Ankara (MVA) que expresan antígenos del virus quimérico de la inmunodeficiencia de simio y humano (SHIV), válidos para ser utilizados para la inmunización de simios y poder comprobar el grado de protección que los simios adquieren al ser infectados con el virus SHIV, un híbrido de VIH y SIV. De esta manera se confirma en animales evolutivamente muy próximos a los seres humanos, susceptibles de ser infectados de forma natural por un virus similar al virus de la inmunodeficiencia humana, la eficacia como vacunas de dichos vectores derivados de MVA, lo que es un indicativo de la potencialidad de los vectores homólogos primeramente mencionados, los virus derivados de MVA que expresan antígenos del VIH-1, como vacunas eficaces para proteger a seres humanos contra el virus de la inmunodeficiencia humana.

### Estado de la Técnica

Los datos de la OMS indican que en el año 2004 la enfermedad del SIDA había causado más de 23 millones de fallecimientos, con más de 40 millones de personas infectadas y con unas predicciones de sobrepasar los 60 millones de infectados para el año 2012. Las diferencias geográficas y económicas de esta enfermedad son evidentes, pues más del 95% de los casos y el 95% de las muertes por SIDA ocurren en el tercer mundo, la mayoría de ellas en el África subsahariana y el sudeste asiático, sobre todo entre jóvenes adultos y con un incremento progresivo entre las mujeres. De entre los países desarrollados, España continúa siendo el país con mayor número de personas infectadas de la Unión Europea, con unos 150.000 casos. Si bien es cierto que una mejora en los servicios sanitarios en muchas regiones contribuiría a disminuir la velocidad de transmisión del virus, existe consenso en la comunidad internacional de la urgente necesidad en desarrollar vacunas profilácticas y terapéuticas contra el SIDA que ayuden a solucionar el problema.

El desarrollo del SIDA representa los últimos estadios de la infección causada por el retrovirus conocido como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El VIH es un retrovirus que pertenece al género Lentivirus, con un genoma de 9,8 kb. El virión contiene dos copias de ARN de banda sencilla y de polaridad positiva. En los primeros estadios de la infección, el ARN genómico, por medio de la transcriptasa en reverso o retrotranscriptasa (RT) que llega a la célula asociada al ARN viral, se convierte en ADN lineal de doble banda. Este ADN se transporta al núcleo, donde se integra en la célula hospedadora en forma de provirus, a partir del cual se transcriben los genes estructurales gag, pol y env, los genes reguladores, tat, rev, nef, y los genes accesorios vif, vpr y vpu. Los productos de la traducción de dichos genes son los siguientes:

- El producto de la traducción del gen Gag es la poliproteína precursora gag-p55 que se procesa dando lugar a la proteína matriz p17, la proteína de la cápsida p24 y las proteínas de la nucleocápsida p6 y p7.
- El procesamiento del precursor Pol da lugar a las tres enzimas víricas: la proteasa (p11), la retrotranscriptasa (p6S/S1) (RT) y la integrasa (p32), de las que la RT posee actividad de ADN polimerasa (dependiente tanto de ARN como de ADN) y actividad endonucleasa (RNasa H), ambas requeridas durante la síntesis del ADN, mientras que la integrasa está involucrada en el proceso de integración del provirus, actuando como endonucleasa.
- El producto del gen Env es una proteína de 88 kDa que está fuertemente glicosilada (gp160). Esta proteína es procesada por proteasas celulares, dando lugar a las proteínas gp120 y gp41, que permanecen unidas por uniones no covalentes en la superficie del virión. En la glicoproteína gp120 se localizan los sitios de unión a los receptores celulares, el receptor CD4 y los correceptores CXCR4 (llamado X4) y CCR5 (llamado C5). Es a esta proteína a la que se debe mayoritariamente la variabilidad genética del virus VIH y su capacidad para escapar a la respuesta inmune tanto humoral como celular, por ser la que está más expuesta en la superficie del virus. Por su parte, la glicoproteína gp41 o transmembrana actúa como anclaje a la membrana lipídica. Tiene en su extremo amino terminal una zona hidrófoba altamente conservada, requerida para la fusión de la membrana vírica y la membrana plasmática celular durante el proceso de entrada del virus en la célula hospedadora.
- Los genes reguladores y auxiliares son codificados por seis fragmentos de marco de lectura abierta solapante. Los genes Tat y Rev son necesarios para la replicación vírica en todas las células infectadas. El gen Tat codifica una proteína de 14 kDa que aumenta la expresión de los genes del VIH. El gen Rev

codifica una proteína de 19 kDa que facilita el transporte al citoplasma de los ARNm. La proteína Nef, de 210 aminoácidos, se asocia con estructuras de membrana e induce la internalización y degradación de moléculas de CD4 en los lisosomas. El gen Vif codifica una proteína necesaria para la propagación del virus en linfocitos de sangre periférica, macrófagos primarios y algunas líneas celulares establecidas. El gen Vpr codifica una proteína de 15 kDa que se asocia con la proteína de la nucleocápsida p6. La proteína Vpu es una fosfoproteína que facilita la disociación dentro de la célula infectada de la gp160 y CD4 por degradación de la molécula CD4 en el retículo endoplásmico.

En los extremos 5' y 3' del DNA viral se encuentran las secuencias LTR (*long terminal repeats*), en las que se localizan importantes regiones reguladoras que juegan un papel primordial durante el proceso de retrotranscripción.

Se han identificado dos clases del virus: VIH-1 y VIH-2, de las que la segunda, VIH-2, parece ser menos patógena que la primera y se localiza sobre todo en la zona occidental de África. Es la forma que genera la enfermedad con mayor rapidez, VIH-1, la que se encuentra más extendida por el planeta y la que más se ha diversificado. Existen tres subtipos del VIH-1, denominados M, N y O, aunque más del 95% de todos los aislados del VIH a nivel global en la población, pertenecen al subtipo M. En función de las diferencias en la secuencia de nucleótidos, en especial en la parte correspondiente a las proteínas de la envuelta (Env), este subtipo se subdivide a su vez en ocho estirpes principales, a las que se alude generalmente como clades y que se denominan con las letras A, B, C, D, F, G, H y J. Los clades B y C representan aproximadamente el 80% de las infecciones a nivel mundial, siendo el clade B el más representativo en Europa y América del Norte, mientras que el clade C es prevalente en África y Asia. Son abundantes las zonas en las que las dos clases están presentes en la población (China, India, África subsahariana), por lo que se piensa que las vacunas que contuvieran antígenos correspondientes a los dos clades, B y C, serían mucho más eficaces en dichas zonas.

Una posibilidad para el diseño de tales vacunas consiste en la generación de moléculas de ADN recombinante que contengan secuencias capaces de expresar proteínas del VIH, o fragmentos o formas de fusión de las mismas de forma que, al ser administradas a un individuo, se sintetizan dichas proteínas, fragmentos o formas de fusión de las mismas y se genera una respuesta inmune contra ella. Dichas moléculas de ADN recombinante pueden generarse a partir de genomas de virus en los que se han eliminado o inactivado regiones cuya expresión es necesaria para la replicación del virus en las células diana y/o en los que se han sustituido regiones que codifican proteínas no imprescindibles para que el virus desarrolle la parte de su ciclo vital que se desea que tenga lugar en la célula diana. En esos casos, el ADN recombinante puede administrarse en forma de partículas virales completas que facilitan la transfección del ADN recombinante a la célula diana. De entre los virus que se están utilizando como vectores, las formas modificadas del virus Vaccinia están entre los vectores virales más tentativos para ser aplicados como vacuna recombinante. Algunas de ellas, como el virus NYVAC, (cuyo genoma se representa en la parte inferior de la Figura 1), han sido generadas por mutagénesis dirigida con el resultado de la eliminación de 18 genes del virus Vaccinia (estirpe Copenhague), aproximadamente 10 kb. Otras, como el virus Vaccinia modificado de Ankara (MVA), han sido generadas de forma menos controlada; concretamente, el MVA se ha generado al haber pasado el virus por más de 570 pases seriados en cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (CEF), lográndose una pérdida del 15% del genoma viral parental (1, 2) que supone deleciones en genes de los que algunos de ellos están intactos en el genoma del virus NYVAC (genes que se indican subrayando su nombre en la Figura 1) y otros han sido delecionados en ambos vectores (genes que aparecen con el nombre en negrita en la Figura 1), existiendo también genes que permanecen intactos en el genoma del virus MVA y que presentan deleciones en el genoma de NYVAC (los genes cuyo nombre aparece en cursiva en la Figura 1). En el virus MVA, los genes estructurales del virus han permanecido inalterados, mientras que genes involucrados en la evasión del sistema inmune (3), y genes relacionados con el rango de hospedador (2, 4, 5), han sido delecionados o fragmentados. MVA produce su ciclo infeccioso completo en células CEF y en células de riñón de Hámster (BHK), mientras que en líneas celulares humanas, incluyendo las células HeLa, tiene un ciclo abortivo (6, 7). Aunque la replicación viral depende del tipo celular, el bloqueo del programa de morfogénesis en las células no permisivas ocurre en los pasos posteriores a la formación de formas virales inmaduras (IV), sin haber alteraciones de la expresión de genes virales tempranos y tardíos (8, 9). En células en cultivo, los recombinantes de MVA producen niveles similares o mayores de proteína heteróloga que los vectores derivados de la cepa silvestre del virus Vaccinia WR (Western Reserve) (9-11), lo que le hace interesante como sistema de expresión. En mamíferos, recombinantes de MVA han demostrado inducir una inmunidad protectora frente a un amplio espectro de patógenos (6, 12-16), mostrando las siguientes ventajas como vector de expresión de antígenos heterólogos:

- Alto nivel de seguridad, demostrada cuando se usó en más de 120000 individuos durante la campaña de erradicación de la viruela en Alemania.
- Avirulento en una amplia variedad de animales en condiciones inmunosupresoras.
- Poca o nula reacción sistémica o local tras su inoculación en humanos, incluyendo individuos de alto riesgo.
- Alta plasticidad y estabilidad de su genoma, lo que permite introducir grandes cantidades de material génico exógeno.
- Potente inductor de respuestas inmunes eficaces frente a una gran variedad de antígenos.

Dada su seguridad y capacidad de producir protección, puede ser de gran utilidad en la generación de vacunas vivas frente a enfermedades infecciosas y en la terapia del cáncer. Como cualquier otra vacuna dirigida a seres humanos,

para llevar a cabo ensayos clínicos de la posible eficacia como vacunas de vectores derivados del MVA, es necesario obtener información previa sobre su comportamiento inmunogénico y su capacidad de conferir protección en modelos animales. En el caso del SIDA, sin embargo, no es sencillo encontrar un modelo animal adecuado. Las especies animales habituales que se usan para la experimentación con otras enfermedades, como pueden ser los ratones, no sirven como modelo de infección, al no replicarse en ellos ni el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ni el equivalente de simio, el virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV). Si es posible, sin embargo, obtener de los ratones información previa sobre el comportamiento inmunológico de los vectores en estudio que permita una evaluación previa de su posible eficacia y ayude a descartar o considerar interesante continuar con los ensayos. Además, el modelo de ratón transgénico que expresa el antígeno de histocompatibilidad humano MHC de clase I (HLA-A2) permite demostrar si la vacunación confiere presentación antigénica similar a la humana por parte del HLA-A2, que es prevalente en la población, algo que no se puede hacer, de momento, en primates, por no disponerse de primates transgénicos para dicho antígeno humano. Los estudios sobre la capacidad protectora conferida por la vacunación, sin embargo, requieren el uso de otros modelos distintos del modelo de ratón.

En esa línea, los modelos de primates no humanos se han convertido en una herramienta fundamental para evaluar en ensayos clínicos las vacunas candidatas contra el SIDA. La infección de chimpancés por el VIH-1 ha presentado grandes limitaciones como su elevado costo, su poca disponibilidad y la ausencia de síntomas clínicos. Se ha encontrado que el virus de la inmunodeficiencia de simios (o SIV, a partir de su nombre en inglés, *simian immunodeficiency virus*) es un modelo mucho más útil. Se trata de un lentivirus que infecta de forma natural diversos tipos de primates. Se han descrito cinco subgrupos del mismo. La forma aislada de macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), a la que se denomina SIVmac, pertenece al primer tipo.

Al igual que sucede con el VIH, su genoma se caracteriza por presentar dos secuencias LTR en sus extremos 3' y 5', en las cuales se encuentran el promotor y las secuencias reguladoras o de unión a factores transcripcionales. Presenta tres marcos de lectura abierta para proteínas estructurales: gag, pol y env; marcos de lectura abierta para genes reguladores: nef, tat y rev, y los llamados genes accesorios: vif, vpr y vpx. Los miembros del subgrupo SIVmac comparten un alto grado de homología genética con el VIH-2.

Existen puntos comunes entre los virus SIV y VIH, entre los que se encuentran el tropismo celular, la organización genómica, las características ultraestructurales, el modo de transmisión, la respuesta del hospedador a la infección y los síntomas clínicos de la enfermedad, con la salvedad de las infecciones asintomáticas. Estas características han propiciado que los modelos basados en el virus SIV sean atractivos para la evaluación de la eficacia de candidatos a vacunas y el diseño de nuevas vacunas para ensayos en humanos.

La infección por SIV se caracteriza por un máximo de viremia en las dos primeras semanas, seguido por una disminución de los niveles virales hasta un punto que es variable y del cual dependerá la progresión de la enfermedad. El período de incubación viral es menor que en la infección por VIH. La variabilidad en la progresión de la enfermedad depende de la heterogeneidad genética de los macacos usados en los estudios, así como del virus empleado en el desafío y la ruta de exposición (intravenosa, mucosa o perinatal). Ante la infección por SIV, la respuesta del hospedador es parecida a la generada contra el VIH, pero difiere en la especificidad de los anticuerpos neutralizantes contra los antígenos de la envoltura.

El SIV presenta varias desventajas como modelo. En primer lugar, es un virus diferente al VIH; por tanto, las proteínas de la envuelta, que son el blanco fundamental de los anticuerpos neutralizantes, son muy divergentes en ambos modelos. Otra desventaja es que el virus SIV usa sólo el correceptor CCR5 para entrar en la célula, mientras que el VIH usa, además, otros correceptores como CXCR4, CCR2 o CCR3. Por esta y otras razones, la calidad y la eficacia de un candidato probado en este modelo no se considera necesariamente extrapolable a seres humanos.

Para soslayar estas desventajas, en 1991 se obtuvo por primera vez un virus híbrido entre el VIH y el SIV. Este virus se denominó SHIV (del inglés *Simian-Human Immunodeficiency Virus*) (25). Este híbrido contenía los genes env y tat del VIH y el resto del material genético del SIV. El SHIV fue capaz de infectar macacos Rhesus, aunque no era capaz de reproducir los síntomas característicos del SIDA en los animales inoculados con él.

Con este primer híbrido, se dispuso de un modelo de infección en macacos útil para estudios de protección contra la infección, si bien este modelo aún no permitía concluir si los candidatos a vacunas eran capaces de proteger contra la enfermedad. Unos años más tarde, a través de pasos sucesivos por macacos y en cultivo, se lograron aislar varias variantes agresivas del SHIV capaces no sólo de infectar macacos, sino de producir un síndrome similar al SIDA. Estas cepas, adaptadas a multiplicarse en los animales así inoculados, provocaron depleción en los linfocitos CD4+ y la muerte de los macacos en menos de un año tras la inoculación. De entre estas variantes del SHIV, una de las más comúnmente utilizadas es la denominada SHIV89.6P, obtenida mediante pases seriados en macacos Rhesus del virus parental SHIV89.6, que contiene los genes gag, pol, vif, vpx, vpr y nef del virus de simio SIVmac239, mientras que los genes auxiliares tat, rev y vpu y el gen de las proteínas de la envuelta env proceden de un aislado citopático del HIV-1, el HIV89.6 (26,27). Gracias al virus SHIV89.6P y otros similares se cuenta con un modelo para evaluar la protección contra la enfermedad y la muerte conferida por posibles vacunas en desarrollo.



Gracias a este modelo ha sido posible realizar varios estudios en macacos que han demostrado la relevancia de vectores recombinantes de MVA como vacuna potencial frente al VIH, especialmente cuando se utilizan en sistemas combinados de inmunización en los que se emplean dos o más dosis de vacunación separadas en el tiempo, suministrándose al menos en la primera dosis un vector diferente al de las siguientes dosis, aunque los antígenos expresados a partir de cada uno de los vectores pueden ser los mismos. Para hacer referencia a estos protocolos de vacunación, en los que se suministra una primera dosis de desencadenamiento de la respuesta inmune con un vector que da lugar a la expresión de un antígeno y una o más dosis de potenciación o refuerzo de la respuesta inmune generada que contienen un vector diferente, pero que da lugar generalmente a la expresión del mismo antígeno, se emplea a menudo en español su denominación en inglés *prime/boost*. Estos protocolos se consideran especialmente adecuados para ser aplicados para la prevención o el tratamiento de las infecciones por el virus VIH pues, por una parte, evitan la administración de formas vivas atenuadas del virus, recurriéndose sólo a la utilización de componentes del mismo; por otra parte, el uso de vectores de expresión capaces de introducirse en las células en lugar de recurrir a la administración directa de las proteínas que expresan posibilita que las proteínas que deben actuar como antígenos se encuentren presentes en el citoplasma de las células hospedadoras para que se produzca su procesamiento mediante la ruta de presentación de antígenos del MHC de clase I, lo que es necesario para desencadenar una respuesta inmune de células T, particularmente respuestas citotóxicas inmunes asociadas con linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Por último, el uso de vectores diferentes en cada una de las dosis disminuye la probabilidad de que el vector de vacunación como tal sea eliminado rápidamente por el sistema inmune del hospedador, evitándose la potenciación de la respuesta inmune dirigida contra las partes constituyentes del vector que no proceden del microorganismo contra el que se busca protección.

En los estudios con macacos (12), los vectores recombinantes derivados del MVA están demostrando ser particularmente útiles para ser utilizados en protocolos combinados de inducción y potenciación de la respuesta inmune con vectores diferentes, en especial cuando el recombinante derivado del MVA se administra en la segunda y/o en alguna dosis posterior a esta y expresa, al igual que el vector utilizado en la primera dosis, múltiples antígenos de VIH y SIV (Virus de la Inmunodeficiencia de Simio). La respuesta de células T citotóxicas y de memoria generada demuestra el potencial de los recombinantes de MVA como vacunas frente al virus VIH (17).

Por ello, se han diseñado distintos vectores recombinantes, basados en el MVA, capaces de expresar diversos antígenos del VIH. Intentando buscar formas más eficaces para generar una respuesta protectora, se han construido vectores capaces de expresar más de una proteína de dicho virus, en ocasiones formando proteínas de fusión. Así, por ejemplo, las solicitudes de patente WO 02/072754 y WO 2004/087201 describen en general vectores derivados del MVA que expresan las proteínas Env, Gag y Pol (rMVA), considerando como una opción adicional la posibilidad de que el antígeno inmunizante incluya también secuencias de vif, vpr, tat, rev, vpu o nef, aunque sin discutir que la expresión de alguna de esas secuencias tenga gran importancia de cara a la posible respuesta de protección generada, ni utilizando esa opción en las realizaciones de la invención. Aunque en dichas solicitudes de patentes internacionales se menciona que las secuencias de vif, vpr, tat, rev, vpu o nef, así como las correspondientes a env, gag y pol, pueden en general codificar sólo fragmentos de la correspondiente proteína, y/o presentar mutaciones, es una característica definitoria de la invención que se intenta proteger en dichas solicitudes internacionales que el gen env carezca de parte o de la totalidad de los nucleótidos que codifican el dominio citoplasmático de gp41. Wyatt et al. (AIDS Research and Human Retroviruses, Mary Ann Liebert, US, vol. 20, no. 6, 1 Junio 2004, páginas 645-653) han divulgado vectores derivados de MVA con las mismas características.

El estado de la técnica no describe específicamente la posibilidad de que la parte codificante correspondiente a la proteína gp41 se elimine en su totalidad ni discute las posibles consecuencias que esto tendría. Si se menciona en cambio en los ejemplos de ambas solicitudes de patente, tal como Wyatt et al. mencionan en el resumen de su artículo, que dichas proteínas de la envuelta, gracias al truncamiento de la proteína gp41, ven facilitada su acumulación en la membrana de las células que la expresan, lo que se trata como un efecto positivo buscado. También se trata como un efecto positivo deseado la formación de partículas similares a virus VIH en las que están presentes proteínas Gag y Env y que se pueden detectar, entre otras localizaciones, en el exterior de las células en las que las correspondientes proteínas se han expresado. Respecto al lugar de inserción de las secuencias expresadas, no se menciona que este hecho tenga una importancia especial salvo para manifestar como positivo el hecho de que la elección del sitio de la delección III como uno de los lugares en los que se insertan secuencias permite que el recombinante MVA siga siendo TK<sup>+</sup>. Ello implica que el vector recombinante MVA descrito en dicho estado de la técnica exprese timidina quinasa y, por consiguiente, mantenga una cierta virulencia. Tampoco se discute que tenga relevancia alguna que se utilice más de un lugar de inserción para incluir en el vector las secuencias que codifican los antígenos que se desean expresar, no describiéndose pruebas para demostrar la estabilidad de dichos vectores.

La solicitud de patente WO 2004/035006 describe también vectores derivados de MVA que contienen secuencias codificantes de varias proteínas de VIH que se expresan en forma de proteínas de fusión, concretamente una fusión Gag-Pol y una fusión nef-tat. Sin embargo, su enfoque es diferente al de las solicitudes internacionales anteriormente comentadas: el objetivo de esta solicitud de patente es que no haya empaquetamiento en proteínas virales. La solución propuesta es que al menos una de las secuencias codificantes de proteínas del VIH esté unida a una secuencia líder heteróloga, siendo la del tPA la secuencia que se elige para las realizaciones correspondientes a vectores derivados del MVA y promoviéndose de esta manera la secreción de las proteínas sintetizadas. En lo que

se refiere a la inserción de las secuencias, además, se muestra preferencia por el sitio de la delección III, utilizándose de nuevo en un mismo vector un segundo lugar de inserción de secuencias adicionales, el de la delección II, para una proteína de fusión tPA-nef-tat, sin considerar que esto pueda tener consecuencias para la estabilidad del vector ni realizar experimentos para verificar que realmente sea estable. Además, la única forma considerada para la secuencia env, delta V2 env, posee delecciones en la parte correspondiente a la proteína gp120, no considerándose de nuevo la posibilidad de eliminar la proteína gp41 ni las posibles consecuencias derivadas de ello.

Scheifflinger et al. (Archives of Virology, Springer Wien, AT, vol. 141, no. 3/04, 1 enero 1996, páginas 663-669) describen virus MVA recombinantes que expresan genes exógenos cuyo sitio de inserción es el locus de timidina quinasa. Los genes exógenos están insertados en el gen de la timidina quinasa, que está interrumpido por los genes foráneos. Así, los virus MVA recombinantes son TK-, pero la secuencia codificante del gen TK, aunque interrumpido, permanece en los genomas recombinantes. Los virus recombinantes resultantes se describen como difíciles de crecer, manejar y purificar, requiriendo la inserción de un gen adicional TK (el gen de timidina quinasa del virus de la viruela aviar) para superar estos inconvenientes.

La presente invención, por su parte, proporciona distintos vectores recombinantes, basados en el virus MVA, capaces de expresar diversos antígenos del VIH, que responden a un enfoque diferente a los descritos en solicitudes de patente anteriores. Estos vectores recombinantes derivados del MVA poseen secuencias que permiten la expresión simultánea de la proteína gp120 y de una proteína de fusión Gag-Pol-Nef. Tanto la secuencia que expresa la proteína gp120 como la secuencia correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef se encuentran insertadas en un mismo lugar, el correspondiente al gen de la timidina quinasa. Este hecho aumenta la estabilidad de los vectores, al utilizar un único sitio de inserción con respecto a otros vectores derivados también del MVA que contienen varias secuencias codificantes de proteínas del VIH, dado que estos últimos, al llevar insertas cada una de las secuencias en un lugar diferente de inserción, pierden con facilidad los insertos presentes en ellos. Además, la utilización específica del *locus* de la timidina quinasa como lugar de inserción da lugar a que los vectores objeto de la invención sean virus recombinantes derivados del MVA que presentan una mayor seguridad para ser utilizados como vacunas, por carecer de un gen, el de la timidina quinasa, involucrado en virulencia. A diferencia de lo descrito en solicitudes como WO 02/072754 y WO 2004/087201, la expresión de la proteína gp120 en ausencia de secuencias correspondientes a la proteína gp41, permite su liberación al medio extracelular pocas horas después de su síntesis en el citoplasma de la célula infectada, facilitándose con ello la inducción tanto de respuesta humoral como celular frente a esta proteína, la proteína que mayor variabilidad presenta en su secuencia entre los distintos clades.

Los virus recombinantes de la presente invención expresan al menos cuatro antígenos: Env, Gag, Pol y Nef, por considerarse que un vector que exprese esos cuatro antígenos es mucho más eficaz que vectores recombinantes capaces de expresar sólo alguno de dichos antígenos o incluso otros, por la capacidad de los antígenos elegidos para inducir respuestas celulares específicas y por la menor diversidad genética que existe entre aislados del VIH en lo que a las secuencias de Gag, Pol y Nef se refiere. Además, se considera una característica particularmente importante de la invención la presencia de secuencias correspondientes al gen regulador nef, junto con las correspondientes a los genes estructurales gag, pol y env, pues se expresa en etapas tempranas del ciclo del VIH y la generación de una respuesta celular frente a sus productos se considera necesaria para aumentar el repertorio de defensa inmunológica contra el VIH y conseguir una respuesta protectora adecuada que permita el control inmunológico de la infección por el VIH-1. La asociación de las secuencias codificantes de gag, pol y nef se ha realizado en los vectores objeto de la invención de forma que se generara una proteína de fusión que mantuviera todos los epítomos con capacidad para generar respuesta celular, posibilitando una mayor presentación antigénica que otros vectores que expresan fusiones que corresponden sólo a las proteínas Gag y Pol, pero generándose una proteína de fusión que no se proteoliza por acción de la proteasa viral, no da lugar a la formación de partículas virales y que, al contrario de lo que sucedía con las proteínas expresadas en otros vectores de la técnica anterior, se acumula en el citoplasma en forma de una poliproteína estable. El uso de un promotor sintético idéntico para dirigir la expresión tanto de la proteína gp120 como de la fusión Gag-Pol-Nef, - un promotor elegido para que permita la expresión de las correspondientes proteínas tanto a tiempos tempranos como a tiempos tardíos durante la replicación del MVA -, permite la expresión simultánea de las secuencias de la gp120 y de la proteína quimérica Gag-Pol-Nef, su acumulación a lo largo del ciclo de infección del MVA y el procesamiento antigénico de las mismas a tiempos tempranos y tardíos.

Un grupo de los vectores objeto de la invención han sido diseñados específicamente para la vacunación de seres humanos. En estos vectores, tanto la secuencia de la proteína gp120 como la secuencia de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef se han generado a partir de secuencias del virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1. La utilización para la generación de los vectores recombinantes de secuencias obtenidas específicamente de aislados naturales y que preferentemente pertenecen a los clades del VIH-1 más representados en la naturaleza, (los clanes B y C), posibilita además una vacunación mundial más representativa de la población infectada o en riesgo. Por todo ello, el uso de estos vectores para vacunación, de forma aislada o como parte de protocolos de inmunización en los que se suministran vectores codificantes de antígenos en varias dosis espaciadas en el tiempo, se ha considerado que puede ser de especial utilidad para ayudar a contener la expansión del virus VIH. Además, estos vectores derivados del virus MVA representan tanto una alternativa a construcciones similares derivadas del virus NYVAC como un complemento útil para la utilización de cada uno de los mencionados vectores recombinantes en fases diferentes de

protocolos de inmunización durante los cuales se suministra una o dos dosis para desencadenar la respuesta inmune y una o más dosis sucesivas para potenciarla, pues las pruebas realizadas hasta ahora por el grupo de los inventores muestran que, además de diferir en su genoma y en la respuesta inmune que generan en ratones frente a los antígenos del VIH gp120 y Gag-Pol-Nef, ambos vectores manifiestan un comportamiento diferente en cultivos celulares y modelos animales (inducción de diferentes patrones de expresión de genes humanos en células HeLa, menor inducción por parte del MVA de apoptosis que el vector NYVAC, induciendo éste último mayor destrucción celular y respuesta humoral contra sí mismo (28)). Este comportamiento diferencial hace predecible que su comportamiento sea diferente también tras haber sido administrados a seres humanos como vacunas de vectores recombinantes generados a partir de cada uno de ellos.

Tal como se describe más adelante en la sección de Ejemplos de la presente memoria, los ensayos realizados en ratones demuestran la capacidad inmunogénica de estos vectores objeto de la invención diseñados para la vacunación de seres humanos y, en particular, de las dos realizaciones de vectores de la invención con las que se llevaron a cabo los ensayos, los vectores MVA-B y MVA-C. Sin embargo, para poder evaluar su capacidad para conferir protección para controlar la infección por el VIH, es necesario acudir a un modelo de primates no humanos, como puede ser el de los macacos Rhesus anteriormente descritos, de forma que estos animales sean sometidos a un protocolo de desencadenamiento/potenciación de la respuesta inmune y en los que se evalúe posteriormente la capacidad para controlar la infección que la respuesta inmune generada sea capaz de conferir tras “desafiar” la misma mediante la inoculación de un virus capaz de infectar a los macacos y de dar lugar en ellos a síntomas similares a los del SIDA. Para este tipo de desafío sería adecuada una de las variantes patogénicas del SHIV mencionadas anteriormente. Este tipo de ensayos, sin embargo, no pueden realizarse con los vectores de la invención diseñados para la vacunación de seres humanos, vectores cuyos insertos codifican proteínas exógenas al virus MVA que derivan todas ellas de secuencias de proteínas propias del VIH-1. Requieren la generación de vectores especiales que cumplan varias condiciones:

- a) Contener secuencias codificantes retrovirales del mismo origen que las contenidas en el virus que vaya a utilizarse en el desafío. Este virus puede muy bien ser el SHIV, de manera que la secuencia correspondiente al gen env procederá del VIH-1, mientras que las posibles secuencias correspondientes a otros genes, como puedan ser gag, pol o nef, procederán del SIV.
- b) Presentar la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que los vectores diseñados para uso en humanos con los que se quieren comparar.

El cumplimiento de estas condiciones permite que el estudio sea factible y que se puedan extrapolar de sus resultados el comportamiento esperable al utilizar en seres humanos los vectores con los que se los quiere comparar. La presente invención proporciona también vectores que permiten valorar la capacidad protectora que podría generarse en seres humanos que fueran vacunados con los virus recombinantes objeto de la presente invención, derivados del virus MVA y con secuencias exógenas derivadas todas ellas de secuencias de proteínas del VIH-1. Adicionalmente, se proporcionan también vectores recombinantes análogos contruidos a partir de otro derivado de poxvirus, el virus NYVAC, para poder comparar el efecto de ambos.

#### Descripción de la invención

La invención proporciona nuevos vectores recombinantes derivados del virus MVA capaces de expresar simultáneamente una forma de la proteína Env del VIH-1 que carece de la parte correspondiente a la proteína gp41 y una proteína de fusión correspondiente a las proteínas Gag, Pol y Nef del virus VIH-1 que no se proteoliza por acción de la proteasa del VIH, estando las secuencias de la proteína Env y de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef bajo el control de promotores idénticos e insertadas ambas en el mismo sitio de inserción del vector. Estos vectores objeto de la invención, en los que las secuencias codificantes de antígenos exógenos al MVA se derivan todas ellas de secuencias propias del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), han sido diseñados para poder fabricar con ellos medicamentos que puedan utilizarse como vacunas preventivas o terapéuticas contra el SIDA en seres humanos. Para ello, y para diferenciar los vectores de la presente invención que se describirán más adelante y que comprenden secuencias derivadas del virus SIVmac y han sido diseñados para ser administrados a macacos, en la presente memoria se alude en ocasiones a los primeros vectores objeto de la invención con expresiones como “los vectores objeto de la invención diseñados para la vacunación de seres humanos”, “los vectores derivados del MVA diseñados para la vacunación de seres humanos”, o con expresiones similares. Por claridad de la descripción cuando se usan estas expresiones, en ocasiones se alude a dichos vectores como “los vectores en los que las secuencias codificantes de antígenos exógenos al MVA se derivan todas ellas de secuencias propias del VIH-1”.

Así, la invención se refiere también tanto a composiciones que contienen dichos vectores recombinantes como al uso de dichos vectores para la fabricación de un medicamento destinado a ser utilizado como vacuna para ayudar a prevenir o tratar la infección provocada por el virus VIH.

La expresión de la proteína Env sintetizada a partir de los vectores de la presente invención da lugar a proteínas gp120 no asociadas a proteínas gp41 o fragmentos de la misma, facilitándose con ello su salida de la célula y su

liberación al medio, lo que a su vez hace más probable la activación de las células B y la producción de anticuerpos neutralizantes frente al VIH. En las realizaciones preferidas de los vectores de la presente invención, la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env que forma parte de los vectores objeto de la invención codifica una proteína gp120 completa, habiéndose delecionado toda la secuencia del gen env que en la secuencia natural de dicho gen aparece tras el último triplete correspondiente a la proteína gp120, eliminando con ello la totalidad de la secuencia codificante correspondiente a la proteína gp41.

La proteína de fusión de Gag, Pol y Nef está diseñada de tal manera que no da lugar a la formación de partículas similares a partículas virales. La forma utilizada para la construcción de las realizaciones de la invención, que se describen con detalle en la presente memoria, se acumula en el citoplasma de las células infectadas con los vectores recombinantes objeto de la invención en forma de poliproteína, sin experimentar el procesamiento característico del virus VIH provocado por la proteasa viral que daría lugar a su escisión en proteínas más pequeñas, aunque posteriormente sí va a experimentar el procesamiento celular que permite la presentación de péptidos antígenicos de la proteína de fusión y la generación de una respuesta inmune contra los mismos.

El sitio del vector en el que se encuentran insertadas las secuencias de la proteína Env y de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef es el gen de la timidina quinasa, gen que queda inactivado por delección por la presencia de las secuencias insertadas en su lugar, aumentándose con ello la seguridad de los vectores objeto de la invención para ser administrados a individuos con el propósito de generar en ellos una respuesta inmune frente al VIH. En las realizaciones preferidas de dichos vectores de la presente invención, diseñados para la vacunación de seres humanos, la secuencia codificante de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef se genera a partir de secuencias de proteínas Gag, Pol y Nef para las que se deduce una secuencia de ADNc utilizando codones de lectura frecuentes en mamíferos, buscando con ello aumentar los niveles de expresión de la proteína de fusión. Además, en la secuencia codificante de la proteína de fusión, se provocan modificaciones respecto a las secuencias naturales, para aumentar su inmunogenicidad y su seguridad. Las modificaciones por las que se tiene preferencia incluyen la inactivación por mutagénesis del sitio activo de la proteasa y la eliminación mediante delección del sitio activo de la integrasa, la realización de delecciones en el gen nef y su inserción en la región codificante de la RT, la traslocación del sitio activo de la RT al extremo C-terminal de la proteína de fusión y la fusión de la secuencia del gen gag en fase de lectura con pol-nef, creando una desviación de una fase de lectura e introduciendo un cambio de glicina a alanina para prevenir la formación de partículas semejantes a virus. De entre ellas, se prefiere específicamente las modificaciones realizadas para generar la secuencia correspondiente a la proteína de fusión descritas por Didierlaurent A. *et al.* (18). Un esquema de los elementos que conforman una proteína de fusión Gag-Pol-Nef que cumple todas estas características se muestra en la zona inferior de la Figura 40, marcada como GagPolNef (gpn).

En las realizaciones preferidas de los vectores de la presente invención diseñados para la vacunación de seres humanos, el promotor se escoge de manera que permita la expresión de la proteína Env y de la proteína de fusión Gag-Pol-Env tanto en etapas tempranas como tardías del ciclo infectivo del virus MVA. El promotor sintético temprano/tardío de poxvirus pE/L (19) es la opción elegida para las realizaciones más preferidas de la invención, aunque cualquier otro promotor de poxvirus podría utilizarse igualmente para la construcción de los vectores objeto de la invención.

En una realización particularmente preferida de los vectores objeto de la invención diseñados para la vacunación de seres humanos, en los que las secuencias codificantes de antígenos exógenos al MVA se derivan todas ellas de secuencias propias del VIH-1, tanto la secuencia correspondiente a la proteína Env como las secuencias utilizadas para generar la secuencia que da lugar a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef proceden de aislados naturales del clade B y/o C. En realizaciones aún más preferidas de la presente invención, la secuencia correspondiente a la proteína Env y las secuencias utilizadas para generar la secuencia que da lugar a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef proceden de aislados naturales pertenecientes a un mismo clade, preferentemente el clade B o el clade C, pero también se consideran realizaciones de la invención aquellas en las que la secuencia correspondiente a la proteína Env procede de un aislado de un clade y las secuencias utilizadas para generar la secuencia que da lugar a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef proceden de un aislado de un clade diferente. Están incluidas también dentro del alcance de la presente invención aquellas realizaciones en las que al menos una de las secuencias utilizadas para generar la secuencia correspondiente a la proteína de fusión, es decir, la secuencia de gag, la secuencia de pol o la secuencia de nef, procede de un aislado diferente, pudiendo ser diferentes los tres aislados de los que se obtiene cada una de las correspondientes secuencias codificantes e, incluso, no pertenecer al mismo clade. Las composiciones de la presente invención que contienen los vectores recombinantes objeto de la invención, destinadas a ser utilizadas en la vacunación contra el virus VIH, pueden contener vectores recombinantes generados únicamente a partir de aislados de un clade concreto, preferentemente el clade B o el C, mezclas de vectores recombinantes de distintos clades en las que cada uno de los vectores se ha construido con secuencias procedentes de aislados de un único clade, vectores idénticos entre sí que se han construido a partir de secuencias procedentes de aislados de clades diferentes o mezclas de cualquiera de los vectores incluidos dentro del alcance de la invención. Se prefieren aquellas composiciones que contengan vectores de la invención generados a partir de un único clade, preferentemente el clade B o el C, o mezclas de vectores generados a partir de aislados del clade B y vectores generados a partir de aislados del clade C. Las composiciones que contengan tanto vectores generados a partir de aislados del clade B y vectores generados a partir de aislados del clade C deberían ser de especial utilidad para ser

utilizadas para la prevención y/o el tratamiento de la infección por el VIH en aquellas zonas en las que ambos clades están representados de forma significativa.

En las realizaciones de la invención cuya construcción se describe en ejemplos de la presente memoria, la secuencia correspondiente a la proteína Env se encuentra insertada en dirección opuesta con respecto a la dirección de la transcripción de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef. Los promotores de cada una de las secuencias correspondientes a proteínas del VIH están insertados en direcciones opuestas y en la zona más interna del inserto. Cada uno de los vectores de la presente invención diseñados para la vacunación de seres humanos cuya construcción se describe se generaron a partir de aislados naturales correspondientes a clades diferentes. El primero de ellos, el vector MVA-B, permite la expresión de una forma del gen env obtenida a partir del aislamiento del VIH BX08, procedente de Europa, y una proteína de fusión Gag-Pol-Nef que resulta de la traducción de una secuencia polinucleotídica generada a partir de secuencias correspondientes a genes gag, pol y nef obtenidos del aislado IIIB, que forma parte, como el aislamiento BX08, del clade B. El segundo de los vectores, el vector MVA-C, permite la expresión una forma del gen env obtenida a partir del aislado del VIH CN54, procedente de China, y una proteína de fusión Gag-Pol-Nef que resulta de la traducción de una secuencia polinucleotídica generada a partir de secuencias correspondientes a genes gag, pol y nef del mismo aislamiento CN54, que forma parte del clade C. Las secuencias de aminoácidos expresadas a partir de cada uno de los genes env contenidos en los vectores derivados de MVA reproducen la secuencia completa de las proteínas gp120 de los virus del aislado BX08, en el caso del MVA-B, y los virus del aislado CN54 en el caso del MVA-C. La construcción de estos vectores y la evaluación de su capacidad inmunogénica en ratones se describen más tarde en este documento con ayuda de las Figuras 1 a 38 y los Ejemplos 1 a 32 en secciones que aparecen más adelante en esta memoria. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, los ratones no son un modelo adecuado para evaluar la capacidad para controlar la infección del VIH que los vectores sean capaces de conferir a seres humanos inmunizados con ellos. Para ello es más adecuado recurrir a animales evolutivamente más próximos a los seres humanos, como pueden ser primates no humanos tales como los macacos Rhesus, a los que se les puede inocular un virus capaz de infectar a dichos animales y de producir en ellos un síndrome similar al SIDA. Algunas variantes patogénicas del virus SHIV como SHIV89.6P cumplen las características anteriores. Desafiar la respuesta inmunogénica producida por uno o más vectores de vacunación con una variante del virus SHIV implica que la inmunización no puede realizarse con los vectores de la invención anteriormente descritos, que están diseñados para expresar proteínas derivadas de secuencias propias del virus contra cuya infección se busca protección, - el VIH-1 -, pues no se reproducirían en el ensayo las condiciones del proceso que sucedería en la infección de un ser humano. Por ello, la evaluación de la capacidad de control de la infección que puedan conferir los vectores de la presente invención diseñados para la vacunación de seres humanos requiere la generación de vectores especiales que cumplan varias condiciones:

- a) Contener secuencias codificantes retrovirales del mismo origen que las contenidas en el virus utilizado en el desafío, -virus que puede ser el SHIV-, de manera que la secuencia correspondiente al gen env procederá del VIH-1 mientras que las posibles secuencias correspondientes a otros genes, como puedan ser gag, pol o nef, procederán del virus SIV);
- b) Presentar la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que los vectores diseñados para uso en humanos con los que se quieren comparar.

La invención proporciona también vectores que cumplen estas características, que son también un objeto de la presente invención. Así, la invención se refiere también a nuevos vectores recombinantes derivados del virus MVA capaces de expresar simultáneamente una forma de la proteína Env del VIH-1 que carece de la parte correspondiente a la proteína gp41 y una proteína de fusión que contiene secuencias de las proteínas Gag, Pol y Nef del virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV), y en los que la secuencia correspondiente a la proteína Env y la secuencia correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef están bajo el control de promotores idénticos e insertadas ambas en el mismo sitio de inserción del vector. En estos vectores, por tanto, a diferencia de los vectores objeto de la invención diseñados para la vacunación de seres humanos, la proteína de fusión correspondiente a las proteínas Gag, Pol y Nef no se sintetiza a partir de secuencias procedentes de VIH-1, sino de secuencias procedentes del SIVmac (virus de la inmunodeficiencia de simio aislado de macacos). Ello permite su utilización en protocolos de inmunización de macacos y en el posterior desafío de la inmunidad creada con un virus SHIV patógeno en el que la secuencia del gen env deriva de la correspondiente secuencia de un aislado del VIH-1, mientras que las secuencias correspondientes a los genes gag, pol y nef corresponden al virus de simio que infecta a macacos. De esta manera, al cumplirse la condición de que las secuencias codificantes retrovirales contenidas en los vectores objeto de la invención diseñados para realizar ensayos en macacos tengan su origen en el mismo tipo de virus que las presentes en el retrovirus que vaya a utilizarse en el desafío, la inmunidad generada frente a las proteínas sintetizadas a partir de dichos vectores podrá servir para controlar la infección desencadenada por el retrovirus que se inocular en el desafío.

Para que tenga sentido el establecimiento de paralelismos entre los resultados observados en macacos y los que podrían esperarse en seres humanos, los vectores objeto de la invención diseñados para realizar ensayos en macacos cumplen la condición de presentar la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que los vectores objeto de la invención diseñados para la vacunación de seres humanos con los que se quieren comparar. De acuerdo con ello, de forma análoga a los vectores en los que las secuencias codificantes de

antígenos exógenos al MVA se derivan todas ellas de secuencias propias del VIH-1, la expresión de la proteína Env sintetizada a partir de los vectores objeto de la invención diseñados para ser utilizados en macacos da lugar a proteínas gp120 no asociadas a proteínas gp41 o a fragmentos de la misma, facilitándose con ello su salida de la célula y su liberación al medio, lo que a su vez hace más probable la activación de las células B y la producción de anticuerpos neutralizantes frente al VIH. En las realizaciones preferidas de la presente invención, la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env que forma parte de los vectores objeto de la invención codifica una proteína gp120 completa, habiéndose delecionado toda la secuencia del gen env que en la secuencia natural de dicho gen aparece tras el último triplete correspondiente a la proteína gp120, eliminando con ello, la totalidad de la secuencia codificante correspondiente a la proteína gp41. Un esquema referente a la secuencia de la proteína Env que forma parte de los vectores objeto de la invención se muestra en la parte superior de la Figura 40. El último gráfico corresponde a la secuencia de una proteína gp120 expresada a partir de vectores objeto de la invención, y muestra que se ha eliminado la totalidad de la secuencia codificante de la proteína gp41, mientras los gráficos previos representan proteínas de la envuelta con secuencias correspondientes a la proteína gp41.

En cuanto a la proteína de fusión de Gag, Pol y Nef, -también de forma análoga a la proteína homóloga sintetizada a partir de los vectores en los que la correspondiente secuencia codificante deriva de secuencias propias del VIH-1-, está diseñada de manera que no dé lugar a la formación de partículas similares a partículas virales. La forma utilizada para la construcción de las realizaciones de los vectores objeto de la presente invención que se describen con detalle en la presente memoria se acumula en el citoplasma de las células infectadas con los vectores recombinantes objeto de la presente invención en forma de poliproteína, sin experimentar el procesamiento característico del virus VIH provocado por la proteasa viral que daría lugar a su escisión en proteínas más pequeñas, aunque posteriormente sí va a experimentar el procesamiento celular que permite la presentación de péptidos antigénicos de la proteína de fusión y la generación de una respuesta inmune contra los mismos.

Tal como se ha comentado anteriormente, la utilidad principal de los vectores objeto de la presente invención que comprenden secuencias derivadas del virus SIVmac es la de ser utilizados en protocolos de inmunización para extraer datos sobre la posible utilidad como vacunas de vectores diseñados para ser administrados a seres humanos, que deben tener la misma estructura de organización génica, promotores y sitio de inserción. Es por ello que las realizaciones equivalentes a las realizaciones preferidas de los vectores objeto de la presente invención diseñados para la vacunación de seres humanos (exceptuando las que se refieren a aislados del VIH-1 como origen preferido de las secuencias codificantes de las proteínas Env y Gag-Pol-Nef) son también realizaciones preferidas de los vectores diseñados para realizar ensayos en macacos. Así, el lugar del vector en el que se encuentran insertadas las secuencias de la proteína Env y de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef es el gen de la timidina quinasa, puesto que es un gen relacionado con la virulencia que queda inactivado por delección por la presencia de las secuencias en él insertadas, aumentándose con ello la seguridad de los vectores.

En las realizaciones preferidas, la secuencia codificante de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef se genera a partir de secuencias de proteínas Gag, Pol y Nef para las que se deduce una secuencia de ADNc utilizando codones de lectura frecuentes en mamíferos, buscando con ello aumentar los niveles de expresión de la proteína de fusión. Además, en la secuencia codificante de la proteína de fusión se han provocado modificaciones respecto a las secuencias naturales, para aumentar su inmunogenicidad y su seguridad. Las modificaciones por las que se tiene mayor preferencia incluyen la inactivación por mutagénesis del sitio activo de la proteasa y la eliminación mediante delección del sitio activo de la integrasa, la realización de delecciones en el gen nef y su inserción en la región codificante de la RT, la traslocación del sitio activo de la RT al extremo C-terminal de la proteína de fusión, y la fusión de la secuencia del gen gag en fase de lectura con pol-nef, creando una desviación de una fase de lectura e introduciendo un cambio de glicina a alanina para prevenir la formación de partículas semejantes a virus. De entre ellas, se prefiere específicamente las modificaciones realizadas para generar la secuencia correspondiente a la proteína de fusión descrita por Didierlaurent A. *et al.* (18). Tal como sucedía en el caso de las proteínas Gag-Pol-Nef derivadas de secuencias propias del VIH-1, las proteínas de fusión Gag-Pol-Nef que cumplen todas estas características, aunque derivadas en este caso de secuencias propias del virus SIVmac, están representadas por el esquema que se muestra en la zona inferior de la Figura 40, marcada como GagPolNef (gpn).

En las realizaciones preferidas de la invención, el promotor se escoge de manera que permitan la expresión de la proteína Env y de la proteína de fusión Gag-Pol-Env tanto en etapas tempranas como tardías del ciclo infectivo del virus MVA. El promotor sintético temprano/tardío de poxvirus pE/L (19) es la opción elegida para las realizaciones más preferidas de la invención, aunque cualquier otro promotor de poxvirus podría utilizarse igualmente para la construcción de los vectores objeto de la presente invención.

En los Ejemplos 1 y 19 se describe, respectivamente, la construcción de los vectores denominados MVA-B y MVA-C, que suponen sendas realizaciones de los vectores objeto de la presente invención, diseñados para la vacunación de seres humanos, que cumplan en todas las características preferidas para estos vectores de la invención. En ellos, la secuencia correspondiente a la proteína Env se encuentra insertada en dirección opuesta con respecto al sentido de la transcripción de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef, encontrándose los promotores correspondientes a cada una de las secuencias correspondientes a proteínas del VIH insertados en orientaciones opuestas y en la zona más interna del inserto.



Para poder extraer datos sobre la posible protección que estos vectores conferirían a seres humanos vacunados con ellos, en la presente memoria se describe la construcción de un vector, obtenido igualmente a partir del virus MVA, que posee, igualmente insertado en el locus de timidina quinasa, un inserto que comprende la secuencia codificante de una proteína de fusión Gag-Pol-Nef generada a partir de secuencias del virus SIVmac en la que se han realizado todas las modificaciones antes mencionadas, detalladas en la publicación de Didierlaurent *et al.* (18) y bajo el control de un promotor sintético temprano/tardío pE/L, así como la secuencia codificante de una proteína gp120, procedente de un virus VIH-1, que carece totalmente de parte codificante correspondiente a la proteína gp41, igualmente bajo el control de un promotor sintético temprano/tardío pE/L, estando los promotores correspondientes a cada una de las secuencias correspondientes a proteínas del VIH insertados en orientaciones opuestas y en la zona más interna del inserto. A los vectores que cumplen estas características se les ha denominado, de forma general vectores MVA-SHIV.

Para realizar el desafío posterior a la administración del vector MVA-SHIV cuya construcción se describe más adelante en la presente memoria, se ha elegido el virus quimérico de simio y humano SHIV89.6P. Por ello, para poder realizar los experimentos de valoración de la protección conferida por la inmunización con el vector en condiciones óptimas, se ha construido un vector MVA-SHIV cuyo genoma contiene un inserto del que forman parte tanto la secuencia codificante de la proteína 89.6P-gp120, es decir, una secuencia correspondiente a la proteína Env del virus SHIV89.6P (originariamente procedente del aislado 89.6 del virus VIH-1), modificada para que carezca totalmente de la parte correspondiente a la proteína gp41, como secuencias codificantes de los antígenos Gag, Pol y Nef de dicho virus SHIV89.6P (originariamente procedentes del virus de la inmunodeficiencia de simio, aislado de macacos, SIVmac239), a partir de las cuales se ha generado la secuencia correspondiente a la proteína de fusión SIVgpn realizando en ellas las modificaciones preferidas de la presente invención. Es por ello que al vector construido de esta manera se le denomina específicamente vector MVA-89.6P-SIVgpn o, de forma más detallada, vector MVA-gp120-HIV89.6p-SIVmac239-gag-pol-nef.

Tanto en los Ejemplos que describen los ensayos de inmunogenicidad realizados con los vectores MVA-B y MVA-C, como en los Ejemplos encaminados a valorar la capacidad inmunogénica de los vectores objeto de la invención diseñados para realizar ensayos en macacos y, por añadidura, su capacidad para conferir protección frente a infecciones causadas por el SHIV, se ha considerado adecuado disponer también de un control positivo con el que comparar los resultados obtenidos con los vectores derivados de MVA. Para tal finalidad se han utilizado vectores recombinantes derivados de NYVAC con la misma estructura de organización génica, sitio de inserción en el genoma viral (el locus de timidina quinasa (TK)) y los mismos promotores sintéticos tempranos/tardíos, situados en igual disposición que en el vector derivado de MVA con los que se desean comparar: los vectores NYVAC-B (utilizado en los ensayos realizados con MVA-B), NYVAC-C (utilizado en los ensayos realizados con MVA-C) y un vector adicional, previsto para realizar ensayos comparativos con los realizados con los vectores denominados MVA-SHIV, que se ha diseñado específicamente para realizar los ensayos de evaluación de la capacidad protectora descritos en la presente memoria, al que se ha denominado, de forma abreviada, NYVAC-SHIV. Teniendo en cuenta el origen de las secuencias presentes en su inserto, idéntico al origen de las secuencias presentes en el inserto del vector denominado MVA-89.6P-SIVgpn o MVA-gp120-HIV89.6p-SIVmac239-gag-pol-nef con el que se desea comparar, al vector NYVAC-SHIV concreto cuya construcción se describe en la presente memoria se le ha denominado NYVAC-89.6P-SIVgpn o, de forma más detallada, NYVAC-gp120-HIV89.6-SIVmac239-gag-pol-nef. Dada su utilidad como control positivo en los ensayos que constituyen la utilidad principal de los vectores MVA-SHIV de la presente invención, los vectores del tipo NYVAV-SHIV están también comprendidos dentro del alcance de la presente invención. La presente invención se refiere también a composiciones que contienen los vectores recombinantes objeto de la invención que comprenden una secuencia codificante de una forma de la proteína Env del VIH-1 que carece de la parte correspondiente a la proteína gp41 en su totalidad y una secuencia codificante de una proteína de fusión Gag-Pol-Nef derivada de secuencias del virus SIVmac, así como a su uso para valorar la respuesta inmunológica y la capacidad protectora frente a la infección por el VIH desencadenada por vectores con la misma estructura de organización de genes, promotores y sitio de inserción que se pretendan utilizar para la vacunación de seres humanos. La realización preferida de esa forma de utilización de los vectores de la invención consiste en administrárselos a simios, preferiblemente a macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), para evaluar la respuesta inmune producida y la capacidad protectora generada tras dicha administración, sometiéndolos posteriormente a un desafío con un SHIV patógeno. Así se obtiene información relevante para valorar los resultados y evaluar si indican que merece la pena llevar a cabo la siguiente batería de ensayos clínicos en seres humanos con los vectores homólogos previstos para la vacunación de seres humanos, así como información sobre el procedimiento adecuado para realizar dichos ensayos.

Preferiblemente, el protocolo que se siga para la administración de los vectores objeto de la invención a macacos responderá al esquema que se tenga previsto seguir para la vacunación de seres humanos, o a un esquema del cual se desee evaluar su grado de adecuación.

Los ensayos de inmunogenicidad realizados con los vectores MVA-B y MVA-C, descritos posteriormente en la sección de Ejemplos de la presente memoria, así como los ensayos sobre el grado de protección que ofrecen los vectores frente a la infección por el SHIV89.6P realizados en macacos con el vector MVA-89.6P-SIVgpn, son un indicativo tanto de la utilidad como vacunas de los vectores de la invención diseñados para la vacunación de seres

humanos como de la validez de los protocolos de inmunización utilizados. Por todo ello, son también un objeto de la presente invención los métodos de vacunación para prevenir o tratar una infección provocada por el VIH en los que se administra al menos un vector recombinante de la invención, derivado del virus MVA, y capaz de expresar simultáneamente una forma de la proteína Env del VIH-1 que carece de la parte correspondiente a la proteína gp41 en su totalidad y una proteína de fusión que contiene secuencias de las proteínas Gag, Pol y Nef del VIH-1, es decir, uno de los vectores objeto de la presente invención diseñados para la fabricación de medicamentos útiles como vacunas preventivas o terapéuticas contra el SIDA.

Los métodos de vacunación incluidos dentro del alcance de la invención pueden comprender una o más dosis de vacunación, siempre y cuando en una de ellas se administre al menos uno de los vectores de la invención. Se prefieren los métodos en los que se administra más de una dosis de vacunación para desencadenar o potenciar la respuesta inmune. De entre ellos, se prefieren especialmente los protocolos combinados en los que se usan vectores diferentes en la primera dosis de desencadenamiento de la respuesta inmune y en las dosis sucesivas destinadas a reforzar la respuesta desencadenada (dosis de potenciación o refuerzo). Dado que los vectores derivados de MVA parecen ser de mayor utilidad para conseguir una respuesta de protección frente a la infección por el VIH cuando se suministran en la segunda o en dosis sucesivas destinadas al refuerzo de la respuesta inmune previamente desencadenada, lo que más se prefiere es que al menos un vector recombinante derivado del MVA de la invención esté presente en la segunda dosis o en una dosis posterior, pudiendo estar ausente o presente en la primera dosis de vacunación. En los casos en los que al menos un vector derivado de MVA está presente en la segunda dosis y/o en una dosis posterior de vacunación, se prefiere que al menos uno de los vectores administrados en la primera dosis de vacunación sea capaz de expresar las mismas proteínas derivadas del VIH que el vector de la invención presente en otra dosis diferente. De ellos, los vectores derivados del virus NYVAC, NYVAC-B y NYVAC-C y las combinaciones que comprendan ambos vectores son una opción adecuada para ser utilizados en la primera dosis de vacunación como parte de un método de vacunación objeto de la invención cuando el vector de la invención administrado en la segunda y/o en una dosis sucesiva de vacunación es, respectivamente, el vector objeto de la invención que posteriormente se denomina MVA-B o el vector que posteriormente se denomina MVA-C, o bien una composición que comprende tanto el vector MVA-B como el vector MVA-C. También son realizaciones preferidas del método de vacunación de la invención aquellas en las que la primera dosis de vacunación contiene el vector de ADN desnudo DNA-B cuando en la segunda dosis y/o en dosis posteriores de vacunación está presente el vector MVA-B objeto de la presente invención, así como aquellas en las que la primera dosis de vacunación contiene el vector de ADN desnudo DNA-C cuando en la segunda dosis y/o en dosis posteriores de vacunación está presente el vector MVA-C objeto de la invención.

El proceso de construcción de los vectores de la presente invención y los ensayos en los que se evalúa tanto su capacidad inmunogénica y como su capacidad protectora se describe con más detalle con ayuda de las Figuras y los Ejemplos que aparecen más adelante en la presente memoria.

#### Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra un esquema de los mapas de los genomas de los virus MVA (parte superior) y NYVAC (parte inferior), en los que la localización de los genes fragmentados se indica mediante un sombreado oscuro, indicándose su denominación inmediatamente debajo. Los nombres subrayados indican los genes delecionados en el virus MVA e intactos en el virus NYVAC, los nombres en negrita indican los nombres de genes delecionados tanto en el virus MVA como en el virus NYVAC; y los nombres en cursiva indican genes intactos en el virus MVA pero con delecciones en el virus NYVAC. Las letras A a Q situadas sobre cada una de las representaciones de los genomas se refieren a la denominación de los distintos fragmentos de restricción generados por la enzima HindIII al digerir con ella el ADN genómico de los virus MVA y NYVAC. RTI: región terminal izquierda; RCC: región central conservada; RTD: región terminal derecha.

La **Figura 2** muestra un esquema del proceso de construcción del vector plasmídico de transferencia pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1 y los plásmidos a partir de los cuales se genera.

La **Figura 3** muestra los fragmentos generados en el análisis por PCR del locus TK del virus MVA-B. La parte superior de la figura muestra un esquema en el que se representan las posiciones de los oligonucleótidos utilizados como cebadores, los tamaños estimados de los fragmentos que se generan en el curso de la PCR con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos, así como su localización con respecto a los insertos y las secuencias flanqueantes de los mismos. La parte inferior muestra fotografías de los geles obtenidos al someter a electroforesis los productos de los diferentes análisis por PCR realizados con diferentes parejas de cebadores. A: PCR cebada con los oligonucleótidos TK-L y GPN7649; B: PCR cebada con los oligonucleótidos GPN8170 y E/L; C: PCR cebada con los oligonucleótidos BX08556/TK-R. Las muestras correspondientes a cada calle son: 1: pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1; 2: MVA-B; 3: MVA-WT; 4: NYVAC-WT.



La **Figura 4** muestra una fotografía de un gel obtenido al someter a electroforesis los productos resultantes de una reacción de PCR en la que se utilizaron como cebadores oligonucleótidos que hibridaban con las secuencias flanqueantes del gen TK. Las muestras correspondientes a cada calle son: 1: NYVAC-WT; 2: MVA-B; 3: MVA-WT.

5 La **Figura 5** muestra los resultados del análisis por transferencia tipo Western de la expresión de los genes heterólogos gp120-BX08 (parte superior de la figura) y gagpolnef-IIIB (parte inferior de la figura, en la que la proteína gagpolnef-IIIB se abrevia como GPN) desde un vector NYVAC-B (primera calle), desde los stocks P1, P2 y P3 (calles 2-4: P1, P2 y P3) y desde células en las que se había simulado la infección (calle 5).

10 La **Figura 6** muestra los resultados correspondientes a las pruebas de estabilidad del vector MVA-B. La parte A muestra los resultados de las inmunotinciones de células CEF infectadas con el vector MVA-B y tratadas con los anticuerpos anti-WR (fotografía de la izquierda), anti-p24 (fotografía central) y anti-gp120 (fotografía de la derecha), junto con un gráfico en el que se representa el total de células teñidas con cada anticuerpo. La parte B muestra la detección de la expresión de las proteínas gagpolnef-IIIB (fotografía de la izquierda) y gp120-BX08 (fotografía de la derecha) mediante transferencia tipo Western y detección con anticuerpos dirigidos contra dichas proteínas en células infectadas con el virus recombinante NYVAC-B (NYVACB), células en las que se había simulado la infección (M) y stocks de virus correspondientes a los pases 7 a 10 (P7, P8, P9 y P10).

20 La **Figura 7** muestra la cinética de expresión de la proteína gp120-BX08 obtenida mediante el análisis con un anticuerpo anti-gp120 del clade B de transferencias tipo Western correspondientes a muestras tomadas pasadas 4, 8, 16 y 24 horas de una infección con un virus recombinante. La parte superior corresponde a la infección con el virus MVA-B y la inferior a la infección con el virus NYVAC-B. Para cada una de las muestras aparece inmediatamente debajo la intensidad de la señal lograda al incubar las muestras con un anticuerpo anti- $\beta$ -actina ( $\beta$ -act.) P: precipitado; S: sobrenadante; M: simulación de infección.

25 La **Figura 8** muestra la cinética de expresión de la proteína gagpolnef-IIIB obtenida mediante el análisis con un anticuerpo anti-p24 del clade B de transferencias tipo Western correspondiente a muestras tomadas pasadas 6, 18 y 24 horas de una infección con un virus recombinante. Las calles marcadas como "1" corresponden a muestras infectadas con el virus NYVAC-B, las calles marcadas como "2" a muestras infectadas con el virus MVA-B y la calle marcada con la letra "M" a una muestra en la que se simuló la infección. La flecha indica la posición de la proteína gagpolnef-IIIB (abreviada como GPN).

30 El gráfico mostrad en la **Figura 9** representa la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IFN- $\gamma$  generadas por la inmunización de ratones BALB/c con virus recombinantes a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-BX08 y gagpolnef-IIIB. En ordenadas se indica el número de células T secretoras de IFN- $\gamma$  detectadas por cada  $10^6$  esplenocitos, específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade B que se indican en abscisas. Para cada uno de esos grupos de péptidos, la primera barra corresponde al valor detectado en animales inmunizados con MVA-B y la segunda a animales inmunizados con NYVAC-B.

40 La **Figura 10** muestra la producción de citoquinas detectada en ratones BALB/c inmunizados con virus recombinantes a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-BX08 y gagpolnef-IIIB. La parte izquierda corresponde a los niveles de IFN- $\gamma$  y la derecha a los niveles de IL-10, ambos en pg/ml, detectados en los sobrenadantes de esplenocitos de animales inoculados con MVA-B (primera barra de cada uno de los grupos de péptidos) o NYVAC-B (segunda barra de cada uno de los grupos de péptidos) frente a grupos específicos de péptidos representativos del clade B.

45 La **Figura 11** muestra gráficos correspondientes a los niveles de distintos tipos de células T secretoras de IFN- $\gamma$  y presentes en los esplenocitos de ratones BALB/c inoculados con MVA-B (primera barra de cada grupo de péptidos) o NYVAC-B (segunda barra de cada grupo de péptidos) reestimulados por los grupos de péptidos representativos del clade B indicados en el eje X. El gráfico superior muestra el porcentaje de células T CD8 $^{+}$  que secretan IFN- $\gamma$ , el gráfico intermedio muestra el porcentaje de células T CD4 $^{+}$  que secretan IFN- $\gamma$  y el gráfico inferior muestra el porcentaje total de células T CD8 $^{+}$  y T CD4 $^{+}$  que secretan IFN- $\gamma$ , todos ellos detectados por cada  $3 \times 10^5$  esplenocitos.

50 La **Figura 12** muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IFN- $\gamma$  generadas por la inmunización de ratones BALB/c con distintas combinaciones de vectores a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-BX08 y gagpolnef-IIIB, así como los resultados correspondientes a los controles, en todos los casos administrando los vectores siguiendo protocolos de inducción/potenciación. En el eje Y se indica el número de células T secretoras de IFN- $\gamma$  detectadas por cada  $10^6$  esplenocitos, específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade B que se indican en el eje X. Para cada uno de esos péptidos, la primera barra corresponde al valor detectado en animales inmunizados con DNA-B+MVA-B, la segunda a animales inmunizados con DNA-B+NYVAC-B, la tercera a animales inmunizados con DNA-B+DNA-B, la cuarta a animales inmunizados con DNA  $\emptyset$  +MVA-WT y la última a animales inmunizados con DNA  $\emptyset$  + NYVAC-WT. Los círculos (•) bajo las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo; los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos grupos.

La **Figura 13** muestra la producción de IFN- $\gamma$ , expresada en pg/ml, generada tras la reestimulación, con los grupos de péptidos indicados en el eje X, de esplenocitos extraídos de ratones BALB/c inmunizados mediante protocolos de combinación de inducción/potenciación en los que se incluye el DNA-B en la primera dosis de iniciación de la respuesta excepto en la última muestra, que se inocula con ADN sin inserto (DNA- $\phi$ ), inoculándose en la segunda dosis de potenciación de la respuesta lo siguiente: MVA-B (primera barra de cada grupo), NYVAC-B (segunda barra), DNA-B de nuevo (tercera barra), MVA-WT (cuarta barra) y NYVAC-WT (quinta barra, correspondiente a la muestra a la que se le inoculó primeramente DNA- $\phi$ ).

La **Figura 14** muestra la producción de quimioquinas, expresada en pg/ml y generada tras la reestimulación con los grupos de péptidos del clade B indicados en el eje X, de esplenocitos extraídos de ratones BALB/c inmunizados mediante protocolos de combinación de inducción/potenciación en los que se incluye el DNA-B en la primera dosis de iniciación de la respuesta salvo en el control, que se inoculó con ADN sin inserto (DNA- $\phi$ ), inoculándose en la segunda dosis de potenciación de la respuesta MVA-B (primera barra de cada grupo), NYVAC-B (segunda barra), DNA-B de nuevo (tercera barra), y NYVAC-WT (cuarta barra, correspondiente al control inoculado primeramente con DNA- $\phi$ ). El gráfico de la izquierda corresponde a la concentración detectada de MIP-1  $\beta$  y el de la derecha a la concentración detectada de RANTES.

La **Figura 15** muestra gráficos correspondientes a los niveles de distintos tipos de células T secretoras de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  presentes en esplenocitos reestimulados por los grupos de péptidos representativos del clade B indicados en el eje X tras haber sido extraídos de ratones BALB/c inmunizados mediante protocolos combinados de inducción/potenciación en los que se incluye el DNA-B en la primera dosis de iniciación de la respuesta -salvo en los controles, que fueron inoculados con ADN sin inserto (DNA- $\phi$ )-, inoculándose en la segunda dosis de potenciación de la respuesta MVA-B (primera barra de cada grupo), NYVAC-B (segunda barra) y DNA-B de nuevo (tercera barra), mientras que los controles inoculados con DNA- $\phi$  recibieron en la segunda dosis MVA-WT (cuarta barra) o NYVAC-WT (quinta barra). La parte superior corresponde a células productoras de IFN- $\gamma$  y la inferior a células productoras de TNF- $\alpha$ . Los gráficos de la izquierda corresponden a las células CD8 $^{+}$ , los gráficos intermedios a las células CD4 $^{+}$  y los gráficos de la derecha al total de células implicadas. En cada caso, el valor dado se refiere a número de células secretoras de cada tipo (CD8 $^{+}$ , CD4 $^{+}$ , total) detectadas por cada  $3 \times 10^5$  esplenocitos.

La **Figura 16** muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IFN- $\gamma$  específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade B indicados en el eje X, generadas por la inmunización de ratones BALB/c mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se combinan vectores derivados de Vaccinia a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-BX08 y gagpolnef-IIIb. En el eje Y se indica el número de células T secretoras de IFN- $\gamma$ , específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade B que se indican en el eje X, detectadas por cada  $10^6$  esplenocitos. Para cada uno de esos péptidos, la primera barra corresponde al valor detectado en animales inmunizados con NYVAC-B+MVA-B, la segunda a animales inmunizados con MVA-B+NYVAC-B y la tercera a animales inmunizados con MVA-WT+NYVAC-WT.

La **Figura 17** muestra la producción de IFN- $\gamma$ , expresada en pg/ml, generada tras la reestimulación con los grupos de péptidos del clade B indicados en el eje X, de esplenocitos extraídos de ratones BALB/c inmunizados mediante protocolos de combinación de inducción/potenciación en los que se combinan vectores derivados de Vaccinia a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-BX08 y gagpolnef-IIIb: NYVAC-B+MVA-B (primera barra), MVA-B+NYVAC-B (segunda barra) y MVA-WT+NYVAC-WT (tercera barra).

La **Figura 18** muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IFN- $\gamma$  específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade B indicados en el eje X, generadas por la inmunización de ratones humanizados HHDII mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se incluye el DNA-B en la primera dosis de inducción de la respuesta, inoculándose en la segunda dosis de potenciación de la respuesta MVA-B (primera barra de cada grupo) o NYVAC-B (segunda barra). La tercera barra corresponde al control de inoculación de un ADN sin inserto (DNA  $\emptyset$ ) en la primera dosis y MVA-WT en la segunda. Los círculos (•) bajo las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo; los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos grupos.

La **Figura 19** muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IL-2 específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade B indicados en el eje X, generadas por la inmunización de ratones HHDII mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se incluye el DNA-B en la primera dosis de inducción de la respuesta, inoculándose en la segunda dosis de potenciación de la respuesta MVA-B (primera barra de cada grupo) o NYVAC-B (segunda barra). La tercera barra corresponde al control de inoculación de un DNA sin inserto (DNA  $\emptyset$ ) en la primera dosis y MVA-WT en la segunda. Los círculos (•) bajo las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo; los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos grupos.

La **Figura 20** muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IFN- $\gamma$  específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade B indicados en el eje X, generadas por la

inmunización de ratones humanizados HHDI mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se combinan vectores derivados de Vaccinia a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-BX08 y gagpolnef-IIIB. En el eje Y se indica el número de células T secretoras de IFN- $\gamma$ , específicas para cada uno de los grupos de péptidos, detectadas por cada  $10^6$  esplenocitos. Para cada uno de esos grupos de péptidos, la primera barra corresponde al valor detectado en animales inmunizados con MVA+NYVAC-B, la segunda a animales inmunizados con NYVAC-B+MVA-B, la tercera a animales inmunizados con MVA-B+MVA-B, la cuarta a animales inmunizados con NYVAC-B+NYVAC-B y la quinta a animales inmunizados con NYVAC-WT+MVA-WT. Los círculos (•) bajo las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo.

La **Figura 21** muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IL-2 específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade B indicados en el eje X, presentes por cada  $10^6$  esplenocitos de ratones HHDI inmunizados mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se combinan vectores derivados de Vaccinia a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-BX08 y gagpolnef-IIIB. Para cada uno de esos grupos de péptidos, la primera barra corresponde al valor detectado en animales inmunizados con MVA+NYVAC-B, la segunda a animales inmunizados con NYVAC-B+MVA-B, la tercera a animales inmunizados con MVA-B+MVA-B, la cuarta a animales inmunizados con NYVAC-B+NYVAC-B y la quinta a animales inmunizados con NYVAC-WT+MVA-WT. Los círculos (•) bajo las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo.

La **Figura 22** muestra un esquema de la construcción del vector plasmídico de transferencia pLZAW1gp120B/gagpolnef-C-14 y los plásmidos a partir de los cuales se genera.

La **Figura 23** muestra los fragmentos generados en el análisis por PCR del locus TK del virus MVA-C. La parte superior de la figura muestra un esquema de los tamaños de los fragmentos que se generan con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos, así como su localización con respecto a los insertos y las secuencias flanqueantes de los mismos. La parte inferior muestra fotografías de los geles obtenidos al someter a electroforesis los productos de las PCR realizadas con diferentes parejas de cebadores.

A: PCR cebada con los oligonucleótidos TK-L y gp120-1213;  
B: PCR cebada con los oligonucleótidos gp120-1050 y gp120-10;  
C: PCR cebada con los oligonucleótidos GPN-2018 y GPN-3820;  
D: PCR cebada con los oligonucleótidos GPN-4000 y TK-R;  
E: PCR cebada con los oligonucleótidos GPN-802 y GPN-2198.

Las muestras correspondientes a cada calle son:

1: NYVAC-C;  
2: MVA-C (P2);  
3: MVA-WT;  
4: NYVAC-WT.

La **Figura 24** muestra, en su parte superior, un esquema de los fragmentos obtenidos al amplificar mediante PCR el locus TK a partir de muestras que contienen o carecen de insertos en dicho locus, mientras que la parte inferior es una fotografía de un gel obtenido al someter a electroforesis los productos resultantes de una reacción de PCR en la que se utilizaron como cebadores oligonucleótidos que hibridaban con las secuencias flanqueantes del gen TK. Las muestras fueron: NYVAC-C (calle 1), MVA-C correspondiente a los stocks P1 (calle 2) y P2 (calle 3) y MVA-WT (calle 4).

La **Figura 25** muestra los resultados del análisis por transferencia tipo Western de la expresión de los genes heterólogos gp120-C (parte superior) y gagpolnef-C (parte inferior, en la que la proteína gagpolnef-C se abrevia como GPN) desde un vector NYVAC-C (última calle), desde los stocks P2 y P3 (calles primera y segunda, marcadas como P2-M y P3, respectivamente) y desde células en las que se había simulado la infección (M).

La **Figura 26** muestra los resultados correspondientes a las pruebas de estabilidad del vector MVA-C. La parte A muestra los resultados de las inmunotinciones de células CEF infectadas con el vector MVA-C y tratadas con los anticuerpos anti-WR (fotografía de la izquierda), anti-gp120 específico del clade C (fotografía central) y anti-p24 específico del clade C (fotografía de la derecha), así como un gráfico en el que se representan los porcentajes de las placas teñidas con cada uno de los anticuerpos calculados con respecto al total de placas teñidas con el anticuerpo anti-WR. La parte B muestra la detección de la expresión de las proteínas gagpolnef-C (fotografía de la izquierda) y gp120-C (fotografía de la derecha) mediante transferencias tipo Western y detección con anticuerpos dirigidos contra dichas proteínas en células infectadas con el virus recombinante NYVAC-C (calles marcadas como "NYVAC-C", células en las que se había simulado la infección (calles marcadas como "CEF" y stocks de virus correspondientes a los pases 7 a 10 (calles marcadas como P7, P8, P9 y P10).

La **Figura 27** muestra la cinética de expresión de la proteína gp120-C obtenida mediante el análisis con un anticuerpo anti-gp120 del clade C de transferencias tipo Western correspondientes a muestras tomadas pasadas 6, 18, y 24 horas de una infección con un virus recombinante. La parte superior corresponde a la infección con el virus MVA-C y la inferior a la infección con el virus NYVAC-C. Para cada una de las muestras aparece inmediatamente debajo la intensidad de la señal lograda al incubar las muestras con un anticuerpo anti- $\beta$ -actina ( $\beta$ -act.). P: precipitado; S: sobrenadante; M: simulación de infección. P: precipitado; S: sobrenadante; M: simulación de infección.

La **Figura 28** muestra la cinética de expresión de la proteína gagpolnef-C obtenida mediante el análisis con un anticuerpo anti-p24 del clade C de transferencias tipo Western correspondientes a precipitados celulares de muestras tomadas pasadas 6, 18 y 24 horas de una infección con un virus recombinante. Las calles marcadas como "1" corresponden a muestras infectadas con el virus MVA-C, las calles marcadas como "2" a muestras infectadas con el virus NYVAC-C y las calles marcadas como M a muestras en las que se simuló la infección. La flecha indica la posición de la proteína gagpolnef-C (abreviada como GPN).

La **Figura 29** muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IFN- $\gamma$  generadas por la inmunización de ratones humanizados HDDII con virus recombinantes a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-C y gagpolnef-C. La parte A corresponde a las células T secretoras de IFN- $\gamma$ , detectadas por cada  $10^6$  esplenocitos, específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade C que se indican en el eje X. La parte B corresponde a las células T secretoras de IFN- $\gamma$  generadas contra la parte de los virus recombinantes que deriva de Vaccinia. Tanto en el caso de los péptidos (parte A) como en el de la respuesta anti-Vaccinia, la primera barra corresponde al valor detectado en animales inmunizados con MVA-C y la segunda a animales inmunizados con NYVAC-C.

La **Figura 30** muestra la producción de citoquinas detectada en ratones HDDII inmunizados con virus recombinantes a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-C y gagpolnef-C. La parte superior corresponde a los niveles de IFN- $\gamma$  y la inferior a los niveles de IL-10, ambos expresados en pg/ml, detectados en los sobrenadantes de esplenocitos de animales inoculados con MVA-C (primera barra de cada uno de los grupos de péptidos) o NYVAC-C (segunda barra de cada uno de los grupos de péptidos) frente a grupos específicos de péptidos representativos del clade C.

La **Figura 31** muestra gráficos correspondientes a los porcentajes de distintos tipos de células T productoras de IFN- $\gamma$  generadas frente a grupos de péptidos específicos representativos del clade C por la inoculación de MVA-C (primera barra de cada grupo de péptidos) o NYVAC-C (segunda barra de cada grupo de péptidos) a ratones HDDII. El gráfico superior representa el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> respecto al total de células secretoras de IFN- $\gamma$ , el gráfico intermedio el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> y el gráfico inferior al porcentaje que la suma de las células CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> anteriores supone sobre el total de células secretoras de IFN- $\gamma$ .

La **Figura 32** muestra la respuesta humoral generada por inoculación de MVA-C o NYVAC-C a ratones HDDII o C57/BL6 mediante los valores de densidad óptica a 492 nm obtenidos al detectar por ELISA anticuerpos IgG frente a: (A) extractos celulares de una infección con Vaccinia; (B) proteína Gag o (C) la proteína gp160. Los grupos de inmunización fueron: 1: MVA-C en HDDII; 2: MVA-C en C57/BL6; 3: NYVAC-C en HDDII; 4: NYVAC-C en C57/BL6; 5: control.

En cada grupo, la situación de los símbolos marca el valor obtenido para cada uno de los ratones del grupo: ♦: ratón 1; ■: ratón 2; ▲: ratón 3; ●: ratón 4; la posición de la barra horizontal — indica el valor medio correspondiente a los cuatro ratones de cada grupo.

La **Figura 33** muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IFN- $\gamma$  específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade C indicados en el eje X, presentes por cada  $10^6$  esplenocitos de ratones HDDII inmunizados mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se incluye el DNA-C en la primera dosis de inducción de la respuesta, inoculándose en la segunda dosis de potenciación de la respuesta MVA-C (primera barra de cada grupo) o NYVAC-C (segunda barra). La tercera barra corresponde al control de inoculación de un ADN sin inserto (DNA  $\emptyset$ ) en la primera dosis y NYVAC-WT en la segunda. Los círculos (●) bajo las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo; la presencia de asteriscos indica diferencias significativas entre los distintos grupos: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$ .

La **Figura 34** muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IL-2 específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade C indicados en el eje X, presentes por cada  $10^6$  esplenocitos de ratones HDDII inmunizados mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se incluye el DNA-C en la primera dosis de inducción de la respuesta, inoculándose en la segunda dosis de potenciación de la respuesta MVA-C (primera barra de cada grupo) o NYVAC-C (segunda barra). La tercera barra corresponde al control de inoculación de un ADN sin inserto (DNA  $\emptyset$ ) en la primera dosis y NYVAC-WT en la segunda. Los círculos (●) bajo las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo; los asteriscos indica diferencias significativas entre los distintos grupos: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$ .

La **Figura 35** muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IFN- $\gamma$  específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade C indicados en el eje X, presentes por cada  $10^6$  esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se combinan vectores derivados de Vaccinia a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-C y gagpolnef-C. Para cada uno de esos grupos de péptidos, la primera barra corresponde al valor detectado en animales inmunizados con NYVAC-C+MVA-C, la segunda a animales inmunizados con MVA-C+MVA-C, la tercera a animales inmunizados con MVA-C+NYVAC-C, la cuarta a animales inmunizados con NYVAC-C+NYVAC-C y la quinta a animales inmunizados con NYVAC-WT+MVA-WT. Los círculos (•) bajo las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo; los asteriscos indican diferencias significativas entre los distintos grupos: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$ .

La **Figura 36** muestra la producción de citoquinas detectada tras la inmunización de ratones BALB/c mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se combinan vectores derivados de Vaccinia a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-C y gagpolnef-C. La parte izquierda corresponde a los niveles de IFN- $\gamma$  (expresados en ng/ml) y la derecha a los niveles de IL-10 (expresados en pg/ml), detectados en los sobrenadantes de esplenocitos, reestimulados con cada uno de los grupos de péptidos del clade C indicados junto a cada grupo de barras, extraídos de animales inoculados con: MVA-C+NYVAC-C (primera barra de cada grupo), MVA-C+MVA-C (segunda barra), NYVAC-C+MVA-C (tercera barra), NYVAC-C+NYVAC-C (cuarta barra), NYVAC-WT+MVA-WT (quinta barra) o MVA-WT+NYVAC-WT (sexta barra).

La **Figura 37** muestra gráficos correspondientes a los niveles de distintos tipos de células T secretoras de IFN- $\gamma$  y presentes en los esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se combinan vectores derivados de Vaccinia a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-C y gagpolnef-C, tras ser reestimulados por los grupos de péptidos representativos del clade C indicados en el eje X. El gráfico superior corresponde a las células CD8<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  presentes por cada  $3 \times 10^5$  células CD8<sup>+</sup>, el gráfico intermedio a las células CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  presentes por cada  $3 \times 10^5$  células CD4<sup>+</sup> y el gráfico inferior al conjunto de células CD8<sup>+</sup> más CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  presentes por cada  $3 \times 10^5$  células CD8<sup>+</sup> más CD4<sup>+</sup>. Las barras que se aparecen en cada grupo de péptidos corresponden a animales inoculados con: NYVAC-C+MVA-C (primera barra de cada grupo), MVA-C+MVA-C (segunda barra), MVA-C+NYVAC-C (tercera barra), NYVAC-C+NYVAC-C (cuarta barra), NYVAC-WT+MVA-WT (quinta barra).

La **Figura 38a** muestra los resultados obtenidos al tratar con anticuerpos dirigidos contra la proteína PARP lisados de células HeLa recogidos transcurrido los distintos tiempos, expresados en horas, que se indican sobre las calles, tras la infección con MVA-WT (calles encabezadas por "MVA") o con NYVAC (calles encabezadas por "NYVAC"). PARPc indica la posición de la proteína PARP completa; PARPf indica la posición de la proteína PARP que ha sufrido una rotura específica. La parte inferior muestra la intensidad de las señales logradas al incubar las muestras con un anticuerpo anti- $\beta$ -actina ( $\beta$ -act.).

La **Figura 38b** muestra las señales de inmunofluorescencia detectadas a partir de células infectadas con MVA-WT (fotografía superior) o NYVAC-WT (fotografía inferior) cuyos núcleos habían sido teñidos con DAPI.

La **Figura 38c** muestra una fotografía de un gel obtenido al someter a electroforesis muestras de ARN ribosómico obtenidas de células HeLa transcurridos los intervalos de tiempo de 18 y 24 horas que se indican sobre las calles, tras infectar dichas células con: muestras carentes de virus (pocillos marcados como "HeLa"), virus Vaccinia silvestre de la cepa Western Reserve (pocillos marcados como "WR"), MVA-WT (pocillos marcados como "MVA"), o NYVAC-WT (pocillos marcados como "NYVAC"). Se indican las posiciones en las que se detectan los ARN ribosómicos 28S (28S rRNA) y 18S (18S rRNA) y la de las bandas resultantes de su degradación.

La **Figura 38d** muestra un gráfico en el que se indica el factor de incremento del número de células apoptóticas detectado mediante citometría de flujo en células HeLa infectadas según se indica en el eje X: M: simulación de infección; WR: infección con virus Vaccinia silvestre de la cepa Western Reserve; MVA: infección con MVA-WR; NYVAC: infección con NYVAC-WT. Los signos "-" y "+" indican, respectivamente, la ausencia o la presencia del inhibidor de caspasas zVAD en las muestras utilizadas para provocar la infección.

La **Figura 39** muestra un esquema de la organización del genoma del virus quimérico de la inmunodeficiencia de simio y humano SHIV89.6P. Las secuencias representadas por rectángulos rellenos provienen del genoma del virus de simio SIVmac239, mientras que las secuencias representadas por rectángulos sin relleno provienen del genoma del aislado 89.6 del virus VIH-1.

La **Figura 40** muestra la estructura de las secuencias codificantes de antígenos de retrovirus presentes en los vectores objeto de la presente invención. La parte superior, encabezada por la abreviatura "Env" corresponde a distintas formas de la secuencia correspondiente a la proteína de la envuelta, de las que la última, la marcada como "C-env-120", representa la presente en los vectores objeto de la invención, carente por completo de la parte correspondiente a la proteína gp41. La parte inferior muestra el esquema correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef sintetizada a partir de los vectores cuya construcción se describe en la sección de Ejemplos. Las

modificaciones realizadas sobre las secuencias deducidas a partir de las proteínas del SHIV89.P, generadas deduciendo la secuencia de tripletes correspondientes a las secuencias de aminoácidos de las proteínas -utilizando para ello los codones más frecuentes en mamíferos-, fueron las siguientes modificaciones principales: la secuencia correspondiente al antígeno Gag que incluye las proteínas de la matriz (MA), la cápsida (CA), p2 y p7 se ligó respetando el marco de lectura (en el punto marcado como FS-1) con la secuencia correspondiente al antígeno Pol que carecía de dominio integrasa; además, el sitio activo de la transcriptasa en reverso (RT) fue reemplazado por un gen nef en el que se había alterado el orden de los aminoácidos (sc-nef), de manera que la zona que de forma natural contiene el extremo carboxilo (RT-C) fuera la parte inicial, mientras la zona que de forma natural contiene el extremo amino (RT-A) pasó a ser la zona final; la secuencia de RT que solapa con el sitio activo (sitio activo, RT) se traslocó respetando el marco de lectura al extremo 3' de la secuencia codificante de la proteína de fusión; adicionalmente, la glicina del extremo amino se sustituyó por alanina ( $\Delta\text{Myr}$  (G→A)) para impedir su miristilación, mientras se anulaba la actividad enzimática de la proteasa (XPR) introduciendo una mutación puntual en su sitio activo ( $\Delta\text{PRr}$  (D→N)).

La **Figura 41** muestra un esquema de la construcción del vector plasmídico de transferencia pLZAW-1-89.6P-SIVgpn-18 y de los plásmidos a partir de los cuales se genera.

La **Figura 41a** muestra los pasos necesarios para la obtención del vector pLZAW1-89.6P-9;

la **Figura 41b** muestra los pasos necesarios para la obtención del vector pLZAW-1-89.6P-SIVgpn-18 a partir del vector pLZAW-1-89.6P-9. En ambos casos la parte correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef, denominada posteriormente "SIVgpn" se indica en la Figura como "SIVsyngagapolnef", mientras la parte correspondiente a la proteína de la envuelta, denominada posteriormente 89.6gp120, aparece indicada como "89.6Psynenv120".

La **Figura 42** muestra los fragmentos generados en el análisis por PCR del locus de timidina quinasa (TK) del virus MVA-89.6P-SIVgpn. La parte superior de la figura, marcada como "A" muestra un esquema en el que se representan las posiciones de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados como cebadores respecto a los brazos izquierdo (TK-L) y derecho (TK-D) del locus TK, así como los tamaños estimados de los fragmentos que se generan en la PCR realizada utilizando como molde el virus MVA-89.6P-SIVgpn (primera línea del gráfico) o el virus MVA sin inserto (línea inferior del gráfico, situada en la zona marcada como "WT"). La parte inferior, marcada como "B", muestra la fotografía del gel obtenido al someter a electroforesis los productos de las PCR realizadas con los cebadores TK-L y TK-R2 sobre ADN extraído de células infectadas con MVA-WT (calle 3), el stock P2 del MVA-89.6P-SIVgpn (calle 4), el stock P3 del MVA-89.6P-SIVgpn (calle 5) o transfectadas con el plásmido pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18 (control positivo, C+) (calle 2). La calle 1 corresponde a un marcador de tamaño.

La **Figura 43** muestra los resultados del análisis por transferencia tipo Western de la expresión de los genes heterólogos 89.6p-gp120 (parte superior de la figura, marcada como "anti-gp120", en la que la posición de la proteína se indica mediante la flecha etiquetada como "89.6P") y SIVgpn (parte inferior de la figura, marcada como "anti-SIVp27", en la que la posición de la proteína SIVgpn se indica mediante la flecha etiquetada como "GPN") detectada en extractos de células transfectadas de forma transitoria con el plásmido pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18 (segunda calle, marcada como "C+") o en extractos de células infectadas con los stocks P1 (tercera calle, marcada como "P1"), P2 (cuarta calle, marcada como "P2") y P3 (quinta calle, marcada como "P3") del virus MVA-89.6P-SIVgpn, o desde células tratadas en las mismas condiciones pero que no habían entrado en contacto ni con el plásmido pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18 ni con ningún stock de virus (cultivos de células en las que se simuló la infección, analizadas en la primera calle, marcada como "M").

La **Figura 44** muestra, en la parte superior, los resultados de las inmunotinciones de células CEF infectadas con el vector MVA-89.6P-SIVgpn y tratadas con anticuerpos anti-WR (que reconoce la parte del vector derivada de MVA) (fotografía de la izquierda), anti-gp120 (fotografía central) y anti-SIVp27 (que reconoce la parte de la proteína SIVgpn correspondiente a la proteína p27) fotografía de la derecha), mientras en la parte inferior aparece un gráfico en el que se representan los porcentajes de las placas teñidas con cada uno de los anticuerpos calculados con respecto al total de placas teñidas con el anticuerpo anti-WR.

La **Figura 45** muestra los fragmentos generados en el análisis por PCR del locus TK del virus NYVAC-89.6P-SIVgpn. La parte superior de la figura, marcada como "A", muestra un esquema en el que se representan las posiciones de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados como cebadores respecto a los brazos izquierdo (TK-L) y derecho (TK-R) del locus TK, así como los tamaños estimados de los fragmentos que se generan en la PCR realizada utilizando como molde: el virus NYVAC-89.6P-SIVgpn (primera línea del gráfico) o el virus NYVAC sin inserto, (línea inferior de la parte del gráfico marcada como "NYVAC-WT"). La parte inferior, marcada como "B", muestra la fotografía del gel obtenido al someter a electroforesis los productos de las PCR realizadas con los cebadores TK-L y TK-R2 sobre ADN extraído de células infectadas con NYVAC-WT (calle 2), el stock P3 del NYVAC-89.6P-SIVgpn (calle 3), el stock P3 del MVA-89.6P-SIVgpn (calle 4) o el virus MVA-WT, que carece de inserto (calle 5). La calle 1 corresponde a un marcador de tamaño.

La **Figura 46** muestra los resultados del análisis por transferencia tipo Western de la expresión de los genes heterólogos 89.6p-gp120 (parte superior de la figura, marcada como "anti-gp120", en la que la posición de la proteína se indica mediante la flecha etiquetada como "89.6P") y SIVgpn (parte inferior de la figura, marcada como

"anti-SIVp27", en la que la posición de la proteína SIVgpn se indica mediante la flecha etiquetada como "GPN" detectada en extractos de células infectadas con los stocks P1 (calle 3), P2 (calle 4) y P3 (calle 5) del vector NYVAC-89.6P-SIVgpn, con el stock P3 del vector MVA-89.6P-SIVgpn (calle 2) o en extractos de células tratadas en las mismas condiciones pero que no habían entrado en contacto con ningún stock de virus (cultivos de células en las que se simuló la infección, analizadas en la calle 1).

La **Figura 47** muestra, en la parte superior, los resultados de las inmunotinciones de células CEF infectadas con el vector NYVAC-89.6P-SIVgpn y tratadas con los anticuerpos anti-WR (fotografía de la izquierda), anti-gp120 (fotografía central) y anti-SIVp27 (fotografía de la derecha), mientras en la parte inferior aparece un gráfico en el que se representan los porcentajes de las placas teñidas con cada uno de los anticuerpos calculados con respecto al total de placas teñidas con el anticuerpo anti-WR.

La **Figura 48** muestra fotografías de transferencias tipo Western de geles de poliacrilamida en los que se había sometido a electroforesis extractos de células infectadas con diferentes stocks P3 de los virus NYVAC-89.6P-SIVgpn (calles 1 y 2, correspondientes, respectivamente a los stocks P3.1 (29/01/04) y P3.2 (25/02/04)) y MVA-89.6P-SIVgpn (stocks P3 del 20/06/03 (calle 3), P3 del 20/09/04 (calle 4), P3.1 del 20/09/04 (calle 5) y P3.2, del 1/10/04 (calle 6). La calle 7 corresponde a un extracto de células en las que se había simulado la infección. La fotografía de la izquierda corresponde a la incubación con un anticuerpo policlonal de conejo anti-gp120; la posición de la proteína 89.6P-gp120 se indica mediante una flecha marcada como "89.6P". La fotografía de la derecha corresponde a la incubación con un anticuerpo monoclonal anti-SIV-gag-p27, que reconoce la proteína SIVgpn, cuya posición en el gel se indica mediante una flecha marcada como "SIVgpn".

La **Figura 49** muestra un esquema del estudio realizado en macacos para evaluar la inmunogenicidad y eficacia como vacunas frente al virus SHIV de los vectores derivados de poxvirus objeto de la presente invención. Los números del esquema marcan los distintos eventos. Los números situados debajo de la segunda línea horizontal indican el tiempo transcurrido, en semanas, desde el comienzo del estudio. El punto 0 corresponde al momento de inoculación del primer vector de vacunación. Las flechas gruesas indican los momentos en los que se inoculó a los macacos bien un vector de vacunación, bien un virus capaz de producir infección, según se indica en la línea inferior: ADN: inoculación de DNA-SHIV, es decir, dos plásmidos desnudos con insertos correspondiente a secuencias codificantes de proteínas del SHIV89.6P, Env (pcDNA-gp120 89.6p) y SIVgpn (pcDNA-gag-pol-nef) (grupos 1 y 2), o del plásmido desnudo carente de inserto DNA-emp (grupo 3), NYVAC vs MVA: inoculación de los vectores derivados de poxvirus NYVAC-89.6P-SIVgpn (grupo 2), MVA-89.6P-SIVgpn (grupo 1) o del vector NYVAC tipo silvestre, carente de inserto con secuencias codificantes de proteínas del SHIV89.6P (grupo 3); DESAFÍO: inoculación del virus patógeno quimérico SHIV89.6P. Las flechas delgadas, marcadas como "CMI", indican los momentos en los que se extrajeron de los macacos muestras de sangre periférica.

La **Figura 50** muestra, en escala logarítmica, el número de células SFC (*spot forming cells*) que expresaban IFN- $\gamma$  obtenido por cada  $10^6$  células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en muestras procedentes de cada uno de los macacos incluidos en el estudio de eficacia de la vacunación. Los números que aparecen en el eje de abscisas indican, en semanas, el momento en el tiempo en el que fueron tomadas cada una de las muestras, tomando como tiempo 0 el momento de la administración de la primera dosis de vacunación. Para cada valor de tiempo, aparecen tres grupos de valores. Estos valores representan el comportamiento de cada uno de los 7 animales utilizados en el estudio y sometidos a un procedimiento de inmunización concreto: la primera vertical de puntos, marcados mediante cuadrados con un vértice apuntando hacia arriba ( $\blacktriangle$ ) corresponde a muestras tomadas de cada uno de los macacos del grupo 1 (inmunizados con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + MVA-89.6P-SIVgpn); la segunda vertical de puntos, marcados mediante cuadrados cuyos vértices determinan dos líneas paralelas ( $\blacksquare$ ), corresponde a muestras tomadas de cada uno de los macacos del grupo 2 (inmunizados con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + NYVAC-89.6P-SIVgpn); la tercera vertical de puntos, marcados mediante círculos ( $\bullet$ ), corresponde a muestras tomadas de cada uno de los macacos del grupo 3 (inmunizados con un plásmido a partir del cual no se expresaba ningún antígeno correspondiente al SHIV89.6P + NYVAC-WT). Cada punto representa el valor obtenido para un macaco concreto, mientras los rectángulos situados en cada una de las verticales indican el valor medio correspondiente a todos los macacos de ese grupo para las muestras tomadas en un mismo momento en el tiempo. La presencia de un número de puntos inferior a 7 en algunas verticales indica que el punto situado sobre el eje X representa a más de un macaco, en cada uno de los cuales el valor de las SFC detectadas por cada  $10^6$  PBMC analizadas no fue superior a 1. La línea punteada indica el valor por debajo del cual los valores no se consideran significativos (20 SFC). Las flechas blancas indican la inoculación de un vector de vacunación; la flecha negra indica el momento en el que se produjo el desafío mediante la inoculación del virus SHIV89.6P.

La **Figura 51** muestra, en escala logarítmica, los valores medios de SPF que expresaban IFN- $\gamma$  obtenidos, por cada  $10^6$  PBMC analizadas, para cada grupo de macacos a lo largo del tiempo de estudio, tiempo que se expresa en semanas en el eje X. El tiempo 0 al momento de la administración de la primera dosis de vacunación. Las flechas con relleno punteado indican los momentos en los que se administraron dosis de vacunación. La flecha con relleno oscuro continuo indica el momento en el que se produjo el desafío mediante la inoculación del virus SHIV89.6P. Los datos indicados mediante cuadrados con un vértice apuntando hacia arriba ( $\blacktriangle$ ) corresponden al grupo 1 (los



animales de este grupo fueron inmunizados con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + MVA-89.6P-SIVgpn); los datos indicados mediante cuadrados cuyos vértices determinan dos líneas paralelas (■) corresponden al grupo 2 (inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + NYVAC-89.6P-SIVgpn). Los datos indicados mediante triángulos (▲) corresponden al grupo 3 (inmunizado con un plásmido a partir del cual no se expresaba ningún antígeno correspondiente al SHIV89.6P + NYVAC-WT).

La **Figura 52** muestra, en escala logarítmica, los valores medios de SPF que expresaban IL-2 obtenidos, por cada  $10^6$  PBMC analizadas, para cada grupo de macacos a lo largo del tiempo de estudio. El tiempo se expresa en semanas en el eje X, correspondiendo el tiempo 0 al momento de la administración de la primera dosis de vacunación. Las flechas con relleno punteado indican los momentos en los que se administraron dosis de vacunación. La flecha con relleno oscuro continuo indica el momento en el que se produjo el desafío mediante la inoculación del virus SHIV89.6P. Los datos indicados mediante cuadrados con un vértice apuntando hacia arriba (◆) corresponden al grupo 1 (inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + MVA-89.6P-SIVgpn); los datos indicados mediante cuadrados cuyos vértices determinan dos líneas paralelas (■) corresponden al grupo 2 (inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + NYVAC-89.6P-SIVgpn). Los datos indicados mediante triángulos (▲) corresponden al grupo 3 (inmunizado con un plásmido a partir del cual no se expresaba ningún antígeno correspondiente al SHIV89.6P + NYVAC-WT).

La **Figura 53** muestra, en escala logarítmica, los valores medios de SPF que expresaban IL-4 obtenidos, por cada  $10^6$  PBMC analizadas, para cada grupo de macacos a lo largo del tiempo de estudio. El tiempo se expresa en semanas en el eje X, correspondiendo el tiempo 0 al momento de la administración de la primera dosis de vacunación. Las flechas con relleno punteado indican los momentos en los que se administraron dosis de vacunación. La flecha con relleno oscuro continuo indica el momento en el que se produjo el desafío mediante la inoculación del virus SHIV89.6P. Los datos indicados mediante cuadrados con un vértice apuntando hacia arriba (◆) corresponden al grupo 1 (inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + MVA-89.6P-SIVgpn); los datos indicados mediante cuadrados cuyos vértices determinan dos líneas paralelas (■) corresponden al grupo 2 (inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + NYVAC-89.6P-SIVgpn). Los datos indicados mediante triángulos (▲) corresponden al grupo 3 (inmunizado con un plásmido a partir del cual no se expresaba ningún antígeno correspondiente al SHIV89.6P + NYVAC-WT).

La **Figura 54** corresponde a la valoración de la viremia en los tres grupos en estudio. El gráfico superior corresponde al grupo 3, inmunizado con un plásmido a partir del cual no se expresaba ningún antígeno correspondiente al SHIV89.6P + NYVAC-WT. Los gráficos inferiores corresponden a los grupos que recibieron vectores derivados de poxvirus: el gráfico de la parte inferior izquierda corresponde al grupo 1, inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + MVA-89.6P-SIVgpn; el gráfico de la parte inferior derecha corresponde al grupo 2, inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + NYVAC-89.6P-SIVgpn. Cada línea que conecta puntos representa un macaco. Cada punto marcado con un símbolo representa las copias de ARN del SHIV89.6P, detectadas mediante QC RNA-PCR, en la muestra de plasma de ese macaco tomada en la semana que se indica en el eje X. El tiempo 0 corresponde al momento de inoculación del virus SHIV89.6P.

La **Figura 55** muestra la concentración, por microlitro de sangre, de células CD4+ (puntos marcados mediante círculos sin relleno, ○) y de células CD8+ (puntos marcados mediante triángulos sin relleno, △), detectadas por FACS mediante el uso de anticuerpos específicos dirigidos contra cada uno de estos tipos de células. Cada grupo de puntos corresponde a los valores obtenidos en las muestras de un macaco diferente, extraídas en el momento en el tiempo indicado. El tiempo se expresa, en semanas, en la parte superior de los gráficos. El tiempo 0 corresponde al momento de inoculación del virus SHIV89.6P, indicado mediante la abreviatura "desf.". Los gráficos superiores corresponden a macacos del grupo 1, inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + MVA-89.6P-SIVgpn. Los gráficos intermedios corresponden a macacos del grupo 2, inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + NYVAC-89.6P-SIVgpn. Los gráficos inferiores corresponden a macacos de grupo 3, inmunizado con un plásmido a partir del cual no se expresaba ningún antígeno correspondiente al SHIV89.6P + NYVAC-WT. El último gráfico, carente de puntos indicativos de valores, marcado como "D7 98028 (euth)", corresponde a un macaco que hubo de ser sacrificado debido al avanzado estado de la enfermedad que el virus SHIV89.6P inoculado desencadenó en él.

La **Figura 56** muestra, en el eje Y, el porcentaje de supervivencia de los macacos que componían cada uno de los grupos según las semanas transcurridas desde el momento de la infección con el virus SHIV89.6P, que se indican en el eje X, correspondiendo el tiempo 0 al de la primera inoculación de dicho virus. Los datos indicados mediante



cuadrados con un vértice apuntando hacia arriba (◆) corresponden al grupo 1 (inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + MVA-89.6P-SIVgpn); los datos indicados mediante cuadrados cuyos vértices determinan dos líneas paralelas (▢) corresponden al grupo 2 (inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + NYVAC-89.6P-SIVgpn). Los datos indicados mediante triángulos (▲) corresponden al grupo 3 (inmunizado con un plásmido a partir del cual no se expresaba ningún antígeno correspondiente al SHIV89.6P + NYVAC-WT).

## Ejemplos

### *Construcción y ensayos de inmunogenicidad de vectores diseñados para la vacunación de seres humanos*

#### **- Ejemplo 1.- Generación del MVA-B**

##### Construcción del vector plasmídico pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1

El vector plasmídico pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1 fue construido por los inventores para la generación del virus recombinante de MVA que expresa los genes Env de VIH-I (aislamiento BX08) y la quimera de Gag, Pol y Nef (aislamiento IIIB), ambos pertenecientes al clade B. El ADN de la quimera Gag-Pol-Nef fue generado por GeneArt (Regensburg, Alemania) y el ADN de gp120 fue generado por el grupo Aventis; los plásmidos que los contienen utilizados para la construcción de pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1 y del MVA-B a partir de éste último, fueron cedidos al grupo de los inventores en el marco del programa de colaboración EuroVacl.

El plásmido pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1 es un derivativo de pUC diseñado para la selección de placas azules/blancas. Contiene las secuencias flanqueantes derecha (TK-R) e izquierda (TK-L) del gen viral de la timidina quinasa (TK), el promotor E3L dirigiendo la expresión del marcador de selección  $\beta$ -galactosidasa, y el gen de resistencia a ampicilina (AP). Entre las dos secuencias flanqueantes se encuentran las dos secuencias que se desean expresar, gp120-BX08 (SEQ ID NO:15) y gagpolnef-IIIB (SEQ ID NO:16), que han sido modificadas para optimizar el uso de codones de mamífero. Para dirigir la expresión de cada una de las secuencias hay sendos promotores sintéticos temprano/tardío (pE/L), situados en orientación opuesta en la zona del inserto más alejada de las secuencias flanqueantes. La posición de cada uno de los componentes incluidos en el plásmido se describe a continuación en la Tabla 1.

**Tabla 1.- Posición de los componentes del plásmido pLZAW1gp120B/gagpolnefB-1**

Secuencia flanqueante izquierda de TK	90-410	Complementaria
T5NT para $\beta$ -gal	929-935	Complementaria
$\beta$ -gal	ATG-TAA (936-4079)	Complementaria
Promotor E3L para $\beta$ -gal	4080-4140	Complementaria
Parte 1 de la secuencia flanqueante izquierda de TK	4151-4498	Complementaria
gagpolnef-IIIB	ATG-TAA (4533-8513)	Complementaria
Promotor E/L para gagpolnef-IIIB	8523-8561	Complementaria
Promotor E/L para gp120-BX08	8576-8614	
BX08gp120	ATG-TAA (8624-10105)	
T5NT para BX08gp120	10144-10150	
Secuencia flanqueante derecha de TK	10212-10903	Complementaria
AP	ATG-TAA (12074-12934)	Complementaria

Para la construcción de este plásmido se utilizaron otros dos plásmidos diferentes:

- pMA60gp120B/gagpolnefB-12,17 (proporcionado por el grupo Aventis, Canadá). El plásmido es un derivativo de pUC que contiene las secuencias flanqueantes derecha (TK-R) e izquierda (TK-L) del gen viral de la timidina quinasa (TK), el promotor E3L dirigiendo la expresión del marcador de selección  $\beta$ -galactosidasa, y el gen de resistencia a ampicilina (AP). Entre las dos secuencias flanqueantes se encuentran las dos secuencias que se desean expresar, gp120-BX08 y gagpolnef-IIIB, que han sido modificadas para optimizar el uso de codones de mamífero. Para dirigir la expresión de cada una de las secuencias hay sendos promotores sintéticos temprano/tardío (pE/L), situados en orientación opuesta en la zona del inserto más alejada de las secuencias flanqueantes.

- pLZAW1: El plásmido fue proporcionado por Linong Zhang, del grupo Aventis, Canadá. Es un plásmido basado en pUC que contiene un brazo izquierdo del gen de TK, sitios de clonación para insertar genes exógeno, una repetición corta del brazo izquierdo el gen de TK, un promotor E3L dirigiendo la expresión de un casete con  $\beta$ -gal y un brazo derecho del gen de TK.

La construcción del plásmido pLZAW1gp120B/gagpolnefB-1 a partir de estos otros dos plásmidos se representa en la Figura 2. Brevemente, un fragmento de ADN de 5,6 Kb que contenía los genes de interés fue sacado por digestión con BamHI del plásmido pMA60gp120/gagpolnefB-12,17 modificado por incubación con la ADN polimerasa Klenow para generar extremos romos, y clonado en el vector pLZAW1 previamente digerido con la endonucleasa de restricción Ascl, modificado por incubación con Klenow, y desfosforilado por incubación con la enzima fosfatasa alcalina, generándose de esta forma el vector plasmídico de transferencia pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1. El plásmido generado dirige la inserción de los genes de interés en el locus TK del genoma del virus atenuado MVA.

#### Construcción del virus recombinante MVA-B

Cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) fueron infectados con virus atenuado MVA en pase 586 (habiendo sido el MVA-F6, pase 585, proporcionado por Gerd Sutter) a una multiplicidad de 0,05 ufp/célula, y posteriormente transfectados con 10  $\mu$ g del vector plasmídico de transferencia pLZAW1gp120B/gagpolnefB-1, usando para ello lipofectina comercial suministrada por Invitrogen y siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 72 horas post-infección las células fueron recogidas, sonicadas y usadas para la selección de los virus recombinantes. Los virus MVA recombinantes que contenían los genes gp120B/gagpolnef-B y coexpresaban de forma transitoria el gen marcador  $\beta$ -Gal (MVA-B (X-Gal<sup>+</sup>)), fueron seleccionados por pases consecutivos de purificación de placas en células CEF teñidas con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactósido (XGal) (300  $\mu$ g/ml). Los MVA recombinantes que contenían los genes gp120B/gagpolnef-B y que habían perdido el gen marcador (MVA-B (X-Gal<sup>-</sup>)), fueron seleccionados como focos virales no teñidos en células CEF en presencia de XGal. En cada paso de purificación las placas aisladas fueron expandidas en CEF durante 3 días, y el extracto viral crudo obtenido fue usado para el paso de purificación de placas consecutivo.

Tras 4 pases consecutivos de purificación fueron aisladas 12 placas recombinantes que expresaban eficientemente ambos antígenos y que habían perdido el gen marcador. Se hizo crecer el recombinante designado como MVA-B-4.1.5.2 (P1) para generar un stock crudo (P2) que se envió a producción en condiciones GMP para estudios clínicos. La secuencia del inserto situada en el locus de la timidina quinasa de este recombinante está representada por SEQ ID NO:19. La localización en dicha secuencia de cada uno de los elementos que componen el inserto se indica a continuación en la Tabla 2:

**Tabla 2.- Posición de los componentes principales del inserto del vector MVA-B**

Parte 1 de la secuencia flanqueante izquierda de TK	1-502	Complementaria
gagpolnef-III <sub>B</sub>	ATG-TAA (537-4517)	Complementaria
Promotor E/L para gagpolnef-III <sub>B</sub>	4527-4565	Complementaria
Promotor E/L para gp120-BX08	4580-4618	
gp120-BX08	ATG-TAA (4628-6109)	
Secuencia flanqueante derecha de TK	6216-6907	Complementaria

A partir del P2, se preparó un stock P3 de virus purificado de células CEF infectadas a una multiplicidad de infección de 0,05 ufp/célula a través de dos colchones de sacarosa al 45%. Este stock P3, con un título de  $2,4 \times 10^9$  ufp/ml, fue el que se utilizó en los protocolos de inmunización.

#### Caracterización del MVA-B

Para confirmar la homogeneidad genética del virus MVA-B generado y la integridad de los genes insertados, se realizó un análisis por PCR del ADN viral extraído de células CEF infectadas a una multiplicidad de 5 ufp/célula, empleando para ello oligonucleótidos que hibridan o con las regiones TK flanqueantes del inserto de interés o con regiones internas de los genes insertados. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados como cebadores y la posición en que aparecen sobre el vector plasmídico de transferencia pLZAW1gp120B/gagpolnefB-1 se muestran en la Tabla 3. Las posiciones en las que hibridan dichos oligonucleótidos, así como los tamaños estimados de los fragmentos generados en las distintas PCR y la localización de los mismos con respecto a los insertos y las secuencias flanqueantes, aparecen representados en la parte superior de la Figura 3.

Tabla 3.- Oligonucleótidos utilizados como cebadores de las PCR de caracterización del vector MVA-B

Oligo nucleótido	SECUENCIA	Posición
TK-L	5' TGATTAGTTTGATGCGATTC 3' (SEQ ID NO:1)	4338-4357
TK-R	5' TGTCCTTGATACGGCAG 3' (SEQ ID NO:2)	10379-10395
BX08556	5' TGCCCATCGACAACG 3' (SEQ ID NO:3)	9129-9143
GPN7649	5' AGCCCCATCGAGACCG 3' (SEQ ID NO:4)	6698-6713
GPN8170	5' ATTAGCCTGCCTCTCGG 3' (SEQ ID NO:5)	7218-7234
E/L	5' TATTTTTTTTTTTTGAATATAAATAG 3' (SEQ ID NO:6)	8522-8548

La parte inferior de la Figura 3 muestra fotografías de los geles obtenidos al someter a electroforesis los productos de las PCR realizadas con las diferentes parejas de cebadores para efectuar el análisis de los fragmentos del VIH-1 incluidos en el virus MVA-B. Para ello, 100 ng de ADN viral extraído de células de embrión de pollo (CEF) infectadas a una multiplicidad de 5 ufp/célula con los virus MVA-B del stock P3 (calle 2), MVA-WT (calle 3) y NYVAC-WT (calle 4) o bien con 10 ng del plásmido pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1 (calle 1), fueron usados como molde para hacer una amplificación mediante PCR de los diferentes fragmentos del VIH-1 incluidos en MVA-B. Las condiciones de cada PCR se estandarizaron de forma individualizada para cada pareja de oligonucleótidos cebadores empleada. Como se observa en las fotografías mostradas en la parte inferior de la Figura 3, las muestras correspondientes al control positivo, el plásmido pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1, dan lugar en todos los casos a bandas de igual tamaño que las correspondientes muestras MVA-B, mientras que en las calles 3 y 4, correspondientes a muestras que carecen de inserto (MVA-WT y NYVAC-WT, respectivamente), no se observan bandas.

El virus NYVAC de tipo silvestre utilizado en este ejemplo, así como las formas recombinantes NYVAC-B y NYVAC-C utilizadas posteriormente y que se han generado insertando sobre el NYVAC de tipo silvestre las mismas secuencias utilizadas para generar, respectivamente, los vectores de la invención MVA-B y MVA-C, fueron donados por el grupo Aventis, en el marco de colaboración del proyecto EuroVac I, en viales conteniendo aproximadamente  $7 \times 10^7$  unidades infecciosas por vial. Previamente a su utilización, el vector NYVAC-B fue crecido en células CEF y purificado en colchón de sacarosa en las mismas condiciones que MVA-B.

La Figura 4, por su parte, muestra una fotografía de un gel correspondiente al análisis de productos de PCR correspondientes al locus TK. Para su obtención, 100 ng del ADN viral extraído de células CEF infectadas a una multiplicidad de 5 ufp/célula con los virus NYVAC-WT (calle 1), MVA-B (calle 2) o MVA-WT (calle 3), fueron usados como molde para hacer un análisis por PCR del locus TK empleando como cebadores 100 ng de los oligonucleótidos que hibridan con las secuencias flanqueantes del gen TK, TK-L (SEQ ID NO:1) y TK-R (SEQ ID NO:2) en una mezcla de reacción que contenía 0,3 mM de dNTPs, 2,5 mM de  $MgCl_2$  y 2,5 U de la enzima polimerasa Platinum Taq. El programa incluye un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 min, 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 60°C durante 1 min y extensión a 68°C durante 2 min, y finalmente un ciclo de extensión a 68°C durante 10 min. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 0,7%, obteniéndose el resultado que se muestra en la Figura 4. En la calle 2, la correspondiente al vector MVA-B, se observa una banda de aproximadamente 6 Kb compatible con la presencia del inserto completo, mientras que en las calles correspondientes a los virus de tipo silvestre MVA-WT (3) y NYVAC-WT (1) aparecen bandas mucho menores, que corresponderían al locus de TK sin inserto. Las diferencias observadas en los tamaños de las bandas correspondientes a los virus sin inserto MVA-WT y NYVAC-WT se debe a que el gen TK es uno de los que ha sufrido una inactivación selectiva en el virus NYVAC (véase la Figura 1), siendo el tamaño del gen TK menor en esta forma atenuada de Vaccinia.

#### Ejemplo 2.- Análisis de la expresión de proteínas del VIH a partir del MVA-B

La expresión de las proteínas gp120-BX08 y gagpolnef-B por el virus MVA-B fue analizada mediante transferencia tipo Western. Monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con 5 ufp/célula de los diferentes stocks de virus recombinante MVA-B: P1, P2 y P3. Los extractos celulares fueron recogidos a las 24 horas post-infección, fraccionados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa, y sometidos a la reacción frente a un anticuerpo policlonal de conejo anti-gp120 (generado en el laboratorio) que reconoce la proteína gp120 del aislamiento BX08; y frente a un anticuerpo policlonal de conejo anti-p24 (cedido por el programa EVA, ARP432) que reconoce la quimera gagpolnef-B del aislamiento IIIB. Como controles positivos se utilizaron extractos procedentes de células infectadas con el vector NYVAC-B.

Como se observa en la Figura 5, ambos antígenos son expresados eficientemente por los diferentes stocks del recombinante MVA-B generado.

#### Ejemplo 3.- Comprobación de la estabilidad del MVA-B

Para verificar que el recombinante MVA-B podía ser pasado sucesivamente sin perder la expresión de los genes insertados, se realizó un ensayo de estabilidad efectuando varios pases sucesivos del virus recombinante MVA-B en

células CEF. Monocapas de células CEF crecidas en placas P100 fueron infectadas de forma sucesiva, a una multiplicidad de 0,05 ufp/célula, partiendo del stock P2 del MVA-B (pase 6) hasta generar el pase 10 (P10). A continuación, monocapas de células CEF crecidas en placas de 6 pocillos fueron infectadas con una dilución  $10^{-5}$  del extracto viral obtenido del último pase (P10). A las 48 horas post-infección, las placas de lisis generadas fueron analizadas por inmunotinción, empleando anticuerpos policlonales anti-WR (que reconoce proteínas del virus MVA); anti-gp120 (que reconoce la gp120 del aislamiento BX08); y anti-p24 (que reconoce la quimera gagpolnef-B del aislamiento IIIB); estos dos últimos anticuerpos fueron los mismos que se utilizaron en el Ejemplo 2. Los resultados de estas inmunotinciones se muestran en la parte A de la Figura 6. Los recuentos de placas efectuados mostraron que un 100% de las placas resultaban teñidas con los anticuerpos anti-WR, anti-p24 y anti-gp120. Por ello, se puede considerar que, tras 10 pases sucesivos del virus en células CEF, ambos antígenos se expresan eficientemente (100% de las placas reconocidas por los tres anticuerpos), corroborándose la estabilidad del producto generado.

Los extractos de células CEF infectadas con los pases 7, 8, 9 y 10 también fueron analizados por inmunotransferencia tipo Western, pruebas a las cuales corresponden las tinciones mostradas en la parte B de la Figura 6. Para realizar estos ensayos, monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con 5 ufp/célula de los extractos virales obtenidos en los pases 7 (P7), 8 (P8), 9 (P9) y 10 (P10) del virus recombinante MVA-B. Los extractos celulares fueron recogidos a las 24 horas post-infección, fraccionados en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDA-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa y hechos reaccionar con los mismos anticuerpos policlonales anti-gp120 (parte derecha de la figura) o anti-p24 (parte izquierda de la figura) utilizados en la prueba correspondiente a la parte A de la Figura 6. Ambos anticuerpos se utilizaron a una dilución 1/500. Como control positivo se empleó un extracto de células CEF infectadas con el virus NYVAC-B (cedido por el grupo Aventis). Los resultados confirman la correcta expresión de las proteínas gp120-BX08 y gagpolnef-B en todos los extractos obtenidos por la infección con virus procedentes de distintos pases.

#### **- Ejemplo 4.- Liberación de gp120-BX08 y cinética de expresión a partir del MVA-B en el transcurso del tiempo**

Para definir si la proteína gp120-BX08 era eficientemente secretada, monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con MVA-B a 5 ufp/célula. A las 4, 8, 16 y 24 horas post-infección las células se recogieron separando el precipitado (P) del sobrenadante (S) celular. Los sobrenadantes de cada tiempo analizado fueron concentrados y fraccionados junto a los precipitados celulares en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa, y sometidos a reacción frente al anticuerpo policlonal anti-gp120 (diluidos 1/500) anteriormente utilizado en los Ejemplos 2 y 3. De igual forma fueron tratadas células CEF infectadas con el NYVAC-B (proporcionado por el grupo Aventis), usado como control positivo en el ensayo. Como control interno para verificar que había sido aplicado en el gel la misma cantidad de proteína, las membranas fueron incubadas también frente a un anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -actina. Los resultados se muestran en la Figura 7. En su parte superior, correspondiente a la muestra del MVA-B, puede apreciarse que la proteína gp120-BX08 es expresada eficientemente por el MVA-B desde las 4 horas post-infección, detectándose en el sobrenadante celular a partir de las 8 horas post-infección, y con un comportamiento similar al que se observa en células infectadas con el NYVAC-B, para el cual se muestran los resultados obtenidos en la parte inferior de la Figura 7.

La expresión de la proteína de fusión gagpolnef-B fue analizada siguiendo un procedimiento similar: monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con MVA-B a 5 ufp/célula aunque, en este caso, la presencia de la proteína se ensayó en el precipitado celular obtenido a las 6, 18 y 24 horas post-infección, igualmente mediante transferencia tipo Western y poniendo de manifiesto la presencia de la proteína mediante reacción con el anticuerpo policlonal anti-p24 utilizado en los Ejemplos 2 y 3. Los resultados se muestran en la Figura 8. En ella puede observarse la correcta expresión de esta proteína de fusión a lo largo del tiempo de infección tanto desde MVA-B (calle 2 de cada tiempo de infección) como desde NYVAC-B (calle 1), aunque se produce una mayor acumulación de la proteína de fusión en células infectadas con MVA-B.

#### **- Ejemplo 5.- Inmunogenicidad del MVA-B: Respuesta inmune específica de células T productoras de IFN- $\gamma$**

Una vez generado y caracterizado el recombinante MVA-B, el siguiente objetivo fue analizar su capacidad de inducir una respuesta inmune específica en el modelo murino frente a los antígenos que expresa. Para ello, ratones BALB/c (n=4) de 6-8 semanas de edad se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.) con una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-B (stock P3) o de NYVAC-B. 10 días después de la inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, y se les extrajo el bazo para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT que detecta las células T específicas frente al antígeno en función de su cualidad para producir IFN- $\gamma$ , que es un indicador positivo de que un inmunógeno es capaz de activar selectivamente una respuesta celular del tipo CD4<sup>+</sup> Th1, característica esta última que se considera indicadora de la eficacia de un proceso de vacunación. Para ello, placas de 96 pocillos con fondos de nitrocelulosa se cubrieron con 75  $\mu$ l/pocillo a una concentración de 6  $\mu$ g/ml de un anticuerpo monoclonal de rata anti-IFN- $\gamma$  murino (R4-6A2, Pharmingen, San Diego, CA) resuspendido en PBS, incubándose toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron los pocillos tres veces con medio RPMI y finalmente se incubó con medio complementado con 10% FCS, al menos una hora a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Por otro lado, los bazos de los ratones inmunizados, que una vez extraídos se mantuvieron en RPMI + 10% FCS, se dispusieron en una rejilla estéril sobre una placa de 60 mm, y se homogeneizaron, disgregando el extracto mediante su paso por

agujas de diferente calibre (21G->25G). Las células así disgregadas se centrifugaron 5 min a 1.500 rpm a 4°C, y se lavaron dos veces con RPMI + 10% FCS. Para lisar los eritrocitos de las muestras, se añadió NH<sub>4</sub>Cl 0,1 M estéril (2 ml/bazo) y se mantuvo a 4°C durante 3-5 min, se añadió RPMI + 10% FCS y se centrifugó. Después se lavaron 2 veces, y finalmente se resuspendieron en 1-2 ml de RPMI + 10% FCS. El recuento de la viabilidad de los

esplenocitos se realizó mediante tinción con azul tripan (4% en agua, Sigma).  
Para evaluar la respuesta inmune específica, se utilizaron diferentes grupos de 40-50 péptidos de 15 aminoácidos cada uno, solapantes en 11 aminoácidos, que cubrían todas las regiones antigénicas incluidas en el recombinante MVA-B de la invención. Cada grupo de péptidos se diluyó a una concentración de 10 µg/ml en RPMI + 10% FCS a los que se les añadió 30 U/ml de IL-2. Una vez preparado, se añadió a cada pocillo 100 µl de mezcla del grupo de péptidos, sobre lo cual se añadió 100 µl/pocillo de esplenocitos de los animales inmunizados, a una concentración de 10<sup>7</sup> esplenocitos/ml y diluciones 1/4 y 1/16 de la misma. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub>, se lavaron 5 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (PBST), y se incubaron con 2 µg/ml del anticuerpo monoclonal de rata anti-IFN-γ biotinilado XMG1.2 (Pharmingen) diluido en PBST, durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se lavaron las placas 5 veces con PBST y se añadió una dilución 1/800 de avidina-peroxidasa (0,5 mg/ml) (Sigma). Tras 1 hora a temperatura ambiente se lavó 3 veces con PBST y 2 con PBS, añadiéndose finalmente la mezcla reveladora con 1 µg/ml del sustrato DAB (Sigma), resuspendido en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, que contenía 0,015% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción se detuvo lavando la placa con abundante agua y, una vez seca, se llevó a cabo el recuento de las manchas generadas con la ayuda de un estereomicroscopio de Leica MZ122 APO y el software Imaging System QWIN (Leica, Cambridge, Reino Unido). El número de células productoras de IFN-γ obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos.

Los resultados, que se muestran en la Figura 9, demuestran que el MVA-B es capaz de potenciar una respuesta inmune específica frente a casi todos los grupos de péptidos ensayados, en distinta proporción que su homólogo NYVAC-B.

#### **- Ejemplo 6.- Inmunogenicidad del MVA-B: Producción de citoquinas por esplenocitos reestimulados**

A continuación, se procedió a evaluar la producción de citoquinas estimulada en los esplenocitos de los ratones inmunizados al ser mezclados con los diferentes grupos de péptidos solapantes. Para ello, los esplenocitos aislados en el Ejemplo 5 fueron cultivados (5x10<sup>6</sup> células/pocillo) en una placa de 24 pocillos y estimulados con 1 µg/ml de cada grupo de péptidos. La placa se incubó durante 5 días a 37°C en atmósfera del 5% CO<sub>2</sub>. Después de este periodo, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y se centrifugaron a 1.500 rpm, 5 min, a 4°C, almacenándose a -70°C hasta su utilización. Tal como se ha comentado anteriormente, los niveles de la citoquina interferón-gamma (IFN-γ) son un indicador positivo de la activación de una respuesta celular del tipo CD4<sup>+</sup> Th1, mientras que la citoquina IL-10, por su parte, es un indicador de activación de la respuesta celular tipo CD4<sup>+</sup> Th2. La relación entre los niveles de IFN-γ e IL-10 indica si la vacunación es más o menos eficaz. Para conocer los niveles de una y otra citoquina, IL-10 e IFN-γ, presentes en los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos reestimulados *in vitro*, se procedió a la determinación de estos niveles mediante kits de ELISA comerciales de Pharmingen. Siguiendo las instrucciones del fabricante, placas de 96 pocillos de fondo plano se cubrieron con el anticuerpo anti-citoquina, diluido en su correspondiente tampón, y se incubó toda la noche a 4°C. Después, los pocillos se lavaron con PBST, y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con PBST + 10% FCS (PBSTB). Posteriormente, se añadieron diluciones seriadas en PBSTB de las muestras y de las citoquinas estándar, incubándose la placa a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, se lavó con PBST y se incubó a temperatura ambiente, durante 1 hora, con el anticuerpo específico anti-citoquina biotinilado, junto a la estreptavidina conjugada con peroxidasa, todo ello diluido en PBSTB. Finalmente, la reacción se detectó con TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, Sigma), a temperatura ambiente y en oscuridad, y se detuvo, tras 30 min de incubación, con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N.

La absorbancia se leyó a 450 nm y los valores obtenidos fueron extrapolados en la curva estándar (pg/ml). Los resultados, mostrados en la Figura 10, indican que existe una polarización de la respuesta celular específica hacia un subtipo Th1, caracterizado por la secreción de altos niveles de IFN-γ, tanto para MVA-B como para NYVAC-B, frente a los diferentes grupos de péptidos ensayados. Existen claras diferencias entre las respuestas generadas por cada uno de los recombinantes.

#### **- Ejemplo 7.- Inmunogenicidad del MVA-B: Identificación de los tipos de células T específicas secretoras de IFN-γ**

Como las células presentadoras que se estaban empleando hasta el momento en la caracterización de la respuesta celular eran las propias del bazo que expresan las moléculas de histocompatibilidad tanto de clase I (MHC-I) como de clase II (MHC-II), el siguiente paso fue dilucidar si la respuesta celular que se estaba obteniendo en ELISPOT era debida a la secreción de IFN-γ por las células T CD8<sup>+</sup> o por las células T CD4<sup>+</sup>. Para ello, los esplenocitos obtenidos en el Ejemplo 5 fueron reestimulados *in vitro* durante 1 hora a 37°C con 5 µg/ml de cada grupo de péptidos solapantes pertenecientes al clade B, tras lo cual se añadió Brefeldina a una concentración de 10 µg/ml, incubándose durante toda la noche a 37°C. Siete días después se procedió a un marcaje de superficie empleando

anticuerpos específicos anti-CD4 o anti-CD8 conjugados a FITC, seguido de un marcaje intracelular empleando anti-IFN- $\gamma$  conjugado a PE. Una vez fijadas las células fueron analizadas en el citómetro de flujo.

Los resultados, mostrados en la Figura 11, permiten apreciar que, tanto para el grupo de animales inmunizado con el MVA-B, como para el grupo inmunizado con NYVAC-B, la respuesta productora de IFN- $\gamma$  es mayoritariamente debida a la población de células T CD8<sup>+</sup> específicas activadas frente a los diferentes grupos de péptidos. Al determinar los niveles totales de IFN- $\gamma$  secretados por ambos tipos de células, se corroboró el resultado obtenido en el ensayo de ELISPOT descrito en el Ejemplo 5, donde se observaba una respuesta específica frente a la mayoría de los grupos de péptidos en los animales inmunizados con ambos recombinantes. De nuevo, existen diferencias claras entre las respuestas generadas por cada uno de los recombinantes.

**- Ejemplo 8.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación: Respuesta inmune específica de células T productoras de IFN- $\gamma$**

Una vez establecido que la administración de una primera dosis de inmunización que contenía el MVA-B era capaz de inducir una respuesta inmune específica en el modelo murino, se evaluó a continuación si la utilización de este vector de la invención como parte de protocolos de inducción/potenciación (*priming/boosting*) daba lugar a un incremento en la magnitud y en la amplitud de la respuesta inmune. Para ello, grupos de 4 ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad se inocularon por vía intramuscular (i.m.) con 100  $\mu$ g del vector de ADN DNA-B (cedido por GeneArt, Alemania), que contiene las mismas secuencias codificantes de proteínas del VIH-1 que lleva insertadas el MVA-B, pero bajo el control de sendos promotores de citomegalovirus e insertadas en vectores plasmídicos (uno para gp120 y otro para la proteína de fusión Gag-Pol-Nef). Los grupos control fueron inoculados (i.m.) con 100  $\mu$ g de ADN sin inserto (DNA  $\emptyset$ ). 15 días después se les inmunizó por vía intraperitoneal (i.p.) con 2 x 10<sup>7</sup> ufp/ratón de MVA-B (stock P3) o de NYVAC-B (grupo Aventis, Francia), que expresa los mismos antígenos de VIH que MVA-B. Un tercer grupo recibió una segunda dosis de DNA-B (100  $\mu$ g, i.m.). Los grupos control recibieron una dosis de 2 x 10<sup>7</sup> ufp/ratón de MVA-WT o NYVAC-WT. 10 días después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, mezclas de esplenocitos de los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con diferentes mezclas (*pools*) de péptidos solapantes pertenecientes al clade B (5  $\mu$ g/ml) que comprenden todas las regiones antigénicas incluidas en los virus recombinantes MVA-B y NYVAC-B. El número de células productoras de IFN- $\gamma$  obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12, en la que aparece el número de células secretoras de IFN- $\gamma$  específicas detectadas por cada 10<sup>6</sup> esplenocitos en los ratones inmunizados con las diferentes combinaciones de vectores. Se observa para casi todos los grupos de péptidos analizados que la inclusión de vectores derivados de poxvirus que codifican antígenos del VIH-1 en la segunda dosis de refuerzo de la respuesta inmune da lugar en casi todos los casos a un incremento significativo de la respuesta inmune con respecto a la utilización únicamente de vectores de ADN, siendo la respuesta generada diferente según se utilice MVA-B o NYVAC-B.

**- Ejemplo 9.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación: Producción de citoquinas por esplenocitos reestimulados**

Cinco grupos de ratones BALB/c (n=4) fueron inoculados en régimen combinado de inducción de la respuesta inmune mediante la administración de una primera dosis de vector y de potenciación de la misma mediante la inoculación de otro vector en una segunda dosis, de manera análoga a como se describió en el Ejemplo 8 y utilizando las mismas combinaciones de vectores. Los esplenocitos extraídos fueron estimulados *in vitro* con las diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade B (1  $\mu$ g/mL) e incubados durante 5 días a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -70°C. Los niveles de IFN- $\gamma$  se determinaron por ELISA usando un Kit comercial (Pharmigen). Los resultados se muestran en la Figura 13, donde se observa que la producción de IFN- $\gamma$  difiere según se utilice MVA-B o NYVAC-B como segundo vector de inmunización.

**- Ejemplo 10.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación: Producción de  $\beta$ -quimioquinas por esplenocitos reestimulados**

Cinco grupos de ratones BALB/c (n=4) fueron inoculados en régimen combinado de inducción de la respuesta inmune mediante la administración de una primera dosis de vector y de potenciación de la misma mediante la inoculación de otro vector en una segunda dosis, de manera análoga a como se describió en el Ejemplo 8 y utilizando las mismas combinaciones de vectores. Los esplenocitos extraídos fueron estimulados *in vitro* con las diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade B (1  $\mu$ g/ml) e incubados durante 5 días a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -70°C. Los niveles de MIP-1  $\beta$  y RANTES se determinaron por ELISA usando kits comerciales (Pharmigen)

Los resultados se muestran en la Figura 14, donde se observa que la producción de quimioquinas MIP-1  $\beta$  y RANTES difieren según se utilice MVA-B o NYVAC-B como segundo vector de inmunización.

**- Ejemplo 11.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación: Identificación de los tipos de células T específicas productoras de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$**

- 5 Cinco grupos de ratones BALB/c (n=4) fueron inoculados en régimen combinado de inducción de la respuesta inmune mediante la administración de una primera dosis de vector y de potenciación de la misma mediante la inoculación de otro vector en una segunda dosis, de manera análoga a como se describió en el Ejemplo 8 y utilizando las mismas combinaciones de vectores. Los esplenocitos extraídos fueron estimulados *in vitro* con el péptido de la envuelta del aislado Bx08 (5  $\mu$ g/ml) e incubados durante 1 hora a 37 °C. Transcurrido ese tiempo se le  
10 añadió Brefeldina A (10  $\mu$ g/mL) y se dejó incubando a 37 °C. Siete días después, se procedió a un marcaje de superficie empleando anticuerpos específicos anti-CD4 o anti-CD8 conjugados a FITC (diluidos 1/100), seguido de un marcaje intracelular empleando anti-IFN- $\gamma$  o anti-TNF- $\beta$  conjugado a PE (diluido 1/100). Una vez fijadas las células fueron analizadas en el citómetro de flujo
- 15 Los resultados se muestran en la Figura 15. En ellos se observan diferencias en los niveles de células CD8<sup>+</sup> entre los grupos, con un mayor incremento de células secretoras de TNF- $\alpha$  en el grupo que había recibido DNA-B+MVA-B.

**- Ejemplo 12.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación que combinan varios vectores derivados de Vaccinia: Respuesta inmune específica de células T productoras de IFN- $\gamma$**

- 20 Grupos de 4 ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.) con una dosis de con  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-B (stock P3), NYVAC B (grupo Aventi) o MVA WT. 15 días después los ratones recibieron una segunda dosis por vía intraperitoneal (i.p.) de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de vector, de manera que se inoculó NYVAC-B a los ratones que habían recibido MVA-B en la primera dosis, MVA-B a los ratones que habían recibido NYVAC-B en la primera dosis y NYVAC-WT (grupo Aventis) a los ratones que habían recibido MVA-WT en la primera dosis. Se generaron así grupos que habían sido inoculados con las siguientes combinaciones de vectores: NYVAC-B+MVA-B, MVA-B+NYVAC-B y MVA-WT+NYVAC-WT. 10 días después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, grupos de mezcla de esplenocitos de los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade B (5  $\mu$ g/ml) que comprenden todas las regiones antigénicas incluidas en los virus recombinantes MVA-B y NYVAC-B. El número de células productoras de IFN- $\gamma$  obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos.
- 35 Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16. En ella puede observarse como las dos combinaciones de vectores que contienen secuencias derivadas de VIH-1 incrementan tanto la magnitud como la amplitud de la respuesta inmune específica generada, según se observa con los diferentes grupos de péptidos. La combinación en la que el NYVAC-B se inocula en la primera dosis y el MVA-B en la segunda fue la que dio lugar al número más elevado de células secretoras de IFN- $\gamma$  frente a los diferentes grupos de péptidos.

**- Ejemplo 13.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores derivados de Vaccinia: Producción de IFN- $\gamma$  por esplenocitos estimulados**

- 45 Tres grupos de ratones BALB/c (n=4) de 6-8 semanas de edad fueron inoculados en régimen combinado de inducción de la respuesta inmune mediante la administración de una primera dosis de vector y de potenciación de la misma mediante la inoculación de otro vector en una segunda dosis, de manera análoga a como se describió en el Ejemplo 12 y utilizando las mismas combinaciones de vectores. Los esplenocitos extraídos fueron estimulados *in vitro* con las diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade B (1  $\mu$ g/ml) utilizadas en los Ejemplos anteriores e incubados durante 5 días a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -70°C. Los niveles de IFN- $\gamma$  se determinaron por ELISA usando un kit comercial (Pharmigen).

Los resultados se muestran en la Figura 17, donde se observa que la producción de IFN- $\gamma$  más amplia se obtiene con la combinación NYVAC-B+MVA-B, al igual que en el Ejemplo 12.

**- Ejemplo 14.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores de ADN y vectores virales derivados de Vaccinia: Respuesta inmune específica de células T productoras de IFN- $\gamma$  en ratones humanizados HHDI**

- 60 Se procedió también a realizar experimentos con ratones humanizados HHDI. Estos ratones, generados por F. Lemonier en Francia y cedidos por él para la realización de los experimentos descritos en la presente memoria, sólo permiten la presentación de antígenos en el contexto del MHC de clase I humano, al tener reemplazados los genes murinos del MHC clase I y  $\beta$ -microglobulina por los correspondientes genes humanos. Grupos de 4 ratones HHDI de 6-10 semanas de edad se inocularon por vía intramuscular (i.m.) con 100  $\mu$ g del vector de ADN DNA-B (cedido por GeneArt, Alemania) utilizado también en el Ejemplo 8. Los grupos control fueron inoculados (i.m.) con 100  $\mu$ g de ADN sin inserto (DNA  $\emptyset$ ). 15 días después se les inmunizó por vía intraperitoneal (i.p.) con  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de



MVA-B (stock P3) o de NYVAC-B (grupo Aventis, Francia), que expresa los mismos antígenos de VIH que MVA-B. Un tercer grupo recibió una segunda dosis de DNA-B (100 µg, i.m.). El grupo control recibió una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-WT. 10 días después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, mezclas de esplenocitos de los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade B (5 µg/ml) que comprenden todas las regiones antigénicas incluidas en los virus recombinantes MVA-B y NYVAC-B. El número de células productoras de IFN-γ obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos. • denota diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo respecto al control negativo. \* denota diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos grupos

La Figura 18 muestra los resultados obtenidos. Se observa que las combinaciones DNA-B+MVA-B y DNA-B+NYVAC-B inducen una amplia respuesta frente a los grupos de péptidos, con inmunodominancia frente a Env.

**- Ejemplo 15.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores de ADN y vectores virales derivados de Vaccinia: Respuesta inmune específica de células T productoras de IL-2 en ratones humanizados HHDI**

Grupos de 4 ratones HHDI de 6-10 semanas de edad se inocularon por vía intramuscular (i.m.) con 100 µg del vector de ADN DNA-B (cedido por GenArt, Alemania). El grupo control fue inoculado (i.m.) con 100 µg de ADN sin inserto (DNA Ø). 15 días después se les inmunizó por vía intraperitoneal (i.p.) con  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-B (stock P3) o de NYVAC-B (grupo Aventis, Francia), que expresa los mismos antígenos de VIH que MVA-B. Un tercer grupo recibió una segunda dosis de DNA-B (100 µg, i.m.). El grupo control recibió una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-WT. 10 días después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, mezclas de esplenocitos de los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade B (5 µg/ml) que comprenden todas las regiones antigénicas incluidas en los virus recombinantes MVA-B y NYVAC-B. El número de células productoras de IL-2 obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos. La Figura 19 muestra los resultados obtenidos, en la que: • denota diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada pool respecto al control negativo. \* denota diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos grupos. Se observa inmunodominancia de antígenos de Env, con amplia respuesta frente a los distintos grupos de péptidos y diferencias significativas entre los grupos DNA-B+MVA-B y DNA-B+NYVAC-B.

**- Ejemplo 16.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores derivados de Vaccinia: Respuesta inmune específica de células T productoras de IFN-γ en ratones humanizados HHDI**

Cinco grupos de 4 ratones HHDI de 6-10 semanas de edad se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.) con una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-B (stock P3) (2 grupos), NYVAC B (grupo Aventis) (2 grupos) o NYVAC WT (grupo control). 15 días después los ratones recibieron una segunda dosis por vía intraperitoneal (i.p.) de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de vector, de manera que a uno de los grupos que había recibido MVA-B en la primera dosis se le inoculó NYVAC-B y a otro de nuevo MVA-B, a uno de los grupos que habían recibido NYVAC-B en la primera dosis se le inoculó NYVAC-B de nuevo y a otro MVA-B y, finalmente, el grupo control recibió en la segunda dosis MVA-WT (Aventis-Pasterur). Se generaron así grupos que habían sido inoculados con las siguientes combinaciones de vectores: MVA-B+NYVAC-B, NYVAC-B+MVA-B, MVA-B+MVA-B, NYVAC-B+NYVAC-B y NYVAC-WT+MVA-WT.

10 días después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, grupos de mezcla de esplenocitos de los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade B (5 µg/ml) que comprenden todas las regiones antigénicas incluidas en los virus recombinantes MVA-B y NYVAC-B. El número de células productoras de IFN-γ obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos. La Figura 20 muestra los resultados obtenidos, en la que: • denota diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo. Se observa que la inmunización combinada de vectores virales, MVA-B y NYVAC-B, induce una amplia respuesta inmune contra distintos antígenos del VIH.

**- Ejemplo 17.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores derivados de Vaccinia: Respuesta inmune específica de células T productoras de IL-2 en ratones humanizados HHDI**

Cinco grupos de 4 ratones HHDI de 6-10 semanas de edad se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.) con una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-B (stock P3) (2 grupos), NYVAC B (grupo Aventis) (2 grupos) o NYVAC WT (grupo control). 15 días después los ratones recibieron una segunda dosis por vía intraperitoneal (i.p.) de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de vector, de manera que a uno de los grupos que había recibido MVA-B en la primera dosis se le inoculó NYVAC-B



y a otro de nuevo MVA-B, a uno de los grupos que habían recibido NYVAC-B en la primera dosis se le inoculó NYVAC-B de nuevo y a otro MVA-B y, finalmente, el grupo control recibió en la segunda dosis MVA-WT (grupo Aventis). Se generaron así grupos que habían sido inoculados con las siguientes combinaciones de vectores: MVA-B+NYVAC-B, NYVAC-B+MVA-B, MVA-B+MVA-B, NYVAC-B+NYVAC-B y NYVAC-WT+MVA-WT.

10 días después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, grupos de mezcla de esplenocitos de los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade B (5 µg/ml) que comprenden todas las regiones antigénicas incluidas en los virus recombinantes MVA-B y NYVAC-B. El número de células productoras de IL-2 obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos. La Figura 21 muestra los resultados obtenidos, en la que: • denota diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo. Como en el Ejemplo 16, se observa que la combinación de vectores induce una amplia respuesta inmune (producción de IL-2) frente a distintos antígenos del VIH.

#### - Ejemplo 18.- Generación del MVA-C

##### Construcción del vector plasmídico pLZAW1gp120C/gagpolnef-C-14

El vector plasmídico pLZAW1gp120C/gagpolnef-C-14 fue construido por los inventores para la generación del virus recombinante de MVA que expresa secuencias génicas correspondientes a la proteína gp120 (gp120-C) y a la quimera de Gag, Pol y Nef (gagpolnef-C) del aislamiento CN54, que pertenece al clade C. El vector pMA60gp120C/gagpolnef-C-14,15 utilizado para su construcción, contiene las secuencias codificantes de ambas proteínas; se construyó utilizando la secuencia codificante de la proteína de fusión gagpolnef-C generada por GeneArt (Regensburg, Alemania) y fue cedido a los inventores para la construcción del vector MVA-C en el marco del programa de colaboración EuroVacl.

El plásmido pLZAW1gp120C/gagpolnef-C-14 es un derivativo de pUC diseñado para la selección de placas azules/blancas. Contiene las secuencias flanqueantes derecha (TK-R) e izquierda (TK-L) del gen viral de la timidina quinasa (TK), el promotor E3L dirigiendo la expresión del marcador de selección β-galactosidasa, y el gen de resistencia a ampicilina (AP). Entre las dos secuencias flanqueantes se encuentran las dos secuencias que se desean expresar, gp120-C (SEQ ID NO:17) y gagpolnef-C (SEQ ID NO:18), que han sido modificadas para optimizar el uso de codones de mamífero. Para dirigir la expresión de cada una de las secuencias hay sendos promotores sintéticos temprano/tardío (pE/L), situados en orientación opuesta en la zona del inserto más alejada de las secuencias flanqueantes. La posición de cada uno de los componentes incluidos en el plásmido se describe a continuación en la Tabla 4.

**Tabla 4.- Componentes del plásmido pLZAW1gp120C/gagpolnef-C-14**

Secuencia flanqueante izquierda de TK	410-908	Complementaria
T5NT para β-gal	929-935	Complementaria
β-gal	ATG-TAA (936-4079)	Complementaria
Promotor E3L para β-gal	4080-4140	Complementaria
Parte 1 de la secuencia flanqueante izquierda de TK	4151-4498	Complementaria
T5NT para gp120	4607-4614	Complementaria
gp120	ATG-TAA (4643-6139)	Complementaria
Promotor E/L para gp120	6149-6187	Complementaria
Promotor E/L para gagpolnef	6202-6240	
gagpolnef	ATG-TAA (6250-10503)	
T5NT para gagpolnef	10584-10590	
Secuencia flanqueante derecha de TK	10652-11343	Complementaria
AP	ATG-TAA (12514-13374)	Complementaria

Para la construcción de este plásmido se utilizaron otros dos plásmidos diferentes:

- pMA60gp120C/gagpolnef-C-14,15 (proporcionado por el grupo Aventis, Canadá). El plásmido es un derivativo de pUC que contiene las secuencias flanqueantes derecha (TK-R) e izquierda (TK-L) del gen viral de la timidina quinasa (TK) en sitios de clonación del pUC.. Entre las dos secuencias flanqueantes se encuentran las dos secuencias que se desean expresar, gp120-C y gagpolnef-C, que han sido modificadas para optimizar el uso de codones de mamífero. Para dirigir la expresión de cada una de las secuencias hay sendos promotores sintéticos temprano/tardío (pE/L), situados en orientación opuesta en la zona del inserto más alejada de las secuencias flanqueantes.

- pLZAW1: El plásmido fue proporcionado por Linong Zhang, del grupo Aventis, Canadá. Es un plásmido basado en pUC que contiene un brazo izquierdo del gen de TK, sitios de clonación para insertar genes exógenos, una repetición corta del brazo izquierdo del gen de TK, un promotor E3L dirigiendo la expresión de un casete con  $\beta$ -gal y un brazo derecho del gen de TK.

La construcción del plásmido pLZAW1gp120C/gagpolnefC-14 a partir de estos otros dos plásmidos se representa en la Figura 22. Brevemente, un fragmento de ADN de 6047 kpb que contenía los genes de interés fue sacado por digestión con EcoRV del plásmido pMA60gp120C/gagpolnefC-14,15, modificado por incubación con la ADN polimerasa de Klenow para generar extremos romos, y clonado en el vector pLZAW1 previamente digerido con la endonucleasa de restricción Ascl, modificado por incubación con Klenow, y desfosforilado por incubación con fosfatasa alcalina de intestino de ternera, generándose de esta forma el vector plasmídico de transferencia pLZAW1gp120C/gagpolnefC-14. El plásmido generado dirige la inserción de los genes de interés en el locus de la TK del genoma del virus atenuado MVA. Después de aislar el virus recombinante deseado mediante el análisis de la expresión de actividad  $\beta$ -galactosidasa la posterior propagación del virus recombinante conduce a la autodelección de  $\beta$ -gal por recombinación homóloga entre el brazo izquierdo de TK y la repetición corta del brazo izquierdo de TK que flanquean el marcador.

#### - Construcción del virus recombinante MVA-C

Cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) fueron infectados con virus atenuado MVA en pase 586 (MVA-F6, pase 586, proporcionado por Gerd Sutter) a una multiplicidad de 0,05 ufp/célula, y posteriormente transfectados con 10  $\mu$ g de ADN del plásmido de transferencia pLZAW1gp120C/gagpolnefC-14, usando para ello lipofectina comercial suministrada por Invitrogen y siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 72 horas post-infección las células fueron recogidas, sonizadas y usadas para la selección de los virus recombinantes. Los virus MVA recombinantes que contenían los genes gp120C/gagpolnef-C y coexpresaban de forma transitoria el gen marcador  $\beta$ -Gal (MVA-B (X-Gal<sup>+</sup>)), fueron seleccionados por pases consecutivos de purificación de placas en células CEF teñidas con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactósido (XGal) (300  $\mu$ g/ml). En lo sucesivo, los MVA recombinantes que contenían los genes gp120C/gagpolnef-C y que habían perdido el gen marcador (MVA-B (X-Gal<sup>-</sup>)), fueron seleccionados como focos virales no teñidos en células CEF en presencia de XGal. En cada paso de purificación las placas aisladas fueron expandidas en CEF durante 3 días, y el extracto viral crudo obtenido fue usado para el paso de purificación de placas consecutivo.

Tras 4 pases consecutivos de purificación fueron aisladas 24 placas recombinantes que expresaban eficientemente ambos antígenos y que habían perdido el gen marcador. Se hizo crecer el recombinante designado como MVA-C-1.7.1.2 (P1) (SEQ ID NO:16) para generar un stock crudo (P2) que se envió a producción en condiciones de buenas prácticas de fabricación para estudios clínicos. La secuencia del inserto que este recombinante lleva incluido en el sitio de la timidina quinasa viene representada por SEQ ID NO:20. La localización en dicha secuencia de cada uno de los elementos que componen el inserto se indica a continuación en la Tabla 5

**Tabla 5.- Posición de los componentes principales del inserto del vector MVA-C**

Parte 1 de la secuencia flanqueante izquierda de TK	1-502	Complementaria
gp120-C	ATG-TAA (647-2143)	Complementaria
Promotor E/L para gp120-C	2153-2191	Complementaria
Promotor E/L para gagpolnef	2206-2244	
gagpolnef-C	ATG-TAA (2254-6507)	
Secuencia flanqueante derecha de TK	6656-7347	Complementaria

A partir del P2, se preparó un stock P3 de virus, purificándolo a partir de células CEF infectadas a una multiplicidad de infección de 0,05 por pase a través de dos colchones de sacarosa al 36%. Este stock P3, con un título de  $4,25 \times 10^8$  ufp/ml, fue el que se utilizó en los protocolos de inmunización en el modelo murino.

#### Caracterización del virus recombinante MVA-C

Para confirmar la homogeneidad genética del virus MVA-C generado y la integridad de los genes insertados, se realizó un análisis por PCR del ADN viral extraído de células CEF infectadas a una multiplicidad de 5 ufp/célula, empleando para ello oligonucleótidos que hibridan o con las regiones TK flanqueantes del inserto o con regiones internas de los genes insertados. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados como cebadores y la posición en que aparecen sobre el vector plasmídico de transferencia pLZAW1gp120C/gagpolnefC-14 se muestran en la Tabla 6. Las posiciones en las que hibridan dichos oligonucleótidos, así como los tamaños estimados de los fragmentos generados en las distintas PCR y la localización de los mismos con respecto a los insertos y las secuencias flanqueantes, aparecen representadas en la parte superior de la Figura 23.

Tabla 6.- Oligonucleótidos utilizados como cebadores de las PCR de caracterización del vector MVA-C

Oligo nucleótido	SECUENCIA	Posición
TK-L	5' TGATTAGTTTGATGCGATTTC 3' (SEQ ID NO:1)	4338-4357
TK-R	5' TGTCCTTGATACGGCAG 3' (SEQ ID NO:2)	10819-10835
gp120-10	5' TCGAGCATGGACAGGGCC 3' (SEQ ID NO:7)	6128-6145
gp120-1050	5' GTCTTGTTCTGGAAGTGC 3' (SEQ ID NO:8)	5088-5105
gp120-1213	5' ATCATCACCATCCCCTGC 3' (SEQ ID NO:9)	4925-4942
GPN-802	5' TGGGTTTAAACAAGATCG 3' (SEQ ID NO:10)	7043-7060
GPN-2018	5' CAAGGTGAAGCAGTGGCC 3' (SEQ ID NO:11)	8260-8276
GPN-2198	5' TGGGTCCTCTTGTTTCAGC 3' (SEQ ID NO:12)	8439-8456
GPN-3820	5' CGGCCTTGCCGATCTTGG 3' (SEQ ID NO:13)	10061-10078
GPN-4000	5' CCGACAAGAGCGAGAGCG 3' (SEQ ID NO:14)	10241-10258

La parte inferior de la Figura 23 muestra fotografías de los geles obtenidos al someter a electroforesis los productos de las PCR realizadas con las diferentes parejas de cebadores para efectuar el análisis de los fragmentos del VIH-1 incluidos en el virus MVA-C. Para ello, 100 ng del ADN viral extraído de células CEF infectadas a una multiplicidad de 5 ufp/célula con los virus NYVAC-C (calle 1), MVA-C (calle 2), MVA-WT (calle 3) o NYVAC-WT (calle 4), fueron usados como molde para hacer una amplificación mediante PCR de diferentes fragmentos de VIH-1 incluidos en MVA-C. Las condiciones de cada PCR se estandarizaron de forma individualizada para cada pareja de oligonucleótidos cebadores empleada. Como se observa en las fotografías mostradas en la parte inferior de la Figura 23, en las calles 3 y 4, correspondientes a muestras que carecen de inserto, no se observan bandas en ninguno de los casos, mientras que el control positivo NYVAC-C expresa los mismos genes incluidos en MVA-C.

La Figura 24, por su parte, muestra una fotografía de un gel obtenido al someter a electroforesis los productos resultantes de una reacción de PCR en la que se utilizaron como cebadores oligonucleótidos (TK-L y TK-R) que hibridan con las secuencias flanqueantes del gen TK. En las calles 2 y 3, correspondiente a los stocks P1 y P2 del vector MVA-C se observa una banda de algo más de 6 Kb compatible con la presencia del inserto completo; mientras que en la calle 4, correspondiente a ADN extraído de células CEF infectadas con la cepa silvestre MVA-WT del virus MVA aparece una banda mucho menor, que correspondería al locus de TK sin inserto.

#### Ejemplo 19.- Análisis de la expresión de proteínas del VIH a partir del MVA-C

La expresión de las proteínas gp120-C y gagpolnef-C por el virus MVA-C fue analizada mediante transferencia tipo Western. Monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con 5 ufp/célula de los diferentes stocks de virus recombinante MVA-B. Los extractos celulares fueron recogidos a las 24 horas post-infección, fraccionados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa, y sometidos a la reacción frente a un anticuerpo policlonal de conejo anti-gp120 (generado en el laboratorio) que reconoce la proteína gp120 del aislamiento CN54; y frente a un anticuerpo policlonal de conejo anti-p24 (cedido por el programa EVA, ARP432) que reconoce la quimera gagpolnef-C del mismo aislamiento. Como controles positivos se utilizaron extractos procedentes de células infectadas con el vector NYVAC-C.

Como se observa en la Figura 25, ambos antígenos son expresados eficientemente por diferentes stocks (P2, P3) del recombinante MVA-C generado.

#### Ejemplo 20.- Comprobación de la estabilidad del MVA-C

Para verificar que el recombinante MVA-C podía ser pasado sucesivamente sin perder la expresión de los genes insertados, se realizó un ensayo de estabilidad análogo al descrito en el Ejemplo 3, efectuando varios pases sucesivos del virus recombinante MVA-C en células CEF. Monocapas de células CEF crecidas en placas P100 fueron infectadas de forma sucesiva, a una multiplicidad de 0,05 ufp/célula, partiendo del stock P2 del MVA-C (pase 6) hasta generar el pase 10 (P10). A continuación, monocapas de células CEF crecidas en placas de 6 pocillos fueron infectadas con una dilución  $10^{-5}$  del extracto viral obtenido del último pase (P10). A las 48 horas post-infección, las placas de lisis generadas fueron analizadas por inmunotinción, empleando anticuerpos policlonales anti-WR (que reconoce proteínas del virus MVA); anti-gp120 (que reconoce la gp120 del aislamiento CN54); y anti-p24 (que reconoce la quimera gagpolnef-C del mismo aislamiento); estos dos últimos anticuerpos fueron los mismos que se utilizaron en el Ejemplo 19. Los resultados de estas inmunotinciones se muestran en la parte A de la Figura 26. Los recuentos de placas demostraron que, tras 10 pases sucesivos del virus en células CEF, ambos antígenos se expresan eficientemente (100% de las placas reconocidas por el anticuerpo anti-WR fueron reconocidas por los anticuerpos anti-gp120 y anti-p24), corroborándose la estabilidad del producto generado. Los extractos de células CEF infectadas con los pases 7, 8, 9 y 10 también fueron analizados por inmunotransferencia tipo Western, pruebas

a las cuales corresponden las tinciones mostradas en la parte B de la Figura 26. Para realizar estos ensayos, monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con 5 ufp/célula de los extractos virales obtenidos en los pases 7 (P7), 8 (P8), 9 (P9) y 10 (P10) del virus recombinante MVA-C. Los extractos celulares fueron recogidos a las 24 horas post-infección, fraccionados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDA-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa y hechos reaccionar con los mismos anticuerpos policlonales anti-gp120 (parte derecha de la figura) o anti-p24 (parte izquierda de la figura) utilizados en la prueba correspondiente a la parte A de la Figura 26. Ambos anticuerpos se utilizaron a una dilución 1/500. Como control positivo se empleó un extracto de células CEF infectadas con el virus NYVAC-C (cedido por el grupo Aventis). Los resultados confirman la correcta expresión de las proteínas gp120-C y gagpolnef-C en todos los extractos obtenidos por la infección con virus procedentes de distintos pases.

#### **Ejemplo 21.- Liberación de gp120-C y cinética de expresión a partir del MVA-C en el transcurso del tiempo**

Para definir si la proteína gp120-C era eficientemente secretada, monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con el virus recombinante MVA-C a 5 ufp/célula. A las 6, 18 y 24 horas post-infección las células se recogieron separando el precipitado (P) del sobrenadante (S) celular. Los sobrenadantes de cada tiempo analizado fueron concentrados y fraccionados junto a los precipitados celulares en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa, y sometidos a reacción frente al anticuerpo policlonal anti-gp120 específico para el aislamiento CN54 anteriormente utilizado en los Ejemplos 19 y 20. De igual forma fueron tratadas células CEF infectadas con el NYVAC-C (proporcionado por el grupo Aventis), usado como control positivo en el ensayo. Como control interno para verificar que había sido aplicado en el gel la misma cantidad de proteína, las membranas fueron incubadas también frente a un anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -actina. Los resultados se muestran en la Figura 27. En su parte superior, correspondiente a la muestra del MVA-C, puede apreciarse que la proteína gp120-C es expresada eficientemente por el MVA-C desde las 6 horas post-infección, detectándose en el sobrenadante celular a partir de las 18 horas post-infección, y con un comportamiento similar al que se observa en células infectadas con el NYVAC-C, para el cual se muestran los resultados obtenidos en la parte inferior de la Figura 27.

La expresión de la proteína de fusión gagpolnef-C fue analizada en el precipitado celular igualmente a las 6, 18 y 24 horas post-infección siguiendo un procedimiento análogo al utilizado para la proteína gp120-C, aunque utilizando en este caso el anticuerpo anti-p24 específico para el aislamiento CN54. Los resultados se muestran en la Figura 28. En ella puede observarse que esta proteína de fusión se expresa eficientemente a lo largo del tiempo de infección tanto desde MVA-C (calle 1 de cada tiempo de infección) como desde NYVAC-C (calle 2).

#### **Ejemplo 22.- Inmunogenicidad del MVA-C: Respuesta inmune específica de células T productoras de IFN- $\gamma$**

Una vez generado y caracterizado el recombinante MVA-C, el siguiente objetivo fue analizar su capacidad de inducir una respuesta inmune específica en el modelo murino frente a los antígenos que expresa. Para ello, ratones transgénicos HHDII (n=4) de 10 semanas de edad se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.) con una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-C o de NYVAC-C. 8 días después de la inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, y se les extrajo el bazo para llevar a cabo un ensayo de ELISPOT análogo al descrito en el Ejemplo 5, siguiendo la misma metodología descrita en dicho Ejemplo con la excepción de que, en este caso, para evaluar la respuesta inmune específica, se utilizaron diferentes grupos que contenían 40-50 péptidos solapantes de 15 aminoácidos cada uno, pertenecientes al clade C, que cubrían todas las regiones antigénicas incluidas en el recombinante MVA-C de la invención.

Los resultados, que se muestran en la Figura 29, demuestran que el MVA-C es capaz de potenciar una respuesta inmune específica frente a casi todos los grupos de péptidos ensayados, evidenciándose la mejor respuesta frente a los grupos de péptidos representativos de los genes de la envuelta (Env1 y Env2).

Adicionalmente, se evaluó también la respuesta generada contra las proteínas expresadas a partir de las partes del vector derivadas de las formas atenuadas de Vaccinia utilizadas para la construcción de los recombinantes, MVA y NYVAC. Para ello, los esplenocitos de los animales inmunizados se pusieron en contacto durante 48 horas con células RMAS-HDD previamente infectadas durante 5 horas con 5 ufp/célula de las cepas silvestres de MVA y NYVAC, MVA-WT y NYVAC-WT. El número de células productoras de IFN- $\gamma$  obtenido frente a las células RMAS-HHDII sin infectar (control negativo) fue sustraído en todos los casos. Los resultados, que se muestran en la parte B de la Figura 29, demuestran que la respuesta anti-Vaccinia fue superior en el grupo de ratones inmunizados con NYVAC-C.

#### **- Ejemplo 23.- Inmunogenicidad del MVA-C: Producción de citoquinas por esplenocitos reestimulados**

Los esplenocitos aislados de los animales inmunizados con MVA-C y NYVAC-C aislados en el Ejemplo 22 fueron cultivados ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) en una placa de 24 pocillos y estimulados con 1  $\mu$ g/ml de cada grupo de péptidos pertenecientes al clade C. La placa se incubó durante 5 días a 37°C en atmósfera del 5% CO<sub>2</sub>. Después de este periodo, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y se centrifugaron a 1.500 rpm, 5 min, a 4°C, almacenándose a -70°C hasta su utilización. Para conocer los niveles de IL-10 e IFN- $\gamma$  presentes en los

sobrenadantes de cultivos de esplenocitos reestimulados *in vitro*, se procedió a la determinación de estos niveles mediante kits de ELISA comerciales de Pharmigen, siguiendo las instrucciones del fabricante de forma análoga a la descrita en el Ejemplo 6. Los resultados, mostrados en la Figura 30, indican que MVA-C induce la secreción de las citoquinas IL-10 e IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de cultivo de los esplenocitos reestimulados. Los niveles de IFN- $\gamma$  fueron significativamente superiores frente a los grupos de péptidos GPN2, Env-1 y Env-2, evidenciando una clara polarización de la respuesta celular antígeno-específica hacia un subtipo Th1.

**- Ejemplo 24.- Inmunogenicidad del MVA-C: Identificación de los tipos de células T específicas productoras de IFN- $\gamma$**

Para dilucidar si la respuesta celular que se estaba obteniendo en ELISPOT era debida a la secreción de IFN- $\gamma$  por las células T CD8<sup>+</sup> o por las células T CD4<sup>+</sup>, los esplenocitos obtenidos en el Ejemplo 22 fueron reestimulados durante 1 hora con 5  $\mu$ g/ml de cada grupo de péptidos, tras lo cual se añadió Brefeldina a una concentración de 10  $\mu$ g/ml, incubándose durante toda la noche. Posteriormente se procedió a un marcaje de superficie empleando anticuerpos específicos anti-CD4 o anti-CD8 conjugados a FITC, seguido de un marcaje intracelular empleando anti-IFN- $\gamma$  conjugado a PE. Una vez fijadas las células fueron analizadas en el citómetro de flujo.

Los resultados, mostrados en la Figura 31, permiten apreciar que, tanto para el grupo de animales inmunizado con el MVA-C, como para el grupo inmunizado con NYVAC-C, la respuesta productora de IFN- $\gamma$  es mayoritariamente debida a la población de células T CD8<sup>+</sup> específicas activadas frente a los diferentes grupos de péptidos. Al determinar los niveles totales de IFN- $\gamma$  secretados por ambos tipos de células, se corroboró el resultado obtenido en el ensayo de ELISPOT, donde se observaba una respuesta específica frente a la mayoría de los grupos de péptidos en los animales inmunizados con ambos recombinantes. De nuevo, existen diferencias claras entre las respuestas generadas por cada uno de los recombinantes.

**- Ejemplo 25.- Inmunogenicidad del MVA-C: Respuesta humoral generada**

Para evaluar la respuesta humoral generada por la inoculación de MVA-C y NYVAC-C, grupos de 4 ratones HHDII o C57BL/6 de 6-10 semanas de edad fueron inoculados por vía intraperitoneal (i.p.) con una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-C (stock P3) o de NYVAC-C (grupo Aventis, Francia). 14 días después, se extrajo sangre del plexo suborbital de los ratones inmunizados y, tras dejarlo toda la noche a 4 °C se centrifugó obteniéndose el suero. La cantidad total de anticuerpos IgG presentes en los sueros frente a la proteína Gag (2  $\mu$ g/ml), la proteína de la envuelta gp-160 (2  $\mu$ g/ml) o frente a extractos celulares de una infección con vaccinia fue determinada por ELISA, diluyendo para ello los sueros 1/500 para la detección de los anticuerpos frente a Vaccinia y 1/50 para la detección de los anticuerpos frente a la proteína Gag y frente a la proteína gp160. Los resultados, que se muestran en la Figura 32, muestran un aumento de la respuesta humoral generada frente a la proteína de la envuelta en los ratones inmunizados con el vector recombinante MVA-C con respecto a los controles y los ratones inmunizados con NYVAC-C, siendo inferior la respuesta humoral generada frente a los antígenos del propio vector Vaccinia en los ratones inmunizados con MVA-C que en los ratones del mismo tipo inmunizados con NYVAC-C.

**- Ejemplo 26.- Utilización del MVA-C en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores de ADN y vectores virales derivados de Vaccinia: Respuesta inmune específica de células T productoras de IFN- $\gamma$  generada en ratones humanizados HHDII**

Grupos de 4 ratones HHDII de 6-10 semanas de edad se inocularon por vía intramuscular (i.m.) con 100  $\mu$ g del vector de ADN DNA-C (cedido por GeneArt, Alemania), formado por dos plásmidos recombinantes derivados de pcDNA que contienen cada uno de ellos una de las secuencias codificantes de proteínas del VIH-1 (gp120-C y gagpolnef-C) que lleva insertadas el MVA-C, bajo el control de sendos promotores de citomegalovirus. El grupo control fue inoculado (i.m.) con 100  $\mu$ g de ADN sin inserto (DNA  $\emptyset$ ). 15 días después se les inmunizó por vía intraperitoneal (i.p.) con  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-C (stock P3) o de NYVAC-C (grupo Aventis, Francia), que expresa los mismos antígenos de VIH que MVA-C. El grupo control recibió una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de NYVAC-WT. 10 días después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, mezclas de esplenocitos de los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade C (5  $\mu$ g/ml) que comprenden todas las regiones antigénicas incluidas en los virus recombinantes MVA-C y NYVAC-C. El número de células productoras de IFN- $\gamma$  obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos.

Los resultados se muestran en la Figura 33. Se observa que la inmunización combinada de vectores genera una respuesta inmune amplia, con producción de IFN- $\gamma$  frente a distintos antígenos del VIH, con diferencias significativas entre los vectores. La combinación DNA-C+NYVAC-C produjo inmunodominancia frente a Env.

**- Ejemplo 27.- Utilización del MVA-C en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores de ADN y vectores virales derivados de Vaccinia: Respuesta inmune específica de células T productoras de IL-2 generada en ratones humanizados HHDI**

5 Grupos de 4 ratones HHDI de 6-10 semanas de edad se inocularon por vía intramuscular (i.m.) con 100 µg del vector de ADN DNA-C (cedido por GeneArt, Alemania) utilizado en el Ejemplo 26. El grupo control fue inoculado (i.m.) con 100 µg de ADN sin inserto (DNA Ø). 15 días después se les inmunizó por vía intraperitoneal (i.p.) con 2 x 10<sup>7</sup> ufp/ratón de MVA-C (stock P3) o de NYVAC-C (grupo Aventis, Francia), que expresa los mismos antígenos de VIH que MVA-C. El grupo control recibió una dosis de 2 x de 10<sup>7</sup> ufp/ratón de NYVAC-WT. 10 días después de la  
10 última inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, mezclas de esplenocitos de los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con las mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade C (5 µg/ml), que comprenden todas las regiones antigénicas incluidas en los virus recombinantes MVA-C y NYVAC-C, utilizadas en los Ejemplos anteriores referentes al MVA-C. El número de células  
15 productoras de IL-2 obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 34. Se observa que la inmunización combinada de vectores genera una respuesta inmune amplia, con producción de IL-2 frente a los distintos antígenos del VIH, con diferencias  
20 significativas entre los vectores. La combinación DNA-C +NYVAC-C produjo inmunodominancia frente a Env.

**- Ejemplo 28.- Utilización del MVA-C en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores derivados de Vaccinia: Respuesta inmune específica de células T productoras de IFN-γ en ratones BALB/c**

25 Habiendo establecido que la administración de una primera dosis de inmunización que contenía el MVA-C era capaz de inducir una respuesta inmune específica en el modelo murino, se evaluó a continuación si la utilización de este vector de la invención como parte de un protocolo de inducción/potenciación, con diferentes combinaciones de MVA-C y NYVAC-C, daba lugar a un incremento en la magnitud y la amplitud de la respuesta inmune. Por ello, se suministró una primera dosis de inmunización a 4 grupos de ratones BALB/c (n=4) de 6-8 semanas de edad que  
30 contenía 2 x 10<sup>7</sup> ufp/ratón de MVA-C (P3), NYVAC-C (grupo Aventis), MVA-WT o NYVAC-WT por la ruta intraperitoneal. 15 días después los ratones recibieron una segunda dosis por vía intraperitoneal (i.p.) de 2 x 10<sup>7</sup> ufp/ratón, de manera que a uno de los grupos que había recibido MVA-B en la primera dosis se le inoculó NYVAC-C y a otro de nuevo MVA-C, a uno de los grupos que habían recibido NYVAC-C en la primera dosis se le inoculó NYVAC-C de nuevo y a otro MVA-B y, el grupo control que había recibido MVA-WT recibió en la segunda dosis  
35 NYVAC-C y el grupo control que había recibido NYVAC-WT recibió en la segunda dosis MVA-WT (grupo Aventis). Se generaron así grupos que habían sido inoculados con las siguientes combinaciones de vectores: MVA-C+NYVAC-C, NYVAC-C+MVA-C, MVA-C+MVA-C, NYVAC-C+NYVAC-C, NYVAC-WT+MVA-WT y MVA-WT+NYVAC-WT.

40 10 días después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, grupos de mezcla de esplenocitos de los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade C (5 µg/ml) que comprenden todas las regiones  
45 antigénicas incluidas en los virus recombinantes MVA-C y NYVAC-C. El número de células productoras de IFN-γ obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos.

De los resultados obtenidos, que se muestran en la Figura 35, se puede deducir que las diferentes combinaciones de vectores derivados de poxvirus (MVA-C+NYVAC-C, MVA-C+MVA-C, NYVAC-C+MVA-C, NYVAC-C+NYVAC-C, NYVAC-WT+MVA-WT, MVA-WT+NYVAC-WT) incrementan tanto la magnitud como la amplitud de la respuesta  
50 inmune específica generada, según se observa con los diferentes grupos de péptidos. Los grupos de péptidos mejor reconocidos fueron los correspondientes a Env1, GPN1 y GPN2, seguidos de GPN3 y Gag1.

Las combinaciones de MVA-C y NYVAC-C dieron lugar a mayores respuestas que la administración de dos dosis de virus homólogos, MVA-C+MVA-C o NYVAC-C+NYVAC-C. El grupo de ratones al que se le administró en la primera  
55 dosis NYVAC-C y en la dosis de potenciación MVA-C fue el que mostró el número más elevado de células secretoras de IFN-γ frente a los diferentes grupos de péptidos.

**- Ejemplo 29.- Utilización del MVA-C en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores derivados de Vaccinia: Producción de citoquinas por esplenocitos reestimulados procedentes de ratones BALB/c**

60 Seis grupos de ratones BALB/c (n=4) fueron inoculados en régimen combinado de inducción de la respuesta inmune mediante la administración de una primera dosis de vector y la potenciación de la misma mediante la inoculación de un segundo vector en una segunda dosis, de manera análoga a la descrita en el Ejemplo 28 y utilizando las mismas  
65 combinaciones de vectores. Los esplenocitos extraídos fueron estimulados *in vitro* con las diferentes mezclas de

péptidos solapantes pertenecientes al clade C (1 µg/ml) e incubados durante 5 días a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -70°C. Los niveles de IFN-γ e IL-10 se determinaron por ELISA usando kits comerciales (Pharmigen).

- 5 Los resultados se muestran en la Figura 36. Se observa que la combinación de vectores virales induce una respuesta celular tipo Th2, con polarización hacia los antígenos Env y gpn1.

10 **- Ejemplo 30.- Utilización del MVA-C en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores derivados de Vaccinia: Identificación de los tipos de células T específicas secretoras de IFN-γ generadas en ratones BALB/c**

Cinco grupos de ratones BALB/c (n=4) fueron inoculados en régimen combinado de inducción de la respuesta inmune mediante la administración de una primera dosis de vector y la potenciación de la misma mediante la inoculación de un segundo vector en una segunda dosis, de manera análoga a la descrita en el Ejemplo 28 y utilizando las mismas combinaciones de vectores salvo en el caso de los controles, en el que se prescindió de inocular la combinación MVA-WT+NYVAC-WT en este orden.

20 Los esplenocitos extraídos fueron reestimulados *in vitro* durante 1 hora a 37°C con 5 µg/ml de cada grupo de péptidos solapantes pertenecientes al clade C, tras lo cual se añadió Brefeldina a una concentración de 10 µg/ml, incubándose durante toda la noche a 37°C. Siete días después se procedió a un marcaje de superficie empleando anticuerpos específicos anti-CD4 o anti-CD8 conjugados a FITC, seguido de un marcaje intracelular empleando anti-IFN-γ conjugado a PE. Una vez fijadas las células fueron analizadas en el citómetro de flujo.

25 Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 37. Se observa que la combinación de vectores virales induce un menor aumento de células CD8<sup>+</sup> productoras de IFN-γ que de células CD4<sup>+</sup>, con la combinación NYVAC-C+MVA-C induciendo el mayor incremento frente a los péptidos de Gag1, Env1, Gpn1 y Gpn2.

30 **- Ejemplo 31.- Perfil diferencial de cambios en los niveles de expresión de genes humanos inducidos durante la infección con los vectores MVA y NYVAC**

Para evaluar si las diferencias en las respuestas inmunes inducidas por la inoculación de vectores recombinantes derivados de MVA y NYVAC iban acompañadas también de perfiles diferentes de inducción de variaciones en los niveles de expresión de genes en las células infectadas, se realizó un experimento de infección de células HeLa con MVA y NYVAC y se evaluaron los cambios experimentados en los niveles de expresión de 15000 genes humanos utilizando microarrays con ADNc humano. Para ello, se generaron microarrays de ADNc tal como se ha descrito previamente (20), utilizando la genoteca de ADNc humano 40K de Research Genetics (<http://www.resgen.com/products/SVHcDNA.php3>), que contenían 15.360 secuencias de ADNc, (de las cuales 13295 corresponden a genes conocidos y 2.257 corresponden a genes de control), utilizando portaobjetos CMT-GAPS II (Corning) sobre los que se fijaron las secuencias de ADNc mediante el Microgrid II (BioRobotics) a 22°C y una humedad relativa de 40-45%. Por otro lado, se cultivaron células HeLa (de la American Type Culture Collection) en placas de 10 cm de diámetro, en medio de Dulbecco al que le había añadido suero bovino de recién nacido al 10% y antibióticos y se llevaron a cabo infecciones con el MVA-WT y el NYVAC-WT a una multiplicidad de infección de 5 ufp/célula. El ARN total se aisló de las células infectadas utilizando Ultraespect-II RNA (Biotecx), siguiendo las instrucciones del fabricante, a partir de muestras tomadas por duplicado de las células infectadas con cada uno de los virus transcurridos 2, 6 y 16 horas del momento de la infección. Cada muestra de ARN se utilizó en dos hibridaciones diferentes: en una hibridación, la muestra infectada con MVA-WT se marcó con dUTP-Cy3 y la muestra infectada con NYVAC-WT se marcó con dUTP-Cy5, mientras que en la otra la muestra infectada con MVA-WT se marcó con dUTP-Cy5 y la muestra infectada con NYVAC-WT se marcó con dUTP-Cy3. El doble marcaje se utilizó para suprimir diferencias en el marcaje y la hibridación debidas a características específicas del Cy-dUTP. Una mezcla que contenía 40 µg de ARN, 150 pmoles de oligo(dT)<sub>20</sub>, dATP 0,5 mM, dGTP 0,5 mM, dCTP 0,5 mM, dTTP 0,1 mM, dUTP-Cy3/Cy5 0,05 mM (Amersham), tampón de reacción para la primera hebra 1X (Invitrogen) y ditiotritol 10 mM en un volumen de 38 µl se calentó (65°C, 5 min) y se preincubó (42°C, 5 min), tras lo cual se añadieron 400 U de SuperScript II (Invitrogen) y 40 U de inhibidor de RNasa (Roche) y se incubó la mezcla a 42°C durante 2,5 horas. La reacción se terminó añadiendo EDTA y el molde de ARN de partida se retiró añadiendo 2 µl de NaOH 10 N, seguido de incubación (20 min, 65°C). La reacción se neutralizó añadiendo 4 µl de ácido acético 5 M. Se mezclaron las sondas de Cy5 y Cy3 y los colorantes no incorporados se retiraron mediante precipitación con isopropanol. Las sondas se resuspendieron en agua desionizada; los agentes bloqueantes añadidos para incrementar la especificidad fueron poli(A) (20 µg, Sigma), ARNt (20 µg, Sigma) y ADN humano Cot-1 (20 µg, Invitrogen). Mientras las sondas se secaban en una Speed-Vac, los microarrays se prehibridaron con una mezcla que contenía SSC 6x (SSC 1X está formado por NaCl 0,15 M y citrato sódico 0,015 M), dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,5% y albúmina de suero bovino al 1% (42°C, 1 hora), se lavaron cinco veces con agua, y se secaron mediante centrifugación (563 x g, 1 min). Las sondas se resuspendieron en 40 µl de tampón de hibridación (formamida al 50%, SSC 6x, SDS al 0,5%, solución de Denhardt 5x) y se incubaron con los portaobjetos que contenían los microarrays (42°C, 16 horas) en cámaras de hibridación (Array-It) en un baño de agua en la oscuridad. Después de la incubación, los portaobjetos se lavaron dos veces en SSC 0,1X-SDS 0,1% durante 5 minutos cada vez y tres veces en SSC 0,1x durante 5 minutos cada vez. Finalmente, los portaobjetos se secaron mediante centrifugación como se

describió anteriormente y se escanearon en un ScanArray 4000 (Packard Biosciences) utilizando el software ScanArray 3.1. A partir de las imágenes de Cy5 y Cy3 se obtuvieron datos preliminares utilizando el software QuantArray 3.0 (Packard Biosciences), que se procesaron utilizando el software SOLAR (BioALMA, Madrid, España. La señal de fondo se resta de la señal, se representa  $\log_{10}(\text{señal})$  frente  $\log_2(\text{relación})$  y se realiza una normalización mínima. Este valor se calcula para las cuatro réplicas y se obtiene una tabla con la señal media, el factor de cambio, log (relación), la desviación estándar del logaritmo de la relación y el valor z (una medida de la proximidad de un valor [log relación] a otros valores con señales similares) (21). Una vez obtenidos estos datos, el juego de datos se redujo eliminando los genes con una desviación estándar entre las réplicas  $>1$  y aquellos que mostraban valores de  $z \leq 2$ , después de lo se reprocesaron los datos, se agrupó los genes utilizando el mapa clásico de autoorganización de Kohonen (22,23,24) y se analizó el mapa resultante utilizando el software Engene, disponible en <http://www.engene.cnb.uam.es>.

Las diferencias más representativas detectadas en las células infectadas con uno y otro virus se resumen en la Tabla 7, en la que se indican el factor de aumento de la expresión de varios genes representativos observado transcurridos distintos intervalos de tiempo (horas post-infección: h.p.i.) tras el momento de la infección. En ella puede observarse que el perfil de inducción de variaciones en los niveles de expresión de genes en las células infectadas es diferente según el virus utilizado para la infección. Por ejemplo, el incremento por MVA y no por NYVAC de genes coestimuladores de la respuesta inmune, como IL-7, proteína B7, NFATC3 y MAP2K5, puede condicionar el menor grado de respuesta inmune de un vector frente al otro.



**Tabla 7.-Perfiles de expresión de genes representativos modificados por la infección de células humanas HeLa con cepas de MVA y NYVAC**

Función y nombre del gen	Símbolo gen	Factor de cambio con MVA			Factor de cambio con NYVAC		
		2 hpi	6 hpi	16 hpi	2 hpi	6 hpi	16 hpi
Genes incrementados con MVA y NYVAC							
Respuesta de crecimiento temprano 1	EGR1	4,17	4,60	1,94	4,74	10,38	6,83
Factor nuclear similar al factor 2 derivado de células eritroides 3	NFE2L3	2,36	2,36	2,52	1,19	2,13	1,32
Factor nuclear del polipéptido ligero kappa 2	NFKB2	2,03	2,22	2,34	1,53	2,02	1,79
Interleuquina 6	IL6	2,65	2,14	1,56	2,02	5,85	2,68
Proteína estimulada por el interferón, 15 kDa	ISG15	2,57	2,25	1,61	1,21	1,14	3,39
Antígeno CD80	CD80	1,75	2,58	2,06	1,25	2,02	2,7
Fosfatasa de especificidad dual 5	DUSP5	3,01	2,91	1,87	1,98	4,16	2,18
Protooncogén JUN B	JUNB	2,93	3,92	1,06	2,16	2,14	1,32
Homólogo del oncogén V-jun del virus del sarcoma de aves 17	JUN	2,17	2,02	1,31	2,14	13,75	8,01
Homólogo del oncogén V-MYC del virus de mielocitomatosis de aves	MYC	2,22	1,53	1,05	1,05	2,93	1,65
Miembro de la familia de la quinesina 5A	KIF5A	2,05	1,88	1,73	1,89	5,45	4,64
Genes incrementados con MVA							
Interleuquina 7	IL7	6,10	5,3	3,2	0,80	0,55	0,88
Proteína B7	B7	1,97	1,75	3,53	1,58	1,58	1,78
Antígeno CD47	CD47	5,35	4,08	3,16	1,02	0,76	1,03
Proteína quinasa activada por mitógenos 5	MAP2K5	2,37	2,74	1,69	1,02	0,76	1,03
Factor nuclear del polipéptido ligero kappa epsilon	NFKBIE	2,41	1,61	1,12	1,18	1,27	1,42
Factor nuclear citoplásmico de células T activadas	NFATC3	3,46	2,97	1,30	1,01	1,34	1,34
Genes incrementados con NYVAC							
Factor activador de la transcripción 3	ATF3	1,78	1,98	0,99	2,42	8,36	6,10
Caspasa 9, proteasa de cisteína relacionada con la apoptosis	CASP9	1,1	0,82	0,32	2,59	2,37	1,98
Fosfatasa de especificidad dual 2	DUSP2	3,93	3,59	1,85	2,43	5,25	1,56
Nucleoporina de 88kD	NUP88	0,87	0,93	0,92	3,52	6,49	4,23
Factor de crecimiento de tejido conectivo	CTGF	5,77	4,51	1,12	4,24	11,45	5,14
Dominio similar a los de homología con plectestrina familia A miembro 1	PHLDA1	1,01	0,95	0,99	4,19	8,24	5,28

**- Ejemplo 32.- Perfil diferencial de cambios en los niveles de inducción de apoptosis inducidos durante la infección de células en cultivo por los vectores MVA y NYVAC**

5

Para evaluar si las diferencias observadas en la respuesta inmune inducida por la inoculación de vectores derivados de MVA y NYVAC iban acompañadas de variaciones en los niveles de inducción de muerte celular por apoptosis, se llevaron a cabo distintos experimentos para evaluar el grado de apoptosis, evaluando distintos parámetros indicativos del mismo. Una de las características de la apoptosis es la rotura específica por proteasas de la proteína PARP. Para evaluarla, se procedió a la infección de células HeLa con 5 ufp/célula de MVA o NYVAC y se recogieron a 4, 8 y 16 horas postinfección en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 0,5 M, NP-40 10%, SDS 1%). Se separaron cantidades iguales de lisados de proteínas (10 µg) mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con un anticuerpo anti-PARP humano (1:500 dilución) de Cell Signalling, obteniéndose los resultados que se muestran en la parte superior de la Figura 38a, en la que se indica la posición de la banda correspondiente a la proteína PARP completa (PARPc)

15

y la correspondiente a un fragmento de la proteína PARP escindido de la proteína completa (PARPf). Como control interno para verificar que había sido aplicado en el gel la misma cantidad de proteína, las membranas fueron incubadas también frente a un anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -actina (SIGMA), obteniéndose la señal que se muestra en la parte inferior de dicha Figura. Los resultados muestran que la infección de células HeLa con NYVAC induce con el tiempo de infección la degradación de PARP. Esta degradación es mucho menor en células infectadas con MVA. La inducción de apoptosis por NYVAC también se confirmó mediante pruebas de inmunofluorescencia de células HeLa infectadas con 5 ufp/célula cuyos núcleos fueron teñidos a las 24 horas postinfección con DAPI durante 30 min a temperatura ambiente y las células fotografiadas. Los resultados se muestran en la Figura 38b, en cuya parte inferior, correspondiente a células HeLa infectadas con NYVAC, se observa que NYVAC favorece condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos, algo que no se observa en la infección con MVA (parte superior de la Figura). Otro indicador de apoptosis es la activación de la enzima RNasa L, que favorece la ruptura del ARN ribosómico. Para evaluar esta activación, se aisló el total de ARN usando el sistema de purificación por resina de ARN Ultraspec-II (Biotech), a partir de muestras de células HeLa infectadas con 5 ufp/célula obtenidas transcurridas 18 ó 24 de la infección con la cepa Western Reserve (WR) de Vaccinia, con MVA o con NYVAC, añadiendo un control en el que se simuló la infección. Se sometieron los ARNs (2 microgramos) a electroforesis en geles de agarosa-formaldehído al 1% que contenían bromuro de etidio y se fotografió bajo luz ultravioleta el patrón de bandas obtenido. Los resultados, mostrados en la Figura 38c muestran que la infección de células HeLa con NYVAC induce a las 18 horas degradación del ARN ribosómico en fragmentos característicos de la activación de la enzima RNasa L, lo que no se observa en la infección con MVA.

Finalmente, otro indicador de apoptosis es la cuantificación del número de células apoptóticas por citometría de flujo. Este ensayo se realizó de nuevo en células HeLa infectadas (5 ufp/célula) con Vaccinia WR, MVA y NYVAC, así como en controles en los que se simuló la infección. Los diferentes estadios del ciclo celular y el porcentaje de células en la fase subG<sub>0</sub> fueron analizadas por tinción con yoduro de propidio (IP). Para cada uno de ellos se realizó el ensayo en muestras que habían sido incubadas en ausencia o en presencia del inhibidor general de caspasas zVAD (4 micromolar, Calbiochem). A las 24 horas se recogieron las células, se lavaron con PBS frío, se permeabilizaron con etanol al 70% en PBS a 4°C durante 30 min. Después de tres lavados con PBS, las células se incubaron durante 45 min a 37°C con RNasa A y se tiñeron con IP (10 microgramos/ml). El porcentaje de células que presentaban DNA hipodiploide se determinó por citometría de flujo. Los datos fueron adquiridos en 15000 células por muestra y los resultados se representan como veces de incremento en células apoptóticas respecto a las células sin infectar. El gráfico de la Figura 38d muestra el factor de incremento de células apoptóticas observado en cada uno de los casos. En él puede observarse que la infección con NYVAC provoca apoptosis en una gran parte de la población celular (más del 40%) y que este fenómeno se previene con la adición del inhibidor general de caspasas zVAD. La inducción de apoptosis por MVA fue mucho más reducida.

Los resultados de estos ensayos demuestran que NYVAC induce apoptosis durante la infección, mientras que MVA no parece activar apoptosis o da muestras de activar en menor medida. Estas diferencias bioquímicas, junto a las diferencias genéticas definidas en el Ejemplo 31, indican que es de esperar que los vectores recombinantes generados a partir de MVA y NYVAC, a pesar de contener las mismas secuencias codificantes del VIH-1 bajo el control de promotores idénticos, den lugar a comportamientos diferentes al ser inoculados en seres humanos con la intención de provocar una respuesta inmune contra el VIH. Los vectores recombinantes derivados de MVA, por tanto, representan una interesante alternativa para sustituir o complementar de forma ventajosa a los vectores recombinantes derivados de NYVAC en protocolos de inmunización frente al VIH-1.

#### ***Construcción y ensayos realizados con los vectores diseñados para uso en macacos***

##### ***- Ejemplo 33.- Generación del MVA-89.6P-SIVgpn***

##### ***Construcción del vector plasmídico pLZAW1-89.6p-SIVgpn-18***

El vector plasmídico de transferencia pLZAW1-89.6p-SIVgpn-18 fue construido por los inventores para la generación de los virus recombinantes derivados de MVA y de NYVAC que expresan la parte correspondiente a la proteína gp120 del gen Env del SHIV 89.6P (89.6Psynenv120, a la que en lo sucesivo se aludirá de forma abreviada como 89.6P-gp120) y la quimera de los genes Gag, Pol y Nef del mismo virus (SIVmac239-gagpolnef, a la que en lo sucesivo se aludirá de forma abreviada como SIVgpn), esta última a partir de una secuencia de nucleótidos obtenida a partir de las secuencias de los genes Gag, Pol y Nef del virus SHIV89.6P en las que se habían practicado las mismas modificaciones que se realizaron para obtener las quimeras de los genes Gag, Pol y Nef presentes en los vectores MVA-B y MVA-C. El plásmido pLZAW1-89.6p-SIVgpn-18 es un derivativo de pUC diseñado para la selección de placas azules/blancas y la generación, como medida de seguridad, de un vector viral carente del marcador  $\beta$ -Gal, al igual que se hizo en el caso de los vectores MVA-B y MVA-C, como medida de seguridad. Contiene las secuencias flanqueantes derecha (TK-R) e izquierda (TK-L) del gen de la timidina quinasa (TK) del MVA, una repetición corta de la secuencia flanqueante izquierda ("brazo izquierdo") del gen TK, el promotor E3L dirigiendo la expresión del marcador de selección  $\beta$ -galactosidasa, y el gen de resistencia a ampicilina (AP). Entre las dos secuencias flanqueantes se encuentran las dos secuencias que se desea expresar, 89.6P-gp120 (SEQ ID NO: 22) y SIVgpn (SEQ ID NO: 23), que han sido modificadas para optimizar el uso de codones de mamífero. Para

dirigir la expresión de cada una de las secuencias hay sendos promotores sintéticos temprano/tardío (pE/L), situados en orientación opuesta en la zona del inserto más alejada de las secuencias flanqueantes. La posición de cada uno de los componentes incluidos en el plásmido se describe a continuación en la Tabla 8.

5

**Tabla 8.- Posición de los componentes del plásmido pLZAW1gp120B/gagpolnefB-1**

Secuencia flanqueante izquierda de TK	410-908	Complementaria
T5NT para $\beta$ -gal	929-935	Complementaria
$\beta$ -gal	ATG-TAA (936-4079)	Complementaria
Promotor E3L para $\beta$ -gal	4080-4140	Complementaria
Parte 1 de la secuencia flanqueante izquierda de TK	4151-4498	Complementaria
89.6p-gp120	ATG-TAA (4518-6032)	Complementaria
Promotor E/L para 89.6P-gp120	6080-6118	Complementaria
Promotor E/L para SIVgpn	6143-6181	
SIVgpn	ATG-TAG (6226-10443)	
T5NT para SIVgpn	10499-10505	
Secuencia flanqueante derecha de TK	10488-11179	Complementaria
AP	ATG-TAA (12350-13210)	Complementaria

Para la construcción de este plásmido se utilizaron otros dos plásmidos diferentes:

10

- pcDNA89.6P-syn-CD5-GP120REKR: (proporcionado por Ralf Wagner, Regensburg, Alemania).

- pCR-ScriptSIV-syn-gagpolnef: (proporcionado por Ralf Wagner, Regensburg, Alemania).

15

- pLZAW1: El plásmido fue proporcionado por Linong Zhang, del grupo Aventis, Canadá. Es un plásmido basado en pUC que contiene un brazo izquierdo del gen de TK, sitios de clonación para insertar genes exógenos, una repetición corta del brazo izquierdo del gen de TK, un promotor E3L dirigiendo la expresión de un casete con  $\beta$ -gal y un brazo derecho del gen de TK.

20

- pJR101: El plásmido fue generado por los inventores. Es un derivado de pUC que contiene las secuencias flanqueantes derecha e izquierda del *locus* HA del virus MVA, sitios de clonación para insertar genes exógenos bajo el control de la transcripción del promotor sintético temprano/tardío (E/L), y el promotor 7.5 del virus MVA (P7.5) dirigiendo la expresión del gen  $\beta$ -gus.

25

La construcción del plásmido pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18 a partir de estos otros dos plásmidos se representa en las Figuras 41a y 41b. Brevemente, un fragmento de ADN de 1,518 Kb que contenía el gen 89.6P-gp120 (indicado en la figura como 89.6synenv120) se escindió del plásmido pcDNA89.6P-syn-CD5-GP120REKR mediante digestión con EcoRI, tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa para generar extremos romos, y digestión con BamHI. El fragmento de ADN se subclonó en el vector pJR101 (previamente digerido con las endonucleasas de restricción SmaI y BamHI), generando el plásmido pJR-89.6P-18 (7918 pb). Un fragmento de ADN de 1,612 kb que contenía el promotor sintético temprano/tardío (E/L) dirigiendo al gen 89.6-gp120 se escindió del plásmido pJR-89.6P-18 mediante digestión con HindIII y BamHI, seguida de la modificación con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa, y se clonó en el vector pLZAW1 (previamente digerido con la endonucleasa de restricción AscI, modificado mediante la incubación con el fragmento Klenow, y desfosforilado mediante incubación con la fosfatasa alcalina intestinal de ternera (CIP)), generando el vector plasmídico pLZAW1-89.6P-9 (9131 pb) (Figura 41a).

30

35

Por otra parte, un fragmento de ADN de 4,230 kb que contenía el gen SIVgpn (indicado en las Figuras como SIVsyngagpolnef) se escindió del plásmido pCR-Script SIV-syn-gagpolnef mediante digestión con EcoRI y XhoI seguida de la modificación con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa, y se subclonó en el vector pJR101 (previamente digerido con la endonucleasa de restricción SmaI y desfosforilado mediante incubación con la fosfatasa alcalina intestinal de ternera (CIP)), generando el plásmido pJR-SIVgpn-9 (10630 pb). Un fragmento de ADN de 4,3 kb que contenía el promotor sintético temprano/tardío (E/L) dirigiendo al gen SIVgpn se escindió del plásmido pJR-SIVgpn-9 mediante digestión con HindIII, tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y digestión con NotI, y se clonó en el vector pLZAW1-89.6P-9 (previamente digerido con las endonucleasas de restricción SmaI y NotI, generando el vector plasmídico de transferencia pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18 (13399 pb) (Figura 41b).

40

45

El plásmido pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18 generado dirige la inserción de los genes de interés en el locus TK del genoma de MVA y NYVAC. Después de que los virus recombinantes deseados fueron aislados mediante la evaluación de la expresión de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, la propagación posterior de los virus recombinantes

conduce a la autodelección del gen  $\beta$ -gal mediante recombinación homóloga entre el brazo izquierdo de TK y la repetición corta del brazo izquierdo de TK que están flanqueando el marcador.

#### Construcción del virus recombinante MVA-89.6P-SIVgpn

Cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) procedentes de huevos SPF (libres de patógenos específicos, por sus siglas en inglés "Specific Pathogen Free") fueron infectados con un virus atenuado MVA en pase 586 (habiéndose el MVA-F6 del pase anterior, 585, proporcionado por Gerd Sutter) a una multiplicidad de 0,05 ufp/célula, y posteriormente transfectados con 10  $\mu$ g del vector plasmídico de transferencia pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18, usando para ello el reactivo de transfección lipofectamina (Lipofectamine™ 2000, Cat. 18324-012, lote 1198865, suministrada por Invitrogen S.A., El Prat de Llobregat, Barcelona, España) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 72 horas post-infección las células fueron recogidas, sonicadas y usadas para la selección de los virus recombinantes.

Los virus MVA recombinantes que contenían los genes 89.6P-gp120/SIVgpn y que coexpresaban de forma transitoria el gen marcador  $\beta$ -Gal (MVA-SHIV (X-Gal<sup>+</sup>)), fueron seleccionados realizando pases consecutivos de purificación de placas en células CEF teñidas con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactósido (XGal) (300  $\mu$ g/ml). Los virus MVA recombinantes que contenían los genes 89.6P-gp120/SIVgpn y que habían perdido el gen marcador (MVA-SHIV (X-Gal<sup>-</sup>)), fueron seleccionados como focos virales no teñidos en células CEF en presencia de XGal. En cada paso de purificación las placas aisladas fueron expandidas en células CEF durante 3 días, y el extracto viral crudo obtenido fue usado para el siguiente paso de purificación de placas.

En el primer paso de la selección por cribado se aislaron 3 placas X-Gal<sup>+</sup> a las que se denominó MVA-89.6P-SIVgpn-(1 a 3). La placa denominada MVA-89.6P-SIVgpn-1, que expresaba de forma eficiente los antígenos 89.6P-gp120 y SIVgpn, se amplificó y utilizó para el siguiente paso de purificación. En el segundo pase, se aislaron 22 placas X-Gal<sup>+</sup>, todas las cuales expresaban de forma eficiente ambas proteínas. Se amplificaron tres placas, denominadas MVA-89.6P-SIVgpn-1.4, MVA-89.6P-SIVgpn-1.6 y MVA-89.6P-SIVgpn-1.18, que se utilizaron para el siguiente paso de purificación. En el tercer pase, se aislaron 20 placas X-Gal<sup>+</sup> y 4 placas X-Gal<sup>-</sup>, todas las cuales expresaban de forma eficiente ambos antígenos. Una de las placas X-Gal<sup>-</sup> (MVA-89.6P-SIVgpn-1.6.8) y una de las placas X-Gal<sup>+</sup> (MVA-89.6P-SIVgpn-1.18.2) se amplificaron y utilizaron en el siguiente paso de purificación; la primera de ellas, MVA-89.6P-SIVgpn-1.6.8, se utilizó para preparar el stock P1 por infección a partir de una placa p150 en células CEF). En el cuarto pase se aislaron 6 placas X-Gal<sup>-</sup> y 6 placas X-Gal<sup>+</sup>. El recombinante denominado MVA-89.6P-SIVgpn-1.6.8.5 (X-Gal<sup>-</sup>) se utilizó para preparar los stocks P2 por infección a una multiplicidad de 0,01 ufp/célula de cinco placas p150. Los stocks P3 (generados en células CEF infectadas en 40-100 placas p150 a una multiplicidad de infección de 0,05 ufp/célula, recogidos transcurridos 3-4 días después de la infección y purificados a través de dos colchones de sacarosa al 45%) se prepararon solamente a partir del MVA-89.6P-SIVgpn-1.6.8.5 (X-Gal<sup>-</sup>) para los estudios de inmunización en simios; las características de los diferentes stocks P3 obtenidos se especifican más adelante en el Ejemplo 38.

#### Caracterización del MVA-89.6P-SIVgpn

Para confirmar la homogeneidad genética del virus MVA-89.6P-SIVgpn-1.6.8.5 (X-Gal<sup>-</sup>) generado y la integridad de los genes insertados, se amplificaron los stocks P2 (MVA-89.6P-SIVgpn-1.6.8.5) y P3 mediante infección de células CEF a una multiplicidad de infección de 5 ufp/célula, recuperando los extractos celulares a las 24 horas post-infección. Se purificó el ADN del virus y se sometió a análisis mediante PCR empleando para ello oligonucleótidos cebadores que hibridan con las regiones TK flanqueantes del inserto de interés izquierda (oligonucleótido TK-L) o derecha (oligonucleótido TK-R2), con las siguientes secuencias:

TK-L: 5' TGATTAGTTTGATGCGATTC 3' (SEQ ID NO:1)  
TK-R2: 5' CTGCCGTATCAAGGACA 3' (SEQ ID NO:21)

Las posiciones en las que hibridan dichos oligonucleótidos con respecto al inserto presente en MVA-89.6P-SIVgpn, así como los tamaños estimados de los fragmentos generados en las PCR que utilizan como molde el ADN de dicho virus y el ADN correspondiente al virus MVA de tipo silvestre (WT), carente de inserto, aparecen representados en la parte superior de la Figura 42.

La parte inferior de la Figura 42, por su parte, muestra una fotografía de un gel correspondiente al análisis de productos de PCR situados entre los brazos izquierdo (TK-L) y derecho (TK-R) del locus TK en los virus MVA-SHIV de los stocks P2 (MVA-89.6P-SIVgpn (P2)) y P3 (MVA-89.6P-SIVgpn (P3)), el virus MVA tipo silvestre (MVA-WT) y el plásmido de transferencia pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18. Para su obtención, 100 ng del ADN viral extraído de células CEF infectadas a una multiplicidad de 5 ufp/célula con los virus MVA-WT (calle 3), MVA-89.6P-SIVgpn (P2) (calle 4) o MVA-89.6P-SIVgpn (P3) (calle 5) o 10 ng del plásmido pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18 fueron usados como molde para hacer un análisis por PCR de la secuencia ubicada entre ambos brazos del locus TK empleando como cebadores 100 ng de los oligonucleótidos que hibridan con las secuencias flanqueantes del gen TK, TK-L (SEQ ID NO:1) y TK-R2 (SEQ ID NO:21) en una mezcla de reacción que contenía 0,3 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 2,5 U de la

enzima polimerasa Platinum Taq. El programa incluye un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 min, 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 60°C durante 1 min y extensión a 68°C durante 2 min, y finalmente un ciclo de extensión a 68°C durante 10 min. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 0,7%, obteniéndose el resultado que se muestra en la parte inferior de la Fig. 3. En las calles 4 y 5, las correspondientes a los dos stocks de vector MVA-SHIV, se observa una banda situada ligeramente por encima de la banda de 6 Kb del marcador (calle 1), compatible con la presencia del inserto completo, banda que también aparece en la calle correspondiente al control positivo, el plásmido pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18, mientras que en la calle correspondiente al virus de tipo silvestre MVA-WT (3) aparece una banda mucho menor, que corresponderían al locus de TK sin inserto.

Adicionalmente, se procedió a secuenciar el ADN del virus MVA-89.6P-SIVgpn del stock P2, utilizando como cebadores los oligonucleótidos TK-L (SEQ ID NO:1), TK-R2 (SEQ ID NO:21) y E/L (SEQ ID NO:25) obteniéndose la secuencia representada por SEQ ID NO:24.

Los elementos que forman parte del inserto presente en el genoma del virus MVA-89.6-SIVgpn se especifican a continuación en la Tabla 9.

**Tabla 9.- Posición de los componentes principales del inserto del vector MVA-89.6P-SIVgpn**

Parte 1 de la secuencia flanqueante izquierda de TK	1-499	Complementaria
89.6P-gp120	ATG-TAA (519 - 2033)	Complementaria
Promotor E/L para 89.6P-gp120	2081 - 2119	Complementaria
Promotor E/L para SIVgpn	2144 - 2183	
SIVgpn	ATG-TAG (2227 - 6444 )	
Secuencia flanqueante derecha de TK	6488 - 7179	Complementaria

#### **Ejemplo 34.- Análisis de la expresión de proteínas del SHIV a partir del MVA-89.6P-SIVgpn**

##### **34.1.- Transferencias tipo Western**

La expresión de las proteínas 89.6P-gp120 y SIVgpn por los stocks P2 y P3 del virus MVA-89.6P-SIVgpn fue analizada mediante transferencia tipo Western. Monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con 5 ufp/célula del stock P2 o del stock P3. Los extractos celulares fueron recogidos a las 24 horas post-infección, fraccionados mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa, y sometidos a la reacción frente a un anticuerpo policlonal de conejo anti-gp120 (generado en el laboratorio de los inventores) que reconoce la proteína gp120 del SHIV89.6P; y frente a un anticuerpo monoclonal anti-SIV-gag-p27 (cedido por el programa EVA, ARP392) que reconoce la parte correspondiente a la proteína p27 del antígeno Gag del SIV y, por ello, la proteína de fusión SIVgpn. Como controles positivos se utilizaron extractos procedentes de células transfectadas de forma transitoria con el vector plasmídico de transferencia pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18.

Como se muestra en la Figura 43, tanto la proteína 89.6-gp120 (fotografía superior, marcada como "anti-gp120") como la proteína de fusión SIVgpn (fotografía inferior, marcada como "anti-SIVp27") se detectaron en los extractos de células infectadas con virus de los stocks P1, P2 y P3 del MVA-89.6P-SIVgpn, así como en el extracto de células transfectadas de forma transitoria con el plásmido utilizado como control positivo (calles marcadas como "C+"), indicando la correcta expresión de ambos antígenos por los virus recombinantes derivados de MVA generados.

##### **34.2. Inmunotinción de placas**

La expresión de las proteínas 89.6P-gp120 y SIVgpn por parte del recombinante MVA-89.6P-SIVgpn se analizó también en células CEF infectadas con una dilución  $10^{-5}$  del stock P3, mediante la inmunotinción de las mismas utilizando bien un anticuerpo policlonal dirigido contra las proteínas propias del vector MVA tipo silvestre (anti-WR), bien un anticuerpo policlonal anti-gp120 del clade B (anti-gp120) o bien el anticuerpo monoclonal anti-SIVgag-p27 proporcionado por el programa EVA (ARP392).

Los resultados, mostrados en la Figura 44, muestran que más del 97% de las placas virales que resultaban teñidas con el anticuerpo anti-WR eran también positivas para los anticuerpos anti-gp120 (fotografías y barras marcadas como "antigp120") y anti-SIVgag-p27 (fotografías y barras marcadas como "anti-SIVp27").

#### **- Ejemplo 35.- Construcción y caracterización del virus recombinante NYVAC-89.6P-SIVgagpolnef**

Se infectaron con la cepa de tipo silvestre de NYVAC (donada por el grupo Aventis, en el marco de colaboración del proyecto financiado por el V Programa Marco de la Unión Europea (*European Vaccine Effort Against HIV*, conocido

por su acrónimo EuroVac I), a una multiplicidad de infección de 0,025 ufp/célula, células BSC40 (una línea celular derivada de riñón de mono, que carece de potencial miogénico), que luego se transfectaron con 10 µg de ADN del vector plasmídico de transferencia pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18 (cuyas características se describieron en el Ejemplo 33), utilizando como reactivo lipofectamina (Invitrogen, Cat. 18324-012, lote 1198865) siguiendo las instrucciones del fabricante. 72 horas después de la infección se recogieron las células, se sonicaron y se utilizaron para realizar un cribado en busca de virus recombinantes. Los virus NYVAC recombinantes que contenían los genes 89.6P-gp120/SIVgpn y que coexpresaban de forma transitoria el gen marcador β-Gal (NYVAC-89.6P-SIVgpn (X-Gal<sup>+</sup>)), fueron seleccionados realizando pases consecutivos de purificación de placas en células BSC40 teñidas con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactósido (XGal) (300 µg/ml). Los virus NYVAC recombinantes que contenían los genes 89.6P-gp120/SIVgpn y que habían perdido el gen indicador β-Gal (NYVAC-89.6P-SIVgpn (X-Gal<sup>-</sup>)), fueron seleccionados como focos virales no teñidos en células BSC40 en presencia de XGal. En cada paso de purificación las placas aisladas fueron expandidas en células BSC40 durante 2 días, y el extracto viral crudo obtenido fue usado para el siguiente paso de purificación de placas.

En el primer paso de la selección por cribado se aislaron 3 placas X-Gal<sup>+</sup> a las que se denominó NYVAC-89.6P-SIVgpn-(1 a 3). Las tres placas, que expresaban eficientemente los antígenos 89.6P-gp120 y SIVgpn, se amplificaron y utilizaron para el siguiente paso de purificación de placas. En el segundo pase, se aislaron 18 placas X-Gal<sup>+</sup>; 8/18 expresaban ambas proteínas. Se amplificó la placa denominada NYVAC-89.6P-SIVgpn-2.1, que se utilizó para el siguiente paso de purificación. En el tercer pase, se aislaron 12 placas X-Gal<sup>+</sup>, todas las cuales expresaban de forma eficiente la proteína 89.6P-gp120 y 11/12 expresaban la proteína SIVgpn. Las placas denominadas NYVAC-89.6P-SIVgpn-2.1.1 y NYVAC-89.6P-SIVgpn-2.1.2 se amplificaron y utilizaron en el siguiente paso de purificación. En el cuarto pase se aislaron 12 placas X-Gal<sup>+</sup> y 12 placas X-Gal<sup>-</sup>; todas ellas expresaban de forma eficiente la proteína 89.6P-gp120 y 22 de 24 expresaban la proteína SIVgpn. Los recombinantes denominados NYVAC-89.6P-SIVgpn-2.1.1.1 (X-Gal<sup>+</sup>) y NYVAC-89.6P-SIVgpn-2.1.2.3 (X-Gal<sup>+</sup>) se amplificaron y utilizaron en el siguiente paso de purificación. En el quinto pase se aislaron 12 placas X-Gal<sup>+</sup>; todas ellas expresaban de forma eficiente ambos antígenos. El recombinante denominado NYVAC-89.6P-SIVgpn-2.1.1.1.4 (X-Gal<sup>+</sup>) se amplificó en células CEF (una placa de p150 para generar el stock P1) y se utilizó para preparar los stocks P2 (por infección de cinco placas p150 a 0,01 ufp/célula). Los stocks P3 (crecidos en 40-100 placas p150 de células CEF infectadas a una multiplicidad de infección de 0,05, recogidos transcurridos 3-4 días después de la infección y purificados a través de dos colchones de sacarosa al 45%) se prepararon para los estudios de inmunización en simios; las características de cada uno de los stocks P3 generados se mencionan en el Ejemplo 37.

#### Caracterización del NYVAC-89.6P-SIVgpn

Para confirmar la homogeneidad genética y pureza del virus NYVAC-89.6P-SIVgpn generado y la integridad de los genes insertados, se amplificó el stock P3 mediante infección de células CEF a una multiplicidad de infección de 5 ufp/célula, recuperando los extractos celulares a las 24 horas post-infección. Se purificó el ADN del virus y se sometió a análisis mediante PCR empleando para ello oligonucleótidos cebadores que hibridan con las regiones TK flanqueantes del inserto de interés izquierda (TK-L) (SEQ ID NO:1) y derecha (TK-R2) (SEQ ID NO:21), de forma análoga a la descrita en el Ejemplo 33.

Las posiciones en las que hibridan dichos oligonucleótidos con respecto al inserto presente en NYVAC-SHIV, así como los tamaños estimados de los fragmentos generados en las PCR que utilizan como molde el ADN de dicho virus y el ADN correspondiente al virus NYVAC de tipo silvestre (WT) carente de inserto, aparecen representados en la parte superior de la Figura 45. La parte inferior de dicha Figura 45 muestra la fotografía de los geles obtenidos al someter a electroforesis los productos de las PCR realizadas con la pareja de cebadores TK-L/TK-R2 para efectuar el análisis del inserto incluido en el virus NYVAC-SHIV presente en el stock P3 (NYVAC-89.6P-SIVgpn (P3)) (calle3), que se comparó con los productos de PCR generados a partir del control positivo MVA-SHIV (MVA-89.6P-SIVgpn (P3)) (calle 4) y con los vectores tipo silvestre, sin insertos, como controles positivos, es decir, NYVAC-WT (calle 2) y MVA-WT (calle 5). Para ello, 100 ng de ADN viral extraído de células de embrión de pollo (CEF) infectadas a una multiplicidad de 5 ufp/célula con los virus NYVAC-WT, NYVAC-89.6P-SIVgpn (P3) (MVA-SHIV), MVA-89.6P-SIVgpn (P3) (MVA-SHIV) y MVA-WT fueron usados como molde para hacer una amplificación mediante PCR del fragmento de secuencia comprendido entre los brazos TK-L y TK-R en cada uno de ellos. Como se observa en las fotografías mostradas en la parte inferior de la Figura 45, la muestra correspondiente al control positivo, el virus recombinante MVA-89.6P-SIVgpn (P3) (calle 4), da lugar a una banda de igual tamaño que las correspondientes a las muestras del virus recombinante cuya descripción se describe en este ejemplo NYVAC-SHIV (NYVAC-89.6P-SIVgpn (P3), calle 3), mientras que en la calle 2, correspondientes al virus NYVAC que carece de inserto (NYVAC-WT), se observa una banda de aproximadamente 400 pb compatible con la ausencia de inserto en el *locus* de TK propio de NYVAC, más corto que el del MVA-WT que, por su parte, da lugar a la banda de casi 900 pb que habría de esperarse según las características del *locus* de TK en este último virus.

#### Ejemplo 36 .- Análisis de la expresión de proteínas del SHIV a partir del NYVAC-89.6P-SIVgpn

##### 36.1.- Transferencias tipo Western

La expresión de las proteínas 89.6P-gp120 y SIVgpn por el virus recombinante NYVAC-89.6P-SIVgpn fue analizada mediante transferencia tipo Western. Monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con 5 ufp/célula de los stocks P1, P2 o P3. Los extractos celulares fueron recogidos a las 24 horas post-infección, fraccionados mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa, y sometidos a la reacción frente a un anticuerpo policlonal de conejo anti-gp120 (generado en el laboratorio de los inventores inmunizando conejos con la proteína gp120 del aislado IIIB), que es capaz de reconocer la proteína gp120 del SHIV89.6P; y frente a un anticuerpo monoclonal anti-SIV-gag-p27 (cedido por el programa EVA, ARP392) que reconoce la proteína gag del SIV y, por ello, la proteína de fusión SIVgpn. Como controles positivos se utilizaron extractos procedentes de células infectadas con el virus MVA-SHIV (MVA.89.6P-SIVgpn(P3)).

Como se muestra en la Figura 46, tanto la proteína 89.6-gp120 (fotografía de superior, marcada como "anti-gp120") como la proteína de fusión SIVgpn (fotografía inferior, marcada como "anti-SIVp27") se detectaron en los extractos de células infectadas con virus de los stocks P1, P2 y P3 del NYVAC-89.6P-SIVgpn (NYVAC-SHIV), así como en el extracto de células infectadas con el control positivo MVA-SHIV, indicando la correcta expresión de ambos antígenos por los virus recombinantes derivados de NYVAC generados.

### 36.2. Inmunotinción de placas

La expresión de las proteínas 89.6P-gp120 y SIVgpn por parte del recombinante NYVAC-89.6P-SIVgpn se analizó también en células DF-1 infectadas con una dilución  $10^{-5}$  del stock P3 del NYVAC-SHIV (NYVAC-89.6P-SIVgpn (P3)), mediante la inmunotinción de las mismas utilizando bien un anticuerpo policlonal dirigido contra las proteínas propias del vector MVA tipo silvestre (anti-WR), bien un anticuerpo policlonal anti-gp120 del clade B (anti-gp120) o bien el anticuerpo monoclonal anti-SIVgag-p27 proporcionado por el programa EVA (ARP392). Los resultados, mostrados en la Figura 47, muestran que más del 98% de las placas virales que resultaban teñidas con el anticuerpo anti-WR eran también positivas para los anticuerpos anti-gp120 (fotografías y barras marcadas como "antigp120") y anti-SIVgag-p27 (fotografías y barras marcadas como "anti-SIVp27").

### - Ejemplo 37.- Control de los stocks virales enviados para los estudios de inmunización de macacos

De los stocks de virus recombinantes MVA-SHIV y NYVAC-SHIV obtenidos, se seleccionaron para ser utilizados en estudios de inmunización de macacos los que se muestran a continuación en la Tabla 10:

**Tabla 10.- Stocks de virus recombinantes seleccionados para estudios de inmunización en macacos**

MVA-89.6P-SIVgpn			
Stock	Título (UFP/ml)	UFP totales enviadas	Fecha de envío
P3 (20/06/03)	$1,6 \times 10^9$	$7,5 \times 10^9$	10/03/04
P3 (20/09/04)	$8,75 \times 10^8$	$5 \times 10^9$	6/10/04
P3.1 (20/09/04)	$1,1 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	6/10/04
P3.2 (01/10/04)	$2 \times 10^9$	$0,5 \times 10^9$	13/10/04
NYVAC-89.6P-SIVgpn			
Stock	Título (UFP/ml)	UFP totales enviadas	Fecha de envío
P3.1 (29/01/04)	$1,2 \times 10^9$	$7,2 \times 10^9$	10/03/04
P3.2 (25/02/04)	$5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$	6/10/04

La expresión de las proteínas 89.6P-gp120 y SIVgpn por los diferentes stocks de virus recombinantes MVA-89.6P-SIVgpn y NYVAC-89.6P-SIVgpn fue analizada mediante transferencia tipo Western. Monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con 5 ufp/célula de uno de los stocks mencionados en la Tabla 10. Los extractos celulares fueron recogidos a las 24 horas post-infección, fraccionados mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa, y sometidos a la reacción frente a un anticuerpo policlonal de conejo anti-gp120 (generado en el laboratorio de los inventores inmunizando conejos con la proteína gp120 del aislado IIIB), que es capaz de reconocer la proteína gp120 del SHIV89.6P; y frente a un anticuerpo monoclonal anti-SIV-gag-p27 (cedido por el programa EVA, ARP392) que reconoce la proteína gag del SIV y, por ello, la proteína de fusión SIVgpn. Como control negativo se utilizó un extracto de células en las que se había simulado la infección, es decir, que habían sido sometidas a los mismos pasos que las células infectadas, pero que no habían recibido virus en la solución con las que deberían haber sido infectadas (extracto M). La Figura 48 muestra los resultados de las inmunotinciones con cada uno de los anticuerpos, correspondiendo la parte izquierda a la tinción con el anticuerpo anti-gp120 y la derecha a la tinción con el anticuerpo anti-SIV-gag-p27.

Comprobada la expresión eficiente de ambas proteínas en los extractos procedentes de cada uno de los stocks, se enviaron alícuotas de los mismos a los Drs. Jonathan Heeney y Petra Mooij, del Biomedical Primate Research



Centre de Rijswijk, Holanda, donde se llevaron a cabo los ensayos con macacos que se describen en los siguientes Ejemplos.

## 5 Estudio preclínico de la eficacia como vacuna

### Protocolo de inmunización y desafío posterior

Los ensayos que se describen a continuación en los Ejemplos 38 y 39 se llevaron a cabo para evaluar la inmunogenicidad y la eficacia de los vectores cuya construcción se describe en los Ejemplos 33 y 35 para proteger a simios inmunizados con ellos frente al desarrollo de la enfermedad del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, con el fin de valorar a partir de los resultados obtenidos el grado de eficacia esperable de los vectores descritos en la patente principal al inmunizar con ellos seres humanos. Dichos ensayos se llevaron a cabo en el Biomedical Primate Research Centre de Rijswijk (Países Bajos). Para su realización, se utilizaron macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) adultos jóvenes, que habían demostrado ser negativos a la infección por SIV, retrovirus de simio y virus de leucemia de simio. Las condiciones de estabulación y manejo de los animales siguieron las normas éticas establecidas por el mencionado centro de experimentación.

El estudio no sólo pretendió establecer correlaciones con la inmunogenicidad y eficacia que serían esperables al utilizar los vectores de la patente principal como vacunas en seres humanos, sino que también intentó obtener datos para compararlos con los resultados obtenidos al utilizar un vector, también derivado de poxvirus, que contiene el mismo inserto de secuencias codificantes de antígenos del SHIV89.6P que el vector derivado de MVA cuya construcción y caracterización se ha descrito en los Ejemplos 33 y 34, MVA-89.6P-SIVgpn, al que también se hará referencia en los Ejemplos siguientes mediante la denominación general abreviada MVA-SHIV. El vector alternativo utilizado cuya construcción está también descrita en la presente memoria es el vector derivado de NYVAC, denominado NYVAC-89.6P-SIVgpn, al que también se hará referencia en los Ejemplos siguientes mediante la denominación general abreviada NYVAC-SHIV. Tanto el MVA-SHIV como el NYVAC-SHIV, que contienen el mismo inserto, fueron administrados en dosis de refuerzo o potenciación de la respuesta inmune (a las que se alude con frecuencia mediante el término inglés *boost*) con posterioridad a la administración de dosis de iniciación o desencadenamiento de la respuesta inmune (*priming*) en las que los animales recibieron ADN desnudo que contenía un inserto idéntico al presente en el ADN de los vectores MVA-SHIV y NYVAC-SHIV, el vector DNA-SHIV, que consta de dos plásmidos de expresión, pcDNA-gp120.89.6p, que expresa la proteína gp120 del SHIV89.6P, y pcDNA-SIVgag-pol-nef, que expresa la proteína SIVgpn generada a partir de secuencias correspondientes al virus SHIV89.6P, plásmidos que fueron generados por el Dr. Ralf Wagner, Regensburg, Alemania, y cedidos por el mismo para la realización del estudio. Los detalles sobre el estudio y los resultados obtenidos se describen con mayor detalle a continuación en los Ejemplos 38 y 39.

### **Ejemplo 38.- Inmunización de los macacos y valoración de la inmunidad generada**

Los 21 macacos utilizados en el estudio fueron divididos en tres grupos (grupos 1, 2, y 3), cada uno compuesto de 7 individuos. Cada uno de los grupos fue sometido a un protocolo de inmunización diferente, según se muestra a continuación en la Tabla 11:

**Tabla 11.- Grupos de inmunización y tratamiento recibido**

Grupo	Nº de macacos	INMUNIZACIONES				Desafío:
		Semana 0	Semana 4	Semana 20	Semana 24	Semana 32
1	7	DNA-SHIV	DNA-SHIV	MVA-SHIV	MVA-SHIV	SHIV89.6P
2	7	DNA-SHIV	DNA-SHIV	NYVAC-SHIV	NYVAC-SHIV	SHIV89.6P
3	7	DNA-emp	DNA-emp	NYVAC-WT	NYVAC-WT	SHIV89.6P

El grupo 3, de control, recibió en las dos primeras dosis ADN desnudo que carecía del inserto con las secuencias propias del SHIV89.6P (DNA-emp), mientras que en las dos últimas recibió el vector NYVAC-WT, que carece igualmente del inserto. Para la realización del estudio, el vector NYVAC-WT fue crecido en células CEF y purificado en dos colchones de sacarosa de forma análoga a la utilizada con los recombinantes MVA-SHIV y NYVAC-SHIV; del stock generado se enviaron al centro de primates de Holanda, el día 20 de abril de 2004, un total de  $8 \times 10^9$  ufp, con un título de  $1 \times 10^9$  ufp/ml.

Las inmunizaciones con ADN desnudo se produjeron con un total de 4 mg de plásmido, utilizando en el caso del vector DNA-SHIV 2 mg de cada uno de los plásmidos que lo componen, pcDNA-gp120.89.6p y pcDNA-SIV-gag-pol-nef, y empleando 4 mg del vector DNA-emp para los controles. En cada una de las dos inoculaciones de ADN desnudo que recibió cada macaco se suministraron 2 mg de plásmido, disueltos en 1,5 ml de PBS, que se suministraron por vía intramuscular en la parte superior de cada pata.

Las inmunizaciones con los vectores NYVAC-SHIV, MVA-SHIV y NYVAC-WT se llevaron a cabo inoculando en la parte superior del brazo derecho, por vía intramuscular, 0,5 ml que contenían  $5 \times 10^8$  ufp, de manera que en cada dosis se inocularon  $5 \times 10^8$  ufp/macaco. Para ello se utilizaron los siguientes stocks:

- 5           - en el caso del MVA-SHIV, P3 (20/06/03), con un título de  $1,6 \times 10^9$  ufp/ml,;
- en el caso del NYVAC-SHIV, P3.1 (29/01/04), con un título de  $1,2 \times 10^9$  ufp/ml,;
- en el caso del NYVAC-WT, el stock con un título de  $1 \times 10^9$  ufp/ml mencionado anteriormente.

10       En todos los casos, transcurridas 32 semanas después de recibir la primera dosis de inmunización, los macacos fueron sometidos a lo que se conoce como un “desafío” o “reto” viral (traducción del término inglés “challenge”), es decir, se inoculó a los animales por vía intravenosa una dosis de 50-100 MID50 de SHIV89.6P, dilución 1:1000 del stock de Letvin (entendiendo como MID50 o “*Monkey Infectious Dose*” la cantidad de virus que es capaz de producir infección en el 50% de los animales) y se observó la evolución de cada animal.

15       2 semanas antes de comenzar con el protocolo de inmunización, en distintos momentos a lo largo del mismo y con posterioridad al desafío se extrajeron muestras de sangre periférica, mediante punción intravenosa, de cada uno de los animales. De la sangre heparinizada se obtuvieron las células PBMC (“*peripheral blood mononuclear cells*”, células mononucleares de sangre periférica), que se utilizaron para los ensayos de respuesta celular. En la Figura 49 se muestra un esquema del transcurso del estudio, en el que están marcados los momentos de las tomas de muestras (CMI, abreviatura de “*cell mediated immunity*” o inmunidad mediada por células), los momentos en los que se administraron las distintas dosis de inmunización (ADN y vectores derivados de poxvirus: NYVAC ó MVA) y el momento en el que se procedió al desafío con el virus SHIV89.6P.

25       Con el fin de valorar la inmunidad generada, se realizaron ensayos para detectar por la técnica de ELISPOT la respuesta de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-4 en los animales de cada uno de los grupos y su evolución en el tiempo, según se describe a continuación.

30       La respuesta de citoquinas se evaluó en las fracciones de células PBMC extraídas de cada uno de los macacos. Para ello, muestras de dichas células de cada uno de los macacos se incubaron durante 48 horas con grupos de péptidos. Para el ELISPOT de gp120 se utilizó un grupo de 48 péptidos, concretamente los péptidos 4702 a 4749 del N° Cat. 4827 del NIH AIDS Research and Reference Reagents Program, cada uno de los cuales consta de 20 aminoácidos de los que 10 aminoácidos son solapantes con el siguiente péptido, con los cuales queda representada la secuencia de la proteína 89.6P-gp120. Para el ELISPOT de SIVgpn, los péptidos fueron sintetizados por SynPep Dublín (California, Estados Unidos) y son grupos de 15 aminoácidos con 11 aminoácidos solapantes, que se pueden agrupar en los grupos (*pools*): Gag-pool 11, 1-54; Gag-pool 12, 55-108; Pol-pool 11, 109-168; Pol pool 12, 169-173 + 236-290; Pol pool 13, 291-349; Nef pool 11, 174-235; la respuesta de los 7 grupos de péptidos fue analizada utilizando 2 microgramos/ml de cada péptido en el ensayo. Tras la incubación, en cada una de las muestras se midieron las SPF (*Spot forming cells*), que son las células PBMC que expresan una determinada citoquina, después de su estimulación con péptidos específicos incluidos en las proteínas 89.6P-gp120 y SIVgpn. Esto es una medida de las células que fueron estimuladas específicamente por la inoculación de los vectores que expresaban dichas proteínas. Se realizaron medidas por ELISPOT para detectar las SPF que expresaban IFN- $\gamma$ , IL-2 ó IL-4 (29). En el caso de las SPF que expresaban IFN- $\gamma$ , los resultados obtenidos con cada uno de los animales, expresados como SPF totales (las estimuladas por 89.6P-gp120 y la estimuladas por SIVgpn) detectadas por cada  $10^6$  PBMC analizadas, se representan en la Figura 50, en la que se ha utilizado una escala logarítmica en el eje de ordenadas. Los números que aparecen en el eje de abscisas indican el momento en el tiempo en el que fueron tomadas cada una de las muestras. Para cada valor de tiempo, aparecen tres grupos de valores, que presentan el comportamiento de cada uno de los 7 animales utilizados en el estudio con un procedimiento de inmunización concreto: la primera vertical de puntos corresponde a muestras tomadas de macacos del grupo 1 (DNA-SHIV/MVA-SHIV); la segunda vertical de puntos corresponde a muestras tomadas de macacos del grupo 2 (DNA-SHIV/NYVAC-SHIV); la tercera vertical de puntos corresponde a muestras tomadas de ratones del grupo 3 (DNA-emp/NYVAC-WT). Cada punto representa el valor obtenido para un macaco concreto, mientras los rectángulos situados en cada una de las verticales indican el valor medio correspondiente a todos los macacos de ese grupo para las muestras tomadas en un mismo momento en el tiempo. La presencia de un número de puntos inferior a 7 en algunas verticales indica que el punto situado sobre el eje de abscisas representa a más de un macaco, en cada uno de los cuales el valor de las SFC detectadas por cada  $10^6$  PBMC analizadas no fue superior a 1. La línea punteada indica el valor por debajo del cual los valores se consideran insignificantes (20 SFC). Las flechas blancas indican la inoculación de un vector de vacunación; la flecha negra indica el momento en el que se produjo el desafío con el SHIV89.6P. Se aprecia como antes del desafío, los puntos correspondientes a los dos primeros grupos, y en especial el valor medio de los mismos, son superiores a los obtenidos en el grupo control, inmunizado con DNA/NYVAC sin insertos. Una vez producida la infección con el patógeno SHIV89.6P, los valores quedan bastante igualados en todos los grupos al producirse inmunidad frente al SHIV.

65       Para simplificar la interpretación de los datos, en la Figura 51 se representan los valores medios del número total de células que expresan IFN- $\gamma$  obtenidos para cada uno de los grupos, de nuevo en escala logarítmica, en función del tiempo en el que se tomaron las muestras, partiendo en este caso del momento en el que los macacos recibieron la

primera dosis de ADN desnudo. Las Figuras 52 y 53, por su parte, representan los valores medios obtenidos para cada uno de los grupos, igualmente en escala logarítmica, en función del tiempo, de SFC que expresaban IL-4 (Figura 53) o IL-2 (Figura 52).

- 5 Se puede observar que, tanto en el grupo 1 (el que recibió el vector MVA-SHIV, el MVA-89.6P-SIVgpn, en las dosis de potenciación de la respuesta) (datos indicados mediante cuadrados con un vértice apuntando hacia arriba,  $\blacklozenge$ ) como en el grupo 2 (el que recibió el vector NYVAC-SHIV, el NYVAC-89.6P-SIVgpn, en las dosis de potenciación de la respuesta) (datos mediante cuadrados cuyos vértices conforman dos líneas paralelas,  $\blacksquare$ ), la magnitud de la respuesta inmune es semejante y claramente superior a la que se detecta en el grupo 3, el de los macacos que recibieron vectores que no expresaban antígenos del SHIV (cuyos datos se indican mediante triángulos,  $\blacktriangle$ ). En este último grupo, se aprecia como la respuesta inmune aumenta claramente después del desafío con el virus SHIV89.6P, debido a la replicación del virus, lo que hace que, a partir de ese momento, los valores sean semejantes en los tres grupos.
- 10
- 15 Estos datos indican que la media total de la respuesta inmune (producción de IFN- $\gamma$ ) resulta claramente potenciada al serles administrados a los macacos los vectores MVA-89.6P-SIVgpn y NYVAC-89.6P-SIVgpn. La respuesta inmune inducida por estos dos vectores es semejante. Ambos inducen una buena respuesta celular frente a los antígenos 89.6P-gp120 y SIVgpn.

### 20 **Ejemplo 39.- Eficacia de la respuesta inmune generada para proteger frente al desarrollo del virus SHIV**

Para valorar la eficacia de protección frente al desarrollo de una infección generada por el virus SHIV89.6 en relación a la respuesta inmune evaluada en los ensayos descritos en el Ejemplo 38, se procedió a extraer datos sobre dos magnitudes significativas: el número de partículas virales detectables en el plasma de las muestras sanguíneas que habían sido extraídas de los macacos una vez que se les habían inoculado el virus patógeno SHIV89.6P, así como el porcentaje que las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> suponían respecto al total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

#### 30 **39.1.- ARN viral detectable en plasma**

Los valores referentes al número de partículas virales detectables en plasma constituyen un buen valor indicativo de la capacidad de la respuesta inmune generada para controlar la posible infección producida por el virus SHIV89.6P inoculado. Valores por encima de 100.000 copias/ml se consideran que conducen al desarrollo en los macacos de SIDA y a la muerte del animal, mientras que valores próximos a 10.000 copias/ml o inferiores mantienen al animal sin aparentes efectos patógenos. La detección de una concentración de copias virales inferior a ese valor puede considerarse indicativo de que la respuesta inmune generada es capaz de conferir protección en los modelos animales utilizados.

Por ello, se procedió a detectar el ARN del virus SHIV89.6P presente en el plasma de las muestras sanguíneas extraídas de los macacos justo antes (tiempo 0) y con posterioridad a la inoculación de dicho virus. Para ello se utilizó la técnica cuantitativa en tiempo real QC RNA-PCR, que mide el número de copias virales por mililitro de plasma y es capaz de detectar 50 copias por ml. Los valores obtenidos para cada uno de los macacos se muestran en la Figura 54, en la que aparecen tres gráficos. El gráfico superior corresponde al grupo 3, el de los macacos control que habían sido inmunizados con ADN y NYVAC que carecían de inserto desde el que poder expresar antígenos del SHIV. El gráfico de la parte inferior izquierda corresponde al grupo 1, inmunizado con DNA-SHIV/MVA-SHIV, mientras el gráfico de la parte inferior derecha corresponde al grupo 2, inmunizado con DNA-SHIV/NYVAC-SHIV.

En dicha Figura puede apreciarse como, de los 7 macacos que recibieron la inmunización control, 32 semanas después del desafío, 6 presentan valores continuados de viremia que oscilan entre 10.000-100.000 copias/ml, mientras que uno de los animales no respondió a la infección.

De los animales vacunados, todos los animales del grupo DNA-SHIV/MVA-SHIV redujeron los niveles de viremia con respecto al grupo control. 3 eliminaron completamente el virus antes de las 20 semanas, concretamente transcurridas 7, 14 ó 18 semanas. En cuanto al resto, al cabo de las 32 semanas, tres macacos redujeron la viremia por debajo de 1000 copias/ml y uno mantenía alrededor de 2000 copias/ml. En cuanto al grupo vacunado con DNA-SHIV/NYVAC-SHIV, 4 animales eliminaron completamente el virus antes de las 20 semanas, concretamente transcurridas 4, 14 ó 17 semanas. En cuanto al resto, al cabo de las 32 semanas, dos macacos mantenían niveles por debajo de 1000 copias/ml y uno de ellos por debajo de 10000 copias/ml.

Estos resultados demuestran claramente que los dos vectores derivados de poxvirus utilizados, MVA-SHIV (MVA-89.6P-SIVgpn) y NYVAC-SHIV (MVA-89.6P-SIVgpn), inducen un alto grado de protección en macacos frente al virus patógeno SHIV89.6P al ser utilizados en protocolos de tipo *prime/boost* (desencadenamiento/potenciación de la respuesta) al ser utilizados en las dosis de refuerzo o potenciación de la respuesta inmune generada.

#### 65 **39.2.- Porcentaje de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>**

Los valores referentes a los porcentajes de células T de sangre periférica CD4+ y CD8+ detectables son también datos significativos, pues las células CD4+ son utilizadas tanto por el VIH como por el SIV como células diana para la infección. La reducción en el número de estas células por debajo de 200 células por ml se considera un síntoma de la enfermedad, el SIDA. La proporción de células T CD4+ y CD8+ es por tanto un buen indicador del estado de la infección.

Por ello, se procedió a su detección en la fracción de células PBMC de las muestras sanguíneas extraídas a los macacos 12 semanas antes de que se produjera el desafío con el SHIV89.6P, justo antes de inocularlo (tiempo 0) y con posterioridad a la inoculación de dicho virus. Para llevar a cabo los ensayos, se utilizaron anticuerpos específicos para cada una de las poblaciones, determinándose por FACS la proporción de células CD4+ y CD8+ presentes. Los resultados se muestran en la Figura 55.

En la parte superior de dicha Figura, la correspondiente al grupo inmunizado con DNA-SHIV/MVA-SHIV, se observa que 6 de los macacos mantenían niveles normales de células CD4+, similares a los de células CD8+, y sólo en uno de ellos dichos niveles se redujeron por debajo de 100. En la parte intermedia de la Figura, la correspondiente al grupo inmunizado con DNA-SHIV/NYVAC-SHIV, se obtuvieron resultados similares: 6 animales mantenían niveles normales de células CD4+ y sólo en uno dichos niveles se redujeron por debajo de 100. En el grupo control, en cambio, tal como se observa en la parte inferior de la Figura 55, en 5 de los macacos los niveles de células CD4+ se redujeron por debajo de 100, habiendo sido necesario sacrificar uno de los otros dos macacos (D7 98928, junto a cuyo nombre figura la abreviatura "euth") debido al avanzado estado de la enfermedad. Uno de los macacos control, sin embargo, se mantuvo protegido.

### 39.3.- Porcentaje de supervivencia de los macacos infectados (%)

Adicionalmente, se realizó un cálculo del porcentaje de supervivencia de los macacos en cada uno de los tres grupos, computando el número de macacos que permanecían vivos tras la inoculación del virus SHIV89.6P. En la Figura 56 se representan los datos obtenidos transcurridos los intervalos de tiempo desde la infección, en semanas, que se representan en el eje abscisas. En dicha Figura puede observarse como, transcurridas más de 50 semanas desde la infección con el SHIV89.6P, tanto los macacos del grupo inmunizado con DNA-SHIV/MVA-SHIV (datos indicados mediante cuadrados con un vértice apuntando hacia arriba, ◆) como los del grupo inmunizado con DNA-SHIV/NYVAC-SHIV (datos indicados mediante cuadrados cuyos vértices conforman dos líneas paralelas, ■), la supervivencia de los macacos era del 100%, mientras que en el grupo control (datos indicados mediante triángulos, ▲) a las 27 semanas desde la inoculación del virus SHIV89.6P comienza a observarse un descenso de los macacos vivos, siendo su porcentaje de supervivencia inferior al 40% transcurridas más de 50 semanas desde la inoculación de dicho virus.

Tomando estos datos en conjunto, puede concluirse que tanto el recombinante generado a partir de MVA, MVA-89.6P-SIVgpn, como el generado a partir de NYVAC, NYVAC-89.6P-SIVgpn, que tienen la misma organización genética en sus insertos y son capaces de expresar simultáneamente los antígenos 89.6P-gp120 y SIVgpn, han demostrado en el modelo de primates no humanos, los macacos Rhesus, que son unos excelentes vectores para ser utilizados para la vacunación contra el SIDA de simio. Estos resultados refuerzan los obtenidos en los ensayos descritos en los Ejemplos de la patente principal y suponen un apoyo respecto a la posible utilidad de estos vectores en la vacunación frente al SIDA humano.

### **Bibliografía**

1. Antonie, G., F., Scheiflinger, F. Dorner, y F. G. Falkner. 1998. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 244:365-396.
2. Meyer, H., G. Sutter, and A. Mayr. 1991. Mapping of deletions in the genome of highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J. Gen. Virol.* 72:1031-1038.
3. Blanchard, T. J., Alcamí, P. Andrea, and G. L. Smith. 1998. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implication for use as a human vaccine. *J. Gen. Virol.* 79:1159-1167.
4. Altenburger, W., C-P. Sütter, and J. Altenburger. 1989. Partial deletion of the human host range in the attenuated vaccinia virus MV A. *Arch. Viro I.* 105: 15-27.
5. Wyatt, L. S., M. W. Carroll, C-P. Czerny, M. Merchlinsky, J. R. Sisler, and B. Moss. 1998. Marker rescue of the host range restrictions defects of modified vaccinia virus Ankara. *Virology* 251:334-342.
6. Carroll, M. W. and B. Moss. 1997. Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MV A strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a non human mammalian cell line. *Virology* 238: 198-211.
7. Drexler, I., K. Heller, B. Wahren, V. Erfle and G. Sütter. 1998. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary. *J. Gen. Virol.* 79:347-52.
8. Sancho, M. C., S. Schleich, G. Griffiths, and J. Krijnse-Locker. 2002. The block in assembly of modified vaccinia virus Ankara in HeLa cells reveals new insights into vaccinia virus morphogenesis. *J. Virol.* 76: 8318-8334.

9. Sütter, G., and B. Moss. 1992. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:10847-10851.

10. Carroll, M. W., W. W. Overwijk, R. S. Chamberlain, S. A. Rosenberg, B. Moss, and N. P. Restifo. 1997. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara (MV A) as an effective recombinant vector: a murine tumor model. *Vaccine* 15:387-394.

11. Ramirez, J. C., M. M. Gherardi, and M. Esteban. 2000. Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T -cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. *J Virol*. 74:923-933.

12. Hirsch, V. M., T. R. Fuerst, G. Sutter, M. W. Carroll, L. C. Yang, S. Goldstein, M. Piatak, Jr., W. R. Elkins, W. G. Alvord, D. C. Montefiori, B. Moss, and J. D. Lifston. 1996. Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus Ankara. *J. Virol*. 70:3741-3552.

13. Mahnel, H. and A. Mayr. 2002. Experiences with immunization against orthopox viruses of humans and animals using vaccine strain MV A. *Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr.* 107:253-256.

14. Mayr, A., H. Stickl, H. K. Muller, K. Danner, and H. Singer. 1978. The smallpox vaccination strain MV A: marker, genetic structure, experience gained with parental vaccination and behaviour in organism with a debilitated defense mechanism. *Zentbl. Bakteriologie*. 167:375-390.

15. Schneider, J., S. C. Gilbert, T. J. Blanchard, T. Hanke, K. J. Robson, C. M. Hannan, M. Becker, R. Sinden, G. L. Smith and A. V.S. Hill. 1998. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat. Med.* 4:397-402.

16. Sutter, G., L. S. Wyatt, P. L. Foley, J. R. Bennink, and B. Moss. 1994. A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine* 12:1032-1040.

17. Sutter, G. 2003. Vaccinia vectors as candidate vaccines: The development of Modified Vaccinia Virus Ankara for antigen delivery. *Current Targets-Infectious Disorders* 3, 263-271.

18. Didierlaurent A., Ramirez JC, Gherardi M, Zimmerli SC, Graf M, Orbea HA, Pantaleo G, Wagner R, Esteban M, Kraehenbuhl JP, Sirard JC. 2004. Attenuated poxviruses expressing a synthetic HIV protein stimulate HLA-A2-restricted cytotoxic T-cell responses. *Vaccine* 22:3395-3403.

19. Chakrabarti, S., Sisler, R.J., Moss, B. Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression. 1997. *BioTechniques* 23, 1094-1097.

20. Guerra, S., L.A. López-Fernández, A. Pascual-Montano, M. Muñoz, K. Harshman y M. Esteban. Cellular gene expression survey of vaccinia virus infection of human HeLa cells. 2003. *J. Virol*. 77:6493-6506.

21. Quackenbush, J. Microarray data normalization and transformation. 2002. *Nat. Genet.* 32:496-501.

22. Kohonen, T. Self-organization maps, 2ª edición. 1997. Springer-Verlag, Heidelberg, Alemania.

23. Jones, J.O. y A.M. Arvin. Microarray analysis of host cell gene transcription in response to Varicella-Zoster virus infection of human T cells and fibroblasts in vitro and SCIDhu skin xenografts in vivo. 2003. *J. Virol*. 77:1268-1280.

24. Eisen, M. B., P.T. Spellman, P.O. Brown, y D. Botstein. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14863-14868.

25. Li, J., Lord, C.I., Haseltine, W., Letvin, N.L., Sodroski, J. Infection of cynomolgus monkeys with a chimeric HIV-1/SIVmac virus that expresses the HIV-1 envelope glycoproteins. 1992. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr* 5:639-646.

26. Reimann, K. A., J. T. Li, G. Voss, C. Lekutis, K. Tenner-Racz, P. Racz, W. Lin, D. C. Montefiori, D. E. Lee-Parritz, Y. Lu, et al. An env gene derived from a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate confers high in vivo replicative capacity to a chimeric simian/human immunodeficiency virus in rhesus monkeys. 1996. *J. Virol*. 70:3198.

27. Reimann, K. A., J. T. Li, R. Veazey, M. Halloran, I. W. Park, G. B. Karlsson, J. Sodroski, N. L. Letvin. A chimeric simian/human immunodeficiency virus expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate env causes an AIDS-like disease after in vivo passage in rhesus monkeys. 1996. *J. Virol*. 70:6922.

28. Guerra, S., López-Fernández, L.A., Pascual-Montano, A., Nájera, J.L., Zavallós, A., Esteban, M. Host response to the attenuated poxvirus vector NYVAC: upregulation of apoptotic genes and NF-κB responsive genes in infected HeLa cells. 2006. *J. Virol* 80:985-998.

29. Mooij, P., Nieuwenhuis I.G., Knoop C.J., Doms R.W., Bogers W.M.J.M., ten Haaf P.J.F., Niphuis H., Koornstra W., Bieler K., Köstler J., Morein B., Cafaro A., Ensoli B., Wagner R., Heeney J.L. Qualitative T-Helper Responses to Multiple Viral Antigens Correlate with Vaccine-Induced Immunity to Simian/Human Immunodeficiency Virus Infection. 2004. *J. Virol*. 78:3333-3342.

**Listado de secuencias**

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

<120> VECTORES RECOMBINANTES BASADOS EN EL VIRUS MODIFICADO DE ANKARA (MVA)  
COMO VACUNAS PREVENTIVAS Y TERAPÉUTICAS CONTRA EL SIDA

<130> PCT-277

<160> 25

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Cebador

<223> TK-L

<400> 1

tgattagttt gatgcgattc

20

<210> 2

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Cebador

<223> TK-R

<400> 2

tgtccttgat acggcag

17

<210> 3

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> BX08556

<400> 3

tgcccatcga caacg

15

<210> 4

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> GPN7649

<400> 4

agcccatcg agaccg

16

<210> 5  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> cebador  
 <223> GPN8170  
  
 <400> 5  
 attagcctgc ctctcgg 17

<210> 6  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> cebador  
 <223> E/L  
  
 <400> 6  
 tatttttttt ttttggaata taaatag 27

<210> 7  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> Cebador  
 <223> gp120-10  
  
 <400> 7  
 tcgagcatgg acagggcc 18

<210> 8  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> Cebador  
 <223> gp120-1050  
  
 <400> 8  
 gtcttggttct ggaagtgc 18

<210> 9  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> Cebador  
 <223> gp120-1213  
  
 <400> 9  
 atcatcacca tcccctgc 18



<210> 10  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> Cebador  
 <223> GPN-802

<400> 10  
 tggggtttaaa caagatcg 18

<210> 11  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> Cebador  
 <223> GPN-2018

<400> 11  
 caaggtgaag cagtggcc 18

<210> 12  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> Cebador  
 <223> GPN-2198

<400> 12  
 tgggtcctct tggttcagc 18

<210> 13  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> Cebador  
 <223> GPN-3820

<400> 13  
 cggccttgcc gatcttgg 18

<210> 14  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> Cebador  
 <223> GPN-4000

<400> 14  
 ccgacaagag cgagagcg 18

# ES 2 392 670 T3

<210> 15

<211> 1482

<212> ADN

<213> Secuencia artificial derivada del aislado BX08 del VIH-1

<220>

<221> Secuencia codificante

<223> gp120-bX08

<400> 15

atg	gac	cgc	gcc	aag	ctg	ctg	ctg	ctg	ctg	ctg	ctg	ctg	ctg	ctg	ccc	cag	gcc	cag	gcc	60
Met	Asp	Arg	Ala	Lys	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Gln	Ala	Gln	Ala	
				5					10						15				20	

gct	agc	gac	cgc	ctg	tgg	gtg	aca	gtg	tac	tac	ggc	gtg	ccc	gtg	tgg	aag	gac	gcc	acc	120
Ala	Ser	Asp	Arg	Leu	Trp	Val	Thr	Val	Tyr	Tyr	Gly	Val	Pro	Val	Trp	Lys	Asp	Ala	Thr	
				25					30					35					40	

acc	acc	ctg	ttc	tgc	gcc	tcc	gac	gcc	aag	gcc	tac	gac	acc	gag	gtg	cac	aac	gtg	tgg	180
Thr	Thr	Leu	Phe	Cys	Ala	Ser	Asp	Ala	Lys	Ala	Tyr	Asp	Thr	Glu	Val	His	Asn	Val	Trp	
				45					50					55					60	

gcc	acc	cac	gcc	tgc	gtg	ccc	acc	gac	ccc	aac	ccc	cag	gag	gtg	gtg	ctg	ggc	aac	gtg	240
Ala	Thr	His	Ala	Cys	Val	Pro	Thr	Asp	Pro	Asn	Pro	Gln	Glu	Val	Val	Leu	Gly	Asn	Val	
				65					70					75					80	

acc	gag	aac	ttc	aac	atg	ggc	aag	aac	aac	atg	gtg	gag	cag	atg	cac	gag	gac	atc	atc	300
Thr	Glu	Asn	Phe	Asn	Met	Gly	Lys	Asn	Asn	Met	Val	Glu	Gln	Met	His	Glu	Asp	Ile	Ile	
				85					90					95					100	

agc	ctg	tgg	gac	cag	tcc	ctg	aag	ccc	tgc	gtg	aag	ctg	acc	ccc	ctg	tgc	gtg	acc	ctg	360
Ser	Leu	Trp	Asp	Gln	Ser	Leu	Lys	Pro	Cys	Val	Lys	Leu	Thr	Pro	Leu	Cys	Val	Thr	Leu	
				105					110					115					120	

aac	tgc	acc	aag	ctg	aag	aac	agc	acc	gac	acc	aac	aac	acc	cgc	tgg	ggc	acc	cag	gag	420
Asn	Cys	Thr	Lys	Leu	Lys	Asn	Ser	Thr	Asp	Thr	Asn	Asn	Thr	Arg	Trp	Gly	Thr	Gln	Glu	
				125					130					135					140	

atg	aag	aac	tgc	tcc	ttc	aac	atc	agc	acc	tcc	gtg	cgg	aac	aag	atg	aag	aga	gag	tac	480
Met	Lys	Asn	Cys	Ser	Phe	Asn	Ile	Ser	Thr	Ser	Val	Arg	Asn	Lys	Met	Lys	Arg	Glu	Tyr	
				145					150					155					160	

gcc	ctg	ttc	tac	tcc	ctg	gac	atc	gtg	ccc	atc	gac	aac	gac	aac	acc	agc	tac	cgc	ctg	540
Ala	Leu	Phe	Tyr	Ser	Leu	Asp	Ile	Val	Pro	Ile	Asp	Asn	Asp	Asn	Thr	Ser	Tyr	Arg	Leu	
				165					170					175					180	

agg	tcc	tgc	aac	acc	tcc	atc	atc	acc	cag	gcc	tgc	ccc	aag	gtg	agc	ttc	gag	ccc	atc	600
Arg	Ser	Cys	Asn	Thr	Ser	Ile	Ile	Thr	Gln	Ala	Cys	Pro	Lys	Val	Ser	Phe	Glu	Pro	Ile	
				185					190					195					200	

ccc	atc	cac	ttc	tgc	gcc	ccc	gcc	ggc	ttc	gcc	atc	ctg	aag	tgc	aac	aac	aag	acc	ttc	660
Pro	Ile	His	Phe	Cys	Ala	Pro	Ala	Gly	Phe	Ala	Ile	Leu	Lys	Cys	Asn	Asn	Lys	Thr	Phe	
				205					210					215					220	

aac	ggc	acc	ggc	ccc	tgc	acc	aac	gtg	agc	acc	gtg	cag	tgc	acc	cac	ggc	atc	cgc	ccc	720
Asn	Gly	Thr	Gly	Pro	Cys	Thr	Asn	Val	Ser	Thr	Val	Gln	Cys	Thr	His	Gly	Ile	Arg	Pro	
				225					230					235					240	

gtg	gtg	tcc	acc	cag	ctg	ctg	ctg	aac	ggc	agc	ctg	gcc	gag	gag	gag	gtg	gtg	atc	cgg	780
Val	Val	Ser	Thr	Gln	Leu	Leu	Leu	Asn	Gly	Ser	Leu	Ala	Glu	Glu	Glu	Val	Val	Ile	Arg	
				245					250					255					260	

tcc	gag	aac	ttc	acc	aac	aac	gcc	aag	acc	atc	atc	gtg	cag	ctg	aac	gag	agc	gtg	gag	840
Ser	Glu	Asn	Phe	Thr	Asn	Asn	Ala	Lys	Thr	Ile	Ile	Val	Gln	Leu	Asn	Glu	Ser	Val	Glu	
				265					270					275					280	

# ES 2 392 670 T3

```

atc aac tgc acc aga ccc aac aac aac acc agg aag tcc atc cac atc ggc ccc ggc cgc 900
Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg
285 290 295 300

gcc ttc tac acc acc ggc gac atc atc ggc gac atc cgg cag gcc cac tgc aac atc tcc 960
Ala Phe Tyr Thr Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser
305 310 315 320

aga acc aac tgg acc aac acc ctg aag agg gtg gcc gag aag ctg cgc gag aag ttc aac1020
Arg Thr Asn Trp Thr Asn Thr Leu Lys Arg Val Ala Glu Lys Leu Arg Glu Lys Phe Asn
325 330 335 340

aac acc acc atc gtg ttc aac cag agc agc ggc ggc gac ccc gag atc gtg atg cac tcc1080
Asn Thr Thr Ile Val Phe Asn Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser
345 350 355 360

ttc aac tgc ggc ggc gag ttc ttc tac tgc aac acc acc cag ctg ttc aac tcc acc tgg1140
Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp
365 370 375 380

aac gag acc aac agc gag ggc aac atc acc tcc ggc acc atc acc ctg ccc tgc cgg atc1200
Asn Glu Thr Asn Ser Glu Gly Asn Ile Thr Ser Gly Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile
385 390 395 400

aag cag atc atc aac atg tgg cag gag gtg ggc aag gcc atg tac gcc ccc ccc atc ggc1260
Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Gly
405 410 415 420

ggc cag atc aag tgc ctg tcc aac atc acc ggc ctg ctg ctg acc aga gac ggc ggc tcc1320
Gly Gln Ile Lys Cys Leu Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Ser
425 430 435 440

gac aac agc agc agc ggc aag gag atc ttc cgc ccc ggc ggc ggc gac atg agg gac aac1380
Asp Asn Ser Ser Ser Gly Lys Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn
445 450 455 460

tgg cgc tcc gag ctg tac aag tac aag gtg gtg aag atc gag ccc ctg ggc atc gcc ccc1440
Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Ile Ala Pro
465 470 475 480

acc aag gcc aag agg agg gtg gtg cag cgc gag aag cgc tga 1482
Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg *
485 490

```

<210> 16

<211> 3981

<212> ADN

<213> Secuencia artificial derivada del aislado IIIB del VIH

<220>

<221> Secuencia codificante

<223> gagpolnef-IIIB

<400> 16

```

atg gcc gcc agg gcc agc gtg ctg agc ggc ggc gag ctg gac agg tgg gag aag atc agg 60
Met Ala Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp Glu Lys Ile Arg
5 10 15 20

ctg agg ccc ggc ggc aag aag aag tat aag ctg aag cac atc gtg tgg gcc agc agg gag 120
Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu
25 30 35 40

ctg gag agg ttc gcc gtg aac ccc ggc ctg ctg gag acc agc gag ggc tgc agg cag atc 180
Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile

```

ES 2 392 670 T3

				45				50				55				60				
ctg	ggc	cag	ctg	cag	ccc	agc	ctg	cag	acc	ggc	agc	gag	gag	ctg	agg	agc	ctg	tac	aac	240
Leu	Gly	Gln	Leu	Gln	Pro	Ser	Leu	Gln	Thr	Gly	Ser	Glu	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Tyr	Asn	
				65				70				75				80				
acc	gtg	gcc	acc	ctg	tac	tgc	gtg	cac	cag	agg	atc	gag	atc	aag	gac	acc	aag	gag	gcc	300
Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Tyr	Cys	Val	His	Gln	Arg	Ile	Glu	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys	Glu	Ala	
				85				90				95				100				
ctg	gac	aag	atc	gag	gag	gag	cag	aac	aag	tcc	aag	aag	aag	gcc	cag	cag	gcc	gcc	gcc	360
Leu	Asp	Lys	Ile	Glu	Glu	Glu	Gln	Asn	Lys	Ser	Lys	Lys	Lys	Ala	Gln	Gln	Ala	Ala	Ala	
				105				110				115				120				
gac	acc	ggc	cac	agc	agc	cag	gtg	agc	cag	aac	tac	ccc	atc	gtg	cag	aac	atc	cag	ggc	420
Asp	Thr	Gly	His	Ser	Ser	Gln	Val	Ser	Gln	Asn	Tyr	Pro	Ile	Val	Gln	Asn	Ile	Gln	Gly	
				125				130				135				140				
cag	atg	gtg	cac	cag	gcc	atc	agc	ccc	agg	acc	ctg	aac	gcc	tgg	gtg	aag	gtg	gtg	gag	480
Gln	Met	Val	His	Gln	Ala	Ile	Ser	Pro	Arg	Thr	Leu	Asn	Ala	Trp	Val	Lys	Val	Val	Glu	
				145				150				155				160				
gag	aag	gcc	ttc	agc	ccc	gag	gtg	atc	ccc	atg	ttc	agc	gcc	ctg	agc	gag	gga	gcc	acc	540
Glu	Lys	Ala	Phe	Ser	Pro	Glu	Val	Ile	Pro	Met	Phe	Ser	Ala	Leu	Ser	Glu	Gly	Ala	Thr	
				165				170				175				180				
ccc	cag	gac	ctg	aac	acc	atg	ctg	aac	acc	gtg	ggc	ggc	cac	cag	gcc	gcc	atg	cag	atg	600
Pro	Gln	Asp	Leu	Asn	Thr	Met	Leu	Asn	Thr	Val	Gly	Gly	His	Gln	Ala	Ala	Met	Gln	Met	
				185				190				195				200				
ctg	aag	gag	acc	atc	aac	gag	gag	gcc	gcc	gag	tgg	gac	agg	gtg	cac	ccc	gtg	cac	gcc	660
Leu	Lys	Glu	Thr	Ile	Asn	Glu	Glu	Ala	Ala	Glu	Trp	Asp	Arg	Val	His	Pro	Val	His	Ala	
				205				210				215				220				
ggc	ccc	atc	gcc	ccc	ggc	cag	atg	agg	gag	ccc	cgc	ggc	agc	gac	atc	gcc	ggc	acc	acc	720
Gly	Pro	Ile	Ala	Pro	Gly	Gln	Met	Arg	Glu	Pro	Arg	Gly	Ser	Asp	Ile	Ala	Gly	Thr	Thr	
				225				230				235				240				
agc	acc	ctg	cag	gag	cag	atc	ggc	tgg	atg	acc	aac	aac	ccc	ccc	atc	ccc	gtg	ggc	gaa	780
Ser	Thr	Leu	Gln	Glu	Gln	Ile	Gly	Trp	Met	Thr	Asn	Asn	Pro	Pro	Ile	Pro	Val	Gly	Glu	
				245				250				255				260				
atc	tac	aag	agg	tgg	atc	atc	ctg	ggc	ctg	aac	aag	atc	gtg	agg	atg	tac	agc	ccc	acc	840
Ile	Tyr	Lys	Arg	Trp	Ile	Ile	Leu	Gly	Leu	Asn	Lys	Ile	Val	Arg	Met	Tyr	Ser	Pro	Thr	
				265				270				275				280				
agc	atc	ctg	gat	atc	agg	cag	ggc	ccc	aaa	gag	ccc	ttc	agg	gac	tac	gtg	gac	agg	ttc	900
Ser	Ile	Leu	Asp	Ile	Arg	Gln	Gly	Pro	Lys	Glu	Pro	Phe	Arg	Asp	Tyr	Val	Asp	Arg	Phe	
				285				290				295				300				
tac	aag	acc	ctg	cgc	gcc	gag														

# ES 2 392 670 T3

Gly Asn Phe Arg	Asn Gln Arg Lys Met Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His	385	390	395	400
acc gcc agg aac tgc cgc gcc ccc agg aag aag ggc tgc tgg aag tgc ggc aag gag ggc	Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly Lys Glu Gly	405	410	415	420
cac cag atg aag gac tgc acc gag agg cag gct aat ttt agg gaa gat ctg gcc ttc cta	His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn Phe Arg Glu Asp Leu Ala Phe Leu	425	430	435	440
caa ggg aag gcc agg gaa ttt tct tca gag cag acc aga gcc aac agc ccc acc att tct	Gln Gly Lys Ala Arg Glu Phe Ser Ser Glu Gln Thr Arg Ala Asn Ser Pro Thr Ile Ser	445	450	455	460
tca gag cag acc aga gcc aac agc ccc acc aga aga gag ctt cag gtc tgg ggt aga gac	Ser Glu Gln Thr Arg Ala Asn Ser Pro Thr Arg Arg Glu Leu Gln Val Trp Gly Arg Asp	465	470	475	480
aac aac tcc ccc tca gaa gca gga gcc gat aga caa gga act gta tcc ttt aac ttc cct	Asn Asn Ser Pro Ser Glu Ala Gly Ala Asp Arg Gln Gly Thr Val Ser Phe Asn Phe Pro	485	490	495	500
cag atc act ctt tgg caa cga ccc ctc gtc aca ata aag atc ggt ggc cag ctg aag gag	Gln Ile Thr Leu Trp Gln Arg Pro Leu Val Thr Ile Lys Ile Gly Gly Gln Leu Lys Glu	505	510	515	520
gcc ctg ctg gcc acc ggc gcc gac gac acc gtg ctg gag gag atg agc ctg ccc ggc agg	Ala Leu Leu Ala Thr Gly Ala Asp Asp Thr Val Leu Glu Glu Met Ser Leu Pro Gly Arg	525	530	535	540
tgg aag ccc aag atg atc ggc ggc atc ggc ggc ttc atc aag gtg agg cag tac gac cag	Trp Lys Pro Lys Met Ile Gly Gly Ile Gly Gly Phe Ile Lys Val Arg Gln Tyr Asp Gln	545	550	555	560
atc ctg atc gag atc tgc ggc cac aag gcc atc ggc acc gtg ctg gtg gga cct aca cct	Ile Leu Ile Glu Ile Cys Gly His Lys Ala Ile Gly Thr Val Leu Val Gly Pro Thr Pro	565	570	575	580
gtg aac atc atc ggc agg aac ctg ctg acc cag atc ggc tgc acc ctg aac ttc ccc atc	Val Asn Ile Ile Gly Arg Asn Leu Leu Thr Gln Ile Gly Cys Thr Leu Asn Phe Pro Ile	585	590	595	600
agc ccc atc gag acc gtg ccc gtg aag ctg aag ccc ggc atg gac ggc cct aag gtg aag	Ser Pro Ile Glu Thr Val Pro Val Lys Leu Lys Pro Gly Met Asp Gly Pro Lys Val Lys	605	610	615	620
cag tgg ccc ctg acc gag gag aag atc aag gcc ctg gtg gag atc tgc acc gag atg gag	Gln Trp Pro Leu Thr Glu Glu Lys Ile Lys Ala Leu Val Glu Ile Cys Thr Glu Met Glu	625	630	635	640
aag gag ggc aag atc agc aag atc ggc ccc gag aac ccc tac aac acc ccc gtg ttc gcc	Lys Glu Gly Lys Ile Ser Lys Ile Gly Pro Glu Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Val Phe Ala	645	650	655	660
atc aag aag aag gac agc acc aag tgg agg aag ctg gtg gac ttc agg gag ctg aac aag	Ile Lys Lys Lys Asp Ser Thr Lys Trp Arg Lys Leu Val Asp Phe Arg Glu Leu Asn Lys	665	670	675	680
agg acc cag gac ttc tgg gag gtg cag ctg ggc atc ccc cac ccc gcc ggc ctg aag aag	Arg Thr Gln Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu Gly Ile Pro His Pro Ala Gly Leu Lys Lys	685	690	695	700
aag aag agc gtg acc gtg ctg gac gtg ggc gac gcc tac ttc agc gtg ccc ctg gac gag	Lys Lys Ser Val Thr Val Leu Asp Val Gly Asp Ala Tyr Phe Ser Val Pro Leu Asp Glu	705	710	715	720

# ES 2 392 670 T3

gac ttc agg aag tat acc cct tta aga cca atg act tac aag gca gct gta gat ctt agc2220  
 Asp Phe Arg Lys Tyr Thr Pro Leu Arg Pro Met Thr Tyr Lys Ala Ala Val Asp Leu Ser  
 725 730 735 740

cac ttt tta aaa gaa aag ggg gga ctg gaa ggg cta att cac tcc caa cga aga caa gat2280  
 His Phe Leu Lys Glu Lys Gly Gly Leu Glu Gly Leu Ile His Ser Gln Arg Arg Gln Asp  
 745 750 755 760

atc ctt gat ctg tgg atc tac cac aca caa ggc tac ttc cct gat cca agg atg ggt ggc2340  
 Ile Leu Asp Leu Trp Ile Tyr His Thr Gln Gly Tyr Phe Pro Asp Pro Arg Met Gly Gly  
 765 770 775 780

aag tgg tca aaa agt agt gtg gtt gga tgg cct gct gta agg gaa aga atg aga cga gct2400  
 Lys Trp Ser Lys Ser Ser Val Val Gly Trp Pro Ala Val Arg Glu Arg Met Arg Arg Ala  
 785 790 795 800

gag cca gca gca gat ggg gtg gga gca gca tct cga gac cta gaa aaa cat gga gca atc2460  
 Glu Pro Ala Ala Asp Gly Val Gly Ala Ala Ser Arg Asp Leu Glu Lys His Gly Ala Ile  
 805 810 815 820

aca agt agc aac aca gca gct aac aat gct gat tgt gcc tgg cta gaa gca caa gag gag2520  
 Thr Ser Ser Asn Thr Ala Ala Asn Asn Ala Asp Cys Ala Trp Leu Glu Ala Gln Glu Glu  
 825 830 835 840

gag gag gtg ggt ttt cca gtc aca cct caa gta cca ttc ctg tgg atg ggc tac gag ctg2580  
 Glu Glu Val Gly Phe Pro Val Thr Pro Gln Val Pro Phe Leu Trp Met Gly Tyr Glu Leu  
 845 850 855 860

cac ccc gac aag tgg acc gtg cag ccc atc gtg ctg ccc gag aag gac agc tgg acc gtg2640  
 His Pro Asp Lys Trp Thr Val Gln Pro Ile Val Leu Pro Glu Lys Asp Ser Trp Thr Val  
 865 870 875 880

AAC GAC ATT CAG AAG CTG GTG GGC AAG CTG AAC TGG GCC AGC CAG ATC TAC CCC GGC ATC2700  
 Asn Asp Ile Gln Lys Leu Val Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln Ile Tyr Pro Gly Ile  
 885 890 895 900

aag gtg agg cag ctg tgc aag ctg ctg agg ggc aca aag gct ctg acc gag gtg atc ccc2761  
 Lys Val Arg Gln Leu Cys Lys Leu Leu Arg Gly Thr Lys Ala Leu Thr Glu Val Ile Pro  
 905 910 915 920

ctg acc gag gag gcc gag ctg gag ctg gcc gag aac agg gag atc ctg aag gag ccc gtg2820  
 Leu Thr Glu Glu Ala Glu Leu Glu Leu Ala Glu Asn Arg Glu Ile Leu Lys Glu Pro Val  
 925 930 935 940

cac ggc gtg tac tac gac ccc agc aag gac ctg atc gcc gag atc cag aag cag ggc cag2880  
 His Gly Val Tyr Tyr Asp Pro Ser Lys Asp Leu Ile Ala Glu Ile Gln Lys Gln Gly Gln  
 945 950 955 960

ggc cag tgg acc tac cag atc tac cag gag ccc ttc aag aac ctg aag acc ggc aag tac2940  
 Gly Gln Trp Thr Tyr Gln Ile Tyr Gln Glu Pro Phe Lys Asn Leu Lys Thr Gly Lys Tyr  
 965 970 975 980

gcc cgc atg cgc ggc gcc cac acc aac gac gtg aag cag ctg acc gag gcc gtg cag aag3000  
 Ala Arg Met Arg Gly Ala His Thr Asn Asp Val Lys Gln Leu Thr Glu Ala Val Gln Lys  
 985 990 995 1000

atc acc acc gag agc atc gtg atc tgg ggc aag act cct aag ttc aag ctg ccc atc cag3060  
 Ile Thr Thr Glu Ser Ile Val Ile Trp Gly Lys Thr Pro Lys Phe Lys Leu Pro Ile Gln  
 1005 1010 1015 1020

aag gag acc tgg gag acc tgg tgg acc gag tac tgg cag gcc acc tgg att ccc gag tgg3120  
 Lys Glu Thr Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Tyr Trp Gln Ala Thr Trp Ile Pro Glu Trp  
 1025 1030 1035 1040

gag ttc gtg aac acc cct ccc ctg gtg aag ctg tgg tat cag ctg gag aag gag ccc atc3180  
 Glu Phe Val Asn Thr Pro Pro Leu Val Lys Leu Trp Tyr Gln Leu Glu Lys Glu Pro Ile  
 1045 1050 1055 1060

# ES 2 392 670 T3

```

gtg ggc gcc gag acc ttc tac gtg gac ggc gcc gcc aac agg gag acc aag ctg ggc aag3240
Val Gly Ala Glu Thr Phe Tyr Val Asp Gly Ala Ala Asn Arg Glu Thr Lys Leu Gly Lys
1065 1070 1075 1080

gcc ggc tac gtg acc aac aag ggc cgc cag aag gtg gtg ccc ctg acc aac acc acc aac3300
Ala Gly Tyr Val Thr Asn Lys Gly Arg Gln Lys Val Val Pro Leu Thr Asn Thr Thr Asn
1085 1090 1095 1100

cag aag acc gag ctg cag gct atc tac ctg gcc ctg cag gac tca ggc ctg gag gtg aac3360
Gln Lys Thr Glu Leu Gln Ala Ile Tyr Leu Ala Leu Gln Asp Ser Gly Leu Glu Val Asn
1105 1110 1115 1120

atc gtg acc gac agc cag tac gcc ctg ggc atc atc cag gcc cag ccc gac aag agc gag3420
Ile Val Thr Asp Ser Gln Tyr Ala Leu Gly Ile Ile Gln Ala Gln Pro Asp Lys Ser Glu
1125 1130 1135 1140

agc gag ctg gtg aac cag atc atc gag cag ctg atc aag aag gag aag gtg tac ctg gcc3480
Ser Glu Leu Val Asn Gln Ile Ile Glu Gln Leu Ile Lys Lys Glu Lys Val Tyr Leu Ala
1145 1150 1155 1160

tgg gtg ccc gcc cac aag ggc atc ggc ggc aac gag cag gtg gac aag ctg gtg agc gcc3540
Trp Val Pro Ala His Lys Gly Ile Gly Gly Asn Glu Gln Val Asp Lys Leu Val Ser Ala
1165 1170 1175 1180

ggc atc agg aag atc ctg ttc ctg gac ggc atc gac aag gcc cag gac gag cac gag aag3600
Gly Ile Arg Lys Ile Leu Phe Leu Asp Gly Ile Asp Lys Ala Gln Asp Glu His Glu Lys
1185 1190 1195 1200

tac cac agc aac tgg agg gct atg gct agc gac ttc aac ctg cct ccc gtg gtg gct aag3660
Tyr His Ser Asn Trp Arg Ala Met Ala Ser Asp Phe Asn Leu Pro Pro Val Val Ala Lys
1205 1210 1215 1220

gag atc gtg gcc agc gcc ttc acc atc ccc agc atc aac aac gag acc ccc ggc atc cgc3720
Glu Ile Val Ala Ser Ala Phe Thr Ile Pro Ser Ile Asn Asn Glu Thr Pro Gly Ile Arg
1225 1230 1235 1240

tac cag tac aac gtg ctg ccc cag ggc tgg aag ggc agc ccc gcc atc ttc cag agc agc3780
Tyr Gln Tyr Asn Val Leu Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro Ala Ile Phe Gln Ser Ser
1245 1250 1255 1260

atg aca aag atc ctg gag ccc ttc aag aag cag aac ccc gac atc gtg atc tat cag tac3840
Met Thr Lys Ile Leu Glu Pro Phe Lys Lys Gln Asn Pro Asp Ile Val Ile Tyr Gln Tyr
1265 1270 1275 1280

atg gac gac ctg tac gtg ggc agc gac ctg gag atc ggc cag cac agg acc aag atc gag3900
Met Asp Asp Leu Tyr Val Gly Ser Asp Leu Glu Ile Gly Gln His Arg Thr Lys Ile Glu
1285 1290 1295 1300

gag ctg agg cag cac ctg ctg agg tgg ggc ctg acc acc ccc gac aag aag cac cag aag3960
Glu Leu Arg Gln His Leu Leu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Pro Asp Lys Lys His Gln Lys
1305 1310 1315 1320

gag ccc cca ttc ctg tgg taa 3981
Glu Pro Pro Phe Leu Trp *
1325

```

<210> 17

<211> 1497

<212> ADN

<213> Secuencia artificial derivada del aislado CN54 del VIH-1

<220>

<221> Secuencia codificante

<223> gp120-C



# ES 2 392 670 T3

<400> 17

```

atg gac agg gcc aag ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ccc cag gcc cag gcc 60
Met Asp Arg Ala Lys Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Gln Ala Gln Ala
                    5                      10                      15                      20

gtg ggc aac ctg tgg gtg acc gtg tac tac ggc gtg ccc gtg tgg aag ggc gcc acc acc120
Val Gly Asn Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Gly Ala Thr Thr
                    25                      30                      35                      40

acc ctg ttc tgc gcc agc gac gcc aag gcc tac gac acc gag gtg cac aac gtg tgg gcc180
Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val His Asn Val Trp Ala
                    45                      50                      55                      60

acc cac gcc tgc gtg ccc gcc gac ccc aac ccc cag gag atg gtg ctg gag aac gtg acc240
Thr His Ala Cys Val Pro Ala Asp Pro Asn Pro Gln Glu Met Val Leu Glu Asn Val Thr
                    65                      70                      75                      80

gag aac ttc aac atg tgg aag aac gag atg gtg aac cag atg cag gag gac gtc atc agc300
Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn Glu Met Val Asn Gln Met Gln Glu Asp Val Ile Ser
                    85                      90                      95                      100

ctg tgg gac cag agc ctg aag ccc tgc gtg aag ctg acc ccc ctg tgc gtg acc ctg gag360
Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Glu
                    105                     110                     115                     120

tgc agg aac gtg agc agc aac agc aac gac acc tac cac gag acc tac cac gag agc atg420
Cys Arg Asn Val Ser Ser Asn Ser Asn Asp Thr Tyr His Glu Thr Tyr His Glu Ser Met
                    125                     130                     135                     140

aag gag atg aag aac tgc agc ttc aac gcc acc acc gtg gtg agg gac agg aag cag acc480
Lys Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ala Thr Thr Val Val Arg Asp Arg Lys Gln Thr
                    145                     150                     155                     160

gtg tac gcc ctg ttc tac agg ctg gac atc gtg ccc ctg acc aag aag aac tac agc gag540
Val Tyr Ala Leu Phe Tyr Arg Leu Asp Ile Val Pro Leu Thr Lys Lys Asn Tyr Ser Glu
                    165                     170                     175                     180

aac agc agc gag tac tac agg ctg atc aac tgc aac acc agc gcc atc acc cag gcc tgc600
Asn Ser Ser Glu Tyr Tyr Arg Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser Ala Ile Thr Gln Ala Cys
                    185                     190                     195                     200

ccc aag gtg acc ttc gac ccc atc ccc atc cac tac tgc acc ccc gcc ggc tac gcc atc660
Pro Lys Val Thr Phe Asp Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Thr Pro Ala Gly Tyr Ala Ile
                    205                     210                     215                     220

ctg aag tgc aac gac aag atc ttc aac ggc acc ggc ccc tgc cac aac gtg agc acc gtg720
Leu Lys Cys Asn Asp Lys Ile Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys His Asn Val Ser Thr Val
                    225                     230                     235                     240

cag tgc acc cac ggc atc aag ccc gtg gtg agc acc cag ctg ctg ctg aac ggc agc ctg780
Gln Cys Thr His Gly Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu
                    245                     250                     255                     260

gcc gag ggc gag atc atc atc agg agc gag aac ctg acc aac aac gtg aaa acc atc atc840
Ala Glu Gly Glu Ile Ile Ile Arg Ser Glu Asn Leu Thr Asn Asn Val Lys Thr Ile Ile
                    265                     270                     275                     280

gtg cac ctg aac cag agc gtg gag atc gtg tgc acc agg ccc ggc aac aac acc agg aag900
Val His Leu Asn Gln Ser Val Glu Ile Val Cys Thr Arg Pro Gly Asn Asn Thr Arg Lys
                    285                     290                     295                     300

agc atc agg atc ggc ccc ggc cag acc ttc tac gcc acc ggc gac atc atc ggc gac atc960
Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln Thr Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile
                    305                     310                     315                     320

```

# ES 2 392 670 T3

```

agg cag gcc cac tgc aac atc agc gag gac aag tgg aac gag acc ctg cag agg gtg agc1020
Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Glu Asp Lys Trp Asn Glu Thr Leu Gln Arg Val Ser
325 330 335 340

aag aag ctt gcc gag cac ttc cag aac aag acc atc aag ttc gcc agc agc agc ggc ggc1080
Lys Lys Leu Ala Glu His Phe Gln Asn Lys Thr Ile Lys Phe Ala Ser Ser Ser Gly Gly
345 350 355 360

gac ctg gag gtg acc acc cac agc ttc aac tgc agg ggc gag ttc ttc tac tgc aac acc1140
Asp Leu Glu Val Thr Thr His Ser Phe Asn Cys Arg Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr
365 370 375 380

agc ggc ctg ttc aac ggc gcc tac acc ccc aac ggc acc aag agc aac agc agc agc atc1200
Ser Gly Leu Phe Asn Gly Ala Tyr Thr Pro Asn Gly Thr Lys Ser Asn Ser Ser Ser Ile
385 390 395 400

atc acc atc ccc tgc agg atc aag cag atc atc aac atg tgg cag gag gtg ggc agg gcc1260
Ile Thr Ile Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Arg Ala
405 410 415 420

atg tac gcc cct ccc atc aag ggc aac atc acc tgc aag agc aac atc acc ggc ctg ctg1320
Met Tyr Ala Pro Pro Ile Lys Gly Asn Ile Thr Cys Lys Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu
425 430 435 440

ctg gtg agg gac ggc ggc acc gag ccc aac gac acc gag acc ttc agg ccc ggc ggc ggc1380
Leu Val Arg Asp Gly Gly Thr Glu Pro Asn Asp Thr Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly
445 450 455 460

gac atg agg aac aac tgg agg agc gag ctg tac aag tac aag gtg gtg gag atc aag cccl1440
Asp Met Arg Asn Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Glu Ile Lys Pro
465 470 475 480

ctg ggc gtg gcc ccc acc acc acc aag agg agg gtg gtg gag agg gag aag agg tga 1497
Leu Gly Val Ala Pro Thr Thr Thr Lys Arg Arg Val Val Glu Arg Glu Lys Arg *
485 490 495

```

<210> 18

<211> 4254

<212> ADN

<213> Secuencia artificial derivada del aislado CN54 del VIH-1

<220>

<221> Secuencia codificante

<223> gagpolnef-C

<400> 18

```

atg gcc gcc agg gcc agc atc ctg agg ggc ggc aag ctg gac aag tgg gag aag atc agg 60
Met Ala Ala Arg Ala Ser Ile Leu Arg Gly Gly Lys Leu Asp Lys Trp Glu Lys Ile Arg
5 10 15 20

ctg agg ccc ggc ggc aag aag cac tac atg ctg aag cac ctg gtg tgg gcc agc agg gag 120
Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys His Tyr Met Leu Lys His Leu Val Trp Ala Ser Arg Glu
25 30 35 40

ctg gag agg ttc gcc ctg aac ccc ggc ctg ctg gag acc agc gag ggc tgc aag cag atc 180
Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asn Pro Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Lys Gln Ile
45 50 55 60

atg aag cag ctg cag agc gcc ctg cag acc ggc acc gag gag ctg agg agc ctg ttc aac 240
Met Lys Gln Leu Gln Ser Ala Leu Gln Thr Gly Thr Glu Glu Thr Arg Ser Leu Phe Asn
65 70 75 80

acc gtg gcc acc ccc tac tgc gtg cac acc gag atc gac gtg agg gac acc agg gag gcc 300
Thr Val Ala Thr Pro Tyr Cys Val His Thr Glu Ile Asp Val Arg Asp Thr Arg Glu Ala

```

# ES 2 392 670 T3

85	90	95	100
ctg gac aag atc gag gag gag cag aac aag atc cag cag aag acc cag cag gcc aag gag 360			
Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ile Gln Gln Lys Thr Gln Gln Ala Lys Glu			
105	110	115	120
gcc gac ggc aag gtg agc cag aac tac ccc atc gtg cag aac ctg cag ggc cag atg gtg 420			
Ala Asp Gly Lys Val Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Leu Gln Gly Gln Met Val			
125	130	135	140
cac cag ccc atc agc ccc agg acc ctg aat gca tgg gtg aag gtg gtg gag gag aag gcc 480			
His Gln Pro Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu Lys Ala			
145	150	155	160
ttc agc ccc gag gtg atc ccc atg ttc agc gcc ctg agc gag ggc gcc acc cct cag gac 540			
Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp			
165	170	175	180
ctg aac acc atg ctg aac acc gtg ggc ggc cac cag gcc gcc atg cag atc ctg aag gac 600			
Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln Ala Ala Met Gln Ile Leu Lys Asp			
185	190	195	200
acc atc aac gag gag gcc gcc gag tgg gac agg ctg cac ccc gtg cac gcc ggc ccc atc 660			
Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg Leu His Pro Val His Ala Gly Pro Ile			
205	210	215	220
gcc ccc ggc cag atg agg gag ccc agg ggc agc gac atc gcc ggc acc acc agc aac ctg 720			
Ala Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Asn Leu			
225	230	235	240
cag gag cag atc gcc tgg atg acc agc aac cca ccc gtg ccc gtg ggc gac atc tac aag 780			
Gln Glu Gln Ile Ala Trp Met Thr Ser Asn Pro Pro Val Pro Val Gly Asp Ile Tyr Lys			
245	250	255	260
agg tgg atc atc ctg ggt tta aac aag atc gtg agg atg tac agc ccc acc agc atc ctg 840			
Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu			
265	270	275	280
gac atc aag cag ggc ccc aag gag ccc ttc agg gac tac gtg gac agg ttc ttc aag acc 900			
Asp Ile Lys Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Phe Lys Thr			
285	290	295	300
ctg agg gcc gag cag gcc acc cag ggc gtg aag aac tgg atg acc gac acc ctg ctg gtg 960			
Leu Arg Ala Glu Gln Ala Thr Gln Gly Val Lys Asn Trp Met Thr Asp Thr Leu Leu Val			
305	310	315	320
cag aac gcc aac ccc gac tgc aag acc atc ctg agg gcc ctg ggc ccc ggc gcc agc atc 1020			
Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Arg Ala Leu Gly Pro Gly Ala Ser Ile			
325	330	335	340
gag gag atg atg acc gcc tgc cag ggc gtg ggc ggc ccc agc cac aag gcc aag gtg ctg 1080			
Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro Ser His Lys Ala Lys Val Leu			
345	350	355	360
gcc gag gcc atg agc cag acc aac agc gcc atc ctg atg cag agg agc aac ttc aag ggc 1140			
Ala Glu Ala Met Ser Gln Thr Asn Ser Ala Ile Leu Met Gln Arg Ser Asn Phe Lys Gly			
365	370	375	380
agc aag agg atc gtg aag tgc ttc aac tgc ggc aag gag ggc cac atc gcc agg aac tgc 1200			
Ser Lys Arg Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Ile Ala Arg Asn Cys			
385	390	395	400
agg gcc ccc agg aag aag ggc tgc tgg aag tgc ggc aag gag ggc cac cag atg aag gac 1260			
Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp			
405	410	415	420
tgc acc gag agg cag gcc aac ttc ctg ggc aag atc tgg ccc agc cac aag ggc ggc ccc 1320			

# ES 2 392 670 T3

Cys Thr Glu Arg	Gln Ala Asn Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser His Lys Gly Gly Pro	425	430	435	440
ggc aac ttc ctg	cag aac agg ccc gag ccc acc gcc ccc ccc gag gag agc ttc agg ttc	1380			
Gly Asn Phe Leu	Gln Asn Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Phe Arg Phe	445	450	455	460
gag gag gag acc	acc acc ccc agc cag aag cag gag ccc atc gac aag gag ctg tac cccl	1440			
Glu Glu Glu Thr	Thr Thr Pro Ser Gln Lys Gln Glu Pro Ile Asp Lys Glu Leu Tyr Pro	465	470	475	480
ctg acc agc ctg	aag agc ctg ttc ggc aac gac ccc agc agc cag gaa ttc ttc agg gag	1500			
Leu Thr Ser Leu	Lys Ser Leu Phe Gly Asn Asp Pro Ser Ser Gln Glu Phe Phe Arg Glu	485	490	495	500
aac ctg gcc ctg	ccc cag ggc agg gcc agg gag ttc agc agc gag cag acc agg gcc aac	1560			
Asn Leu Ala Leu	Pro Gln Gly Arg Ala Arg Glu Phe Ser Ser Glu Gln Thr Arg Ala Asn	505	510	515	520
agc ccc acc agg	ggc gag ctg cag gtg tgg ggc agg gac aac aac agc atc agc gag gcc	1620			
Ser Pro Thr Arg	Gly Glu Leu Gln Val Trp Gly Arg Asp Asn Asn Ser Ile Ser Glu Ala	525	530	535	540
ggc gcc aac agg	cag ggc acc atc agc ttc aac ttc ccc cag atc acc ctg tgg cag agg	1680			
Gly Ala Asn Arg	Gln Gly Thr Ile Ser Phe Asn Phe Pro Gln Ile Thr Leu Trp Gln Arg	545	550	555	560
ccc ctg gtg acc	atc aag atc ggc ggc cag ctg aag gag gcc ctg ctg aac acc ggc gcc	1740			
Pro Leu Val Thr	Ile Lys Ile Gly Gly Gln Leu Lys Glu Ala Leu Leu Asn Thr Gly Ala	565	570	575	580
ggc gac acc gtg	ctg gag gac ctg aac ctg ccc ggc aag tgg aag ccc aag atg atc ggc	1800			
Gly Asp Thr Val	Leu Glu Asp Leu Asn Leu Pro Gly Lys Trp Lys Pro Lys Met Ile Gly	585	590	595	600
ggc atc ggc ggc	ttc atc aag gtg agg cag tac gag cag atc ccc atc gag atc tgc ggc	1860			
Gly Ile Gly Gly	Phe Ile Lys Val Arg Gln Tyr Glu Gln Ile Pro Ile Glu Ile Cys Gly	605	610	615	620
cac aag gcc atc	ggc acc gtg ctg gtg ggc ccc acc ccc gtg aac atc atc ggc agg aac	1920			
His Lys Ala Ile	Gly Thr Val Leu Val Gly Pro Thr Pro Val Asn Ile Ile Gly Arg Asn	625	630	635	640
ctg ctg acc cag	ctg ggc tgc acc ctg aac ttc ccc atc agc ccc atc gag acc gtg ccc	1980			
Leu Leu Thr Gln	Leu Gly Cys Thr Leu Asn Phe Pro Ile Ser Pro Ile Glu Thr Val Pro	645	650	655	660
gtg aag ctg aag	ccc ggc atg gac ggc ccc aag gtg aag cag tgg ccc ctg acc gag gag	2040			
Val Lys Leu Lys	Pro Gly Met Asp Gly Pro Lys Val Lys Gln Trp Pro Leu Thr Glu Glu	665	670	675	680
aag atc aag gcc	ctg acc gcc atc tgc gac gag atg gag aag gag ggc aag atc acc aag	2100			
Lys Ile Lys Ala	Leu Thr Ala Ile Cys Asp Glu Met Glu Lys Glu Gly Lys Ile Thr Lys	685	690	695	700
atc ggc ccc gag	aac ccc tac aac acc ccc atc ttc gcc atc aag aag aag gac agc acc	2160			
Ile Gly Pro Glu	Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Ile Phe Ala Ile Lys Lys Lys Asp Ser Thr	705	710	715	720
aag tgg agg aag	ctg gtg gac ttc agg gag ctg aac aag agg acc cag gac ttc tgg gag	2220			
Lys Trp Arg Lys	Leu Val Asp Phe Arg Glu Leu Asn Lys Arg Thr Gln Asp Phe Trp Glu	725	730	735	740
gtg cag ctg ggc	atc ccc cac ccc gcc ggc ctg aag aag aag aag agc gtg acc gtg ctg	2280			
Val Gln Leu Gly	Ile Pro His Pro Ala Gly Leu Lys Lys Lys Lys Ser Val Thr Val Leu	745	750	755	760

# ES 2 392 670 T3

gac gtg ggc gac gcc tac ttc agc atc ccc ctg tac gag gac ttc agg aag tac acc gcc2340  
 Asp Val Gly Asp Ala Tyr Phe Ser Ile Pro Leu Tyr Glu Asp Phe Arg Lys Tyr Thr Ala  
 765 770 775 780

ttc acc atc ccc agc agg aac aac gag acc ccc ggc atc agc tac cag tac aac gtg ctg2400  
 Phe Thr Ile Pro Ser Arg Asn Asn Glu Thr Pro Gly Ile Ser Tyr Gln Tyr Asn Val Leu  
 785 790 795 800

ccc cag ggc tgg aag ggc agc ctc gcc atc ttc cag agc agc atg acc atc gag gag ctg2460  
 Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Leu Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met Thr Ile Glu Glu Leu  
 805 810 815 820

atc tac agc aag aag agg cag gag atc ctg gac ctg tgg gtg tac cac acc cag ggc tac2520  
 Ile Tyr Ser Lys Lys Arg Gln Glu Ile Leu Asp Leu Trp Val Tyr His Thr Gln Gly Tyr  
 825 830 835 840

ttc ccc gac tgg cac aac tac acc ccc ggc ccc ggc gtg agg ttc ccc ctg acc ttc ggc2580  
 Phe Pro Asp Trp His Asn Tyr Thr Pro Gly Pro Gly Val Arg Phe Pro Leu Thr Phe Gly  
 845 850 855 860

tgg tgc ttc aag ctg gtg ccc gtg gac ccc agg gag gtg gag gag gcc aac gag ggc gag2640  
 Trp Cys Phe Lys Leu Val Pro Val Asp Pro Arg Glu Val Glu Glu Ala Asn Glu Gly Glu  
 865 870 875 880

gac aac tgc ctg ctg cac ccc gtg tgc cag cac ggc atg gag gac gac cac agg gag gtg2700  
 Asp Asn Cys Leu Leu His Pro Val Cys Gln His Gly Met Glu Asp Asp His Arg Glu Val  
 885 890 895 900

ctg aag tgg aag ttc gac agc cag ctg gcc cac agg cac agg gcc agg gag ctg cac ccc2760  
 Leu Lys Trp Lys Phe Asp Ser Gln Leu Ala His Arg His Arg Ala Arg Glu Leu His Pro  
 905 910 915 920

gag ttc tac aag gac tgc atg ggc ggc aag tgg agc aag agc agc atc gtg ggc tgg ccc2820  
 Glu Phe Tyr Lys Asp Cys Met Gly Gly Lys Trp Ser Lys Ser Ser Ile Val Gly Trp Pro  
 925 930 935 940

gcc atc agg gag agg atg agg agg acc gag ccc gcc gcc gac ggc gtg ggc gcc gtg agc2880  
 Ala Ile Arg Glu Arg Met Arg Arg Thr Glu Pro Ala Ala Asp Gly Val Gly Ala Val Ser  
 945 950 955 960

agg gac ctg gag aag cac ggc gcc atc acc agc agc aac acc gcc gcc acc aac gag gac2940  
 Arg Asp Leu Glu Lys His Gly Ala Ile Thr Ser Ser Asn Thr Ala Ala Thr Asn Glu Asp  
 965 970 975 980

tgc gcc tgg ctg gag gcc cag gag gag ggc gag gtg ggc ttc ccc gtg agg ccc cag gtg3000  
 Cys Ala Trp Leu Glu Ala Gln Glu Glu Gly Glu Val Gly Phe Pro Val Arg Pro Gln Val  
 985 990 995 1000

ccc ctg agg ccc atg acc tac aag ggc gcc gtg gac ctg agc ttc ttc ctg aag gag aag3060  
 Pro Leu Arg Pro Met Thr Tyr Lys Gly Ala Val Asp Leu Ser Phe Phe Leu Lys Glu Lys  
 1005 1010 1015 1020

ggc ggc ctg gag ggc ctg agg cag cac ctg ctg agg tgg ggc ttc acc acc ccc gac aag3120  
 Gly Gly Leu Glu Gly Leu Arg Gln His Leu Leu Arg Trp Gly Phe Thr Thr Pro Asp Lys  
 1025 1030 1035 1040

aag cac cag aag gag ccc ccc ttc ctg tgg atg ggc tac gag ctg cac ccc gac aag tgg3180  
 Lys His Gln Lys Glu Pro Pro Phe Leu Trp Met Gly Tyr Glu Leu His Pro Asp Lys Trp  
 1045 1050 1055 1060

acc gtg cag ccc acc cag ctg ccc gag aag gat agc tgg acc gtg aac gac atc cag aag3240  
 Thr Val Gln Pro Thr Gln Leu Pro Glu Lys Asp Ser Trp Thr Val Asn Asp Ile Gln Lys  
 1065 1070 1075 1080

ctg gtg ggc aag ctg aac tgg gcc agc cag atc tac ccc ggc atc aag gtg agg cag ctg3300  
 Leu Val Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln Ile Tyr Pro Gly Ile Lys Val Arg Gln Leu  
 1085 1090 1095 1100

# ES 2 392 670 T3

```

tgc aag ctg ctg agg ggc gcc aag gcc ctg acc gac atc gtg ccc ctg acc gag gag gcc3360
Cys Lys Leu Leu Arg Gly Ala Lys Ala Leu Thr Asp Ile Val Pro Leu Thr Glu Glu Ala
1105 1110 1115 1120

gag ctg gag ctg gcc gag aac agg gag atc ctg aag gag ccc gtg cac ggc gtg tac tac3420
Glu Leu Glu Leu Ala Glu Asn Arg Glu Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr Tyr
1125 1130 1135 1140

gac ccc agc aag gac ctg atc gcc gag atc cag aag cag ggc cag gag cag tgg acc tac3480
Asp Pro Ser Lys Asp Leu Ile Ala Glu Ile Gln Lys Gln Gly Gln Glu Gln Trp Thr Tyr
1145 1150 1155 1160

cag atc tac cag gag ccc ttc aag aac ctg aag acc ggc aag tac gcc aag atg agg acc3540
Gln Ile Tyr Gln Glu Pro Phe Lys Asn Leu Lys Thr Gly Lys Tyr Ala Lys Met Arg Thr
1165 1170 1175 1180

gcc cac acc aac gac gtg aag cag ctg acc gag gcc gtg cag aag atc gcc atg gag ggc3600
Ala His Thr Asn Asp Val Lys Gln Leu Thr Glu Ala Val Gln Lys Ile Ala Met Glu Gly
1185 1190 1195 1200

atc gtg atc tgg ggc aag acc ccc aag ttc agg ctg ccc atc cag aag gag acc tgg gag3660
Ile Val Ile Trp Gly Lys Thr Pro Lys Phe Arg Leu Pro Ile Gln Lys Glu Thr Trp Glu
1205 1210 1215 1220

acc tgg tgg acc gac tac tgg cag gcc acc tgg atc ccc gag tgg gag ttc gtg aac acc3720
Thr Trp Trp Thr Asp Tyr Trp Gln Ala Thr Trp Ile Pro Glu Trp Glu Phe Val Asn Thr
1225 1230 1235 1240

cct ccc ctg gtg aag ctg tgg tat cag ctg gag aag gac ccc atc gtg ggc gtg gag acc3780
Pro Pro Leu Val Lys Leu Trp Tyr Gln Leu Glu Lys Asp Pro Ile Val Gly Val Glu Thr
1245 1250 1255 1260

ttc tac gtg gac ggc gcc gcc aac agg gag acc aag atc ggc aag gcc ggc tac gtg acc3840
Phe Tyr Val Asp Gly Ala Ala Asn Arg Glu Thr Lys Ile Gly Lys Ala Gly Tyr Val Thr
1265 1270 1275 1280

gac agg ggc agg aag aag atc gtg agc ctg acc gag acc acc aac cag aag acc gag ctg3900
Asp Arg Gly Arg Lys Lys Ile Val Ser Leu Thr Glu Thr Thr Asn Gln Lys Thr Glu Leu
1285 1290 1295 1300

cag gcc atc tgc atc gcc ctg cag gac agc ggc agc gag gtg aac atc gtg acc gac agc3960
Gln Ala Ile Cys Ile Ala Leu Gln Asp Ser Gly Ser Glu Val Asn Ile Val Thr Asp Ser
1305 1310 1315 1320

cag tac gcc ctg ggc atc atc cag gcc cag ccc gac aag agc gag agc gag ctg gtg aac4020
Gln Tyr Ala Leu Gly Ile Ile Gln Ala Gln Pro Asp Lys Ser Glu Ser Glu Leu Val Asn
1325 1330 1335 1340

cag atc atc gag cag ctg atg aag aag gag agg gtg tac ctg agc tgg gtg ccc gcc cac4080
Gln Ile Ile Glu Gln Leu Met Lys Lys Glu Arg Val Tyr Leu Ser Trp Val Pro Ala His
1345 1350 1355 1360

aag ggc atc ggc ggc aac gag cag gtg gac aag ctg gtg agc agc ggc atc agg aag gtg4140
Lys Gly Ile Gly Gly Asn Glu Gln Val Asp Lys Leu Val Ser Ser Gly Ile Arg Lys Val
1365 1370 1375 1380

ctg aag acc ctg gag ccc ttc agg aag cag aac ccc ggc atc gtg atc tac cag tac atg4200
Leu Lys Thr Leu Glu Pro Phe Arg Lys Gln Asn Pro Gly Ile Val Ile Tyr Gln Tyr Met
1385 1390 1395 1400

gac gac ctg tac gtg ggc agc gac ctg gag atc ggc cag cac agg acc aag taa 4254
Asp Asp Leu Tyr Val Gly Ser Asp Leu Glu Ile Gly Gln His Arg Thr Lys *
1405 1410 1415

```

<210> 19  
 <211> 6907  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial quimérica

<220>  
 <221> Inserto del MVA-B

<220>  
 <221> Secuencia flanqueante izquierda de TK  
 <222> 1..502  
 <223> Tk<sub>L</sub>

<220>  
 <221> Secuencia complementaria a secuencia codificante  
 <222> 537..4517  
 <223> gagpolnef-IIIB

<220>  
 <221> Secuencia complementaria de promotor  
 <222> 4527..4565  
 <223> pE/L para gagpolnef-IIIB

<220>  
 <221> Promotor  
 <222> 4580..4618  
 <223> pE/L para gp120-BX08

<220>  
 <221> Secuencia codificante  
 <222> CDS: 4628..6109  
 <223> gp120-BX08

<220>  
 <221> Secuencia flanqueante derecha de TK  
 <222> 6216..6907  
 <223> Tk<sub>R</sub>

<400> 19  
 aagcttttgc gatcaataaa tggatcacaa ccagtatctc ttaacgatgt tcttcgcaga 60  
 tgatgattca ttttttaagt atttggctag tcaagatgat gaatcttcat tatctgatat 120  
 attgcaaata actcaatata tagactttct gttattatta ttattgatcc aatcaaaaaa 180  
 taaattagaa gccgtgggtc attgttatga atctctttca gaggaataca gacaattgac 240  
 aaaattcaca gactctcaag attttaaaaa actgtttaac aaggcccta ttgttacaga 300  
 tggaagggtc aaacttaata aaggatattt gttcgacttt gtgattagtt tgatgcgatt 360  
 caaaaaagaa tcctctctag ctaccaccgc aatagatcct attagataca tagatcctcg 420  
 tcgcgatata gcattttcta acgtgatgga tatattaaag tgaataaaag tgaacaataa 480  
 ttaattcttt attgtcatca tgggtaccaa ggcgcggatc cccgggtacc gagctcttac 540  
 cacaggaatg ggggctcctt ctggtgcttc ttgtcggggg tggtcaggcc ccacctcagc 600  
 aggtgctgcc tcagctcctc gatcttggtc ctgtgctggc cgatctccag gtcgctgccc 660  
 acgtacaggt cgtccatgta ctgatagatc acgatgtcgg ggttctgctt cttgaagggc 720  
 tccaggatct ttgtcatgct gctctggaag atggcggggc tgcccttcca gccctggggc 780  
 agcacgttgt actggtagcg gatgccgggg gtctcggttg tgatgctggg gatggtgaag 840  
 gcgctggcca cgatctcctt agccaccacg ggaggcagg tgaagtcgct agccatagcc 900  
 ctccagttgc tgtggtactt ctggtgctcg tcctgggcct tgcgatgcc gtccaggaac 960  
 aggatcttcc tgatgccggc gtcaccagc ttgtccacct gtcggttgcc gccgatgcc 1020  
 ttgtggggcg gcaccaggc caggtaacac ttctccttct tgatcagctg ctgatgatc 1080  
 tgggttcacca gctcgctctc gctcttgctg ggctgggcct ggatgatgcc cagggcgtac 1140  
 tggctgtcgg tcacgatgtt caoctocagg cctgagtcct gcagggccag gtagatagcc 1200  
 tgcagctcgg tcttctggtt ggtggtggtg gtcaggggca ccaccttctg gcggcccttg 1260  
 ttggtcacgt agccggcctt gccagcttg gtctccctgt tggcggcgcc gtccacgtag 1320



aaggtctcgg	cgcccacgat	gggctccttc	tccagctgat	accacagctt	caccagggga	1380
ggggtgttca	cgaactccca	ctcgggaatc	caggtggcct	gccagtactc	ggtcaccag	1440
gtctcccagg	tctccttctg	gatgggcagc	ttgaacttag	gagtcttgcc	ccagatcacg	1500
atgctctcgg	tgggtgatctt	ctgcacggcc	tccgtcagct	gcttcacgtc	gttgggtgtg	1560
gcgcgcgcga	tgcgggcgta	cttgccgggtc	ttcaggttct	tgaagggtc	ctggtagatc	1620
tggtaggtcc	actggccctg	gccctgcttc	tggatctcgg	cgatcaggtc	cttgctgggg	1680
tcgtagtaca	cgcctgtcac	gggctccttc	aggatctccc	tgttctcggc	cagctccagc	1740
tccgctcct	cggtcagggg	gatcacctcg	gtcagagcct	ttgtgcccct	cagcagcttg	1800
cacagctgcc	tcaccttgat	gccggggtag	atctggcttg	cccagttcag	cttgcccacc	1860
agcttctgaa	tgtcgttcac	ggccagctg	tccttctcgg	gcagcacgat	gggctgcacg	1920
gtccacttgt	cggggtgcag	ctcgtagccc	atccacagga	atggtacttg	aggtgtgact	1980
ggaaaaccca	cctcctcctc	ctcttggtgt	tctagccaag	cacaatcagc	attgttagct	2040
gctgtgttgc	tacttgatgat	tgtccatgt	ttttctaggt	ctcgagatgc	tgtcccacc	2100
ccatctgctg	ctggctcagc	tctgtctatt	ctttccctta	cagcaggcca	tccaaccaca	2160
ctactttttg	accacttgcc	acccatcctt	ggatcaggga	agtagccttg	tgtgtggtag	2220
atccacagat	caaggatata	ttgtcttcgt	tgggagtga	ttagcccttc	cagtccccc	2280
ttttctttta	aaaagtggct	aagatctaca	gctgccttgt	aagtcattgg	tcttaaagg	2340
gtatacttcc	tgaagtccct	gtccaggggc	acgctgaagt	aggcgtcgcc	cagctccagc	2400
acggtcacgc	tcttcttctt	cttcaggccg	gcggggtggg	ggatgcccag	ctgcacctcc	2460
cagaagtcct	gggtcctctt	gttcagctcc	ctgaagtcca	ccagcttcc	ccacttggtg	2520
ctgtccttct	tcttgatggc	gaacacgggg	gtgttgtagg	ggttctcggg	gccgatcttg	2580
ctgatcttgc	cctccttctc	catctcgggt	cagatctcca	ccagggcctt	gatcttctcc	2640
tccgtcagg	gccactgctt	caccttaggg	ccgtccatgc	cgggcttcag	cttcacgggc	2700
acggctctga	tggggctgat	ggggaagttc	aggggtgcagc	cgatctgggt	cagcaggttc	2760
ctgccgatga	tgttcacagg	tgtagggtcc	accagcacgg	tgccgatggc	cttgtggccg	2820
cagatctcga	tcaggatctg	gtcgtactgc	ctcaccttga	tgaagccgcc	gatgccgccg	2880
atcatcttgg	gcttccacct	gccgggcagg	ctcatctcct	ccagcacggg	gtcgtcggcg	2940
ccgggtggcca	gcagggcctc	cttcagctgg	ccaccgatct	ttattgtgac	gaggggtcgt	3000
tgccaaagag	tgatctgagg	gaagttaaag	gatacagttc	cttgtctatc	ggctcctgct	3060
tctgaggggg	agttgttgtc	tctaccccag	acctgaagct	ctcttctggt	ggggctgttg	3120
gctctggtct	gctctgaaga	aatggtgggg	ctgttggtc	tggctctgctc	tgaagaaat	3180
tccctggcct	tcccttgtag	gaaggccaga	tcttccctaa	aattagcctg	cctctcgggtg	3240
cagtccttca	tctggtggcc	ctccttgccg	cacttccagc	agcccttctt	cctggggggcg	3300
cggcagttcc	tggcgggtgtg	gccctccttg	ccgcagttga	agcacttcac	catcttctc	3360
tggttcctga	agttgcccct	ctgcatcatg	atggtggcgg	tgttggtcac	ctggctcatg	3420
gcctcggcca	gcaccctggc	cttgtggccg	gggcccgcga	cgccctggca	ggcgggtcatc	3480
atctcctcca	gggtggcggc	gggtcccagg	gccttcagga	tggctcttga	gtcgggggtg	3540
gcgttctgca	ccagcagggt	ctcggtcac	cagttcttca	cctcctgggt	ggcgtgctcg	3600
gcgcgcagg	tcttgtagaa	cctgtccacg	tagtccctga	agggctcttt	ggggccctgc	3660
ctgatatacca	ggatgctggt	ggggctgtac	atcctcacga	tcttggttcag	gccaggatg	3720
atccacctct	tgtagatttc	gccacgggg	atgggggggt	tgttggtcat	ccagccgatc	3780
tgtcctgca	gggtgctggt	gggtccggcg	atgtcgtcgc	cgccggggctc	cctcatctgg	3840
ccggggggcga	tggggccggc	gtgcacgggg	tgcacctgt	cccactcggc	ggcctcctcg	3900
ttgatggtct	ccttcagcat	ctgcatggcg	gcctggtggc	cgcccacggg	gttcagcatg	3960
gtgttcagg	cctggggggg	ggctccctcg	ctcagggcgc	tgaacatggg	gatcacctcg	4020
gggctgaagg	ccttctcctc	caccaccttc	accagggcgt	tcagggtcct	ggggctgatg	4080
gcctggtgca	ccatctggcc	ctggatgttc	tgcacgatgg	ggtagtcttg	gtcacctgg	4140
ctgctgtggc	cgggtgtcggc	ggcggcctgc	tgggccttct	tcttggtactt	gttctgctcc	4200
tctcgtatct	tgtccagggc	ctccttggtg	tccttgatct	cgatcctctg	gtgcacgcag	4260
tacagggtgg	ccacggtgtt	gtacaggctc	ctcagctcct	cgctgccggg	ctgcaggctg	4320
ggctgcagct	ggcccaggat	ctgcctgcag	ccctcgctgg	tctccagcag	gccgggggttc	4380
acggcgaacc	tctccagctc	cctgctggcc	cacacgatgt	gcttcagctt	atacttcttc	4440
ttgcccgcgg	gcctcagcct	gatcttcttc	cacctgtcca	gctcggccgc	gctcagcacg	4500
ctggccctgg	cgcccatgct	cgagtctatt	tatatccaa	aaaaaaaaaa	taaaatttca	4560
atttttgtcg	acaagcttaa	aaattgaaat	tttatttttt	ttttttggaa	tataaataag	4620
ctcagacatg	gaccgcgcca	agctgctgct	gctgctgctg	ctgctgctgc	tgccccaggc	4680
ccaggccgct	agcgaccgcc	tgtgggtgac	agtgtactac	ggcgtgccc	tgtggaagga	4740
cgcaccacc	accctgttct	gcgcctccga	cgccaaggcc	tacgacaccg	aggtgcacaa	4800
cgtgtggggc	accacgcct	gcgtgcccc	cgaccccaac	ccccaggagg	tgggtgctggg	4860
caacgtgacc	gagaacttca	acatgggcaa	gaacaacatg	gtggagcaga	tgcacagga	4920

```

catcatcagc ctgtgggacc agtccctgaa gccctgctgt aagctgaccc ccctgtgcgt 4980
gacctgaac tgcaccaagc tgaagaacag caccgacacc aacaacaccc gctggggcac 5040
ccaggagatg aagaactgct ccttcaacat cagcacctcc gtgcggaaca agatgaagag 5100
agagtacgcc ctgttctact ccctggacat cgtgcccacg gacaacgaca acaccagcta 5160
ccgcctgagg tcctgcaaca cctccatcat caccagggcc tgccccaagg tgagcttcga 5220
gcccattccc atccacttct gcgccccgcg cggttcgccc atcctgaagt gcaacaacaa 5280
gaccttcaac ggcaccggcc cctgcaccaa cgtgagcacc gtgcagtga cccacggcat 5340
ccgccccgtg gtgtccaccc agctgctgct gaacggcagc ctggccgagg aggaggtggt 5400
gatccggtcc gagaacttca ccaacaacgc caagaccatc atcgtgcagc tgaacgagag 5460
cgtggagatc aactgcacca gacccaacaa caacaccagg aagtccatcc acatcgggcc 5520
cggccgcgcc ttctacacca ccggcgacat catcggcgac atccggcagg cccactgcaa 5580
catctccaga accaactgga ccaacaccct gaagaggggtg gccgagaagc tgcgcgagaa 5640
gttcaacaac accaccatcg tgttcaacca gagcagcggc ggcgaccccg agatcgtgat 5700
gcaactcctt aactgcggcg gcgagttctt ctactgcaac accaccacgc tgttcaactc 5760
cacctggaac gagaccaaca gcgagggcaa catcacctcc ggcaccatca ccctgccttg 5820
ccggatcaag cagatcatca acatgtggca ggaggtgggc aaggccatgt acgccccccc 5880
catcggcggc cagatcaagt gcctgtccaa catcaccggc ctgctgctga ccagagacgg 5940
cggctccgac aacagcagca gcggcaagga gatcttccgc cccggcggcg gcgacatgag 6000
ggacaactgg cgctccgagc tgtacaagta caaggtggtg aagatcgagc ccctgggcat 6060
cgccccacc aaggccaaga ggaggggtgt gcagcgcgag aagcgtgat aatagggatc 6120
cgcgccaaat ttaaattgat ctgatccttt ttctgggtaa gtaatacgtc aaggagaaaa 6180
cgaaacgata tgtagttagc ggccgcctaa ttaactaata ttatatTTTT tatctaaaaa 6240
actaaaaata aacattgatt aaattttaat ataacttta aaaatggatg ttgtgtcgtt 6300
agataaacgg tttatgtatt ttgaggaaat tgataatgag ttagattacg aaccagaaag 6360
tgcaaatgag gtgcgaaaaa aactgccgta tcaaggacag ttaaaactat tactaggaga 6420
attatTTTT cttagtaagt tacagcgaca cggatatatta gatggtgcca ccgtagtgta 6480
tataggatcg gctcctggta cacatatacg ttatttgaga gatcatttct ataatttagg 6540
aatgattatc aaatggatgc taattgacgg acgccatcat gatcctattc taaatggatt 6600
gcgtgatgtg actctagtga ctcggttcgt tgatgaggaa tatctacgat ccatcaaaaa 6660
acaactgcat ccttctaaga ttattttaat ttctgatgta agatccaaac gaggaggaaa 6720
tgaacctagt acggcggatt tactaagtaa ttacgctcta caaaatgtca tgattagtat 6780
tttaaaccce gtggcatcta gtcttaaatg gagatgcccg tttccagatc aatggatcaa 6840
ggacttttat atcccacacg gtaataaaat gttacaacct tttgctcctt catattcagg 6900
ggaattc

```

<210> 20

<211> 7347

<212> ADN

<213> Secuencia artificial quimérica

<220>

<221> Inserto del MVA-C

<220>

<221> Secuencia flanqueante izquierda de TK

<222> 1..502

<223> Tk<sub>L</sub>

<220>

<221> Secuencia complementaria a secuencia codificante

<222> 647..2143

<223> gp120-C

<220>

<221> Secuencia complementaria de promotor

<222> 2153..2191

<223> pE/L para gp120-C

<220>

<221> Promotor

&lt;222&gt; 2206..2244

&lt;223&gt; pE/L para gp120-C

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Secuencia codificante

&lt;222&gt; CDS: 2254..6507

&lt;223&gt; gagpolnef-C

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Secuencia flanqueante derecha de TK

&lt;222&gt; 6656..7347

<223> Tk<sub>R</sub>

&lt;400&gt; 20

aagcttttgc	gatcaataaa	tggatcacaa	ccagtatctc	ttaacgatgt	tcttcgcaga	60
tgatgattca	ttttttaagt	atttggttag	tcaagatgat	gaatcttcat	tatctgatat	120
attgcaaata	actcaatata	tagactttct	gttattatta	ttattgatcc	aatcaaaaaa	180
taaattagaa	gccgtgggtc	attggtatga	atctctttca	gaggaatata	gacaattgac	240
aaaattcaca	gactctcaag	attttaaaaa	actgtttaac	aagggtcccta	ttgttacaga	300
tggaagggtc	aaacttaata	aaggatattt	gttcgacttt	gtgattagtt	tgatgcgatt	360
caaaaaagaa	tcctctctag	ctaccaccgc	aatagatcct	attagataca	tagatcctcg	420
tcgcgatata	gcattttcta	acgtgatgga	tatattaaag	tcgaataaag	tgaacaataa	480
ttaattcttt	attgtcatca	tgggtaccaa	ggcgcgatcg	cattttctaa	cgtgatggat	540
atattaaagt	cgaataaagt	gaacaataat	taattcttta	ttgtcatcat	gtaattaaact	600
agctaccggg	aataaaaaatt	ccgggagatc	tctcgagaga	tctttatcac	ctcttctccc	660
tctccaccac	cctcctcttg	gtggtggtgg	gggccacgcc	caggggcttg	atctccacca	720
ccttgtaact	gtacagctcg	ctcctccagt	tgttcctcat	gtcgccgccg	ccgggcctga	780
aggctctcgt	gtcgttgggc	tcggtgccgc	cgtccctcac	cagcagcagg	ccggtgatgt	840
tgctcttgca	ggtgatgttg	cccttgatgg	gaggggcgta	catggccctg	cccacctcct	900
gccacatggt	gatgatctgc	ttgatcctgc	aggggatggt	gatgatgctg	ctgctgttgc	960
tcttggtgcc	gttgggggtg	taggcgcctg	tgaacaggcc	gctgggtgtg	cagtagaaga	1020
actcgcctct	gcagttgaag	ctgtgggtgg	tcacctccag	gtcgccgccg	ctgctgctgg	1080
cgaacttgat	ggtcttggtc	tggaaagtgt	cggcaagctt	cttgctcacc	ctctgcaggg	1140
tctcgttcca	cttgctcctg	ctgatgttgc	agtgggcctg	cctgatgtcg	ccgatgatgt	1200
cgcgggtggc	gtagaagggt	tggccggggc	cgatcctgat	gctcttctcg	gtgttggtgc	1260
cgggcctggt	gcacacgata	tccacgctct	ggttcagggt	cacgatgatg	gttttcacgt	1320
tgttggtcag	gttctcgtct	ctgatgatga	tctcgccctc	ggccaggctg	ccgttcagca	1380
gcagctgggt	gctcaccacg	ggcttgatgc	cgtgggtgca	ctgcacgggt	ctcacgttgt	1440
ggcagggggc	ggtgccgttg	aagatcttgt	cgttgcaact	caggatggcg	tagccggcgg	1500
gggtgcagta	gtggatgggg	atggggtcga	aggtcacctt	ggggcaggcc	tgggtgatgg	1560
cgtcgtgtgt	gcagttgatc	agcctgtagt	actcgtgctg	gttctcgtcg	tagttcttct	1620
tggtcagggg	cacgatgtcc	agcctgtaga	acagggcgta	cacgggtctgc	ttcctgtccc	1680
tcaccaagggt	ggtggcggtg	aagctgcagt	tcttcacctc	cttcacgtct	tcgtggtagg	1740
tctcgtggta	ggtgtcgttg	ctggtgctgc	tcacgttcct	gcactccagg	gtcacgcaca	1800
gggggggtcag	cttcacgcag	ggcttcaggc	tctgggtcca	caggctgatg	acgtcctcct	1860
gcactctggt	caccatctcg	ttcttccaca	tgttgaaagt	ctcggtcacg	ttctccagca	1920
ccatctcctg	ggggttgggg	tcggcgggca	cgcaggcgtg	ggtggcccac	acgttgtgca	1980
cctcgggtgtc	gtaggccttg	gcgtcgctgg	cgcagaacag	ggtgggtggg	gcgcccttcc	2040
acacgggcac	gccgtagtag	acggtcaccc	acaggttgcc	cacggcctgg	gcctggggca	2100
gcagcgcagc	cagcagcagc	agcagcagct	tggccctgtc	catgctcgag	cttatttata	2160
ttccaaaaaa	aaaaaataaa	atttcaattt	ttaagcttgt	cgacaaaaat	tgaattttta	2220
tttttttttt	ttggaatata	aatagactcg	agcatggccg	ccagggccag	catcctgagg	2280
ggcggcaagc	tggacaagtg	ggagaagatc	aggctgaggc	ccggcggcaa	gaagcactac	2340
atgctgaagc	acctggtgtg	ggccagcagg	gagctggaga	ggttcgccct	gaaccccggc	2400
ctgctggaga	ccagcagagg	ctgcaagcag	atcatgaagc	agctgcagag	cgccctgcag	2460
accggcaccg	aggagctgag	gagcctgttc	aacaccgtgg	ccacccctta	ctgctgtcac	2520
accgatcctg	acgtgaggga	caccagggag	gccctggaca	agatcgagga	ggagcagaac	2580
aagatccagc	agaagaccca	gcaggccaag	gaggccgacg	gcaaggtgag	ccagaactac	2640
cccatcgtgc	agaacctgca	gggccagatg	gtgcaccagc	ccatcagccc	caggaccctg	2700
aatgcatggg	tgaagggtgg	ggaggagaa	gccttcagcc	ccgaggtgat	ccccatgttc	2760

# ES 2 392 670 T3

agcgccctga	gcgaggggcg	cacccctcag	gacctgaaca	ccatgctgaa	caccgtgggc	2820
ggccaccagg	ccgcatgca	gatcctgaag	gacaccatca	acgaggaggc	cgccgagtgg	2880
gacaggctgc	accccgtagc	cgccggcccc	atcgcccccg	gccagatgag	ggagcccagg	2940
ggcagcgaca	tcgcccggcac	caccagcaac	ctgcaggagc	agatcgccctg	gatgaccagc	3000
aaccaccccg	tgcctgtggg	cgacatctac	aagagggtgga	tcatacctggg	tttaaacaaag	3060
atcgtgagga	tgtacagccc	caccagcatc	ctggacatca	agcaggggccc	caaggagccc	3120
ttcagggact	acgtggacag	gttcttcaag	accctgaggg	ccgagcaggc	caccaggggc	3180
gtgaagaact	ggatgaccga	caccctgctg	gtgcagaacg	ccaaccccga	ctgcaagacc	3240
atcctgaggg	ccctgggccc	cgccgcccagc	atcgaggaga	tgatgaccgc	ctgccagggc	3300
gtgggcgggc	ccagccacaa	ggccaagggtg	ctggccgagg	ccatgagcca	gaccaacagc	3360
gccatcctga	tgcagaggag	caacttcaag	ggcagcaaga	ggatcgtgaa	gtgcttcaac	3420
tgcggcaagg	agggccacat	cgccagggaac	tgcaggggccc	ccagggaagaa	gggctgctgg	3480
aagtgcggca	aggaggggcca	ccagatgaag	gactgcaccg	agaggcaggc	caacttctctg	3540
ggcaagatct	ggcccagcca	caagggcggc	cccggcaact	tcttgcagaa	caggcccagag	3600
cccaccgccc	cccccgagga	gagcttcagg	ttcgaggagg	agaccaccac	ccccagccag	3660
aagcaggagc	ccatcgacaa	ggagctgtac	cccctgacca	gcctgaagag	cctgttcggc	3720
aacgacccca	gcagccagga	attcttcagg	gagaacctgg	ccctgcccc	gggcaggggc	3780
agggagttca	gcagcgagca	gaccaggggc	aacagcccca	ccaggggcga	gctgcagggtg	3840
tggggcaggg	acaacaacag	catcagcgag	gcccgcgcca	acaggcaggg	caccatcagc	3900
ttcaacttcc	ccagatcac	cctgtggcag	aggcccctgg	tgaccatcaa	gatcggcggc	3960
cagctgaagg	aggccctgct	gaacaccggc	gcccggcgaca	ccgtgctgga	ggacctgaac	4020
ctgcccggca	agtgggaagcc	caagatgatc	ggcggcatcg	gcggcttcat	caaggtgagg	4080
cagtacgagc	agatccccat	cgagatctgc	ggccacaagg	ccatcggcac	cgtgctggtg	4140
ggccccaccc	ccgtgaacat	catcggcagg	aacctgctga	cccagctggg	ctgcaccctg	4200
aacttcccca	tcagccccat	cgagaccgtg	cccgtgaagc	tgaagcccgg	catggacggc	4260
cccaagggtga	agcagtggcc	cctgaccgag	gagaagatca	aggccctgac	cgccatctgc	4320
gacgagatgg	agaaggaggg	caagatcacc	aagatcggcc	ccgagaacct	ctacaacacc	4380
cccatcttcg	ccatcaagaa	gaaggacagc	accaagtggg	ggaagctggt	ggacttcagg	4440
gagctgaaca	agaggaccca	ggacttcttg	gaggtgcagc	tgggcatccc	ccaccccgcc	4500
ggcctgaaga	agaagaagag	cgtgaccgtg	ctggacgtgg	gcgacgccta	cttcagcatc	4560
cccctgtacg	aggacttcag	gaagtacacc	gccttcacca	tccccagcag	gaacaacgag	4620
acccccggca	tcagctacca	gtacaacgtg	ctgccccagg	gctggaaggg	cagcctcgcc	4680
atcttccaga	gcagcatgac	catcgaggag	ctgatctaca	gcaagaagag	gcaggagatc	4740
ctggacctgt	gggtgtacca	caccaggggc	tacttccccg	actggcacia	ctacaccccc	4800
ggccccggcg	tgaggttccc	cctgaccttc	ggctggtgct	tcaagctggt	ccccgtggac	4860
cccaggggag	tggaggaggc	caacgagggc	gaggacaact	gcctgctgca	ccccgtgtgc	4920
cagcacggga	tgagggacga	ccacagggag	gtgctgaagt	ggaagttcga	cagccagctg	4980
ggccacaggc	acagggccag	ggagctgcac	cccagttct	acaaggactg	catgggcggc	5040
aagtggagca	agagcagcat	cgtgggctgg	cccgccatca	gggagaggat	gaggaggacc	5100
gagcccgccg	ccgacggcgt	gggcgcccgtg	agcagggacc	tggagaagca	cgccgccatc	5160
accagcagca	acaccgcccgc	caccaacgag	gactgcgcct	ggctggaggc	ccaggaggag	5220
ggcgagggtg	gcttccccgt	gaggccccag	gtgcccctga	ggcccatgac	ctacaagggc	5280
gccgtggacc	tgagcttctt	cctgaaggag	aaggcgggcc	tggagggcct	gaggcagcac	5340
ctgctgaggt	ggggcttcac	cacccccgac	aagaagcacc	agaaggagcc	ccccttcctg	5400
tggatgggct	acgagctgca	ccccgacaag	tggaccgtgc	agcccaccca	gctgcccagag	5460
aaggatagct	ggaccgtgaa	cgacatccag	aagctggtgg	gcaagctgaa	ctggggccagc	5520
cagatctacc	ccggcatcaa	ggtgaggcag	ctgtgcaagc	tgctgagggg	cgccaaggcc	5580
ctgaccgaca	tcgtgcccct	gaccgaggag	gccgagctgg	agctggccga	gaacagggag	5640
atcctgaagg	agcccgtgca	cgccgtgtac	tacgacccca	gcaaggacct	gatcgccgag	5700
atccagaagc	agggccagga	gcagtggacc	taccagatct	accaggagcc	cttcaagaac	5760
ctgaagaccg	gcaagtacgc	caagatgagg	accgcccaca	ccaacgacgt	gaagcagctg	5820
accgaggccg	tgcagaagat	cgccatggag	ggcatcgtga	tctggggcaa	gacccccaaag	5880
ttcaggctgc	ccatccagaa	ggagacctgg	gagacctggt	ggaccgacta	ctggcaggcc	5940
acctggatcc	ccgagtggga	gttcgtgaac	acccctcccc	tgggtgaagct	gtgggtatcag	6000
ctggagaagg	accccatcgt	gggcgtggag	accttctacg	tggacggcgc	cgccaacagg	6060
gagaccaaga	tcggcaaggc	cggctacgtg	accgacaggg	gcagggaagaa	gatcgtgagc	6120
ctgaccgaga	ccaccaacca	gaagaccgag	ctgcaggcca	tctgcatcgc	cctgcaggac	6180
agcggcagcg	aggtgaacat	cgtgaccgac	agccagtacg	ccctgggcat	catccaggcc	6240
cagcccgaca	agagcgagag	cgagctggtg	aaccagatca	tcgagcagct	gatgaagaag	6300
gagaggggtg	acctgagctg	ggtgcccgc	cacaagggca	tcggcgggcaa	cgagcagggtg	6360

ES 2 392 670 T3

gacaagctgg	tgagcagcgg	catcaggaag	gtgctgaaga	ccctggagcc	cttcaggaag	6420
cagaaccccg	gcatcgtgat	ctaccagtac	atggacgacc	tgtacgtggg	cagcgacctg	6480
gagatcggcc	agcacaggac	caagtaaaga	tctctcgagg	agctcaagcg	ggcggatccc	6540
ccgggctgca	ggaattcgat	cgcgccaaat	ttaaatgatc	ctgatccttt	ttctgggtaa	6600
gtaatacgtc	aaggagaaaa	cgaaacgata	tgtagttagc	ggcgcgctaa	ttactaata	6660
ttatatTTTT	tatctaaaaa	actaaaaata	aacattgatt	aaattttaat	ataatactta	6720
aaaatggatg	ttgtgtcggt	agataaaaccg	tttatgtatt	ttgaggaaat	tgataatgag	6780
ttagattacg	aaccagaaaag	tgcaaatgag	gtcgcaaaaa	aactgccgta	tcaaggacag	6840
ttaaaactat	tactaggaga	attatTTTT	cttagtaagt	tacagcgaca	cggtatatta	6900
gatggtgcc	ccgtagtgt	tataggatcg	gctcctggta	cacatatacg	ttatttgaga	6960
gatcatttct	ataatttagg	aatgattatc	aatggatgc	taattgacgg	acgccatcat	7020
gatcctattc	taaatggatt	gcgtgtatgt	actctagtga	ctcggttcgt	tgataggaa	7080
tatctacgat	ccatcaaaaa	acaactgcat	ccttctaaga	ttattttaat	ttctgatgta	7140
agatccaaac	gaggaggaaa	tgaacctagt	acggcggatt	tactaagtaa	ttacgctcta	7200
caaaatgtca	tgattagtat	tttaaacccc	gtggcatcta	gtcttaaatg	gagatgcccg	7260
ttccagatc	aatggatcaa	ggacttttat	atcccacacg	gtaataaaat	gttacaacct	7320
tttgctcctt	catattcagg	ggaattc				7347

```
<210> 21
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
```

<220>  
<221> Cebador  
<223> TK-R2

```
<400> 21
ctgccgtatc aaggaca
```

<210> 22  
<211> 1515  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial derivada del gen Env del virus SHIV89.6P, carente de nucleótidos correspondientes a la proteína gp41

```
<220>  
<221> Secuencia codificante  
<223> 89.6P-gp120
```

<400> 22																				
atg	ccc	atg	ggg	tct	ctg	caa	ccg	ctg	gcc	acc	ttg	tac	ctg	ctg	ggg	atg	ctg	gtc	gct	60
Met	Pro	Met	Gly	Ser	Leu	Gln	Pro	Leu	Ala	Thr	Leu	Tyr	Leu	Leu	Gly	Met	Leu	Val	Ala	
				5					10						15				20	
tcc	gtg	cta	gcg	acc	gag	aag	ctg	tgg	gtg	acc	gtg	tac	tac	ggc	gtg	ccc	gtg	tgg	agg	120
Ser	Val	Leu	Ala	Thr	Glu	Lys	Leu	Trp	Val	Thr	Val	Tyr	Tyr	Gly	Val	Pro	Val	Trp	Arg	
				25					30					35					40	
gag	gcc	acc	acc	acc	ctg	ttc	tgc	gcc	agc	gac	gcc	aaa	gcc	tac	gac	acc	gag	gtg	cac	180
Glu	Ala	Thr	Thr	Thr	Leu	Phe	Cys	Ala	Ser	Asp	Ala	Lys	Ala	Tyr	Asp	Thr	Glu	Val	His	
				45					50					55					60	
aac	gtg	tgg	gcc	acc	cac	gcc	tgc	gtg	ccc	acc	gac	ccc	aac	ccc	cag	gag	gtg	gtg	ctg	240
Asn	Val	Trp	Ala	Thr	His	Ala	Cys	Val	Pro	Thr	Asp	Pro	Asn	Pro	Gln	Glu	Val	Val	Leu	
				65					70					75					80	
ggc	aac	gtg	acc	gag	aac	ttc	aat	atg	tgg	aag	aac	aac	atg	gtg	gac	cag	atg	cac	gag	300
Gly	Asn	Val	Thr	Glu	Asn	Phe	Asn	Met	Trp	Lys	Asn	Asn	Met	Val	Asp	Gln	Met	His	Glu	
				85					90					95					100	

# ES 2 392 670 T3

gac atc atc agc ctg tgg gac gag agc ctg aag ccc tgc gtg aag ctg acc ccc ctg tgc	360
Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Glu Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys	
105 110 115 120	
gtg acc ctg aac tgc acc aac ctg aac atc acc aag aac acc acc aac ctg acc agc agc	420
Val Thr Leu Asn Cys Thr Asn Leu Asn Ile Thr Lys Asn Thr Thr Asn Leu Thr Ser Ser	
125 130 135 140	
agc tgg ggc atg atg gag gag ggc gag atc aag aac tgc agc ttc tac atc acc acc tcc	480
Ser Trp Gly Met Met Glu Glu Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Tyr Ile Thr Thr Ser	
145 150 155 160	
atc agg aac aag gtg aag aag gag tac gcc ctg ttc aac agg ctg gac gtg gtg ccc gtg	540
Ile Arg Asn Lys Val Lys Lys Glu Tyr Ala Leu Phe Asn Arg Leu Asp Val Val Pro Val	
165 170 175 180	
aag aac acc agc aac acc aag tac agg ctg att agc tgc aac acc agc gtg att acc cag	600
Lys Asn Thr Ser Asn Thr Lys Tyr Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln	
185 190 195 200	
gcc tgc cct aaa gtg agc ttc cag ccc atc ccc atc cac tac tgc gtg ccc gcc ggc ttc	660
Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Gln Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Val Pro Ala Gly Phe	
205 210 215 220	
gcc atc ctg aag tgc aac aac aag acc ttc aac ggc agc ggc ccc tgc acc aac gtg agc	720
Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe Asn Gly Ser Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser	
225 230 235 240	
acc gtg cag tgc acc cac ggc atc agg ccc gtg gtg tct acc cag ctg ctg ctg aac ggc	780
Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly	
245 250 255 260	
agc ctg gcc gaa gag gac atc gtg atc agg agc gag gac ttc acc gac aac gtg aag acc	840
Ser Leu Ala Glu Glu Asp Ile Val Ile Arg Ser Glu Asp Phe Thr Asp Asn Val Lys Thr	
265 270 275 280	
atc atc gtg cag ctg aac gag agc gtg gtg att aac tgc acc agg ccc aac aac aac acc	900
Ile Ile Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Val Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr	
285 290 295 300	
agg gag agg ctg agc atc ggc ccc ggc agg gcc ttc tac gcc agg agg aac atc atc ggc	960
Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg Asn Ile Ile Gly	
305 310 315 320	
gac atc agg cag gcc cac tgc aac atc agc agg gcc aag tgg aac aac acc ctg cag cag	1020
Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Arg Ala Lys Trp Asn Asn Thr Leu Gln Gln	
325 330 335 340	
atc gtc atc aag ctg agg gag aag ttc agg aac aag acc atc gcc ttc aac cag agc agc	1080
Ile Val Ile Lys Leu Arg Glu Lys Phe Arg Asn Lys Thr Ile Ala Phe Asn Gln Ser Ser	
345 350 355 360	
ggc ggc gac ccc gag atc gtg atg cac agc ttc aac tgc ggc ggc gag ttc ttc tac tgc	1140
Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys	
365 370 375 380	
aac acc gcc cag ctg ttc aac agc acc tgg aac gtg gcc ggc ggc acc aac ggc acc gag	1200
Asn Thr Ala Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Glu	
385 390 395 400	
ggc aac gac atc atc acc ctg cag tgc agg atc aag cag atc atc aac atg tgg cag aag	1260
Gly Asn Asp Ile Ile Thr Leu Gln Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Lys	
405 410 415 420	
gtg ggc aag gcc atg tac gcc cct ccc atc acc ggc cag atc agg tgc agc agc aac atc	1320
Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Thr Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile	
425 430 435 440	

# ES 2 392 670 T3

```

acc ggc ctg ctg ctg act cgc gac ggc ggc aac agc acc gag acc gag acc gag atc ttc 1380
Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Ser Thr Glu Thr Glu Thr Glu Ile Phe
445 450 455 460

agg ccc ggc ggc ggc gac atg agg gac aac tgg agg agc gag ctg tac aag tac aag gtg 1440
Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val
465 470 475 480

gtg agg atc gag ccc atc ggc gtg gcc ccc acc agg gcc aag agg agg acc gtg cag agg 1500
Val Arg Ile Glu Pro Ile Gly Val Ala Pro Thr Arg Ala Lys Arg Arg Thr Val Gln Arg
485 490 495 500

gag aag agg tag taa 1515
Glu Lys Arg . .
505

```

<210> 23

<211> 4218

<212> ADN

<213> Secuencia artificial derivada del virus SHIV89.6P mediante modificaciones en las partes correspondientes a los antígenos Gag, Pol y Nef

<220>

<221> Secuencia codificante

<223> SIVgpn

<400> 23

```

atg cgc gtg agg aac agc gtg ctg agc ggc aag aag gcc gac gag ctg gag aag atc agg 60
Met Arg Val Arg Asn Ser Val Leu Ser Gly Lys Lys Ala Asp Glu Leu Glu Lys Ile Arg
1 5 10 15 20

ctg agg ccc aac ggc aag aag aag tat atg ctg aag cac gtg gtg tgg gcc gcc aac gag 120
Leu Arg Pro Asn Gly Lys Lys Lys Tyr Met Leu Lys His Val Val Trp Ala Ala Asn Glu
25 30 35 40

ctg gac agg ttc ggc ctg gcc gag agc ctg ctg gag aac aag gag ggc tgc cag aag atc 180
Leu Asp Arg Phe Gly Leu Ala Glu Ser Leu Leu Glu Asn Lys Glu Gly Cys Gln Lys Ile
45 50 55 60

ctg agc gtg ctg gcc ccc ctg gtg ccc acc ggc agc gag aac ctg aag agc ctg tac aac 240
Leu Ser Val Leu Ala Pro Leu Val Pro Thr Gly Ser Glu Asn Leu Lys Ser Leu Tyr Asn
65 70 75 80

acc gtg tgc gtg atc tgg tgc atc cac gcc gag gag aag gtg aag cac acc gag gag gcc 300
Thr Val Cys Val Ile Trp Cys Ile His Ala Glu Glu Lys Val Lys His Thr Glu Glu Ala
85 90 95 100

aag cag atc gtg cag agg cac ctg gtg gtg gag acc ggc acc acc gag acc atg ccc aag 360
Lys Gln Ile Val Gln Arg His Leu Val Val Glu Thr Gly Thr Thr Glu Thr Met Pro Lys
105 110 115 120

acc agc agg ccc acc gcc ccc agc tcc ggc cgc ggc ggc aac tac ccc gtg cag cag atc 420
Thr Ser Arg Pro Thr Ala Pro Ser Ser Gly Arg Gly Gly Asn Tyr Pro Val Gln Gln Ile
125 130 135 140

ggc ggc aac tac gtg cac ctg ccc ctg agc ccc agg acc ctg aac gcc tgg gtg aag ctg 480
Gly Gly Asn Tyr Val His Leu Pro Leu Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Leu
145 150 155 160

atc gag gag aag aag ttc ggc gcc gag gtg gtg ccc ggc ttc cag gcc ctg agc gag ggc 540
Ile Glu Glu Lys Lys Phe Gly Ala Glu Val Val Pro Gly Phe Gln Ala Leu Ser Glu Gly
165 170 175 180

tgc acc cct tac gac atc aac cag atg ctg aac tgc gtg ggc gac cac cag gcc gcc atg 600

```

# ES 2 392 670 T3

Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu Asn Cys Val Gly Asp His Gln Ala Ala Met	185	190	195	200
cag atc atc agg gac atc atc aac gag gag gcc gcc gac tgg gac ctg cag cac cct cag	205	210	215	220
Gln Ile Ile Arg Asp Ile Ile Asn Glu Glu Ala Ala Asp Trp Asp Leu Gln His Pro Gln				660
ccc gcc cct cag cag ggc cag ctg agg gag gcc agc ggc agc gac atc gcc ggc acc aca	225	230	235	240
Pro Ala Pro Gln Gln Gly Gln Leu Arg Glu Pro Ser Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr				720
agc agc gtg gac gag cag atc cag tgg atg tac agg cag cag aac cct atc ccc gtg ggc	245	250	255	260
Ser Ser Val Asp Glu Gln Ile Gln Trp Met Tyr Arg Gln Gln Asn Pro Ile Pro Val Gly				780
aac atc tac agg agg tgg atc cag ctg ggc ctc cag aag tgc gtg agg atg tac aac ccc	265	270	275	280
Asn Ile Tyr Arg Arg Trp Ile Gln Leu Gly Leu Gln Lys Cys Val Arg Met Tyr Asn Pro				840
aca aac atc ctg gac gtg aag cag gga cca aag gag ccc ttc cag tca tat gtg gac agg	285	290	295	300
Thr Asn Ile Leu Asp Val Lys Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Gln Ser Tyr Val Asp Arg				900
ttc tac aag agc ctg agg gcc gag cag acc gac gcc gcc gtg aag aac tgg atg acc cag	305	310	315	320
Phe Tyr Lys Ser Leu Arg Ala Glu Gln Thr Asp Ala Ala Val Lys Asn Trp Met Thr Gln				960
acc ctg ctg atc cag aac gcc aac ccc gac tgc aag ctg gtg ctg aag ggc ctg ggc gtg	325	330	335	340
Thr Leu Leu Ile Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Leu Val Leu Lys Gly Leu Gly Val				1020
aac ccc acc ctg gag gag atg ctg acc gcc tgc cag ggc gtg ggc ggc ccc ggc cag aag	345	350	355	360
Asn Pro Thr Leu Glu Glu Met Leu Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro Gly Gln Lys				1080
gct agg ctg atg gcc gag gct ctg aag gag gcc ctg gcc ccc gtg ccc atc ccc ttc gcc	365	370	375	380
Ala Arg Leu Met Ala Glu Ala Leu Lys Glu Ala Leu Ala Pro Val Pro Ile Pro Phe Ala				1140
gcc gcc cag cag agg gga ccc agg aag ccc atc aag tgc tgg aac tgc ggc aag gag ggc	385	390	395	400
Ala Ala Gln Gln Arg Gly Pro Arg Lys Pro Ile Lys Cys Trp Asn Cys Gly Lys Glu Gly				1200
cac agc gcc agg cag tgc agg gcc ccc agg agg cag ggc tgc tgg aag tgc ggc aag atg	405	410	415	420
His Ser Ala Arg Gln Cys Arg Ala Pro Arg Arg Gln Gly Cys Trp Lys Cys Gly Lys Met				1260
gac cac gtg atg gcc aag tgc ccc gac agg cag gcc ggt ttt agg cct tgg tcc atg ggg	425	430	435	440
Asp His Val Met Ala Lys Cys Pro Asp Arg Gln Ala Gly Phe Arg Pro Trp Ser Met Gly				1320
aaa gaa gcc ccg caa ttt ccc cat ggc tca agt gca tca ggg gct gat gcc aac tgc tcc	445	450	455	460
Lys Glu Ala Pro Gln Phe Pro His Gly Ser Ser Ala Ser Gly Ala Asp Ala Asn Cys Ser				1380
ccc aga gga ccc agc tgt gga tct gct aaa gaa cta cat gca gtt ggg caa gca gca gag	465	470	475	480
Pro Arg Gly Pro Ser Cys Gly Ser Ala Lys Glu Leu His Ala Val Gly Gln Ala Ala Glu				1440
aga aaa gca gag aga aag cag aga gaa gcc tta caa gga ggt gac aga gga ttt gct gca	485	490	495	500
Arg Lys Ala Glu Arg Lys Gln Arg Glu Ala Leu Gln Gly Gly Asp Arg Gly Phe Ala Ala				1500
cct caa ttc tct ctt tgg agg aga cca gta gtg acc gcc cac atc gag ggc cag ccc gtg	505	510	515	520
Pro Gln Phe Ser Leu Trp Arg Arg Pro Val Val Thr Ala His Ile Glu Gly Gln Pro Val				1560



# ES 2 392 670 T3

gag	gtg	ctg	ctg	aac	acc	ggc	gcc	gac	gac	agc	atc	gtg	acc	ggc	atc	gag	ctg	gga	ccc	1620
Glu	Val	Leu	Leu	Asn	Thr	Gly	Ala	Asp	Asp	Ser	Ile	Val	Thr	Gly	Ile	Glu	Leu	Gly	Pro	
				525					530					535					540	
cac	tac	acc	ccc	aag	atc	gtg	ggc	ggc	atc	ggc	ggc	ttc	atc	aac	aca	aag	gag	tac	aag	1680
His	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ile	Val	Gly	Gly	Ile	Gly	Gly	Phe	Ile	Asn	Thr	Lys	Glu	Tyr	Lys	
				545					550					555					560	
aac	gtg	gag	atc	gag	gtg	ctg	ggc	aag	agg	atc	aag	ggc	acc	atc	atg	acc	ggc	gac	acc	1740
Asn	Val	Glu	Ile	Glu	Val	Leu	Gly	Lys	Arg	Ile	Lys	Gly	Thr	Ile	Met	Thr	Gly	Asp	Thr	
				565					570					575					580	
ccc	atc	aac	atc	ttc	ggc	agg	aac	ctg	ctg	acc	gcc	ctg	ggc	atg	agc	ctg	aac	ttc	ccc	1800
Pro	Ile	Asn	Ile	Phe	Gly	Arg	Asn	Leu	Leu	Thr	Ala	Leu	Gly	Met	Ser	Leu	Asn	Phe	Pro	
				585					590					595					600	
atc	gcc	aag	gtg	gag	ccc	gtg	aag	gtg	gcc	ctg	aag	ccc	ggc	aag	gac	ggc	ccc	aag	ctg	1860
Ile	Ala	Lys	Val	Glu	Pro	Val	Lys	Val	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Lys	Asp	Gly	Pro	Lys	Leu	
				605					610					615					620	
aag	cag	tgg	cct	ctg	agc	aag	gag	aag	atc	gtg	gcc	ctg	agg	gaa	atc	tgc	gag	aag	atg	1920
Lys	Gln	Trp	Pro	Leu	Ser	Lys	Glu	Lys	Ile	Val	Ala	Leu	Arg	Glu	Ile	Cys	Glu	Lys	Met	
				625					630					635					640	
gag	aag	gac	ggc	cag	ctg	gag	gag	gcc	cct	ccc	acc	aac	ccc	tac	aac	acc	ccc	acc	ttc	1980
Glu	Lys	Asp	Gly	Gln	Leu	Glu	Glu	Ala	Pro	Pro	Thr	Asn	Pro	Tyr	Asn	Thr	Pro	Thr	Phe	
				645					650					655					660	
gcc	atc	aag	aag	aag	gac	aag	aac	aag	tgg	agg	atg	ctg	atc	gac	ttc	agg	gag	ctg	aac	2040
Ala	Ile	Lys	Lys	Lys	Asp	Lys	Asn	Lys	Trp	Arg	Met	Leu	Ile	Asp	Phe	Arg	Glu	Leu	Asn	
				665					670					675					680	
agg	gtg	aca	cag	gac	ttc	acc	gag	gtg	cag	ctg	ggc	atc	cct	cac	ccc	gcc	ggc	ctg	gcc	2100
Arg	Val	Thr	Gln	Asp	Phe	Thr	Glu	Val	Gln	Leu	Gly	Ile	Pro	His	Pro	Ala	Gly	Leu	Ala	
				685					690					695					700	
aag	aag	gag	aag	ggc	ggc	ctg	gag	ggc	atc	tac	tac	agc	gcc	agg	agg	cac	agg	atc	ctg	2160
Lys	Lys	Glu	Lys	Gly	Gly	Leu	Glu	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Arg	Arg	His	Arg	Ile	Leu	
				705					710					715					720	
gac	atg	tac	ctg	gag	aag	gag	gag	ggc	atc	atc	ccc	gac	tgg	cag	gac	tac	acc	agc	ggc	2220
Asp	Met	Tyr	Leu	Glu	Lys	Glu	Glu	Gly	Ile	Ile	Pro	Asp	Trp	Gln	Asp	Tyr	Thr	Ser	Gly	
				725					730					735					740	
ccc	ggc	atc	aga	tac	ccc	aag	acc	ttc	ggc	tgg	ctg	tgg	aag	ctg	gtg	ccc	gtg	aac	gtg	2280
Pro	Gly	Ile	Arg	Tyr	Pro	Lys	Thr	Phe	Gly	Trp	Leu	Trp	Lys	Leu	Val	Pro	Val	Asn	Val	
				745					750					755					760	
agc	gac	gag	gcc	cag	gag	gac	gag	agg	cac	tac	ctg	atg	cag	ccc	gcc	cag	acc	agc	aag	2340
Ser	Asp	Glu	Ala	Gln	Glu	Asp	Glu	Arg	His	Tyr	Leu	Met	Gln	Pro	Ala	Gln	Thr	Ser	Lys	
				765					770					775					780	
tgg	gac	gac	ccc	tgg	ggc	gag	gtg	ctg	gcc	tgg	aag	ttt	gac	ccc	acc	ctg	gcc	tac	acc	2400
Trp	Asp	Asp	Pro	Trp	Gly	Glu	Val	Leu	Ala	Trp	Lys	Phe	Asp	Pro	Thr	Leu	Ala	Tyr	Thr	
				785					790					795					800	
tac	gag	gcc	tac	gcc	aga	tac	ccc	gag	gag	ctg	gag	gcc	agc	cag	gcc	tgc	cag	agg	aag	2460
Tyr	Glu	Ala	Tyr	Ala	Arg	Tyr	Pro	Glu	Glu	Leu	Glu	Ala	Ser	Gln	Ala	Cys	Gln	Arg	Lys	
				805					810					815					820	
agg	ctg	gag	gag	ggc	atg	ggc	ggc	gcc	atc	agc	atg	agg	agg	agc	aag	ccc	gcc	ggc	gac	2520
Arg	Leu	Glu	Glu	Gly	Met	Gly	Gly	Ala	Ile	Ser	Met	Arg	Arg	Ser	Lys	Pro	Ala	Gly	Asp	
				825					830					835					840	
ctg	agg	cag	aag	ctg	ctg	agg	gcc	agg	ggc	gag	acc	tac	ggc	agg	ctg	ctg	ggc	gag	gtg	2580
Leu	Arg	Gln	Lys	Leu	Leu	Arg	Ala	Arg	Gly	Glu	Thr	Tyr	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Glu	Val	
				845					850					855					860	

# ES 2 392 670 T3

gag gac ggc agc agc cag agc ctg ggc ggc ctg ggc aag ggc ctg agc agc agg agc tgc	2640
Glu Asp Gly Ser Ser Gln Ser Leu Gly Gly Leu Gly Lys Gly Leu Ser Ser Arg Ser Cys	
865 870 875 880	
gag ggc cag aag tac aac cag ggc cag tac atg aac acc ccc tgg agg aac ccc gcc gag	2700
Glu Gly Gln Lys Tyr Asn Gln Gly Gln Tyr Met Asn Thr Pro Trp Arg Asn Pro Ala Glu	
885 890 895 900	
gag aag gag aag ctg gcc tac agg aag cag aac atg gac gac atc gac gag gag gac gac	2760
Glu Lys Glu Lys Leu Ala Tyr Arg Lys Gln Asn Met Asp Asp Ile Asp Glu Glu Asp Asp	
905 910 915 920	
gac ctg gtg ggc gtg agc gtg agg ccc aag gtg ccc ctg agg gcc atg acc tac aag ctg	2820
Asp Leu Val Gly Val Ser Val Arg Pro Lys Val Pro Leu Arg Ala Met Thr Tyr Lys Leu	
925 930 935 940	
gcg atc gac atg agc cac ttc atc ctg aac agc atc ggc ttc agc acc ccc gag gag aag	2880
Ala Ile Asp Met Ser His Phe Ile Leu Asn Ser Ile Gly Phe Ser Thr Pro Glu Glu Lys	
945 950 955 960	
ttc cag aag gac cct ccc ttc cag tgg atg ggc tac gag ctg tgg ccc acc aag tgg aag	2940
Phe Gln Lys Asp Pro Pro Phe Gln Trp Met Gly Tyr Glu Leu Trp Pro Thr Lys Trp Lys	
965 970 975 980	
ctc cag aag atc gag ctg ccc cag agg gag acc tgg acc gtg aac gac atc cag aag ctg	3000
Leu Gln Lys Ile Glu Leu Pro Gln Arg Glu Thr Trp Thr Val Asn Asp Ile Gln Lys Leu	
985 990 995 1000	
gtg ggc gtg ctg aac tgg gcc gcc cag att tac ccc ggc atc aag acc aag cac ctg tgc	3060
Val Gly Val Leu Asn Trp Ala Ala Gln Ile Tyr Pro Gly Ile Lys Thr Lys His Leu Cys	
1005 1010 1015 1020	
agg ctg atc cgc ggc aag atg aca ctg acc gag gag gtg cag tgg acc gag atg gcc gag	3120
Arg Leu Ile Arg Gly Lys Met Thr Leu Thr Glu Glu Val Gln Trp Thr Glu Met Ala Glu	
1025 1030 1035 1040	
gcc gag tac gag gag aac aag atc att ctg agc cag gag cag gag ggc tgc tac tac cag	3180
Ala Glu Tyr Glu Glu Asn Lys Ile Ile Leu Ser Gln Glu Gln Glu Gly Cys Tyr Tyr Gln	
1045 1050 1055 1060	
gag ggc aag ccc ctg gag gcc acc gtg atc aag agc cag gac aac cag tgg agc tac aag	3240
Glu Gly Lys Pro Leu Glu Ala Thr Val Ile Lys Ser Gln Asp Asn Gln Trp Ser Tyr Lys	
1065 1070 1075 1080	
atc cac cag gag gac aag atc ctg aag gtg ggc aag ttc gcc aag atc aag aac acc cac	3300
Ile His Gln Glu Asp Lys Ile Leu Lys Val Gly Lys Phe Ala Lys Ile Lys Asn Thr His	
1085 1090 1095 1100	
acc aac ggc gtg agg ctg ctg gcc cac gtg atc cag aag atc ggc aag gag gcc atc gtg	3360
Thr Asn Gly Val Arg Leu Leu Ala His Val Ile Gln Lys Ile Gly Lys Glu Ala Ile Val	
1105 1110 1115 1120	
atc tgg ggc cag gtg ccc aag ttc cac ctg ccc gtg gag aag gac gtg tgg gag cag tgg	3420
Ile Trp Gly Gln Val Pro Lys Phe His Leu Pro Val Glu Lys Asp Val Trp Glu Gln Trp	
1125 1130 1135 1140	
tgg acc gac tac tgg cag gtg aca tgg atc ccc gag tgg gac ttc atc agc acc cct cct	3480
Trp Thr Asp Tyr Trp Gln Val Thr Trp Ile Pro Glu Trp Asp Phe Ile Ser Thr Pro Pro	
1145 1150 1155 1160	
ctg gtg agg ctg gtg ttc aat ctg gtg aag gac ccc atc gag ggc gag gag acc tac tac	3540
Leu Val Arg Leu Val Phe Asn Leu Val Lys Asp Pro Ile Glu Gly Glu Glu Thr Tyr Tyr	
1165 1170 1175 1180	

# ES 2 392 670 T3

```

acc gac ggc agc tgc aac aag cag agc aag gag ggc aag gcc ggc tac atc acc gac agg 3600
Thr Asp Gly Ser Cys Asn Lys Gln Ser Lys Glu Gly Lys Ala Gly Tyr Ile Thr Asp Arg
1185 1190 1195 1200

ggc aag gac aag gtg aag gtg ctg gag cag acc acc aac cag cag gcc gag ctg gag gcc 3660
Gly Lys Asp Lys Val Lys Val Leu Glu Gln Thr Thr Asn Gln Gln Ala Glu Leu Glu Ala
1205 1210 1215 1220

ttc ctg atg gcc ctg acc gac agc ggc ccc aag gcc aac atc atc gtg gac agc cag tat 3720
Phe Leu Met Ala Leu Thr Asp Ser Gly Pro Lys Ala Asn Ile Ile Val Asp Ser Gln Tyr
1225 1230 1235 1240

gtg atg ggc atc atc acc ggc tgc ccc acc gag agc gag agc agg ctg gtg aac cag atc 3780
Val Met Gly Ile Ile Thr Gly Cys Pro Thr Glu Ser Glu Ser Arg Leu Val Asn Gln Ile
1245 1250 1255 1260

atc gag gag atg att aag aag agc gag att tac gtg gcc tgg gtg ccc gcc cac aag ggc 3840
Ile Glu Glu Met Ile Lys Lys Ser Glu Ile Tyr Val Ala Trp Val Pro Ala His Lys Gly
1265 1270 1275 1280

atc ggc ggc aac cag gag atc gac cac ctg gtg agc cag ggc atc agg cag gtg ctg agg 3900
Ile Gly Gly Asn Gln Glu Ile Asp His Leu Val Ser Gln Gly Ile Arg Gln Val Leu Arg
1285 1290 1295 1300

aag agg atc acc gtg ctg gac atc ggc gac gcc tac ttc agc atc cct ctg gac gag gag 3960
Lys Arg Ile Thr Val Leu Asp Ile Gly Asp Ala Tyr Phe Ser Ile Pro Leu Asp Glu Glu
1305 1310 1315 1320

ttc agg cag tac acc gcc ttc acc ctg ccc agc gtg aac aac gcc gag ccc ggc aag agg 4020
Phe Arg Gln Tyr Thr Ala Phe Thr Leu Pro Ser Val Asn Asn Ala Glu Pro Gly Lys Arg
1325 1330 1335 1340

tac atc tac aag gtg ctg ccc cag ggc tgg aag ggc agc ccc gcc atc ttc cag tac acc 4080
Tyr Ile Tyr Lys Val Leu Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro Ala Ile Phe Gln Tyr Thr
1345 1350 1355 1360

atg agg cac gtg ctg gag ccc ttc agg aag gcc aac ccc gac gtg acc ctg gtg cag tac 4140
Met Arg His Val Leu Glu Pro Phe Arg Lys Ala Asn Pro Asp Val Thr Leu Val Gln Tyr
1365 1370 1375 1380

atg gac gac atc ctg atc gcc tcc gac agg acc gac ctg gag cac gac agg gtg gtg ctc 4200
Met Asp Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asp Arg Thr Asp Leu Glu His Asp Arg Val Val Leu
1385 1390 1395 1400

cag agc aag gag ctg tag 4218
Gln Ser Lys Glu Leu .
1405

```

<210> 24

<211> 7180

<212> ADN

<213> Secuencia artificial quimérica

<220>

<221> Secuencia flanqueante izquierda de TK

<222> 1..499

<223> TK-L

<220>

<221> Secuencia complementaria a secuencia codificante

<222> 519..2033

<223> Secuencia complementaria a la secuencia codificante  
de la proteína 89.6P-gp120

<220>  
 <221> Secuencia complementaria de promotor  
 <222> 2081..2119  
 <223> Secuencia complementaria del promotor pE/L para 89.6P-gp120

<220>  
 <221> Promotor  
 <222> 2144..2183  
 <223> Promotor pE/L para SIVgpn

<220>  
 <221> Secuencia codificante  
 <222> 2227..6444  
 <223> Secuencia codificante de la proteína SIVgpn

<220>  
 <221> Secuencia flanqueante derecha de TK  
 <222> 6488..7179  
 <223> TK-R

<220>  
 <223> Secuencia del inserto presente en el genoma de los vectores MVA-89.6P-SIVgpn y NYVAC-89.6P-SIVgpn

<400> 24  
 aagcttttgc gatcaataaa tggatcacaa ccagtatctc ttaacgatgt tcttcgcaga 60  
 tgatgattca ttttttaagt atttggetag tcaaatgat gaattctcat tatctgatat 120  
 attgcaaate actcaatate tagactttct gttattatta ttgatccaat caaaaaataa 180  
 attagaagcc gtgggtcatt gttatgaate tctttcagag gaatacagac aattgacaaa 240  
 attcacagac tctcaagatt ttaaaaaact gtttaacaag gtccctattg ttacagatgg 300  
 aagggtcaaa ctttaataag gatatttgtt cgactttgtg attagtttga tgcgattcaa 360  
 aaaagaatcc tctctagcta ccaccgcaat agatcctatt agatacatag atcctcgtcg 420  
 cgatatcgca ttttctaacg tgatggatat attaaagtcg aataaagtga acaataatta 480  
 attcttttatt gtcattcatg gtaccaaggc gcggtatcctt actacctctt ctccctctgc 540  
 acggctctcc tcttgccctt ggtgggggcc acgccgatgg gctcgatcct caccaccttg 600  
 tacttgatca gctcgctcct ccagttgtcc ctcatgtcgc cgccgccggg cctgaagatc 660  
 tcgggtctcg gtctcggtgt gttgccgcgc tcgcgagtca gcagcaggcc ggtgatgttg 720  
 ctgctgcacc tgatctggcc ggtgatggga ggggcgtaca tggccttgcc cactctctgc 780  
 cacatgttga tgatctgctt gatcctgcac tgcagggtga tgatgtcgtt gccctcgggtg 840  
 ccgttggtgc cgcgggccac gttccagggt ctggtgaaca gctgggcggg gttgcagtag 900  
 aagaactcgc cgcgcaggt gaagctgtgc atcacgatct cggggtcgcc gccgtgtctc 960  
 tgggtgaagg cgatggtctt gttcctgaac ttctccctca gcttgatgac gatctgctgc 1020  
 aggggtgttg tccacttgcc cctgctgatg ttgcagtggt cctgcctgat gtcgccgatg 1080  
 atgttctctc tggcgtagaa ggccctgccg ggcccgatgc tcagcctctc cctggtgttg 1140  
 ttgttgggcc tgggtgcagt aatcaccaag ctctcggtca gctgcacgat gatggtcttc 1200  
 acgttgctcg tgaagtcctc gctcctgatc acgatgtcct ctccggccag gctgccgttc 1260  
 agcagcagct gggtagacac cacgggcctg atgcctggtg tgcactgcac ggtgctcacg 1320  
 ttggtgcagg ggcgctgcc gttgaagggt ttggtgttgc acttcaggat ggcgaagccg 1380  
 gcgggcacgc agtagtggt ggggatgggc tggaaagctc ctttagggca gccctgggta 1440  
 atcacgctgg tgttgcaagt aatcagcctg tacttggtgt tgctggtgtt cttcacgggc 1500  
 accacgtcca gcctgttgaa cagggcgtac tcttcttcca ccttggtcct gatggaggtg 1560  
 gtgatgtaga agctgcagtt cttgatctcg cctcctcca tcatgccccca gctgctgctg 1620  
 gtcagggttg tgggtgttct ggtgatgttc aggttggtgc agttcagggt cacgcacagg 1680  
 ggggtcagct tcacgcaggc cttcaggctc tcgtcccaaa ggctgatgat gtcctcgtgc 1740  
 atctgggtcca ccatgttgtt cttccacata ttgaagttct cggtcacgtt gccacgacc 1800  
 acctcctggg ggttggggtc ggtgggcacg caggcgtggg tggccacac gttgtgcacc 1860  
 tcgggtgtcgt aggtcttggt gtcgtggcg cagaacaggg tgggtggtggc ctccctccac 1920  
 acgggcacgc cgtagtacac ggtaaccac agcttctcgg tcgctagcac ggaagcgacc 1980  
 agcatcccca gcaggtaaaa ggtggccagc ggttgacagag accccatggg catgctggcg 2040  
 gcgaattggg taccaggcct agatctgtcg acttcgagct tatttatatt ccaaaaaaaa 2100  
 aaaataaaat ttcaattttt aagctcgcgc caaatttagc ttaaaaattg aaattttatt 2160

# ES 2 392 670 T3

tttttttttt	ggaatataaa	taagctcgaa	gtcgacagat	ctaggcctgg	tacccaattc	2220
gccaggatgc	gcgtgaggaa	cagcgtgctg	agcggcaaga	aggccgacga	gctggagaag	2280
atcaggctga	ggcccaacgg	caagaagaag	tatatgctga	agcacgtggt	gtgggcccgc	2340
aacgagctgg	acaggttcgg	cctggccgag	agcctgctgg	agaacaagga	gggctgccag	2400
aagatcctga	gcgtgctggc	ccccctggtg	cccaccggca	gcgagaacct	gaagagcctg	2460
tacaacaccg	tgtgcgtgat	ctggtgcatc	cacgccgagg	agaaggtgaa	gcacaccgag	2520
gaggccaagc	agatcgtgca	gaggcacctg	gtggtggaga	ccggcaccac	cgagaccatg	2580
cccaagacca	gcaggcccac	cgcccccagc	tccggccgcg	gcggcaacta	ccccgtgcag	2640
cagatcggcg	gcaactacgt	gcacctgccc	ctgagcccca	ggacctgaa	cgctgggtg	2700
aagctgatcg	aggagaagaa	gttcggcgcc	gagtggtg	ccggcttcca	ggccctgagc	2760
gagggctgca	ccccttacga	catcaaccag	atgctgaact	gcgtgggcga	ccaccaggcc	2820
gccatgcaga	tcatcaggga	catcatcaac	gaggaggccg	ccgactggga	cctgcagcac	2880
cctcagcccc	cccctcagca	gggccagctg	agggagccca	gcggcagcga	catgcgccgc	2940
accacaagca	gcgtggacga	gcagatccag	tggatgtaca	ggcagcagaa	ccctatcccc	3000
gtgggcaaca	tctacaggag	gtggatccag	ctgggcctcc	agaagtgcgt	gaggatgtac	3060
aacccccaaa	acatcctgga	cgtgaagcag	ggaccaaagg	agcccttcca	gtcatatgtg	3120
gacaggttct	acaagagcct	gagggccgag	cagaccgacg	ccgccgtgaa	gaactggatg	3180
acccagaccc	tgctgatcca	gaacgccaac	cccgactgca	agctggtgct	gaagggcctg	3240
ggcgtgaacc	ccacctgga	ggagatgctg	accgcctgcc	agggcgtggg	cgcccccggc	3300
cagaaggcta	ggctgatggc	cgaggctctg	aaggaggccc	tggcccccg	gccccatccc	3360
ttcgccgcgc	cccagcagag	gggacccagg	aagcccatca	agtgtgggaa	ctgcggcaag	3420
gagggccaca	gcgccaggca	gtgcagggcc	cccaggaggc	agggctgctg	gaagtgcggc	3480
aagatggacc	acgtgatggc	caagtgcgcc	gacaggcagg	ccggttttag	gccttggtcc	3540
atggggaaag	aagccccgca	atttccccat	ggctcaagtg	catcaggggc	tgatgccaac	3600
tgtccccca	gaggacccag	ctgtggatct	gctaaagaac	tacatgcagt	tgggcaagca	3660
gcagagagaa	aagcagagag	aaagcagaga	gaagccttac	aaggaggtga	cagaggattt	3720
gctgcacctc	aattctctct	ttggaggaga	ccagtagtga	ccgcccacat	cgagggccag	3780
cccgctggagg	tgtctgtgaa	caccggcgcc	gacgacagca	tcgtgaccgg	catcgagctg	3840
ggacccccact	acacccccaa	gatcgtgggc	ggcatcggcg	gcttcatcaa	cacaaaggag	3900
tacaagaacg	tggagatcga	ggtgctgggc	aagaggatca	agggcaccat	catgaccggc	3960
gacacccccca	tcaacatctt	cggcaggaac	ctgctgaccg	ccctgggcat	gagcctgaac	4020
ttccccatcg	ccaaggtgga	gcccgtgaag	gtggccctga	agccccggca	ggacggcccc	4080
aagctgaagc	agtggcctct	gagcaaggag	aagatcgtgg	ccctgaggga	aatctgcgag	4140
aagatggaga	aggacggcca	gctggaggag	gcccctcca	ccaaccccta	caacaccccc	4200
accttcgcca	tcaagaagaa	ggacaagaac	aagtggagga	tgctgatcga	cttcagggag	4260
ctgaacaggg	tgacacagga	cttcaccgag	gtgcagctgg	gcacccctca	ccccgccggc	4320
ctggccaaga	aggagaaggg	cggcctggag	ggcatctact	acagcgccag	gaggcacagg	4380
atcctggaca	tgtacctgga	gaaggaggag	ggcatcatcc	ccgactggca	ggactacacc	4440
agcggccccg	gcatcagata	ccccaaagacc	ttcggtggc	tgtggaagct	ggtgcccgctg	4500
aacgtgagcg	acgaggccca	ggaggacgag	aggcactacc	tgatgcagcc	cgcccagacc	4560
agcaagtggg	acgacccctg	gggcgagggtg	ctggcctgga	agtttgaccc	cacctggcc	4620
tacacctacg	aggcctacgc	cagatacccc	gaggagctgg	aggccagcca	ggcctgccag	4680
aggaagaggc	tggaggaggg	catgggcggc	gccatcagca	tgaggaggag	caagcccgc	4740
ggcgacctga	ggcagaagct	gctgaggggc	aggggcgaga	cctacggcag	gctgctgggc	4800
gaggtggagg	acggcagcag	ccagagcctg	ggcggcctgg	gcaagggcct	gagcagcagg	4860
agctgcgagg	gccagaagta	caaccagggc	cagtacatga	acacccccctg	gaggaacccc	4920
gccgaggaga	aggagaagct	ggcctacagg	aagcagaaca	tggacgacat	cgacgaggag	4980
gacgacgacc	tgggtggcgt	gagcgtgagg	cccaaggtgc	ccctgagggg	catgacctac	5040
aagctggcga	tcgacatgag	ccacttcatc	ctgaacagca	tcggcttcag	cacccccgag	5100
gagaagttcc	agaaggaccc	tcccttccag	tggatgggct	acgagctgtg	gcccaccaag	5160
tggaagctcc	agaagatcga	gctgccccag	agggagacct	ggaccgtgaa	cgacatccag	5220
aagctggtgg	gcgtgctgaa	ctgggcccgc	cagatttacc	ccggcatcaa	gaccaagcac	5280
ctgtgcagcg	tgtacctcgg	caagatgaca	ctgaccgagg	aggtgcagtg	gaccgagatg	5340
gccgaggccg	agtacgagga	gaacaagatc	attctgagcc	aggagcagga	gggctgtac	5400
taccaggagg	gcaagccccct	ggaggccacc	gtgatcaaga	gccaggacaa	ccagtggagc	5460
tacaagatcc	accaggaggga	caagatcctg	aaggtgggca	agttcgccaa	gatcaagaac	5520
acccacacca	acggcgtgag	gctgctggcc	cacgtgatcc	agaagatcgg	caaggaggcc	5580
atcgtgatct	ggggccagggt	gcccaggttc	cacctgcccc	tggagaagga	cgtgtgggag	5640
cagtgggtgga	ccgactactg	gcaggtgaca	tggatccccg	agtgggactt	catcagcacc	5700
cctcctctgg	tgaggctggg	gttcaatctg	gtgaaggacc	ccatcgaggg	cgaggagacc	5760

# ES 2 392 670 T3

tactacaccg	acggcagctg	caacaagcag	agcaaggagg	gcaaggccgg	ctacatcacc	5820
gacaggggca	aggacaaggt	gaaggtgctg	gagcagacca	ccaaccagca	ggccgagctg	5880
gaggccttcc	tgatggccct	gaccgacagc	ggccccaagg	ccaacatcat	cgtggacagc	5940
cagtatgtga	tgggcatcat	caccggctgc	cccaccgaga	gcgagagcag	gctggtgaac	6000
cagatcatcg	aggagatgat	taagaagagc	gagattttacg	tggcctgggt	gcccgccac	6060
aagggcatcg	gcggaacca	ggagatcgac	cacctggtga	gccagggcat	caggcaggtg	6120
ctgaggaaga	ggatcaccgt	gctggacatc	ggcgacgcct	acttcagcat	ccctctggac	6180
gaggagttca	ggcagtacac	cgccttcacc	ctgcccagcg	tgaacaacgc	cgagcccggc	6240
aagaggtaca	tctacaaggt	gctgccccag	ggctggaagg	gcagccccgc	catcttccag	6300
tacaccatga	ggcacgtgct	ggagcccttc	aggaaggcca	accccagcgt	gaccctggtg	6360
cagtacatgg	acgacatcct	gatcgctcc	gacaggaccg	acctggagca	cgacagggtg	6420
gtgctccaga	gcaaggagct	gtagctcgag	ggggatccac	tagttctaga	gcggccgccc	6480
taattaacta	atattatatt	ttttatctaa	aaaactaaaa	ataaacattg	attaaatttt	6540
aatataatac	ttaaaaaatg	atgttggtgc	gttagataaa	ccgtttatgt	attttgagga	6600
aattgataat	gagttagatt	acgaaccaga	aagtgcaa	gaggtcgcaa	aaaaactgcc	6660
gtatcaagga	cagttaaaac	tattactagg	agaattat	tttcttagta	agttacagcg	6720
acacggtata	ttagatggtg	ccaccgtagt	gtatatagga	tcggctcctg	gtacacatat	6780
acgttatttg	agagatcatt	tctataat	aggaatgatt	atcaaatgga	tgctaattga	6840
cggacgccat	catgaccta	ttctaaatg	attgctgat	gtgactctag	tgactcggtt	6900
cgttgatgag	gaatatctac	gatccatcaa	aaaacaactg	catccttcta	agattatttt	6960
aatttctgat	gtaagatcca	aacgaggagg	aaatgaacct	agtacggcgg	atttactaag	7020
taattacgct	ctacaaaatg	tcatgattag	tattttaaac	cccgtggcat	ctagtcttaa	7080
atggagatgc	ccgtttccag	atcaatggat	caaggacttt	tatatccac	acggtataa	7140
aatgttacaa	ccttttgctc	cttcataattc	aggggaattc			7180

<210> 25

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> E/L

<400> 25

tatttttttt ttttgggaata taaatag

27

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector recombinante derivado del virus MVA capaz de expresar simultáneamente una forma de la proteína Env del VIH-1 que carece de la parte correspondiente a la proteína gp41 en su totalidad y una proteína de fusión que contiene secuencias de las proteínas Gag, Pol y Nef del VIH-1, estando la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env y la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef bajo el control de promotores idénticos e insertadas ambas secuencias en el mismo lugar de inserción del vector, el locus de timidina quinasa, de manera que el vector recombinante carece del gen de la timidina quinasa.
- 10 2. Un vector recombinante derivado del virus MVA según la reivindicación 1, en el que tanto la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env como las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef se generan a partir de las secuencias de proteínas Env, Gag, Pol y Nef de aislados naturales.
- 15 3. Un vector recombinante derivado del virus MVA según la reivindicación 2, en el que la secuencia de nucleótidos de la proteína Env se ha generado realizando modificaciones en la secuencia correspondiente, destinadas a eliminar la expresión de la proteína gp41, mediante delección de toda la secuencia del gen env que en la secuencia natural de dicho gen aparece tras el último triplete correspondiente a la proteína gp120.
- 20 4. Un vector recombinante derivado del virus MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión Gag-Pol-Nef no se proteoliza por acción de la proteasa del VIH.
- 25 5. Un vector recombinante derivado del virus MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los promotores que controlan las secuencias de la proteína Env y la proteína de fusión Gag-Pol-Nef son promotores idénticos que permiten la expresión de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef y de la proteína Env carente de la parte correspondiente a la proteína gp41 en su totalidad tanto en etapas tempranas como tardías del ciclo infectivo del virus MVA.
- 30 6. Un vector recombinante derivado del virus MVA según la reivindicación 5, en el que los promotores que controlan la secuencia de la proteína Env y la secuencia de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef son promotores sintéticos pE/L.
- 35 7. Un vector recombinante según las reivindicaciones 1 a 6, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env se ha generado eliminando toda la secuencia del gen env que en la secuencia natural de dicho gen aparece tras el último triplete de la proteína gp120, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión Gag-Pol-Nef da lugar a una poliproteína que no se proteoliza por acción de la proteasa del VIH y los promotores que controlan las secuencias correspondientes a la proteína Env y la proteína Gag-Pol-Nef son promotores sintéticos pE/L.
- 40 8. Un vector recombinante según la reivindicación 7, en el que tanto la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env como las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef han sido obtenidas de aislados naturales del clade B.
- 45 9. Un vector recombinante según la reivindicación 8, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env da lugar a una proteína que reproduce la secuencia de la proteína gp120 del aislado BX08, representada por SEQ ID NO:15.
- 50 10. Un vector recombinante según la reivindicación 8, en el que las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef han sido obtenidas del aislado IIIB, estando la secuencia de nucleótidos de dicha proteína de fusión representada por SEQ ID NO:16.
- 55 11. Un vector recombinante según las reivindicaciones 9 y 10, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env da lugar a una proteína que reproduce la secuencia de la proteína gp120 del aislado BX08 y las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef han sido obtenidas del aislado IIIB, estando representadas dichas secuencias, respectivamente, por SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16.
- 60 12. Un vector recombinante según la reivindicación 7, en el que tanto la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env como las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef han sido obtenidas de aislados naturales del clade C.
- 65 13. Un vector recombinante según la reivindicación 12, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env da lugar a una proteína que reproduce la secuencia de la proteína gp120 del aislado CN54, representada por SEQ ID NO:17.

14. Un vector recombinante según la reivindicación 12, en el que las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef han sido obtenidas del aislado CN54, estando la secuencia de nucleótidos de la proteína de fusión representada por SEQ ID NO:18.

15. Un vector recombinante según las reivindicaciones 13 y 14, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env da lugar a una proteína que reproduce la secuencia de la proteína gp120 del aislado CN54 y las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef se han obtenido también del aislado CN54, estando representadas dichas secuencias, respectivamente, por SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO:18.

16. Una composición que contiene, al menos, un vector recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

17. Una composición que contiene, al menos, un vector recombinante según la reivindicación 16 destinada a ser administrada a un individuo con el propósito de provocar o reforzar una respuesta inmune que ayude a prevenir o a tratar una infección provocada por el virus VIH.

18. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 16 y 17, que contiene al menos un vector recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.

19. Una composición según la reivindicación 18, que contiene, al menos, un vector recombinante según la reivindicación 11.

20. Una composición según la reivindicación 19, destinada a ser administrada a un individuo con el propósito de provocar o reforzar una respuesta inmune que ayuda a prevenir o tratar una infección provocada por el virus VIH como parte de un protocolo de inmunización en el que se administra una primera dosis de vacunación para desencadenar la respuesta inmune y una o más dosis posteriores para reforzar la respuesta inmune inicial.

21. Una composición según la reivindicación 20, destinada a ser administrada como la primera dosis de vacunación con la que se desencadena la respuesta inmune.

22. Una composición según la reivindicación 20, destinada a ser administrada tras la primera dosis de vacunación como una o más de las dosis posteriores de vacunación que tienen el propósito de reforzar la respuesta inmune inicial.

23. Una composición según la reivindicación 20, destinada a ser administrada tanto en la primera dosis de vacunación que tiene el propósito de desencadenar la respuesta inmune como en una o más de las dosis posteriores de vacunación que tienen el propósito de reforzar la respuesta inmune inicial.

24. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 16 y 17, que contiene, al menos, un vector recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15.

25. Una composición según la reivindicación 24, que contiene, al menos, un vector recombinante según la reivindicación 15.

26. Una composición según la reivindicación 25, destinada a ser administrada a un individuo con el propósito de provocar o reforzar una respuesta inmune que ayuda a prevenir o tratar una infección provocada por el virus VIH como parte de un protocolo de inmunización en el que se administra una primera dosis de vacunación para desencadenar la respuesta inmune y una o más dosis posteriores para reforzar la respuesta inmune inicial.

27. Una composición según la reivindicación 26, destinada a ser administrada como la primera dosis de vacunación que tienen el propósito de desencadenar la respuesta inmune.

28. Una composición según la reivindicación 26, destinada a ser administrada como una o más de las dosis posteriores de vacunación que tienen el propósito de reforzar la respuesta inmune inicial.

29. Una composición según la reivindicación 26, destinada a ser administrada tanto como la primera dosis de vacunación con la que se desencadena la respuesta inmune como en una o más de las dosis posteriores de vacunación que tienen el propósito de reforzar la respuesta inmune inicial.

30. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 16 y 17, que contiene al menos un vector recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, y al menos un vector recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15.

31. Una composición según la reivindicación 30, que contiene, al menos un vector recombinante según la reivindicación 11 y al menos un vector recombinante según la reivindicación 15.



32. Una composición según la reivindicación 31, destinada a ser administrada a un individuo con el propósito de provocar o reforzar una respuesta inmune que ayuda a prevenir o tratar una infección provocada por el virus VIH como parte de un protocolo de inmunización en el que se administra una primera dosis de vacunación para desencadenar la respuesta inmune y una o más dosis posteriores para reforzar la respuesta inmune inicial.
33. Una composición según la reivindicación 32, destinada a ser administrada como la primera dosis de vacunación que tiene el propósito de desencadenar la respuesta inmune.
34. Una composición según la reivindicación 32, destinada a ser administrada tras la primera dosis de vacunación como una o más de las dosis posteriores de vacunación que tienen el propósito de reforzar la respuesta inmune inicial.
35. Una composición según la reivindicación 32, destinada a ser administrada tanto en la primera dosis de vacunación cuyo propósito es desencadenar la respuesta inmune como en una o más de las dosis posteriores de vacunación que tienen el propósito de reforzar la respuesta inmune inicial.
36. Uso de un vector recombinante derivado del virus MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la fabricación de un medicamento destinado a ser utilizado como vacuna para ayudar a prevenir o a tratar una infección provocada por el virus VIH.
37. Uso según la reivindicación 36, en el que medicamento está diseñado para ser la única vacuna que se suministre a un individuo para ayudar a prevenir o a tratar una infección provocada por el virus VIH.
38. Uso según la reivindicación 37, en el que el medicamento contiene al menos un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 y/o al menos un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15.
39. Uso según la reivindicación 36, en el que el medicamento está diseñado para ser administrado como al menos una de las dosis que forman parte de un protocolo de inmunización en el que se administra una primera dosis de vacunación para desencadenar la respuesta inmune y una segunda o más dosis posteriores para reforzar la respuesta inmune inicial.
40. Uso según la reivindicación 39, en el que el medicamento está diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la primera dosis de vacunación cuyo propósito es desencadenar la respuesta inmune inicial.
41. Uso según la reivindicación 40, en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la primera dosis de vacunación cuyo propósito es desencadenar la respuesta inmune inicial, contiene al menos un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 y/o al menos un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15.
42. Uso según la reivindicación 41, en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la primera dosis de vacunación -cuyo propósito es desencadenar la respuesta inmune inicial- contiene al menos un vector según la reivindicación 11, y/o al menos un vector según la reivindicación 15, y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial, previamente desencadenada, contiene al menos un vector recombinante derivado del virus NYVAC.
43. Uso según la reivindicación 42, en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la primera dosis de vacunación cuyo propósito es desencadenar la respuesta inmune inicial, contiene al menos un vector según la reivindicación 11, y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial, previamente desencadenada, contiene al menos el vector recombinante NYVAC-B.
44. Uso según la reivindicación 42, en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la primera dosis de vacunación cuyo propósito es desencadenar la respuesta inmune inicial, contiene al menos un vector según la reivindicación 15, y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial, previamente desencadenada, contiene al menos el vector recombinante NYVAC-C.
45. Uso según la reivindicación 41, en el que tanto el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la primera dosis de vacunación -cuyo propósito es desencadenar la respuesta inmune inicial-, como el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores -destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial, previamente desencadenada, contienen al menos un

vector según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, y/o al menos un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15.

46. Uso según la reivindicación 45, en el que tanto el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación que desencadena la respuesta inmune inicial como el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial previamente desencadenada contienen al menos un vector según la reivindicación 12.

47. Uso según la reivindicación 46 en el que tanto el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación –cuyo propósito es desencadenar la respuesta inmune inicial- como el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores –destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial, previamente desencadenada- contienen al menos un vector según la reivindicación 15.

48. Uso según la reivindicación 39, en el que el medicamento está diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores cuyo propósito es reforzar la respuesta inmune inicial, previamente desencadenada.

49. Uso según la reivindicación 48, en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores –cuyo propósito es reforzar la respuesta inmune inicial, previamente desencadenada- contiene al menos un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 y/o al menos un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15.

50. Uso según la reivindicación 49, en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores –cuyo propósito es reforzar la respuesta inmune inicial, previamente desencadenada- contiene al menos un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, y/o al menos un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación –cuyo propósito es desencadenar la respuesta inmune inicial- contiene al menos un vector recombinante derivado del virus NYVAC.

51. Uso según la reivindicación 50, en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores –destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial, previamente desencadenada-, contiene al menos un vector según la reivindicación 11 y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la primera dosis de vacunación –cuyo propósito es desencadenar la respuesta inmune inicial- contiene al menos el vector recombinante NYVAC-B.

52. Uso según la reivindicación 50, en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores –destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial, previamente desencadenada-, contiene al menos un vector según la reivindicación 15, y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la primera dosis de vacunación –cuyo propósito es desencadenar la respuesta inmune inicial- contiene al menos el vector recombinante NYVAC-C.

53. Uso según la reivindicación 49, en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores –destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial, previamente desencadenada- contiene al menos un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, y/o al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la primera dosis de vacunación –cuyo propósito es desencadenar la respuesta inmune inicial- contiene al menos un plásmido recombinante que contiene secuencias codificantes de antígenos del VIH-1.

54. Uso según la reivindicación 53, en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores –destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial, previamente desencadenada- contiene al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, y/o al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la primera dosis de vacunación –cuyo propósito es desencadenar la respuesta inmune inicial- contiene al menos un plásmido recombinante que contiene secuencias codificantes de antígenos del VIH-1 que están presentes también en al menos uno de los vectores según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, o según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 que forman parte o constituyen la segunda dosis y/o dosis posteriores de vacunación.

55. Uso según la reivindicación 54, en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores –destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial, previamente desencadenada- contiene al menos un vector según la reivindicación 11, y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la primera dosis de vacunación –cuyo propósito es desencadenar la respuesta inmune inicial- contiene al menos el plásmido recombinante DNA-B.

56. Uso según la reivindicación 54, en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores -destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial, previamente desencadenada- contiene al menos un vector según la reivindicación 15 y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de, o constituyendo la primera dosis de vacunación -cuyo propósito es desencadenar la respuesta inmune inicial- contiene al menos el plásmido recombinante DNA-C.

57. Un vector recombinante derivado del virus MVA capaz de expresar simultáneamente una forma de la proteína Env del VIH-1 que carece de la parte correspondiente a la proteína gp41 en su totalidad y una proteína de fusión que contiene secuencias de las proteínas Gag, Pol y Nef del virus de la inmunodeficiencia de simio, SIV, en el que las secuencias de nucleótidos de la proteína Env y de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef están controladas por promotores idénticos y en el que ambas secuencias están insertadas en el mismo lugar de inserción del vector, el locus de timidina quinasa, de manera que el vector recombinante carece del gen de la timidina quinasa.

58. Un vector recombinante según la reivindicación 57, en el que tanto la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env como las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef se generan a partir de las secuencias de proteínas Env, Gag, Pol y Nef de virus quiméricos de la inmunodeficiencia de simio y humano, SHIV.

59. Un vector recombinante derivado del virus MVA según la reivindicación 58, en el que la secuencia de nucleótidos de la proteína Env se ha generado realizando modificaciones en la secuencia correspondiente, destinadas a eliminar la expresión de la proteína gp41, mediante delección de toda la secuencia del gen env que en la secuencia natural de dicho gen aparece tras el último triplete correspondiente a la proteína gp120.

60. Un vector recombinante derivado del virus MVA según cualquiera de las reivindicaciones 58 y 59, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión Gag-Pol-Nef no se proteoliza por acción de la proteasa retroviral.

61. Un vector recombinante derivado del virus MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 57 a 60, en el que los promotores que controlan las secuencias de la proteína Env y la proteína de fusión Gag-Pol-Nef son promotores idénticos que permiten la expresión de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef y de la proteína Env carente de la parte correspondiente a la proteína gp41 en su totalidad, tanto en etapas tempranas como tardías del ciclo infectivo del virus MVA.

62. Un vector recombinante derivado del virus MVA según la reivindicación 61, en el que los promotores que controlan las secuencias de la proteína Env y de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef son promotores sintéticos pE/L.

63. Un vector recombinante según las reivindicaciones 57 a 62, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env se ha generado eliminando toda la secuencia del gen env que en la secuencia natural de dicho gen aparece tras el último triplete correspondiente a la proteína gp120, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión Gag-Pol-Nef da lugar a una poliproteína que no se proteoliza por acción de la proteasa del HIV y los promotores bajo cuyo control están las secuencias correspondientes a la proteína Env y a la proteína Gag-Pol-Nef son promotores sintéticos pE/L.

64. Un vector recombinante según la reivindicación 63, en el que tanto la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env como las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef han sido obtenidas del virus quimérico SHIV89.6P.

65. Un vector recombinante según la reivindicación 64, en el que la secuencia de nucleótidos de la proteína Env está representada por SEQ ID NO:22.

66. Un vector recombinante según la reivindicación 64, en el que la secuencia de nucleótidos de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef está representada por SEQ ID NO:23.

67. Un vector recombinante según las reivindicaciones 65 y 66 que comprende un inserto cuya secuencia está representada por SEQ ID NO:24.

68. Una composición que comprende al menos un vector recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 57 a 67.

69. Una composición según la reivindicación 68, que comprende adicionalmente al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

70. Uso de un vector recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 57 a 67, o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 68 o 69, para evaluar la capacidad para conferir

protección frente a la infección por el VIH de un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que presenta la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que el vector según una cualquiera de las reivindicaciones 57 a 67, evaluando tal capacidad para conferir protección sometiendo a un primate no humano a un protocolo de desencadenamiento/refuerzo de la respuesta inmune en el que el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 57 a 67 se administra al primate, inoculando posteriormente al primate un virus capaz de infectarlo y de causar síntomas similares a los del SIDA y evaluando en el primate la capacidad que tiene la respuesta inmune generada para controlar la infección determinando una magnitud seleccionada entre el número de partículas virales presentes en el plasma de muestras de sangre extraídas del primate, el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup> en el total de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), la tasa de supervivencia de los primates infectados o combinaciones de las mismas.

71. Uso según la reivindicación 70, en el que se determina el número de partículas virales presentes en el plasma de las muestras de sangre extraídas del primate no humano determinando el número de copias de ARN viral presentes en el plasma.

72. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 70 ó 71, en el que el primate no humano es un macaco.

73. Uso según la reivindicación 72, en el que el virus capaz de infectar al macaco y de causar síntomas similares a los del SIDA es una forma patógena del virus de la inmunodeficiencia de simio y humana (SHIV).

74. Uso según la reivindicación 73, en el que la forma patógena del virus de la inmunodeficiencia de simio y humana inoculada es el SHIV89.6P.

75. Uso según las reivindicaciones 73 ó 74, en el que el número de copias de ARN viral presentes en el plasma del macacos se determina transcurridos al menos 10 días desde el momento de la inoculación del virus SHIV.

76. Uso según la reivindicación 74, en el que el SHIV89.6P se inyecta por vía intravenosa.

77. Uso según la reivindicación 76, en el que el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 57 a 67 administrado a los macacos previamente a la inoculación del SHIV89.6P es un vector de la reivindicación 67.

78. Uso según la reivindicación 77, en el que el vector según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que presenta la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que el vector de la reivindicación 67 es el vector MVA-B y/o el vector MVA-C.

79. Uso según la reivindicación 78, en el que el vector de la reivindicación 67 se administra a los macacos en una o más dosis de potenciación de la respuesta inmune.

80. Uso según la reivindicación 79, en el que el vector de la reivindicación 67 se administra a los macacos en la tercera dosis de vacunación.

81. Uso según la reivindicación 80, en el que el vector de la reivindicación 67 se administra a los macacos adicionalmente en una cuarta dosis de vacunación.

82. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 80 u 81, en el que el vector de la reivindicación 67 está ausente de la primera y/o de la segunda dosis de vacunación administradas a los macacos.

83. Uso según la reivindicación 82, en el que el vector de la reivindicación 67 está ausente de la primera y/o de la segunda dosis de vacunación administradas a los macacos.

84. Uso según la reivindicación 83, en el que la primera y la segunda dosis de vacunación comprenden un vector de ADN desnudo a partir del cual pueden expresarse en los macacos antígenos del SHIV89.6P

85. Uso según la reivindicación 79, en el que el vector de la reivindicación 67 se administra por vía intramuscular.

86. Uso de un vector recombinante derivado del virus NYVAC que presenta la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que un vector derivado de MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 57 a 67 como control en un procedimiento en el que se evalúa la eficacia como vacuna de un vector derivado del virus MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 mediante el uso del vector según una cualquiera de las reivindicaciones 57 a 67 que presenta la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que el vector derivado de MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

87. Uso según la reivindicación 86, en el que el vector recombinante derivado del virus NYVAC comprende un inserto cuya secuencia está representada por SEQ ID NO:24 y el vector recombinante derivado de MVA que se utiliza en el procedimiento en el que se evalúa la eficacia como vacuna de otro vector recombinante derivado del virus MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 es un vector recombinante de la reivindicación 11.

88. Uso según la reivindicación 87, en el que se evalúa la eficacia como vacuna del vector MVA-B y/o del vector MVA-C.

89. Un plásmido que posee un inserto con la secuencia codificante de una forma de la proteína Env del VIH-1 que carece de la parte correspondiente a la proteína gp41 en su totalidad y la secuencia codificante de una proteína de fusión que contiene secuencias de las proteínas Gag, Pol y Nef del SIV, inserto en el cual la secuencia codificante de la proteína Env y la secuencia codificante de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef están bajo el control de promotores idénticos localizados en direcciones opuestas y en la zona más interna del inserto, caracterizado por que el inserto esté flanqueado, en uno de sus extremos, por una primera secuencia flanqueante del locus de timidina quinasa y, en el otro extremo, por una segunda secuencia flanqueante más corta comprendida en la secuencia que flanquea el extremo opuesto del locus de timidina quinasa, presentando adicionalmente el plásmido una tercera secuencia que corresponde a la secuencia que flanquea el extremo del locus de timidina quinasa opuesto a la primera secuencia flanqueante y que es más larga y que comprende la segunda secuencia flanqueante más corta, y un gen marcador situado entre la segunda secuencia flanqueante más corta y la tercera secuencia.

90. Plásmido según la reivindicación 89, en el que la secuencia codificante de la proteína Env del VIH-1 es la representada por SEQ ID NO:22, la secuencia codificante de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef es la representada por SEQ ID NO:23, los promotores idénticos que controlan dichas secuencias codificantes son promotores sintéticos pE/L y el gen marcador es LAC-Z.

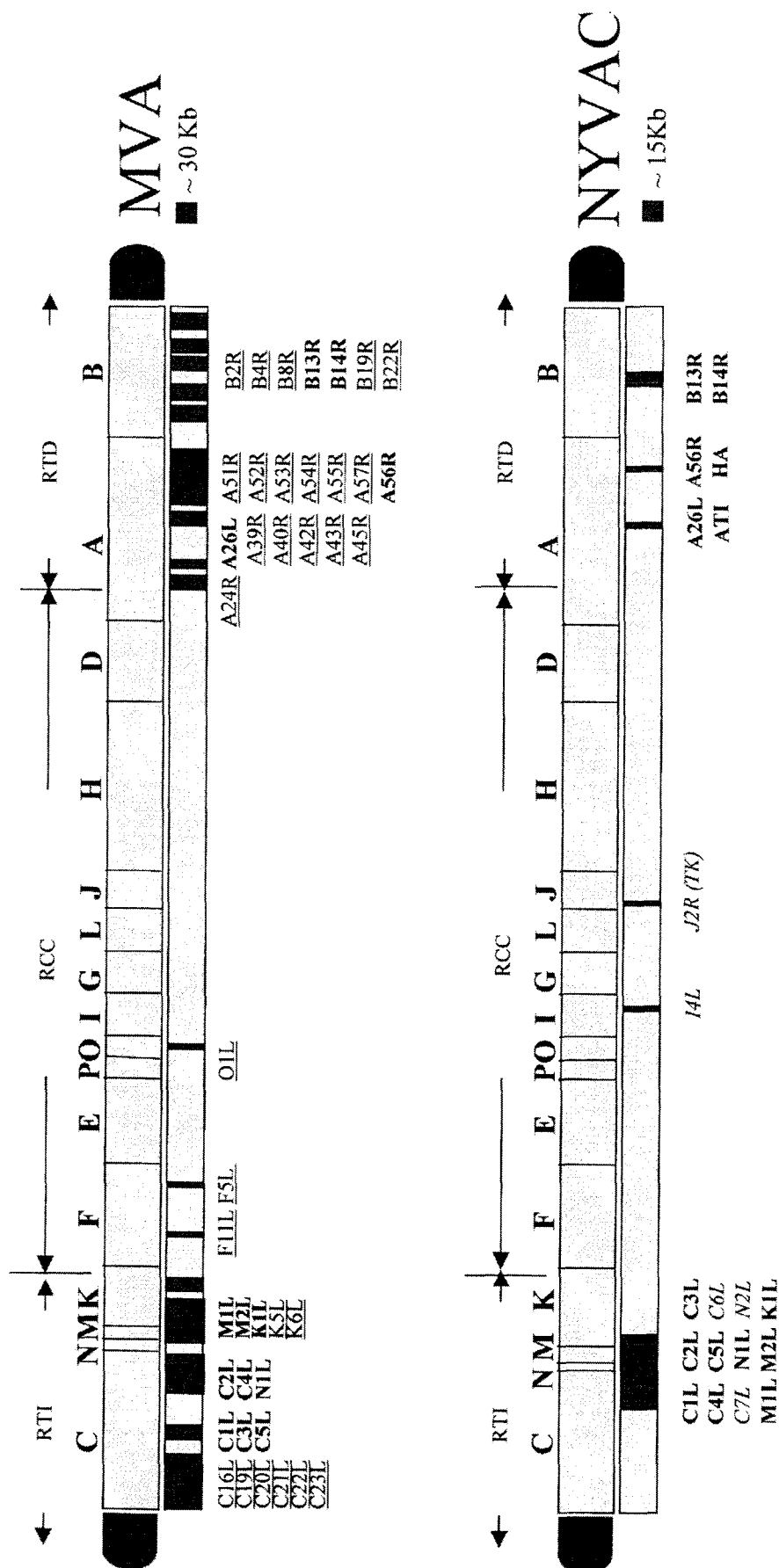


Figura 1

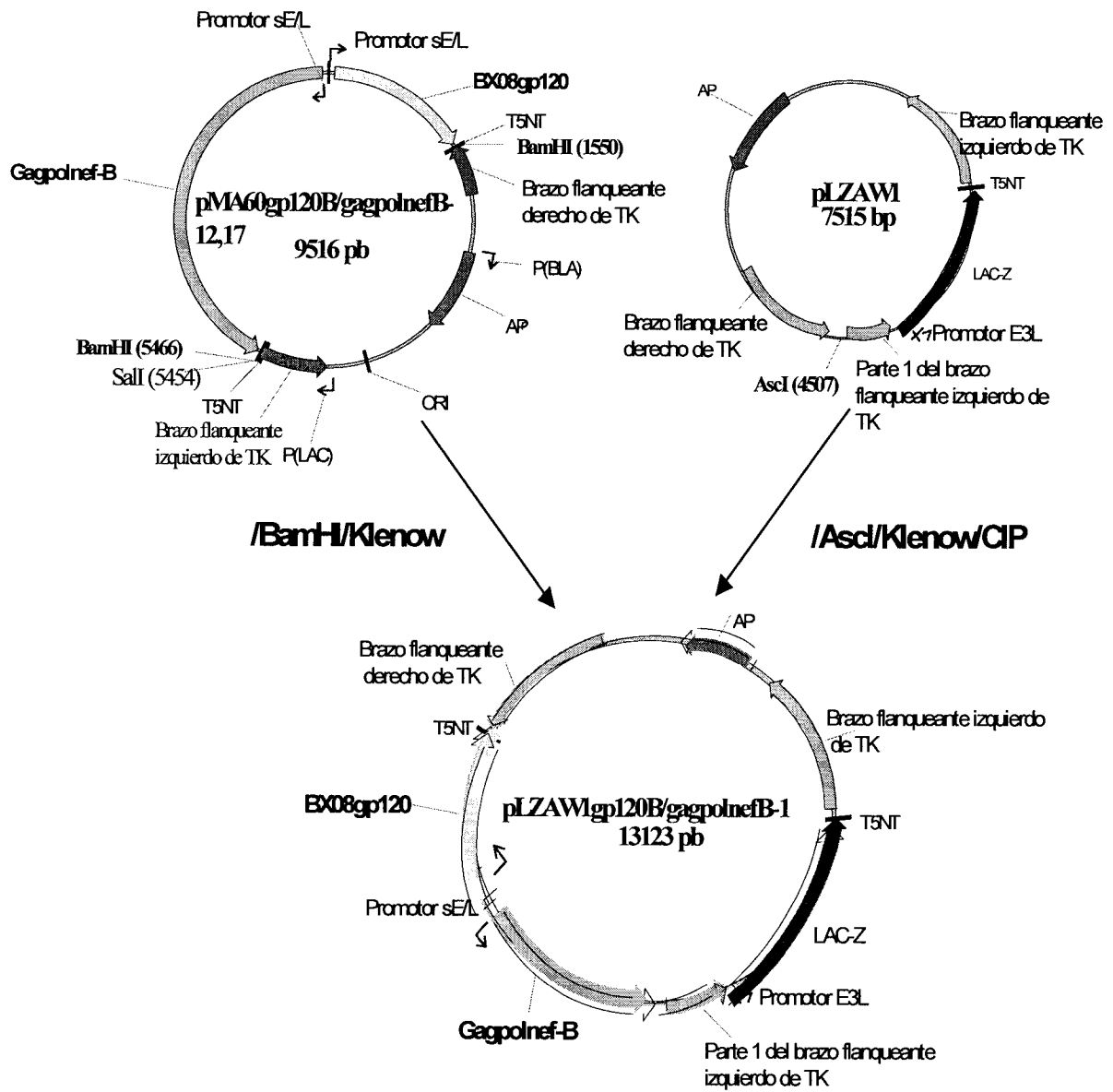


Figura 2

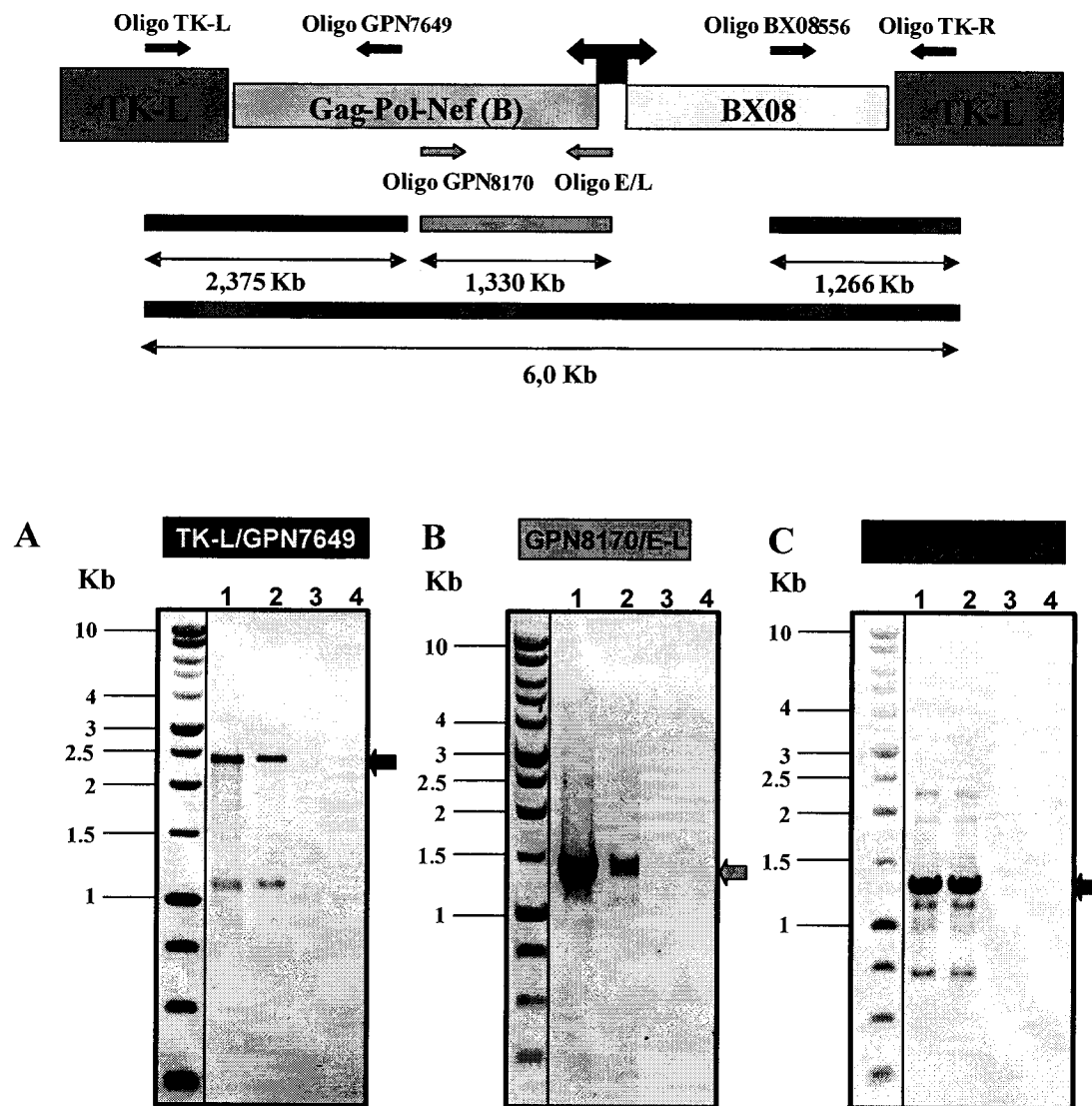
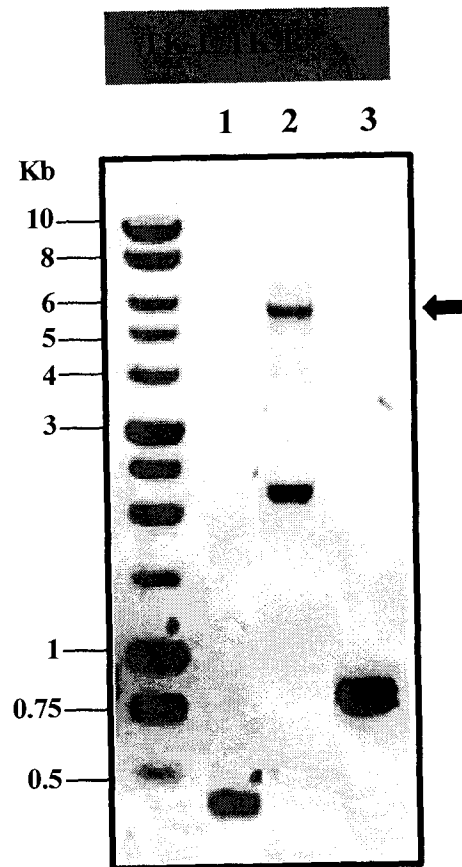


Figura 3





**Figura 4**

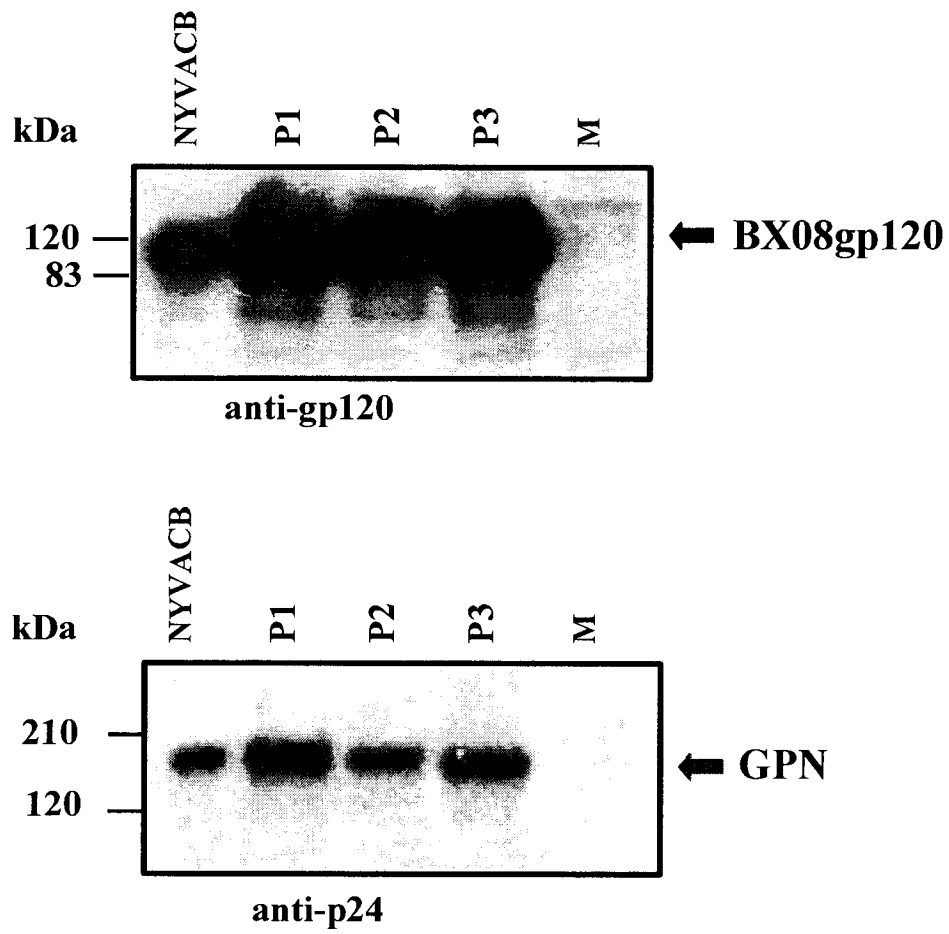
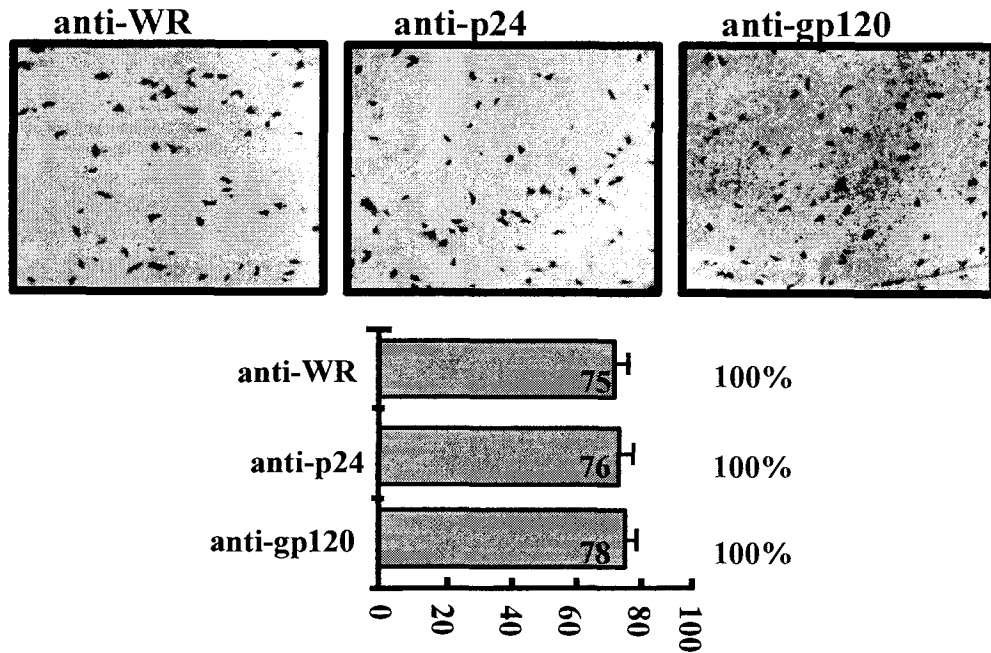
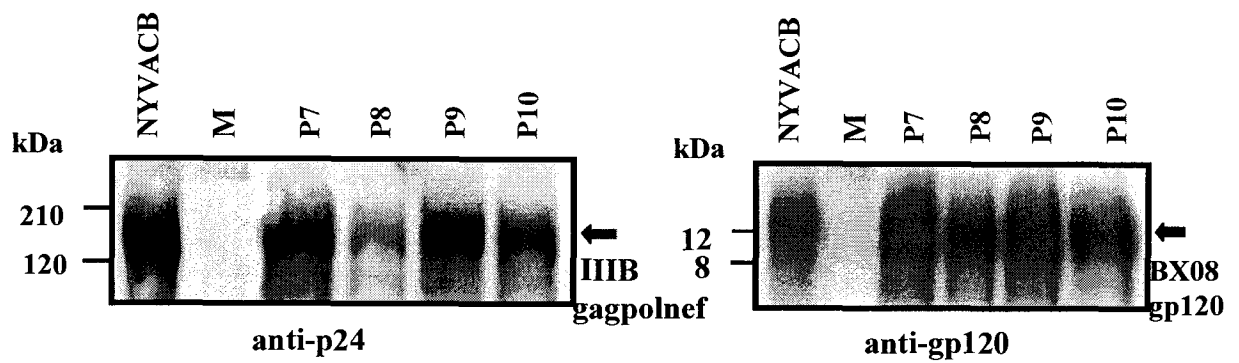


Figura 5

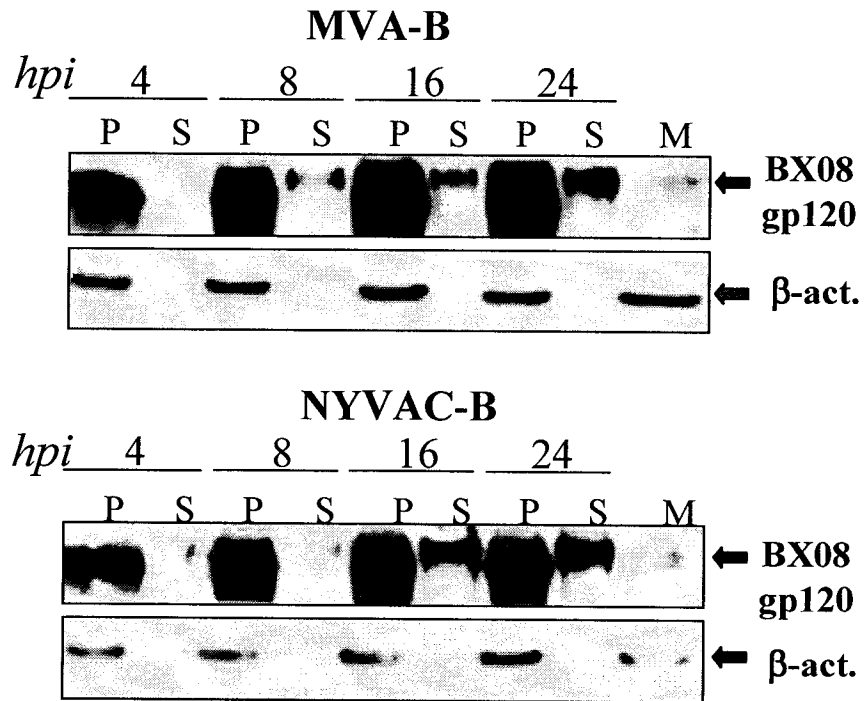
**A**



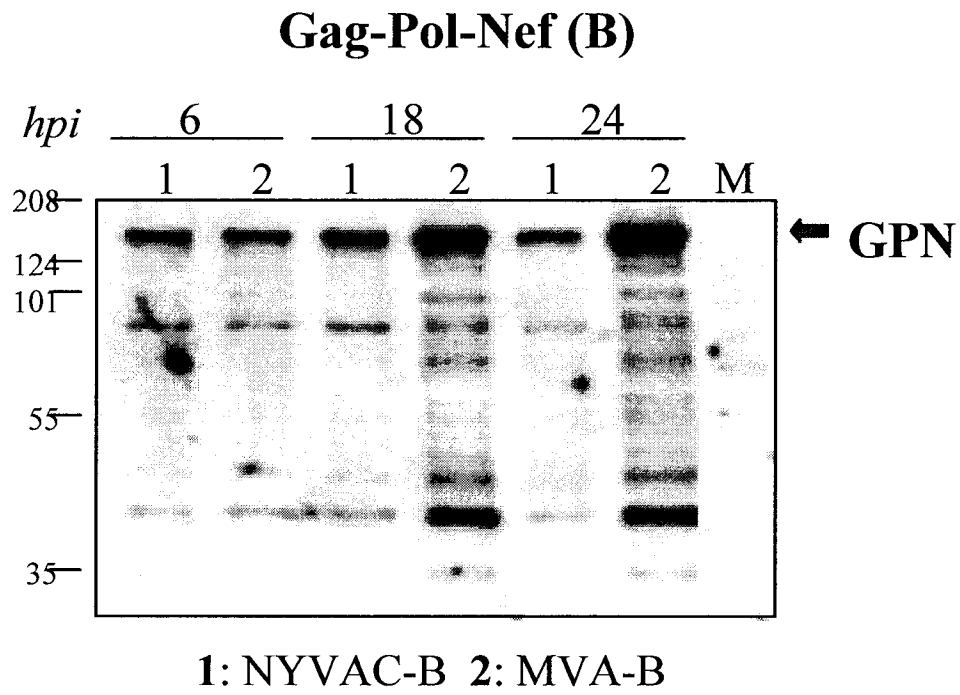
**B**



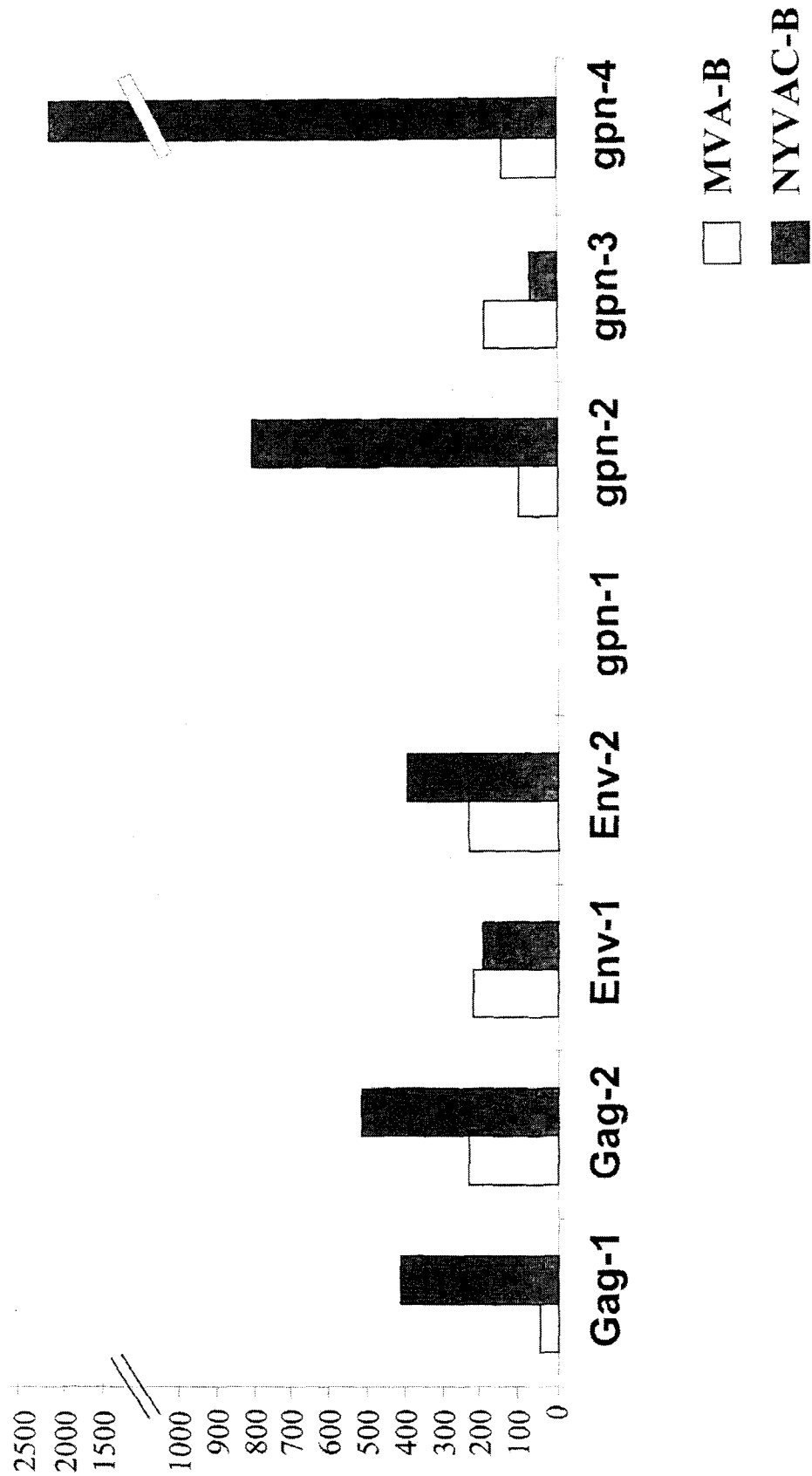
**Figura 6**



**Figura 7**



**Figura 8**



**Figura 9**

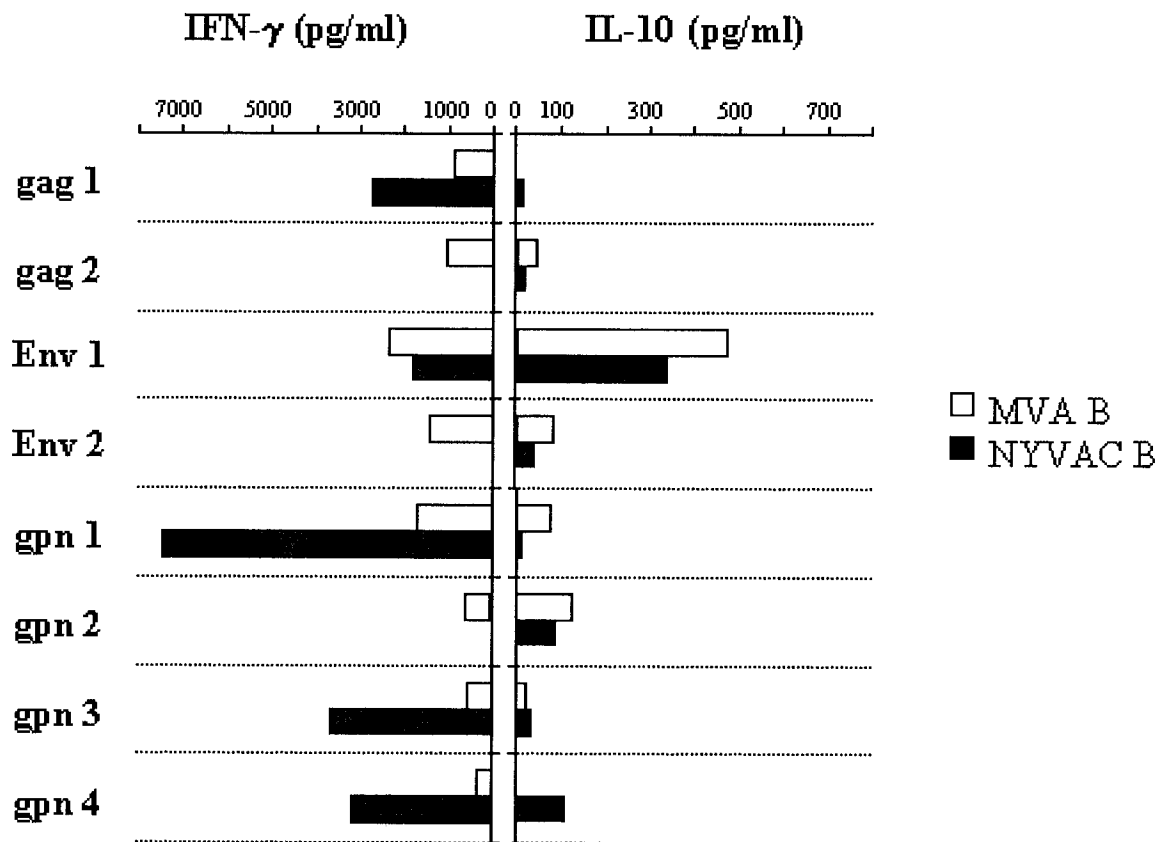
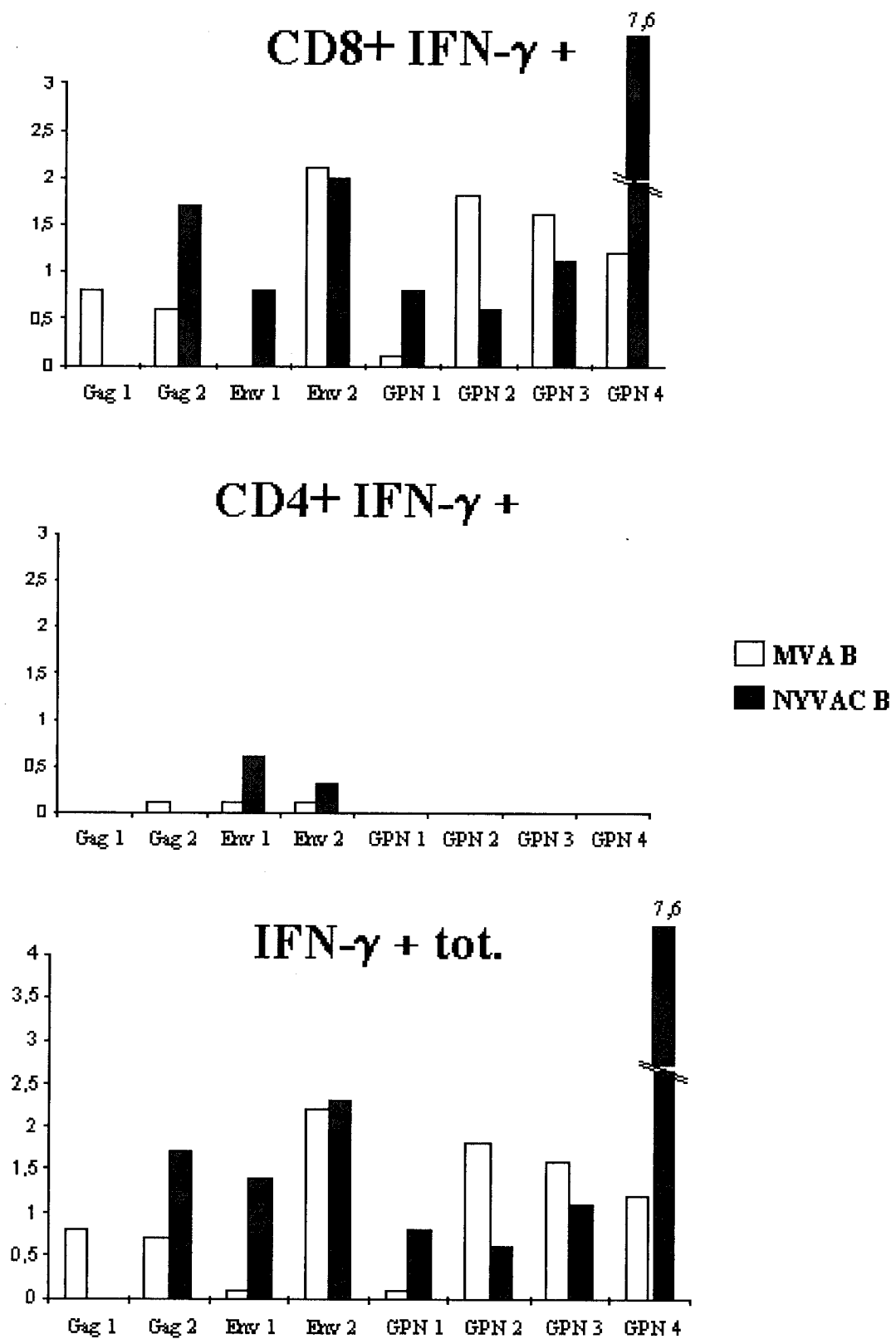


Figura 10



**Figura 11**



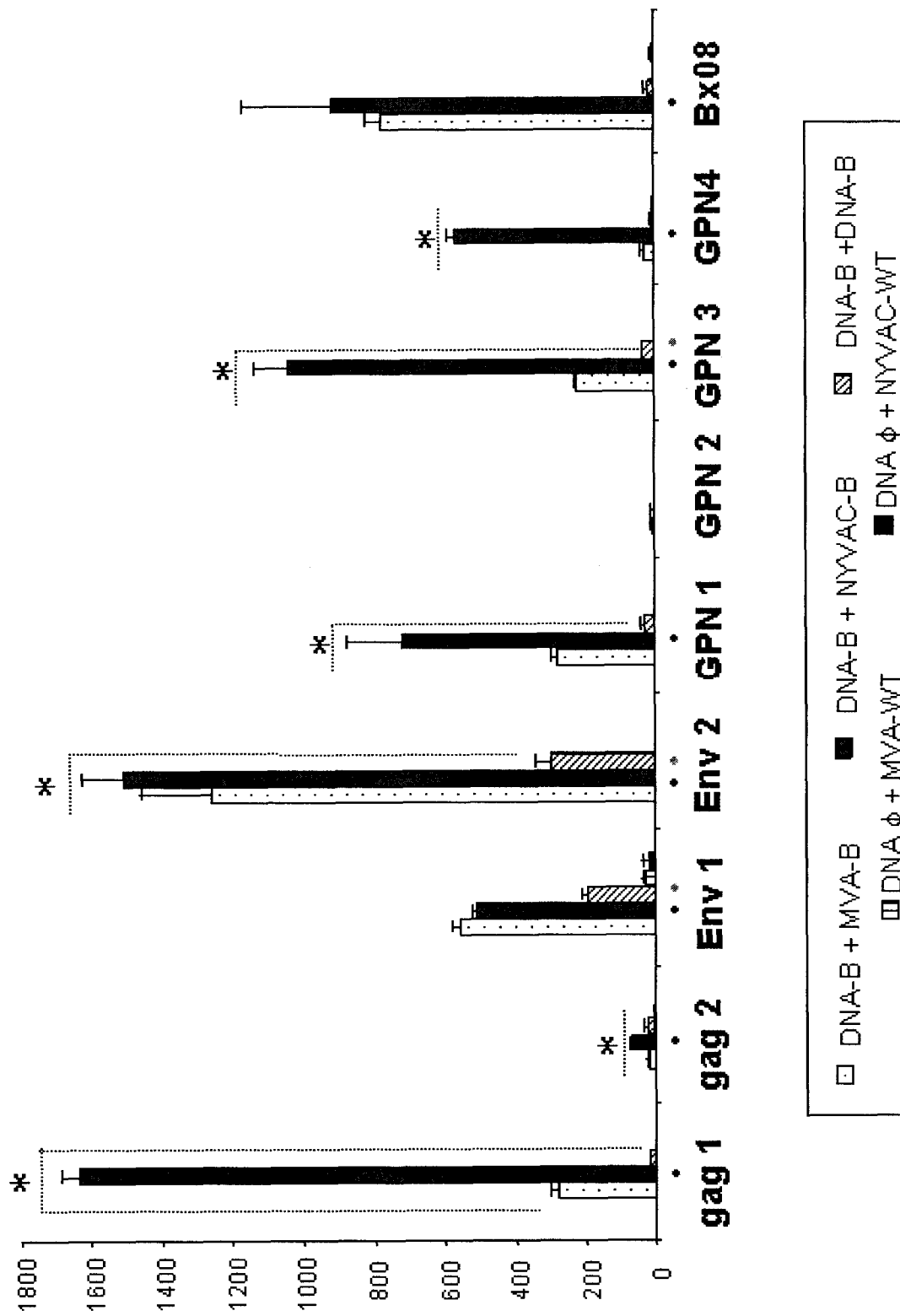


Figura 12

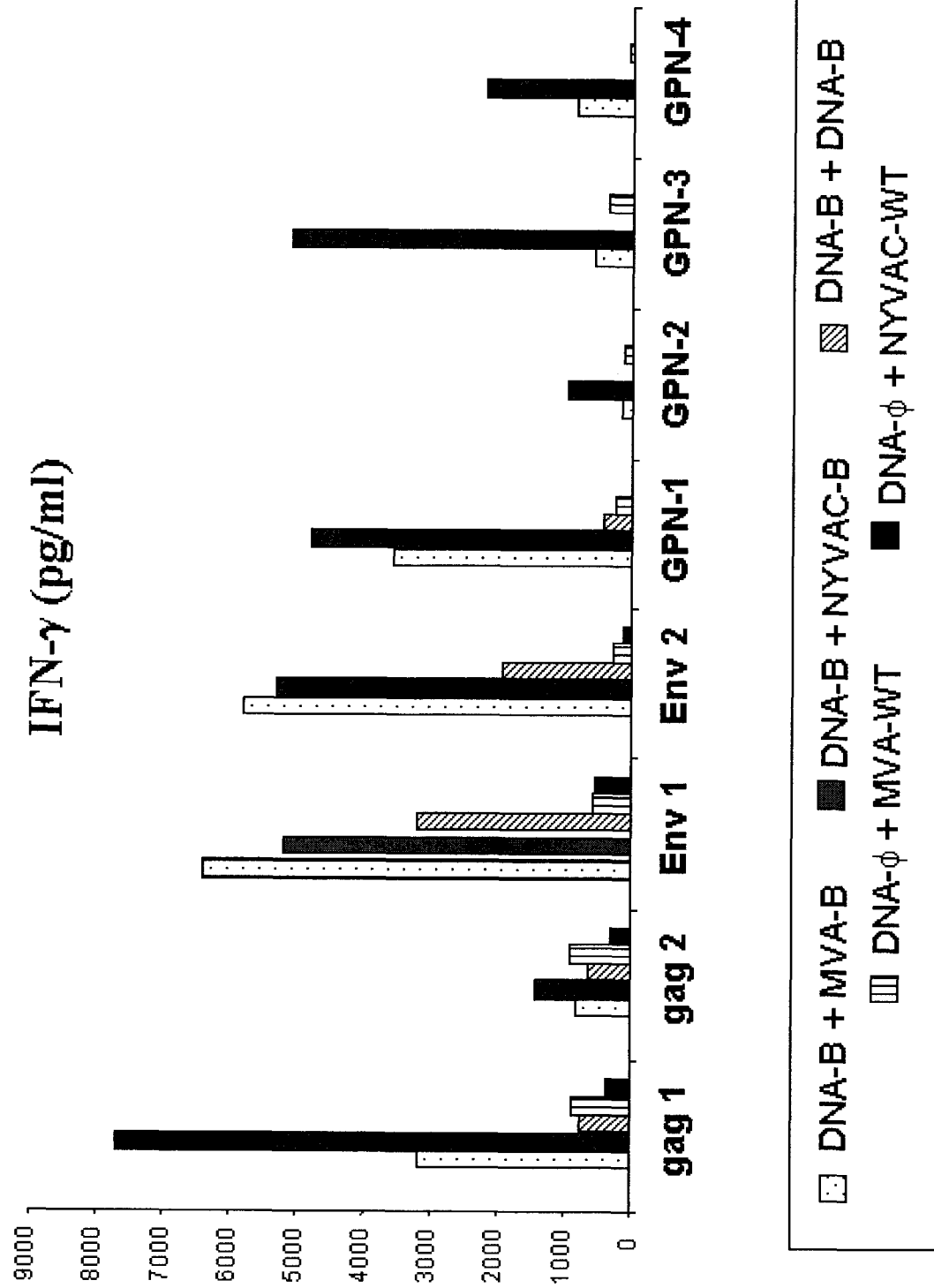
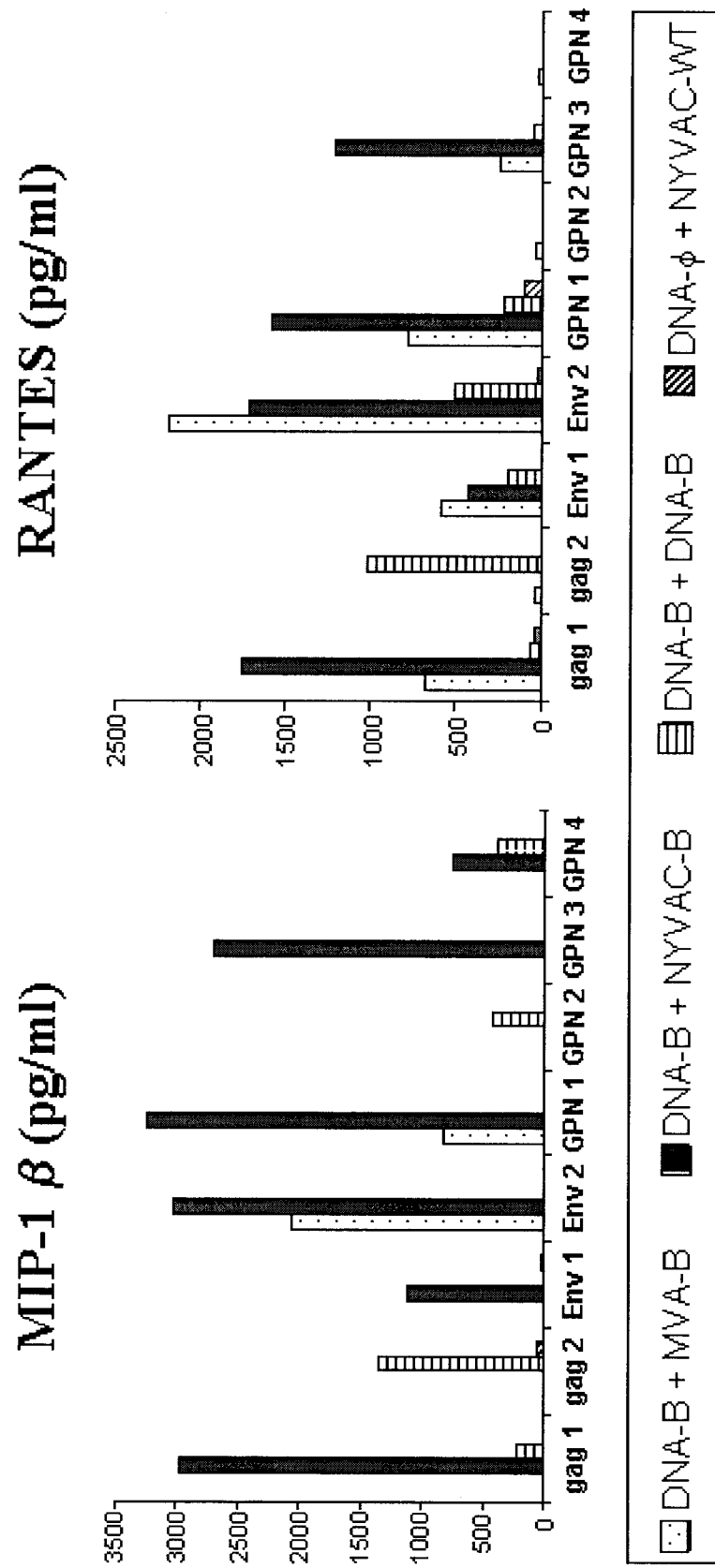


Figura 13



**Figure 14**

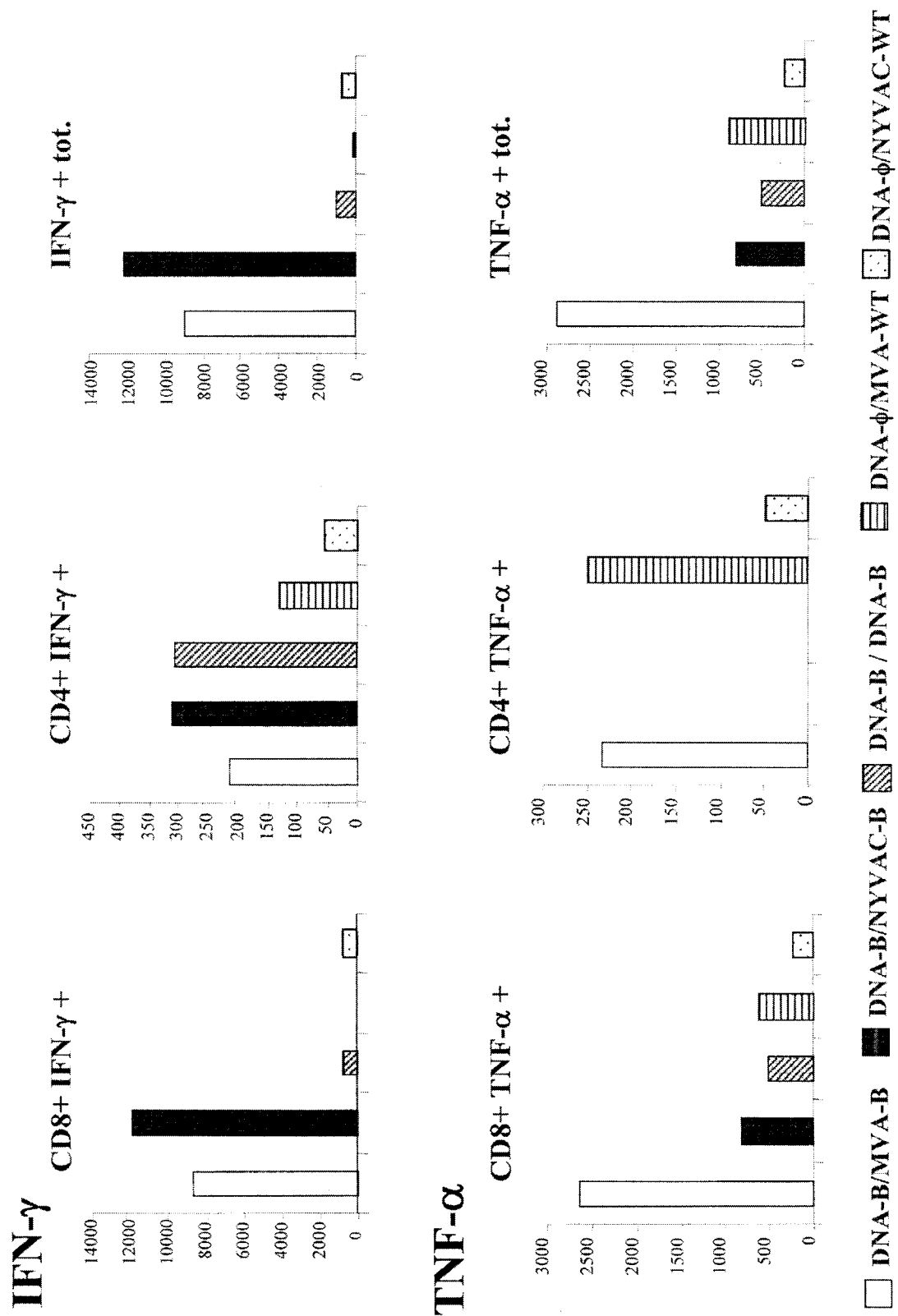


Figure 15

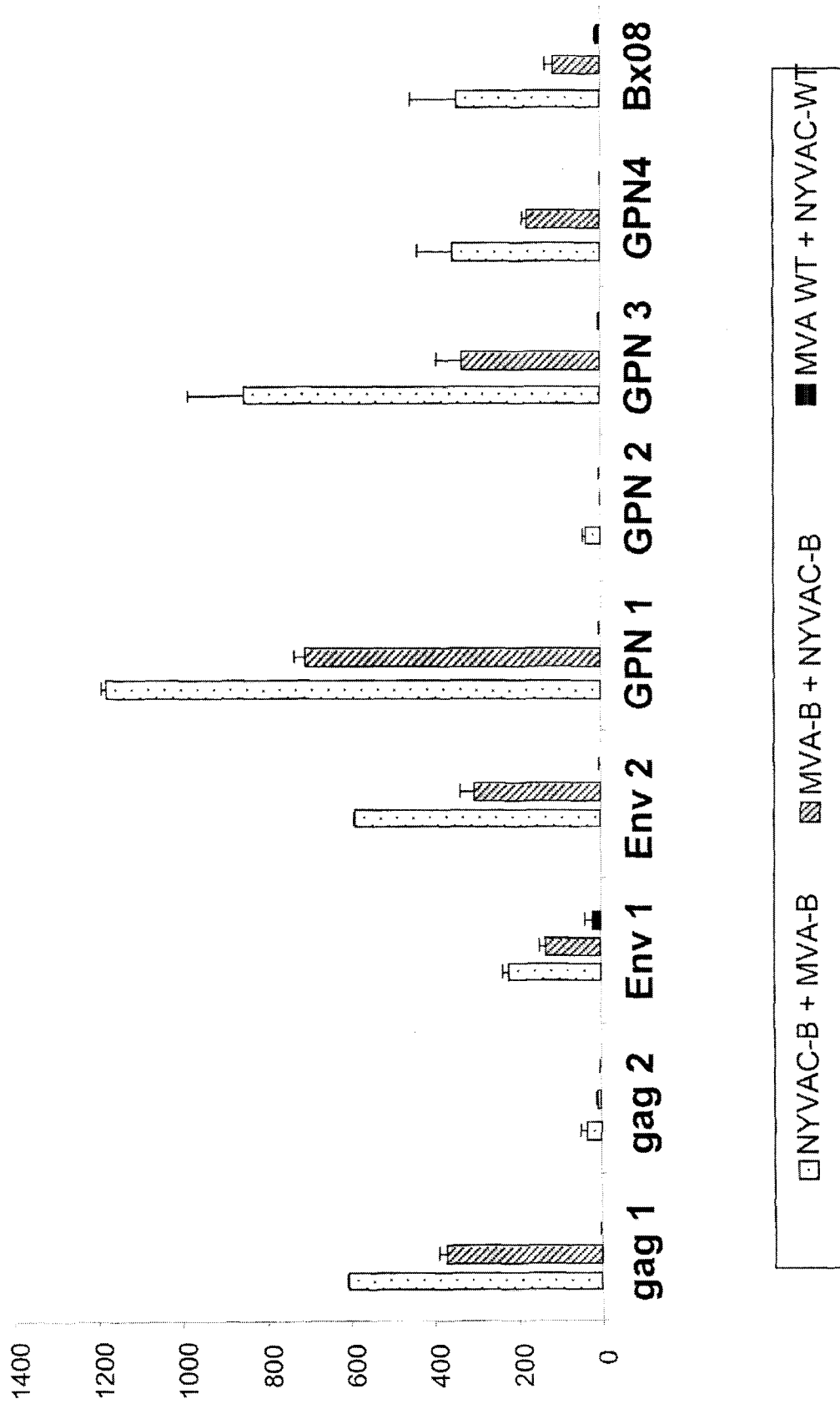
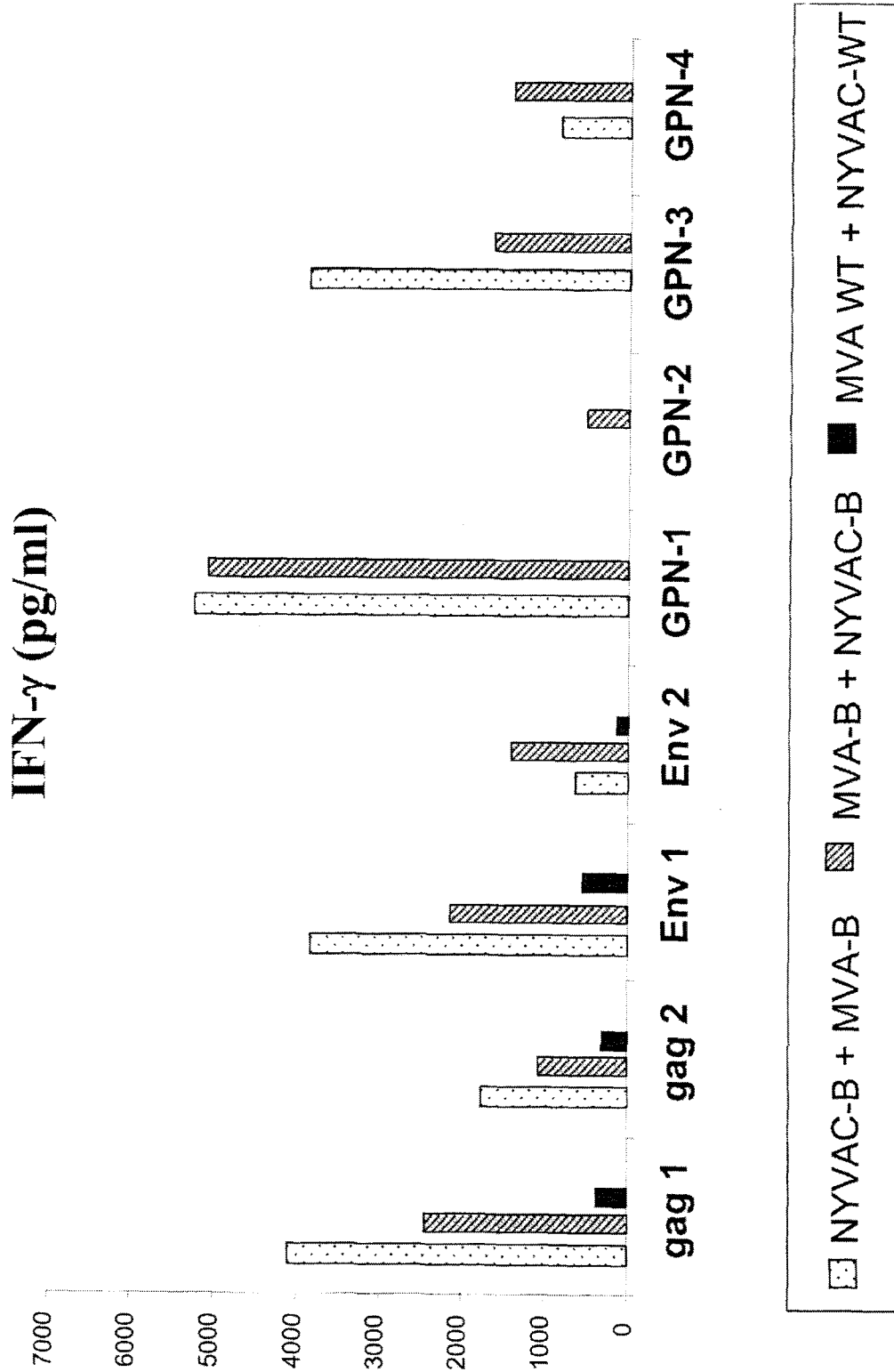


Figura 16



**Figura 17**

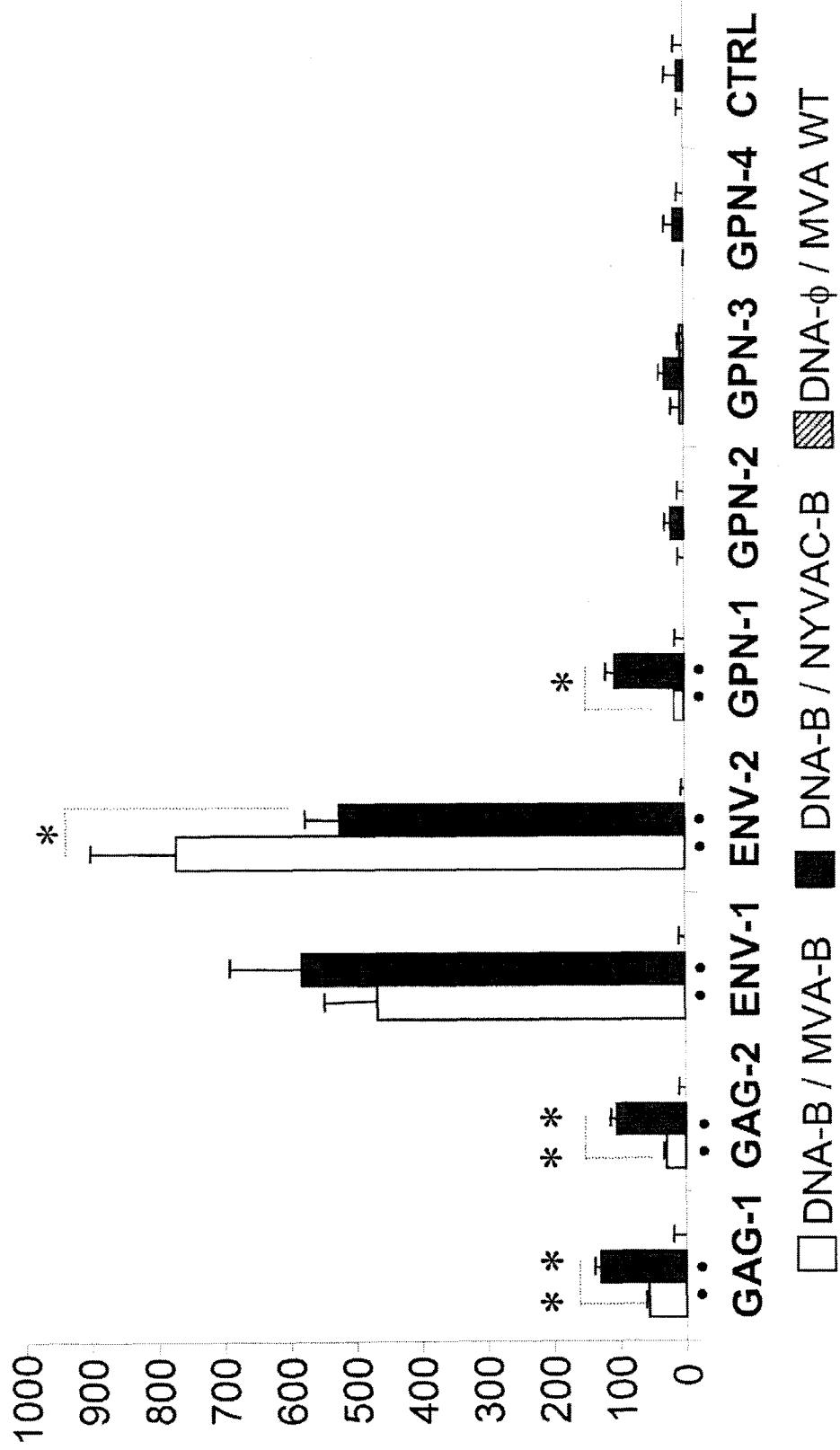


Figura 18

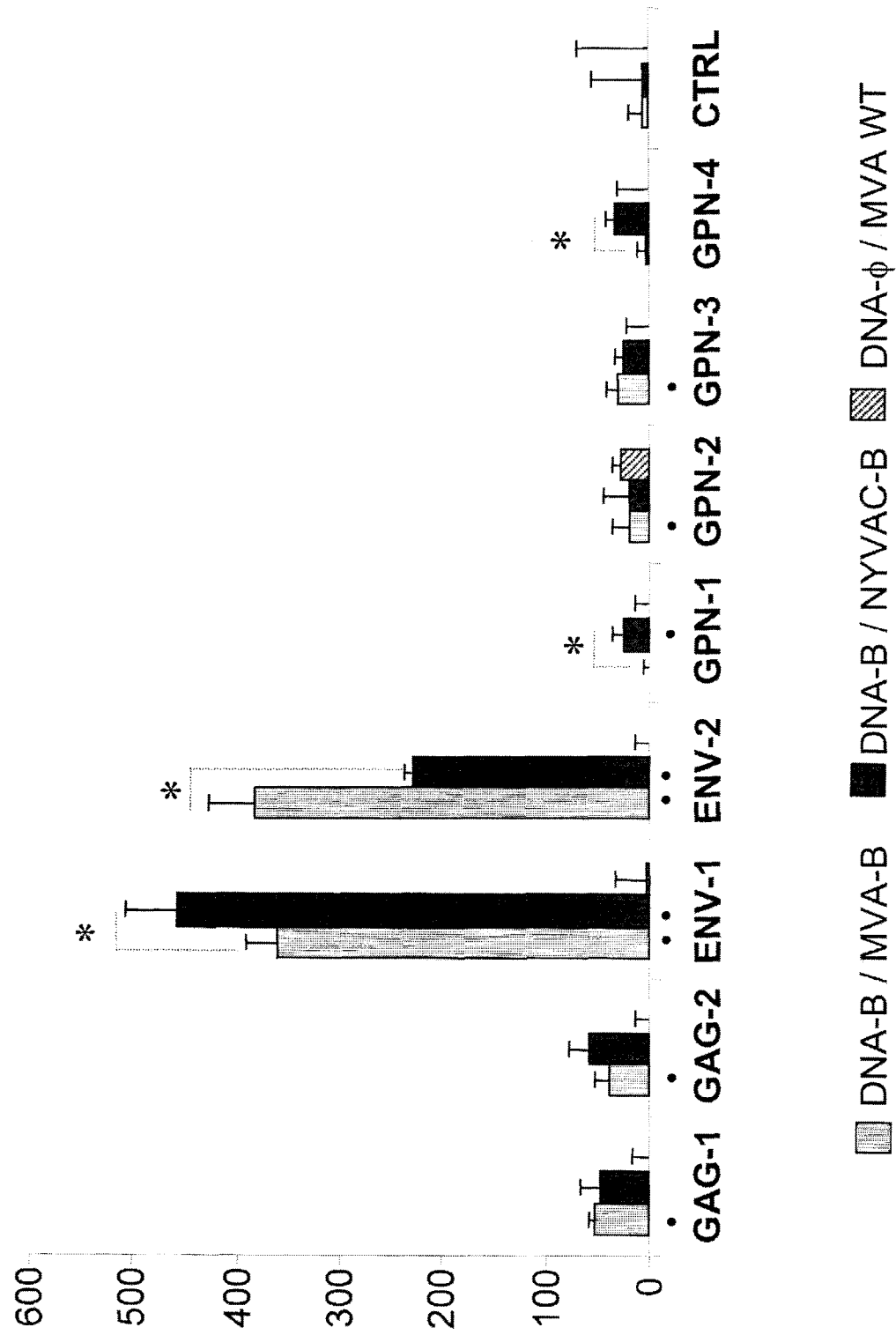


Figura 19



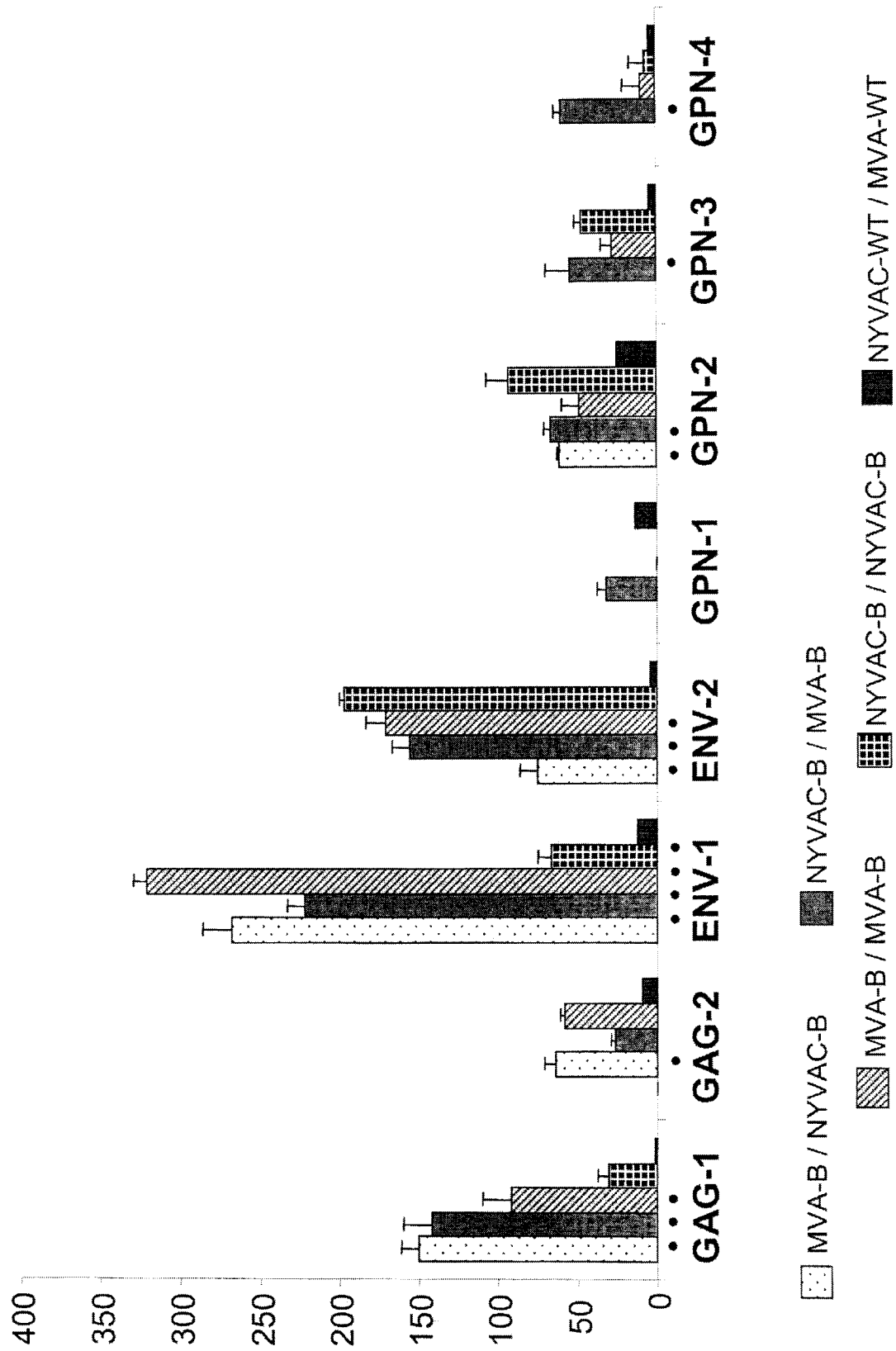


Figura 20

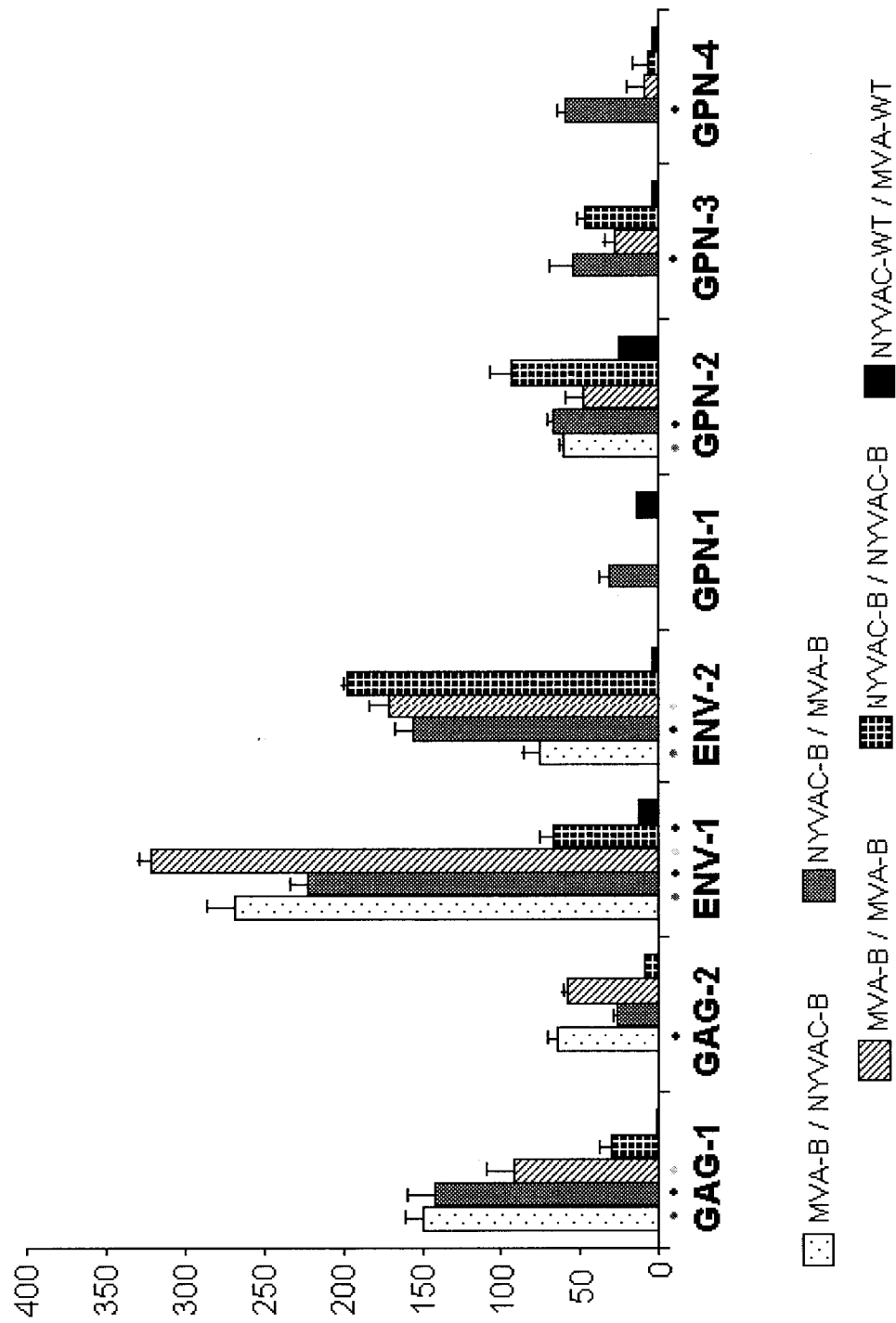
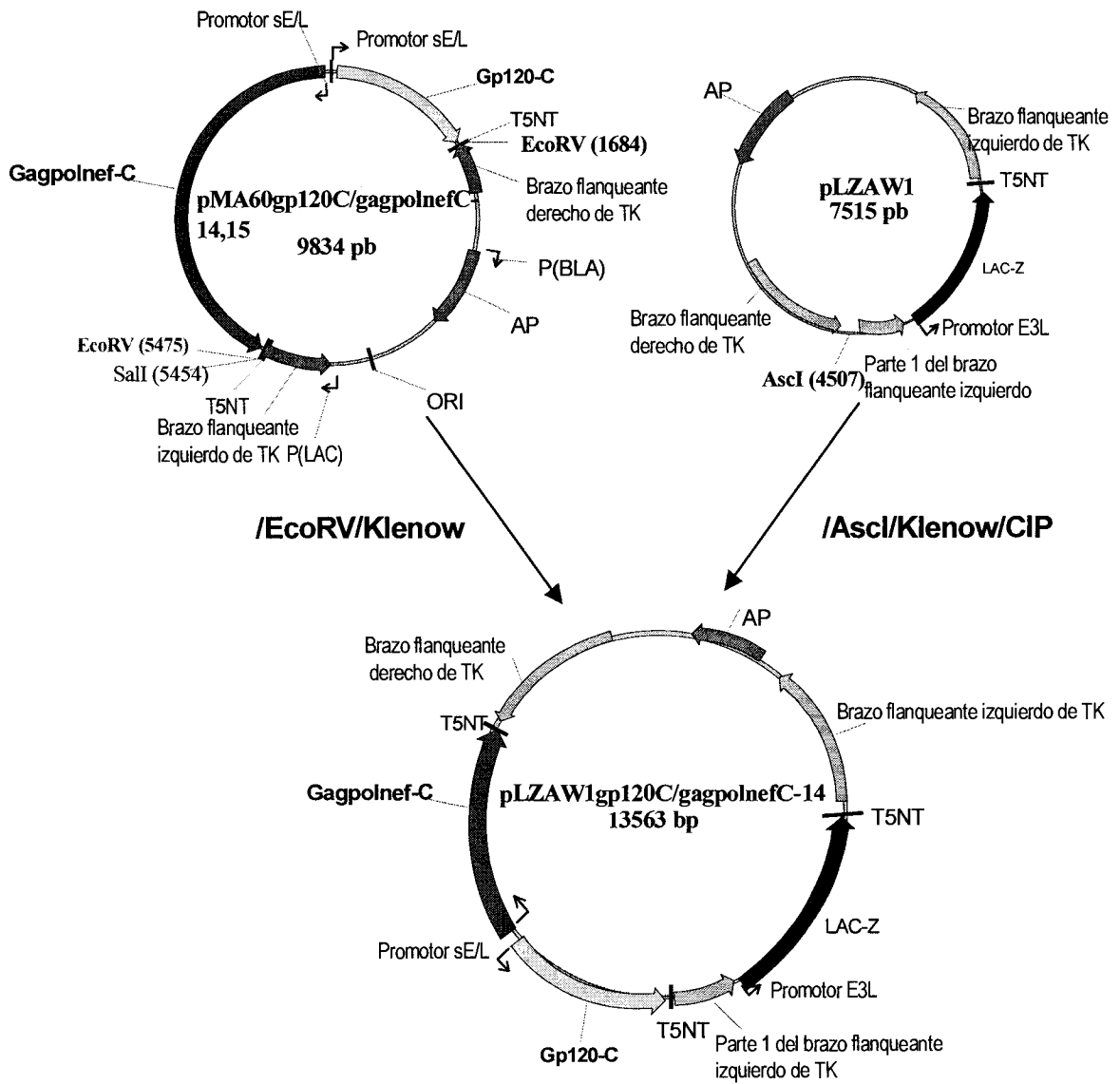


Figure 21



**Figura 22**

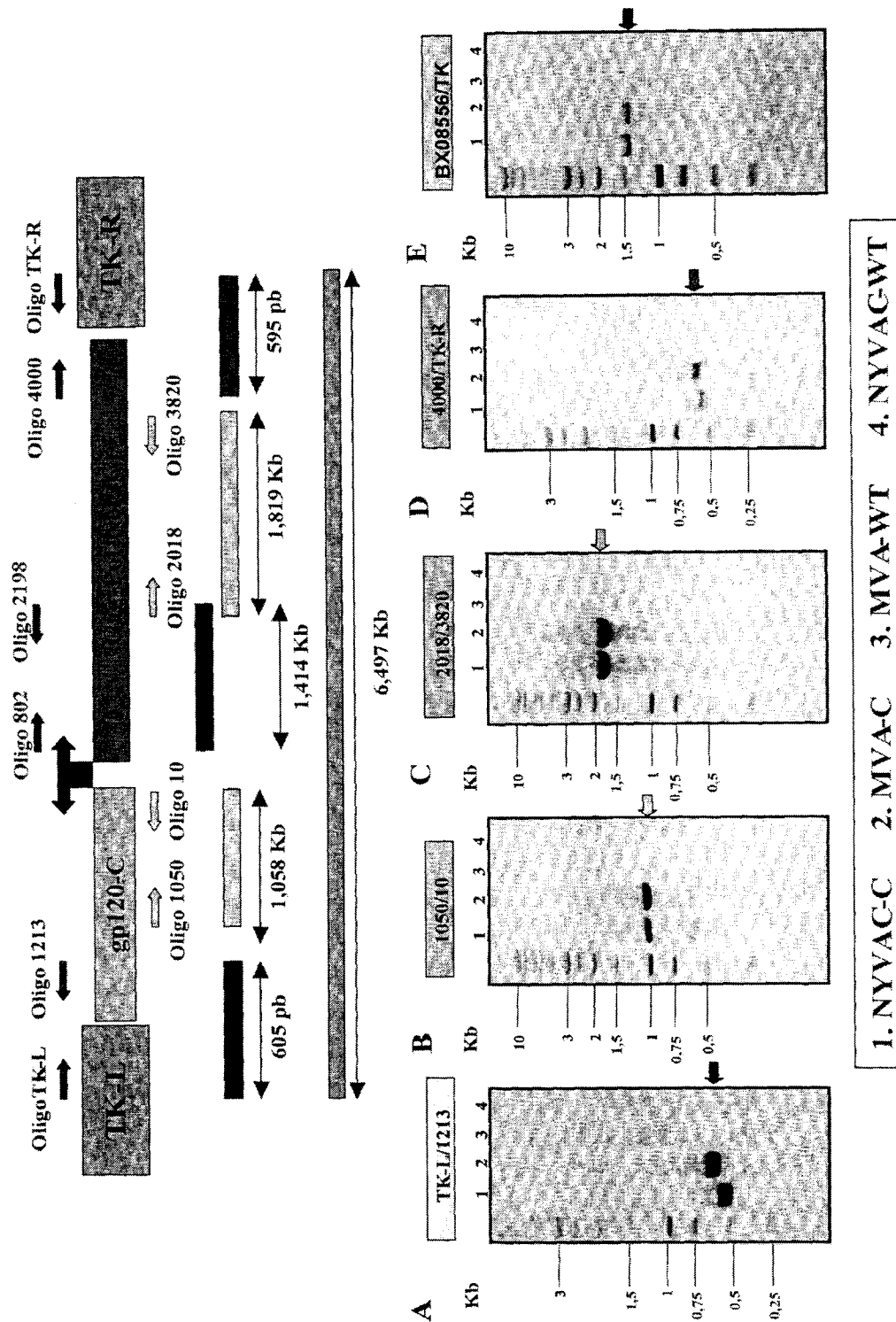


Figura 23

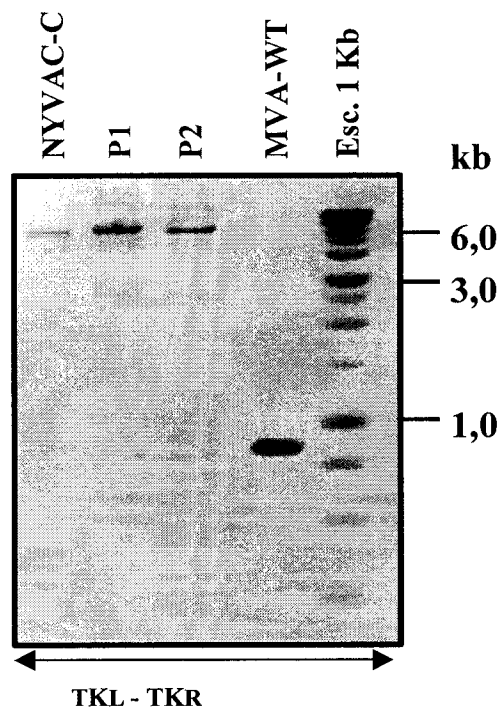
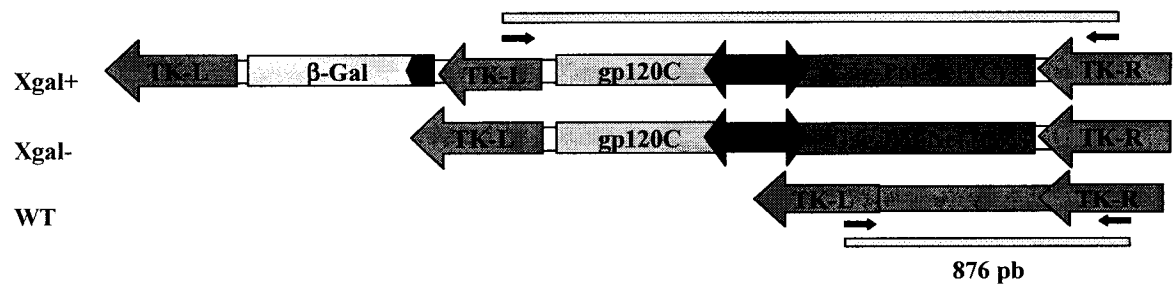
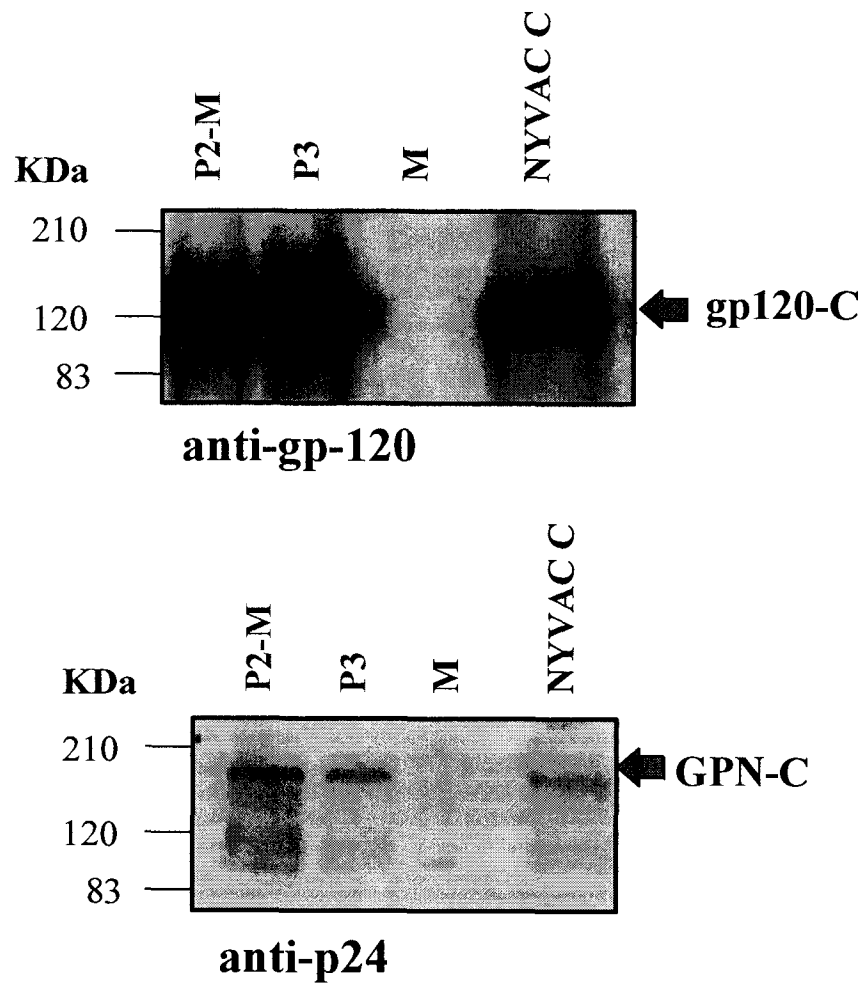
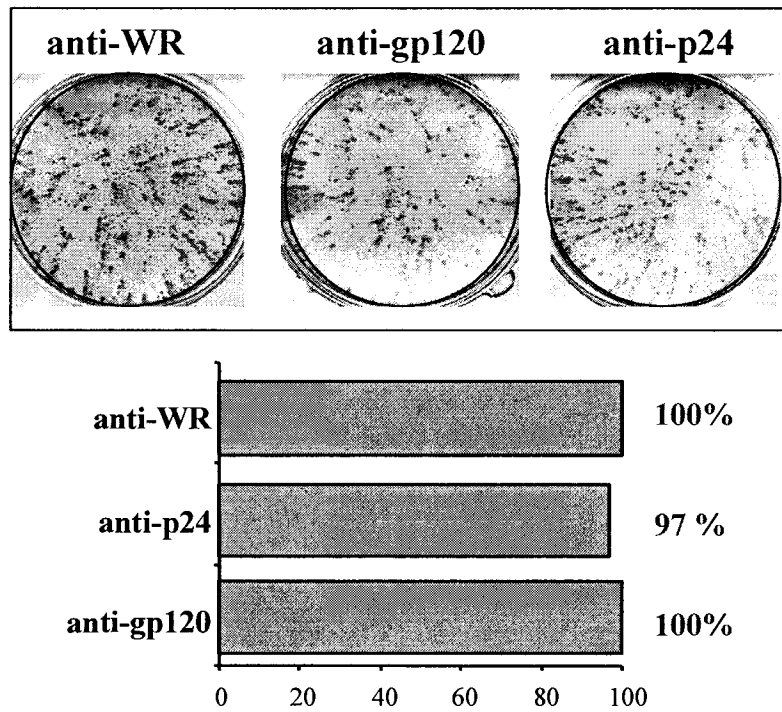


Figura 24

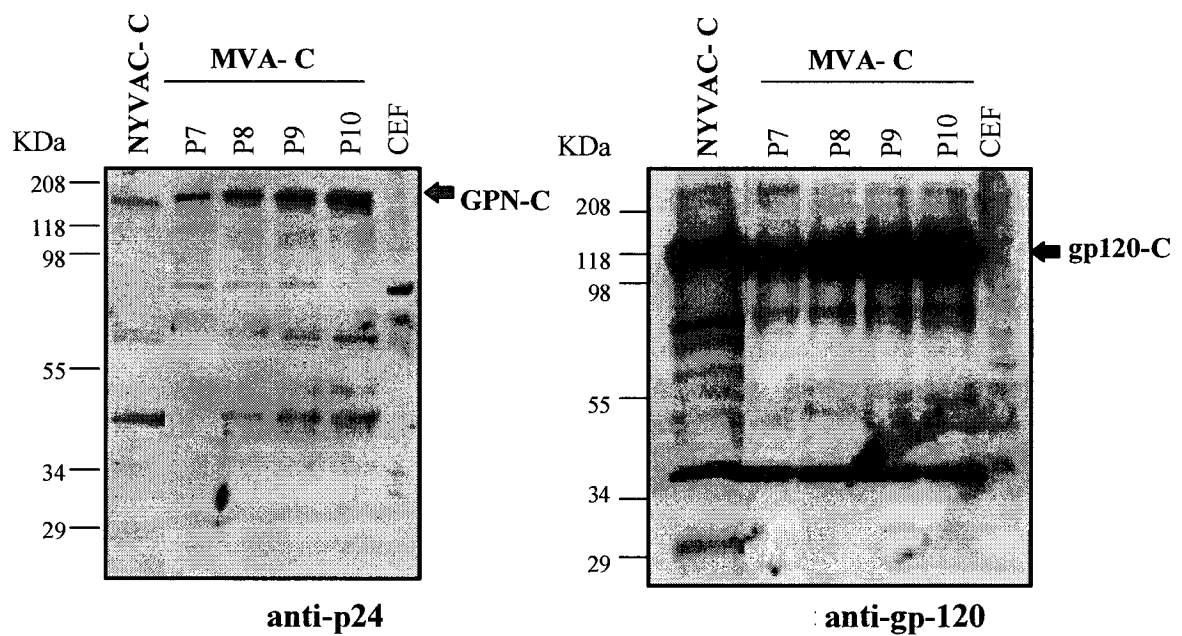


**Figura 25**

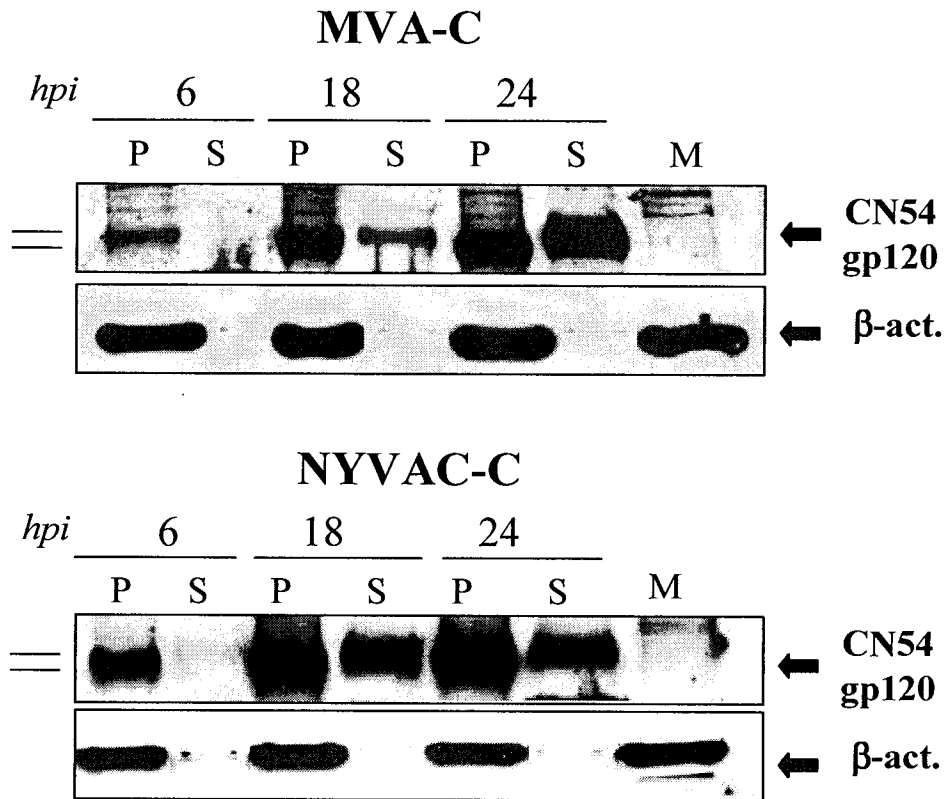
**A**



**B**

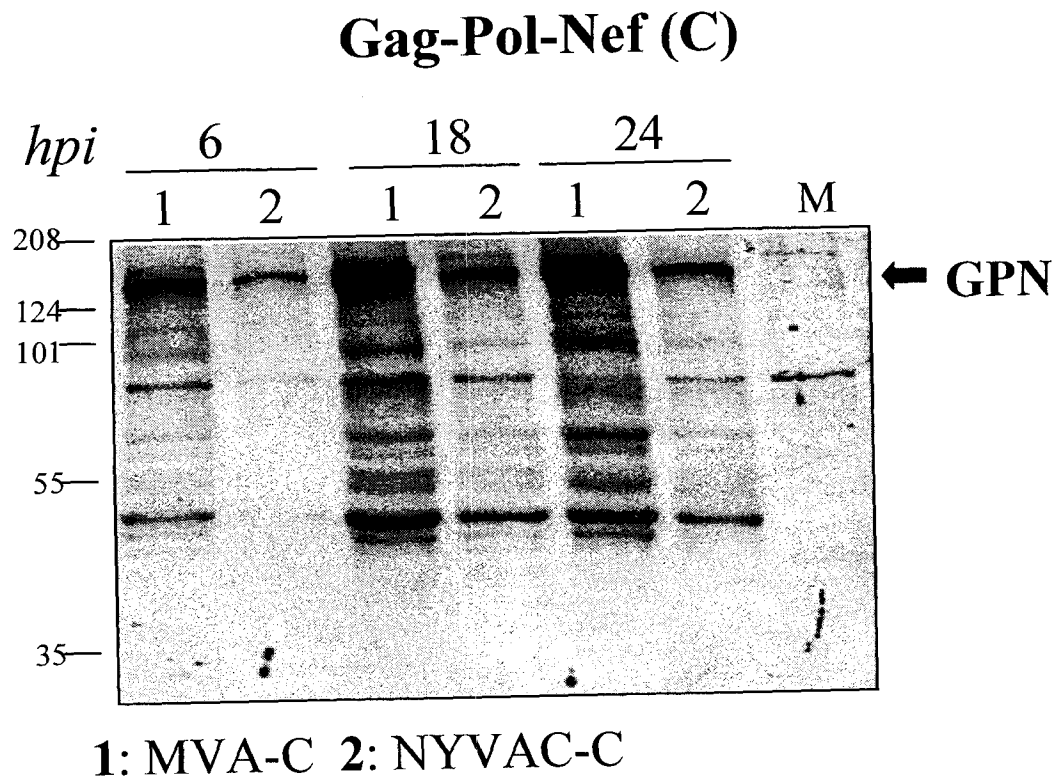


**Figura 26**

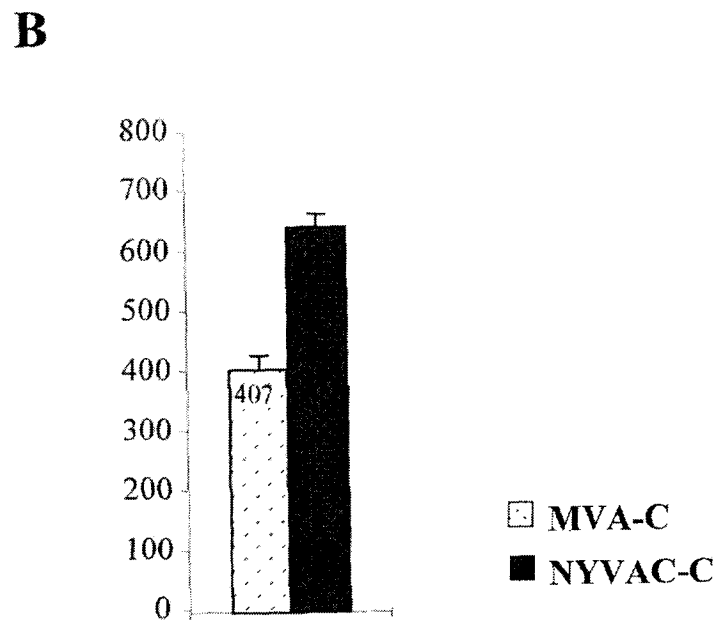
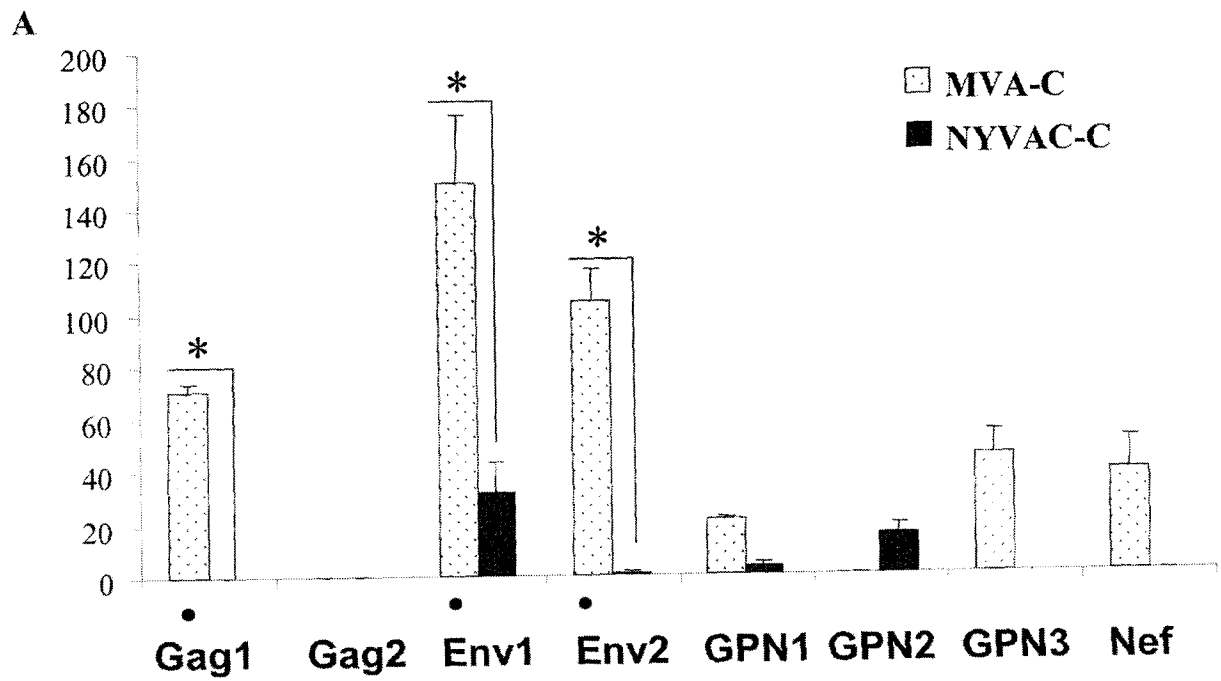


**Figura 27**

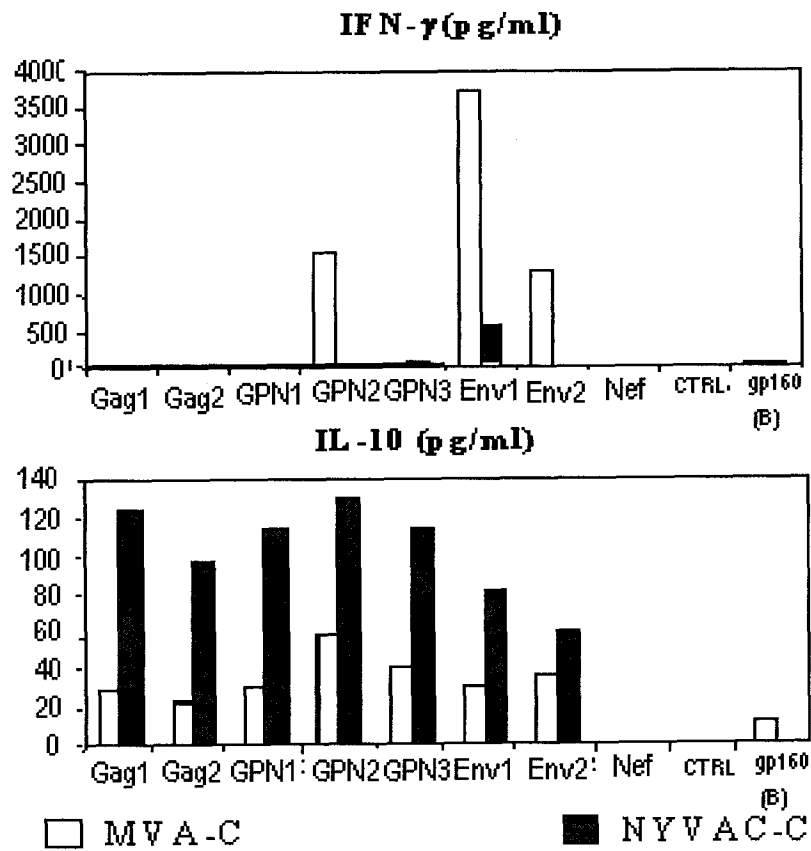




**Figura 28**



**Figura 29**



**Figura 30**

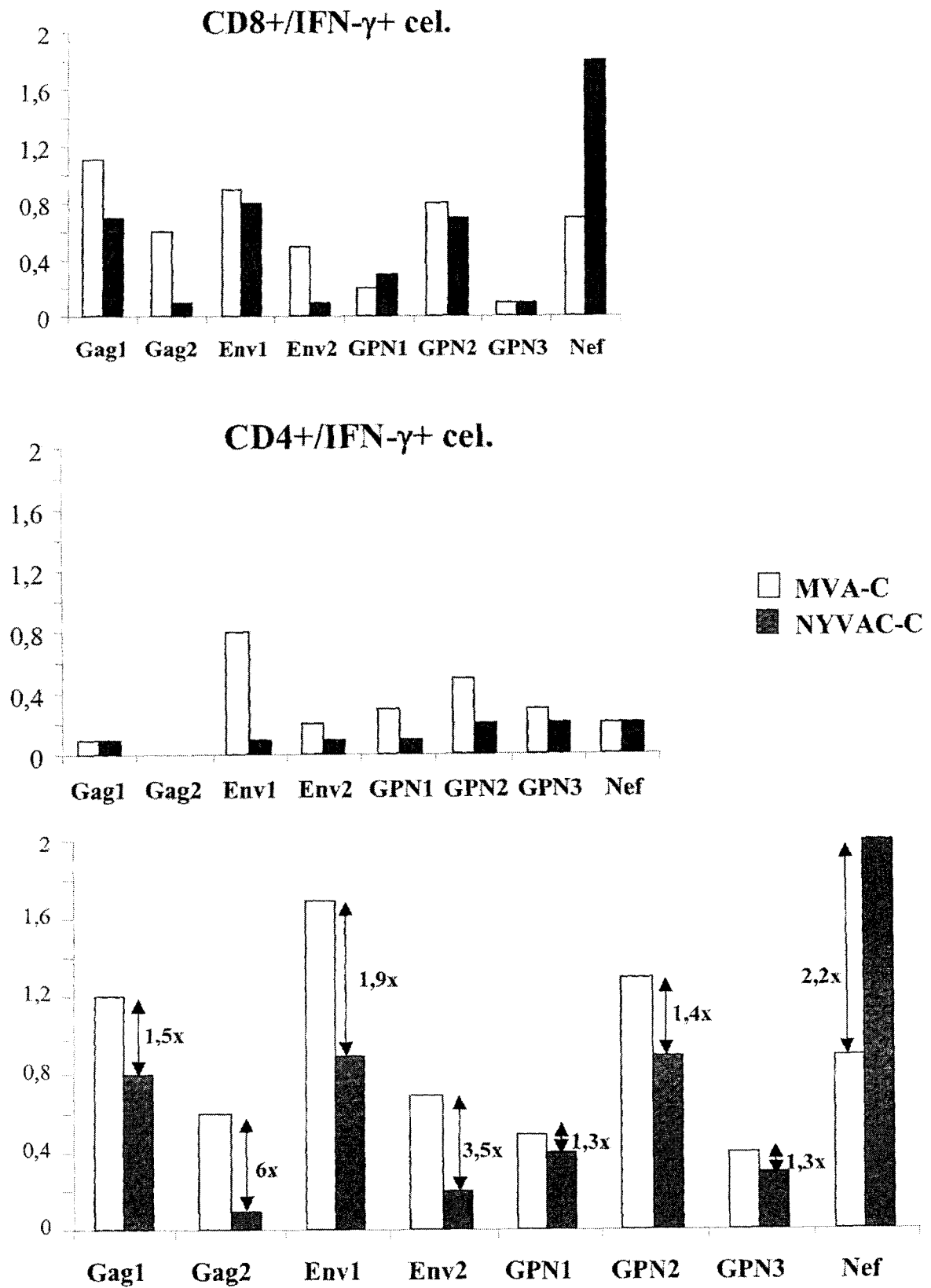


Figura 31

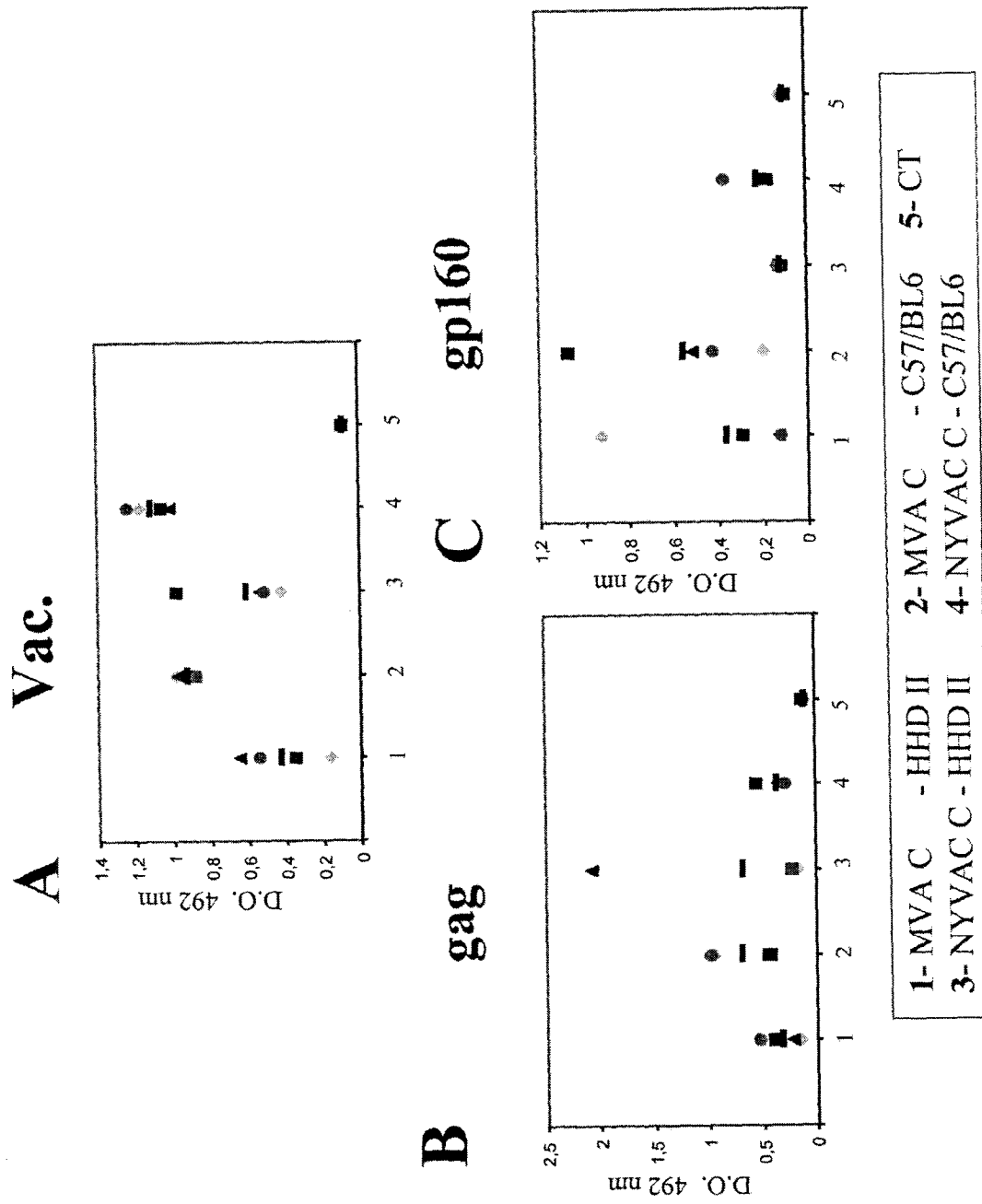


Figura 32

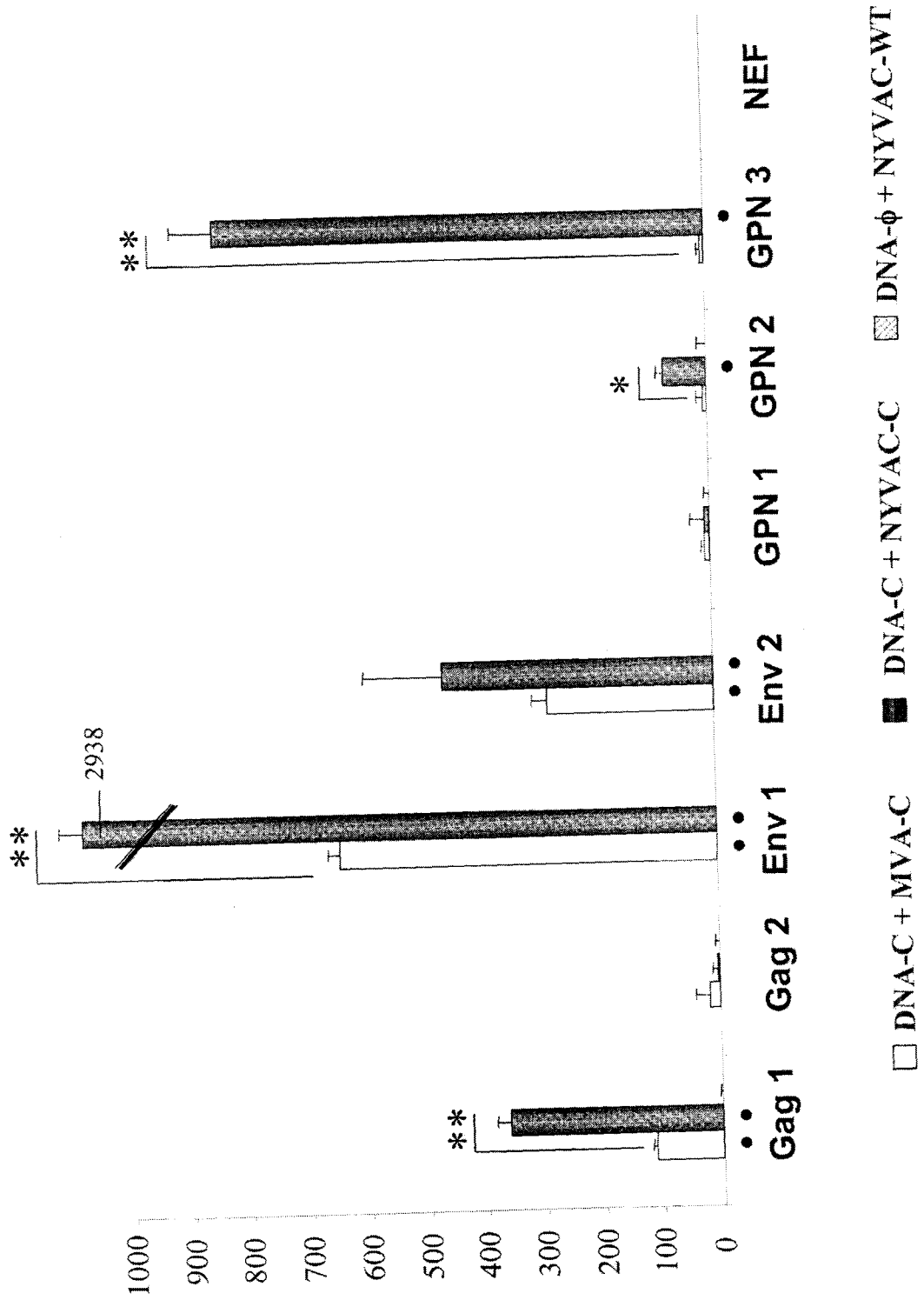


Figure 33

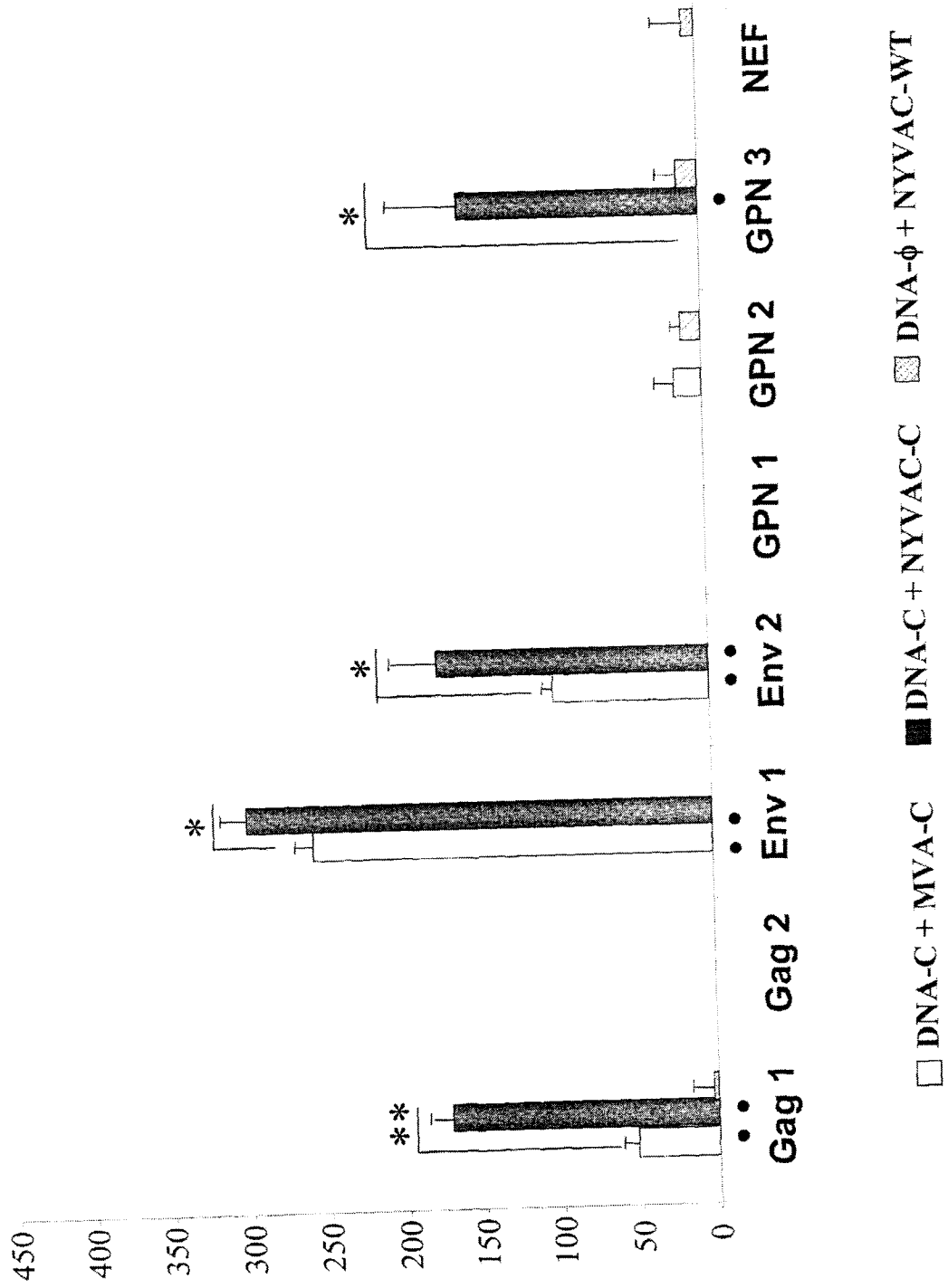


Figura 34

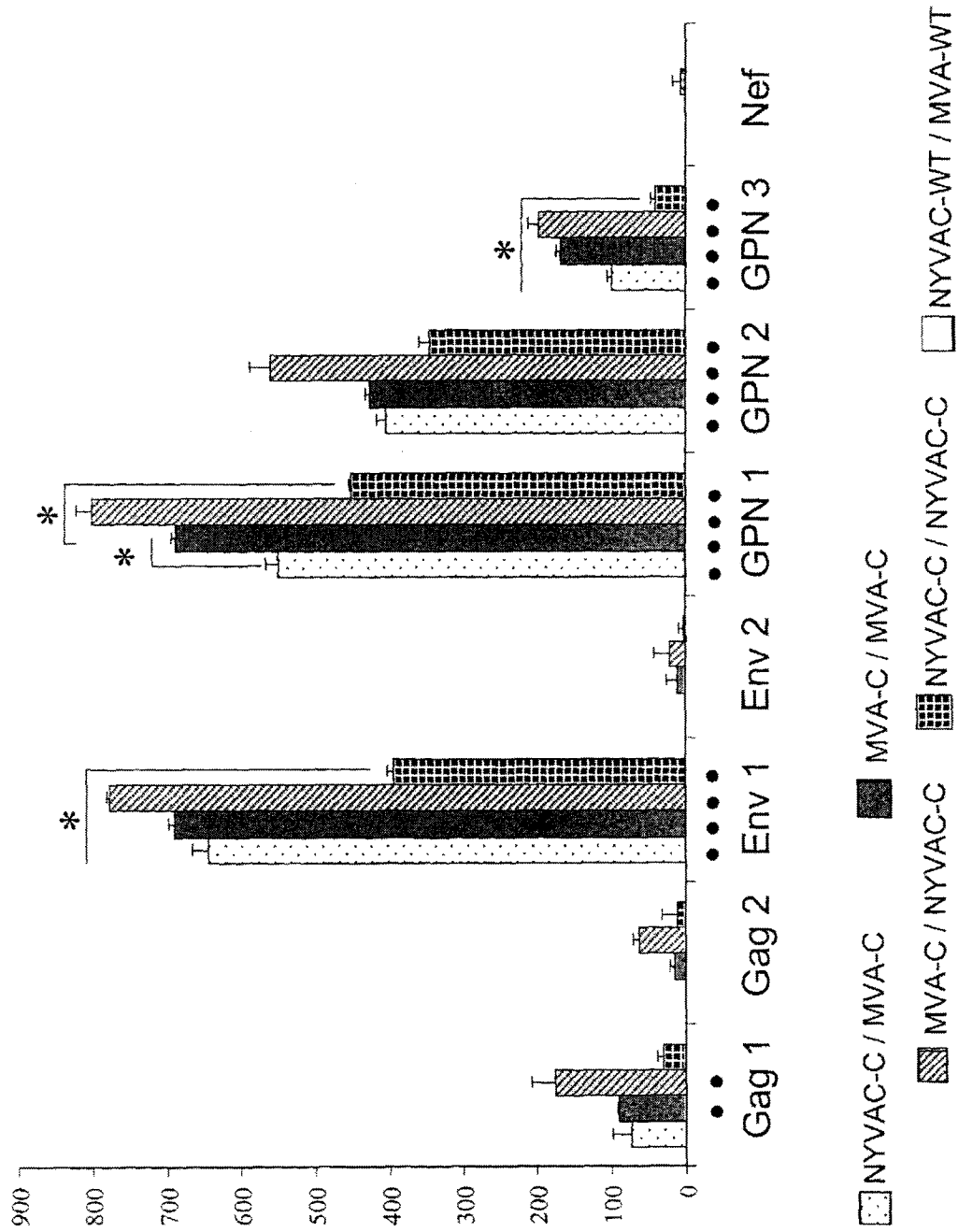


Figura 35



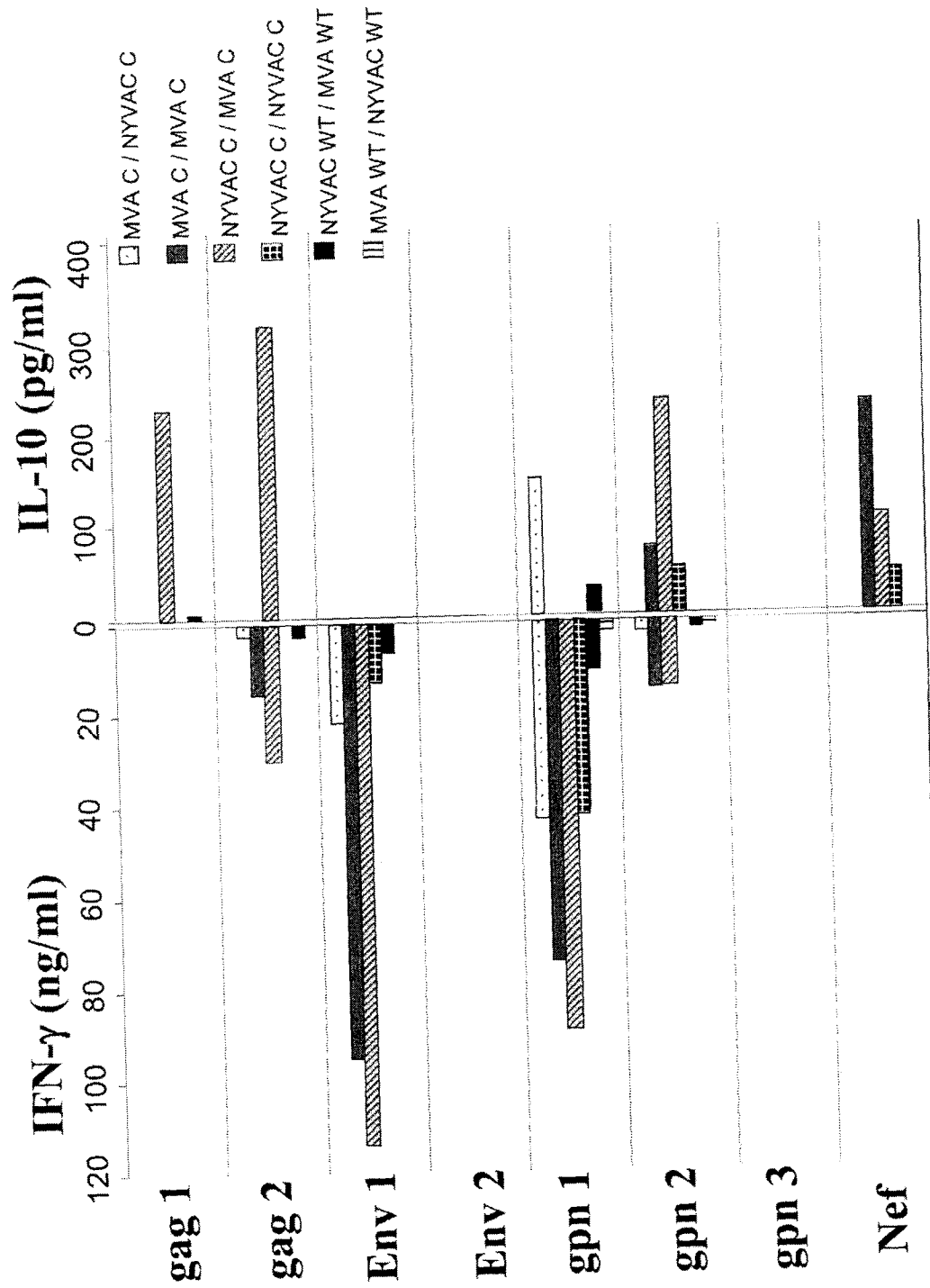
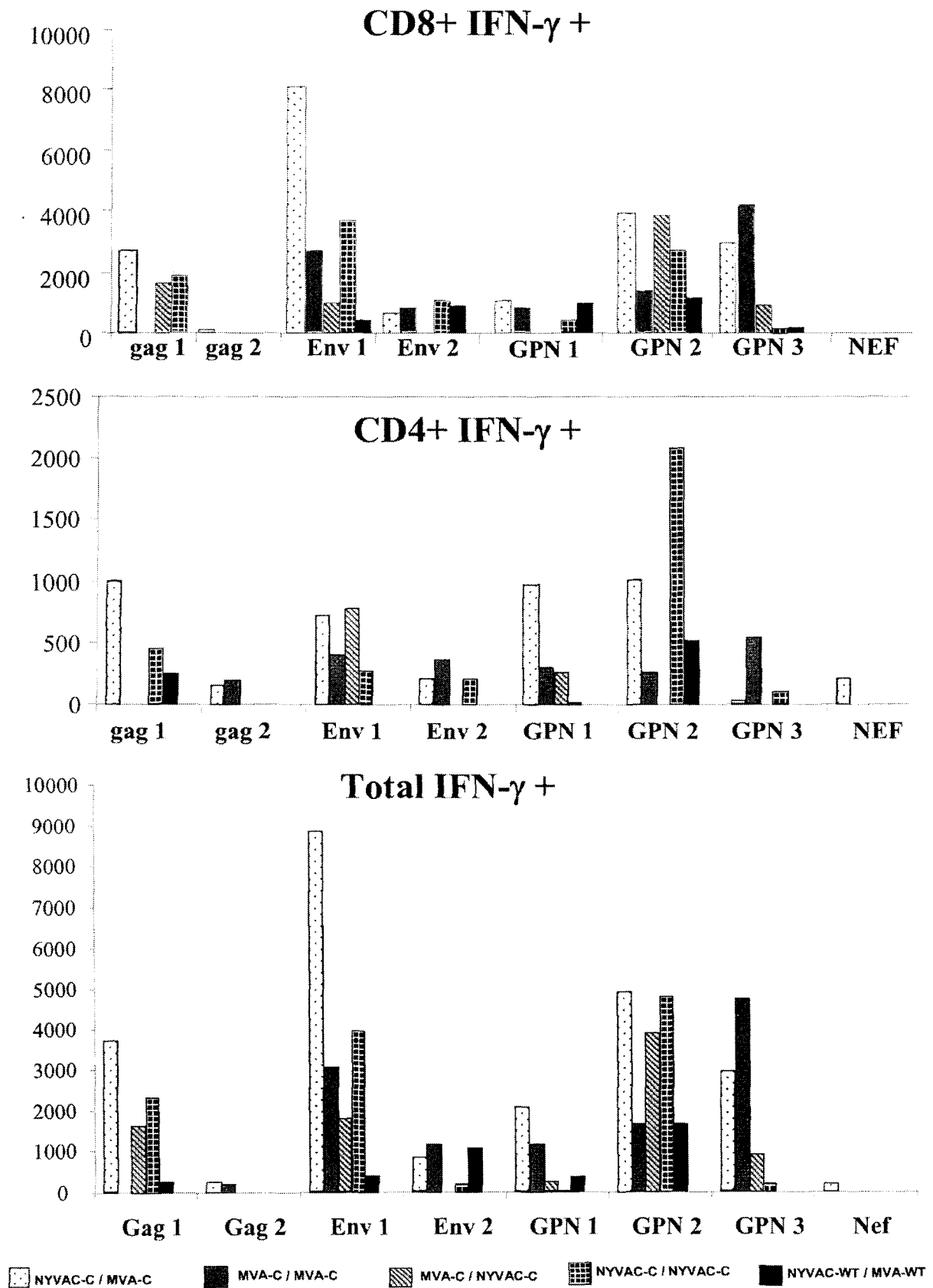
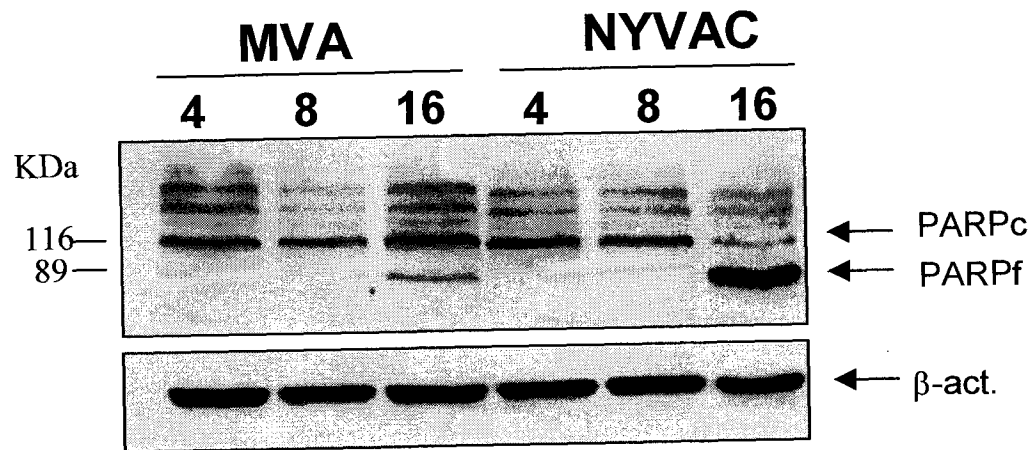


Figura 36

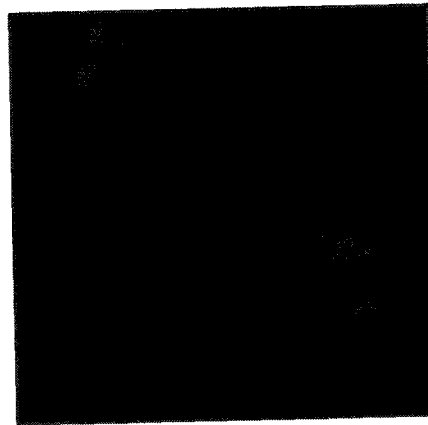


**Figura 37**

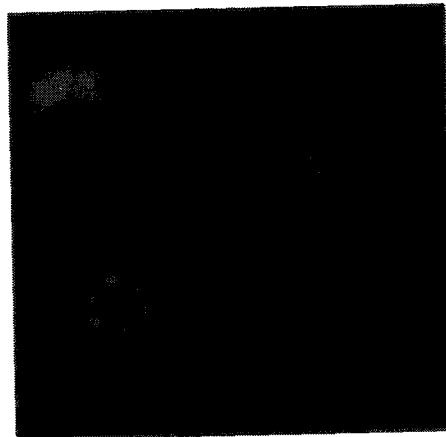


**Figura 38a**

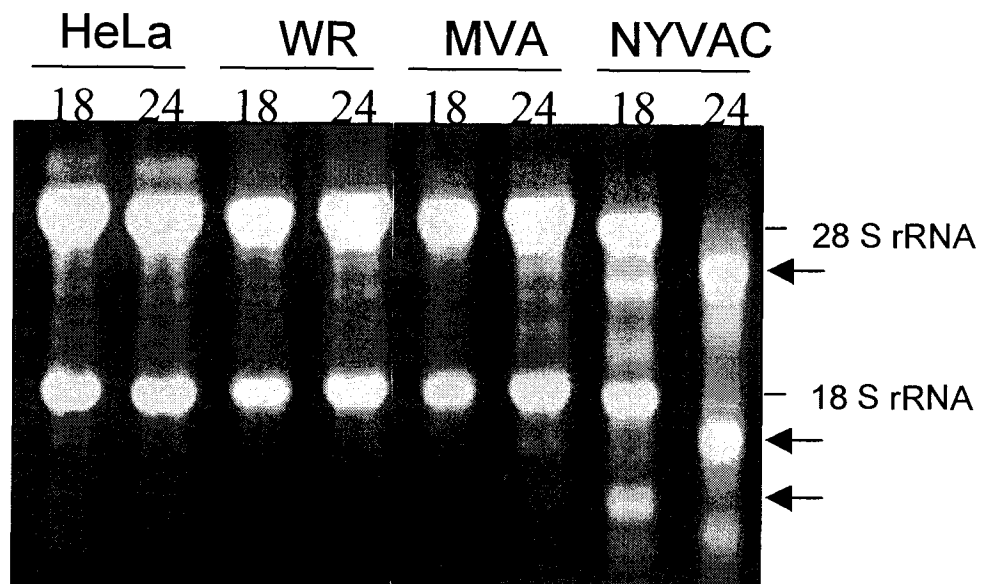
**MVA**



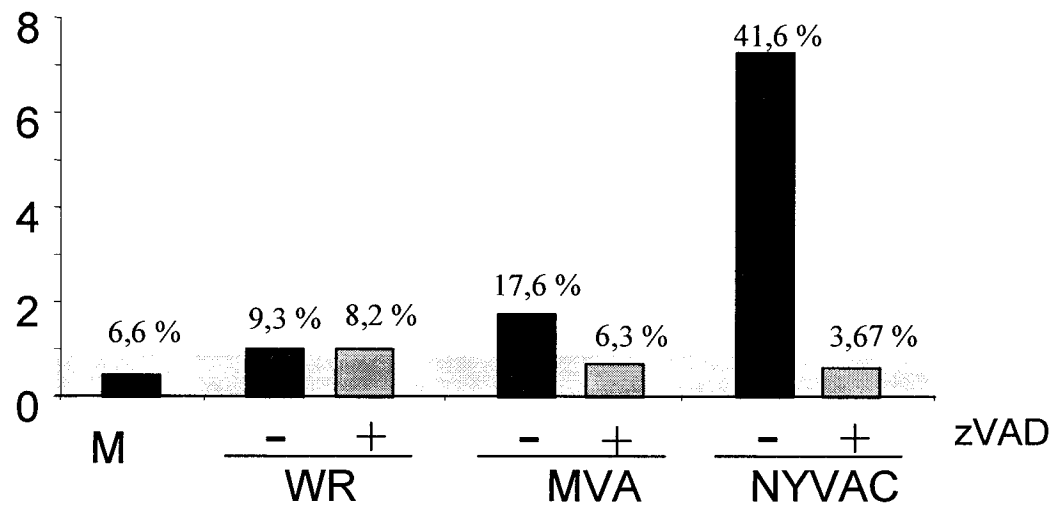
**NYVAC**



**Figura 38b**



**Figura 38c**



**Figura 38d**

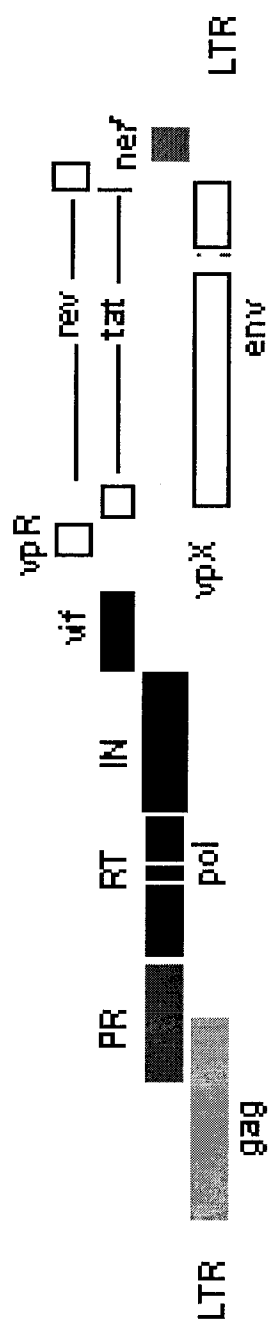
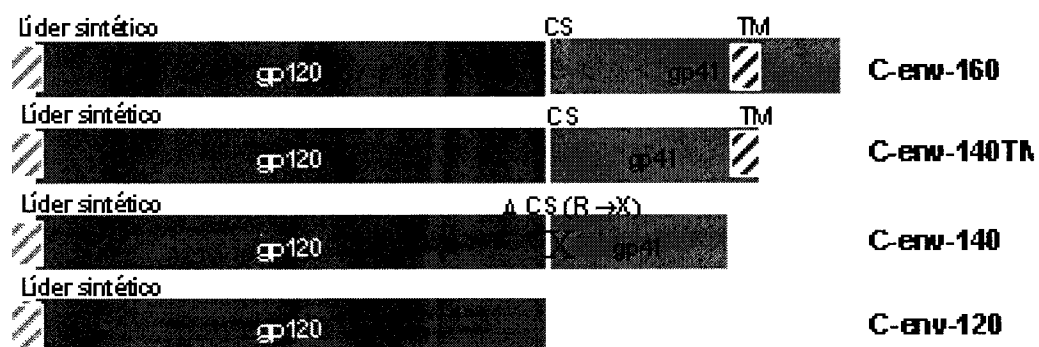


Figura 39

# ENV



# GagPolNef (gpn)



Figura 40



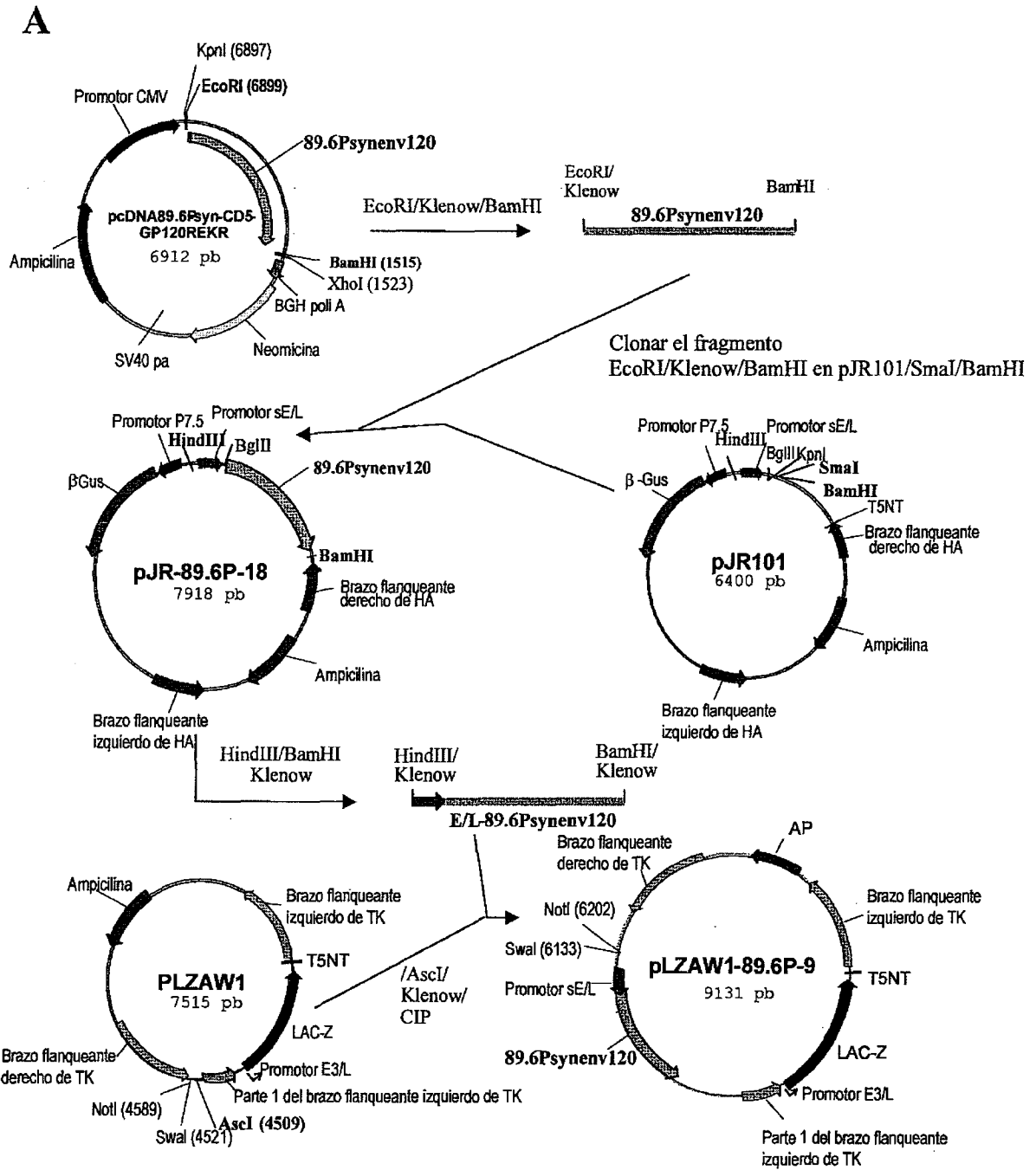


Fig. 41a

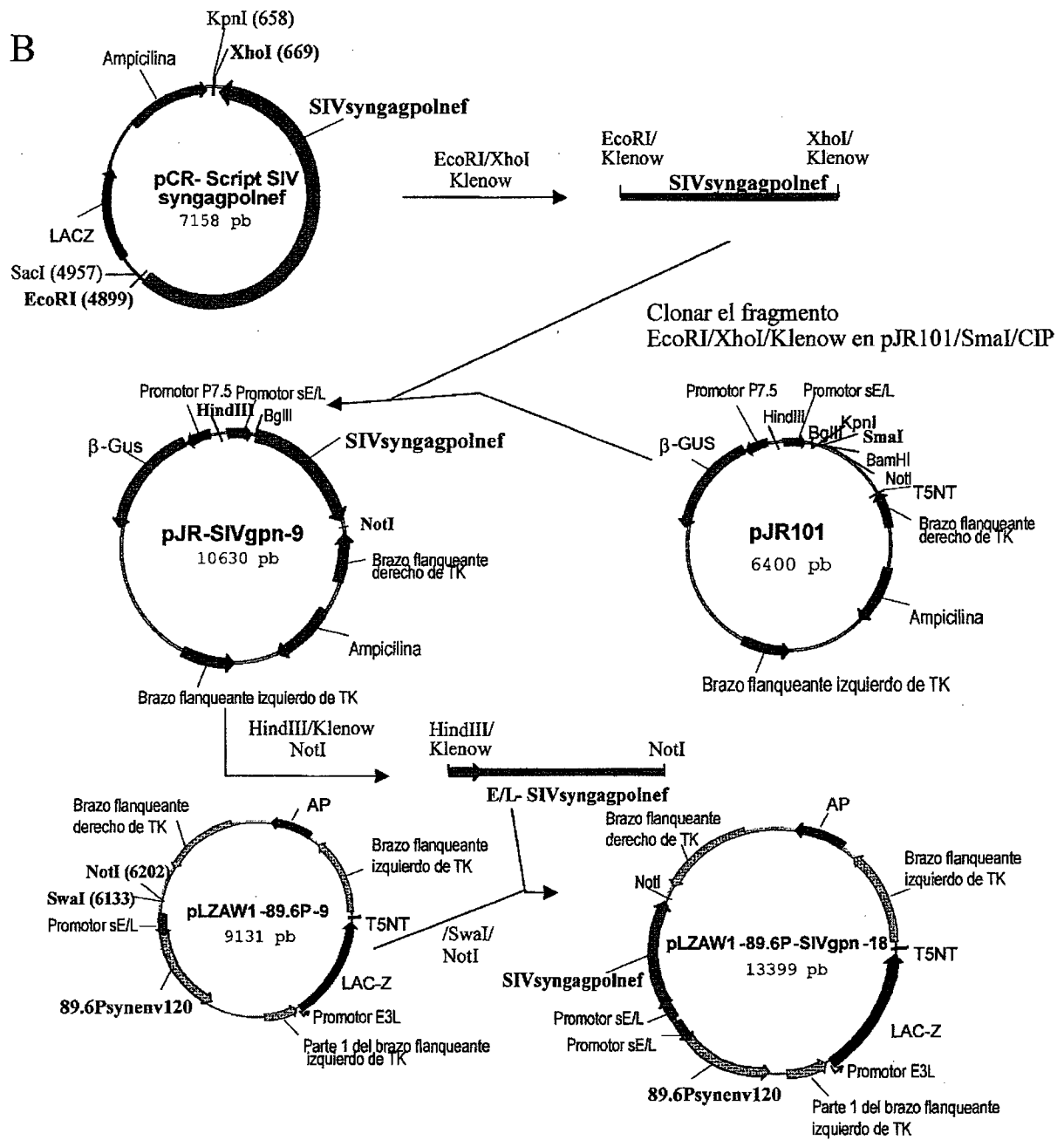
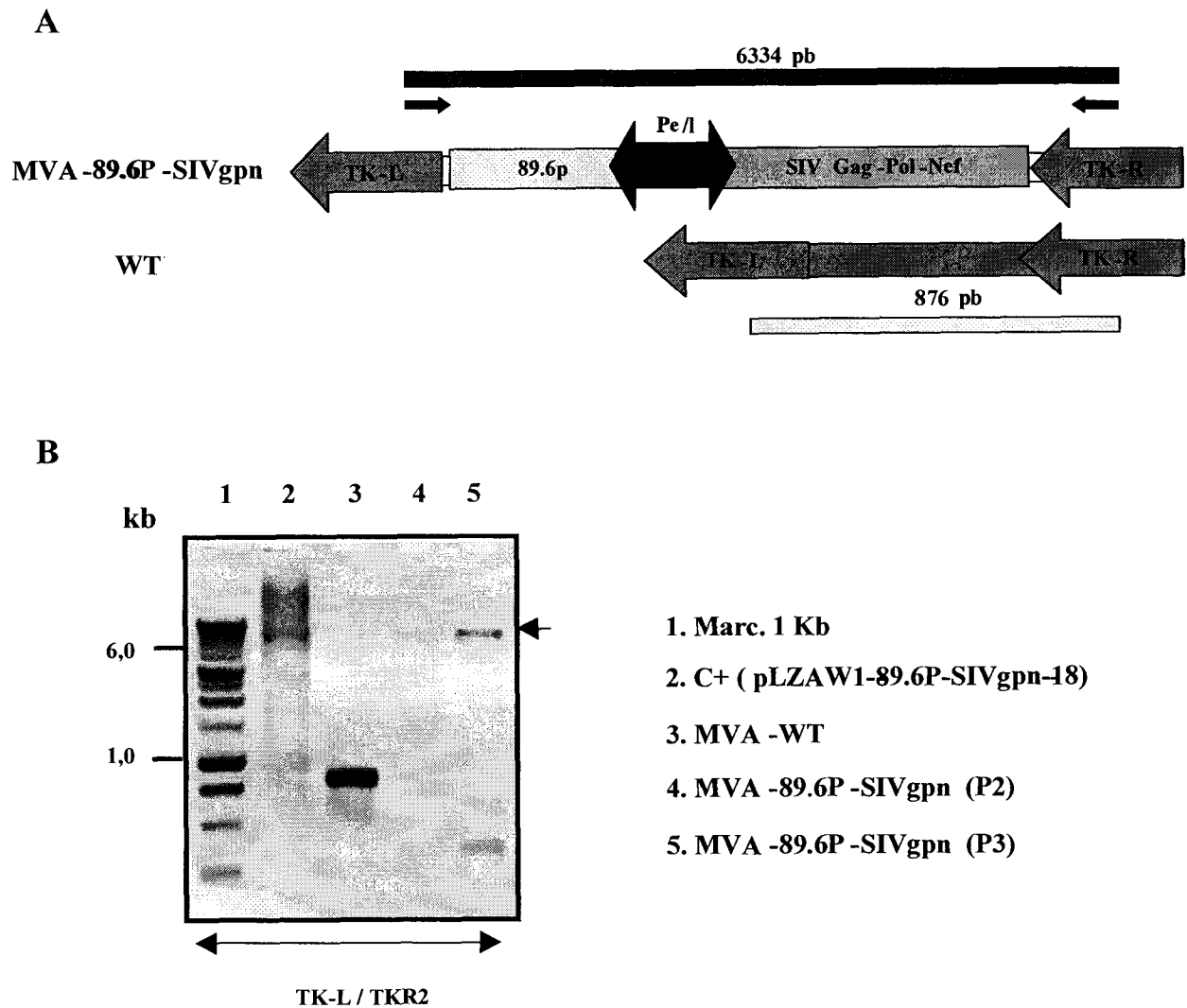
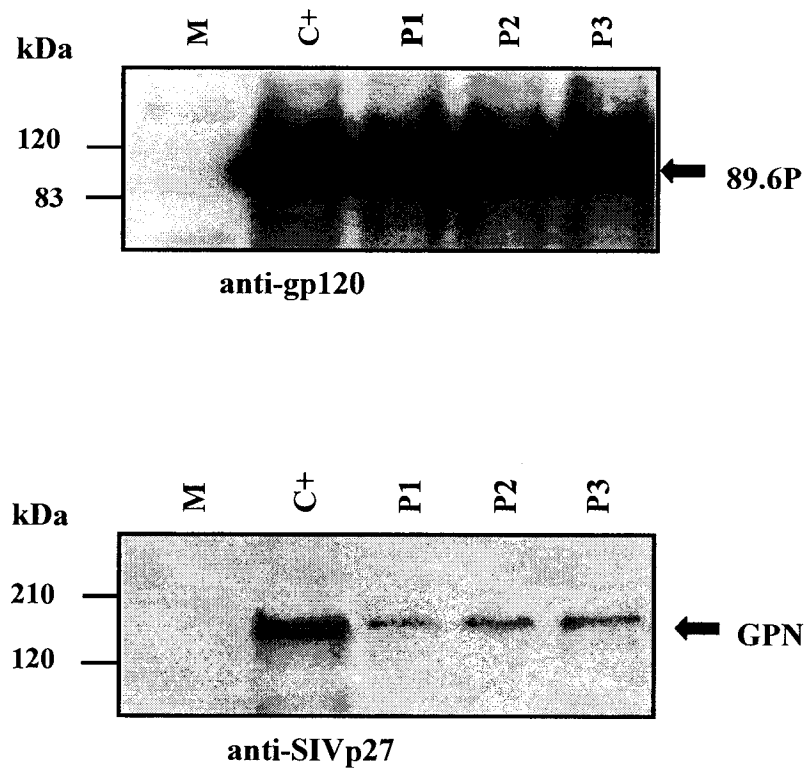


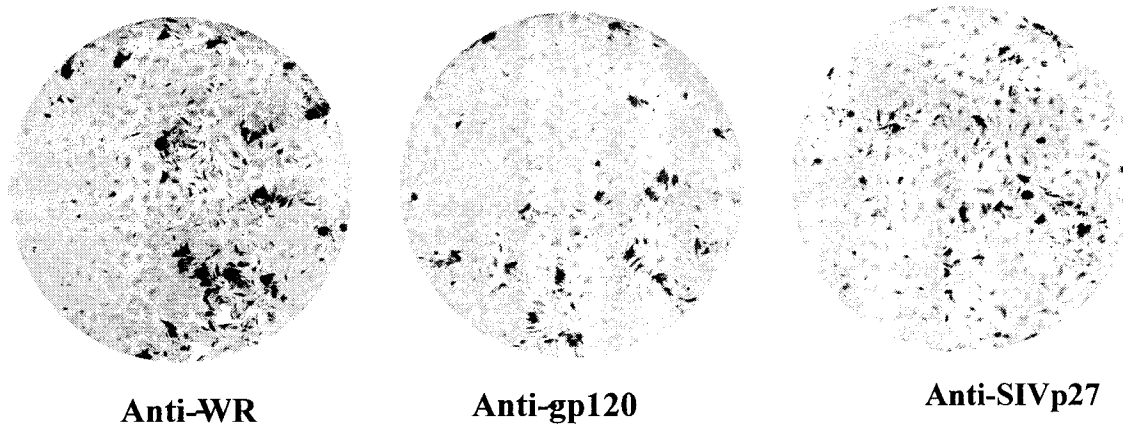
Fig. 41b



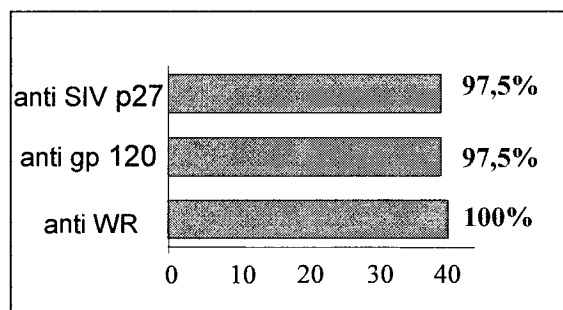
**Figura 42**



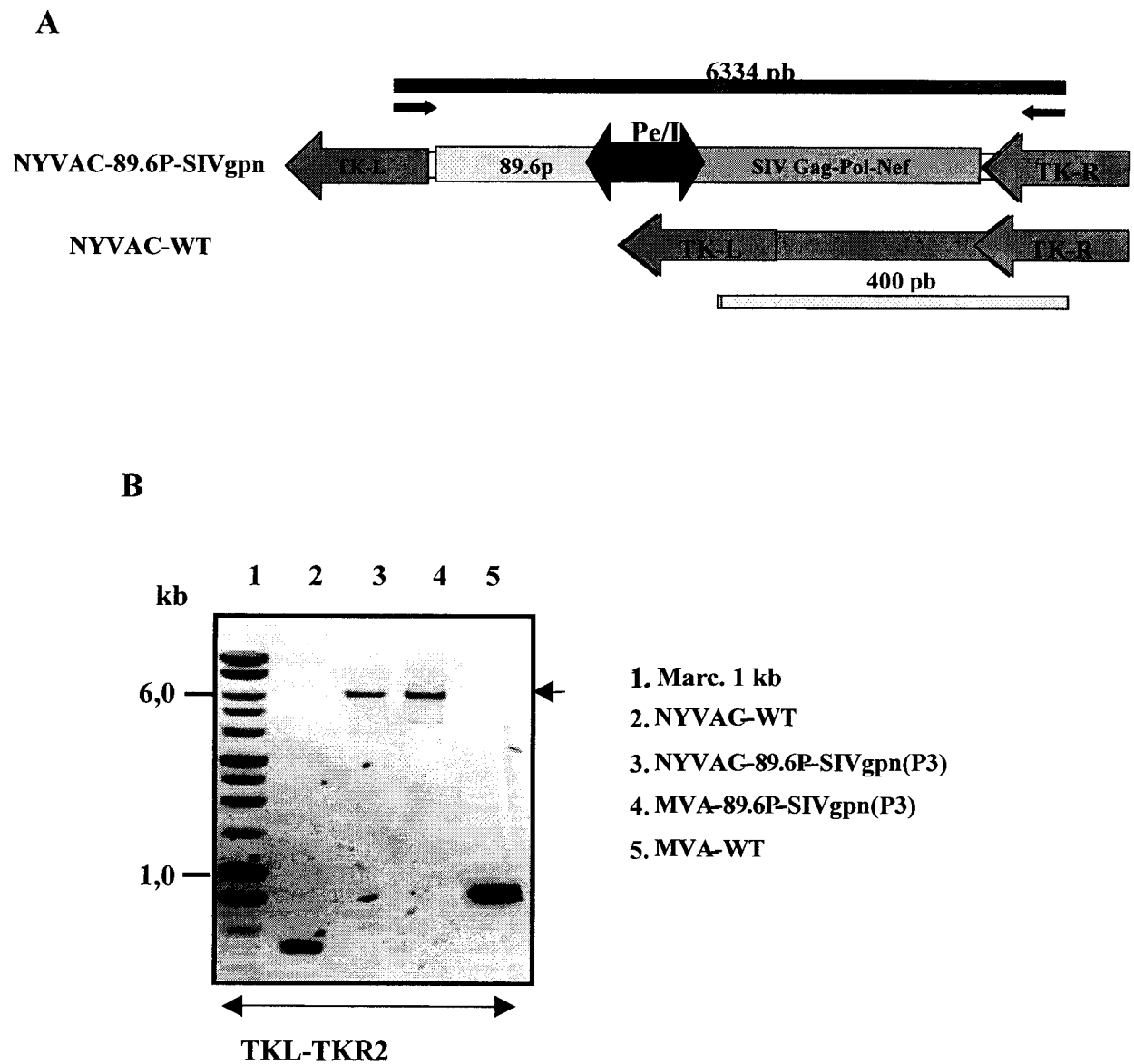
**Figura 43**



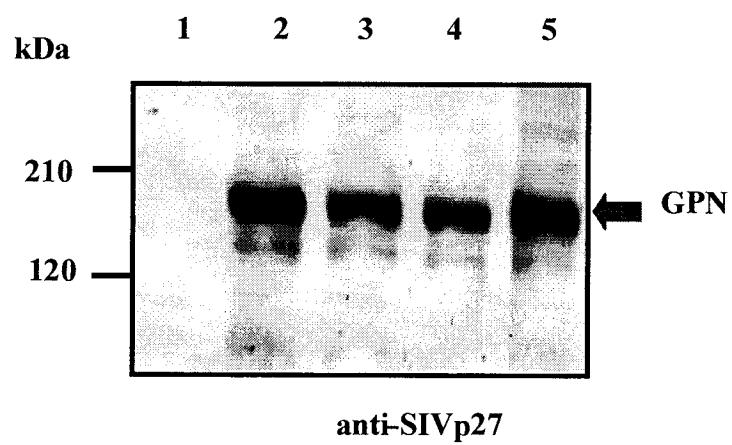
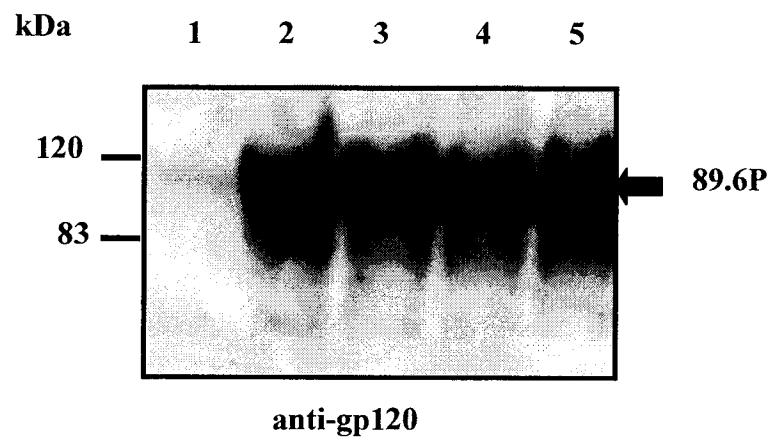
**MVA-89.6P-SIVgpn**



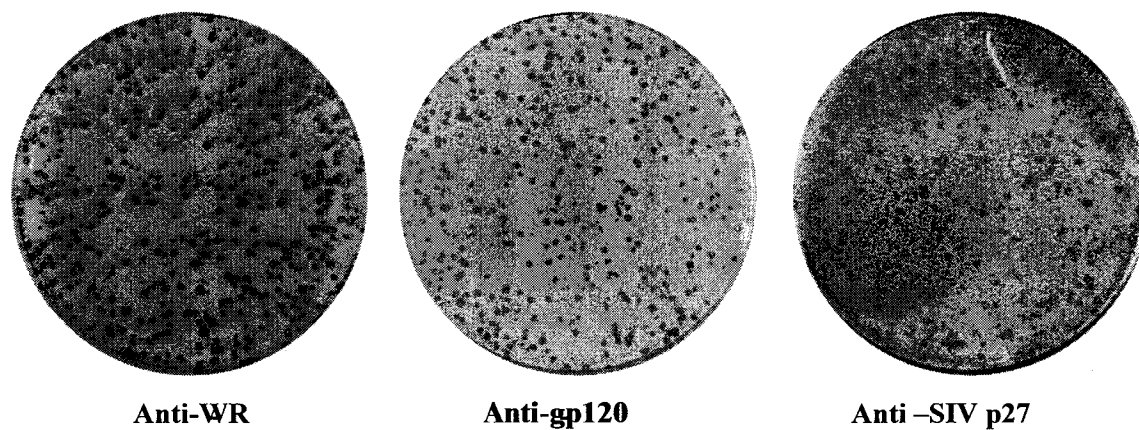
**Figura 44**



**Figura 45**



**Figura 46**

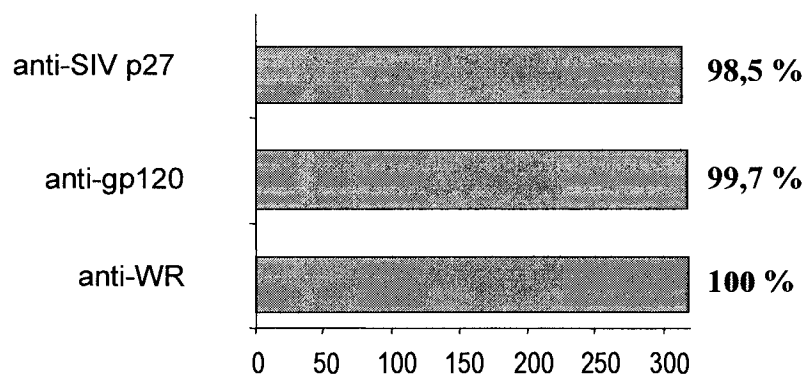


**Anti-WR**

**Anti-gp120**

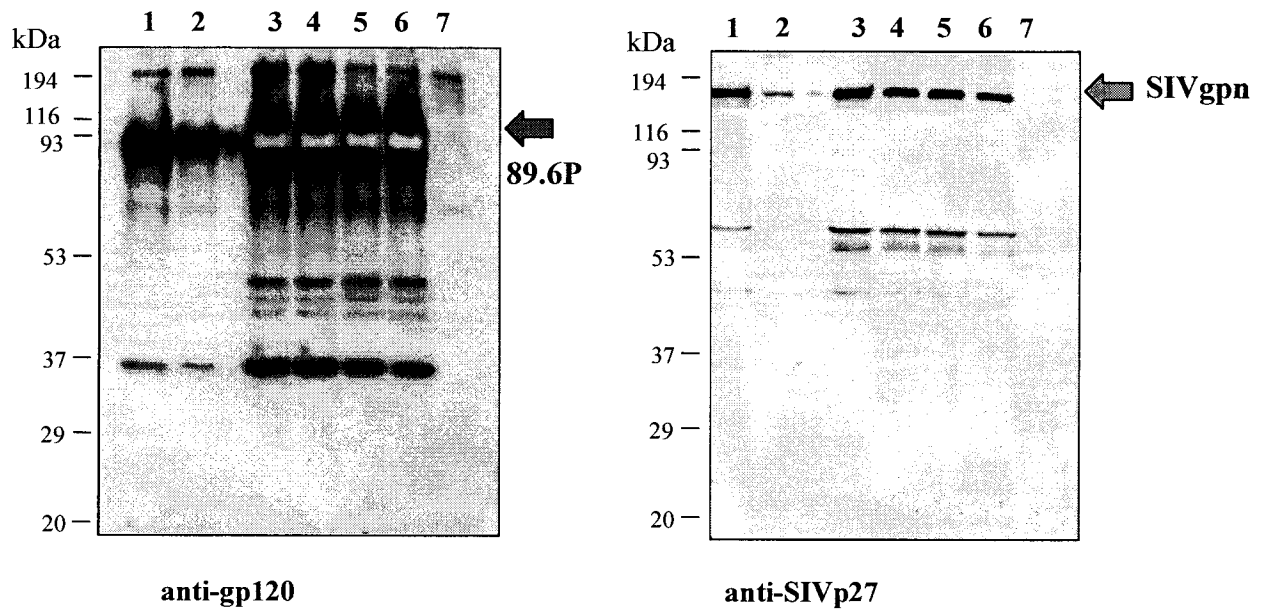
**Anti-SIV p27**

**NYVAC-89.6P-SIVgpn**



**Figura 47**





**Figura 48**

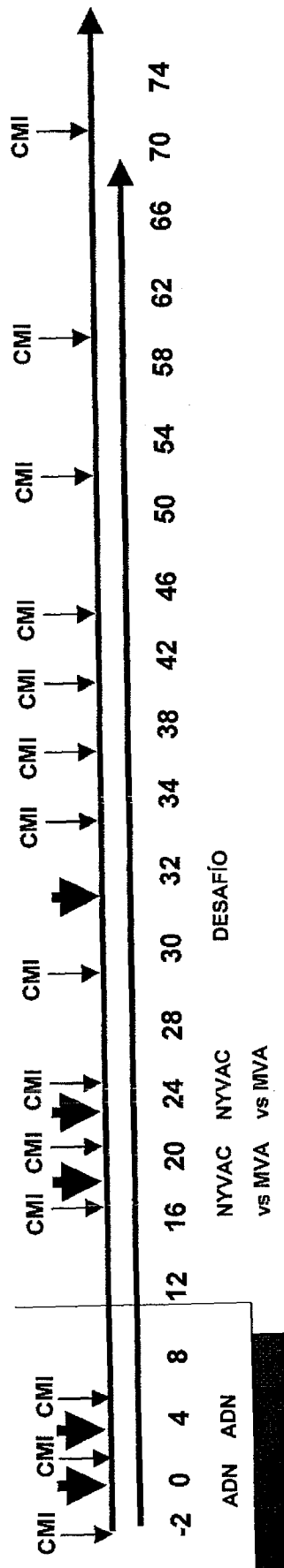


Figura 49

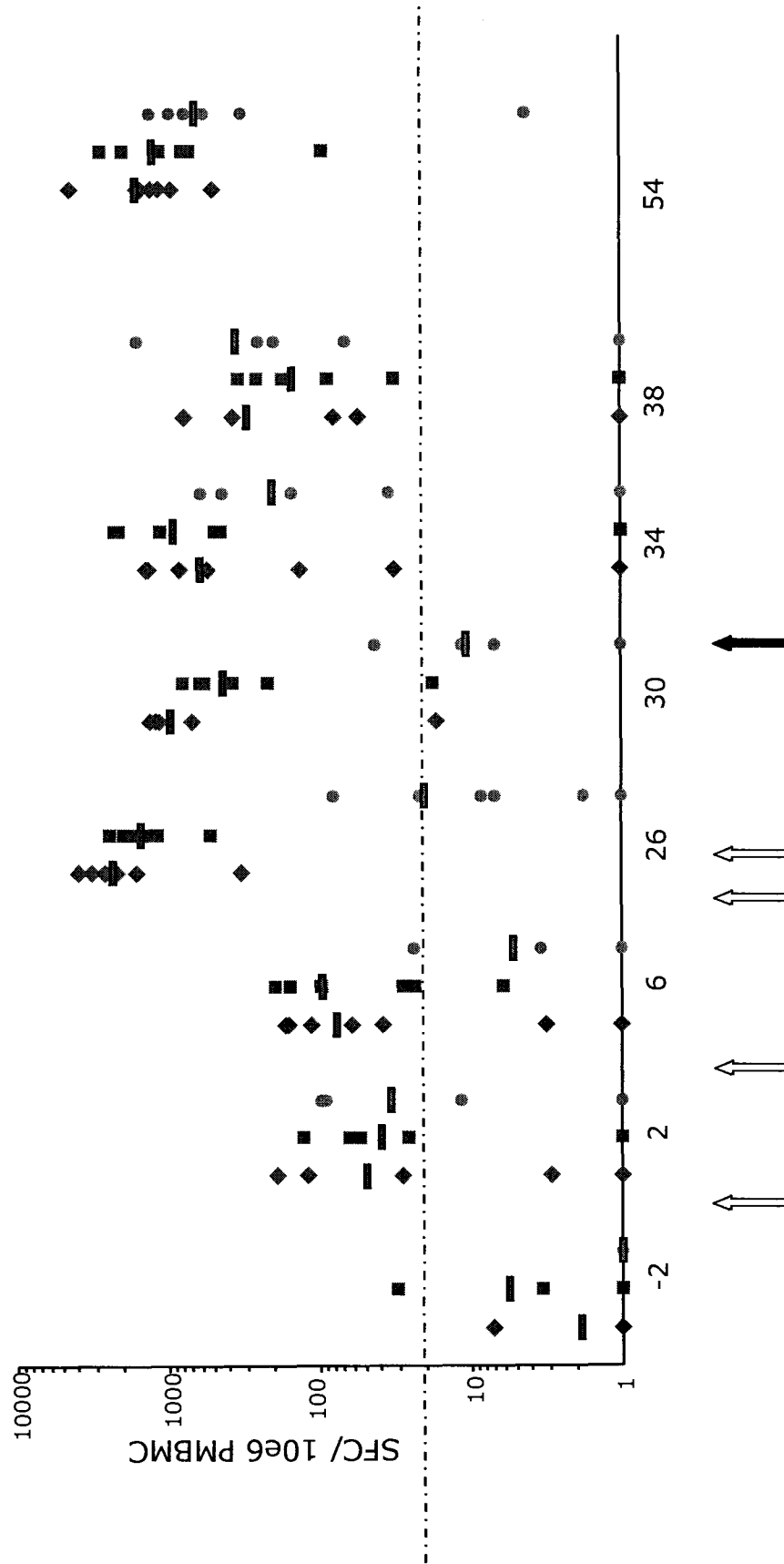


Figura 50

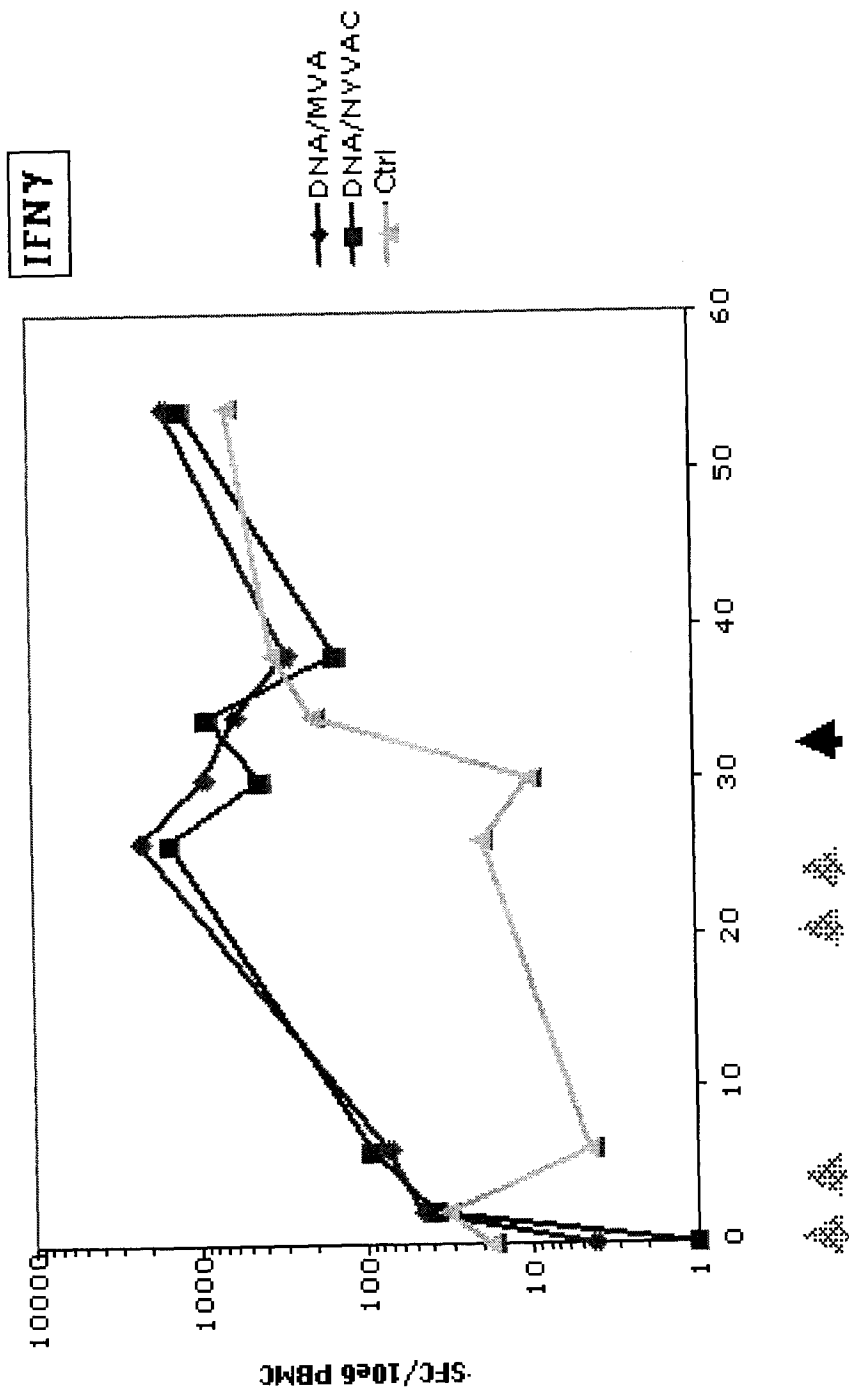


Figura 51

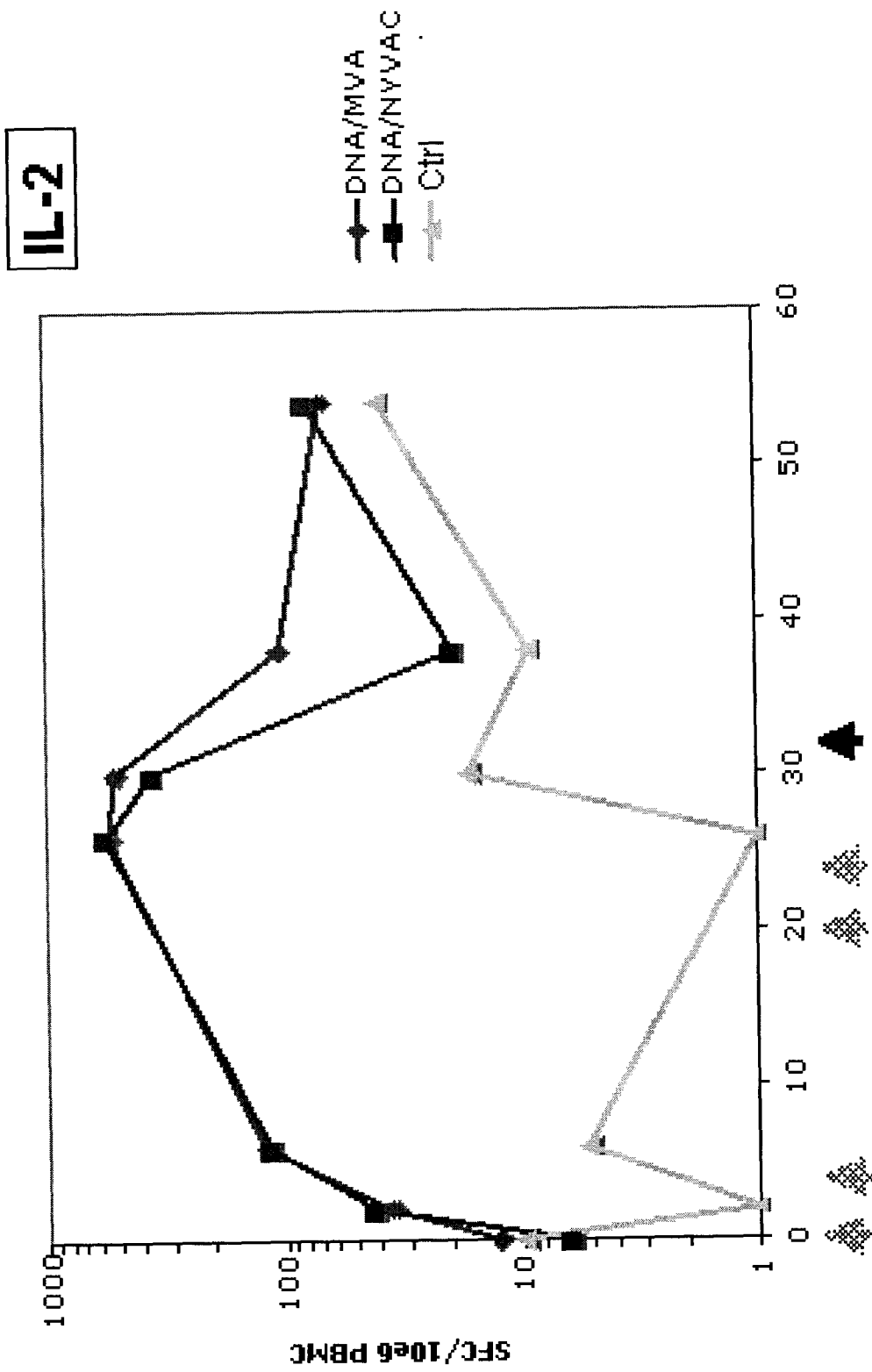


Figure 52

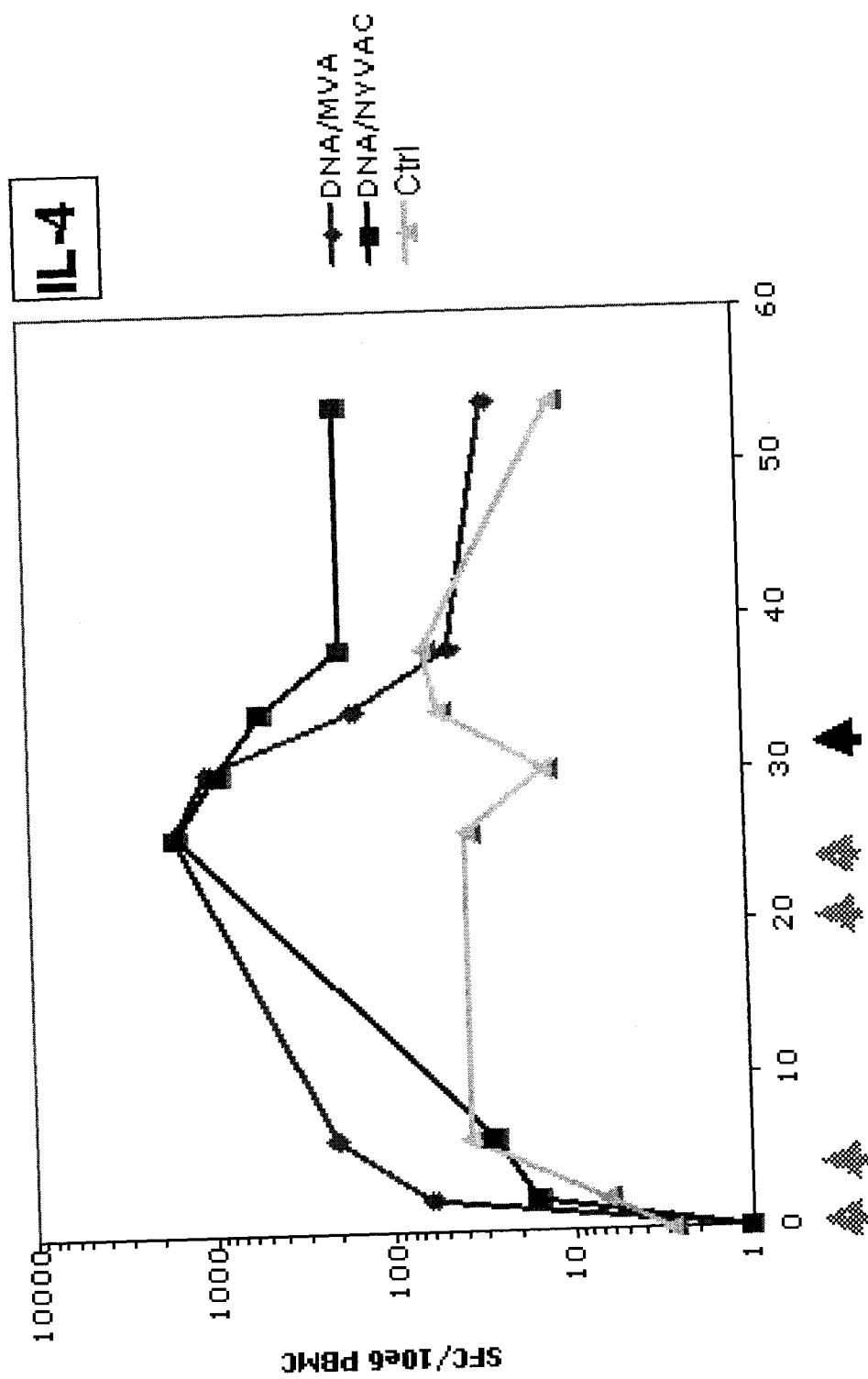


Figure 53

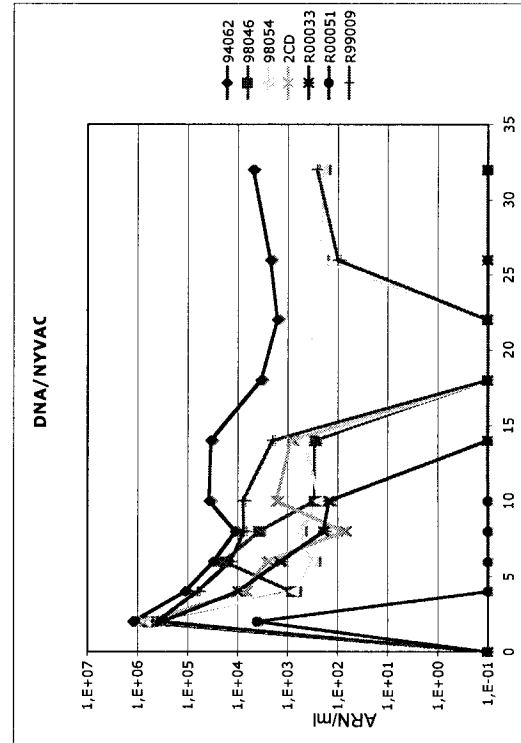
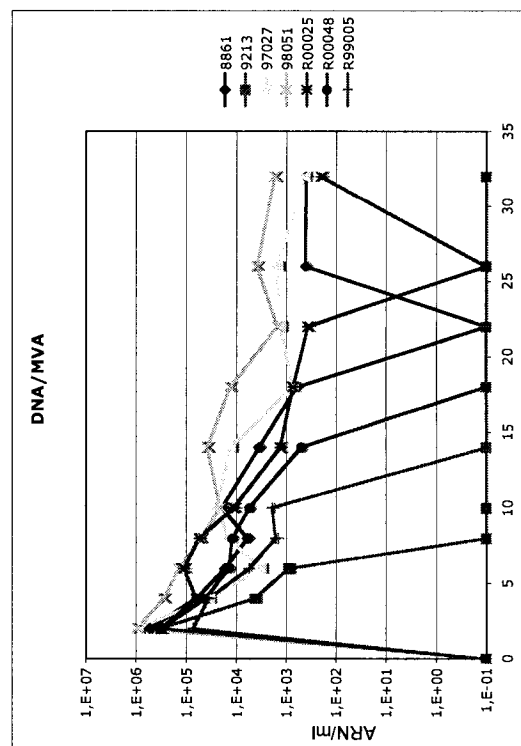
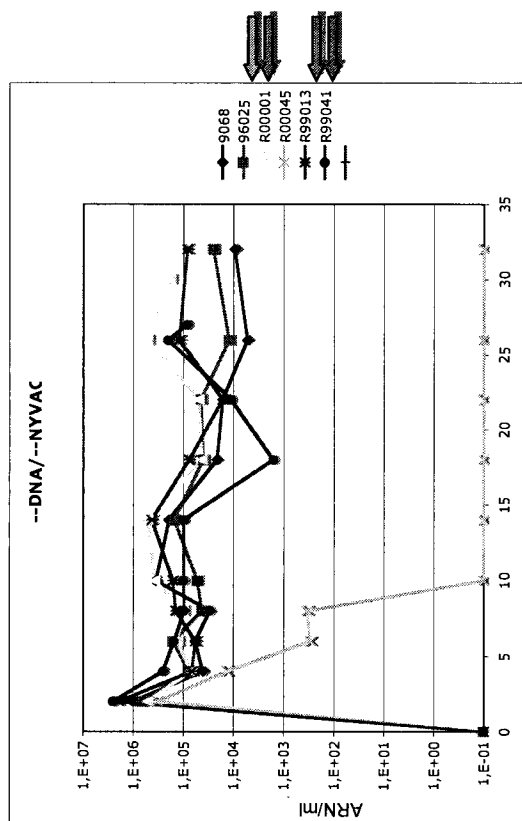


Figura 54

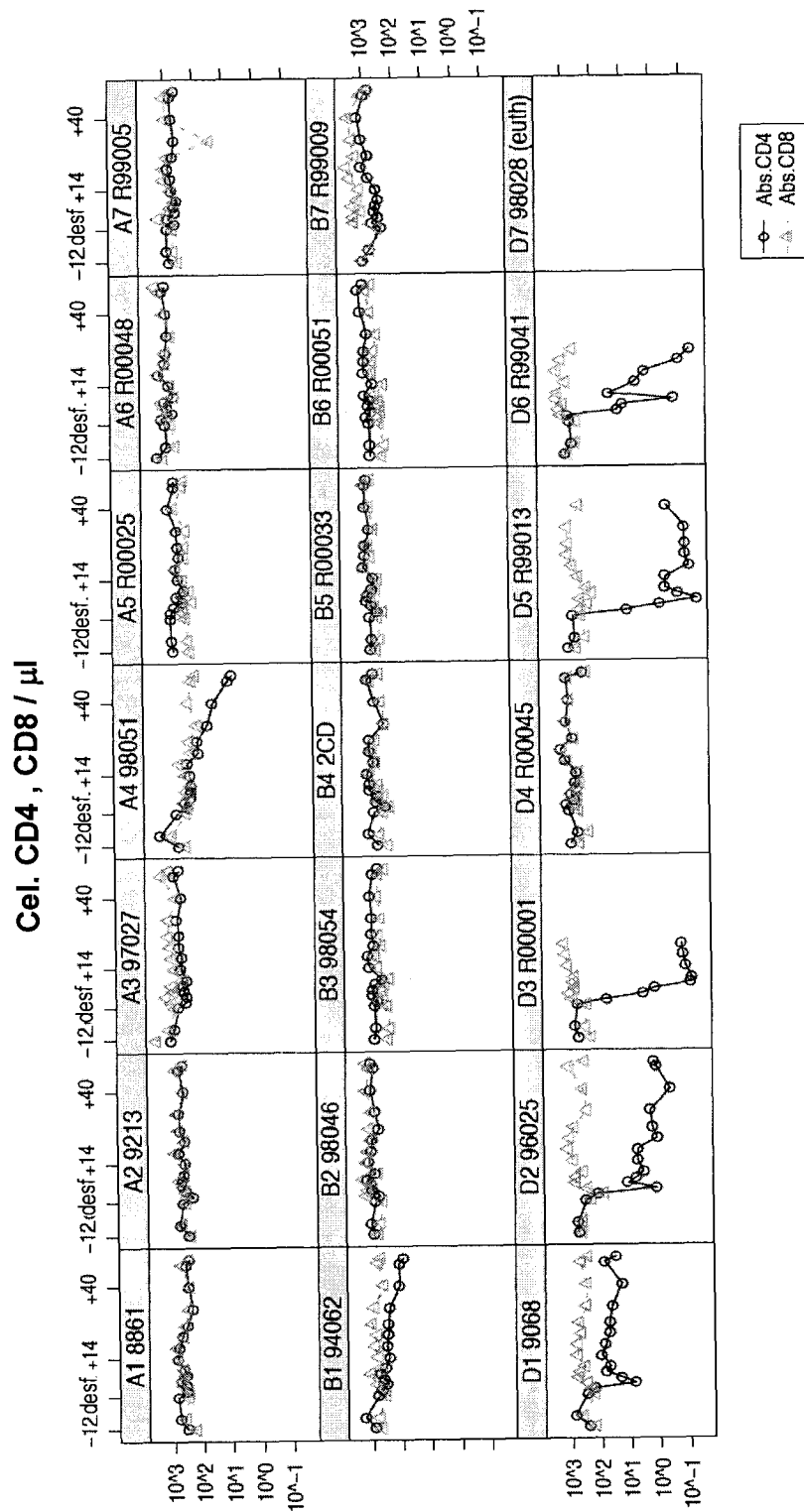


Figura 55



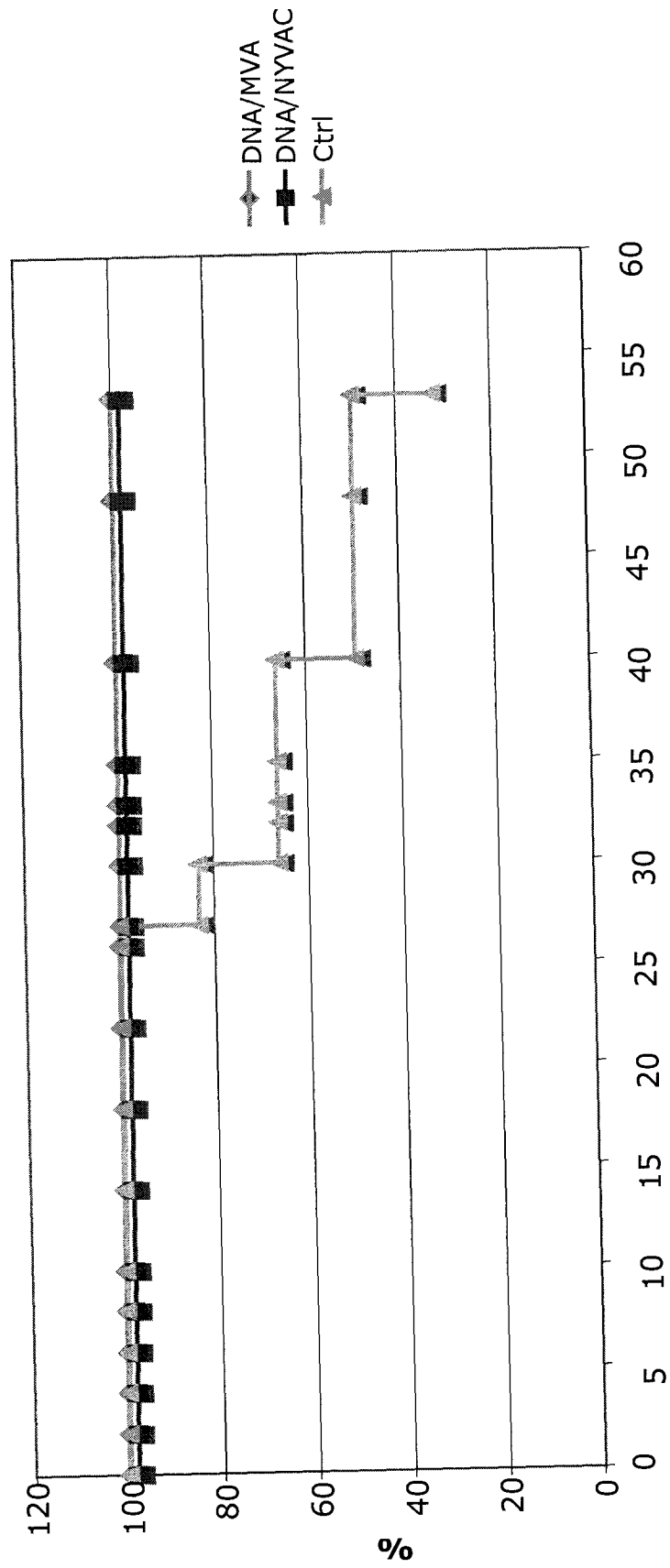


Figura 56