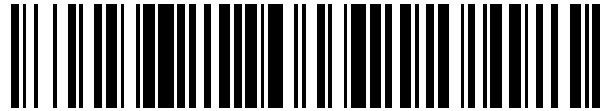


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 376**

51 Int. Cl.:

C12N 15/863 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2007 E 07874019 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2012 EP 2062023**

54 Título: **Sitios intergénicos entre genes conservados en el genoma del virus vaccinia Ankara modificado (MVA)**

30 Prioridad:

25.08.2006 US 840093 P

28.08.2006 US 840755 P

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

21.02.2013

73 Titular/es:

THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)

National Institutes of Health Office of Technology Transfer 6011 Executive Boulevard, Suite 325 Rockville, MD 20852-3804, US

72 Inventor/es:

**MOSS, BERNARD;
WYATT, LINDA y
EARL, PATRICIA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 396 376 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

Sitios intergénicos entre genes conservados en el genoma del virus vaccinia Ankara modificado (MVA)

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a sitios de inserción útiles para la integración estable de secuencias exógenas de DNA en el genoma del MVA.

Descripción de la Técnica Afín

10 Los miembros de la familia poxvirus tienen grandes genomas de DNA bicatenario que codifican varios centenares de proteínas (Moss, B. 2007 "Poxviridae: The Viruses and Their Replication" en Fields Virology, 5ª edición (D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R. A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, y S.E. Straus, Eds), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). La secuencia genómica de la cepa vaccinia fuertemente atenuada vaccinia Ankara modificada (MVA) (Mayr, A. et al. 1978 Zentralbl Bakteriol 167:375-390), que no puede crecer en la mayoría de las células de mamífero y que es un buen candidato para un vector de vacuna recombinante, es conocida (Sutter, G. y Moss, B. 1992 Proc Natl Acad Sci USA 89:10847-10851; y Sutter G. et al. 1994 Vaccine 12:1032-1040) ha sido sometida a pases más de 570 veces en fibroblastos de embrión de pollo, durante lo cual se han producido 6 deleciones principales con relación a la cepa parental Ankara de tipo salvaje, acompañadas por una restricción severa en el campo del hospedador (Meyer, H. et al. 1991 J Gen Virol 72: 1031-1038).

Sumario de la Invención

20 La presente invención se refiere a nuevos sitios de inserción útiles para la integración de secuencias exógenas en una región intergénica (IGR) de un genoma del virus vaccinia, en la que la IGR está localizada entre o está flanqueada por los marcos de lectura abiertos (ORFs) 069-070 del genoma del virus vaccinia en la nomenclatura de CDC/Acambis y donde los ORFs corresponden a genes conservados, y a vectores plasmídicos afines útiles para insertar DNA exógeno en el genoma del virus vaccinia, y adicionalmente a virus vaccinia recombinantes que comprenden una secuencia exógena insertada en dicho nuevo sitio de inserción como medicamento o vacuna.

Breve Descripción de los Dibujos

25 **Figura 1.** Relaciones filogenéticas de HIV-1 y HIV-2 basadas en la identidad de secuencias del gen *pol*. SIV_{cpz} y SIV_{smm} son lentivirus de primates subhumanos recuperados de un chimpancé y un mono negro mangabey, respectivamente.

30 **Figura 2.** Relaciones filogenéticas de los grupos M, N y O de HIV-1 con 4 aislados SIV_{cpz} diferentes basadas en secuencias del gen *pol* de longitud total. La barra indica una distancia genética de 0,1 (divergencia de nucleótidos 10%) y las posiciones del *asterisco* agrupan aislados N de HIV-1 basados en secuencias de *env*.

Figura 3. Propiedades trópicas y biológicas de aislados de HIV-1.

Figura 4. Proteínas codificadas por HIV. Se indican la localización de los genes de HIV, los tamaños de los productos primarios de traducción (en algunos casos poliproteínas), y las proteínas virales maduras procesadas.

35 **Figura 5.** Representación esquemática de un virión de HIV-1 maduro.

40 **Figura 6.** Representación lineal de la glicoproteína Env de HIV-1. La *flecha* indica el sitio de la escisión de gp160 en gp120 y gp41. En gp120, las *áreas sombreadas* representan dominios variables (V₁ a V₅) y los *recuadros vacíos* representan secuencias conservadas (C₁ a C₅). En el ectodominio gp41 se indican varios dominios: el péptido de fusión N-terminal, y las dos hélices de ectodominio (hélices N y C). El dominio que abarca la membrana está representado por un *recuadro negro*. En el dominio citoplásmico gp41, se representan el motivo de endocitosis Tyr-X-X-Leu (YXXL) (**SEQ ID NO: 1**) y dos dominios helicoidales predichos (hélice-1 y -2). Se indican los números de los aminoácidos.

Figura 7. Vector de transferencia pLW-73.

45 **Figura 8.** Secuencia de nucleótidos del vector de transferencia pLW-73 (cadena superior, **SEQ ID NO: 2**; cadena inferior, **SEQ ID NO: 3**).

Figura 9. Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Env del clado D Ugandan (aislado AO7412) (**SEQ ID NO: 4**).

Figura 10. Secuencia de nucleótidos alterada en codones que codifica la proteína gagpol del clado D Ugandan (aislado AO3349 (**SEQ ID NO: 5**).

Figura 11. Generación de MVAs recombinantes y análisis de estabilidad de los genes insertados. **A)** diagrama esquemático de inserción de env y gagpol en los sitios Del II y Del III, respectivamente. **B)** evaluación de la estabilidad por inmunotinción.

Figura 12. Tipos y frecuencia de mutaciones de env en MVA/65A/G env.

5 **Figura 13.** Inserción de Env en I8R/G1L IGR y Gag Pol en Del III.

Figura 14. Modificaciones de los constructos A/G para aumentar la estabilidad.

Figura 15. Expresión de Env después de pases en placas.

Figura 16. Análisis PCR y por transferencia Western de clones individuales.

Figura 17. Expresión de A/G env por MVA doble recombinante.

10 **Figura 18.** Virus recombinantes que expresan env y gagpol de los aislados HN-1 Ugandan.

Figura 19. MVA/UGD4a - análisis de placas env sin mancha

Figura 20. Modificación del gen UGD env en MVA recombinante.

Figura 21. MVA/UGD4b - análisis de placas gag sin mancha. *, localización de tramos de 4-6 residuos G o C.

Figura 22. Modificación del gen gagpol UGD en MVA recombinante.

15 **Figura 23.** Construcción de MVA estable recombinante que expresa UGD env y gagpol.

Figura 24. Respuestas celulares suscitadas por MVA/UGD4d.

Figura 25. Respuestas de anticuerpos suscitadas por MVA/UGD4d.

Depósito de Microorganismos

20 El microorganismo siguiente ha sido depositado de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA, en la fecha indicada:

Microorganismo	No. de Acceso	Fecha
MVA 1974/NIH Clon 1	PTA-5095	27 marzo 2003

25 El Clon 1 de MVA 1974/NIH se depositó como No. de Acceso en ATCC: PTA-5095 en fecha 27 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, Estados Unidos. Este depósito se realizó de acuerdo con las estipulaciones del Tratado de Budapest acerca del Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos de Procedimiento de Patente y las Regulaciones expuestas en el mismo (Tratado de Budapest).

Descripción Detallada de la Realización Preferida

30 A no ser que se defina otra cosa, los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por una persona con experiencia ordinaria en la técnica a la que se refiere esta invención. Véase, v.g., Singleton P y Sainsbury D., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 3ª edición, J. Wiley & Sons, Chichester, Nueva York, 2001 and Fields Virology, 5th Ed. (D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R. A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, and S.E. Straus, eds), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2007.

El término de transición "que comprende" es sinónimo de "que incluye", "que contiene", o "caracterizado por", es inclusivo o indefinido y no excluye elementos adicionales, no citados, o pasos de métodos.

35 La expresión de transición "constituido por" excluye cualquier elemento, paso, o ingrediente no especificado en la reivindicación, pero no excluye componentes o pasos adicionales que no estén relacionados con la invención tales como impurezas asociadas ordinariamente con ellos.

40 La expresión de transición "constituido esencialmente por" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o pasos especificados y aquéllos que no afectan de modo sustancial a la o las características básicas y novedosas de la invención reivindicada.

Los poxvirus se dividen en las subfamilias *Chordopoxvirinae* y *Entomopoxvirinae*, basadas en campo de hospedador vertebrado e insecto. La subfamilia *Chordopoxvirinae* está constituida por 8 géneros: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*,

Avipoxvirus, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, y *Yatapoxvirus*. El miembro prototípico del género *Orthopoxvirus* es el virus vaccinia.

Se han consignado secuencias genómicas completas para al menos un miembro de cada género de *Chordopoxvirus* y dos *Entomopoxvirus*. En todos los *Chordopoxvirus* se conservan aproximadamente 100 genes, y aproximadamente la mitad de éstos están presentes también en los *Entomopoxvirus*. Basándose en lo anterior, pueden hacerse varias generalizaciones: los genes son en gran parte no-solapantes, tienden a existir en bloques que apuntan hacia el extremo más próximo del genoma, están localizados usualmente en la región central si se conservan en gran parte y conciernen a funciones esenciales de replicación, y están localizados usualmente en las regiones extremas si son variables y están relacionados con interacciones del hospedador. La disposición de los genes centrales es notablemente similar en todos los chordopoxvirus. Una convención para la nomenclatura de los genes u ORFs (marcos de lectura abiertos) del virus vaccinia, originada antes de la secuenciación del genoma entero y utilizada subsiguientemente para la secuencia completa de la cepa Copenhagen del virus vaccinia, consiste en utilizar la letra del fragmento de DNA de la endonucleasa de restricción HindIII, seguida por el número de ORF (de izquierda a derecha) dentro del fragmento, y L o R, dependiendo de la dirección del ORF. Una excepción a esta regla se hizo para el fragmento HindIII C; los ORFs se enumeraron desde la derecha a fin de evitar el comienzo en el extremo altamente variable de la izquierda del genoma. Los nombres de los polipéptidos corresponden a los nombres de los genes, excepto que se suprime la L o R. en la mayoría de las secuencias subsiguientes del genoma completo de poxvirus, los ORFs se numeraron sucesivamente desde un extremo del genoma al otro. Sin embargo, las designaciones antiguas de letras se han mantenido como nombres comunes a fin de proporcionar continuidad en la bibliografía. El número de ORF de la cepa Western Reserve (WR) del virus vaccinia se indica comúnmente en los libros de referencia debido a que esta cepa ha sido utilizada para la gran mayoría de los estudios bioquímicos y genéticos.

Los inventores de una realización de la presente invención identificaron nuevos sitios para la inserción de secuencias de DNA exógenas en el genoma del virus vaccinia Ankara modificado (MVA). Los nuevos sitios de inserción están localizados en las regiones intergénicas (IGRs) del genoma viral, en donde las IGRs están, a su vez, localizadas entre o flanqueadas por los marcos de lectura abiertos (ORFs) 069-070 del genoma del MVA en la nomenclatura de CDC/Acambis.

De acuerdo con lo anterior, una realización de la invención se refiere a un MVA recombinante que comprende una secuencia heteróloga de DNA insertada en una IGR del genoma viral que está localizada entre, o flanqueada por los marcos de lectura abiertos (ORFs) 069-70 del genoma del MVA en la nomenclatura de CDC/Acambis.

Sorprendentemente, se encontró que las secuencias exógenas de DNA se mantienen insertadas de manera estable en las IGRs del genoma del MVA. El genoma del MVA debe considerarse como bastante inestable. Parece ser que los genes o secuencias de DNA no esenciales para la propagación del virus están delecionados o fragmentados. Aunque se encontró - por una parte - que se obtienen MVAs estables recombinantes cuando se insertan secuencias heterólogas de DNA en los sitios de deleción del genoma del MVA existentes naturalmente, se encontró por otra parte que a veces estos MVAs recombinantes son inestables. Por esta razón, podría llegarse a la conclusión de que sería de esperar que la inserción de secuencias heterólogas de DNA no esenciales para la propagación viral en los espacios entre los ORFs fuera delecionada asimismo por el virus.

Si bien la secuencia de nucleótidos de un ORF codifica una secuencia de aminoácidos que forman un péptido, polipéptido o proteína, las IGRs entre dos ORFs no tienen capacidad codificante alguna, pero pueden comprender elementos reguladores, sitios de fijación, secuencias promotoras y/o intensificadoras esenciales para o implicadas en el control de la transcripción de la expresión del gen viral. Por tanto, la IGR puede estar involucrada en el control de regulación del ciclo vital del virus. Sin embargo, los autores de la presente realización han demostrado también que los nuevos sitios de inserción tienen la ventaja inesperada de que pueden insertarse de manera estable secuencias exógenas de DNA en el genoma del MVA sin influir o cambiar las características típicas y la expresión génica del MVA. Los nuevos sitios de inserción son especialmente útiles, dado que no se ha alterado ningún ORF o secuencia codificante del MVA.

La secuencia de nucleótidos de un ORF comienza regularmente con un codón de partida y termina con un codón de parada. Dependiendo de la orientación de los dos ORFs adyacentes, la IGR, la región entre estos ORFs, está flanqueada por los dos codones de parada de los dos ORFs adyacentes, o bien por los dos codones de partida de los dos ORFs adyacentes, o bien por el codón de parada del primer ORF y el codón de comienzo del segundo ORF, o por el codón de comienzo del primer ORF y el codón de parada del segundo ORF.

De acuerdo con lo anterior, el sitio de inserción para la secuencia exógena de DNA en la IGR puede encontrarse aguas abajo o en posición 3' del codón de parada de un primer ORF. En el caso de que el ORF adyacente, denominado también segundo ORF, tenga la misma orientación que el primer ORF, este sitio de inserción aguas abajo del codón de parada del primer ORF se encuentra aguas arriba o en posición 5' del codón de comienzo del segundo ORF.

En el caso de que el segundo ORF tenga una orientación opuesta con relación al primer ORF, lo cual significa que la orientación de los dos ORFs adyacentes apunta uno hacia otro, entonces el sitio de inserción se encuentra aguas abajo de los codones de parada de ambos ORFs.

- 5 Como tercera alternativa, en el caso de que los dos ORFs adyacentes se lean en direcciones opuestas, pero la orientación de los dos ORFs adyacentes apunte en direcciones opuestas respecto al otro, lo que es sinónimo de un posicionamiento que se caracteriza porque los codones de comienzo de los dos ORFs son adyacentes uno a otro, entonces el DNA exógeno está insertado aguas arriba con relación a ambos codones de comienzo.

10 Los ORFs en el genoma del MVA se presentan en dos direcciones codificantes. Por consiguiente, la actividad de síntesis de mRNA tiene lugar de izquierda a derecha, es decir, en dirección hacia delante y, correspondientemente, de derecha a izquierda (dirección inversa). Es práctica común en poxvirología y se ha convertido en una clasificación estándar para los virus vaccinia identificar los ORFs por su orientación y su posición en los diferentes fragmentos de digestión por restricción con HindIII del genoma. Para la nomenclatura, los diferentes fragmentos de HindIII se nombran por letras mayúsculas descendentes correspondientes con su tamaño decreciente. Los ORFs se enumeran de izquierda a derecha en cada fragmento HindIII, y la orientación del ORF se indica con una mayúscula L (que representa la transcripción de derecha a izquierda) o R (que representa la transcripción de izquierda a derecha).
15 Adicionalmente, existe una publicación más reciente de la estructura del genoma del MVA, que utiliza una nomenclatura diferente, numerando simplemente el ORF del extremo izquierdo al extremo derecho del genoma e indicando su orientación con una L o R mayúscula (Antoine, G. et al., 1998 *Virology* 244: 365-396). Como ejemplo, el ORF I8R, de acuerdo con la nomenclatura antigua, corresponde al ORF 069R de acuerdo con Antoine et al.

20 En sus esfuerzos para producir recombinantes del virus vaccinia Ankara modificado (MVA) que expresen genes de HIV como vacunas candidato, los inventores han observado inestabilidad en la expresión de los genes de HIV. Los mismos han determinado que una de las causas de inestabilidad se debe a delecciones del gen extraño y el MVA flanqueante. Para resolver este problema, los inventores se propusieron insertar genes extraños entre los genes conservados a fin de evitar que ocurrieran delecciones viables en los MVAs recombinantes. Los virus que llevan tales delecciones presentan una ventaja de crecimiento y superarán por tanto a las poblaciones de virus rMVA. Si se insertan genes extraños entre los genes conservados en el genoma de vaccinia (se considera que estos genes son necesarios para la replicación del virus vaccinia y son por tanto "genes esenciales"), cualquier delección de un gen esencial inhibiría la replicación del virus y, por tanto, no superaría a los MVAs recombinantes. Así pues, la expresión estable de la población de rMVA se mantiene. La cepa de MVA que los inventores han estado utilizando para producir sus recombinantes fue proporcionada por ellos a los Centros para Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y fue secuenciada posteriormente por Acambis (número de acceso a GenBank AY603355). La cepa de MVA en la que Bavarian Nordic ha basado su publicación WO 03/097845 es una cepa de virus vaccinia Ankara modificada (número de acceso a GenBank U94848) secuenciada por Antoine, G. et al. 1998 *Virology* 244: 365-396. (Obsérvese que los números de genes en estas dos secuencias para un gen dado son diferentes.)

35 Los autores de la invención consideraron inicialmente los genes conservados en la familia Poxviridae así como aquellos genes conservados en la subfamilia Chordopoxvirinae (los poxvirus de vertebrados) (Upton C. et al. 2003 *Journal of Virology* 77: 7590-7600). Estos genes están enumerados en la nomenclatura del virus vaccinia de Copenhague (número de acceso a GenBank M35027) dada en el Poxvirus Bioinformatics Resource Center, que se encuentra en Internet en poxvirus.org. Estos genes totalizan 49 genes conservados en la familia Poxvirus y 41 genes adicionales conservados en los chordopoxvirus, lo que hace un total de 90 genes conservados. De estos 90 genes conservados, los inventores listaron sitios intergénicos entre pares de genes conservados. Estos pares de genes se enumeran en la **Tabla 1**. (Obsérvese que están marcados genes que no han sido incluidos en la publicación de Bavarian Nordic WO 03/097845). Las orientaciones de estos genes son variables, transcribiéndose algunos hacia la derecha, y algunos hacia la izquierda. Esto significa que algunos de los sitios intergénicos contienen promotores que tendrían que conservarse en la construcción del vector de inserción. Adicionalmente, para genes conservados solapantes, durante la construcción del vector los genes tendrían que reconstruirse utilizando codones alternativos para minimizar las secuencias de repetición.

50 Los inventores concentraron su atención en los genes conservados cuya orientación es "extremo a extremo" de tal modo que los codones de parada 3' de los genes están en proximidad estrecha uno a otro. La construcción de los vectores de transferencia utilizados en estos sitios se ve facilitada por el hecho de que en esta región no habría ningún promotor entre los codones de parada. Si existen nucleótidos intergénicos que separan los codones de parada, entonces la construcción del vector de inserción es directa. Si el codón de parada de un gen se encuentra dentro del extremo 3' del otro gen, entonces, durante la construcción del vector de transferencia del plásmido, el gen puede reconstruirse utilizando codones alternativos para minimizar las secuencias de repetición, o, dependiendo de la magnitud del solapamiento, corregirse simplemente en la PCR de los flancos a fin de no solaparse. La **Tabla 2** proporciona los sitios intergénicos que cumplen el requisito de que la orientación de los genes conservados sea "extremo a extremo". Los genes intergénicos resaltados en gris carecen de extremos solapantes y por consiguiente son más simples de construir.

60 Los inventores concentraron su atención específicamente en los 6 sitios intergénicos que carecen de extremos solapantes. En cuanto a la invención, éstos 6, eligieron el sitio intergénico, 069-070 070 (I8R-G1L), a fin de insertar su gen extraño.

Además de utilizar el requisito de los genes conservados arriba enumerados en la aplicación de Upton, para cualquier gen que se haya delecionado experimentalmente y cuya replicación del virus se haya reducido 10 veces en el mutante, este gen podría considerarse como un "gen esencial". Si este gen se encuentra adyacente a otro gen esencial o conservado, el sitio intergénico entre los dos genes podría considerarse como un sitio de inserción diferente para un gen extraño.

5

Tabla 1

Sitios Intergénicos entre Genes Conservados			
Genes/Copenhague	CDC/ Genes Acambis	Antoine et al. Genes	¿Publicado en la lista de WO03/097845? N = No
F9L-F10L		038L-039L	
F12L-F13L		042L-043L	N
F17R-E1L		047R-048L	N
E1L-E2L		048L-049L	N
E8R-E9L		055R-056L	
E9L-E10R		056L-057L	N
I1L-I2L		062L-063L	N
I2L-I3L		063L-064L	N
I5L-I6L		066L-067L	
I6L-I7L		067L-068L	N
I7L-I8R		068L-069R	N
I8R-G1L	069-070	069R-070L	N
G1L-G3L		070L-071L	N
G3L-G2R		071 L-072R	N
G2R-G4L		072R-073L	N
G4L-G5R		073L-074R	N
G5R-G5.5R		074R-075R	N
G5.5R-G6R		075R-076R	N
G6R-G7L		076R-077L	N
G7L-G8R		077L-078R	
G8R-G9R		078R-079R	
G9R-L1R		079R-080R	N
L1R-L2R		080R-081R	
L2R-L3L		081R-082L	
L3L-L4R		082L-083R	
L4R-L5R		083R-084R	N
L5R-J1R		084R-085R	N
J3R-J4R		087R-088R	N
J4R-J5L		088R-089L	
J5L-J6R		089L-090R	
J6R-H1L		090R-091L	N

ES 2 396 376 T3

(continuación)			
Genes/Copenhague	CDC/ Genes Acambis	Antoine et al. Genes	¿Publicado en la lista de WO03/097845? N = No
H1L-H2R		091L-092R	N
H2R-H3L		092R-093L	
H3L-H4L		093L-094L	N
H4L-H5R		094L-095R	
H5R-H6R		095R-096R	N
H6R-H7R		096R-097R	
H7R-D1R		097R-098R	
D1R-D2L		098R-099L	N
D2L-D3R		099L-100R	N
D3R-D4R		100R-101R	N
D4R-D5R		101R-102R	
D5R-D6R		102R-103R	N
D6R-D7R		103R-104R	
09R-D10R		106R-107R	N
D10R-D11L		107R-108L	
D11L-D12L		108L-109L	
D12L-D13L		109L-110L	
D13L-A1L		110L-111L	
A1L-A2L		111L-112L	N
A2L-A2.5L		112L-113L	N
A2.5L-A3L		113L-114L	
A3L-A4L		114L-115L	
A4L-A5R		115L-116R	
A5R-A6L		116R-117L	N
A6L-A7L		117L-118L	
A7L-A8R		118L-119R	
A8R-A9L		119R-120L	N
A9L-A10L		120L-121L	N
A10L-A11R		121L-122R	N
A11R-A12L		122R-123L	
A12L-A13L		123L-124L	
A13L-A14L		124L-125L	
A14L-A14.5L		125L-125.5L	N
A14.5L-A15L		125.5L-126L	N
A15L-A16L		126L-127L	N
A16L-A17L		127L-128L	N
A17L-A18R		128L-129R	N

(continuación)

Genes/Copenhague	CDC/ Genes Acambis	Antoine et al. Genes	¿Publicado en la lista de WO03/097845? N = No
A18R-A19L		129R-130L	N
A19L-A21L		130L-131L	N
A21L-A20R		131L-132R	N
A20R-A22R		132R-133R	N
A22R-A23R		133R-134R	
A23R-A24R		134R-135R	
A28L-A29L		139L-140L	N
A29L-A30L		140L-141L	N

Tabla 2

Genes conservados con orientación "extremo a extremo"

Genes extremo a extremo	Extremos solapantes	CDC/ Genes Acambis	Genes Antoine
F17R-E1L	Yes	049-050	047R-048L
E1R-F17L	No	051-052	053R-056L
S1R-G1L	No	071-072	069R-070L
G2R-G4L	Yes	074-075	072R-073L
G6R-G7L	Yes	078-079	076R-077L
L2R-L3L	Yes	083-084	081R-082L
L4R-L5L	No	090-091	088R-089L
J6R-H1L	Yes	092-093	090R-091L
H1R-J6L	No	094-095	092R-093L
D1R-D2L	Yes	100-101	098R-099L
D10R-D11L	No	109-110	107R-108L
A5R-A6L	Yes	118-119	116R-117L
A8R-A9L	Yes	121-122	119R-120L
A11R-A12L	No	131-132	122R-123L
A18R-A19L	Yes	132-133	129R-130L

5 Los genes representados en gris carecen totalmente de extremos solapantes y por consiguiente son más sencillos de utilizar como sitios intergénicos

De acuerdo con la presente invención, pueden insertarse secuencias de DNA heterólogas en una IGR del genoma del MVA que está localizada entre o flanqueada por los ORFs con orientación "extremo a extremo".

10 Las secuencias heterólogas o exógenas de DNA son secuencias que, en la naturaleza, no se encuentran asociadas normalmente con el poxvirus tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención. De acuerdo con una realización adicional de la presente invención, la secuencia exógena de DNA comprende al menos una secuencia codificante. La secuencia codificante está enlazada operativamente a un elemento de control de la transcripción, preferiblemente a un elemento poxviral de control de la transcripción. Adicionalmente, pueden utilizarse también combinaciones entre elementos de control de la transcripción poxvirales y, v.g., sitios de entrada de ribosoma internos.

15 De acuerdo con una realización adicional, la secuencia exógena de DNA puede comprender también dos o más secuencias codificantes enlazadas a uno o varios elementos de control de la transcripción. Preferiblemente, la secuencia codificante codifica una o más proteínas, polipéptidos, péptidos, antígenos extraños o epítopos antigénicos, especialmente los de genes terapéuticamente interesantes.

- Genes terapéuticamente interesantes de acuerdo con la presente invención pueden ser genes derivados de u homólogos a genes de microorganismos patógenos o infecciosos que son causantes de enfermedades. De acuerdo con ello, en el contexto de la presente invención tales genes terapéuticamente interesantes se presentan al sistema inmunitario de un organismo a fin de afectar, preferiblemente inducir, una respuesta inmune específica y, por consiguiente, vacunar o proteger profilácticamente el organismo contra una infección con el microorganismo. En realizaciones preferidas adicionales de la presente invención, los genes terapéuticamente interesantes se seleccionan de genes de virus infecciosos, v.g., - pero sin carácter limitante - el virus del dengue, el virus de la hepatitis B o C, o virus de la inmunodeficiencia humana tales como HIV. Si la secuencia heteróloga de DNA se deriva de HIV, la misma es preferiblemente HIV env.
- Adicionalmente, los genes terapéuticamente interesantes de acuerdo con la presente invención comprenden también genes relacionados con enfermedades, que tienen un efecto terapéutico sobre enfermedades de trastorno proliferativo, cáncer o enfermedades metabólicas. Por ejemplo, un gen terapéuticamente interesante relacionado con el cáncer podría ser un antígeno de cáncer que tenga la capacidad de inducir una reacción inmune anticáncer específica.
- De acuerdo con una realización adicional, la secuencia codificante comprende al menos un marcador o gen de selección.
- Los genes de selección transducen una resistencia particular a una célula, por lo cual se hace posible un cierto método de selección. El técnico experimentado está familiarizado con una diversidad de genes de selección, que pueden utilizarse en un sistema poxviral. Entre éstos se encuentran, v.g., el gen de resistencia a la neomicina (NPT) o el gen de fosforribosil-transferasa (gpt).
- Los genes marcadores inducen una reacción coloreada en las células transducidas, que puede utilizarse para identificar las células transducidas. El técnico experimentado está familiarizado con una diversidad de genes marcadores, que pueden utilizarse en un sistema poxviral. Entre éstos se encuentran el gen que codifica, v.g., β -galactosidasa (β -gal), β -glucosidasa (β -glu), la proteína verde fluorescente (EGFP) o la proteína fluorescente azul.
- De acuerdo con otra realización adicional, la secuencia exógena de DNA comprende una secuencia espaciadora, que separa el elemento de control de la transcripción poxviral y/o la secuencia codificante en la secuencia exógena de DNA del codón de parada y/o el codón de comienzo de los ORFs adyacentes. Esta secuencia espaciadora entre el codón de parada/comienzo del ORF adyacente y la secuencia codificante insertada en el DNA exógeno tiene la ventaja de estabilizar el DNA exógeno insertado y, por tanto, cualquier virus recombinante resultante. El tamaño de la secuencia espaciadora es variable con tal que la secuencia carezca de su propia función codificante o reguladora.
- De acuerdo con una realización adicional, la secuencia espaciadora que separa el elemento de control de la transcripción poxviral y/o la secuencia codificante en la secuencia exógena de DNA del codón de parada del ORF adyacente tiene al menos un nucleótido de longitud.
- De acuerdo con otra realización, la secuencia espaciadora que separa el elemento de control de la transcripción poxviral y/o la secuencia codificante en la secuencia exógena de DNA del codón de comienzo del ORF adyacente tiene al menos 30 nucleótidos. Particularmente, en los casos en que un elemento promotor típico del virus vaccinia se identifica aguas arriba de un codón de comienzo, la inserción del DNA exógeno puede no separar el elemento promotor del codón de comienzo del ORF adyacente. Un elemento promotor típico de vaccinia puede identificarse por escaneo para, v.g., la secuencia "TAAAT" para promotores tardíos (Davison & Moss, 1989 J. Mol. Biol.; 210:771-784) y un dominio rico en A/T para promotores tempranos. Una secuencia espaciadora de aproximadamente 30 nucleótidos es la distancia preferida para asegurar que un promotor poxviral localizado aguas arriba del codón de comienzo del ORF no se vea influenciado. Adicionalmente, de acuerdo con otra realización preferida, la distancia entre el DNA exógeno insertado y el codón de comienzo del ORF adyacente es alrededor de 50 nucleótidos, y más preferiblemente alrededor de 100 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización adicional, la secuencia espaciadora comprende un elemento de control de la transcripción poxviral adicional que es capaz de controlar la transcripción del ORF adyacente.
- Una cepa típica de MVA que puede utilizarse de acuerdo con la presente invención para generar un MVA recombinante es MVA 1274/NIH Clon 1, que ha sido depositada como ATCC Accession No.: PTA-5095 en fecha 27 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, Estados Unidos).
- El término "derivados" de un virus de acuerdo con la presente invención se refiere a virus de la progenie que muestran los mismos rasgos característicos que el virus parental, pero que presentan diferencias en una o más partes de su genoma. El término "derivado de MVA" describe un virus, que tiene las mismas características funcionales comparado con MVA. Por ejemplo, un derivado de MVA 1974/NIH Clon 1 tiene los rasgos característicos de MVA 1974/NIH Clon 1. Una de estas características de MVA 1974/NIH Clon 1 o derivados del mismo es su atenuación y su severa restricción en gama de hospedadores.

El MVA recombinante de acuerdo con la presente invención es útil como medicamento o vacuna. El mismo puede utilizarse para la introducción de la secuencia codificante exógena en una célula diana, siendo dicha secuencia homóloga o heteróloga respecto al genoma de la célula diana.

5 La introducción de una secuencia codificante exógena en una célula diana puede hacerse *in vitro* para producir proteínas, polipéptidos, péptidos, antígenos o epítopes antigénicos. Este método comprende la infección de una célula hospedadora con el MVA recombinante de acuerdo con la invención, cultivo de la célula hospedadora infectada en condiciones adecuadas, y aislamiento y/o enriquecimiento del polipéptido, péptido, proteína, antígeno, epítope y/o virus producido por dicha célula hospedadora.

10 Adicionalmente, el método para introducción de una o más secuencias homólogas o una o más secuencias heterólogas en las células puede aplicarse para terapia *in vitro* e *in vivo*. Para la terapia *in vitro*, células aisladas que han sido infectadas previamente (*ex vivo*) con el MVA recombinante de acuerdo con la invención se administran al cuerpo animal vivo para afectarlo, induciendo preferiblemente una respuesta inmune. Para la terapia *in vivo*, el poxvirus recombinante de acuerdo con la invención se administra directamente al cuerpo animal vivo para afectarlo, induciendo preferiblemente una respuesta inmune. En este caso, las células que rodean el sitio de inoculación, pero también aquellas células a las que el virus se transporta por vía, *v.g.*, del torrente sanguíneo, son infectadas directamente *in vivo* por el MVA recombinante de acuerdo con la invención. Después de la infección, estas células sintetizan las proteínas, péptidos o epítopes antigénicos de los genes terapéuticos, que son codificados por las secuencias codificantes exógenas y, subsiguientemente, presentan los mismos o partes de los mismos en la superficie celular. Las células especializadas del sistema inmune reconocen la presentación de tales proteínas, péptidos o epítopes heterólogos y lanzan una respuesta inmune específica.

Dado que el MVA tiene fuertemente restringido su crecimiento y, por tanto, está fuertemente atenuado, el mismo es útil para el tratamiento de una amplia gama de mamíferos con inclusión de los humanos, que incluye animales o humanos con sistema inmune comprometido. La presente invención proporciona también composiciones farmacéuticas y vacunas para inducir una respuesta inmune en un cuerpo animal vivo, con inclusión de un humano.

25 La composición farmacéutica puede incluir generalmente uno o más portadores, aditivos, antibióticos, conservantes, adyuvantes, diluyentes y/o estabilizadores farmacéuticamente aceptables y/o aprobados. Tales sustancias auxiliares pueden ser agua, solución salina, glicerol, etanol, agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH, o análogos. Portadores adecuados son típicamente moléculas grandes que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos polímeros, copolímeros de aminoácidos, agregados lipídicos, o análogos.

30 Para la preparación de vacunas, el poxvirus recombinante de acuerdo con la invención se convierte en una forma fisiológicamente aceptable. Esto puede hacerse basándose en la experiencia en la preparación de vacunas de poxvirus utilizadas para vacunación contra la viruela (como ha sido descrito por Stickl, H. et al., 1974 Dtsch Med Wochenschr. 99:2386-2392). Por ejemplo, el virus purificado se guarda a -80°C con un título de 5x10⁸ TCID₅₀/ml formulado en Tris aproximadamente 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. Para la preparación de dosis de vacuna, *v.g.*, se liofilizan 10E2-10E8 partículas del virus en 100 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) en presencia de 2% de peptona y 1% de albúmina humana en una ampolla, preferiblemente una ampolla de vidrio. Alternativamente, las dosis de vacuna pueden producirse por liofilización gradual del virus en una formulación. Esta formulación puede contener aditivos adicionales tales como manitol, dextrano, azúcar, glicina, lactosa o polivinilpirrolidona u otros adyuvantes tales como antioxidantes o gases inertes, estabilizadores o proteínas recombinantes (*v.g.*, seroalbúmina humana) adecuados para administración *in vivo*. La ampolla de vidrio se sella luego y puede guardarse entre 4°C y la temperatura ambiente durante varios meses. Sin embargo, mientras que no exista necesidad alguna, la ampolla se guarda preferiblemente a temperaturas inferiores a -20°C.

45 Para vacunación o terapia, el liofilizado puede disolverse en 0,1 a 0,5 ml de una solución acuosa, preferiblemente solución salina fisiológica o tampón Tris, o administrarse sea sistémica o localmente, *es decir*, por vías parenteral, subcutánea, intramuscular, por escarificación o cualquier otra vía de administración conocida por el técnico experimentado. El modo de administración, la dosis y el número de administraciones pueden ser optimizados por los expertos en la técnica de manera conocida. Sin embargo, en la mayoría de los casos un paciente se vacuna con una segunda dosis aproximadamente 1 mes a 6 semanas después de la primera dosis de vacunación.

50 La presente invención se refiere adicionalmente a vectores plasmídicos, que pueden utilizarse para generar MVA recombinante de acuerdo con la presente invención, y se refiere también a ciertas secuencias de DNA.

Regularmente, la IGR localizada entre o flanqueada por 2 ORFs adyacentes comprende secuencias de nucleótidos en las cuales puede insertarse la secuencia exógena de DNA de interés. Por consiguiente, el vector plasmídico de acuerdo con la presente descripción comprende una secuencia de DNA derivada de u homóloga al genoma del MVA, en donde dicha secuencia de DNA comprende un fragmento completo o parcial de una secuencia IGR localizada entre o flanqueada por dos ORFs adyacentes del genoma viral. Preferiblemente, el vector plasmídico comprende, insertado en dicha secuencia derivada de IGR al menos un sitio de clonación para la inserción de una secuencia exógena de DNA de interés y, preferiblemente, para la inserción de un elemento de control de la

transcripción poxviral enlazado operativamente a dicha secuencia heteróloga de DNA. Opcionalmente, el vector plasmídico comprende una casete de gen informador y/o gen de selección.

La secuencia derivada de IGR de la invención se selecciona como 071-072.

5 Las secuencias de DNA son preferiblemente derivadas de u homólogas al genoma del MVA depositado como ATCC Accession No.: PTA-5095 en fecha 27 de marzo de 2003 con la American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, Estados Unidos.

10 Para generar un vector plasmídico de acuerdo con la presente invención, las secuencias se aíslan y se clonan en un vector de clonación estándar, tal como pBluescript (Stratagene), en donde aquéllas flanquean el DNA exógeno a insertar en el genoma del MVA. Opcionalmente, un vector plasmídico de este tipo comprende una casete de gen de selección o gen informador, que puede deleccionarse del virus recombinante final, debido a una secuencia repetitiva incluida en dicha casete.

15 Los métodos para introducir secuencias exógenas de DNA por un vector plasmídico en un genoma del MVA y métodos para obtener MVA recombinante son bien conocidos por las personas expertas en la técnica y, adicionalmente, pueden deducirse de Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Segunda Edición, J. Sambrook, E.F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 y Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons Inc. 1998, capítulo 16, sección IV, "Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vectors".

El MVA de acuerdo con la presente invención puede producirse por transfección de una célula con un vector plasmídico de acuerdo con la presente invención, infección de la célula transfectada con un MVA y, subsiguientemente, identificación, aislamiento y, opcionalmente, purificación del MVA de acuerdo con la invención.

20 Las secuencias de DNA de acuerdo con la invención pueden utilizarse para identificar o aislar el MVA o sus derivados de acuerdo con la invención y células o individuos infectados con un MVA de acuerdo con la invención. Las secuencias de DNA se utilizan, v.g., para generar cebadores de PCR, sondas de hibridación, o se utilizan en tecnologías de redes.

Los HIVs y Su Replicación

25 El agente etiológico del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) está reconocido por ser un retrovirus que exhibe características típicas del género lentivirus, al que se hace referencia como virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Las relaciones filogenéticas de los lentivirus humanos se muestran en **Fig. 1**. HIV-2 está más estrechamente relacionado con SIV_{smm}, un virus aislado de monos tiznados Mangabey en su hábitat natural, que con HIV-1. Actualmente se cree que HIV-2 representa una transmisión zoonótica de SIV_{smm} al hombre. Una serie de
30 aislados lentivirales de chimpancés cautivos, designados SIV_{cpz}, son parientes genéticos cercanos de HIV-1.

Los primeros análisis filogenéticos de aislados de HIV-1 concentraron su atención en muestras de Europa/América del Norte y África; agrupaciones discretas de virus se identificaron de estas dos áreas del mundo. Subtipos o clados genéticos distintos de HIV-1 se definieron subsiguientemente y se clasificaron en 3 grupos: M (principal); O (aberrante); y N (no-M ni O) (**Fig. 2**). El grupo M de HIV-1, que incluye más del 95% de los aislados de virus
35 globales, está constituido por al menos 8 clados discretos (A, B, C, D, F, G, H y J), basados en la secuencia de los genomas virales completos. Miembros del grupo O de HIV-1 han sido recuperados de individuos que vivían en Camerún, Gabón, y Guinea Ecuatorial; sus genomas comparten menos de 50% de identidad con secuencias de nucleótidos que presentan los virus del grupo M. Las cepas de HIV-1 del grupo N descubiertas más recientemente han sido identificadas en individuos infectados de Camerún, no reaccionan serológicamente en el ensayo de
40 inmunosorbente unido a enzima (ELISA) del virus total estándar, pero son fácilmente detectables por análisis de transferencia Western convencionales.

El conocimiento más actual acerca de la variación genética de HIV-1 proviene de estudios de virus del grupo M de origen geográfico diverso. Los datos recogidos durante la última década indican que la población de HIV presente en un individuo infectado puede variar desde 6% a 10% en secuencia de nucleótidos. Aislados de HIV-1 dentro de un
45 clado pueden presentar distancias de nucleótidos de 15% en *gag* y hasta 30% en secuencias codificantes de gp120. La variación genética interclados puede oscilar entre 30% y 40% dependiendo del gen analizado.

La totalidad de los subtipos del grupo M de HIV-1 pueden encontrarse en África. Los virus del clado A son genéticamente los más divergentes y eran el subtipo más común de HN-1 en África al comienzo de la epidemia. Con la rápida propagación de HIV-1 al África del Sur durante medianos a últimos de los años 1990, los virus del clado C se han convertido en el subtipo dominante y dan cuenta actualmente del 48% de las infecciones de HIV-1 en todo el
50 mundo. Los virus del clado B, el subtipo de HIV-1 más intensamente estudiado, siguen siendo los aislados más prevalentes en Europa y América del Norte.

Las tasas elevadas de recombinación genética son un sello de los retrovirus. Inicialmente se creía que las infecciones simultáneas por cepas de virus genéticamente diversas no era probable que se establecieran en
55 individuos en riesgo para HIV-1. Hacia 1995, sin embargo, se hizo evidente que una fracción importante de la diversidad global del grupo M de HIV-1 incluía recombinantes virales interclado. Actualmente se percibe que se

encontrarán recombinantes de HIV-1 en áreas geográficas tales como África, América del Sur, y el Sudeste de Asia, donde coexisten subtipos múltiples de HIV-1 y pueden dar cuenta de más del 10% de las cepas de HIV-1 circulantes. Molecularmente, los genomas de estos virus recombinantes se asemejan a mosaicos de retazos, con segmentos de subtipos diversos de HIV-1 yuxtapuestos, que reflejan los eventos de cruzamiento múltiples que han contribuido a su generación. La mayoría de los recombinantes de HIV-1 han surgido en África y una mayor parte contiene segmentos derivados originalmente de virus del clado A. En Tailandia, por ejemplo, la composición de la cepa circulante predominantemente está constituida por un segmento del gen *gag* más *pol* del clado A y un gen *env* del clado E. Dado que el gen *env* del clado E en las cepas Thai HIV-1 es estrechamente afín al *env* del clado E presente en los aislados virales de la República Centroafricana, se cree que el evento original de recombinación ocurrió en África, con la introducción subsiguiente de un virus descendente en Tailandia. Es interesante que, hasta la fecha, no se ha informado de ningún aislado de longitud total de HIV-1 subtipo E (es decir, con genes de los subtipos E *gag*, *pol*, y *env*).

El descubrimiento de que los receptores de las quimioquinas α y β funcionan como correceptores para la fusión y entrada de virus en células susceptibles CD4⁺ ha conducido a un esquema de clasificación revisado para HIV-1 (**Fig. 3**). Los aislados pueden agruparse ahora sobre la base de la utilización de receptores de quimioquinas en ensayos de fusión en los cuales las proteínas correceptoras de HIV-1 gp120 y CD4⁺ se expresan en células separadas. Como se indica en **Fig. 3**, los aislados de HIV-1 que utilizan el receptor CXCR4 (designados ahora virus X4) son usualmente cepas de la línea de células T (TCL)-trópicas inductoras de sincitios (SI), mientras que aquéllos que utilizan exclusivamente el receptor CCR5 (virus R5) son predominantemente macrófagos (M)-trópicos y no inductores de sincitios (NSI). Las cepas duales-trópicas R5/X4, que pueden comprender la mayoría de los aislados de pacientes y exhiben un continuo de fenotipos trópicos, son frecuentemente SI.

Como sucede para todos los retrovirus competentes en replicación, los 3 productos de traducción primarios de HIV-1, todos ellos proteínas codificantes estructurales, se sintetizan inicialmente como precursores poliproteínicos, que son procesados subsiguientemente por proteasas virales o celulares en proteínas maduras asociadas a partículas (**Fig. 4**). El precursor de Gag de 55 kilodaltons Pr55^{Gag} se escinde en las proteínas de la matriz (MA), de la cápsida (CA), de la nucleocápsida (NC), y p6. La autocatálisis de la poliproteína de 160 kilodaltons Gag-Pol, Pr160^{Gag-Pol}, da lugar a la proteasa (PR), la transcriptasa inversa heterodímera (RT), y las proteínas integrasas (IN), mientras que la digestión proteolítica por una o más enzimas celulares convierte el precursor glicosilado gp160 de Env de 160 kilodaltons en los productos de escisión gp120 de la superficie (SU), y gp41 transmembranal (TM). Las 6 proteínas remanentes codificadas por HIV-1 (Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu y Nef) son los productos de traducción primarios de los mRNAs remodelados.

Gag

Las proteínas Gag de HIV, como las de otros retrovirus, son necesarias y suficientes para la formación de partículas no infecciosas semejantes al virus. Las proteínas Gag retrovirales se sintetizan generalmente como precursores poliproteínicos; el precursor gag de HIV-1 ha sido designado, basándose en su masa molecular aparente, Pr55^{Gag}. Como se ha indicado previamente, el mRNA para Pr55^{Gag} es el transcrito de 9,2 kb no remodelado (**Fig. 4**) que requiere Rev para su expresión en el citoplasma: cuando está presente el ORF *pol*, la proteasa (PR) viral escinde Pr55^{Gag} durante o poco después de la gemación de la célula para generar las proteínas Gag maduras p17 (MA), p24 (CA), p7 (NC), y p6 (véase **Fig. 4**). En el virión, MA está localizada inmediatamente dentro de la bicapa lipídica de la envoltura viral, CA forma la porción exterior de la estructura de núcleo de forma cónica en el centro de la partícula, y NC está presente en el centro de un complejo de ribonucleoproteína con el genoma viral del RNA (**Fig. 5**).

El precursor de HIV Pr55^{Gag} se oligomeriza después de su traducción y se direcciona a la membrana plasmática, donde se ensamblan partículas de tamaño y densidad suficientes que son visibles por EM. La formación de partículas semejantes a virus por Pr55^{Gag} es un proceso de autoensamblamiento, teniendo lugar interacciones críticas Gag-Gag entre dominios múltiples a lo largo del precursor de Gag. El ensamblaje de partículas semejantes a virus no requiere la participación de RNA genómico (aunque la presencia de ácido nucleico parece ser esencial), enzimas codificadas por *pol*, o glicoproteínas Env, pero la producción de viriones infecciosos requiere la encapsidación del genoma viral de RNA y la incorporación de las glicoproteínas Env y el precursor poliproteínico Gag-Pol Pr160^{Gag-Pol}.

Pol

Aguas abajo de *gag* se encuentra la región más altamente conservada del genoma de HIV, el gen *pol*, que codifica 3 enzimas: PR, RT, e IN (véase **Fig. 4**). RT e IN son necesarias, respectivamente, para la transcripción inversa del genoma de RNA viral en una copia bicatenaria de DNA, y para la integración del DNA viral en el cromosoma de la célula hospedadora. PR juega posteriormente un papel crítico en el ciclo vital por mediación de la producción de viriones infecciosos maduros. Los productos del gen *pol* se derivan por escisión enzimática de una proteína de fusión Gag-Pol de 160 kilodaltons, a la que se hace referencia como Pr160^{Gag-Pol}. Esta proteína de fusión se produce por cambio de marco ribosómico durante la traducción de Pr55^{Gag} (véase **Fig. 4**). El mecanismo de cambio de marco para la expresión de Gag-Pol, utilizado también por muchos otros retrovirus, asegura que las proteínas derivadas de *pol* se expresan a un nivel bajo, aproximadamente 5% a 10% del nivel de expresión de *gag*. Al igual que Pr55^{Gag}, el término N de Pr160^{Gag-Pol} está miristilado y direccionado a la membrana plasmática.

Proteasa

Estudios iniciales de pulso y caza realizados con retrovirus aviares indicaban claramente que las proteínas Gag retrovirales se sintetizan inicialmente como precursores poliproteínicos que se escinden para generar productos más pequeños. Estudios subsiguientes demostraron que la función de procesamiento es proporcionada por una enzima viral en lugar de una enzima celular, y que la digestión proteolítica de los precursores Gag y Gag-Pol es esencial para la infectividad del virus. El análisis de la secuencia de las PRs recombinantes indicaba que las mismas están relacionadas con proteasas celulares "aspárticas" tales como pepsina y renina. Además de estas enzimas celulares, las PRs retrovirales utilizan dos residuos Asp yuxtapuestos en el sitio activo para coordinarse a una molécula de agua que cataliza la hidrólisis de un enlace peptídico en la proteína diana. Al contrario que las proteasas aspárticas celulares, que funcionan como pseudodímeros (utilizando dos pliegues de la misma molécula para generar el sitio activo), las PRs retrovirales funcionan como dímeros verdaderos. Los datos cristalográficos de rayos X de la PR de HIV-1 indican que los dos monómeros se mantienen unidos en parte por una hoja β antiparalela de 4 cadenas derivada de ambos extremos N y C de cada monómero. El sitio de fijación de sustrato está localizado dentro de una hendidura formada entre los dos monómeros. Al igual que sus homólogos animales, el dímero HIV PR contiene "aletas" flexibles que cuelgan del sitio de fijación y pueden estabilizar el sustrato dentro de la hendidura; los sitios Asp del sitio activo se encuentran en el centro del dímero. Es interesante que, aunque se observa cierta homología limitada de aminoácidos alrededor de los residuos del sitio activo, las secuencias primarias de las PRs retrovirales son sumamente divergentes, si bien sus estructuras son notablemente similares.

Transcriptasa Inversa

Por definición, los retrovirus poseen la capacidad de convertir sus genomas de RNA monocatenario en DNA bicatenarios durante las últimas etapas del proceso de infección. La enzima que cataliza esta reacción es RT, en asociación con su actividad asociada de RNasaH. Las RTs retrovirales tienen 3 actividades enzimáticas: (a) polimerización de DNA dirigida al RNA (para síntesis de la cadena menos del DNA), (b) actividad de RNasaH (para la degradación del cebador tRNA y el RNA genómico presentes en los híbridos intermedios DNA-RNA), y (c) polimerización de DNA dirigida por el DNA para la síntesis de la segunda cadena de DNA o cadena más).

La holoenzima madura RT de HIV-1 es un heterodímero de subunidades de 66 y 51 kd. La subunidad de 51 kd (p51) se deriva de la subunidad de 66 kd (p66) por eliminación proteolítica del dominio RNasaH de 15 kd del terminal C de p66 por PR (véase **Fig. 4**). La estructura cristalina de la RT de HIV-1 revela un pliegue altamente asimétrico en donde las orientaciones de las subunidades p66 y p51 difieren sustancialmente. La subunidad p66 puede visualizarse como una mano derecha, con el sitio activo de la polimerasa en la palma, y una hendidura profunda de fijación de molde formada por la palma, los dedos, y subdominios de dedo pulgar. El dominio de polimerasa está ligado a la RNasaH por el subdominio de condensación. El sitio activo, localizado en la palma, contiene 3 residuos Asp críticos (110, 185 y 186) en proximidad estrecha, y dos iones Mg^{2+} coordinados. La mutación de estos residuos Asp anula la actividad de polimerización de RT. La orientación de los 3 residuos Asp del sitio activo es similar a la observada en otras DNA-polimerasas (v.g. el fragmento Klenow del DNA pol I de *E. coli*). La subunidad p51 parece ser rígida y no forma una hendidura de polimerización; Asp 110, 185 y 186 de esta subunidad están ocultos en el interior de la molécula. Aproximadamente 18 pares de bases del dúplex cebador-molde se encuentran en la hendidura de fijación de ácido nucleico, prolongándose desde el sitio activo de la polimerasa al dominio de RNasaH.

En la estructura RT-cebador-molde-dNTP, la presencia de un didesoxinucleótido en el extremo 3' del cebador permite la visualización del complejo catalítico capturado inmediatamente antes del ataque sobre el dNTP entrante. La comparación con estructuras obtenidas previamente sugiere un modelo por el cual los dedos se cierran para atrapar el molde y el dNTP antes del ataque nucleófilo del 3'-OH del cebador sobre el dNTP entrante. Después de la adición del dNTP entrante a la cadena en crecimiento, se ha propuesto que los dedos adoptan una configuración más abierta, liberando con ello el pirofosfato y permitiendo que la RT se fije al dNTP siguiente. La estructura de la RNasaH de HIV-1 ha sido determinada también por cristalografía de rayos X; este dominio exhibe un pliegue global similar al de la RNasaH de *E. coli*.

Integrasa

Un rasgo distintivo de la replicación de los retrovirus es la inserción de una copia de DNA del genoma viral en el cromosoma de la célula del hospedador después de la transcripción inversa. El DNA viral integrado (el provirus) sirve como molde para la síntesis de RNAs virales y se mantiene como parte del genoma de la célula hospedadora durante toda la vida de la célula infectada. Los mutantes retrovirales deficientes en la capacidad para integrarse no consiguen establecer generalmente una infección productiva.

La integración del DNA viral está catalizada por la integrasa, una proteína de 32 kd generada por escisión mediada por PR de la porción C-terminal de la poliproteína Gag-Pol de HIV-1 (véase **Fig. 4**).

Las proteínas retrovirales IN se componen de 3 dominios estructural y funcionalmente distintos: un dominio N-terminal que contiene dedos de cinc, un dominio central, y un dominio C-terminal relativamente no conservado. Debido a su baja solubilidad, no ha sido posible cristalizar hasta ahora la proteína de 288 aminoácidos IN de HIV-1 entera. Sin embargo, la estructura de los 3 dominios ha sido resuelta independientemente por métodos de

5 cristalografía de rayos X o NMR. La estructura cristalina del dominio central del virus del sarcoma aviar IN ha sido determinada. El dominio N-terminal (residuos 1 a 55), cuya estructura fue resuelta por espectroscopia NMR, se compone de 4 hélices con un cinc coordinado por los aminoácidos His-12, His-16 Cys-40, y Cys-43. La estructura del dominio N-terminal es reminiscente de las proteínas de fijación de DNA helicoidales que contienen un motivo denominado hélice-vuelta-hélice; sin embargo, en la estructura del HIV-1 este motivo contribuye a la formación de dímeros. Inicialmente, la escasa solubilidad dificultó los esfuerzos para resolver la estructura del dominio central. Sin embargo, los intentos de cristalografía alcanzaron éxito cuando se observó que un cambio de Phe a Lys en el residuo 185 IN aumentaba notablemente la solubilidad sin disrupción de la actividad catalítica *in vitro*. Cada monómero del dominio central IN de HIV-1 (residuos IN 50 a 212) está compuesto de una hoja β pentacatenaria flanqueada por hélices; esta estructura exhibe una analogía notable a otras polinucleotidil-transferasas que incluyen RNasaH y la transposasa MuA del bacteriófago. Tres residuos altamente conservados se encuentran en posiciones análogas en otras polinucleotidil-transferasas; en HIV-1 IN éstas son Asp-64, Asp-116 y Glu-152, el denominado motivo D,D-35-E. Las mutaciones en estas posiciones bloquean la función de HIV IN tanto *in vivo* como *in vitro*. La estrecha proximidad de estos 3 aminoácidos en la estructura del cristal tanto del virus del sarcoma aviar como de los dominios centrales de HIV-1 respalda la hipótesis de que estos residuos juegan un papel fundamental en la catálisis de la reacción de transferencia de polinucleotidilo que se encuentra en el corazón del proceso de integración. El dominio C-terminal, cuya estructura ha sido resuelta por métodos NMR, adopta una topología de pliegue pentacatenaria en barril B reminiscente de un dominio Src de homología 3 (SH3). Recientemente, se han resuelto las estructuras de rayos X de fragmentos de la proteína IN del virus SIV y el virus del sarcoma de Rous, que abarcan tanto el dominio central como el dominio C-terminal.

Env

Las glicoproteínas Env de HIV juegan un papel fundamental en el ciclo vital del virus. Las mismas contienen los determinantes que interaccionan con el receptor CD4 y el correceptor, y catalizan la reacción de fusión entre la bicapa lipídica de la envoltura viral y la membrana plasmática de la célula hospedadora. Adicionalmente, las glicoproteínas Env de HIV contienen epítopes que provocan respuestas inmunes que son importantes desde ambas perspectivas de diagnóstico y de desarrollo de vacunas.

La glicoproteína Env del HIV se sintetiza a partir del mRNA bicistrónico Vpu/Env de 4,3 kb remodelado una sola vez (véase **Fig. 4**); la traducción ocurre en ribosomas asociados con el retículo endoplasmático rugoso (ER). El precursor de la poliproteína de 160 kd (gp160) es una proteína integral de membrana que está anclada a las membranas celulares por una señal hidrófoba de interrupción de la transferencia en el dominio destinado para ser la glicoproteína Env TM madura, gp41 (**Fig. 6**). El gp160 está glicosilado cotraduccionalmente, forma enlaces disulfuro, y sufre oligomerización en el ER. La forma oligómera predominante parece ser un trímero, aunque se observan también dímeros y tetrámeros. El gp160 es transportado al Golgi, donde, al igual que otras proteínas precursoras de la envoltura retroviral, es escindido proteolíticamente por las enzimas celulares al gp120 de la glicoproteína SU madura y a la glicoproteína TM gp41. (véase **Fig. 6**). La enzima celular responsable de la escisión de los precursores retrovirales de Env que sigue a un motivo Lys/Arg-X-Lys/Arg-Arg altamente conservado es furina o una proteasa semejante a furina, aunque otras enzimas pueden catalizar también el procesamiento de gp160. La escisión de gp160 es necesaria para la actividad de fusión inducida por Env y la infectividad del virus. Subsiguientemente a la escisión de gp160, gp120 y gp41 forman una asociación no covalente que es crítica para el transporte del complejo Env desde el Golgi a la superficie de la célula. La interacción gp120-gp41 es bastante débil, y una cantidad sustancial de gp120 se desprende de la superficie de las células que expresan Env.

El complejo de glicoproteínas Env de HIV, en particular el dominio SU (gp120), está glicosilado muy fuertemente; aproximadamente la mitad del peso molecular de gp160 se compone de cadenas laterales de oligosacáridos. Durante el transporte de Env desde su sitio de síntesis en el ER a la membrana plasmática, muchas de las cadenas laterales son modificadas por la adición de azúcares complejos. Las numerosas cadenas laterales de oligosacáridos forman lo que podría imaginarse como una nube de azúcar, oscureciendo gran parte del gp120 contra el reconocimiento inmune del hospedador. Como se muestra en Fig. 6, gp120 contiene dominios conservados (C₁ a C₅) y variables (V₁ a V₅) intercalados. Los residuos Cys presentes en los gp120s de diferentes aislados están altamente conservados y forman enlaces disulfuro que unen las cuatro primeras regiones variables en bucles grandes.

Una función primaria de las glicoproteínas Env virales es promover una reacción de fusión de membranas entre las bicapas lipídicas de las membranas de la envoltura viral y la célula del hospedador. Este evento de fusión membranar permite que el centro viral logre entrar en el citoplasma de la célula hospedadora. Han sido implicadas varias regiones tanto en gp120 como en gp41, directa o indirectamente, en la fusión membranar mediada por Env. Estudios de la proteína hemaglutinina HA₂ de los ortomixovirus y la proteína F de los paramixovirus indicaron que un dominio fuertemente hidrófobo en el término N de estas proteínas, al que se hace referencia como el péptido de fusión, juega un papel crítico en la fusión membranar. Los análisis de mutaciones demostraron que un dominio análogo estaba localizado en el término N de las glicoproteínas TM de HIV-1 HIV-2, y SIV (véase **Fig. 6**). Sustituciones no hidrófobas en esta región de gp41 reducían notablemente o bloqueaban la formación de sincitios y daban como resultado la producción de viriones no infecciosos de la progenie.

En posición C-terminal al péptido de fusión gp41 se encuentran dos dominios anfipáticos helicoidales (véase **Fig. 6**) que juegan un papel fundamental en la fusión membranal. Las mutaciones en la hélice N-terminal (a la que se hace referencia como hélice N), que contiene un motivo de repetición de heptada semejante a una cremallera de Leu, deterioran la infectividad y actividad de fusión membranal, y los péptidos derivados de estas secuencias exhiben una actividad antiviral potente en cultivo. La estructura del ectodominio de HIV-1 y SIV gp41, los dos motivos helicoidales en particular, ha sido el foco de análisis estructurales en los últimos años. Las estructuras se determinaron por cristalografía de rayos X o espectroscopia NMR, sea para proteínas de fusión que contenían los dominios helicoidales, una mezcla de péptidos derivados de las hélices N y C, o en el caso de la estructura de SIV, la secuencia intacta del ectodominio gp41 desde el residuo 27 al 149. Estos estudios obtuvieron fundamentalmente estructuras trímeras similares, en las cuales los dos dominios helicoidales están empaquetados en una modalidad antiparalela para generar un haz de 6 hélices. Las hélices N forman un serpentín enrollado en el centro del haz, estando empaquetadas las hélices C en hendiduras hidrófobas en el exterior.

En los pasos que conducen a la fusión membranal, la fijación de CD4 induce cambios de conformación en Env que facilitan la fijación de correceptores. Después de la formación de un complejo ternario gp120/CD4/correceptor, gp41 adopta una conformación hipotética que permite que el péptido de fusión se inserte en la bicapa lipídica diana. La formación del haz de 6 hélices gp41 (que implica interacciones antiparalelas entre las hélices N y C de gp41) en las membranas viral y celular y tiene lugar la fusión membranal.

Uso de Virus MVA Recombinante para Reforzar la Respuesta Inmune de las Células CD+8

La presente invención se refiere a la generación de una respuesta inmune de las células T CD8⁺ contra un antígeno, así como a la provocación de una respuesta de anticuerpos. Más particularmente, la presente invención se refiere a regímenes de inmunización "de cebado y refuerzo" en los cuales la respuesta inmune inducida por la administración de una composición cebadora se refuerza por la administración de una composición reforzante. La presente invención está basada en la demostración experimental previa de que puede conseguirse un refuerzo eficaz utilizando vectores vaccinia Ankara modificados (MVA), después de cebado con cualquiera de una diversidad de tipos diferentes de composiciones cebadoras que incluyen MVA recombinante propiamente dicho.

Un componente protector principal de la respuesta inmune contra varios patógenos está mediado por linfocitos T del tipo CD8⁺, conocidos también como linfocitos T citotóxicos (CTL). Una fracción importante de las células CD8⁺ es la secreción de interferón gamma (IFN γ), y este proporciona una medida de la respuesta inmune de las células T CD8⁺. Un segundo componente de la respuesta inmune es un anticuerpo dirigido contra las proteínas del patógeno.

La presente invención emplea MVA que, como demuestran experimentos anteriores, se ha encontrado que es un medio eficaz para proporcionar un reforzamiento a una respuesta inmune de las células T CD8⁺ cebadas para el antígeno utilizando cualquiera de una diversidad de composiciones cebadoras diferentes y provocando también una respuesta de anticuerpos.

Resulta interesante que un trabajo experimental anterior demuestra que el uso de predecesores de la presente invención permite que un virus MVA recombinante que expresa un antígeno de HIV refuerce una respuesta inmune de las células T CD8⁺ cebada por una vacuna de DNA, provocando también una respuesta de anticuerpos. Puede encontrarse que el MVA induce una respuesta de células T CD8⁺ después de inmunización. Puede demostrarse también que MVA recombinante ceba una respuesta inmune que es reforzada por una o más inoculaciones de MVA recombinante.

Primates no humanos inmunizados con DNA plasmídico y reforzados con la MVA resultaban protegidos eficazmente contra el enfrentamiento exposición intramucosal con virus vivo (Amara et al. 2001, Science 292: 69-74). Ventajosamente, los inventores contemplan que puede emplearse un régimen de vacunación utilizando inmunización intradérmica, intramuscular o mucosal tanto para cebado como para refuerzo, constituyendo un régimen de inmunización general adecuado para inducir las células T CD8⁺ y provocando también una respuesta de anticuerpos, v.g., en humanos.

En diversos aspectos y realizaciones, la presente invención emplea un vector de MVA que codifica un antígeno de HIV para reforzar una respuesta inmune de las células T CD8⁺ al antígeno cebado por la administración previa de ácido nucleico codificante del antígeno y provocar también una respuesta de anticuerpos.

Un aspecto general de la presente invención proporciona el uso de un vector MVA para reforzar una respuesta inmune de las células T CD8⁺ a un antígeno de HIV y provocar también una respuesta de anticuerpos.

Un aspecto de la presente invención proporciona un método de reforzamiento de la respuesta inmune de las células T CD8⁺ a un antígeno de HIV en un individuo, y provocar también una respuesta de anticuerpos, incluyendo el método la provisión en el individuo de un vector de MVA que incluye ácido nucleico codificante del antígeno, enlazado operativamente a secuencias reguladoras para la producción de antígeno en el individuo por expresión del ácido nucleico, por el cual se refuerza una respuesta inmune de las células T CD8⁺ al antígeno cebado previamente en el individuo.

Una respuesta inmune a un antígeno de HIV puede ser cebada por inmunización con DNA plasmídico o por infección con un agente infeccioso.

5 Un aspecto adicional de la invención proporciona un método de inducción de una respuesta inmune de las células T CD8⁺ a un antígeno de HIV en un individuo, provocando también una respuesta de anticuerpos, comprendiendo el método administrar al individuo una composición cebadora que comprende ácido nucleico que codifica el antígeno y administrando luego una composición reforzante que comprende un vector de MVA que incluye ácido nucleico codificante del antígeno enlazado operativamente a secuencias reguladoras para producción de antígeno en el individuo por expresión del ácido nucleico.

10 Un aspecto adicional proporciona el uso de un vector de MVA, como se describe, en la fabricación de un medicamento para administración a un mamífero a fin de reforzar una respuesta inmune de las células T CD8⁺ a un antígeno HIV, provocando también una respuesta de anticuerpos. Un medicamento de este tipo está destinado generalmente a administración después de la administración previa de una composición cebadora que comprende ácido nucleico codificante del antígeno.

15 La composición cebadora puede comprender DNA codificante del antígeno, encontrándose dicho DNA preferiblemente en la forma de un plásmido circular que no es capaz de replicarse en células de mamífero. Cualquier marcador seleccionable no debería ser resistente a un antibiótico utilizado clínicamente; así, por ejemplo, se prefiere la resistencia a Kanamicina a la resistencia a Ampicilina. La expresión del antígeno debería estar impulsada por un promotor que sea activo en células de mamífero, por ejemplo el promotor inmediato temprano de citomegalovirus (CMV IE).

20 En realizaciones particulares de los diversos aspectos de la presente invención, la administración de una composición cebadora va seguida por reforzamiento con una composición reforzante, o composiciones de refuerzo primera y segunda, siendo las composiciones de refuerzo primera y segunda iguales o diferentes una de otra. Otras composiciones de refuerzo adicionales pueden emplearse sin apartarse de la presente invención. En una realización, un régimen de inmunización triple emplea DNA, a continuación adenovirus como primera composición
25 cebadora, seguido por MVA como una segunda composición reforzante, seguida opcionalmente por una composición cebadora ulterior (tercera) o administración reforzante subsiguiente de uno u otro o ambos vectores iguales o diferentes. Otra opción es DNA seguido por MVA, seguido a su vez por adenovirus, seguido opcionalmente por administración de refuerzo subsiguiente de uno u otro o ambos vectores iguales o diferentes.

30 El antígeno a codificar en las composiciones respectivas de cebado y refuerzo (sin embargo se emplean muchas composiciones de refuerzo) no precisa ser idéntico, pero debe compartir al menos un epítipo de las células T CD8⁺. El antígeno puede corresponder a un antígeno completo, o un fragmento del mismo. Pueden emplearse epítopos peptídicos o cadenas artificiales de epítopos, cortando más eficientemente una secuencia innecesaria de proteína en el antígeno y la secuencia codificante en el vector o vectores. Pueden incluirse uno o más epítopos adicionales, por ejemplo epítopos que sean reconocidos por las células T adyuvantes, especialmente epítopos reconocidos en
35 individuos de diferentes tipos HLA.

Un antígeno de HIV de la invención a codificar por un virus MVA recombinante incluye polipéptidos que tienen actividad inmunógena provocada por una secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de HIV Env, Gag, Pol, Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu, o Nef como al menos un epítipo de las células T CD8⁺. Esta secuencia de aminoácidos se corresponde sustancialmente con al menos un fragmento de 10-900 aminoácidos y/o secuencia de consenso de un Env o Pol de HIV conocido; o al menos un fragmento de 10-450 aminoácidos y/o secuencia de consenso de un Gag de HIV conocido; o al menos un fragmento de 10-100 aminoácidos y/o secuencia de consenso de un Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu, o Nef de HIV conocido.

40 Aunque se presenta una secuencia precursora de Env de longitud total para uso en la presente invención, Env está opcionalmente delecionado de las subsecuencias. Por ejemplo, pueden estar delecionados regiones de la superficie de gp120 y productos de escisión transmembranales de gp41.

Aunque se presenta una secuencia precursora de Gag de longitud total para uso en la presente invención, Gag esta delecionado opcionalmente de las subsecuencias. Por ejemplo, pueden estar delecionadas regiones de la proteína matriz (p17), regiones de la proteína de la cápsida (p24), regiones de la proteína de la nucleocápsida (p7), y regiones de p6 (el péptido C-terminal de la poliproteína Gag).

50 Aunque se presenta una secuencia precursora Pol de longitud total para uso en la presente invención, Pol esta delecionado opcionalmente de las subsecuencias. Por ejemplo, pueden estar delecionadas regiones de la proteína proteasa (p10), regiones de la proteína transcriptasa inversa (p66/p51), y regiones de la proteína integrasa (p32).

Una Env, Gag o Pol de HIV de este tipo puede tener identidad global de al menos 50% con respecto a una secuencia de aminoácidos de la proteína Env, Gag o Pol, tal como identidad de 50-99%, o cualquier intervalo o valor comprendido entre ellos, provocando al mismo tiempo una respuesta inmunógena contra al menos una cepa de un HIV.

El porcentaje de identidad puede determinarse, por ejemplo, por comparación de la información de secuencia utilizando el programa de computadora GAP, versión 6.0, disponible del Grupo de Computadoras de Genética de la Universidad de Wisconsin (UWGCG). El programa GAP utiliza el método de alineación de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 1970 48:443), como ha sido revisado por Smith y Waterman (Adv Appl Math 1981 2:482). Brevemente, el programa GAP define la identidad como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son idénticos, dividido por el número total de símbolos de la más corta de las dos secuencias. Los parámetros preferidos por defecto para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unitaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no-identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribsov y Burgess (Nucl. Acids Res 1986 14:6745), como ha sido descrita por Schwartz y Dayhoff (editores, Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. 1979, pp. 353-358); (2) una penalidad de 3,0 por cada laguna y una penalidad adicional de 0,10 por cada símbolo en cada laguna; y (3) sin penalidad para los lagunas en los extremos.

En una realización preferida, una Env de la presente invención es una forma variante de al menos una proteína de la envoltura de HIV. Preferiblemente la Env está compuesta de gp120 y el gp41 que abarca la membrana y el ectodominio, pero carece de parte o la totalidad del dominio citoplásmico de gp41.

Secuencias conocidas de HIV están disponibles fácilmente de bases de datos de secuencias de HIV comerciales e institucionales, tales como GENBANK, o como compilaciones publicadas, tales como Myers et al. eds., Human Retroviruses and AIDS, A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences, Vols. I y II, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, N. Mex. (1993), o en Internet en hiv-web.lanl.gov/.

Las sustituciones o inserciones de una Env, Gag o Pol de HIV para obtener una Env, Gag o Pol de HIV adicional, codificadas por un ácido nucleico para uso en un virus de MVA recombinante de la presente invención, pueden incluir sustituciones o inserciones de al menos un residuo de aminoácido (v.g., 1-25 aminoácidos). Alternativamente, al menos un aminoácido (v.g., 1-25 aminoácidos) puede deleccionarse de una secuencia Env, Gag o Pol de HIV. Preferiblemente, tales sustituciones, inserciones o delecciones se identifican basándose en características de seguridad, niveles de expresión, inmunogenicidad y compatibilidad con tasas de replicación altas de MVA.

Pueden prepararse variaciones en la secuencia de aminoácidos en una Env, Gag o Pol de HIV de la presente invención, v.g., por mutaciones en el DNA. Tales Env, Gag o Pol de HIV incluyen, por ejemplo, delecciones, inserciones o sustituciones de nucleótidos que codifican diferentes residuos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos. Obviamente, las mutaciones que se harán en el ácido nucleico codificante de una Env, Gag o Pol de HIV no deben poner la secuencia fuera del marco de lectura, y preferiblemente no crearán dominios complementarios que pudieran producir estructuras de mRNA secundarias.

El ácido nucleico codificante de Env, Gag o Pol de HIV de la presente invención puede prepararse también por amplificación o mutagénesis orientada de nucleótidos en DNA o RNA codificante de una Env, Gag o Pol de HIV y síntesis o transcripción inversa subsiguiente del DNA codificante para producir DNA o RNA codificante de una Env, Gag o Pol de HIV, basándose en la doctrina y las directrices presentadas en esta memoria.

Los virus de MVA recombinantes que expresan Env, Gag o Pol de HIV de la presente invención incluyen un conjunto finito de secuencias codificantes de Env, Gag o Pol de HIV como nucleótidos de sustitución que pueden ser obtenidos rutinariamente por una persona con experiencia ordinaria a la técnica sin experimentación excesiva, basándose en la doctrina y las orientaciones presentadas en esta memoria. Para una descripción detallada de química y estructura de las proteínas, véase Schulz, G.E. et al., 1978 Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, Nueva York, N.Y., y Creighton, T.E., 1983 Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, CA. Para una presentación de sustituciones de secuencias de nucleótidos, tales como p0referencias de codones, véase Ausubel et al. eds. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc., Nueva York, N.Y. 1994 en §§ A.1.1-A.1.24, y Sambrook, J. et al. 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. en los Apéndices C y D.

Así pues, una persona con experiencia ordinaria a la técnica, dadas la doctrina y orientaciones presentadas en esta memoria, conocerá el modo de sustituir otros residuos de aminoácidos en otras posiciones de un DNA o RNA de *env*, *gag* o *pol* de HIV para obtener Env, Gag o Pol de HIV alternativas, con inclusión de variantes por sustitución, delección o inserción.

Dentro del vector de MVA, secuencias reguladoras para la expresión del antígeno codificado incluirán un promotor. Por "promotor" se entiende una secuencia de nucleótidos a partir de la cual puede iniciarse la transcripción de DNA enlazado operativamente aguas abajo (es decir, en la dirección 3' en la cadena sentido del DNA bicatenario). "Enlazado operativamente" significa unido como parte de la misma molécula de ácido nucleico, posicionado adecuadamente y orientado para que se inicie la transcripción a partir del promotor. El DNA enlazado operativamente a un promotor se encuentra "bajo regulación de la iniciación transcripcional" del promotor. Otras secuencias reguladoras que incluyen fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, genes marcadores y otras secuencias pueden incluirse en caso apropiado, de acuerdo con el conocimiento y la práctica de la persona con experiencia ordinaria en la técnica: véase, por ejemplo, Moss, B. (2001). Poxviridae: the viruses and their replication. En Fields Virology, D.M. Knipe, y P.M. Howley, eds. (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins), pp.

2849-2883. Muchas técnicas y protocolos conocidos para manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de DNA en células y expresión de genes, así como análisis de proteínas, se describen en detalle en Current Protocols in Molecular Biology, 1998, Ausubel et al. editores., John Wiley & Sons.

- 5 Los promotores para uso en aspectos y realizaciones de la presente invención pueden ser compatibles con sistemas de expresión de poxvirus e incluyen secuencias naturales, modificadas y sintéticas.

Una cualquiera o ambas de las composiciones de cebado y refuerzo pueden incluir un adyuvante, tal como el factor estimulante de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF) o el ácido nucleico codificante del mismo.

- 10 La administración de la composición reforzante se realiza por regla general aproximadamente 1 a 6 meses después de la administración de la composición cebadora, con preferencia aproximadamente 1 a 3 meses.

Preferiblemente, la administración de la composición cebadora, la composición reforzante, o ambas composiciones cebadora y reforzante, es inmunización intradérmica, intramuscular o mucosal.

- 15 La administración de vacunas de MVA puede realizarse utilizando una aguja para inyectar una suspensión del virus. Una alternativa es el uso de un dispositivo de inyección sin aguja para administrar una suspensión de virus (utilizando, v.g., el inyector sin aguja Biojector™) o un polvo liofilizado resuspendido que contiene la vacuna, que hace posible la producción de dosis preparadas individualmente, que no precisan almacenamiento en frío. Esto representaría una gran ventaja para una vacuna que es necesaria en las áreas rurales de África.

- 20 MVA es un virus con un registro de seguridad excelente en inmunizaciones humanas. La generación de virus recombinantes puede realizarse sencillamente, y los mismos se pueden fabricar de manera reproducible en grandes cantidades. La administración intradérmica, intramuscular o mucosal del virus MVA recombinante es por consiguiente sumamente adecuada para vacunación profiláctica o terapéutica de humanos contra el SIDA que puede ser controlada por una respuesta de las células T CD8⁺.

El individuo puede padecer SIDA, con lo que el suministro del antígeno y la generación de una respuesta inmune de las células T CD8⁺ al antígeno son beneficiosos o tienen un efecto terapéuticamente beneficioso.

- 25 Muy probablemente, la administración tendrá finalidad profiláctica para generar una respuesta inmune contra HIV o SIDA antes de la infección o el desarrollo de los síntomas.

- 30 Los componentes a administrar de acuerdo con la presente invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender un excipiente, portador, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales materiales deberían ser no tóxicos y no deberían interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del portador u otro material puede depender de la ruta de administración, v.g., las rutas intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, o intraperitoneal.

Como se ha indicado, la administración es preferiblemente intradérmica, intramuscular o mucosal.

- 35 Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

- 40 Para inyección intravenosa, cutánea, subcutánea, intramuscular o mucosal, o inyección en el sitio de la afección, el ingrediente activo se encontrará en la forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está exenta de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Las personas con experiencia relevante en la técnica son perfectamente capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, inyección de Ringer Lactada. En caso requerido, pueden incluirse, conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos.

Puede emplearse una formulación de liberación lenta.

- 45 Después de la producción de las partículas de MVA y formulación opcional de tales partículas en composiciones, las partículas pueden administrarse a un individuo, particularmente un humano u otro primate. La administración puede realizarse a otro mamífero, v.g. un roedor tal como ratón, rata o hámster, cobayo, conejo, oveja, cabra, cerdo, caballo, vaca, burro, perro o gato.

- 50 La administración se realiza preferiblemente en una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según sea el caso, aunque la profilaxis puede considerarse terapia) siendo ésta suficiente para beneficiar al individuo. La cantidad real administrada, y la tasa de evolución temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad del problema que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, v.g., decisiones acerca de dosificación, etc, está dentro de la responsabilidad de los médicos generalistas y otros doctores en medicina, o en un contexto veterinario de un técnico veterinario, y típicamente tiene en cuenta el trastorno a tratar, el estado del paciente individual, el punto de suministro, el método de administración y otros

factores conocidos por los expertos. Ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, edición 16ª, 1980, Osol, A. (Edit.).

En un régimen preferido, el DNA se administra a una dosis de 300 µg a 3 mg/inyección, seguido por MVA a una dosis de 10⁶ a 10⁹ partículas infecciosas de virus/inyección.

- 5 Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, sea simultánea o secuencialmente dependiendo de la afección a tratar.

El suministro a un mamífero no humano no precisa ser para un propósito terapéutico, sino que puede ser para uso en un contexto experimental, por ejemplo, en la investigación de mecanismos de respuestas inmunes a un antígeno de interés, v.g., protección contra HIV o SIDA.

- 10 Un plásmido lanzadera, constructo recombinante de vacuna clínica MVA/ HIV 1 y mecanismo para retención de inserciones de genes extraños intactos en MVA recombinante por alteración de codones del gen extraño e inserción del gen extraño entre dos genes esenciales del virus vaccinia.

La invención proporciona mecanismos para:

- retención de genes extraños intactos por inserción de los mismos entre dos genes de virus vaccinia que son esenciales para la replicación del MVA. La delección del gen extraño puede proporcionar una ventaja significativa de crecimiento para el MVA recombinante permitiendo que el mismo compita con MVA que contiene el gen extraño intacto después de sometimiento a pases repetidos. Sin embargo, la mayoría de las delecciones de un gen extraño incluyen la pérdida de alguna parte del DNA del virus vaccinia flanqueante. Si el DNA del virus vaccinia es esencial, entonces dichos virus con delecciones no se replicarán y competirán con el MVA que contiene el gen extraño intacto. Esta metodología será útil en la producción de virus vaccinia recombinantes que tienen que amplificarse en gran escala por ejemplo para utilización en pruebas clínicas, y
- estabilización de inserciones de genes extraños por alteración de "puntos calientes" específicos que en caso contrario sufren fácilmente mutación después de sometimiento a pases repetidos del virus recombinante. Esta metodología es útil en la producción de virus recombinantes que tienen que amplificarse en gran escala por ejemplo para uso en pruebas clínicas.

Y describe:

- el plásmido lanzadera, pLW-73, utilizado para inserción de un gen extraño entre dos genes esenciales del virus vaccinia; y
- el constructo MVA/UGD4d de vacuna clínica recombinante MVA/HIV-1, un material que incorpora el uso de estos dos mecanismos.

Nuevos Métodos para Generación de Virus MVA Recombinantes Estables

Los autores de la invención han obtenido recombinantes del virus vaccinia Ankara modificado (MVA) que expresan los genes env y gagpol a partir de aislados de HIV-1 de diferentes localizaciones geográficas.

...

- 35 Los genes extraños se insertaron en 2 sitios, Delección II y Delección III de MVA. Se ha demostrado que la estabilidad de estos genes después de pases repetidos de MVA recombinante en cultivo de tejidos es variable. Los inventores demostraron que la inestabilidad era debida, o bien a delección del gen extraño entero y algo de DNA flanqueante, o a mutaciones puntuales específicas que daban como resultado la propagación de viriones de la progenie que tienen una ventaja de crecimiento debido a que no expresan el gen extraño. En este caso los inventores describen dos nuevos métodos de retención del MVA recombinante del gen extraño intacto. En primer lugar, los inventores construyeron un vector de transferencia que dirige la inserción de un gen extraño entre 2 genes esenciales del virus vaccinia en la región central conservada del genoma. El uso de este sitio para inserción de genes evita el desarrollo de variantes que contengan grandes delecciones que incluyen el DNA esencial del virus vaccinia. Adicionalmente, este plásmido puede utilizarse para inserción de genes adicionales en virus recombinantes. En segundo lugar, el análisis de aislados con mutaciones puntuales reveló ciertos "puntos calientes" con propensión para la inserción o delección una sola base que cause terminación prematura durante la traducción. Los inventores demostraron que la generación de mutaciones silenciosas en estos sitios daba como resultado la estabilización del gen insertado.

I. Construcción y aplicación del nuevo vector de transferencia

Construcción del nuevo vector de transferencia, pLW-73

- 50 1. La región central del genoma del MVA, K7R-A24R, se examinó respecto a 1) pares de genes conservados en la familia poxvirus o la subfamilia Chordopoxvirus y 2) genes que se encuentran en dirección opuesta de tal modo que sus extremos 3' están en proximidad estrecha, proporcionando con ello un sitio de inserción que podría no causar disrupción de un promotor de vaccinia. El sitio elegido como nuevo sitio de inserción se encontrará entre dos genes esenciales, 18R y G1L.
- 55 2. El flanco izquierdo del nuevo vector se construyó de manera siguiente: se cortó el plásmido LAS-1 con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI para eliminar el flanco del III MVA, GFP, y la repetición directa del flanco

de MVA. Esta inserción se cortó con *Ascl* y *Sacl*, y se aisló el fragmento GFP. Se amplificaron por PCR quinientos treinta y uno pares de bases en el extremo del gen I8R (con inclusión del codón de parada TAA) con los sitios de restricción *EcoRI* y *Ascl* en los extremos del producto PCR. La amplificación por PCR de 229 pares de bases de la repetición directa (desde el extremo del gen I8R que incluía el codón de parada TAA) se realizó con oligonucleótidos que contenían los sitios de restricción *Sacl* y *XhoI*. La totalidad de las 4 piezas de DNA, 1) la cadena principal del vector con los extremos *EcoRI* y *XhoI*, 2) el nuevo flanco izquierdo que contenía el extremo de I8R con los extremos *EcoRI* y *Ascl*, 3) GFP con extremos *Ascl* y *Sacl* y 4) la repetición directa del flanco I8R con extremos *Sacl* y *XhoI* se ligaron para producir el plásmido pLW-72.

3. El flanco derecho se construyó como sigue: se cortó pLW-72 con las enzimas de restricción *PstI* y *HindIII* para liberar el flanco del III del MVA en el plásmido. Se amplificaron por PCR setecientos dos pares de bases en el extremo del gen G1L con los sitios de las enzimas de restricción *PstI* y *HindIII* en los extremos y se ligaron en el vector pLW-72 para producir pLW-73 (**Fig. 7**). La secuencia de pLW-73 se proporciona en **Fig. 8**.

4. Las características salientes de pLW-73 son: 1) el vector estaba diseñado para inserción de genes extraños entre los genes esenciales en el genoma del MVA. El flanco izquierdo está constituido por el extremo del gen I8R y el flanco derecho está constituido por el extremo del gen G1L; 2) se incluye el gen GFP para selección inicial fácil del virus recombinante, 3) el GFP está flanqueado por repeticiones directas del gen I8R, lo cual permite la expresión transitoria de GFP, dado que el GFP se perderá después de pases repetidos del virus recombinante. Con referencia a WO 2004/087201, las características 2 y 3 estaban contenidas también en los plásmidos anteriores utilizados para producir recombinantes MVA/HIV, pLAS-1 y pLAS-2.

Aplicación de pLW-73

1. El gen *env* del aislado ADA del clado B de HIV-1 se clonó en pLW-73 y se obtuvo un virus MVA recombinante. La secuenciación del DNA confirmó la localización e integridad del gen *env*.

2. Un virus MVA recombinante que expresaba el gen *env* del clado D Ugandan (aislado AO7412) (**Fig. 9**) en el sitio Delección II de MVA resultó ser inestable, es decir, después de pases seriados en cultivo, el gen se delecionó de una porción significativa de la progenie del virus. El mismo gen se clonó luego en pLW-73 y se obtuvo y caracterizó un virus MVA recombinante. La inserción del gen *env* era estable después de pases seriados repetidos (8x) en cultivo, es decir, no se encontró delección alguna del gen insertado o la región flanqueante de MVA. Adicionalmente, no se registró ninguna otra mutación cuando se insertó el gen en este sitio.

II. Mutación puntual de "puntos calientes"

Análisis de mutaciones puntuales

Un virus MVA recombinante que expresaba el gen *gagpol* del Clado D Ugandan (aislado AO3349) en el sitio Delección III de MVA resultó ser inestable. La alteración genética principal era la generación de mutaciones en un solo punto en tramos de 4-6 residuos G o C (**Tabla 3**). Adicionalmente, se encontraron mutaciones puntuales similares en placas sin mancha de virus recombinantes similares que expresaban los genes *gagpol* de un aislado del clado A de Kenia y un aislado del clado C de Tanzania de HIV-1.

Mutagénesis de puntos calientes y análisis de estabilidad en virus recombinante

Utilizando mutagénesis orientada, se produjeron mutaciones silenciosas en seis regiones de este tipo del gen *gag* procedente del aislado de HIV-1 Ugandan. Este gen alterado, UGD 4d *gagpol orf* (**Fig. 10**), se clonó en pLAS-1 y se recombinó en el mismo sitio Delección III de MVA como se hizo durante la construcción del virus inestable. Después de pase seriado repetido (8x) en cultivo, no se encontró placa alguna que no se expresara. La secuenciación del DNA del stock de virus del pase 8 comprobó que se mantenía la integridad del gen *gagpol*.

III. Construcción del recombinante doble

Virus MVA/UGD4d

El virus MVA/UGD4d, un virus recombinante que expresa la envoltura del subtipo D A07412 Ugandan y el *gagpol* AO3349, se construyó de la manera siguiente: Se insertaron los genes de la envoltura y *gagpol* en el Clon 1 de MVA 1974/NIH por recombinación homóloga utilizando los plásmidos lanzadera pLW-73 y pLAS-1, respectivamente. Se aisló MVA/UGD4d por 6 tandas de purificación en placas en células fibroblastos de embrión de pollo y se amplificó y caracterizó subsiguientemente.

Sumario

1. Se construyó un vector de transferencia de plásmido que dirige la recombinación de un gen extraño entre dos genes esenciales, I8R y G1L, en la región central conservada del genoma del MVA. Se demostró que el uso de este sitio inhibe la selección de virus mutantes con delecciones de los flancos gen/MVA insertados.

2. Se alteraron tramos altamente mutables de residuos G y C por mutagénesis orientada y se generaron mutaciones silenciosas en la secuencia codificante. Se demostró que este cambio estabilizaba el gen cuando se insertó en Delección III de MVA.

5 3. Utilizando estos dos métodos anteriores, se construyó el recombinante doble de MVA UGD4d que expresa de manera estable tanto el env como el gagpol del clado D Ugandan.

Ejemplo 1

10 Se han producido MVAs recombinantes que expresan los genes env y gagpol de HIV-1 a partir de muchos aislados diferentes. La estabilidad de los genes insertados después de sometimiento a pases repetidos en cultivo de tejido ha demostrado ser variable. En este caso los inventores (1) demuestran que la inestabilidad representa una combinación de mutación o delección espontánea del gen insertado y la selección de mutantes que no se expresan, y (2) describen nuevos métodos para reducción de la inestabilidad.

Resumen

15 Se construyeron MVAs recombinantes que expresan env y gagpol de muchos aislados diferentes. Se sometió cada virus a pases repetidos en células fibroblastos de embrión de pollo para mimetizar la amplificación en gran escala requerida para la producción de virus para pruebas clínicas. Se monitorizó la estabilidad de la inserción por inmunotinción de env y gag de placas individuales. Para algunos virus recombinantes, se encontró que la expresión de env y/o gag se perdía rápidamente en una fracción significativa de la población de virus. Para identificar el o los mecanismos de pérdida de expresión, se aislaron placas individuales y se caracterizó la naturaleza de las mutaciones. En algunos casos, se identificaron secuencias específicas de DNA con propensión a mutar por adición o delección de un solo nucleótido. La generación de tales mutaciones podía evitarse por alteración de codones sin cambio del producto de traducción predicho. En otros casos, la pérdida de expresión estaba causada por grandes deleciones que se extendían frecuentemente en los genes de MVA flanqueantes no esenciales. Para impedir que ocurriera esto, se construyó un nuevo plásmido lanzadera que se diseñó para dirigir la inserción de los genes extraños entre dos genes esenciales de MVA. La recombinación en este sitio reducía las deleciones del DNA extraño. En un caso, sin embargo, la toxicidad asociada con la expresión de env de HIV de alto nivel era tan grave que la selección de mutantes ratos daba todavía como resultado una población inestable. En este caso, únicamente la truncación del dominio transmembranal de env permitió la construcción de un MVA recombinante estable.

Generación de MVAs Recombinantes y Análisis de la Estabilidad de los Genes Insertados

30 Se clonaron los genes env y gagpol en vectores lanzadera de MVA. Se analizaron la expresión y la función por ensayos de expresión transitoria. Se recombinó gagpol en MVA 1974/NIH Clon 1. Se purificaron los MVA recombinantes en placas con 6-8 tandas seguido por amplificación del virus. Se recombinó env en el aislado MVA/gagpol y los MVA recombinantes dobles (**Fig. 11A**) se purificaron en placas con 6-8 tandas y se amplificaron. Para evaluar la estabilidad de las inserciones, se sometió el virus a pases seriados en células CEF utilizando una multiplicidad de infección (m.o.i.) de ~ 1 pfu/célula para mimetizar la producción en gran escala. Se evaluó la estabilidad por determinación del porcentaje de células que expresaban env o gag, como se determinó por inmunotinción con anticuerpos monoclonales (**Fig. 11B**).

Estabilidad de los MVAs Recombinantes

40 Se construyeron MVAs recombinantes que expresaban genes de aislados de HIV-1 de localizaciones geográficas diferentes. Se insertaron los genes env y gagpol en las deleciones II y III del MVA, respectivamente; ambos bajo control del promotor H5 modificado. La estabilidad de los genes env y gagpol de 7 MVAs recombinantes se muestra en la **Tabla 4**. Se observaron grados variables de inestabilidad en los 7 virus. En MVA/65A/G, la expresión de env se perdía rápidamente, expresando sólo 25% de los viriones env en el pase 6. En MVA/UGD4a, la expresión tanto de env como de gagpol se perdía cada vez más con los pases sucesivos del virus. Dado que se requieren al menos 6-7 pases para la producción de una gran cantidad de virus para una prueba en Fase I, estos dos virus se consideraron inadecuados.

Análisis de la Expresión de MVA/65A/G

50 Haciendo referencia a **Fig. 12**, se seleccionaron aleatoriamente 13 placas de P3 y P5 de MVA/65A/G y se analizaron por inmunotinción con T-24 mAb (sitio de fijación representado en a), transferencia Western, PCR, y secuenciación. Se encontraron 5 tipos de placas y los números de estas placas obtenidos para cada tipo se dan a la derecha de **Fig. 12**. Las placas a, b, y c se teñían, pero b y c eran versiones truncadas debido a sustitución de bases (causando el codón de parada) (b) y delección del extremo del gen env y parte del flanco de MVA (c). Las placas d y e sin mancha eran resultado de la adición de G a un tramo 5G que causaba un cambio de marco (d) y una gran delección del gen env entero y partes de los flancos de MVA (e). Así, la adición de pares de bases, sustitución, y deleciones contribuían todas ellas a la expresión inestable del gen env en MVA/65A/G. Este env A/G, el ejemplo más inestable con el que se trabajó, se seleccionó para estudiar modificaciones que pudieran aumentar la estabilidad.

Modificaciones en los Constructos A/G para Aumentar la Estabilidad

1. Se produjo una envoltura sintética eliminando tramos de 4 y 5 G y C por mutaciones silenciosas a fin de prevenir mutaciones puntuales.

2. Se construyó el vector I8/G1, es decir, pLW-73, con un sitio de inserción entre los genes esenciales I8R y G1L a fin de prevenir deleciones de genes y flancos de MVA que fuesen viables. Los extremos de los genes I8R (500 pb) y G1L (750 pb) de MVA se amplificaron por PCR y se insertaron en un vector que contenía el promotor mH5 temprano/tardío del virus vaccinia controlador de la expresión de genes extraños. Se utilizó este vector I8/G1 para insertar genes extraños en MVA por recombinación homóloga (**Fig. 13**). Las deleciones de genes insertados y MVA flanqueante del gen insertado no serían viables debido a que partes de genes esenciales se habrían delecionado. Por consiguiente, los virus con estas mutaciones no serían capaces de superar a la población con su ventaja de crecimiento normal.

3. La envoltura A/G de gp140 se mutó por deleción del dominio transmembranal y la cola citoplásmica de gp41, dando como resultado una proteína secretada.

Testado de las Modificaciones para Aumentar la Estabilidad

Se produjeron 7 virus recombinantes simples con modificaciones env y/o uso del nuevo vector como se muestra en **Fig. 14**. Se aislaron 5 placas de cada virus y se sometieron a pases independientemente en CEF para determinar si las modificaciones aumentaban la expresión estable de la envoltura. Las placas sometidas a pases se analizaron por inmunotinción con mAb T-43 (sitio de fijación mapeado a 101-125 aa de env), transferencia Western, PCR, y secuenciación.

Expresión de Env después de Pases en Placas

Haciendo referencia a **Fig. 15**, 5 aislados de placas sometidos independientemente a pases de cada uno de los 7 recombinantes arriba enumerados se caracterizaron en los pases 1, 3, 5 y 7 por inmunotinción con mAb T-43 (que se fija entre los aminoácidos 101 y 125 en gp120). Cuatro de 7 virus (**Fig. 15, a, b, c, e**) tenían expresión inestable de proteínas en cada una de las 5 placas sometidas a pases; dos pases de placa de (**Fig. 15f**) tenían también expresión inestable de env. Éstos incluían virus con el env sintético tanto en del II (**Fig. 15c**) como en el sitio esencial del gen (**Fig. 15f**) del genoma del MVA. Únicamente los virus recombinantes que contenían la envoltura como gp140 truncado y secretado se mantenían expresando de manera estable la envoltura (**Fig. 15, d y g**)-

Transferencia Western, PCR y Análisis de Secuencia

De los pases en placas seleccionados, se escogieron clones para analizar la expresión de proteínas por transferencia Western, PCR, y análisis de secuencia (**Fig. 16**). Para el análisis por transferencia Western, se utilizaron T-24 y T-32 que se fijaban en el principio y el fin de la envoltura del clado A, respectivamente, a fin de determinar si se producía únicamente envoltura parcial o envoltura de longitud total. Los virus de control, marcados c, se encuentran a la derecha de cada transferencia. Para los 3 virus producidos en la deleción II de MVA (**Fig. 16 a, b, y c**), únicamente en **Fig. 16 c** (es decir, los clones gp140), se encontraban todos los clones que expresaban proteína detectable en Western. Esta proteína (como se midió por T-32) no estaba truncada. Cuando se insertó la envoltura en el sitio del gen esencial por el vector I8/G1 (**Fig. 16 d, e, y f**), nuevamente, sólo la envoltura de gp140 se expresaba en todos los clones y no estaba truncada. Aunque el uso del vector I8/G1 no impedía mutaciones en la secuencia env, el mismo impedía las deleciones que se habían observado en la envoltura insertada en del II. (Obsérvense los productos PCR positivos para todos los clones testados a partir del vector I8/G1, y en cambio los productos PCR negativos a partir de los clones testados utilizando el vector del II).

Expresión de Env en el Clado A/G Recombinante Doble

Basándose en resultados previos con análisis simple de env, se produjeron recombinantes dobles que expresaban gagpol con gp140 o con el gen sintético gp160, y se testaron respecto a estabilidad de la expresión de env (**Fig. 17**). Se aislaron 5 placas de cada uno como se ha descrito previamente, y se sometieron a pases 7 veces para analizar la estabilidad de la expresión de env. En el pase 7, las placas procedentes de los pases se sometieron a inmunotinción con mAbs T-43 y T-32 (que se fijan a gp120 y gp41, respectivamente). Con mAb T-43, uno de 5 clones de la envoltura sintética de expresión recombinante estaba constituido únicamente por placas sin mancha. La tinción subsiguiente con T-32 de estas placas demostró que otra placa tenía expresión truncada de la envoltura. Todas las placas sometidas a pases del recombinante doble que contenía la envoltura de gp140 parecían estables por inmunotinción tanto con T-43 como con T-32. Los títulos eran también 2 logs mayores que con el otro recombinante doble. Por tanto un recombinante doble del clado A/G que expresaba de manera estable la envoltura pudo producirse únicamente con la envoltura de gp140.

Virus Recombinantes que Expresan env y gagpol a partir de Aislados de HIV-1 Ugandan

Se construyeron virus MVA recombinantes que expresaban los genes env y gagpol de HIV-1 a partir de aislados AO741 y AO3349 Ugandan, como se muestra en **Fig. 18**. Se sometieron a pases seriados cuatro a seis aislados independientes de cada uno y se encontró que ambos genes eran inestables tanto si se expresaban solos como en

combinación (**Tabla 5**). En contraste, la expresión de gp140 en lugar de gp160 fijado a la membrana daba como resultado la estabilidad del gen env después de pases seriados (**Fig. 18** y **Tabla 5**).

MVA/UGD4a - Análisis de Placas de env sin Mancha

5 Para determinar el mecanismo de la inestabilidad, se aislaron 24 placas individuales sin mancha (utilizando Mab T-43) del pase 6 de MVA/UGD4a, se amplificaron, y se caracterizaron. Se identificaron dos pequeñas deleciones (1,2 y 0,3 kb) por amplificación PCR y secuenciación del DNA (**Fig. 19**). Todos los restantes aislados contenían deleciones muy grandes que se extendían al MVA flanqueante. Los puntos de rotura aproximados para estas deleciones se identificaron utilizando pares de cebadores procedentes del interior del gen env o las regiones flanqueantes de MVA.

Modificación del env UGD en MVA Recombinante

10 Para mejorar el problema de la inestabilidad del gen env UGD, el gen env A07412 se insertó en MVA utilizando el nuevo vector, I8/G1, que dirige la recombinación de un gen extraño entre dos genes esenciales del virus vaccinia, I8 y G1 y utiliza el promotor H5 modificado (**Fig. 20**). Se sometieron a pases seriados cuatro placas independientes y se analizaron respecto a la expresión de env por inmunotinción con Mabs T-43 y T-32 en el pase 5. El gen era estable en todos los aislados (**Tabla 6**).

15 MVA/UGD4b - Análisis de Placas gag sin Mancha

20 Para determinar el mecanismo de inestabilidad del gen gag, se escogieron 8 placas individuales sin mancha (utilizando Mab I83-H12-5C - Depósito NIAID AIDS) del pase 6 de MVA/UGD4b, se amplificaron, y se secuenció la inserción gagpol (**Tabla 7**). En 7 aislados se encontró una inserción o delección de un solo residuo G en la posición 564-569. En un aislado, se delecionó un residuo C de la secuencia CCCC en la posición 530-534. Adicionalmente, las placas sin mancha de los stocks de MVA/KEA y MVA/TZC sometidos a muchos pases revelaban un punto caliente similar para mutación, a saber, la posición 564-569. El examen de la secuencia completa del gen gagpol UGD A07412 exhibía 22 tramos de 4 o más residuos G o C (**Fig. 21**).

Modificación del Gen gagpol UGD en MVA Recombinante

25 Dado que el mecanismo de inestabilidad del gen gagpol era fundamentalmente inserción o delección de un solo nucleótido en un tramo de 4-6 residuos G o C, la estrategia para mejorar la estabilidad de este gen fue generar mutaciones silenciosas en tales sitios. Así, se empleó mutagénesis orientada en 6 sitios en gag p17 y p24 (**Tabla 3**). El gen del codón alterado (c.a.) resultante insertado en MVA en la misma localización, es decir, Delección III, resultó estable después de sometimiento seriado a pases (**Fig. 2** y **Tabla 8**).

Construcción de MVA Estable Recombinante que Expresa env y gagpol UGD

30 Se construyó un virus recombinante que expresaba el gen env UGD en el locus I8/G1 y el gen gagpol alterado en codones en Delección III de MVA (**Fig. 23**). El sometimiento a pases seriados demostró la ausencia de inestabilidad de cualquier gen. Adicionalmente, el nivel de la expresión de proteínas y la secuencia de DNA se mantenían inalterados durante el sometimiento a pases (**Tabla 9**).

Conclusiones

35 La inestabilidad de las inserciones env y gagpol se atribuye a la generación de mutaciones y deleciones puntuales y a la ventaja de crecimiento de los mutantes de MVA que no se expresan. La inestabilidad puede reducirse generalmente por alteración de codones y/o inserción en una región esencial del genoma del MVA (MVA/UGD4d) pero tuvo que alterarse env en un caso (MVA/65A/G).

Ejemplo 2

40 Inmunogenicidad de MVA/UGD4d en Ratones BALB/c

Grupos de 10 ratones cada uno se inmunizaron por la vía intraperitoneal con 10^6 ó 10^7 unidades infecciosas de MVA/UGD4d. Grupos de 5 ratones cada uno se inmunizaron análogamente con MVA-1974 parental. Los ratones se inmunizaron en las semanas 0 y 3 y se sangraron en las semanas 0, 3, y 5. Se extirparon los bazo en la semana 5.

45 Se midieron las respuestas celulares en esplenocitos recientes por tinción intracelular con citoquinas. Los esplenocitos se estimularon por separado con lo siguiente: 1) el péptido gag inmunodominante (AMQMLKETI (**SEQ ID NO: 6**)), 2) péptidos env (DTEVHNVWATHACVP (**SEQ ID NO: 7**) y QQQSPLLRAIEAQQH (**SEQ ID NO: 8**)), 3) péptidos pol (8 péptidos con variantes de aminoácidos simples de ELRQHLLRWGLTT (**SEQ ID NO: 9**) y HGVYYDPSKDLIAE (**SEQ ID NO: 10**)), y 4) MVA.

50 Se tiñeron las células para expresión superficial de CD4 y CD8 y luego para expresión intracelular de IFN- γ e IL2 o TNF. Como se muestra en **Fig. 24**, MVA/UGD4d provocaba respuestas de CD8/IFN- γ al péptido gag, los péptidos pol, y MVA. Las respuestas al péptido gag eran multifuncionales, expresando tanto IFN- γ como IL2 o TNF. Asimismo, se provocaron respuestas de CD4/IFN- γ al conjunto de péptidos env.

Se midieron las respuestas humorales por ELISA (**Fig. 25**). Se demostraron respuestas fuertes a UGD env al cabo de 3 semanas después de una inmunización, y se reforzaron por la segunda inmunización. Adicionalmente, se provocaron respuestas fuertes de virus vaccinia después de 1 y 2 inmunizaciones.

5

Tabla 3. Cambios de Nucleótidos MVA/UGD Realizados Para Eliminar Tramos de G y C (Aislado AO3349 de HIV-1)

Nucleótido # que comienza con ATG	Secuencia Original	Secuencia Modificada
28-32	GGGGG	GGGG
70-74	GGGGG	GGGG
408-411	GGGG	GGGA
530-533	CCCC	CACC
564-569	GGGGGG	AGGAGG
686-689	GGGG	GAGG

Tabla 4. Estabilidad de los MVAs Recombinantes

		Porcentaje de placas sin mancha												
Virus	Clado	Origen geográfico	Siembra de LVD		Pase 3/4		Pase 6 / 7		Pase 8/9		Pase 10 - 13		Lote de vacuna	
			env	gag	env	gag	env	gag	env	gag	env	gag	env	gag
KEA5b	A	Kenia	<1	<1	0,13	0,33	0,34	0,36			0,54	2,4	0,64	0,77
65A/G	A/G	Costa de Marfil	<2	<1	28	1	75							
62B	B	US	<1	<1	<1	<1			6	<1	10	1		
TZCa	C	Tanzania	<1	<1	<1	<1	1,7	2,8	3,6	3,7				
71C	C	India	<1	<1	<1	1	<1	2	12	14				
UGD4a	D	Uganda	<1	<1	3	0,28	6,7	6	12,2	17,4				
CMDR	E/A	Thailandia	<1	<1	<1	<1	<1	<1					<1	<1

Tabla 5. Virus Recombinantes que Expresan env y gagpol de los Aislados HIV-1 Ugandan

	Pase	% Sin mancha	
		env	gag
UGD4a	9	12,2	17,4
	5	5,8	2,6
	5	2,7	17,6
	5	8,4	7,2
	5	11,4	8,0
UGD4b	6	1,5	17,0
	5	3,3	9,3
	5	3,7	8,3
	5	7,9	4,4
	5	15,2	5,0
UGD1a	4	Nd	18,8
	4	Nd	46,7
	4	Nd	64,9
	4	Nd	38,1
	5	7,9	44,8
UGD gag3349	8		36,6
	8		25,4
	6		22,9
	6		33,1
UGD env	8	9,0	
	8	2,9	
	8	13,3	
	8	12,5	
	8	14,3	
UGDgag/gp140	5	1,2	18,9
	5	2,3	17,6

Tabla 6. Modificación del Gen env UGD en MVA Recombinante

	Pase	% Sin mancha	
		env	gag
UGD9	5	0,5	
	5	0,4	
	5	0,0	
	5	0,5	

Tabla 7. MVA/UGD4b - Análisis de Placas gag sin Mancha # Placas Individuales con Mutación

Gen	Base#	Secuencia	MVA/UGD	MVA/KEA	MVA/TZC
p17	28	GGGGG			
	70	GGGGG		n=1	
p24	408	GGGG			
	530	CCCC	n=1		
	564	GGGGGG	n=7	n=16	n=21
	686	GGGG			
	1050	GGGGGG			
p7	1133	GGGG			
p1	1320	GGGG			
p6	1361	cccc			
	1387	GGGG			
	1419	GGGG			
	1473	CCCC			
Proteasa RT	1494	GGGGG			
	1590	GGGGG			
	1599	GGGGG			
	2362	GGGG			
	2380	GGGG			
	2528	GGGGG			
	2596	GGGG			
	2893	GGGG			
	3001	CCCC			

Tabla 8. Modificación del Gen gagpol UGD en MVA Recombinante

	Pase	% Sin Mancha	
		env	gag
UGD gag (c.a.)	6		0,9
	6		0,0
	6		0,5

5

Tabla 9. Construcción de MVA Estable Recombinante que Expresa env y gagpol UGD

	Pase	% Sin mancha	
		env	gag
UGD4d	11	0,0	0,7

REIVINDICACIONES

1. Un virus vaccinia Ankara modificado (MVA) recombinante que comprende una secuencia de DNA heteróloga insertada en una región intergénica (IGR) del genoma del MVA, que está localizado entre, o flanqueado por, los marcos de lectura abiertos (ORFs) 069-070 del genoma del MVA en la nomenclatura de CDC/Acambis, que corresponde a los ORFs I8R-G1L en la nomenclatura de Copenhague.
2. El MVA de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de DNA heteróloga comprende al menos una secuencia codificante, bajo el control transcripcional de un elemento de control de la transcripción poxviral.
3. El MVA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la secuencia de DNA heteróloga codifica una o más proteínas, polipéptidos o péptidos.
4. El MVA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la secuencia de DNA heteróloga se deriva del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).
5. El MVA de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la secuencia de DNA heteróloga derivada del virus de la inmunodeficiencia humana codifica HIV env.
6. El MVA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el genoma del MVA es el del MVA depositado en ATCC bajo el número de acceso PTA-5095.
7. El MVA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el genoma del MVA es el que tiene la secuencia de GenBank número de acceso AY603355.
8. El MVA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el genoma del MVA es el que tiene la secuencia de GenBank, número de acceso U94848.
9. Un vector plasmídico que comprende una secuencia de DNA derivada de u homóloga al genoma de un MVA, en donde dicha secuencia de DNA comprende
 - i) un fragmento completo o parcial de una secuencia IGR localizada entre las secuencias completas o parciales de los ORFs 069-070 en la nomenclatura de CDC/Acambis del genoma del MVA, que corresponde a los ORFs I8R-G1L en la nomenclatura de Copenhague; y
 - ii) insertado en dicha secuencia IGR un sitio de clonación para inserción de una secuencia de DNA que es heteróloga al genoma del MVA; y
 - iii) opcionalmente, una casete de gen informador o de selección.
10. Un vector plasmídico que comprende una secuencia de DNA derivada de u homóloga al genoma de un MVA, en donde dicha secuencia de DNA comprende
 - i) un fragmento completo o parcial de los ORFs 069-070 en la nomenclatura de CDC/Acambis que corresponde a los ORFs I8R-G1L en la nomenclatura de Copenhague; y
 - ii) insertado en dichos ORFs, un sitio de clonación para inserción de una secuencia de DNA que es heteróloga al genoma del MVA; y
 - iii) opcionalmente, una casete de gen informador o de selección.
11. El vector plasmídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en donde la secuencia de DNA se deriva de o es homóloga al genoma del MVA depositado en ATCC bajo el número de acceso PTA-5095.
12. El vector plasmídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en donde la secuencia de DNA se deriva de o es homóloga al genoma del MVA que tiene la secuencia de GenBank número de acceso AY603355.
13. El vector plasmídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en donde la secuencia de DNA se deriva de o es homóloga al genoma del MVA que tiene la secuencia de GenBank, número de acceso U94848.
14. Una composición farmacéutica, de vacuna o inmunógena que comprende el MVA o el vector plasmídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
15. El MVA o vector plasmídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso como medicamento, composición inmunógena, o vacuna.
16. Uso del MVA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de un medicamento, composición inmunógena, o vacuna para el tratamiento o la profilaxis de una infección viral o una enfermedad proliferativa.
17. El MVA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para uso en el tratamiento o la profilaxis de una infección viral o una enfermedad proliferativa.

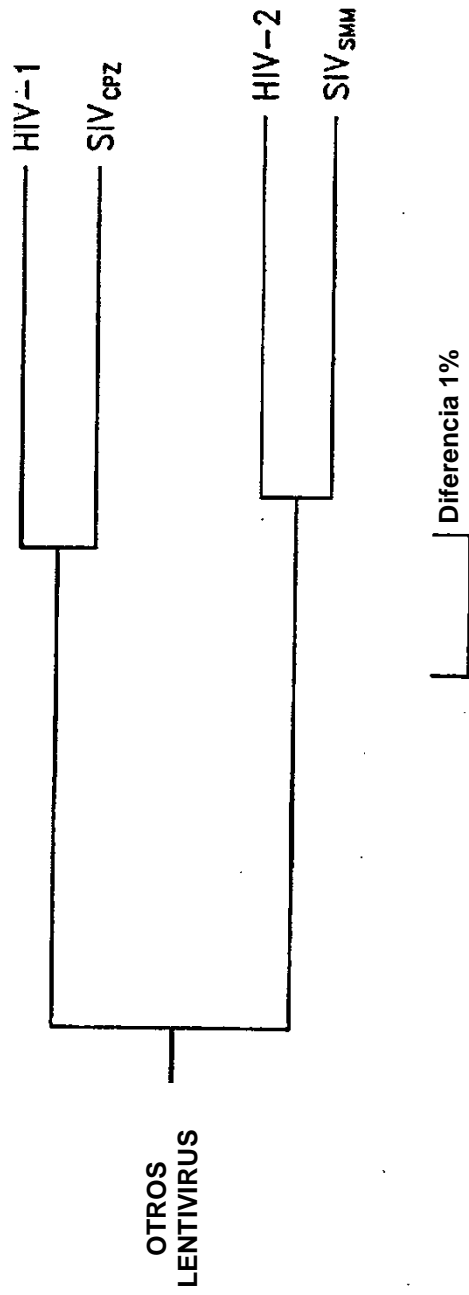


Fig. 1

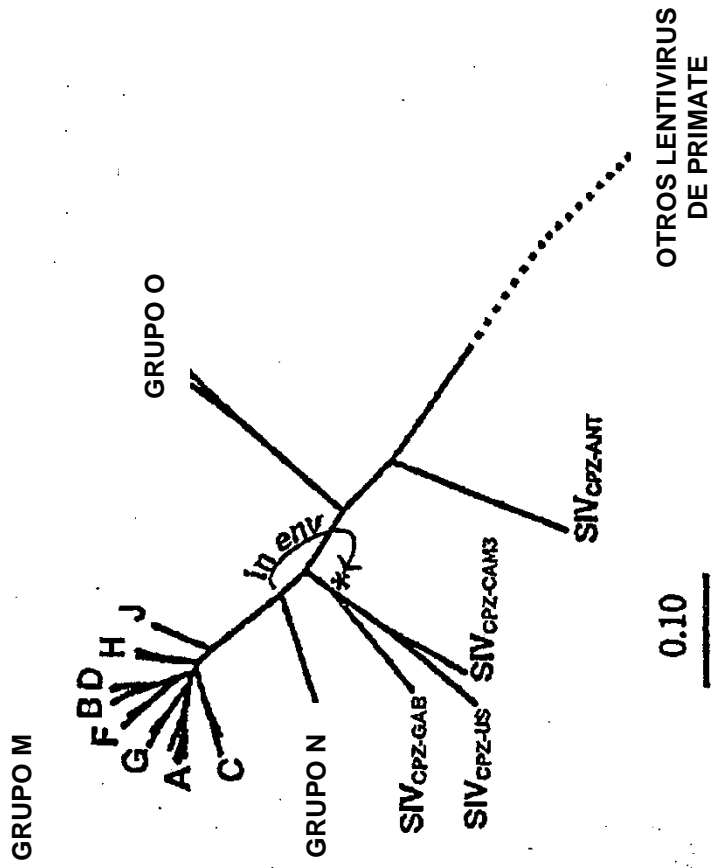


Fig. 2

Correceptor de quimioquinas utilizado	Replicación de PBMC	Replicación de Macrófagos	Replicación de línea de células T	Fenotipo de replicación	Fenotipo inductor de sincitios
X4	+	-	+	Rápido/alto	++
R5	+	+	-	Lento/bajo	-
R5/X4	+	+	+	Rápido/alto	+

Fig. 3

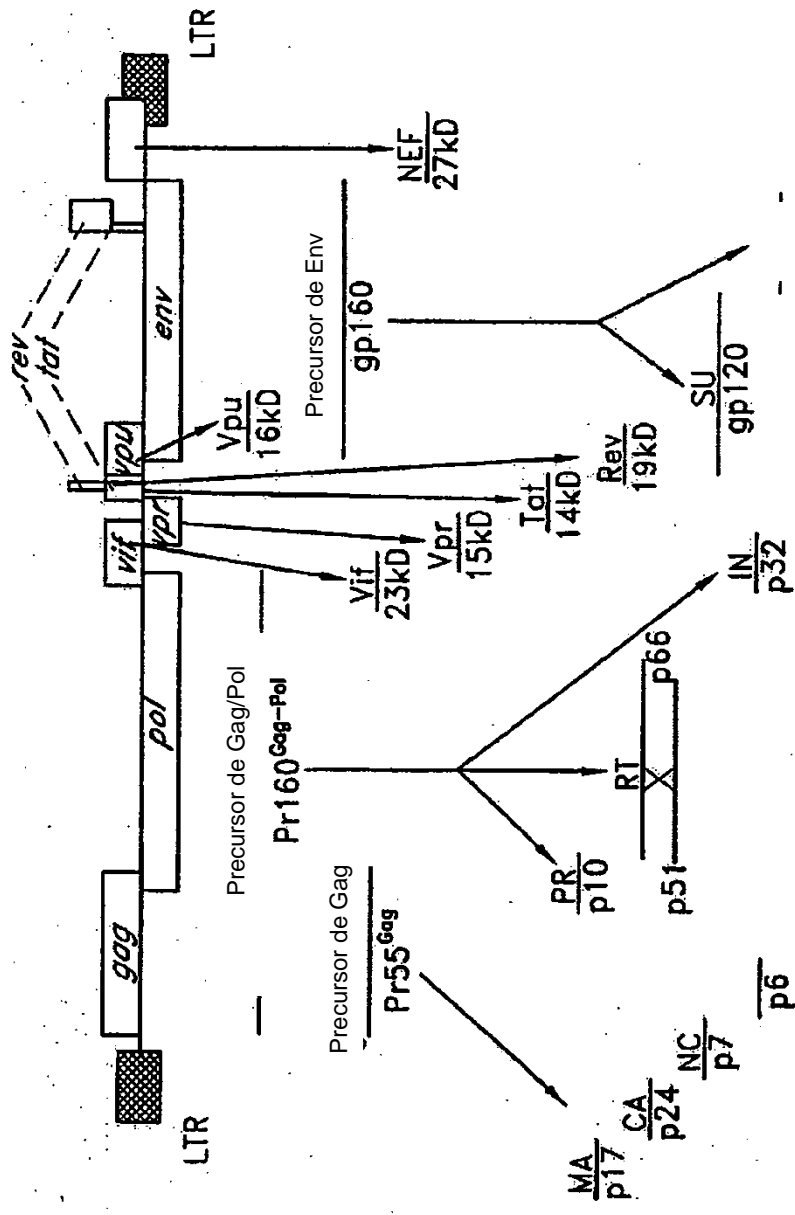


Fig. 4

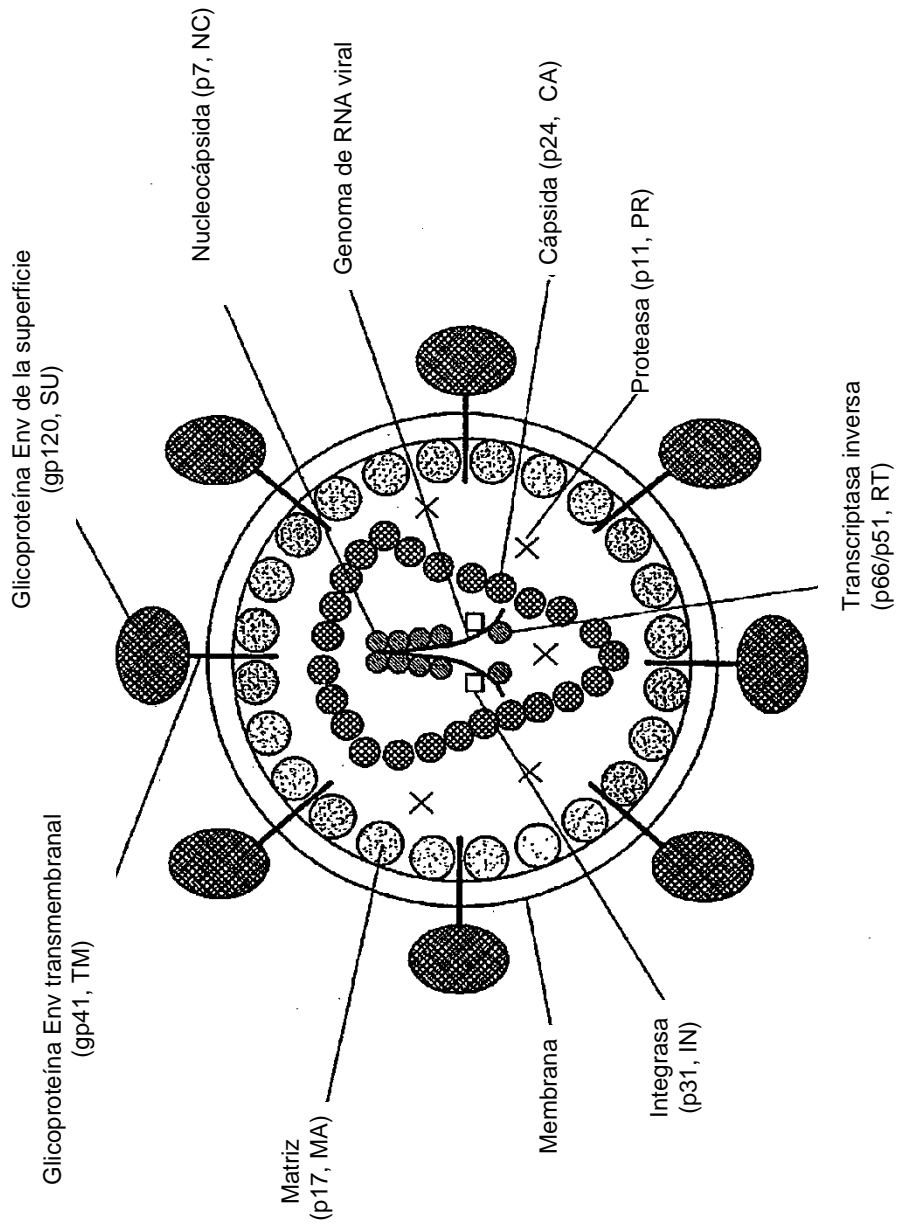


Fig. 5

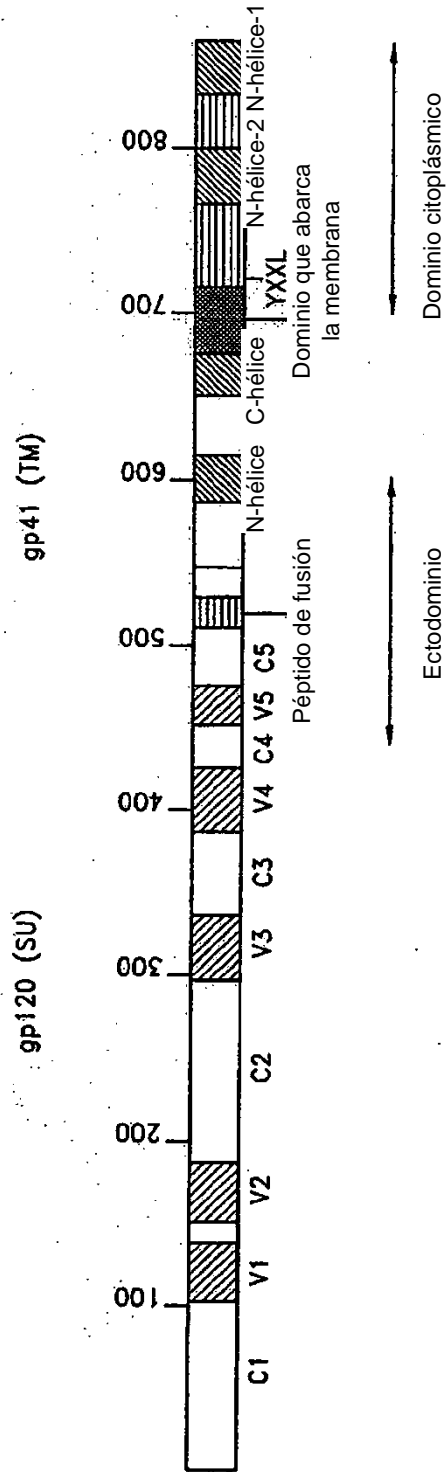


Fig. 6

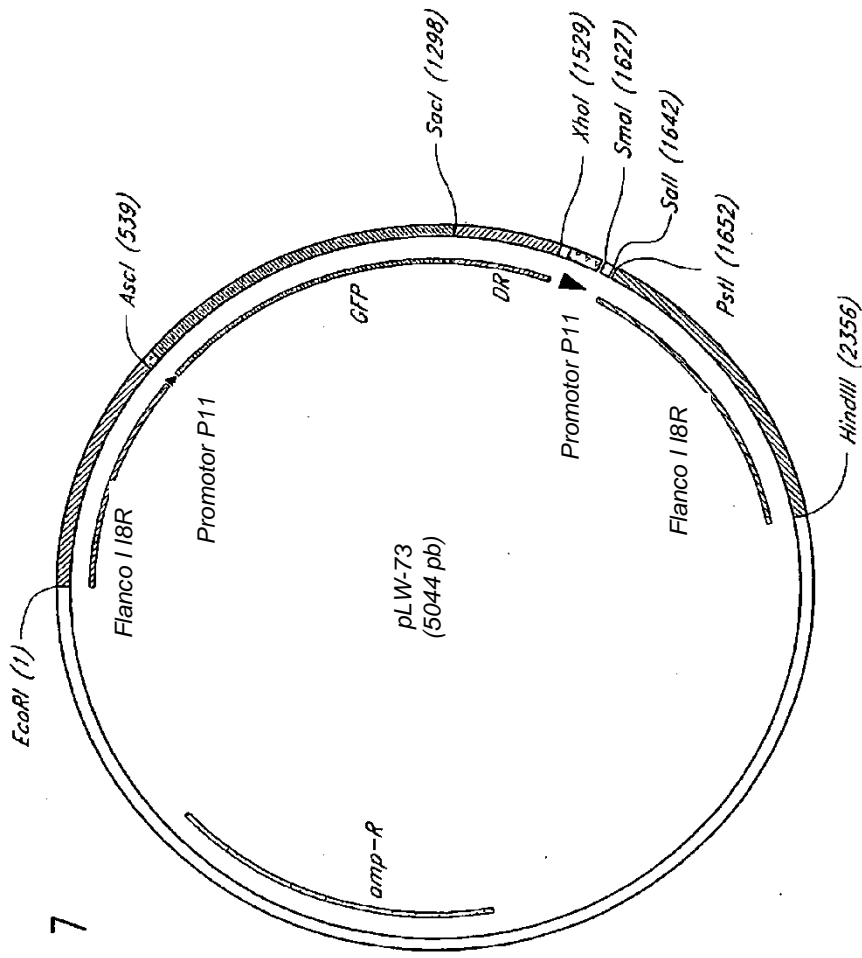


FIG. 7

EcoRI (1)

1 GAATTCCTG GGACATCGT ATATTTCTAT GATCTGCTT ATATGAAGTC TATACAGCA ATAGATTGAG
 CTTAGGGAC CCTGTATGCA TATAAGATA CTAGAGAAA TATACTTCAG ATATGTGCT TATCTAAGTC
 71 AATTTCTACA TAATTATATA TTGTACGCTA ATAAGTTTAA TCTAACACTC CCCGAAGATT TGTTTATPAT
 TTAAGATGT ATTAATATAT AACATGGGAT TATTTCAAAT AGATTTGTGAG GGGCTTCTAA ACAAATATTA
 141 CCTACAAAT TTGGATATC TAGGGGCTAC AAAGGAATAT ATAGACTCGT TCGATATTAG TACAGAACA
 GGGATGTTA AACCTATAAG ATACCGCAIG TTCCCTATA TATCTGAGCA AGCTATAATC ATGTCTTTGT
 211 TGGATAAAT TATTATCCAA TTATTATATG AAGATGATAG AGTATGCTAA ACITATATGA CTAAGTCCTA
 ACCTTATTA ATAATAGGT AATAATATAC TTCTACTATC TCATACGATT TGAATATCAT GATTCAGGAT
 281 TTCTCCTGA GGAGTTGGAT AATTTTGAGA GGACGGGAGA ATTRACTAGT ATGTACAAG AAGCCATTTT
 AAGAGGCACT CCTCAACCTA TTAAACTCT CTGCCCCTCT TAATTGATCA TAACATGTC TTCCGGTAAA
 351 ATCTCAAAT TTACGAATTA AGATTTTAAA TTTTAAACAT AAAGATGATG ATACGTATAT ACACTTTGT
 TAGAATTA AATGCTTAT TCTAAAATTT AAAATTGTA TTCTACTAC TATCCATATA TGTGAAAACA
 421 AAAATATTAT TCGGTGCTA TAACGGACA ACGCTACTA TATATATCA TAGACCTCTA ACGGGATATA
 TTTTATAATA AGCCACAGAT ATTCCTTGT TTCCGATGAT ATATAATAGT ATCTGGAGAT TGCCTATAT
 491 TGAATANGAT TTCAGATACT ATATTTGTC CTGTAGATAA TAACPAAGC GC6CCTTTCA TTTTGTTTTT
 ACTTATACTA AAGTCTATGA TATAAACAG GACAICTAAT ATTGATCCG CGCGGAAAGT AAAACAATAA
 Ascl (539)

FIG. 8-1

561 TTCTATGCTA TAAATGGTGA GCAAGGGCGA GGAGCTGTTT ACCGGGTTG TGCCCATCCT GGTCCAGCTG
 AAGATACGAT ATTTACCACCT CGTTCCCGGT CCTCGACAAG TG6CCCCACC ACGGTAGGA CCAGCTCGAC

631 GACGGCGAG TAAACGGCCA CAACTTCACC GTGTCCGGG AGGGCAGGG CGATGCCACC TACGGCAAGC
 CTGGCGTGC ATTTCCCGGT GTTCAAGTGG CACAGGCCGC TCCCGCTCCC GCTACGGTGG ATGCCGTTCC
 =====

701 TGACCCCTGAA GTTCATCTGC ACCACCAGCA AGTGC0CGT GCCCTGSCCC ACCCTCGTGA CCACCTGAC
 ACTGGGACTT CAAGTAGACG TGGTGGCCGT TCACACGGCA CCGGACCCGG TGGGAGCACT GGTGGGACTG
 =====

771 CTACGGCGTG CAGTGTCTCA GCGCTACCC CGACCACATG AAGCAGCAG ACTTCTCAA GTCCGCCATG
 GATGCCGCAC GTCACGAAGT CCGCGATGGG GGTGGTGTAC TTCTGTCTGC TGAAGAAGTT CAGCGGTTAC
 =====

841 CCCGAAGGT ACGTCCAGGA GCGACCATC TTCTTCAAGG ACGACGGCAA CTACAGACC CCGCCCGAGG
 GGGTTCCGA TGCAGGTCT CCGTGGTAG AAGAAGTCC TGCTGCGTT GATGTTCTGG CCGCGGCTCC
 =====

911 TGAAGTTCGA GGGCGACACC CTGGTARACC GCATCGAGCT GAAGGCATC GACTTCAAGG AGGACGGCAA
 ACTTCAAGCT CCCGCTGGG GACCACTTGG CGTAGCTCGA CTTC0CGTAG CTGAAGTCC TCCTGCCGTT
 =====

981 CATCCTGGG CACAAGCTGG AGTACAATA CAACAGCCAC AACGTCTATA TCATGGCCGA CAAGCAGAAG
 GTAGGACCCC GTGTTCGACC TCATGTTGAT GTGTGGTGG TTGCAGATPAT AGTAC0GGCT GTTCGTCTTC
 =====

1051 AACGGCATCA AGGTGAACIT CAAGATCCGC CACAACATCG AGGACGGCAG CGTGCAGCTC GCCGACCACCT
 TTGCCGTAGT TCCACTTGAA GTTCTAGGGG GTGTGFPAG TCCTGCCGTC GCACGTGGAG CCGCTGGTGA
 =====

FIG. 8-2

```

1121 ACCAGCAGAA CACCCCATC GCGAGCGCC CGGTGCTGCT GCCGACAAC CACTACCTGA GCACCCAGTC
    TGGTCGTCTT GTGGGGTAG CCCTGCGGG GGCAGCAGGA CGGGCTGTG GTGATGACT CGTGGTCTAG
    //

1191 CGCCCTGAGC AAGACCCCA ACGAGAAGG CGATCACATG GTCCCTCTGG AGTTCGTGAC CGCCGCCGGG
    GCGGACTCG TTTCTGGGT TGCCTTGGC GCTAGTGTAC CAGGACGACC TCAAGCACTG CCGCGGGCCC
    //
                SacI (1298)
1261 ATCACTCTCG GCATGCACGA GCTGTACAAG TAAGACTCG AGGACGGAG AATTAACTAG TATTGTACAA
    TAGTGAGAC CGTACGTGCT CGACATGTTT ATTCTCGAGC TCCTGCCCTC TTAATTGATC ATAACATGTT
    //

1331 GAAGCCATT TATCTCTAAA TTACGAATT AAGATTTAA ATTTAAACA TAAAGATGAT GATACGTATA
    CTTGGTAAA AFAGAGATT AAATGCTTAA TTCTAAAATT TAAAATTGT ATTTCTACTA CTATGCATAT
    //

1401 TACACTTTG TAAATATTA TTCCGGTGTCT ATAACGAAAC AAACGCTACT ATATATTATC ATAGACTCT
    ATGTGAAAC ATTTATAT ATGCCACAGA TATTGCCCTG TTTCGGATGA TATAATATAG TATCTGGAGA
    //
                XhoI (1529)
1471 AACGGGATAT ATGAATATGA TTTCAGATAC TATATTTGTT CCTGTAGATA ATAACTAATC CGAGGCCGCT
    TTGCCCTATA TACTTATACT AAGTCTATG ATATAAACA GGACATCTAT TATTGATTGA GCTCCGGCGA
    //

1541 GGTACCCAAC CTAATAATG AAAATAATA CAAAGTCTCT TGAGGGTTGT GTTAAATTGA AAGCAGAAA
    CCATGGGTTG GAFTTTAAC TTTTATTAT GTTCCAAGA ACTCCAACA CAATTTACT TTCGTCTTT
    //
                PstI (1652)
                SmaI (1627)      SalI (1642)
1611 TAATCATAAA TAAGCCGGG GATCCCTAG AGTCGACCTG CAGTCAAACT CTAATGACCA CATCTTTTT
    ATTAGTATT ATTCCGGGCC CTAGGAGATC TCAGCTGGAC GTCAGTTGA GATTACTGGT GTAGAAAAA
    //
                //
    
```

FIG. 8-3

1681 TAGAGATGAA AAATTTTCCA CATCTCCTTT TGTAGACAGG ACTAAACAAT TTGCAGAAAA AAGTTTATTA
 ATCTCTACTT TTAAAGGT GTAGAGAAA ACATCTGTCC TGATTTGTAA AAGGTCITTT TTCAAATAT

1751 GTGTTTAGAT AATCGTATC TTCATCAGTG TAGATAGTAA ATGTAACAG ATAAAAGSTA TTCTTGTCTCA
 CACAAATCTA TTAGCATATG AAGTAGTAC ACTATCAAT TACACTGTCC TATTTTCCAT AAGAAGGACT

1821 ATAGATTGGT AAATTCATA GAATATATTA ATCCTTTCTT CTTGAGATCC CACATCAITTT CAACCAGAGA
 TATCTAACCA TTTAAGGTAT CTATATAAT TAGGAAGAA GAACTCTAGG GTGTAGTAAA GTTGGTCTCT

1891 CGTTTTATCC AATGATTTAC CTCGTACTAT ACCACATACA AAACAGATT TTGCAGTGAC GTCGTAICTG
 GCAAAATAGG TFACTAATG GACATGATA TGGTGTATGT TTTGATCTAA AAGGTCACCTG CAGCATAGAC

1961 GTATTCTCTAC CAACAAAAT TTTACTITTA GTTCTTTTAG AAAATCTAA GGTAGATCT CTATTTGCCA
 CATAAGGATG GTTTGTTTA AANTGAAAT CAAAGAAATC TTTAAGATT CCATCTTAGA GATAAACGGT

2031 ATATGTCATC TATGGAATTA CCACTAGCAA AAAATGATAG AAATAATAT TGATACATCG CAGCTGGITTT
 TATACAGTAG AFACCTTAAT GGTGATCGTT TTTACTATC TTTATATATA ACTATGTAGC GTCGACCCAA

2101 TGATCTACTA TACTTTAAA ACGAATCAGA TTCCATAAT GCCTGTATAT CATCAGCTGA AAAACTATGT
 ACTAGATGAT ATGAAATTTT TGCTTAGTCT AAGGTATTA CCGACATATA GTAGTCGACT TTTTGATACA

2171 TTTACAGTA TTCCTTCGGC ATTTCITTTT AATGATATAT CTGTGTTAGA CAATGATAAA GTTATCATGT
 AAATGTGAT AAGGAAGCG TAAAGAAAA TTTACTATATA GAACAATCT GTTACTATTT CAATAGTACA

FIG. 8-4

2241 CCATGAGAGA GCGGCTCCG TATCGTATAA ATATTCATT AGATGTAGA CGCTTCATTA GGGGTACT
GGTACTCTCT GCGCAGGC ATAGCATATT TATAAGTAA TCTACATCT GCGAGTAAT CCCCATATGA
//
HindIII (2356)
2311 TCATAAAGT TTCTTAATCA GTCCATCATT GGTGGCTCA AGAACAGCT TGCTCCCTA TAGTGAGTCG
AGATATCCA AAGAATTAGT CAGGTAGTAA CCAACGCAGT TCTTGTGGA ACAGAGGGAT ATCACTCAGC
//
2381 TATTAGAGCT TGGCGTAATC ATGGTCATAG CTGTTTCCTG TGTGAATTG TTATCCGCTC ACAATCCAC
ATAATCTCGA ACCGCATTAG TACCAGTATC GACAAAGGAC ACACCTTAAC AATAGCGGAG TGTTAAGGTG
2451 ACAACATACG AGCCGGAAGC ATAAAGTGA AAGCCTGGG TGCCTAATGA GTGAGCTAAC TCACATTAAT
TGTTGTATGC TCGGCCTTCG TATTTACAT TTCGGACCCC ACGGATTACT CACTCGATTG AGTGAATTA
2521 TGGTTGCGC TCACTGCCC CTTTCGAGT GGGAAACCTG TCGTGCAGC TGCATTAATG AATCGGCCAA
ACGCAACGGC AGTGACGGC GAAAGCTCAG CCTTTTGAC AGCACGGTCC ACGTAATTAC TTAGCCGGTT
2591 CGCGGGGGA GAGCGGTTT GCGTATTGG CGCTCTCCG CTTCCCTGGT CACTGACTCG CTGCGGCTCG
GCGGCCCCCT CTCGGCAA GGCATAACCC GCGAGAAGC GAAGGAGCGA GTGACTGAGC GACGGGAGCC
2661 TCGTTCGGCT GCGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAGGC GGTATACGG TTATCCACAG AATCAGGGGA
AGCAAGCCGA CCGCGCTCGC CATAGTCGAG TGAGTTCCG CCATTATGCC AATAGGTGTC TTAGTCCCTT
2731 TAACGAGGA AAGAATGT GAGCAAAGG CCAGAAAAG GCCAGGAACC GTAARAAGC CGCGTTGCTG
ATTGCGTCTT TTCTTGTAACA CTCGTTTCC GGTGCTTTC CCGTCTTGG CATTITTCG GGCACAGAC

FIG. 8-5

2801 GCGTTTTTCG AFAGGTCGG CCCCCTGAC GAGCATACA AAAATCGAGC CTAAGTCAG AGGTGGGAA
 CGCAAAAGC TATCCGAGC GGGGGACTG CTCGTAGTGT TTTTAGCTGC GAGTTCAGTC TCCACCGCTT

2871 ACCCGACAGG ACTATAAGA TACCAGGGT TTCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGGCTCTC CTGTTCCGAC
 TGGGCTGTCC TGATATTTCT AFGGTCCGCA AAGGGGACC TTCGAGGGAG CACGGGAGG GACAAAGCTG

2941 CCTGCCGCTT ACCGGATACC TGTCCGCTT TCTCCCTTCG GGAAGGTTG CGCTTCTCA TAGCTCACGC
 GGACGGCGAA TGGCCTATGG ACAGGGCGAA AGAGGAAGC CCTTGGCACC GCGAAAGAGT ATCGAGTGGC

3011 TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGTTCGTT CGCTCAAGC TGGGTGTGT GCACGAACC CCCGTTACG
 ACATCCATAG AGTCAAGCCA CATCCAGCA GCGAGGTTCC ACCGACACA CGTGCTTGGG GGGCAAGTCC

3081 CCGACCCCTG CGCCTTATCC GGTAATATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA AGACACGACT TATCGCCACT
 GGCTGGCGAC GCGGAATAGG CCATTGATAG CAGAACTCAG GTTGGCCCAT TCTGTGCTGA ATAGGGTGA

3151 GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT GTAGCCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG
 CCGTCGTGGG TGACCATGT CCTAATGTC TCGCTCCATA CATCCGCCAC GATGTCTCAA GAACTTCACC

3221 TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGACA GTATTGGTA TCIGGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG
 ACCGGATTGA TCCCGATGTG ATCTTCTGT CATAAACCAT AGACGGGAGA CGACTTCGGT CAATGGAAGC

3291 GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT TGATCCGGA AACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTGGTTTTT TTGTTTGC AA
 CTTTTCTCA ACCATCGAGA ACTAGGCGGT TTGTTGGTG GCGACATCG CCACAAAAA AACAAACGTT

FIG. 8-6

3361 GCAGCAGATT ACGCGCAGAA AAAAAGGATC TCAAGAAGAT CTTTGTGATCT TTCTACGGG GTCTGACGCT
 CGTCGTCTAA TCGCCGCTCTT TTTTCTCTAG AGTTCTTCTA GGAACACTAGA AAAGATGCC CAGACTGGCA

3431 CAGTGGACG AAAACTCAGG TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAA AAGGATCTTC ACCTAGATCC
 GTCACCTTGC TTTTGAGTGC AATCCCTAA AACAGTACT CTAATAGTTT TTCCTAGAAAG TGGATCTAGG

3501 TTTTAAATTA AAAATGAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATAGTAA ACTTGGTCTG ACAGTTACCA
 AAAATTTAAT TTTTACTTCA AAATTTAGTT AGATTTCTATA TAFACTCAAT TGAACCCAGAC TGCAATGGT

3571 ATGCTTAATC AGTGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA TTTGGTTTCAAT CCATAGTTGC CTGACTCCCC
 TAGGAATTAG TCACTCCGTG GATAGAGTGG CTAGACAGAT AAAGCAAGTA GGATATCAAG GACTGAGGGG

3641 GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGC TTACCATCTG GCCCCAGTGC TGCATGATA CCGCGAGACC
 CAGCACATCT ATTGATGCTA TGGCCCTCCG AATGGTAGAC CGGGGTACAG ACGTTACTAT GGGGCTCTGG

3711 CAGGCTCACC GGTCCAGAT TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGRAGG GCCGAGCCGA GAAGTGGTCC
 GTGGGAGTGG CCGAGGTCTA AATAGTCGTT ATTTGGTCCG TCGCCCTTCC CGGCTCCGCT CTTACCACAGG

3781 TCCAACTTTA TCCGCCCTCA TCAGTCTAT TAATTTGTTCC CGGGAAGCTA GAGTAAGTAG TTCGCCAGTT
 ACGTTGAAAT AGGGGAGGT AGGTCAGATA ATTAAACAAG GCCCTTCGAT CTCATTTCAIC AAGCGGTCAA

3851 AATAGTTTC GCAACGTTGT TGGCATTGCT ACAGGCAATCG TGGTGTACAG CTCGTGCTTT GGTATGGCTT
 TTATCAAAG CGTTGCAACA ACCGTAACGA TGTCCGTAGC ACCACAGTGC GAGCAGCAA CCATACCGAA

FIG. 8-7

3921 CATTGAGTC CGGTCCCAA .CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG TTGTGCAAAA AAGGGTTAG
 GTAAGTCGAG GCCAAGGTT GCTAGTTCCG CTCATGTAC TAGGGGTAC AACAGTTTT TTCGCCAATC

3991 CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTCAGAG TAAGTTGGC GCAGTGTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA
 GAGGAAGCCA GGAGGCTAGC AACAGTCTC ATTC AACCGG CGTCACAATA GTGAGTACCA ATACCGTCGT

4061 CTGCATAATT CTCCTTACTGT CATGCCATCC GTAGATGCT TTCTGTGAC TGGTGAGTAC TCAACCAAGT
 GACGTATTAA GAGNATGACA GTACGGTAGG CATCTACGA AAAGACACTG ACCACTCATG AGTTGGTTCA

4131 CATTCTGAGA ATAGTGTATG CCGGACCGA GTTGCTCTTG CCGGGCTCA ATACGGGATA ATACCGCGCC
 GTAAGACTCT TATCACATAC GCCCGTGGT CAACGAGAAC GGGCGCAGT TATGCCCTAT TATGGCGCGG

4201 ACATAGCAGA ACTTTAAAG TGCTCATCAT TGGAAAACGT TCTTCGGGC GAARACTTC AAGGATCTTA
 TGTATCGTCT TGAATTTTC ACGACTAGTA ACCTTTGGCA AGAAGCCCCG CTTTIGAGAG TTCCTAGAAT

4271 CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACC ACTCGTGCAC CCAACTGATC TTCAGCATCT TTTACTTTCA
 GCGGACAACT CTAGGTCAG CTACATTGG TGAGCACGCG GGTGACTAG AAGTCGTAGA AAATGAAAGT

4341 CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAG GGAATAAGG CGACACGGAA
 GGTCCGCAAG ACCCACTCGT TTTTGTCTT CCGTTTACG GCGTTTTTC CCTATTCCC GCTGTGCCTT

4411 ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTICA ATATTATTGA AGCATTTATC AGGTTATTG TCTCATGAGC
 TACAACCTTAT GAGTATGAGA AGGAAAAGT TATAATNACT TCGTAAATAG TCCCAATAAC AGACTACTCG

FIG. 8-8

4481 GGATACATAT TTGAAATGAT TTAGAAAAAT AAACAAATAG GGGTTCCCGG CACATTTCCC CGAAAAGTGC
 CCTATGTATA AACTTACATA AATCTTTTTA TTGTGTTTATC CCCAAGGCGC GTGTAAAGGG GCTTTTCACG

 4551 CACCTGACGT CTAAGAAACC ATTAATATCA TGACATTAAC CTATAAAAAT AGCGGTATCA CGAGGCCCTT
 GTGGACTGCA GATTCCTTGG TAATAAATAGT ACTCTAATTTG GATATTTTTA TCCGCATAGT GCTCCGGGAA

 4621 TCGTCTCGG CGTTTCGGT ATGACGGTGA AAACCTCTGA CACATGCAGC TCCCGGAGAC GGTCAAGCT
 AGCAGAGCGC GCAAAGCCAC TACTGCCACT TTGTGAGACT GTGTACGTGG AGGGCCCTCTG CCAGTGTGGA

 4691 TGTCTGTAAG CGGATGCCGG GAGCAGACAA GCCCGTCAAG GCGGTGTGGC GGGTGTGGG
 ACAGACATTC GCCTAGCGCC CTCGTCTGTT CGGCAGTCC CGCCAGTGG CCACAAACCG CCCACAGGCC

 4761 GCTGGCTTAA CTAUGCGGCA TCAGAGCAGA TTGTAAGTGA AATGCACCAT ATGCCGTGTG AAATACCGCA
 CGACCGAATT GATACGCCGT AGTCTCGTCT AACATGACTC TCACGTGSTA TAGCCACAC TTTATGSGGT

 4831 CAGATGCCGA AGGAAAAAT ACCGCATCAG GCCCATTCG CCATTCAGGC TCCGCCAATG TTGGGAGGG
 GTCTAGGCAT TCCTCTTTTA TGGCGTAGC CGCGTAAGC GGTAAAGTCCG ACGCGTTGAC AACCCCTTCCC

 4901 CGATCCGGTG GGGCTCTTC GCTATTACGC CAGCTGGCGA AAGGGGGATG TGCTGCAAGG CGATTANGTT
 GCTAGCCAG CCCGGAGAAG CGATAATGGG GTCGACCGGT TTCCCCCTAC ACGACGTTC GCTAATTCAA

 4971 GGGTAACGCC AGGTTTTCC CAGTCACGAC GTGTAAAC GACGGCCAGT GAATTGGATT TAGGTGACAC
 CCCATTGCGG TCCCAAAGG GTCAGTGTG CAAACATTTG CTGCCGGTCA CTTAACCTAA ATCCACTGTG

 5041 TATA
 ATAT

FIG. 8-9

FIG. 8-1
FIG. 8-2
FIG. 8-3
FIG. 8-4
FIG. 8-5
FIG. 8-6
FIG. 8-7
FIG. 8-8
FIG. 8-9

FIG. 8

ATGAGAGTGAGGGAGACAGTGAGGAATTATCAGCAGCTTGTGGAGATGGGGCATCATGCTCC
 TTGGGATGTTAATGATATGTAGTGCTGCAGACCAGCTGTGGGTCCACAGTGATTATGGGGT
 ACCTGTGTGGAAAAGAAGCAACCACTACTCTATTTTGTGCATCAGATGCTAAAGCACATAAA
 GCAGAGGCACATAATATCTGGGCTACACATGCCTGTGTACCAACAGACCCCAATCCACGAG
 AAATAATACTAGGAAATGTACAGAAAACTTTAAACATGTGGAAGAATAACATGGTAGAGCA
 GATGCATGAGGATATAATCAGTTTATGGGATCAAAGTCTAAAACCATGTGTAAAAATTAACC
 CCACTCTGTGTTACTTTAAACTGCACATACATATTGGAATGGAACCTTACAGGGGAATGAAA
 CTAAAGGGAAGAATAGAAGTGACATAATGACATGCTCTTCAATATAACCACAGAAATAAG
 AGGTAGAAAAGAAGCAAGAACTGCACTTTTCTATAAACTTGATGTGGTACCCTAGAGGAT
 AAGGATAGTAATAAGACTACCAACTATAGCAGCTATAGATTAATAAAATTGCAATACCTCAG
 TCGTGACACAGGCGTGTCCAAAAGTAACCTTTGAGCCAATTCCCATACATTATTGTGCCCC
 AGCTGGATTTGCGATTCTGAAATGTAATAATAAGACGTTCAATGGAACGGGTCCATGCAAA
 AATGTCAGCACAGTACAGTGTACACATGGAATTAGGCCAGTAGTGTCAACTCAACTGTTGT
 TGAATGGCAGTCTAGCAGAAGAAGAGATAATAATTAGATCTGAAAATATCACAAATAATGC
 AAAAACCATATAAGTACAGCTTAATGAGTCTGTAACAATTGATTGCATAAGGCCCAACAAC
 AATACAAGAAAAAGTATACGCATAGGACCAGGGCAAGCACTCTATACAACAGACATAATAG
 GGAATATAAGACAAGCACATTGTAATGTTAGTAAAGTAAAATGGGGAAGAATGTTAAAAAG
 GGTAGCTGAAAAATTAAGACCTTCTTAACCAGACAAAGAACATAACTTTTGAACCATCC
 TCAGGAGGGGACCAGAAATTACAACACACAGCTTTAATTGTGGAGGGGAATTTCTTCTACT
 GCAATCAGACTCAGGACTATTTAATGGGAGTCTGCTTAATGAGCAGTTAATGAGACATCAAA
 TGATACTCTCACACTCCAATGCAGAATAAAACAAATTATAAACATGTGGCAAGGAGTAGGA
 AAAGCAATGTATGCCCTCCCATTGCAGGACCAATCAGCTGTTTCATCAAATATTACAGGAC
 TATTGTTGACAAGAGATGGTGGTAATACTGGTAATGATTGAGAGATCTTCAGACCTGGAGG
 GGGAGATATGAGAGACAATTGGAGAAGTGAATTATACAAATATAAAGTAGTAAGAATTGAA
 CCAATGGGTCTAGCACCCACCAGGGCAAAAAGAAGACTGGTGGAAAGAGAAAAAAGAGCAA
 TAGGACTGGGAGCTATGTTCCCTGGGTTCTTGGGAGCGGCAGGAAGCACGATGGGCGCAGC
 GTCAGTACGCTGACGGTACAGGCCAGACAGTTATTGTCTGGTATAGTGCAACAGCAAAAC
 AATTTGCTGAGAGCTATAGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATT
 AACAGCTCCAGGCAAGAGTCTGGCTATGGAAGCTACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGG
 AATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACACATTTGCACCACTACTGTGCCCTGGAACCTACCTGG
 AGTAATAGATCTGTAGAGGAGATTTGGAATAATATGACCTGGATGCAGTGGGAAAGAGAAA
 TTGAGAATTACACAGGTTTAAATATACACCTTAATTGAAGAATCGCAAACCCAGCAAGAAAA
 GAATGAACAAGAACTATTGCAATTGGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAGTATA
 ACAAATGGCTGTGGTATATAAAAATATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTAATAGGTTTAA
 GAATAGTTTTTGTGCTGCTTTCTTTAGTAAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCTCTGTC
 TTTTCAGACCCTCCTCCCAGCCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAA
 GGTGGAGAGCAAGGCTAA

Fig. 9

ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGAGGAAAATTAGATGAATGGGAAAAAATT
 CGGTTACGGCCAGGAGGAAACAAAAATATAGATTA AACATTTAGTATGGGCAAGC
 AGGGAGCTAGAACGATTTGCACTTAATCCTGGTCTTTTAGAAACATCAGAAGGCTGT
 AGACAAATAATAGAACAGCTACAACCATCTATTCAGACAGGATCAGAGGAACTTAAA
 TCATTACATAATACAGTAGTAACCCTCTATTGTGTACATGAAAGGATAAAGGTAGCA
 GATACCAAGGAAGCTTTAGATAAGATAAAGGAAGAACAACCAAAGTAAGAAAAAA
 GCACAGCAAGCAACAGCTGACAGCAGCCAGGTGAGCCAAAATTATCCTATAGTACAA
 AACCTACAGGGACAAATGGTACACCAGTCCTTATCACCTAGGACTTTGAATGCATGG
 GTAAAAGTAATAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCAGAAGTAATACCCATGTTTTAGCA
 TTATCAGAAGGAGCCACACCAACAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTAGGAGGA
 CATCAAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACTATCAATGAGGAAGCTGCAGAAATGG
 GATAGGCTACATCCAGTGCCTGCAGGGCCTGTTGCACCAGGCCAAATGAGAGAACCA
 AGAGGAAGTGATATAGCAGGAACCTACCAGTACCCTTCAGGAACAAAGAAATCTATAA
 AAGATGGATAATCCTAGGATTAATAAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTGTCAGCAT
 TTTGGACATAAGACAAGGACCAAAGGAACCCTTTAGAGACTATGTAGATCGGTTCTA
 TAAAATCTACGAGCCGAGCAAGCTTTCACAGGATGTAAAAAATTGGATGACTGAAAC
 CTTGTTAGTCCAAAATGCGAATCCAGATTGTAAAACTATCTTAAAAGCATTGGGACC
 AGCGGCTACATTAGAAGAAATGATGACAGCATGTGAGGGAGTGGGGGGACCCAGTCA
 TAAAGCAAGAGTTTTGGCTGAGGCAATGAGCCAAGCATCAAACACAAATGCTGTTAT
 AATGATGCAGAGGGGCAATTTCAAGGGCAAGAAAATCATTAAGTGTTCAACTGTGG
 CAAAGAAGGACACCTAGCAAAAAAATTGTAGGGCTCCTAGGAAAAGAGGCTGTTGGAA
 ATGTGGAAAGGAAGGGCACCAAATGAAAGATTGTAATGAAAGACAGGCTAATTTTTT
 AGGGAGAATTTGGCCTTCCCACAAGGGGAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACC
 AGAGCCAACAGCCCCACCAGCAGAGAGCTTCGGGTTTGGGGAAGAGATAACACCCTC
 CCAGAAACAGGAGGGGAAAGAGGAGCTGTATCCTTCAGCCTCCCTCAAATCACTCTT
 TGGCAACGACCCCTAGTCACAATAAAAATAGGGGGACAGCTAAAGGAAGCTCTATTA
 GATACAGGAGCAGATGATACAGTAGTAGAAGAAATGAATTTGCCAGGAAAATGGAAA
 CCAAAAATGATAGGGGGAATTTGGGGGCTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAAATA
 CTCGTAGAAATCTATGGATATAAGGCTACAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCT
 GTCAACATAATTGGAAGAAATTTGTTGACTCAGATTGGTTGCACTTTAAATTTTCCA
 ATTAGTCCTATTGAAACTGTACCAGTAAAATTAAAGTCAGGGATGGATGGTCCAAGA
 GTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAGAAAATAAAAAGCACTAATAGAAATTTGTACA
 GAAATGGAAAAGGAAGGAAAATTTCAAGAATTGGACCTGAAAATCCATACAATACT
 CCAATATTTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAGTGGAGAAAATTAGTAGATTTTC
 AGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAGTTCAACTAGGAATACCACAT
 CCTGCAGGGCTAAAAAAGAAAAATCAGTAACAGTACTGGAGGTGGGTGATGCATAT
 TTTTCAGTTCCTTATATGAAGACTTTAGAAAATACACTGCATTACCATACTTAGT
 ATAAACAATGAGACACCAGGAATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAAGGATGG
 AAAGGATCACCGGCAATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAATTTTAGAACCTTTTAGA
 AAACAAAATCCAGAAGTGGTTATCTACCAATACATGCACGATTTGTATGTAGGATCT
 GACTTA

Fig. 10-1

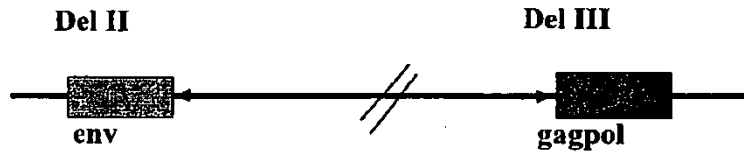
GAAATAGGGCAGCATAGAATAAAAAATAGAGGAATTAAGGGGACACCTATTGAAGTGGG
GATTTACCACACCAGACAAAAATCATCAGAAGGAACCTCCATTTCTTTGGATGGGTTA
TGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAAACTGCCAGAAAAAGAAAGC
TGGACTGTCAATGATCTGCAGAAAGTTAGTGGGGAAATTAATTTGGGCAAGTCAAATTT
ATTCAGGAATTAAGTAAGACAATTATGCAAATGCCTTAGGGGAACCAAAGCACTGAC
AGAAGTAGTACCACTGACAGAAAGCAGAAATTAGAACTGGCAGAAAACAGGGAACTT
CTAAAAGAAACAGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAGACTTAATAGCAGAAA
TACAGAAACAAGGGCAAGACCAATGGACATATCAAATTTATCAAGAACAATATAAAAA
TTTGAAAACAGGAAAGTATGCAAAGAGGAGGAGTACCCACACTAATGATGTAAAACAA
TTAACAGAGGCAGTGCAAAAAATAGCCCAAGAATGTATAGTGATATGGGGAAAGACTC
CTAAATTCAGACTACCCATACAAAAGGAAACATGGGAAACATGGTGGACAGAGTATTG
GCAGGCCACCTGGATTCTTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCCCTCCCTTGGTTAAATTA
TGGTACCAGTTAGAGAAGGAACCCATAGTAGGAGCAGAAACCTTCTAA

Fig. 10-2

Fig. 10-1
Fig. 10-2

Fig. 10

A



B

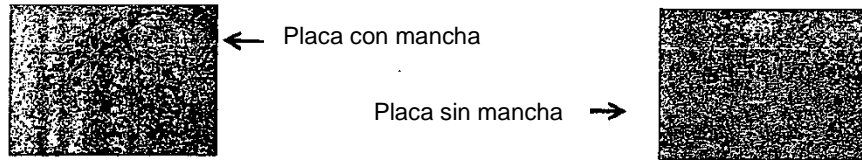


Fig. 11

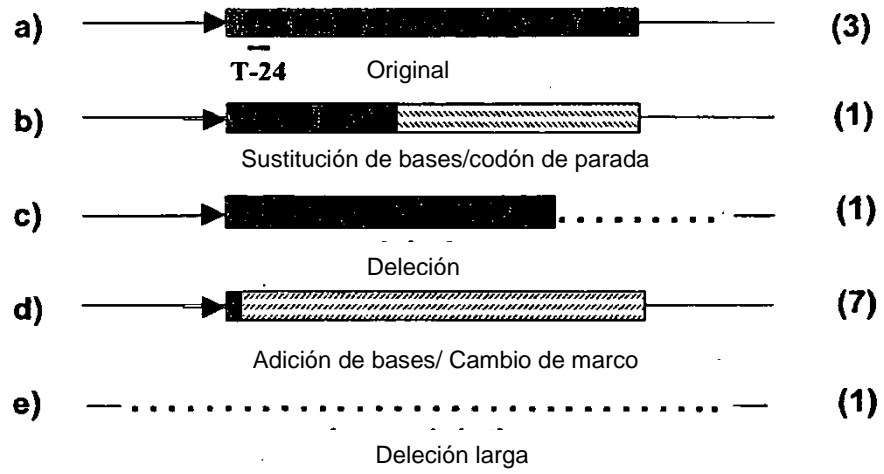


Fig. 12

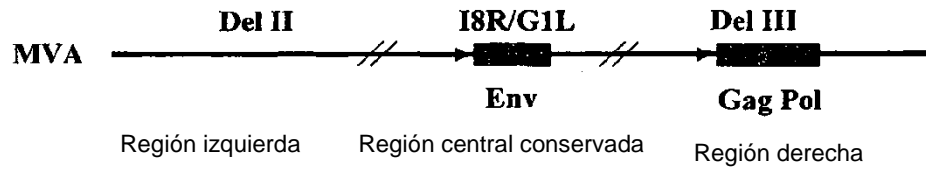


Fig. 13

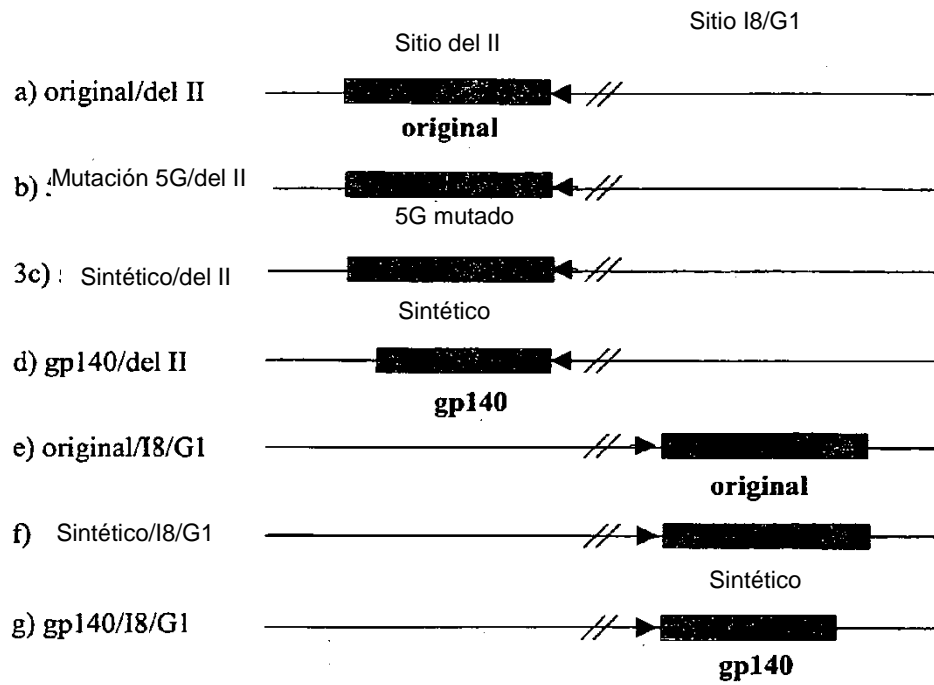


Fig. 14

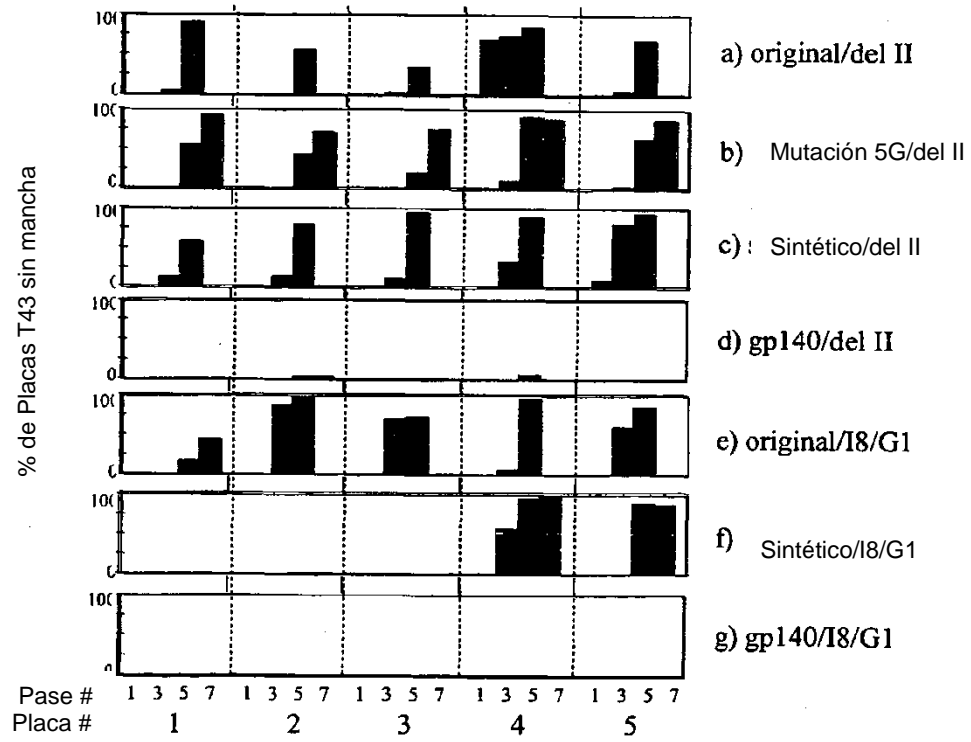


Fig. 15

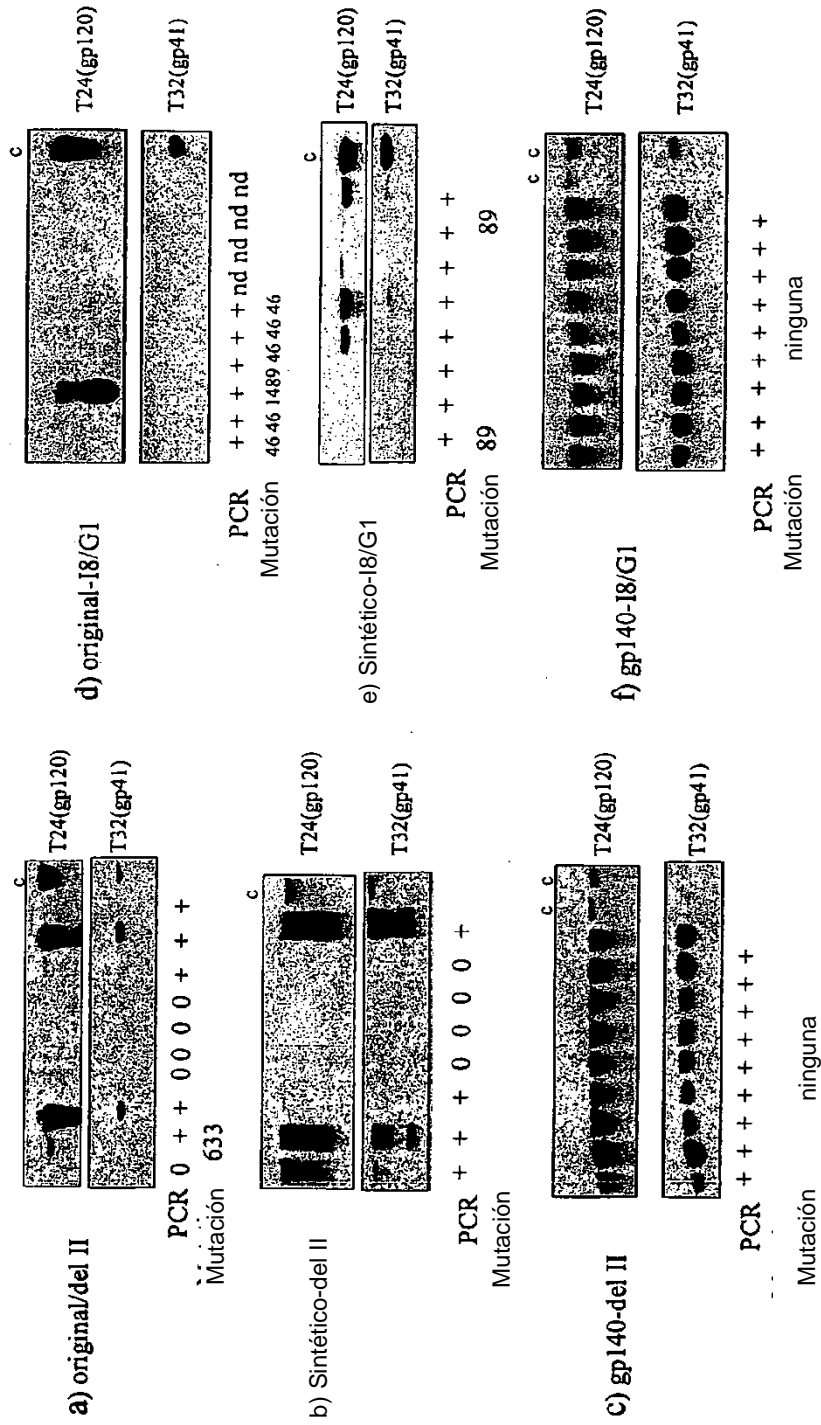


Fig. 16

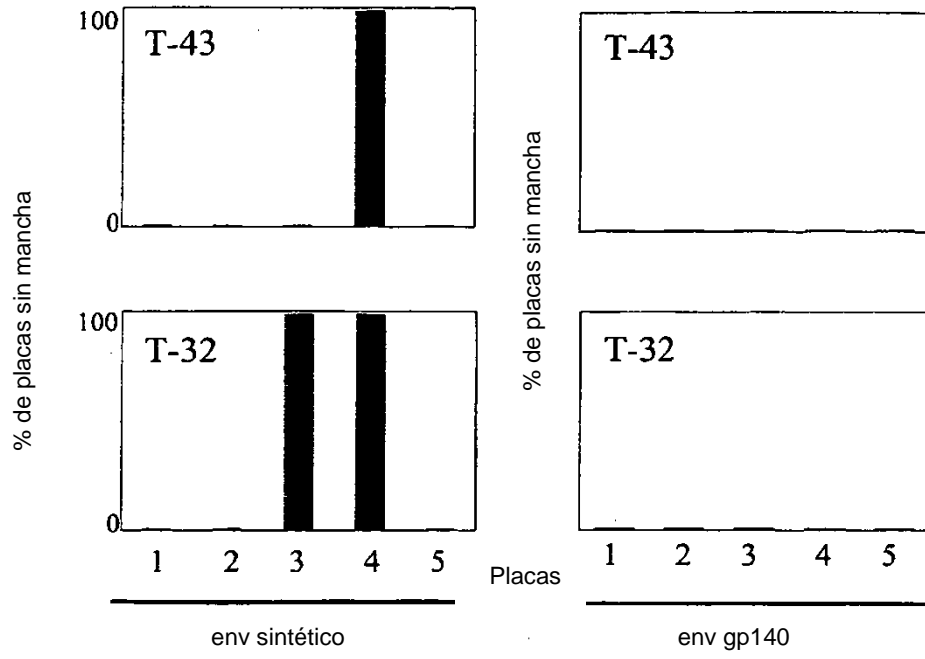


Fig. 17

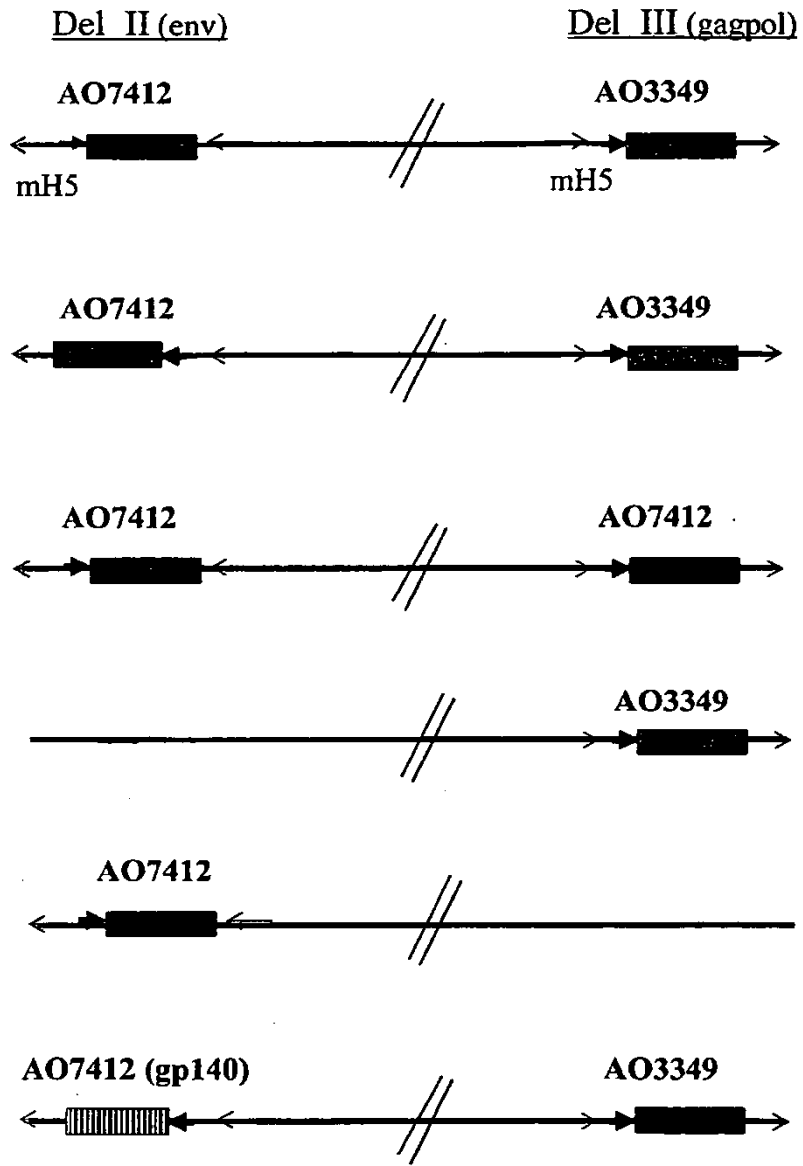


Fig. 18

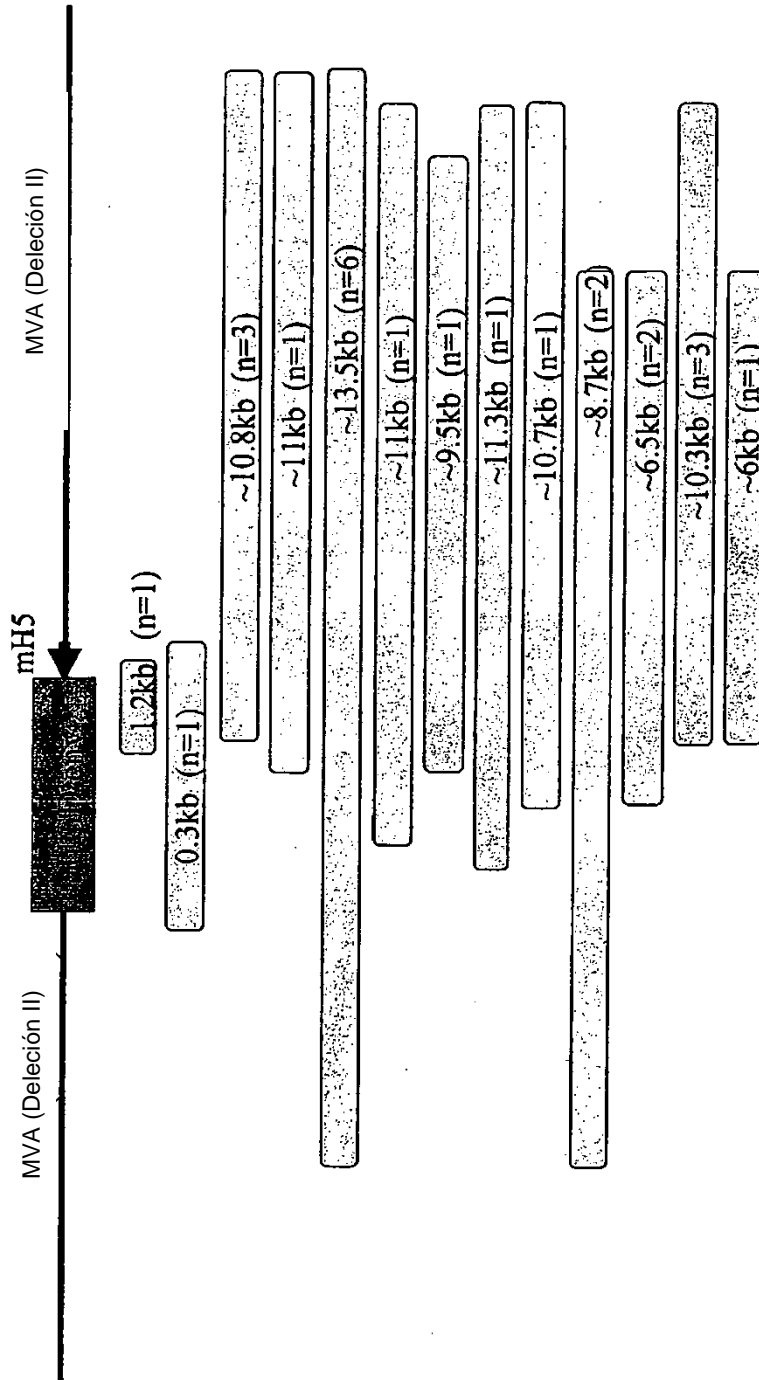


Fig. 19

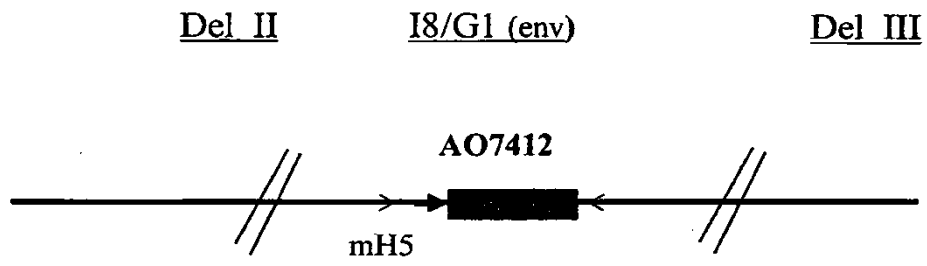


Fig. 20

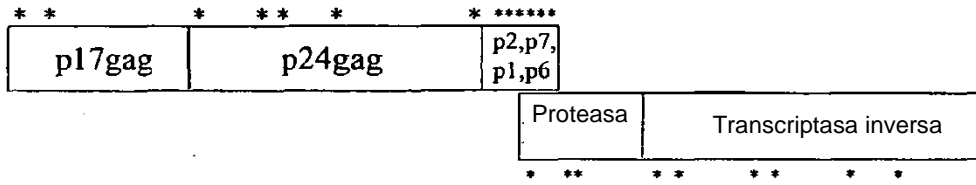


Fig. 21

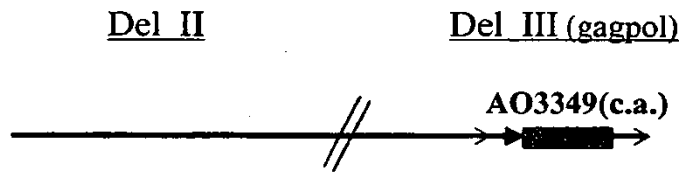


Fig. 22

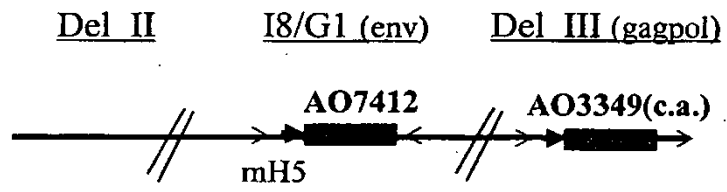


Fig. 23

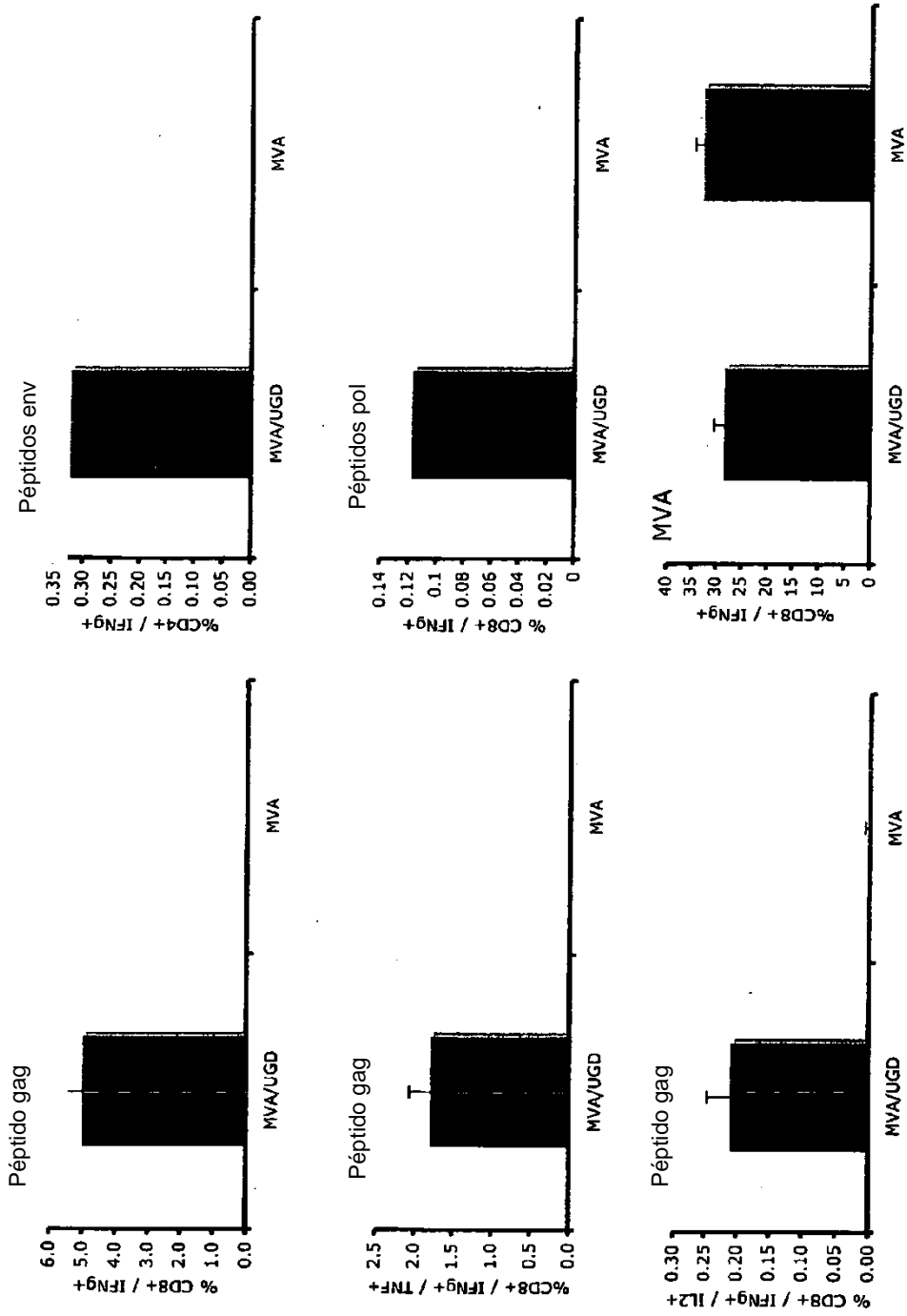


Fig. 24

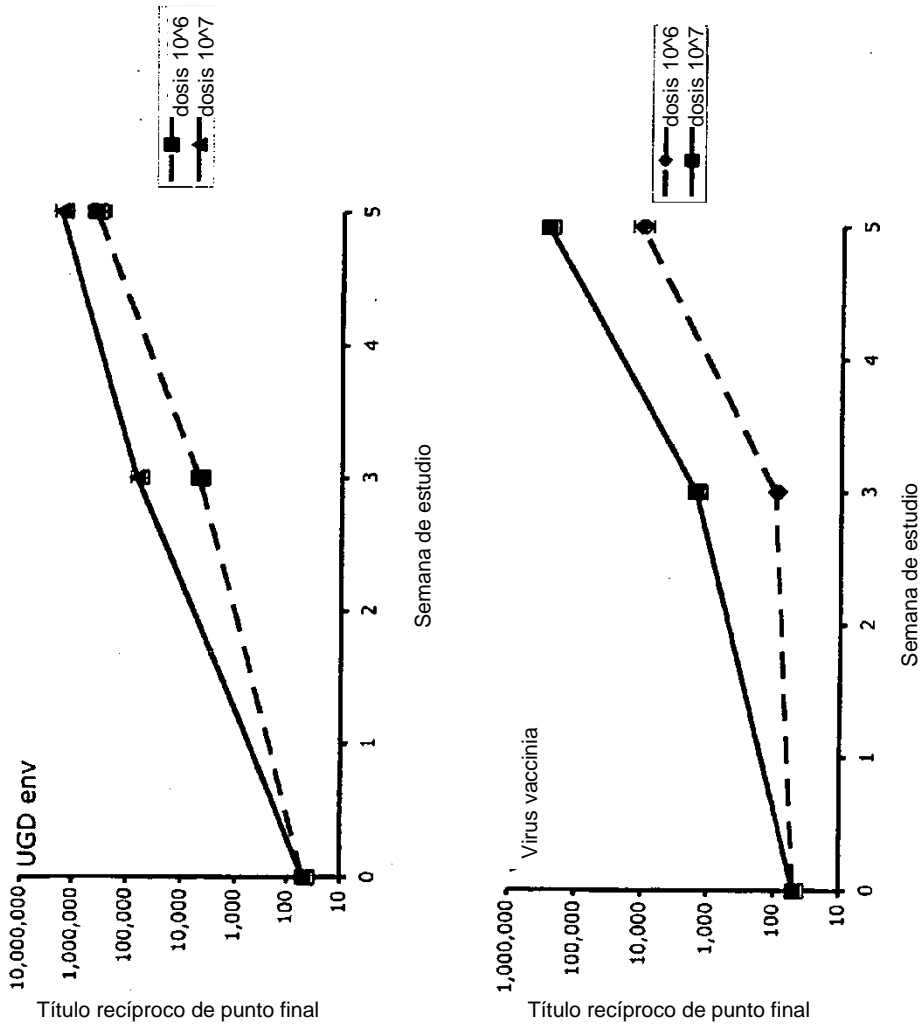


Fig. 25