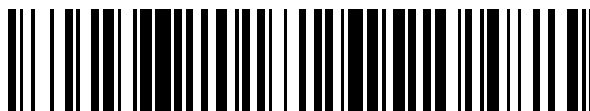


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 010**

51 Int. Cl.:

C07K 14/16 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

C12N 15/863 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2005 E 05807378 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 1789438**

54 Título: **Virus MVA recombinantes que expresan genes env, gag y pol modificados de VIH clado A/G, clado B, y clado C**

30 Prioridad:

27.08.2004 US 604918 P

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

25.06.2015

73 Titular/es:

THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (33.3%)

The National Institute of Health, Office of Technology Transfer, 6011 Executive Boulevard, Suite 325

Rockville, MD 20852-3804, US;

EMORY UNIVERSITY (33.3%) y

THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (33.3%)

72 Inventor/es:

MOSS, BERNARD;

WYATT, LINDA y

ROBINSON, HARRIET L.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 539 010 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

Virus MVA recombinantes que expresan genes *env*, *gag* y *pol* modificados de VIH clado A/G, clado B, y clado C.

5 **Campo de la invención**

La invención proporciona vaccinia Ankara modificada (MVA), una cepa deficiente en replicación del virus vaccinia, que expresa los genes *env*, *gag*, y *pol* del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

10 **Descripción de la técnica relacionada**

Se han desarrollado muchos nuevos candidatos y enfoques en la búsqueda por identificar una vacuna eficaz contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La inducción de fuerte inmunidad mediada por células y anticuerpos anti-envuelta ampliamente reactivos que puedan neutralizar VIH-1 primario pueden ser necesarios para la preparación de una vacuna eficaz contra VIH-1, y la vacuna ideal puede necesitar la inducción de respuestas tanto de células T como B. La vacunación con ADN plasmídico puede provocar respuestas inmunes tanto humorales como celulares (Tang et al. 1992 Nature 356: 152-154; Ulmer et al. 1993 Science 259:1745-1749; y Wolff et al. 1990 Science 247:1465-1468) que protegen a primates no humanos contra exposiciones con virus del SIDA no patogénicos (Boyer et al. 1997 Nat. Med. 3:526-532; y Letvin et al. 1997 PNAS U.S.A. 94:9378-9383.) y produzcan protección moderada contra enfermedad por virus patogénico de la inmunodeficiencia de simios (VIS) (Egan et al. 2000 J. Virol. 74:7485-7495; y Lu et al. 1996 J. Virol. 70: 3978-3991).

Las vacunas que se han diseñado para crear inmunidad celular pueden en algunos casos controlar exposiciones víricas virulentas y prevenir el desarrollo de SIDA en macacos rhesus (Amara et al. 2001 Science 292: 69-74; Barouch et al. 2000 Science 290: 486-492; Barouch et al. 2001 J. Virol. 75:5151-5158; Rose et al. 2001 Cell 106:539-549; y Shiver et al. 2002 Nature 415: 331-335). La sensibilización de la respuesta inmune con ADN plasmídico seguido por un refuerzo con poxvirus recombinante tal como el virus vaccinia Ankara modificado (Amara et al. 2001 Science 292:69-74 y Robinson et al. 2000 AIDS Rev. 2:105-110) o un refuerzo de proteína VLP más IL-12/GM-CSF (O'Neill et al. 2003 AIDS Res. Hum. Retrovir. 19: 883-890 y O'Neill et al. 2002 J. Med. Primatol. 31: 217-227) son dos de los muchos enfoques diferentes para crear inmunidad celular. Incluyendo múltiples regiones génicas de VIH-1 en el mismo vector se aumenta el enfoque de sensibilización con ADN-refuerzo con MVA, ya que respuestas tanto a *gag* como a *env* son importantes para proteger contra exposición al virus (Amara et al. 2002 J. Virol. 76:6138-6146). Carecen de esta ventaja potencial las vacunas de ADN de VIH-1 que codifican solamente Gag o codifican Gag, Env, y otras proteínas virales en construcciones diferentes de ADN (Barouch et al. 2000 Science 290: 486-492; Barouch et al. 2002 Nature 415:335-339 y Kang et al. 1999 Biol. Chem. 380: 353-364). La evasión del VIH es posible cuando la respuesta inmune está dirigida por un único epítipo dominante (Barouch et al. 2000 Science 290: 486-492; Barouch et al. 2002 Nature 415:335-339 y Mortara et al. 1998 J. Viol 72: 1403-1410); por tanto, una respuesta multi-epítipo o multi-proteína parece ventajosa.

Está bien establecido que el ensamblaje VLP y la liberación de células depende de la apropiada regulación de proteasa intracelular para conservar la poliproteína Gag (Gottlinger et al. 1989 PNAS USA 86: 5781-5785; Karacostas et al. 1993 Virology 193:661-671 y Peng et al. 1989 J. Virol. 63:2550-2556) y puede observarse tras transfección de sistemas de expresión solamente de Gag (Huang et al. 2001 J. Virol. 75: 4947-4951; Kang et al. 1999 Biol. Chem. 380: 353-364 y Schneider et al. 1997 J. Virol. 71:4892-4903). Estudios previos demostraron que la alteración del 25º resto de proteasa, de Asp (D) a Asn (N), provocó la pérdida completa de actividad proteasa (Gottlinger et al. 1989 PNAS USA 86: 5781-5785; Kohl et al. 1988 PNAS USA 85:4686-4690 y Loeb et al. 1989 J. Virol. 63: 111-121). Además, Jacobsen et al. (1995 Virology 206:527-534) demostraron que la mutagénesis de proteasa en las posiciones 48 (G48V) y 90 (M90L) condujo a actividad enzimática menos eficaz y procesamiento retardado de las poliproteínas *gag* y *gag-pol*. Mutaciones en la proteasa en cualquiera de las posiciones de aminoácido 48 y 90 retardan, pero no eliminan, la actividad enzimática proteasa, a diferencia de la mutación D25N, y permiten la producción de virus infeccioso cuando está presente dentro de un provirus por lo demás de tipo silvestre. Un estudio reciente sugirió que las dos mutaciones de proteasa en las posiciones 48 y 90 no son limitantes, no solamente en términos de producción de alto nivel de proteínas de VIH-1, sino también con respecto al ensamblaje de VLP (Ellenberger et al. 2004 Virology 319: 118-130).

Una de las vacunas contra VIH más prometedoras es el enfoque de sensibilización-refuerzo heterólogo. La sensibilización puede consistir en un ADN plasmídico recombinante o proteínas de VIH que se expresan en vector viral. El refuerzo heterólogo sería un vector viral recombinante (poxvirus o adenovirus) o segundo vector viral, que optimice el refuerzo para el inmunógeno de inserto de vacuna y no el propio vector. El uso del mismo vector viral recombinante para la sensibilización y el refuerzo puede conducir a una respuesta inmune disminuida similar a la inmunidad preexistente contra el vector recombinante (Vogels et al. 2003 J. Virol. 77: 8263-8271). La sensibilización con un ADN plasmídico recombinante y el refuerzo con un MVA recombinante potencia las respuestas celulares contra un inmunógeno común contenido en ambos vectores (Amara et al. 2001 Science 292: 69-74; Hanke et al. 1998 Vaccine 16: 439-445; Schneider et al. 1998 Nat. Med. 4: 397-402; y Schneider et al. 2001 Vaccine 19: 4595-4602). En la fase efectora máxima de la respuesta inmune contra el protocolo de vacuna, las células CD8 inducidas pueden alcanzar frecuencias muy elevadas de células CD8 totales (Allen et al. 2000 J. Immunol. 164:4968-4978;

Amara et al. 2001 Science 292: 69-74; y Horton et al. 2002 J. Virol. 76: 7187-7202).

Wyatt et al. (2004, Aids Research and Human Retroviruses 20(6): 645-653) describen un vector MVA que comprende gag-pol de VIH de clado B bajo el control transcripcional de PmH5 y env bajo el control transcripcional de pSynII, insertados en delección III de MVA. Se muestra inducción de una respuesta CD8 en ratones después de vacunación de sensibilización y refuerzo con dicho MVA y la correspondiente vacuna de ADN. Un vector MVA que comprende env de clado B insertado en delección II de MVA y gag-pol de VIS insertado en delección III de MVA, ambos bajo el control transcripcional de PmH5 se describe en Earl et al. (2002, Virology 294: 270-281). Se mostró inducción de una respuesta CD8 después de vacunación de sensibilización y refuerzo con ADN/MVA en macacos rhesus.

Sumario de la invención

La invención, en un primer aspecto, se refiere a una composición farmacéutica que comprende un virus MVA recombinante que expresa un gen *env*, *gag*, y *pol* de VIH o gen modificado de los mismos para la producción de un antígeno Env, Gag, y Pol de VIH por expresión a partir de dicho virus MVA recombinante, donde el gen *env* de VIH está modificado para codificar una proteína Env de VIH compuesta por gp120 y el dominio de membrana y ectodominio de gp41 pero que carece de parte o todo el dominio citoplasmático de gp41, y un vehículo farmacéuticamente aceptable; donde el gen *env*, *gag*, o *pol* o gen modificado de los mismos se obtiene del clado AG y dicho gen *env* de VIH o gen modificado del mismo tiene la secuencia expuesta en la Figura 12 o una secuencia al menos un 97 %, 98 %, 99 % o 99,9 % idéntica a la misma, y el gen o genes *gag* y *pol* de VIH o gen o genes modificados de los mismos tienen la secuencia expuesta en la Figura 13 o una secuencia al menos un 97 %, 98 %, 99 % o 99,9 % idéntica a la misma, y donde el gen *pol* codifica una asparagina en el aminoácido 185 de la transcriptasa inversa, una treonina en el aminoácido 266 de la transcriptasa inversa y una glutamina en el aminoácido 478 de la transcriptasa inversa; o el gen *env*, *gag*, o *pol* de VIH o gen modificado de los mismos se obtiene del clado B y el gen *env* de VIH o gen modificado del mismo tiene la secuencia expuesta en la Figura 23 o una secuencia al menos un 97 %, 98 %, 99 % o 99,9 % idéntica a la misma, y el gen o genes *gag* y *pol* de VIH o gen o genes modificados de los mismos tiene la secuencia expuesta en la Figura 24 o una secuencia al menos un 97 %, 98 %, 99 % o 99,9 % idéntica a la misma, y donde el gen *pol* codifica una asparagina en el aminoácido 185 de la transcriptasa inversa, una treonina en el aminoácido 266 de la transcriptasa inversa y una glutamina en el aminoácido 478 de la transcriptasa inversa; o el gen *env*, *gag*, o *pol* de VIH o gen modificado de los mismos se obtiene del clado C y el gen *env* de VIH o gen modificado del mismo tiene la secuencia expuesta en la Figura 39 o una secuencia al menos un 97 %, 98 %, 99 % o 99,9 % idéntica a la misma, y el gen o genes *gag* y *pol* de VIH o gen o genes modificados de los mismos tiene la secuencia expuesta en la Figura 40 o una secuencia al menos un 97 %, 98 %, 99 % o 99,9 % idéntica a la misma, y donde el gen *pol* codifica una asparagina en el aminoácido 185 de la transcriptasa inversa, una treonina en el aminoácido 266 de la transcriptasa inversa y una glutamina en el aminoácido 478 de la transcriptasa inversa; donde dicho gen *env* se inserta en la delección II del virus MVA y dichos genes *gag* y *pol* se insertan en la delección III del virus MVA y donde dicho gen *env*, dichos genes *gag-pol* están bajo el control del promotor mH5.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Relaciones filogenéticas de VIH-1 y VIH-2 basadas en la identidad de las secuencias del gen *pol*. VIS_{cpz} y VIS_{smm} son lentivirus de primates subhumanos recuperados de un chimpancé y monos mangabeyes grises, respectivamente.

Figura 2. Relaciones filogenéticas de VIH-1 grupos M, N y O con cuatro diferentes aislados VIS_{cpz} basadas en secuencias de longitud completa del gen *pol*. La barra indica una distancia genética de 0,1 (divergencia de nucleótidos del 10 %) y el *asterisco* posiciona aislados de VIH-1 grupo N en base a secuencias de *env*.

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

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

Figura 5. Representación esquemática de un virión maduro de VIH-1.

Figura 6. Representación lineal de la glucoproteína Env de VIH-1. La *flecha* indica el sitio de escisión de gp160 en gp120 y gp41. En gp120, las áreas de *entramado lineal* representan dominios variables (V₁ a V₅) y los *recuadros abiertos* 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 (N- y C-hélice). El dominio de membrana está representado por un *recuadro negro*. En el dominio citoplasmático gp41, se muestra el motivo de endocitosis Tyr-X-X-Leu (YXXL) (**SEC ID N° 13**) y dos dominios helicoides predichos (hélice-1 y -2). Se indican los números de aminoácido.

Figura 7. Vector de transferencia pJD-5.

Figura 8. Vector de transferencia pJD6.

Figura 9. Diagrama de flujo "Construcción de MVA 65A/G recombinante".

Figura 10. Expresión en MVA 65A/G de Env de VIH.

Figura 11. Expresión en MVA 65A/G de GagPol de VIH.

Figura 12. Secuencia de Env de MVA 65A/G (**SEC ID N° 1**).

Figura 13. Secuencia de GagPol de MVA 65A/G (**SEC ID N° 2**)

- Figura 14.** Vector de transferencia pJD-16.
- Figura 15.** Expresión de envuelta potenciada a partir de MVA 65A/G modificado.
- Figura 16.** Expresión de Gag a partir de construcciones de MVA 65A/G.
- Figura 17.** Títulos ELISA de gp140 de clado A/G de ratones inmunizados.
- 5 **Figura 18.** Respuesta ICS al péptido p24 de clado A.
- Figura 19.** Vector de transferencia de Gag Pol pLAS-1 HXB2/BH10.
- Figura 20.** Vector de transferencia de ADA Env pLAS-2.
- Figura 21.** Diagrama de flujo "Construcción de MVA 62B recombinante".
- Figura 22.** Expresión de Env y gag de VIH a partir de MVA 62B.
- 10 **Figura 23.** Secuencia de ADA *Env* de MVA 62B (**SEC ID N 3**).
- Figura 24.** Secuencia de *Gag Pol* de HXB2/BH10 en MVA 62B (**SEC ID N 4**).
- Figura 25.** Respuestas contra Env y gag por tinción con citoquinas intracelulares (ICS) en ratones inmunizados con MVA 62B.
- Figura 26.** Vector de transferencia pLW-66.
- 15 **Figura 27.** Vector de transferencia pJD-17.
- Figura 28.** Expresión potenciada de construcciones modificadas de MVA 62B.
- Figura 29.** Expresión de Gag a partir de las construcciones modificadas de MVA 62B.
- Figura 30.** Títulos ELISA de gp140 potenciados con construcciones modificadas en ratones.
- Figura 31.** Respuesta contra Env por ICS potenciada con construcciones modificadas.
- 20 **Figura 32.** Respuesta contra Gag por ICS.
- Figura 33.** Plásmido de transferencia pLAS-6 para MVA 56.
- Figura 34.** Expresión de Env y GagPol por los MVA recombinantes MVA 48 y 56.
- Figura 35.** Plásmido pDC-3 (LAS-1 C-IN3 gag pol)
- Figura 36.** Plásmido pJD-15 (LAS-2 C-IN3 env).
- 25 **Figura 37.** Diagrama de flujo "Construcción de MVA/VIH 71 C recombinante".
- Figura 38.** Expresión en MVA 71 C de Env y GagPol de VIH.
- Figura 39.** Secuencia de Env de MVA/VIH 71 C (**SEC ID N° 5**).
- Figura 40.** Secuencia de Gag Pol de MVA/VIH 71 C (**SEC ID N° 6**).
- Figura 41.** Análisis de partículas tipo VIH-1. (A) análisis de inmunotransferencia de VLP purificadas en gradiente de sacarosa usando anticuerpo policlonal de conejo anti-p24. Las posiciones de los precursores y productos de VIH se indican a la derecha. La fracción 9 de cada gradiente se separó por SDS-PAGE, se transfirió a nitrocelulosa, y se analizó por inmunotransferencia. La construcción de vacuna pGA1/IC25 (eliminación completa de actividad proteasa de VIH) se incluyó como referencia (Ellenberger, D. et al. 2004 *Virology* 319:118-130). (B) resumen de las mutaciones de proteasa introducidas en construcciones de vacuna y productos de expresión demostrables. (C) microscopía electrónica de transmisión de VLP y agregados de proteínas intracelulares en células 293T transfectadas con construcciones de vacuna IC1-90 e IC48.
- 30 **Figura 42.** Respuestas ELISPOT temporales de IFN- γ para grupos sensibilizados con ADN pGA1/IC1-90 y pGA1/IC48. Se ensayaron dieciséis animales contra 19 combinaciones de péptidos. Los símbolos indican la respuesta ELISPOT total de cada animal individual. La barra en negrita representa la media aritmética de cada grupo designado. La respuesta ELISPOT máxima (+42 semanas; 1 semana después del refuerzo con MVA), la respuesta de memoria (8 semanas después de MVA), y la memoria tardía (26 semanas después de MVA) están indicadas. El valor de fondo (2x promedio de control negativo más 10) se sustrajo de los recuentos sin procesar de los pocillos de péptido antes de la conversión a 1 millón de PBMC.
- 35 **Figura 43.** Respuestas ELISPOT de IFN- γ a 1 semana después del refuerzo con MVA. Los números indican la media aritmética para la respuesta contra la región génica indicada. Las designaciones debajo de los paneles indican el gen y la combinación de péptidos usadas para la estimulación. Las designaciones a la derecha de los paneles indican el grupo de sensibilización con ADN. Los símbolos indican los animales individuales. El valor de fondo se sustrajo antes de la conversión a 1 millón de PBMC.
- 40 **Figura 44.** Anchura máxima de las respuestas ELISPOT para grupos sensibilizados con IC1-90 e IC48. Se ensayaron ocho animales por grupo de vacuna contra 19 combinaciones de péptidos ((5 Gag, 6 Pol, y 7 Env, and 1 Tat). Están indicadas las respuestas ELISPOT registradas como positivas para cada combinación de péptidos por animal.
- 45 **Figura 45.** Respuestas ELISPOT determinadas 8 semanas después del refuerzo con MVA. Las designaciones debajo de los paneles indican animales individuales y el grupo sensibilizado con ADN (8 animales por grupo). Las barras apiladas indican respuesta ELISPOT contra combinaciones de péptidos individuales para cada animal. Las barras blancas representan combinaciones de péptidos Gag, las barras negras rellenas representan combinaciones de péptidos Pol, y las barras gris claro representan combinaciones de péptidos Env. El valor de fondo se sustrajo antes de la conversión a 1 millón de PBMC.
- 50 **Figura 46.** Células CD8 y CD4 respondedoras determinadas por tinción con citoquinas intracelulares IFN- γ e IL-2. (A) Porcentaje específico de células CD8 que responden contra Gag y Env para animales individuales en el máximo (1 semana después del refuerzo con MVA). La barra en negrita indica la media aritmética de la altura para la respuesta en cada grupo. Las designaciones por encima de los paneles especifican la citoquina medida (IFN- γ o IL-2) y las designaciones debajo de los paneles especifican el grupo de sensibilización con ADN. Los símbolos indican los animales individuales. (B) Porcentaje específico de células CD4 que responden contra Gag y Env para animales individuales en el máximo (1 semana después del refuerzo con MVA). Las designaciones por encima y por debajo de los paneles son igual que en el panel A.
- 55
- 60
- 65

Figura 47. Modificaciones a los genes de VIH. En el gen *env* de VIH, se eliminaron señales de terminación temprana de vaccinia haciendo mutaciones silenciosas y parte de la cola citoplasmática de gp41 se truncó. En el gen *pol*, se hicieron tres mutaciones en RT y se delecionó la integrasa.

Figura 48. Construcción recombinante de MVA/VIH. Se prepararon virus recombinantes individuales por recombinación homóloga de MVA y plásmidos lanzadera de *env* o *gag* de MVA que contenían GFP transitoria, y la expresión del gen de VIH se controló por el promotor de vaccinia H5 modificado temprano/tardío. El doble recombinante se preparó infectando ambos recombinantes individuales a una MOI 5 pfu/célula, y sembrando lo recogido para picar placas individuales. Las placas se caracterizaron por inmunotinción y aquellas placas que expresaban proteínas tanto Env como Gag se purificaron en placa adicionalmente para obtener el recombinante doble.

Depósito de microorganismo

El siguiente microorganismo se ha depositado de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest en 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 de marzo de 2003

El MVA 1974/NIH Clon 1 se depositó con el Número de Acceso a la ATCC: PTA-5095 el 27 de marzo de 2003 en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. Este depósito se hizo según las disposiciones del Tratado de Budapest según el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con Fines de Procedimiento de Patente y las Regulaciones de acuerdo a ellas (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años desde la fecha de depósito. El depósito estará disponible por la ATCC según los términos del Tratado de Budapest, y sujeto a un acuerdo entre el Solicitante y la ATCC que asegura la disponibilidad permanente y no restringida de la descendencia del cultivo del depósito al público una vez emitida la Patente de Estados Unidos pertinente o tras la puesta a disposición del público de cualquier solicitud de Patente de Estados Unidos o foránea, lo que suceda primero, y asegurar la disponibilidad de la descendencia para ser determinada por el U.S. Commissioner of Patents and Trademarks para tener derecho al mismo de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas conformes al Comisionado del mismo (incluyendo 37 CFR § 1.14). La disponibilidad de la cepa depositada no se entiende como una licencia para practicar la invención contraviniendo los derechos garantizados según la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

Descripción detallada

Virus MVA recombinante

El virus vaccinia, un miembro del género Orthopoxvirus en la familia de Poxviridae, se usó como vacuna viva para inmunizar contra la enfermedad de la viruela humana. La vacunación mundial satisfactoria con virus vaccinia culminó en la erradicación del virus variola, el agente causante de la viruela ("The global eradication of smallpox. Final report of the global commission for the certification of smallpox eradication". History of Public Health, Nº 4, Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 1980). Desde esa declaración de la OMS, la vacunación se ha interrumpido de forma universal excepto para personas en alto riesgo de infecciones con viruela (por ejemplo, trabajadores de laboratorio).

Más recientemente, los virus vaccinia también se han usado para modificar por ingeniería vectores virales para expresión génica recombinante y para el uso potencial como vacunas vivas recombinantes (Mackett, M. et al. 1982 PNAS USA 79:7415-7419; Smith, G.L. et al. 1984 Biotech Genet Engin Rev 2:383-407). Esto implica secuencias de ADN (genes) que codifican antígenos foráneos que se están introduciendo, con la ayuda de técnicas de recombinación de ADN, en el genoma de los virus vaccinia. Si el gen se integra en un sitio en el ADN viral que es no esencial para el ciclo vital del virus, es posible que el virus vaccinia recombinante recién producido sea infeccioso, es decir, capaz de infectar células foráneas y por tanto de expresar la secuencia de ADN integrada (solicitudes de patente EP Nº 83.286 y Nº 110.385). Los virus vaccinia recombinantes preparados de este modo pueden usarse, por un lado, como vacunas vivas para la profilaxis de enfermedades infecciosas, por otro lado para la preparación de proteínas heterólogas en células eucariotas.

Para aplicaciones de vector, se disminuirían los riesgos para la salud mediante el uso de una cepa de virus vaccinia altamente atenuada. Se desarrollaron especialmente varias de estas cepas de virus vaccinia para evitar los efectos secundarios indeseados de la vacunación contra la viruela. Por tanto, el vaccinia modificado (MVA) se ha generado por pases en serie a largo plazo de la cepa Ankara del virus vaccinia (CVA) en fibroblastos de embrión de pollo (para una revisión véase Mayr, A. et al. 1975 Infection 3:6-14; patente Suiza Nº 568.392). El virus MVA está disponible al público en la American Type Culture Collection como ATCC Nº: VR-1508. El MVA se distingue por su gran atenuación, es decir, por su virulencia disminuida y capacidad de replicarse en células de primate manteniendo al mismo tiempo una buena inmunogenicidad. El virus MVA se ha analizado para determinar alteraciones en el genoma respecto a la cepa CVA precursora. Se han identificado seis delecciones principales del ADN genómico

(delección I, II, III, IV, V, y VI) que hacen un total de 31.000 pares de bases (Meyer, H. et al. 1991 J Gen Virol 72:1031-1038). El virus MVA resultante se volvió muy restringido a célula hospedadora para células de ave.

Además, el MVA se caracteriza por su extrema atenuación. Cuando se ensayó en diversos modelos animales, el MVA demostró ser avirulento incluso en animales inmunosuprimidos. De forma más importante, las excelentes propiedades de la cepa MVA se han demostrado en ensayos clínicos extensivos (Mayr A. et al. 1978 Zentralbl Bakteriol [B] 167:375-390; Stickl et al. 1974 Dtsch Med Wschr 99:2386-2392). Durante estos estudios en más de 120.000 seres humanos, incluyendo pacientes de alto riesgo, no se asociaron efectos secundarios con el uso de vacuna MVA.

Se descubrió que la replicación de MVA en células humanas estaba bloqueada de forma tardía en la infección, lo que evita el ensamblaje de viriones infecciosos maduros. No obstante, el MVA fue capaz de expresar genes virales y recombinantes a altos niveles incluso en células no permisivas y se propuso que servía como vector de expresión génica eficaz y excepcionalmente seguro (Sutter, G. y Moss, B. 1992 PNAS USA 89:10847-10851). Adicionalmente, se establecieron nuevas vacunas con vector vaccinia sobre la base de MVA que tiene secuencias de ADN foráneas insertadas en el sitio de delección III dentro del genoma de MVA (Sutter, G. et al. 1994 Vaccine 12:1032-1040).

Los virus vaccinia MVA recombinantes pueden prepararse como se expone a continuación en este documento. Se introduce una construcción de ADN que contiene una secuencia de ADN que codifica un polipéptido foráneo flanqueado por secuencias de ADN de MVA adyacentes a una delección de origen natural, por ejemplo, delección III, u otros sitios no esenciales, dentro del genoma de MVA, en células infectadas con MVA, para permitir la recombinación homóloga. Una vez se ha introducido la construcción de ADN en la célula eucariota y el ADN foráneo se ha recombinado con el ADN viral, es posible aislar el virus vaccinia recombinante deseado de un modo conocido per se, preferiblemente con la ayuda de un marcador. La construcción de ADN a insertar puede ser lineal o circular. Se prefiere un plásmido o producto de reacción en cadena de la polimerasa. La construcción de ADN contiene secuencias que flanquean el lado izquierdo y derecho de una delección de origen natural, por ejemplo delección III, dentro del genoma de MVA. La secuencia de ADN foráneo se inserta entre las secuencias que flanquean la delección de origen natural. Para la expresión de una secuencia de ADN o gen, es necesario que estén presentes secuencias reguladoras, que se requieren para la transcripción del gen, en el ADN. Dichas secuencias reguladoras (llamadas promotores) son conocidas para los especialistas en la técnica, e incluyen por ejemplo aquellas del gen de 11 kDa de vaccinia que se describen en el documento EP-A-198.328, y aquellas del gen de 7,5 kDa (documento EP-A-110.385). La construcción de ADN puede introducirse en las células infectadas por MVA por transfección, por ejemplo mediante precipitación con fosfato de calcio (Graham et al. 1973 Virol 52:456-467; Wigler et al. 1979 Cell 16:777-785), mediante electroporación (Neumann et al. 1982 EMBO J 1:841-845), por microinyección (Graessmann et al. 1983 Meth Enzymol 101:482-492), mediante liposomas (Straubinger et al. 1983 Meth Enzymol 101:512-527), mediante esferoplastos (Schaffner 1980 PNAS USA 77:2163-2167) o por otros métodos conocidos para los especialistas en la técnica.

VIH y su replicación

El agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) está reconocido como un retrovirus que muestra características típicas del género lentivirus, mencionado como virus de inmunodeficiencia humana (VIH). La relación filogenéticas de los lentivirus humano se muestran en la **Figura 1**. El VIH-2 está más estrechamente relacionado con el VIS_{smm}, un virus aislado de monos mangabeyes grises en la naturaleza, que a VIH-1. Se cree actualmente que VIH-2 representa una transmisión zoonótica del VIS_{smm} al ser humano. Una serie de aislados lentivirales de chimpancés cautivos, denominado VIS_{cpz}, son familiares genéticos cercanos de VIH-1.

Los análisis filogenéticos más prematuros de aislados de VIH-1 se centraron en muestras de Europa/América del Norte y África; se identificaron grupos separados de virus de estas dos áreas del mundo. Posteriormente se definieron distintos subtipos genéticos o clados de VIH-1 y se clasificaron en tres grupos: M (principal); O (atípico); y N (no M u O) (Fig. 2). El grupo M de VIH-1, que incluye más del 95 % de los aislados de virus globales, consiste en al menos ocho clados separados (A, B, C, D, F, G, H, y J), en base a la secuencia de genomas virales completos. Los miembros de VIH-1 grupo O se han recuperado de individuos que viven en Camerún, Gabón, y Guinea Ecuatorial; sus genomas comparten menos del 50 % de identidad en la secuencia de nucleótidos con virus del grupo M. Las cepas de VIH-1 del grupo N más recientemente descubiertas se han identificado en cameruneses infectados, que no logran reaccionar serológicamente en ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de virus completo convencional, aunque son fácilmente detectables por análisis convencional de transferencia de Western.

El conocimiento más actual a cerca de la variación genética de VIH-1 proviene de estudios de virus del grupo M de diverso origen geográfico. Los datos recogidos durante la pasada década indican que la población de VIH-1 presente dentro de un individuo infectado puede variar del 6 % al 10 % en la secuencia de nucleótidos. Los aislados de VIH-1 dentro de un clado pueden mostrar distancias de nucleótidos del 15 % en *gag* y de hasta el 30 % en secuencias codificantes de gp120. La variación genética entre clados puede variar entre el 30 % y el 40 % dependiendo del gen analizado.

Todos los subtipos de VIH-1 grupo M pueden encontrarse en África. Los virus del clado A son genéticamente los

más divergentes y fueron el subtipo de VIH-1 más común en África al principio de la epidemia. Con la rápida propagación de VIH-1 a África del Sur durante la segunda mitad de la década de los 90, los virus de clado C se han convertido en el subtipo dominante y ahora representan el 48 % de las infecciones de VIH-1 en todo el mundo. Los virus del clado B, el subtipo de VIH-1 más intensivamente estudiado, siguen siendo los aislados más prevalentes en Europa y América del Norte.

Las altas tasas de recombinación genética son un sello distintivo de los retrovirus. Inicialmente se creía que infecciones simultáneas por cepas de virus genéticamente diversas no tenían probabilidad de establecerse en individuos en riesgo de VIH-1. En 1995, sin embargo, quedó patente que una fracción significativa de la diversidad global de VIH-1 grupo M incluía recombinantes virales entre clados. Ahora se aprecia que los recombinantes de VIH-1 se encontraran en áreas geográficas tales como África, América del Sur, y Asia Suroriental, donde coexisten múltiples subtipos de VIH-1 y pueden representar más del 10 % de las cepas de VIH-1 en circulación. Desde el punto de vista molecular, los genomas de estos virus recombinantes se parecen a mosaicos en patchwork, con segmentos yuxtapuestos de diversos subtipos de VIH-1, lo que refleja los múltiples eventos de cruce que contribuyen a su generación. La mayoría de los recombinantes de VIH-1 han surgido en África y una mayoría contiene segmentos originalmente derivados de virus del clado A. En Tailandia, por ejemplo, la composición de la cepa en circulación predominante consiste en un segmento del gen *gag* más *pol* del clado A y gen *env* del clado E. Como el gen *env* del clado E en cepas de VIH-1 Thai está muy relacionado con *env* de clado E presente en virus aislados de la República de África Central, se cree que el evento de recombinación original sucedió en África, con la posterior introducción del virus descendiente en Tailandia. De forma interesante, no se ha informado hasta la fecha de aislado de VIH-1 subtipo E de longitud completa (es decir, con genes *gag*, *pol*, y *env* de subtipo E).

El descubrimiento de que receptores de quimioquinas α y β funcionan como co-receptores para la fusión del virus y la entrada en células CD4⁺ susceptibles ha conducido a un esquema de clasificación revisado para VIH-1 (**Fig. 3**). Los aislados ahora pueden agruparse en base a la utilización de receptores de quimioquina en ensayos de fusión en que se expresan proteínas co-receptoras de gp120 de VIH-1 y CD4⁺ en células separadas. Como se indica en la Figura 3, los aislados de VIH-1 que usan el receptor CXCR4 (virus X4 no designados) son habitualmente cepas inductoras de sincitio (SI) con tropismo por línea de células T (TCL), mientras que aquellos que utilizan exclusivamente el receptor CCR5 (virus R5) son predominantemente cepas no inductoras de sincitio (NSI) y con tropismo por macrófagos (M). Las cepas R5/X4 de tropismo dual, que pueden comprender la mayoría de los aislados de los pacientes y muestran una continuidad de fenotipos trópicos, son frecuentemente SI.

Como es el caso para todos los retrovirus competentes en replicación, los tres productos de traducción principales de VIH-1, que codifican todas las proteínas estructurales, se sintetizan inicialmente como precursores de poliproteína, que posteriormente se procesa por proteasas virales o celulares en proteínas asociadas a partículas maduras (**Fig. 4**). El precursor de Gag de 55 kD Pr55^{Gag} se escinde en las proteínas de matriz (MA), cápsida (CA), nucleocápsida (NC), y p6. La autocatálisis de la poliproteína Gag-Pol de 160 kD, Pr160^{Gag-Pol}, da lugar a las proteínas proteasa (PR), la transcriptasa inversa heterodimérica (RT), y la integrasa (IN), mientras que la digestión proteolítica por una o más enzimas celulares convierte el precursor de Env de 160 kD glucosilado gp160 en los productos de escisión de superficie gp120 (SU) u transmembrana gp41 (TM). Las seis proteínas restantes codificadas por VIH-1 (Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu, y Nef) son los productos de traducción principales de ARNm sometidos a corte y ajuste.

Gag

Las proteínas Gag de VIH, como aquellas de otros retrovirus, son necesarias y suficientes para la formación de partículas tipo virus no infecciosas. Las proteínas Gag retrovirales generalmente se sintetizan como precursores de poliproteína; el precursor de Gag de VIH-1 se ha llamado, en base a su masa molecular aparente, Pr55^{Gag}. Como se ha indicado previamente, el ARNm para Pr55^{Gag} es el transcrito de 9,2 kb sin corte y ajuste (**Fig. 4**) que requiere Rev para su expresión en el citoplasma. Cuando el ORF de *pol* está presente, la proteasa viral (PR) escinde Pr55^{Gag} durante o poco después de la gemación desde la célula para generar las proteínas Gag maduras p17 (MA), p24 (CA), p7 (NC), y p6 (véase **Fig. 4**). En el virión, MA se localiza inmediatamente dentro de la bicapa lipídica de la envuelta viral, CA forma la parte externa de la estructura central con forma de cono en el centro de la partícula, y NC está presente en el centro en un complejo ribonucleoprotéico con el genoma de ARN viral (**Fig. 5**).

El precursor Pr55^{Gag} de VIH oligomeriza después de su traducción y se dirige a la membrana plasmática, donde se ensamblan partículas de suficiente tamaño y densidad para ser visibles por EM. La formación de partículas tipo virus pro Pr55^{Gag} es un proceso de autoensamblaje, con interacciones Gag-Gag críticas que tienen lugar entre múltiples dominios a lo largo del precursor de Gag. El ensamblaje de partículas tipo virus no requiere la participación de ARN genómico (aunque la presencia de ácido nucleico parece ser esencial), enzimas codificadas por *pol*, o glucoproteínas Env, pero la producción de viriones infecciosos requiere la encapsidación del genoma de ARN viral y la incorporación de las glucoproteínas Env y el precursor de poliproteína Gag-Pol Pr160^{Gag-Pol}.

Pol

Cadena abajo de *gag* yace la región más altamente conservada del genoma de VIH, el gen *pol*, que codifica tres enzimas: PR, RT, e IN (véase la **Fig. 4**). RT e IN son necesarias, respectivamente, para la transcripción inversa de

ARN viral en una copia de ADN bicatenaria, y para la integración del ADN viral en el cromosoma de la célula hospedadora. PR desempeña un papel crítico posterior en el ciclo vital mediando la producción de viriones infecciosos maduros. Los productos del gen *pol* se obtienen por escisión enzimática de una proteína de fusión Gag-Pol de 160 kd, mencionada como Pr160^{Gag-Pol}. Esta proteína de fusión se produce por desplazamiento de fase ribosómico durante la traducción de Pr55^{Gag} (véase la **Fig. 4**). El mecanismo de desplazamiento de fase para la expresión de Gag-Pol, también utilizado por muchos otros retrovirus, asegura que las proteínas derivadas de *pol* se expresen a un nivel bajo, aproximadamente de un 5 % a un 10 % del de Gag. Como Pr55^{Gag}, el extremo N-terminal de Pr160^{Gag-Pol} está miristilado y dirigido a la membrana plasmática.

10 Proteasa

Estudios de seguimiento de pulso previos realizados con retrovirus de aves indicaron claramente que las proteínas Gag retrovirales se sintetizan inicialmente como precursores de poliproteína que se escinden para generar productos más pequeños. Estudios posteriores demostraron que la función de procesamiento se proporciona por una enzima vírica en lugar de celular, y que la digestión proteolítica de los precursores de Gag y Gag-Pol es esencial para la infectividad del virus. El análisis de secuencia de PR retrovirales indicó que están relacionadas con proteasas "aspárticas" celulares tales como pepsina y renina. Como estas enzimas celulares, las PR retrovirales usan dos restos Asp próximos en el sitio activo para coordinar una molécula de agua que cataliza la hidrólisis de un enlace peptídico en la proteína diana. A diferencia de las proteasas aspárticas celulares, que funcionan como pseudodímeros (usando dos pliegues dentro de la misma molécula para generar el sitio activo), las PR retrovirales funcionan como dímeros verdaderos. Los datos cristalográficos de rayos X de PR de VIH-1 indican que los dos monómeros se mantienen juntos en parte por una lámina-β antiparalela de cuatro hebras derivada de los extremos tanto N- como C-terminal de cada monómero. El sitio de unión a sustrato está localizado dentro de una hendidura formada entre los dos monómeros. Como sus homólogos celulares, el dímero de PR de VIH contiene "solapas" flexibles que solapan el sitio de unión y pueden estabilizar el sustrato dentro de la hendidura; los restos Asp del sitio activo descansan en el centro del dímero. De forma interesante, aunque se observa alguna homología limitada de aminoácidos alrededor de los restos del sitio activo, las secuencias primarias de las PR retrovirales son altamente divergentes, aunque sus estructuras son remarcadamente similares.

30 Transcriptasa inversa

Por definición, los retrovirus poseen la capacidad de convertir sus genomas de ARN monocatenario en ADN bicatenario durante las fases tempranas del proceso de infección. La enzima que cataliza esta reacción es RT, junto con su actividad RNasaH asociada. Las RT retrovirales tienen tres actividades enzimáticas: (a) polimerización de ADN dirigida por ARN (para síntesis de ADN de hebra menos), (b) actividad RNasaH (para la degradación del cebador de ARNt y ARN genómico presente en intermedios híbridos ADN-ARN), y (c) polimerización de ADN dirigida por ADN (para la síntesis de ADN de segunda hebra o hebra más).

La holoenzima RT de VIH-1 madura es un heterodímero de subunidades de 66 y 51 kd. La subunidad de 51 kd (p51) se obtiene de la subunidad de 66 kd (p66) por eliminación proteolítica del dominio RNasaH de 15 kd C-terminal de p66 por PR (véase la **Fig. 4**). La estructura cristalina de la RT de VIH-1 revela un plegamiento altamente asimétrico en que las orientaciones de las subunidades p66 y p51 difieren sustancialmente. La subunidad p66 puede visualizarse como una mano derecha, con el sitio activo de polimerasa dentro de la palma, y una hendidura de unión a molde formada por los subdominios de palma, dedos, y dedo pulgar. El dominio de polimerasa está ligado a RNasaH por el subdominio de conexión. El sitio activo, localizado en la palma, contiene tres restos Asp críticos (110, 185, y 186) en cercana proximidad, y dos iones Mg²⁺ coordinados. La mutación de estos restos Asp suprime la actividad de polimerización de RT. La orientación de los tres restos Asp del sitio activo es similar a la observada en otras ADN polimerasas (por ejemplo, el fragmento Klenow de la ADN *pol*II 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 enterrados dentro de la molécula. Aproximadamente 18 pares de bases del dúplex cebador-molde descansan en la hendidura de unión a ácido nucleico, abarcando desde el sitio activo de polimerasa hasta el dominio RNasaH.

En la estructura RT-cebador-molde-dNTP, la presencia de un didexosinucleótido en el extremo 3' del cebador permite la visualización del complejo catalítico atrapado justo antes de abordar el dNTP entrante. La comparación con estructuras obtenidas previamente sugiere un modelo mediante el cual los dedos se cierran para atrapar el molde y dNTP antes del ataque nucleófilo del 3'-OH del cebador en el dNTP entrante. Después de la adición del dNTP entrante a la cadena creciente, se ha propuesto que los dedos adoptan una configuración más abierta, liberando de ese modo el pirofosfato y posibilitando que la RT se una al siguiente dNTP. La estructura de la RNasaH de VIH-1 también se ha determinado por cristalografía de rayos X; este dominio presenta un plegamiento global similar al de RNasaH de *E. coli*.

60 Integrasa

Una característica distintiva de la replicación de retrovirus es la inserción de una copia de ADN del genoma viral en el cromosoma de la célula hospedadora después de transcripción inversa. El ADN viral integrado (el provirus) sirve como molde para la síntesis de ARN virales y se mantiene como parte del genoma de la célula hospedadora durante

la vida de la célula infectada. Mutantes retrovirales deficientes en la capacidad de integrarse generalmente no logran establecer una infección productiva.

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

Las proteínas IN retrovirales están compuestas por tres 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. A causa de su baja solubilidad, aún no ha sido posible cristalizar la proteína IN completa de VIH-1 de 288 aminoácidos. Sin embargo, la estructura de los tres dominios se ha resultado independientemente por cristalografía de rayos X o métodos de RMN. También se ha determinado la estructura cristalina del dominio central de la IN del virus del sarcosoma aviar. El dominio N-terminal (restos 1 a 55), cuya estructura se resolvió por espectroscopia de RMN, está compuesto por cuatro 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 proteínas de unión a ADN helicoide que contiene un llamado motivo hélice-giro-hélice; sin embargo, en la estructura de VIH-1 este motivo contribuye a la formación de dímeros. Inicialmente, la mala solubilidad impidió esfuerzos por resolver la estructura del dominio central. Sin embargo, los intentos en cristalografía fueron satisfactorios cuando se observó que un cambio Phe a Lys en el resto 185 de IN aumentaba enormemente la solubilidad sin alterar la actividad catalítica *in vitro*. Cada monómero del dominio central de IN de VIH-1 (restos 50 a 212 de IN) está compuesto por una lámina- β de cinco hebras flanqueada por hélices; esta estructura tiene una notable semejanza con otras polinucleotidil transferasas incluyendo RNasaH y la transposasa MuA de bacteriófago. Se encuentran tres restos altamente conservados en posiciones análogas en otras polinucleotidil transferasas; en IN de VIH-1 estas son Asp-64, Asp-116 y Glu-152, el llamado motivo D,D-35-E. Mutaciones de estas posiciones bloquean la función de IN de VIH tanto *in vivo* como *in vitro*. La cercana proximidad de estos tres aminoácidos en la estructura cristalina de los dominios centrales tanto del virus de sarcoma aviar como de VIH-1 apoyan la hipótesis de que estos restos desempeñan un papel central en la catálisis de la reacción de transferencia de polinucleotidilo que está en el centro del proceso de integración. El dominio C-terminal, cuya estructura se ha resuelto por métodos de RMN, adopta una topología de plegamiento en barril- β de cinco hebras 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 VIS y el virus del sarcoma de Rous que abarcan los dominios tanto central como C-terminal.

Env

35 Las glucoproteínas Env de VIH desempeñan un papel principal en el ciclo vital del virus. Contienen los determinantes que interactúan con el receptor y co-receptor CD4, y catalizan la reacción de fusión entre la bicapa lipídica de la envuelta viral y la membrana plasmática de la célula hospedadora. Además, las glucoproteínas Env de VIH contienen epítopos que provocan respuestas inmunes que son importantes desde la perspectiva tanto de diagnóstico como de desarrollo de vacunas.

40 La glucoproteína Env de VIH se sintetiza a partir de un ARNm bicistrónico Vpu/Env de 4,3 kb con un único corte y ajuste (véase la **Fig. 4**); la traducción sucede en ribosomas asociados con el retículo endoplasmático rugoso (RE). El precursor de poliproteína de 160 kd (gp160) es una proteína integral de membrana que está anclada a membranas celulares por una señal hidrófoba de interrupción de transferencia en el dominio destinado a ser la glucoproteína TM Env madura, gp41 (**Fig. 6**). La gp160 se glucosila de forma co-traduccional, forma enlaces disulfuro, y experimenta oligomerización en el RE. La forma oligomérica predominante parece ser un trímero, aunque también se observan dímeros y tetrameros. La gp160 se transporta al Golgi, donde, como otras proteínas precursoras de la envuelta retroviral, se escinde proteolíticamente por enzimas celulares en la glucoproteína SU madura gp120 y la glucoproteína TM gp41 (véase la **Fig. 6**). La enzima celular responsable de la escisión de precursores Env retrovirales después de un motivo Lys/Arg-X-Lys/Arg-Arg altamente conservado es furina o una proteasa tipo furina, aunque otras enzimas también pueden catalizar el procesamiento de gp160. La escisión de gp160 es necesaria para la actividad de fusión inducida por Env y la infectividad del virus. Posterior 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 hasta la superficie celular. La interacción gp120-gp41 es bastante débil, y una cantidad sustancial de gp120 se desprende de la superficie de células que expresan Env.

55 El complejo glucoproteico Env de VIH, en particular el dominio SU (gp120), está muy fuertemente glucosilado; aproximadamente la mitad de la masa molecular de gp160 está compuesta por cadenas laterales de oligosacárido. Durante el transporte de Env desde su sitio de síntesis en el RE hasta la membrana plasmática, muchas de las cadenas laterales se modifican mediante la adición de azúcares complejos. Las numerosas cadenas laterales de oligosacárido forman lo que podría imaginarse como una nube de azúcar que oscurece la mayor parte de gp120 del reconocimiento por el sistema inmune del hospedador. Como se muestra en la **Figura 6**, gp120 contiene dominios conservados (C_1 a C_5) y variables (V_1 a V_5) entremezclados. Los restos Cys presentes en las gp120 de diferentes aislados están altamente conservados y forman enlaces disulfuro que se unen a las primeras cuatro regiones variables en bucles grandes.

65 Una función principal de glucoproteínas Env virales es promover una reacción de fusión de membrana entre las

bicapas lipídicas de la envuelta viral y las membranas celulares hospedadoras. Este evento de fusión de membrana posibilita que el núcleo viral consiga entrar en el citoplasma de la célula hospedadora. Se han implicado varias regiones tanto en gp120 como en gp41, directa o indirectamente, en la fusión de membrana mediada por Env. Estudios de la proteína hemaglutinina HA₂ de los ortomixovirus y la proteína F de los paramixovirus indicaron que un dominio altamente hidrófobo en el extremo N-terminal de estas proteínas, mencionado como el péptido de fusión, desempeña un papel crítico en la fusión de membrana. Análisis mutacionales demostraron que un dominio análogo estaba localizado en el extremo N-terminal de las glucoproteínas TM de VIH-1, VIH-2, y VIS (véase la **Fig. 6**). Sustituciones no hidrófobas dentro de esta región de gp41 redujeron enormemente o bloquearon la formación de sincitios y provocaron la producción de viriones descendientes no infecciosos.

C-terminal al péptido de fusión de gp41 hay dos dominios helicoides anfipáticos (véase la **Fig. 6**) que desempeñan un papel central en la fusión de membrana. Mutaciones en la hélice N-terminal (mencionada como hélice-N), que contiene un motivo de repetición de héptada tipo cremallera de Leu, altera la infectividad y actividad de fusión de membrana, y péptidos derivados de estas secuencias muestran potente actividad antiviral en cultivo. La estructura del ectodominio de gp41 de VIH-1 y VIS, los dos motivos helicoides en particular, han sido el centro de análisis estructural en los recientes años. Se determinaron estructuras por cristalografía de rayos X o espectroscopia de RMN para proteínas de fusión que contiene los dominios helicoides, una mezcla de péptidos derivados de las hélices-N y C, o en caso de la estructura de VIS, la secuencia intacta del ectodominio de gp41 desde el resto 27 hasta el 149. Estos estudios obtuvieron estructuras triméricas fundamentalmente similares, en que los dos dominios helicoides se compactan de un modo antiparalelo para generar un haz de seis hélices. Las hélices-N forman un súper enrollamiento en el centro del haz, compactándose las hélices-C en surcos hidrófobos en el exterior.

En las etapas que conducen a la fusión de membrana la unión de CD4 induce cambios conformacionales en Env que facilitan la unión del co-receptor. Después de la formación de un complejo ternario gp120/CD4/co-receptor, gp41 adopta una conformación hipotética que permite que el péptido de fusión se inserte en la bicapa lipídica diana. La formación de seis hélices de gp41 (que implica interacciones antiparalelas entre las hélices-N y C de gp41) pone a las membranas viral y celular juntas y tiene lugar la fusión de membrana.

Uso de virus MVA recombinante para reforzar la respuesta inmune de células CD8⁺

La presente invención se refiere a la composición farmacéutica de la invención para su uso en la generación de una respuesta inmune de células T CD8⁺ contra un antígeno y también que provoca una respuesta de anticuerpos. Más particularmente, la presente invención se refiere a regímenes de inmunización "sensibilización y refuerzo" en que la respuesta inmune inducida por la administración de una composición de sensibilización se refuerza mediante la administración de una composición de refuerzo. La presente invención se basa en la demostración experimental de los inventores de que puede conseguirse refuerzo eficaz usando vectores de vaccinia Ankara modificada (MVA), después de sensibilizar con cualquiera de diversos tipos diferentes de composiciones de sensibilización incluyendo el propio MVA recombinante.

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

La presente invención emplea MVA que, como los experimentos descritos a continuación muestran, se ha descubierto que es un medio eficaz para proporcionar un refuerzo para una respuesta inmune de células T CD8⁺ sensibilizada contra antígeno usando cualquiera de diversas composiciones diferentes de sensibilización y también provocando una respuesta de anticuerpos.

De forma remarcable, el trabajo experimental descrito a continuación demuestra que el uso de realizaciones de la presente invención permite que virus MVA recombinante que expresa un antígeno de VIH refuerce una respuesta inmune de células T CD8⁺ sensibilizada por una vacuna de ADN y también que provoque una respuesta de anticuerpos. Se descubrió que el MVA inducía una respuesta de células T CD8⁺ después de inmunización intramuscular.

En base al trabajo previo (Amara *et al.* 2001 *Science* **292**:69-74), se predice que primates no humanos inmunizados con ADN plasmídico y reforzados con el MVA estarían protegidos de forma eficaz contra exposición intramuscular con virus vivo. De forma ventajosa, los inventores contemplan que puede emplearse un régimen de vacunación usando inmunización intradérmica, intramuscular o a la mucosa tanto para la sensibilización como para el refuerzo, que constituye un régimen de inmunización general adecuado para inducir células T CD8⁺ y también para provocar una respuesta de anticuerpos, por ejemplo, en seres humanos.

La presente invención en diversos aspectos y realizaciones emplea una composición farmacéutica de acuerdo con el primer aspecto de la invención que comprende un vector MVA que codifica un antígeno de VIH para reforzar una respuesta inmune de células T CD8⁺ contra el antígeno sensibilizado por administración previa de ácido nucleico que codifica el antígeno y también que provoca una respuesta de anticuerpos.

Un aspecto general de la presente invención proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con el primer aspecto de la invención que comprende un vector MVA para reforzar una respuesta inmune de células T CD8⁺ contra un antígeno de VIH y también que provoca una respuesta de anticuerpos.

5 Un aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con el primer aspecto de la invención para reforzar una respuesta inmune de células T CD8⁺ contra un antígeno de VIH en un individuo, y también para provocar una respuesta de anticuerpos, incluyendo el método proporcionar al individuo un vector MVA que incluya ácido nucleico que codifica el antígeno unido de forma funcional a las secuencias reguladoras para la producción de antígeno en el individuo mediante la expresión a partir del ácido nucleico, mediante lo cual se refuerza una respuesta inmune de células T CD8⁺ contra el antígeno previamente sensibilizado en el individuo.

Una respuesta inmune contra un antígeno de VIH puede sensibilizarse por inmunización con ADN plasmídico o por infección con un agente infeccioso.

15 Un aspecto adicional de la invención proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con el primer aspecto de la invención para inducir una respuesta inmune de células T CD8⁺ contra un antígeno de VIH en un individuo, y también para provocar una respuesta de anticuerpos, que comprende administrar al individuo una composición de sensibilización que comprende un ácido nucleico que codifica el antígeno y después administrar una composición de refuerzo que comprende un vector MVA que incluye ácido nucleico que codifica el antígeno unido de forma funcional a secuencias reguladoras para la producción de antígeno en el individuo mediante la expresión a partir del ácido nucleico.

25 Una realización adicional proporciona el uso de una composición farmacéutica de acuerdo con el primer aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para la administración a un mamífero para reforzar una respuesta inmune de células T CD8⁺ contra un antígeno de VIH, y también para provocar una respuesta de anticuerpos. Dicho medicamento es generalmente para administración después de administración previa de una composición de sensibilización que comprende ácido nucleico que codifica el antígeno.

30 La composición de sensibilización puede comprender cualquier vector viral, tal como un vector de virus vaccinia tal como una cepa deficiente en replicación tal como vaccinia Ankara modificada (MVA) o NYVAC (Tartaglia et al. 1992 Virology 118:217-232), un vector de viruela aviar tal como viruela de aves de corral o viruela del canario, por ejemplo, la cepa conocida como ALVAC (Paoletti et al. 1994 Dev Biol Stand 82:65-69), o un vector adenoviral o un vector del virus de la estomatitis vesicular o un vector de alfavirus.

35 La composición de sensibilización puede comprender ADN que codifica el antígeno, estando preferiblemente dicho ADN en forma de un plásmido circular que no es capaz de replicarse en células de mamífero. Cualquier marcador de selección no debe ser resistente a un antibiótico usado clínicamente, de modo que por ejemplo se prefiere resistencia a Kanamicina a resistencia a Ampicilina. La expresión del antígeno debe estar dirigida por un promotor que sea activo en células de mamífero, por ejemplo el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV IE).

40 La administración de una composición de sensibilización puede estar seguida por refuerzo con una composición de refuerzo, o una primera y segunda composiciones de refuerzo, siendo la primera y segunda composición de refuerzo iguales o diferentes entre sí. Pueden emplearse aún más composiciones de refuerzo. Un régimen de inmunización triple puede emplear ADN, después adenovirus como primera composición de refuerzo, después MVA, como segunda composición de refuerzo, opcionalmente seguida por una composición de refuerzo adicional (tercera) o posterior administración de refuerzo de uno u otro o ambos del mismo o diferentes vectores. Otra opción es ADN después MVA, después adenovirus, opcionalmente seguido por posterior administración de refuerzo de uno u otro o ambos del mismo o diferentes vectores.

50 El antígeno a codificar en las respectivas composiciones de sensibilización y refuerzo (sin embargo, se emplean muchas composiciones de refuerzo) no tiene que ser idéntico, pero debe compartir al menos un epítipo de 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, eliminando de forma más eficaz secuencias proteicas innecesarias en el antígeno y la secuencia codificante en el vector o vectores. Puede incluirse uno o más epítopos adicionales, por ejemplo epítopos que se reconocen por células auxiliares T, especialmente epítopos reconocidos en individuos de diferentes tipos HLA. La sensibilización y refuerzo pueden administrarse por vía intradérmica, intramuscular o a la mucosa.

60 Un antígeno de VIH codificado por un virus MVA recombinante en una composición farmacéutica de la invención incluye polipéptidos que tienen actividad inmunogénica provocada por una secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de Env, Gag, y Pol de VIH como al menos un epítipo de células T CD8⁺.

65 El antígeno Env de VIH está codificado por un gen al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 12 y los antígenos Gag y Pol de VIH están codificados por un gen al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 13, y donde el gen pol codifica una asparagina en el aminoácido 185 de la transcriptasa

inversa, una treonina en el aminoácido 266 de la transcriptasa inversa, y una glutamina en el aminoácido 478 de la transcriptasa inversa.

5 Como alternativa, el antígeno Env de VIH está codificado por un gen al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 23 y los antígenos Gag y Pol de VIH están codificados por un gen al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 24, y donde el gen pol codifica una asparagina en el aminoácido 185 de la transcriptasa inversa, una treonina en el aminoácido 266 de la transcriptasa inversa, y una glutamina en el aminoácido 478 de la transcriptasa inversa.

10 Como alternativa, el antígeno Env de VIH está codificado por un gen al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 39 y los antígenos Gag y Pol de VIH están codificados por un gen al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 40, y donde el gen pol codifica una asparagina en el aminoácido 185 de la transcriptasa inversa, una treonina en el aminoácido 266 de la transcriptasa inversa, y una glutamina en el aminoácido 478 de la transcriptasa inversa.

15 El porcentaje de identidad puede determinarse, por ejemplo, por comparación de información de secuencia usando un programa informático GAP, versión 6.0, disponible en la University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). El programa GAP utiliza el método de alineación de Needleman y Wunsch (J Mol Biol 1970 48:443), revisado por Smith y Waterman (Adv Appl Math 1981 2:482). En resumen, el programa GAP define la identidad como la cantidad de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son idénticos, dividida por la cantidad total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto preferidos 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 Gribbskov y Burgess (Nucl Acids Res 1986 14:6745), descrita por Schwartz y Dayhoff (eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. 1979, pág. 353-358); (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización adicional de 0,10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización para huecos finales.

20 Una proteína Env codificada por un gen *env* de VIH en la composición farmacéutica de la presente invención está compuesta por gp120 y el dominio de membrana y el ectodominio de gp41 pero carece de parte o todo el dominio citoplasmático de gp41.

25 Están fácilmente disponibles secuencias conocidas de VIH a partir de bases de datos de secuencia de VIH 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, Vol. I and II, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, N. Mex. (1993), o <http://hiv-web.lanl.gov/>.

30 Sustituciones o inserciones de Env, Gag, o Pol de VIH para obtener una Env, Gag, o Pol de VIH adicional, codificada por un ácido nucleico para su uso en un virus MVA recombinante de la presente invención, pueden incluir sustituciones o inserciones de al menos un resto de aminoácido (por ejemplo, 1-25 aminoácidos). Como alternativa, puede delecionarse al menos un aminoácido (por ejemplo, 1-25 aminoácidos) de una secuencia de Env, Gag, o Pol de VIH. Preferiblemente, dicha sustituciones, inserciones o delecciones se identifican en base a características de seguridad, niveles de expresión, inmunogenicidad y compatibilidad con elevadas tasas de replicación de MVA. No obstante, las secuencias deben ser al menos un 97 % idénticas a las secuencias expuestas en las figuras 12, 13, 23, 24, 39 y 40 expuestas anteriormente.

35 Pueden prepararse variaciones de secuencia de aminoácidos en Env, Gag, o Pol de VIH, por ejemplo, por mutaciones en el ADN. Dichas Env, Gag, o Pol de VIH incluyen, por ejemplo, delecciones, inserciones o sustituciones nucleótidos que codifican diferentes restos de aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos. Obviamente, las mutaciones que se harán en el ácido nucleico que codifica Env, Gag, o Pol de VIH no deben situar a la secuencia fuera de fase de lectura y preferiblemente no crearán dominios complementarios que podrían producir estructuras de ARNm secundarias.

40 El ácido nucleico que codifica Env, Gag, o Pol de VIH también puede prepararse por amplificación o mutagénesis dirigida al sitio de nucleótidos en el ADN o ARN que codifica Env, Gag, o Pol de VIH y después de ello sintetizando o transcribiendo de forma inversa el ADN codificante para producir ADN o ARN que codifica Env, Gag, o Pol de VIH, en base a los contenidos y directrices presentados en este documento.

45 Los virus MVA recombinantes que expresan Env, Gag, o Pol de VIH incluyen un conjunto finito de secuencias codificantes de Env, Gag, o Pol de VIH como nucleótidos de sustitución que pueden obtenerse de forma rutinaria por un especialista en la técnica, sin demasiada experimentación, en base a los contenidos y directrices presentados en este documento. Para una descripción detallada de la química proteica y estructura, véase Schulz, G.E. et al., 1978 Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, Nueva York, N.Y., y Creight-on, 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 preferencias 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, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold. Spring

Harbor, N.Y. en los Apéndices C y D.

Por tanto, un especialista en la técnica, dados los contenidos y directrices presentados en este documento, sabrá el modo de sustituir otros restos de aminoácido en otras posiciones de un ADN o ARN de *env*, *gag*, o *pol* de VIH para obtener Env, Gag, o Pol de VIH, incluyendo variantes de sustitución, delección o inserción.

Dentro del vector MVA, las secuencias reguladoras para la expresión del antígeno codificado incluirán un promotor de poxvirus natural, modificado o sintético. Por "promotor" se entiende una secuencia de nucleótidos a partir de la cual puede iniciarse la transcripción de ADN unido de forma funcional cadena abajo (es decir, en la dirección 3' de la hebra con sentido de ADN bicatenario). "Unido de forma funcional" se refiere a unido como parte de la misma molécula de ácido nucleico, adecuadamente posicionado y orientado para que se inicie la transcripción desde el promotor. El ADN unido de forma funcional a un promotor está "bajo la regulación de iniciación de la transcripción" del promotor. Pueden incluirse otras secuencias reguladoras incluyendo fragmentos de terminación, secuencias de poliadenilación, genes marcadores y otras secuencias según lo apropiado, de acuerdo con el conocimiento y práctica de los especialistas en la técnica: véase, por ejemplo, Moss, B. (2001). Poxviridae: the viruses and their replication. En Fields Virology, D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds. (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins), pág. 2849-2883. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en Current Protocols in Molecular Biology, 1998 Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons.

Los promotores para su uso en aspectos de la presente descripción deben ser compatibles con sistemas de expresión de poxvirus e incluyen secuencias naturales, modificadas y sintéticas.

Cualquiera de ella o ambas composiciones de sensibilización y refuerzo pueden incluir un adyuvante, tal como factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) o ácido nucleico codificante del mismo.

La administración de la composición de refuerzo es generalmente aproximadamente 1 a 10 meses después de la administración de la composición de sensibilización, preferiblemente aproximadamente 1 a 6 meses, preferiblemente aproximadamente 1 a 4 meses, preferiblemente aproximadamente 1 a 3 meses.

Preferiblemente, la administración de la composición de sensibilización, la composición de refuerzo, o tanto la composición de sensibilización como de refuerzo, es inmunización intradérmica, intramuscular o a la mucosa.

La administración de vacunas MVA puede conseguirse usando 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 (usando, por ejemplo, inyector sin aguja Biojector™) o un polvo secado por congelación resuspendido que contiene la vacuna, que proporciona la fabricación de dosis individualmente preparadas que no necesitan almacenamiento en frío. Esto sería una gran ventaja para una vacuna que es necesaria en áreas rurales de África.

El MVA es un virus con un excelente registro de seguridad en inmunizaciones humanas. La generación de virus recombinantes puede conseguirse de forma simple, y pueden fabricarse de forma reproducible en grandes cantidades. La administración intradérmica, intramuscular o a la mucosa de virus MVA recombinante por lo tanto es muy adecuada para vacunación profiláctica o terapéutica de seres humanos contra SIDA que puede controlarse por una respuesta de células T CD8⁺.

El individuo puede tener SIDA de modo que el suministro del antígeno y la generación de una respuesta inmune de células T CD8⁺ contra el antígeno es de beneficio o tiene un efecto terapéuticamente beneficioso.

Muy probablemente, la administración tendrá un objetivo profiláctico para generar una respuesta inmune contra VIH o SIDA antes de la infección o el desarrollo de los síntomas.

Los componentes a administrar de acuerdo con la presente invención se formulan en composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones pueden comprender adicionalmente un excipiente, tampón, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables conocidos por los especialistas en la técnica. Dichos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo, vía intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraperitoneal.

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

Pueden incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para inyección intravenosa, cutánea, subcutánea, intramuscular o a la mucosa, o inyección en el sitio afectado, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógeno y

tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuadas. Los especialistas en la técnica serán capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de Ringer con lactato. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos según lo necesario.

5 Puede emplearse una formulación de liberación lenta.

Después de la producción de las partículas MVA y la formulación de dichas partículas en composiciones, las partículas pueden administrarse a un individuo, particularmente ser humano u otro primate. La administración puede ser a otro mamífero, por ejemplo, roedor tal como ratón, rata o hámster, cobaya, conejo, oveja, cabra, cerdo, caballo, vaca, burro, pero o gato.

15 La administración es preferiblemente en una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" (como puede ser el caso, aunque la profilaxis puede considerarse terapia), siendo esta suficiente para mostrar beneficio al individuo. La cantidad real administrada, y la tasa y transcurso de tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, etc., pertenecen a la responsabilidad de los médicos generalistas y otros doctores médicos, o en un contexto de veterinaria un veterinario, y normalmente tiene en cuenta el trastorno a tratar, el estado del paciente individual, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos para los médicos. Ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, 1980, Osol, A. (ed.).

25 El ADN puede administrarse a una dosis de 250 µg a 2,5 mg/inyección, seguido por MVA a una dosis de 10⁶ a 10⁹ partículas infecciosas de virus/inyección.

Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, de forma simultánea o secuencial dependiendo de la afección a tratar.

30 El suministro a un mamífero no humano no tiene que ser con fines terapéuticos, pero puede ser para su uso en un contexto experimental, por ejemplo en investigación de mecanismo de respuestas inmunes contra un antígeno de interés, por ejemplo, protección contra VIH o SIDA.

35 Aspectos adicionales y realizaciones de la presente invención serán evidentes para los especialistas en la técnica, en vista de la anterior descripción y la siguiente ejemplificación experimental, incluida a modo de ilustración y sin limitación, y con referencia a las figuras adjuntas.

Cepa/clado VIH	Región	Gag	Env	Virus recombinante
Clado A/G 928	De Costa de Marfil, para uso en África Occidental	93 % idéntica a Gag A/G consenso	81 % idéntica a Env A/G consenso	Virus MVA 65A/G recombinante expresa Env Gag Pol
Clado B ADA env/HXB2/BH10gp	De EE.UU.	96 % idéntica a Gag B consenso	92 % idéntica a Env B consenso	Virus MVA 62B recombinante expresa Env Gag Pol de VIH
Clado C IN3	De India	95 % idéntica a Gag C consenso	89 % idéntica a Env C consenso	Virus MVA 71C recombinante expresa Env Gag Pol de VIH

Ejemplo 1

40 **Construcción de vectores lanzadera plasmídicos LAS-1 y LAS-2 usados para preparar recombinantes MVA/VIH**

45 1. Vector lanzadera plasmídico LAS-1 - Este vector lanzadera plasmídico, que se inserta en la delección III del genoma MVA, se construyó en las siguientes etapas: Se retiró el promotor del virus vaccinia P11 y el gen de la glucuronidasa de *Escherichia coli* (GUS) de pLW-51 (Wyatt, L.S. et al. 2004 AIDS Res. Human Retroviruses 20:645-653) por digestión con *Ascl* y *Sacl*. El promotor de vaccinia P11 y la proteína fluorescente verde (GFP) con extremos *Ascl* y *Sacl*, obtenidos por amplificación por PCR de pLW-44 (Bisht, H. et al. 2004 PNAS USA 101:6641-6646), se ligaron en el vector creando pLW-51GFP. El promotor *psynII* se retiró de pLW-51GFP por digestión con *XhoI* y *NotI*, se hicieron romos, y se religaron para crear LAS-1.

50 2. Vector lanzadera plasmídico LAS-2 - Este vector lanzadera plasmídico, que se inserta en la delección II del genoma MVA, se construyó del siguiente modo: Se preparó pLW37 hibridando 2 oligos que comprenden hebras complementarias del promotor mH5 (Wyatt, L.S. et al. 1996 Vaccine 14:1451-58) con sitio *HinclI* en el inicio y extremo *SmaI* e insertando esto en el sitio *SmaI* de pLW-16 (Wyatt, L.S. et al. 1999 Vaccine 18:392-397). Las últimas 217 bases del MVA flanco 2 se duplicaron con sitios *KpnI*, *Ascl*, y *Sacl* en el extremo del oligo interior y sitio *KpnI* en el extremo del oligo exterior, y se insertaron en el sitio *KpnI* de pLW-37. Este plásmido, denominado

pLW-37a, se digirió con *Ascl* y *Sacl*, y se insertaron en el mismo el promotor de vaccinia P11 y la proteína fluorescente verde (GFP) con extremos *Ascl* y *Sacl* (obtenidos por amplificación por PCR del promotor P11 y GFP de pLW-44 como se describe anteriormente). El plásmido resultante se denominó pLAS-2.

5 I. pLW-51S

El vector de transferencia plasmídico pLW-51 se construyó del siguiente modo. Se insertó el promotor mH5 (Wyatt et al. 1996 Vaccine 14:1451-1458) en el plásmido pG01 (Sutter y Moss. 1992 PNAS USA 89:10847-10851), que contiene 926 y 530 pb de ADN que flanquea la delección III (del III). Se amplificaron secuencias *Gag-pol* del ADN de VIH clado B (cepa BH10) en el plásmido GA2/JS2 (Nº de acceso a GenBank AF42688) (Smith et al., 2004 AIDS Res Human Retroviruses 20:654-665) usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se insertaron en el plásmido de clonación TA pCR2.1 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Los primeros 1872 nucleótidos de la fase de lectura abierta (ORF) de *gag-pol* de VIH cepa BH10 se reemplazaron con la parte correspondiente de la ORF de *gag* de HXB2 para potenciar la formación de partículas tipo virus (VLP). Esta ORF *gag-pol* quimérica se insertó en el plásmido pG01 modificado después del promotor mH5. Las últimas 280 pb del flanco izquierdo de MVA se duplicaron y se insertaron el promotor del virus vaccinia P11 y el gen de la glucuronidasa de *Escherichia coli* (GUS) entre las dos repeticiones directas para implementar un protocolo de aislamiento de virus recombinante de estabilización con marcador transitorio (Wyatt et al. 2004 AIDS Res. Human Retrovir. 20:645-653).

20 Plásmido pG01

Plásmidos. Se amplificaron secuencias de ADN de MVA que flanquean el sitio de una delección de 3500-pb en el fragmento Hind 111 A del genoma de MVA por PCR y se clonaron en pGEM 4Z (Promega). Los cebadores para el flanco de ADN izquierdo de 900-pb fueron 5'-CAGCAGGAATTCGTTGGTGGTCGCCATGGATGGTGT-3' (**SEC ID Nº 14**) y 5'-GGGGGGGGTACCTAC-CAGCCACCGAAAGAG-3' (**SEC ID Nº 15**) (los sitios para las enzimas de restricción *EcoRI* y *Kpn I* están subrayados). Los cebadores para el flanco de ADN derecho de 600-pb fueron 5'-GGGGGGCTGCAGTTTGGAAAGTTTTATAGGGGGGGGCTGCAGTTT-GGAAAGTT TTATAGG-3' (**SEC ID Nº 16**) y 5'-GGGGGGAAGCTTAACTAGTTTCTGGTG-3' (**SEC ID Nº 17**) (los sitios para las enzimas de restricción *Pst I* y *HindIII* están subrayados). Entre estos flancos de ADN de MVA, se clonaron el gen *lacZ* de *Escherichia coli* bajo el control del promotor tardío del virus vaccinia P11 y el gen *gpt* de *E. coli* bajo el control del promotor temprano/tardío del virus vaccinia P7.5 (Sutter y Moss 1992 PNAS USA 89:10847-10851).

II. pLW44

35 pLW44 contiene un gen que codifica GFP potenciada regulado por el promotor tardío P11 del virus vaccinia.

III: pLW-16

Se construyó un nuevo vector de transferencia plasmídico, pLW-17, para permitir la inserción en la delección II localizada en el lado izquierdo del genoma de MVA (H. Meyer, et al. 1991 J. Gen. Virol. 72:1031-1038) del siguiente modo. Se preparó el flanco 1 por PCR usando cebadores que comienzan en el nucleótido 52 que precede el lado izquierdo de la delección II, se clonó en un vector de clonación T-A, se digirió con *SphI*, y se clonó en el sitio *SphI* de pGEM-4Z (Promega, Madison, WI). El flanco 2 se preparó por PCR usando cebadores que contienen extremos compatibles *EcoRI* y *KpnI* desde el lado derecho de la delección II y se clonó en sitios *EcoRI* y *KpnI* de pGEM-4Z. Este plásmido que contiene las dos regiones flanqueantes de la delección II se denominó pLW-16. El promotor H5 modificado se escindió de pLW-9 por digestión con *SmaI* y *PstI* y se clonó en sitios *SmaI* y *PstI* de pLW-16, provocando un nuevo vector de transferencia plasmídico, pLW-17. La secuencia codificante F de RSV-A2 se escindió de un plásmido proporcionado amablemente por P. Collins y se ligó de forma roma en el sitio *SmaI* de pLW-17 (Wyatt, L.S. et al. 1999 Vaccine 18:392-397).

Ejemplo 2

Recombinantes de MVA que expresan Env, Gag, y Pol de clado A

55 **Construcción y caracterización de MVA 65A/G**

Este ejemplo describe la construcción de un virus recombinante de virus vaccinia Ankara modificado (MVA), MVA 65A/G, que expresa Env y Gag Pol de la cepa 928 de VIH clado A/G. Las características fundamentales de este virus recombinante son:

- 60 1) Un marcador de selección transitorio de proteína fluorescente verde (GFP) se usó en la construcción de MVA 65A/G, de modo que se elimina GFP en el producto de virus final.
- 2) El gen *env* A/G se inserta en del II del genoma MVA y *gag pol* A/G se inserta en del III.
- 3) Tanto *env* como *gag pol* de MVA 65A/G se controlan por el promotor PmH5 de vaccinia.
- 65 4) El virus MVA usado para preparar el MVA 65A/G recombinante es MVA 1974/NIH Clon 1.

Vectores de transferencia plasmídicos

Los vectores de transferencia plasmídicos pJD5 y pJD6 (**Figura 7** y **Figura 8** respectivamente), se usaron para preparar MVA recombinantes individuales por recombinación homóloga. Cada uno de estos plásmidos porta el marcador GFP transitorio, y se construyeron del siguiente modo:

1. Secuencia génica de Gag/pol de VIH A/G 928 (de pGA2/928/928+3RT) que contiene tres mutaciones para inactivar la actividad transcriptasa inversa (correspondiente a lo dado para el recombinante de clado B) con la integrasa retirada se clonó en pCR2.1 usando el kit de PCR FailSafe. El gen gag/pol se clonó en el vector de transferencia pLAS-1 de MVA deleción III (que contiene el marcador de selección transitorio GFP flanqueado por dos repeticiones directas para eliminar GFP en el virus final) mediante el sitio de endonucleasa de restricción Sail, y la expresión génica estuvo bajo el control del promotor temprano/tardío modificado H5. Las secuencias del gen gag/pol de VIH A/G 928 se confirmaron por secuenciación de ADN, y esta construcción se denominó pJD5 gag pol (**Fig. 7**).

2. La secuencia génica de Env de VIH A/G 928 (retirada de pGAI/928/928 de Harriet Robinson) se truncó mediante eliminación por PCR de 114 aminoácidos en la cola citoplasmática de gp41 y se clonó en pCR2.1. Se hicieron mutaciones silenciosas para eliminar 2 señales 5TNT de terminación de poxvirus tempranas (Kit QuikChange, Stratagene). El gen env modificado y truncado se clonó en el vector de transferencia pLAS-2 de MVA deleción II (que contiene el marcador de selección transitoria GFP flanqueado por dos repeticiones directas para eliminar GFP en el virus final), con la expresión génica bajo el control del promotor temprano/tardío modificado H5. La secuencia del gen env de VIH A/G 928 se confirmó por secuenciación de ADN, y esta construcción se denominó pJD6 (**Fig. 8**).

Construcción de MVA recombinante individual

1. El virus MVA 1974/NIH Clon 1, que se obtuvo de un MVA recibido de Anton Mayr (Múnich, Alemania) en pase 572 de 2/22/74 por dilución terminal 3 veces en el National Institutes of Health, se usó para la recombinación.

2. CEF secundarios preparados a partir de huevos de pollo fértiles SPAFAS de 10 días de edad (distribuidos por B&E Eggs, Stevens, PA) en placas de cultivo de seis pocillos se infectaron a una MOI de 0.05 de MVA y se transfectaron con aproximadamente 1,5 µg de JD5 o JD6 (**Fig. 9**). Estas dos construcciones de virus se realizaron de un modo similar al descrito a continuación, pero independientemente.

3. Después de una incubación de dos días a 37°C, los virus se recogieron, se congelaron y se descongelaron 3x, y se sembraron en CEF.

4. A los 3 días después de la infección, los focos de infecciones que expresaban GFP (que indica que ha sucedido recombinación entre el plásmido y el virus infeccioso) se picaron y volvieron a sembrar en CEF. De nuevo, se picaron aquellos focos que expresaban GFP. Este proceso se repitió una vez más.

5. Estos focos que expresan GFP purificados en placa 3x se sembraron en placas CEF por duplicado y se analizaron dos placas para la fluorescencia GFP y la expresión de Gag o Env con anticuerpo monoclonal T24 (expresión de envuelta) o mAb 3537 (183-H12-5C, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) específico para Gag. Los focos individuales se picaron de la placa de réplica duplicada de aquellas muestras con poca o ninguna fluorescencia GFP así como la mayoría de los focos de tinción Gag o Env.

6. Estos focos se sembraron de nuevo por duplicado, y se analizaron del mismo modo 1-2 veces adicionales. Los virus recombinantes resultantes derivados expresaban cualquiera de las proteínas Gag Pol (vJD5gag/pol) o Env (vJD6env) pero tenían deleciónado el gen de GFP por recombinación de las repeticiones dobles.

Construcción MVA recombinante doble

1. Para preparar el recombinante MVA doble, se usaron MVA 65A/G, los dos virus MVA recombinantes individuales, vJD5 gag pol y vJD6 env, que expresan Gag Pol y Env respectivamente, para infectar células CEF juntos a una MOI de 5, se cultivaron a 37 °C durante 2 días y se recogieron (**Fig. 9**).

2. Se infectaron placas duplicadas de la recolección a diferentes diluciones, y una placa se fijó y tiñó con mAb T24 y se valoraron varios focos de células infectadas que tenían CPE redondeado (característico de recombinantes Gag Pol) para asegurar que había recombinantes dobles en la población. Después, se picaron los focos con la morfología redondeada de la placa duplicada no teñida.

3. Estos focos se sembraron a diversas diluciones por triplicado y se inmunotiñeron para la expresión de Env (mAb T24) y la expresión de Gag (mAb 3537). Aquellos focos que se teñían tanto para la expresión de Env como para la de Gag se purificaron en placa 5 veces adicionales.

4. El virus se expandió en células CEF y se produjo una reserva de siembra LVD de MVA/VIH 65A/G $5,5 \times 10^8$ pfu/ml. El ensayo de micoplasma por ATCC fue negativo. El ensayo de esterilidad por BioReliance fue negativo. La secuenciación de ADN confirmó las ORF tanto de env como de gag pol, así como la deleción del gen indicador GFP.

Caracterización de virus recombinante MVA, MVA 65A/G

1. Se analizaron alícuotas de lisados celulares BS-C-1 infectados con MVA 65A/G por radioinmunoprecipitación (RIP) con anticuerpos monoclonales T24 y 3537 para la expresión de las proteínas de envuelta y Gag,

respectivamente (**Fig. 10 y Fig. 11**). Se detectaron bandas del tamaño correcto correspondientes a cada una de estas proteínas. La expresión temprana de proteínas recombinantes se confirmó por infección de las células en presencia de ARA-C. El virus recombinante demostró producir partículas gag en el sobrenadante de células infectadas por sedimentación de las partículas marcadas con ³⁵S en un colchón de sacarosa al 20 %.

2. El pase repetido de MVA 65A/G y el análisis del virus resultante ha confirmado que MVA 65A/G es estable a través de 10 pases de la reserva de siembra LVD.

3. La secuenciación de una región del genoma de MVA/VIH 62 que consiste en los insertos de VIH así como una región de 1000 pares de bases del genoma de MVA flanqueando ambos lados del VIH confirmó que el gen de GFP se ha deletado y la secuencia de los genes insertados de VIH es correcta. Las **Figuras 12 y 13** muestran la secuencia de los genes env y gag pol en los plásmidos.

4. Se evaluó la inmunogenicidad por 10⁷ pfu de MVA 65A/G purificado inoculado en ratones a las 0 y 4 semanas. Se ensayaron anticuerpos séricos ELISA en un ELISA de captura utilizando env gp140 clado A como antígeno. La **Tabla 1** muestra que env clado A es inmunogénica.

Sumario

En resumen, hemos preparado un virus MVA recombinante, MVA 65A/G, que expresa al envuelta modificada y truncada y gag pol mutada A/G 928. El virus recombinante doble MVA se preparó por recombinación homóloga de los recombinantes MVA individuales, uno que expresa Env y uno que expresa Gag Pol. Estos recombinantes MVA individuales se prepararon usando un marcador GFP expresado de forma transitoria que se deletó en los virus finales. MVA/VIH 65A/G demostró ser estable a través de pase repetido de la reserva de siembra LVD.

Modificación a la construcción MVA 65A/G para aumentar la expresión e inmunogenicidad

La inmunogenicidad del virus recombinante MVA 65A/G medida por ELISA utilizando env gp140 de MVA clado A como antígeno mostró que la envuelta de MVA 65A/G no era inmunogénica como se esperaba (véase la **Tabla 1**). Este ejemplo describe la modificación al vector de transferencia plasmídico de MVA 65A/G, pJD-6, que se preparó para aumentar la expresión e inmunogenicidad de la envuelta A/G, y su comparación con el virus original MVA 65A/G.

Tabla 1. Inmunogenicidad de MVA 65 A/G*

Virus de inmunización	Animal nº	Env ELISA		P24 ELISA		Vaccinia ELISA	
		Pre-exanguinación	2x Dosis	Pre-exanguinación	2x Dosis	Pre-exanguinación	2x Dosis
MVA 1974	1801	<100 (combinación)	<100	<100 (combinación)	<100	<100 (combinación)	>102.400
	1802		<100		ND		>102.400
	1803		<100		<100		>102.400
	1804		<100		<100		>102.400
	1805		<100		<100		>102.400
MVA 65A/G	1826	<100 (combinación)	6400	<100 (combinación)	12800	<100 (combinación)	>102.400
	1827		3200		<100		>102.400
	1828		200		<100		51.200
	1829		200		1600		>102.400
	1830		1600		400		102.400

*Títulos ELISA de suero de cinco ratones ensayados individualmente que se inmunizaron dos veces con 10⁷ PFU del virus indicado. Las respuestas de anticuerpos en suero se ensayaron por un ELISA de 2 días utilizando gp140 Clado A 928 secretada, p24 comercial, y virus vaccinia purificado como antígenos para la respuesta ELISA de Clado A.

Modificación a pJD-6

El vector de transferencia plasmídico, pJD-6 se modificó del siguiente modo:

1. El gen de envuelta A/G se amplificó por PCR a partir de pJD-6 con oligos que incorporaban un sitio SmaI en el extremo 5' del clado A/G y un sitio NotI en el extremo 3' del gen env. Este inserto se clonó en el sitio SmaI y NotI del vector de inserción pLAS-2 creando un vector de transferencia, JD-16 (Fig. 14). Este plásmido difiere de pJD-6 (que se había usado para preparar el virus recombinante MVA 65 A/G) en solamente un aspecto, las secuencias intermedias entre el extremo del promotor y el sitio de inicio del gen env dentro de la región de clonación múltiple (véase el nº 2 para explicación adicional).

2. En pJD-6, la env A/G 928 se clonó en el sitio de clonación múltiple de pLAS-2 usando el sitio de restricción NotI. En esta disposición hay un codón de inicio intermedio entre el promotor y el codón de inicio de la envuelta (parte del sitio de la enzima de restricción *SphI*). En pJD-16, la env A/G 928 se clonó en el sitio de clonación múltiple de pLAS-2 usando el sitio SmaI en el inicio del gen y NotI al final del gen, eliminando de este modo este codón de inicio intermedio. Por tanto, las secuencias intermedias entre el extremo del promotor y el sitio de inicio del gen env dentro de la región de clonación múltiple son la única diferencia en los dos plásmidos como se describe a continuación:

Vector de transferencia plasmídico	Extremo del promotor	Secuencias intermedias	Inicio de Env
pJD-6	TAAATA (SEC ID N° 7)	AGCCCGGGATCCTCTAGAGTCG ACCTGCAGGCATGCTCGAGCGGC CGCACC (SEC ID N° 8)	ATGAGAGTG (SEC ID N° 10)
pJD-16	TAAATA (SEC ID N° 7)	AGCCCGGGACC (SEC ID N° 9)	ATGAGAGTG (SEC ID N° 10)

Construcción de MVA recombinante doble

Para preparar el virus MVA recombinante doble con el plásmido JD-16, se usó el virus recombinante MVA individual que expresa gag pol del virus A/G, vJD5 gag pol, como se ha descrito anteriormente en la construcción original MVA 65A/G, para infectar CEF, y pJD-16 se transfectó en este cultivo infectado. El aislamiento del virus procedió como se ha descrito anteriormente para el virus original MVA/VIH 65A/G y el virus recombinante doble resultante (Clon D1.3266-15), se denominó MVA/VIH 65A/G(Smal).

Caracterización y comparación del MVA/VIH 65A/G original con el MVA/VIH 65A/G(Smal) modificado

1. Se analizaron alícuotas de células BS-C-1 infectadas con MVA/VIH 65A/G y MVA/VIH 65A/G(Smal) por RIP con anticuerpos monoclonales mAb T24 y T32 para la expresión de env (Fig. 15) y mAb 3537 (183-H12-5C, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) para la expresión de gag (Fig. 16). Utilizando el programa Image Quant, se cuantificó la cantidad de proteína inmunoprecipitada con T24 de cada construcción, y la expresión de Env fue 2 veces mayor con 65A/G(Smal) modificado en comparación con MVA 65A/G. MVA 65A/G(Smal) demostró producir partículas gag en el sobrenadante de células infectadas por sedimentación de partículas marcadas con ³⁵S a través de un colchón de sacarosa al 20 %.

2. Se evaluó la inmunogenicidad del virus 65A/G(Smal) modificado en ratones inmunizados 2x con cualquiera de MVA 65A/G o MVA 65A/G(Smal) modificado una dosis de 10⁷ dada IM separadas por tres semanas. Se determinó el título ELISA promedio del suero de los cinco ratones (ensayos individualmente) con el virus indicado. Se ensayaron las respuestas de anticuerpo en suero por un ELISA de 2 días utilizando gp140 secretada de cepa 928 Clado A como antígeno. Los resultados de la Fig. 17 indican que la construcción modificada MVA 65A/G (Smal) Env es aproximadamente 40 veces más inmunogénica que la construcción original MVA 65A/G.

Los 2 virus diferentes también se ensayaron para su capacidad de inducir una respuesta inmune celular de la proteína Gag medida por tinción de citoquinas intracelulares. Se inmunizaron ratones (5/grupo) dos veces con 10⁷ pfu de los virus indicados. Se ensayaron los esplenocitos de ratones individuales directamente ex vivo después de cultivo durante una noche con 2 diferentes células P815 pulsadas con péptido gag p24. Las células CD8⁺ IFN-γ⁺ se contaron por citometría de flujo. Como se muestra en la Fig. 18, ambas construcciones tenían respuesta similar de tinción de citoquinas intracelulares (ICS) a los péptidos gag. Esto se esperaría ya que el virus de gag usado para preparar las 2 construcciones es idéntico.

3. El pase repetido de MVA 65A/G(Smal) y el análisis de la expresión del virus resultante ha confirmado que la expresión de la envuelta del MVA 65A/G(Smal) modificado es muy inestable como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Inestabilidad de construcción MVA A/G modificada

Pase	% de placas sin tinción			
	MVA 65 A/G original		MVA 65 A/G (Sma)	
	Env	Gag	Env	Gag
Semilla LVD	<3	2	<2	<1
P2	<1	<1	ND	ND
P3	<1	2	28	1
P4	<1	<1	ND	ND
P5	<1	<1	75	<1
P6	<1	<1		
P7	2	<1		
P8	<1	<1		

Sumario

Por tanto, la retirada del sitio de inicio de codón intermedio, a través de la reclonación de la envuelta en un sitio más cercano al promotor, crea un virus que expresaba cantidades mayores de env y era mucho más inmunogénico; sin embargo no podía reivindicarse como vacuna candidata porque era altamente inestable (Tabla 3).

Tabla 3. Sumario de clado A/G

Propiedades	MVA 65A/G (original)	MVA 65A/G Sma
Título de reserva de siembra LVD (pfu/ ml)	5,5x10 ⁸	2,5x10 ⁸
Expresión de Env de VIH	1	2
Expresión de Gag de VIH	1	1,3
Inmunogenicidad		
Env ELISA	1	40
CD8+ Gag	1	0,8
Estabilidad	1	inestable

Ejemplo 3

5 Recombinantes MVA que expresan Env, Gag, y Pol de clado B

Construcción y caracterización de MVA/VIH 62B

10 Este ejemplo describe la construcción de un virus recombinante de virus vaccinia Ankara modificado (MVA), MVA/VIH 62B, que expresa Env de VIH cepas ADA clado B y Gag Pol quimérica de HXB2/BH10. Este virus difiere de un recombinante de MVA clado B previo, MVA/VIH 48 (que también expresa idéntica Env de VIH cepa ADA y Gag Pol de HXB2/BH10) de 4 modos:

- 15 1) MVA/VIH 62B usa un marcador de selección transitorio de proteína fluorescente verde (GFP) en lugar del marcador de selección GUS usado en MVA/VIH 48.
- 2) El gen *env* se inserta en del II del genoma MVA y el *gag pol* se inserta en del III. En MVA/VIH 48, tanto *env* como *gag pol* se insertan en del III.
- 3) Tanto *env* como *gag pol* de MVA/VIH 62B están controlados por PmH5, el mismo promotor que controla *gag pol* en MVA/VIH 48.
- 20 4) El virus MVA usado para preparar el MVA/VIH 62B recombinante es MVA 1974/NIH clon 1 en lugar de MVA 1983/NIH clon 1 usado para preparar MVA/VIH 48.

Vectores de transferencia plasmídicos

25 Los vectores de transferencia plasmídicos pLAS-1 HXB2/BH10 Gag Pol, y pLAS-2 ADA Env (**Fig. 19** y **Fig. 20** respectivamente), se usaron para preparar MVA recombinantes individuales por recombinación homóloga. Cada uno de estos plásmidos porta el marcador transitorio GFP, y se construyeron del siguiente modo:

- 30 1. La gag pol de clado B se truncó de modo que se retirara la integrasa y se clonó en el plásmido de modo que estuviera controlada por el promotor mH5. Este gen contenía la secuencia HXB2 completa de gag. El gen pol tiene mutaciones de seguridad de transcriptasa inversa en el aminoácido 185 dentro del sitio activo de RT, en el aminoácido 266 que inhibe la actividad de transferencia de hebra, y en el aminoácido 478 que inhibe la actividad Rnasa H. Además, el gen de la integrasa está deletado pasado el sitio *EcoRI*.
- 35 2. pLAS-1 se construyó a partir de pLW-51GFP cortando el promotor de vaccinia Psyn II, haciéndolo como y religándolo. Las secuencias HXB2/BH10 *gag pol* de clado B de MVA/VIH 48 se clonaron en pLAS-1, creando el vector de transferencia plasmídico, pLAS-1 HXB2/BH10 Gag Pol (**Fig. 19**).
- 40 3. La envuelta ADA es una versión truncada con mutaciones 5TNT silenciosas. La envuelta se truncó en la cola citoplasmática del gen gp41 gene, deletando 115 aminoácidos de la cola citoplasmática. Este truncamiento demostró aumentar la cantidad de proteína de envuelta sobre la superficie de células infectadas y potencia la inmunogenicidad de la proteína de envuelta en ratones, y la estabilidad del virus recombinante en cultivo tisular.
4. pLAS-2 se construyó mediante una inserción de una repetición directa del flaco de MVA descrito en la construcción de LAS-2 seguida de una inserción de GFP controlada por el promotor de vaccinia P11. La adición de las secuencias *env* modificadas ADA anteriores de MVA/VIH 48 creó el vector de transferencia plasmídico pLAS-2 ADA Env (**Fig. 20**).

45

Construcción de MVA recombinante individual

- 50 1. Se usó virus MVA 1974/NIH clon 1, que se obtuvo de un MVA recibido de Anton Mayr (Múnich, Alemania) en pase 572 de 2/22/74 por dilución terminal 3 veces en el National Institutes of Health, para la recombinación.
2. Se infectaron células CEF secundarias a una MOI de 0,05 de MVA y se transfectaron con 2 µg de pLAS-1 HXB2/BH10 Gag Pol o 2 µg de pLAS-2 ADA Env (Fig. 21). Estas dos construcciones de virus se realizaron de un modo similar al descrito a continuación, pero independientemente.
3. Después de incubación de dos días a 37 °C, los virus se recogieron, se congelaron y descongelaron 3x, y se sembraron en CEF.
- 55 4. A los 3 días después de la infección, aquellos focos de infecciones que mostraban fluorescencia de GFP (que

indica que ha sucedido recombinación entre el plásmido y el virus infeccioso) se picaron y volvieron a sembrar en CEF. De nuevo, aquellos focos que expresaban GFP se picaron.

5. Estos focos que expresan GFP purificados en placa 2x se sembraron en placas de CEF por triplicado y se analizaron dos placas para la fluorescencia de GFP y la expresión de Gag o Env. Se picaron focos individuales de la tercera placa replicada de esas muestras con poca o ninguna fluorescencia de GFP así como principalmente focos de tinción Gag o Env.

6. Estos focos se sembraron de nuevo por triplicado, y se analizaron del mismo modo 2 veces adicionales (3x para la construcción de Gag Pol). Los virus resultados derivados expresaban proteínas Gag Pol (MVA 60) o Env (MVA 61) pero tenían deletado el gen de GFP por recombinación de las repeticiones dobles.

Construcción de MVA recombinante doble

1. Para preparar el recombinante MVA doble, se usaron MVA/VIH 62B, los dos virus MVA recombinantes individuales, MVA 60 y MVA 61, que expresan Gag Pol y Env respectivamente, para infectar células CEF juntos a una MOI de 5, se cultivaron a 37 °C durante 2 días y se recogieron (**Fig. 21**).

2. Se infectaron placas duplicadas de la recolección a diferentes diluciones, y una placa se fijó y tiñó con mAb T8 y se valoraron varios focos de células infectadas que tenían CPE redondeado (característico de recombinantes Gag Pol) para asegurar que había recombinantes dobles en la población. Después se picaron los focos con la morfología redondeada de la placa duplicada no teñida.

3. Estos focos se sembraron a varias diluciones por triplicado y se inmunotifieron para la expresión de Env (mAb T8) y la expresión de Gag (mAb 3537, 183-H12-5C, NIH AIDS Research and Reference Regent Program). Aquellos focos que se tiñeron para la expresión tanto de Env como de Gag se purificaron en placa adicionalmente.

4. El virus se expandió en células CEF y se produjo una reserva de siembra LVD de MVA/VIH 62. El ensayo de micoplasma por ATCC fue negativo. El ensayo de esterilidad por BioReliance fue negativo.

Caracterización de virus recombinante MVA, MVA/VIH 62B

1. Se analizaron alícuotas de lisados celulares BS-C-1 infectados por MVA/VIH 62B por radioinmunoprecipitación (RIP) con anticuerpos monoclonales T8 y 3537 para la expresión de las proteínas de envuelta y Gag, respectivamente (**Fig. 22**). Se detectaron bandas del tamaño correcto correspondientes a cada una de estas proteínas. La expresión temprana de proteínas recombinantes se confirmó infectando las células en presencia de ARA-C. El virus recombinante demostró producir partículas gag en el sobrenadante de células infectadas por sedimentación de partículas marcadas con ³⁵S sobre un colchón de sacarosa al 20 %.

2. El pase repetido de MVA/VIH 62B y el análisis del virus resultante ha confirmado que MVA 62B es relativamente estable a través de 10 pases de la reserva de siembra LVD.

3. La secuenciación de una región del genoma de MVA/VIH 62B que consiste en los insertos de VIH así como una región de 1000 pares de bases del genoma de MVA flanqueando ambos lados de los insertos de VIH confirmó que el gen de GFP se ha deletado y la secuencia de los genes insertados de VIH es correcta. La secuencia de Env ADA se da en la **Fig. 23**. La secuencia de Gag Pol se da en la **Fig. 24**.

4. Se evaluó la inmunogenicidad por 10⁷ pfu de MVA 62B purificado inoculado en ratones a las 0 y 4 semanas. Se ensayaron anticuerpos séricos ELISA en un ELISA de captura utilizando env gp140 ADA como antígeno. La **Tabla 4** muestra que la env ADA es inmunogénica. La **Fig. 25** muestra las respuestas ICS de env y gag de los ratones a MVA 62B.

Tabla 4. Inmunogenicidad de MVA 62B en ratones*

Virus de inmunización	Animal nº	Env ELISA		p24 ELISA		Vaccinia ELISA	
		Pre-exanguinación	2x Dosis	Pre-exanguinación	2x Dosis	Pre-exanguinación	2x Dosis
MVA 1974	2038	<100 (combinación)	<100	<100 (combinación)	<100	<100 (combinación)	409.600
	2039		<100		<100		409.600
	2040		<100		<100		409.600
	2041		<100		<100		409.600
	2045		<100		<100		204.800
MVA62B	2067	<100 (combinación)	500	<100 (combinación)	6400	<100 (combinación)	102.800
	2069		25,600		3200		204.800
	2070		256,000		400		204.800

	2071	2,400	<100	409.600
	2072	102,400	100	409.600

*Títulos ELISA de suero de cinco ratones ensayados individualmente que se inmunizaron dos veces con 10⁷ PFU del virus indicado. Las respuestas de anticuerpo en suero se ensayaron por un ELISA de 2 días utilizando gp140 ADA clado B secretada, p24 comercial, y virus vaccinia purificado como antígenos para la respuesta ELISA de clado B.

Sumario

En resumen, hemos preparado un virus MVA recombinante, MVA/VIH 62B, que expresa envuelta truncada y modificada ADA y Gag Pol de HXB2/BH10. El virus recombinante doble MVA se preparó por recombinación homóloga de recombinantes MVA individuales, uno que expresa Env y uno que expresa Gag Pol. Estos recombinantes MVA individuales se prepararon usando un marcador GFP expresado de forma transitoria que estaba delecionado en los virus finales. El virus MVA 62 B demostró que creaba partículas y era inmunogénico en ratones. MVA/VIH 62B demostró ser estable a través de pase repetido de la reserva de siembra LVD.

Modificaciones a la construcción MVA 62B para aumentar la expresión e inmunogenicidad

La inmunogenicidad de MVA 62B en ratones medida por ELISA utilizando gp140 de MVA clado B como antígeno (Tabla 4) mostró que la envuelta de MVA 62B no era tan inmunogénica como se esperaba. Este ejemplo describe las modificaciones al vector de transferencia plasmídico de MVA 62B, pLAS-2 ADA Env, que se preparó para aumentar la expresión e inmunogenicidad de la envuelta ADA en los virus MVA 62 B recombinantes dobles finales.

Modificación del vector de transferencia plasmídico

El vector de transferencia plasmídico, pLAS-2 ADA Env se modificó del siguiente modo:

1. La env ADA se cortó de JD-9 ADA Env por tratamiento con la enzima de restricción, XmaI (un isoesquizómero de SmaI que corta creando extremos solapantes en comparación con el corte romo de SmaI), y se insertó en el sitio XmaI en LAS-2 creando el plásmido pLAS ADA Env (SmaI) o como se denominó pLW-66 (**Fig. 26**). Este plásmido difería de pLAS-2 ADA Env (que se ha usado para preparar el virus recombinante MVA 62 B) en solamente un aspecto significativo, las secuencias intermedias entre el extremo del promotor y el sitio de inicio del gen env dentro de la región de clonación múltiple. (También difería de pLAS-2 ADA Env en la región de clonación del extremo del gen env a causa del modo en que se clonó en el plásmido, pero esto no es de importancia para la expresión del gen.) (véase n° 3 para explicación adicional).

2. pLAS-2 ADA Env se dirigió con enzima de restricción Sal I seguida de XhoI para cortar el sitio SphI (que contiene un codón de inicio) y se volvió a ligar todo junto para crear pJD-17 (**Fig. 27**). Este plásmido difería de pLAS-2 ADA Env (que se había usado para preparar el virus recombinante MVA 62 B) en solamente un aspecto, las secuencias intermedias entre el extremo del promotor y el sitio de inicio del gen env dentro de la región de clonación múltiple (véase n° 3 para explicación adicional).

3. En el plásmido pLAS-2 ADA Env, la envuelta ADA se había clonado en el sitio NotI generando la siguiente secuencia de nucleótidos entre el promotor. En pLW-66, la env ADA se clonó en el sitio XmaI (SmaI) generando la siguiente secuencia entre el promotor de vaccinia mH5 y el codón de inicio de env ADA como se describe a continuación. En pJD-17 el sitio SphI simplemente se había eliminado. Todo esto se muestra a continuación:

Vector de transferencia plasmídica	Extremo del promotor	Secuencias intermedias entre el promotor y el inicio de Env	Inicio de Env
pLAS-2 ADA Env	TAAATA (SEC ID N° 7)	AGCCCGGGGATCCTCTAGAGTC GACCTGCAGGCATGCTCGAGCG GCCGCACC (SEC ID N° 8)	ATGAAAGTG (SEC ID N° 10)
PLW-66	TAAATA (SEC ID N° 7)	AGCCCGGGACC (SEC ID N° 9)	ATGAAAGTG (SEC ID N° 10)
PJD-17	TAAATA (SEC ID N° 7)	AGCCCGGGGATCCTCTAGAGTC GAGCGCCGCACC (SEC ID N° 11)	ATGAAAGTG (SEC ID N° 10)

Construcción de MVA recombinante doble

Para preparar el virus MVA recombinante doble con los plásmidos pLW-66 y pJD-17, se usó el virus MVA recombinante individual que expresa gag pol del virus de clado B, MVA 60, como se ha descrito anteriormente, para infectar células CEF, y se transfectó pLW-66 o pJD-17 en estos cultivos de CEF infectados. El aislamiento del virus procedió como se ha descrito anteriormente para el virus original MVA/VIH 62B y los dos clones de cada virus

recombinante doble resultante se denominó del siguiente modo:

Plásmido usado	Número de clon	Denominación final del virus
pLW-66	12	MVA 62B (SmaI)12
pLW-66	16	MVA 62B (SmaI)16
pJD-17	3	MVA 62B(-SphI)3
pJD-17	4	MVA 62B(-SphI)4

Caracterización y comparación del MVA/VIH62B original con los virus modificados MVA/VIH 62B

- 5
1. Se analizaron alícuotas de células BS-C-1 infectadas con MVA/VIH 62B y 4 virus MVA 62B modificados por RIP con anticuerpo monoclonal T8 para la expresión de env (**Fig. 28**) y mAb 3537 para la expresión de gag (**Fig. 29**). Utilizando el programa Image Quant, se cuantificó la cantidad de proteína inmunoprecipitada con T8 de cada construcción, y la expresión de Env fue 2,6-3,3 veces mayor con las construcciones modificadas en comparación con MVA 62B. Todas las construcciones MVA62B demostraron producir partículas gag en el sobrenadante de células infectadas por sedimentación de partículas marcadas con ³⁵S a través de un colchón de sacarosa al 20 %.
- 10
2. Se evaluó la inmunogenicidad de las construcciones MVA62B modificadas en ratones inmunizados 2x con los virus original o MVA 62B modificados a una dosis de 10⁷ dada IM separadas por tres semanas. La **Fig. 30** muestra el título ELISA primario de suero de cinco ratones (ensayados individualmente). Las respuestas de anticuerpo en suero se ensayaron por un ELISA de 2 días utilizando gp140 ADA clado B secretada como antígeno. Los resultados indican que las construcciones modificadas son 11-32 veces más inmunogénicas que la construcción original en este ensayo de la inmunogenicidad de la envuelta.
- 15
3. Los diferentes virus también se ensayaron para su capacidad de inducir una respuesta inmune celular contra la proteína Env o Gag medida por tinción de citoquinas intracelulares (ICS). Se inmunizaron ratones (5/grupo) dos veces con 10⁷ pfu de los virus indicados. Se ensayaron los esplenocitos de ratones individuales directamente *ex vivo* después de cultivo durante una noche con las células P815 pulsadas con péptido env o péptido gag p24. Se contaron las células CD8⁺ IFN-γ⁺ por citometría de flujo.
- 20
- Como se muestra en la **Fig. 31**, las construcciones 62B modificadas crearon todas una respuesta ICS potenciada de Env en comparación con la original. Todas fueron 3-5 veces superior que el MVA 62B original. Como se muestra en la **Fig. 32**, todas las construcciones MVA 62B fueran originales o modificadas tuvieron respuesta ICS similar al péptido gag (variación de no más de dos veces). Esto se esperaba ya que el virus de gag usado para preparar las construcciones MVA 62B modificadas era idéntico.
- 25
3. El pase repetido de los virus MVA/VIH 62B modificados y el análisis del virus resultante ha confirmado que MVA 62B es relativamente estable a través de 10 pases de la reserva de siembra LVD.
- 30

Sumario

35 Por tanto, la eliminación del sitio de inicio de codón intermedio, a través de reclonación de la envuelta en un sitio más cercano al promotor, creó virus que expresaban cantidades mayores de env y eran mucho más inmunogénicos. Estos virus se están reivindicando como virus candidatos de vacuna (**Tabla 5**).

Tabla 5. Construcciones MVA62B originales y modificadas

Propiedades	MVA62B (original)	MVA62B (SmaI)12	MVA62B (SmaI)16	MVA62B (-SphI)3	MVA62B (-SphI)4
Título de reserva de siembra LVD (pfu/ml)	5,3x10 ⁸	6,7x10 ⁸	6,4x10 ⁸	6,7x10 ⁸	3,3x10 ⁸
Cultivo en pase	1	0,7	0,8	ND	0,3
Expresión de Env de VIH	1	206	2,7	ND	3,2
Expresión de Gag de VIH	1	0,7	0,7	0,8	0,9
Inmunogenicidad					
Env ELISA	1	19	32	44	16
CD8+Env	1	3	5	4,6	4,8
CD8+Gag	1	1,1	1,2	1	0,8
Estabilidad	1	1	1	ND	1

Construcción y caracterización de MVA 56

40 Este ejemplo describe la construcción de un virus recombinante de virus vaccinia Ankara modificado (MVA), MVA/VIH clado B que expresa env de VIH cepa ADA y gag pol quimérica de HXB2/BH10. Este virus difiere de un MVA recombinante previo, MVA/VIH 48, (que también expresa la env de VIH cepa ADA y la gag pol de HXB2/BH10) de 3 modos:

45

1. MVA/VIH 56 usa un marcador de selección transitorio de proteína fluorescente verde (GFP) en lugar del marcador de selección GUS usado en MVA/VIH 48.
2. La env ADA de MVA/VIH 56 está controlada por un nuevo promotor de virus vaccinia modificado, Pm2H5, que

permite la expresión más temprana de env ADA que el promotor Psyn II usado para expresar env ADA en MVA/VIH 48. (La gag pol está controlada por el promotor de virus vaccinia mH5, el mismo promotor que controla gag pol en MVA 48.)

3. El virus MVA usado para preparar el MVA/VIH 56 recombinante es MVA 1974/NIH clon 1 en lugar de MVA 1983/NIH clon 1, usado para preparar MVA/VIH 48.

Difiere de construcciones posteriores de MVA 62B original y MVA 62B modificado en que los genes env y gag están controlados por promotores dobles de virus vaccinia que están en tándem, como en MVA 48, y se insertan en solamente la deleción III del genoma de MVA. Esto da a este tipo de construcción una ventaja de construcción sobre las construcciones de MVA 62B ya que hay que proceder a través de sólo una etapa de purificación en placa en comparación con el régimen de construcción de las construcciones de MVA 62B.

Todas las construcciones de clado B descritas tienen la misma env ADA modificada y gag pol de HXB2/BH10 modificada.

Vector de transferencia plasmídico

El vector de transferencia plasmídico, pLAS-6, usado para preparar MVA/VIH 56 por recombinación homóloga se construyó del siguiente modo:

1. Se cortó el marcador de selección GUS del plásmido, pLW-48 (véase el documento WO 002/072759), y se reemplazó con el marcador de selección GFP dirigido por el promotor de virus vaccinia P11 (pLW-51 GFP). Este marcador de selección GFP se usó de forma transitoria para purificar en placa 2x el virus recombinante, pero se delecionó en el recombinante final por recombinación homóloga (porque GFP estaba flanqueada por dos repeticiones directas).

2. El promotor Psyn II de vaccinia se cortó de pLW-51GFP por digestión con XhoI y NotI y se reemplazó con un nuevo promotor de virus vaccinia H5 modificado adicional, pm2H5, en los mismos sitios. Este nuevo plásmido se llamó pLAS-5. Secuencia del promotor m2H5: AAAAAATGAAAACTATTCTAATTTATTAGAGAGTATTGATATA TTCATAGAATTTTTTCGCATATAAATA (SEC ID N° 12)

3. La env ADA, se retiró del pLW-48 por digestión con enzima NotI del plásmido y se clonó en el sitio NotI de pLAS-5 controlada por el promotor del virus vaccinia m2H5. El gen gag pol de HXB2/BH10 se retiró de pLW-48 por digestión con Sall y se puso en el sitio Sal I bajo el control del promotor mH5 para crear el vector de transferencia plasmídico, pLAS-6 (**Fig. 33**), que se usó para crear el virus recombinante MVA/VIH 56. Los genes de VIH recombinantes demostraron expresarse, por transfección.

Construcción MVA/VIH 56 recombinante

1. Se usó virus MVA 1974/NIH clon 1, que se obtuvo de un MVA recibido de Anton Mayr (Múnich, Alemania) en pase 572 de 2/22/74 por dilución terminal 3 veces en el National Institutes of Health, para la recombinación.

2. Se infectaron células CEF secundarias a una MOI de 0,05 de MVA y se transfectaron con 2 µg de pLAS-6, el plásmido descrito anteriormente. Después de una incubación de dos días a 37 °C, el virus se recogió, se congeló y se descongeló 3x, y se sembró en CEF.

3. A los 3 días, aquellos focos de infecciones que expresaban GFP (que indica que había sucedido recombinación entre el plásmido y el virus infeccioso), se picaron y volvieron a sembrar en CEF. De nuevo, se picaron aquellos focos que expresaban GFP.

4. Estos focos que expresaban GFP purificados en placa 2x se sembraron en placas CEF por triplicado y se analizaron dos placas para la fluorescencia de GFP y la expresión de gag pol. Se picaron focos individuales de la tercera placa replicada de aquellas muestras con poca o ninguna tinción de GFP así como principalmente focos con tinción de gag.

5. Estos focos se sembraron de nuevo por triplicado, y se analizaron del mismo modo 2 veces adicionales. El virus resultante derivado expresaba la proteína gag pero tenía delecionado el gen de GFP por recombinación de las repeticiones dobles. Por inmunotinción, el virus también expresaba la proteína env. El virus se expandió en células CEF y se produjo una reserva de siembra LVD y se ensayaron la esterilidad y el micoplasma por BioReliance y ATCC, respectivamente.

Caracterización de virus recombinante MVA, MVA/VIH 56

1. Se analizaron alícuotas de lisados celulares infectados con MVA/VIH 56 por radioinmunoprecipitación (RIP) con anticuerpos monoclonales para la expresión tanto de la proteína de envuelta como la proteína gag, ambas en presencia y ausencia de ARA-C. En RIP, se detectaron bandas del tamaño correcto correspondientes a cada una de estas proteínas, ambas en presencia y ausencia de ARA-C lo que indica una expresión tanto temprana como tardía de proteína recombinante (**Fig. 34**).

2. MVA/VIH 56 demostró producir partículas gag en el sobrenadante de células infectadas por sedimentación de partículas marcadas con ³⁵S del sobrenadante de células BS-C-1 infectadas con MVA/VIH 56 sobre un colchón de sacarosa al 20 % y análisis por PAGE.

3. La secuenciación de una región del genoma de MVA/VIH 56 que consiste en los insertos de VIH así como una

región de 1000 pares de bases del genoma de MVA flanqueando cada lado de los insertos de VIH confirmó que el gen de GFP se había delecionado y la secuencia de los genes insertados de VIH era correcta.

4. El pase repetido de los virus MVA/VIH 62B modificados y el análisis del virus resultante ha confirmado que MVA 62B es relativamente estable a través de 5 pases de la reserva de siembra LVD.

5. Se evaluó la inmunogenicidad de MVA 56 en ratones inmunizados 2x con 10^7 pfu separadas por tres semanas. La **Fig. 28** muestra el título ELISA promedio del suero de cinco ratones (ensayados individualmente). Las respuestas de anticuerpo en suero se ensayaron por un ELISA de 2 días utilizando gp140 ADA clado B secretada como antígeno. Los resultados indican que MVA 56 es capaz de provocar anticuerpos en suero. MVA 56 también se ensayó para su capacidad de inducir una respuesta inmune celular de la proteína Env o Gag medida por ICS. Se inmunizaron ratones (5/grupo) dos veces con 10^7 pfu de MVA 56. Se ensayaron los esplenocitos de ratones individuales directamente *ex vivo* después de cultivo durante una noche con las células P815 pulsadas con péptido env o péptido gag p24. Se contaron las células $CD8^+ IFN-\gamma^+$ por citometría de flujo. Como se muestra en la **Fig. 29**, MVA 56 induce una respuesta inmune celular contra env. Como se muestra en la **Fig. 29**, MVA 56 también induce una respuesta ICS contra gag p24, similar a las otras construcciones de clado B.

Sumario

En resumen, hemos preparado un virus MVA recombinante, MVA/VIH 56, que tiene alta expresión de envuelta truncada y modificada ADA y gag pol de HXB2/BH10 e insertos en la delección III del genoma de MVA. El virus recombinante MVA se preparó usando un marcador GFP expresado de forma transitoria que estaba delecionado en el virus final. La alta expresión de la envuelta ADA fue posible a causa de un nuevo promotor temprano/tardío híbrido, Pm2H5. El MVA 56 recombinante crea partículas gag que se ha demostrado por sedimentación de las partículas a través de sacarosa y análisis por PAGE. La secuenciación de la región recombinante del genoma de MVA confirmó la ausencia de GFP y la secuencia correcta de los genes de VIH. El ELISA de Env confirmó la inmunogenicidad de la envuelta ADA y se detectó respuesta celular tanto a la envuelta como a p24 gag.

Ejemplo 4

MVA recombinante que expresa Env, Gag, Pol de clado C

Construcción y caracterización de MVA/VIH 71C

Este ejemplo describe la construcción de un virus recombinante de virus vaccinia Ankara modificado (MVA), MVA/VIH 71C, que expresa Env y Gag Pol de VIH IN3 indio clado C. Las características destacadas de este virus recombinante son:

1. Se usó un marcador de selección transitorio de proteína fluorescente verde (GFP) en la construcción de MVA/VIH 71C, de modo que se elimine GFP en el producto de virus final.
2. El gen 71C *env* se inserta en del II del genoma de MVA y el gen 71C *gag pol* se inserta en del III.
3. Tanto *env* como *gag pol* de MVA 71C están controlados por el promotor de vaccinia mH5.
4. El virus MVA usado para preparar el MVA/VIH 71C recombinante es MVA 1974/NIH clon 1.

Vectores de transferencia plasmídicos

Se usaron los vectores de transferencia plasmídicos pDC3 y pJD15, **Figura 35** y **Figura 36** respectivamente, para preparar el MVA recombinante doble por recombinación homóloga. Cada uno de estos plásmidos porta el marcador GFP, flanqueado en cada lado por repeticiones directas para eliminar GFP en el producto de virus final. Los plásmidos se construyeron del siguiente modo:

1. Se clonó la secuencia génica de *gag pol* de VIH C IN3 (de aislado indio GenBank nº AF286231 de Harriet Robinson, Emory University) que contiene tres mutaciones para inactivar la actividad transcriptasa inversa (correspondiente a lo dado para recombinante de clado B) con la integrasa eliminada en pCR2.1 usando el kit de PCR FailSafe. El gen *gag/pol* se clonó en la delección III de MVA del vector de transferencia pLAS-1 (que contenía marcador de selección GFP flanqueado por dos repeticiones directas para eliminar GFP en el virus final) mediante el sitio de endonucleasa de restricción SmaI, y la expresión génica estaba bajo el control del promotor temprano/tardío H5 modificado. La secuencia del gen *gag pol* de VIH C IN3 se confirmó por secuenciación de ADN, y esta construcción se denominó pDC3 (**Fig. 35**).
2. La secuencia génica de *env* de VIH C IN3 (de aislado indio GenBank nº AF286231 de Harriet Robinson, Emory University) se truncó mediante eliminación por PCR de 120 aminoácidos en la cola citoplasmática de gp41 y se clonó en pCR2.1. Se hicieron mutaciones silenciosas para eliminar 2 señales de terminación de poxvirus tempranas 5TNT (kit QuikChange, Stratagene). El gen *env* modificado y truncado se clonó en la delección II de MVA del vector de transferencia pLAS-2 (que contiene marcador de selección de GFP flanqueado por dos repeticiones directas para eliminar GFP en el virus final) en el sitio NotI seguido de eliminación del sitio SphI dentro de la región de clonación por corte secuencial con Sall, después XhoI y ligando los extremos para crear pJD-15. La expresión génica en este plásmido está bajo el control del promotor H5 temprano/tardío modificado.

La secuencia del gen *env* de VIH C IN3 se confirmó por secuenciación de ADN, en esta construcción se denominó pJD-15 (**Fig. 36**).

Clado C MVA/VIH gag pol recombinante individual

- 5 1. Se usó virus MVA 1974/NIH clon 1, que se obtuvo de un MVA recibido de Anton Mayr (Múnich, Alemania) en pase 572 de 2/22/74 por dilución terminal 3 veces en el National Institutes of Health, para la recombinación.
- 10 2. Se infectaron CEF secundarios preparados a partir de huevos de pollo fértiles SPAFAS de 10 días de edad (distribuidos por B&E Eggs, Stevens, PA) en placas de cultivo de seis pocillos a una MOI de 0,05 de MVA y se transfectaron con aproximadamente 3,0 µg de pDC3 (**Fig. 37**).
- 15 3. Después de una incubación de dos días a 37 °C, el virus se recogió, se congeló y se descongeló 3x, y se sembró en placas de CEF.
4. A los 3 días después de la infección, se picaron aquellos focos de infecciones que expresaban GFP (que indica que había sucedido recombinación entre el plásmido y el virus infeccioso) y se volvieron a sembrar en CEF. De nuevo, se picaron aquellos focos que expresaban GFP.
- 20 5. Estos focos que expresan GFP purificados en placa 2x se sembraron en placas CEF duplicadas y se analizaron dos placas para la fluorescencia de GFP y para la expresión de Gag con MAb 183-H12-5C (3537) específico para Gag. Se picaron focos individuales de la placa de réplica duplicada de aquellas muestras con poca o ninguna tinción de GFP así como principalmente focos con tinción de Gag.
- 25 6. Estos focos se sembraron de nuevo por duplicado, y se analizaron del mismo modo 3 veces adicionales. El virus recombinante resultante expresaba proteínas Gag Pol pero había delecionado el gen GFP por recombinación de las repeticiones dobles. Se preparó una reserva de siembra, primero por cultivo de las placas picadas finales en 1 pocillo de placa de 6 pocillos, después en matraces T-25, seguido de cultivo en matraces T-150. Este virus, marcado como MVA 68C (LAS1 gag pol), se usó para preparar el recombinante doble.

Construcción de MVA recombinante doble

- 30 1. Para preparar el MVA recombinante doble que exprese las proteínas tanto Env como Gag Pol, se usó el virus MVA recombinante individual que expresa Gag Pol (MVA 68C), para infectar células CEF a una MOI de 0,05, seguido de transfección de 1 µg de pJD15, y se cultivaron a 37 °C durante 2 días y se recogieron (**Fig. 37**).
- 35 2. A los 3 días después de la infección, se picaron aquellos focos de infecciones que expresaban GFP (lo que indica que había sucedido recombinación entre el plásmido y el virus infeccioso) y se volvieron a sembrar en CEF. De nuevo, se picaron aquellos focos que expresaban GFP.
- 40 3. Estos focos que expresaban GFP purificados en placa 2x se sembraron en placas CEF duplicadas y se analizaron dos placas para la fluorescencia de GFP y para la expresión de Env con mAb T-43 específico para la proteína Env. Se picaron focos individuales de la placa de réplica duplicada de aquellas muestras con poca o ninguna fluorescencia de GFP así como principalmente focos con tinción de Env.
- 45 4. Estos focos se sembraron de nuevo por duplicado, y se analizaron del mismo modo 4 veces adicionales. El virus recombinante doble resultante expresaba las proteínas Env y Gag Pol pero había delecionado el gen de GFP por recombinación de las repeticiones dobles. Se preparó una reserva de siembra LVD, primer cultivando las placas picadas finales en 1 pocillo de placa de 6 pocillos, después en matraces T-25, seguido de cultivo en matraces T-150. Este virus, marcado como MVA/VIH 71C (nombre lab.-Clon 2 C4 6.21121), expresaba tanto Env como Gag por inmunotinción.

Caracterización de virus MVA recombinante doble, MVA/VIH 71C

- 50 1. Se analizaron alícuotas de lisados celulares BS-C-1 infectados con MVA/VIH 71C por radioinmunoprecipitación (RIP) con anticuerpos monoclonales T-43 y 3537 para la expresión de las proteínas de envuelta y Gag, respectivamente (**Fig. 38**). Se detectaron bandas del tamaño correcto correspondientes a cada una de estas proteínas. La expresión sucedía en presencia de Ara-C lo que indica la funcionalidad de la parte temprana del promotor mH5. El virus recombinante demostró producir partículas gag en el sobrenadante de células infectadas por sedimentación de las partículas marcadas con ³⁵S sobre un colchón de sacarosa al 20 %. La funcionalidad de la envuelta de clado C expresada se había mostrado con la secuencia C idéntica en construcciones previas en ensayo de fusión.
- 55 2. El pase repetido de MVA/VIH 71C y el análisis del virus resultante ha confirmado que es relativamente estable a través de 9 pases de la reserva de siembra LVD.
- 60 3. La secuenciación de una región del genoma de MVA/VIH 71C que consiste en los insertos de VIH sí como una región de 1000 pares de bases del genoma de MVA flanqueando cada lado de los insertos de VIH confirma que los genes de GFP se han delecionado y la secuencia de los genes insertados de VIH es correcta, que incluye las tres mutaciones en el gen de la transcriptasa inversa. Las **Figuras 39** y **40** muestran la secuencia de los genes *env* y *gag pol* en los plásmidos.
- 65 4. Se ha evaluado la inmunogenicidad de una dosis de 10⁷ pfu de MVA/VIH 71C purificado inoculado en ratones a las 0 y 4 semanas por vía intramuscular. Se ensayaron los anticuerpos en suero ELISA en un ELISA de captura utilizando env gp140 clado C como antígeno. La Tabla 6 muestra que la env clado C es inmunogénica.

Sumario

En resumen, hemos preparado un virus MVA recombinante, MVA/VIH 71C, que expresa la envuelta modificada y truncada de clado C IN3 y gag pol mutada. El virus MVA recombinante doble se preparó por recombinación homóloga de MVA recombinante individual que expresa proteína Gag Pol, con un plásmido que expresa la Env de clado C. Este MVA recombinante doble se preparó usando marcador GFP expresado de forma transitoria que estaba deletado en el virus final. Los experimentos RIP mostraron expresión de proteínas Env y Gag Pol de MVA/VIH 71C, así como producción de partículas gag. El recombinante doble demostró ser relativamente estable a través de pase repetido de la reserva de siembra LVD. Los experimentos de inmunogenicidad en ratones muestran que la env de clado C es inmunogénica (véase **Tabla 6**).

Tabla 6. Títulos de anticuerpo ELISA^a contra Env de clado C en ratones inmunizados con 10⁷ MVA recombinante

Virus	Ratón nº	Pre-exanguinación	2x inmunizados
MVA 71C (Clon nº 2 C4 6,21121)	276	<800	600.000 ^c
	277	<800	800.000
	278	<800	1.200.000
	279	<800	1.600.000
	280	<800	1.600.000
MVA 71C (Clon nº 5 C4 2,21321)	281	<800	800.000
	282	<800	400.000
	283	<800	800.000
	284	<800	3.200.000
	285	<800	3.200.000

^a ELISA de captura utilizando env gp140 clado C como antígeno;
^b se inmunizan 5 ratones cada uno con dosis de 10⁷ dada IM a las 0 y 4 semanas. Exanguinación a 2 semanas después de la 2^a inmunización;
^c dilución de punto final recíproca.

Ejemplo 5**15 Inmunogenicidad comparativa en monos rhesus de vacunas multi-proteína de ADN de VIH-1 (CRF02 AG) /MVA que expresan VLP maduras e inmaduras**

Se desarrolló una vacuna contra el SIDA para África occidental y occidental-central creada en base a VIH-1 subtipo CRF02_AG. Se sensibilizaron macacos rhesus con ADN plasmídico que expresa Gag-Pol-Env y se reforzaron con un virus vaccinia Ankara modificado recombinante (rMVA), que expresaba proteínas coincidentes. Se compararon dos construcciones de vacuna de ADN (IC1-90 e IC48) que diferían en mutaciones puntuales en gag y pol. IC1-90 produce partículas tipo VIH (VLP) principalmente inmaduras (el núcleo comprende Pr55Gag sin procesar) e IC48 produce VLP maduras con Pr55Gag procesada, VLP inmaduras, y agregados proteicos intracelulares. Ambas vacunas provocaron respuestas celulares significativas para Gag, Pol, y Env. Se observaron respuestas ELISPOT aproximadamente 2 veces superiores contra epítomos Gag y Env para animales IC48 que para animales IC1-90 en el pico de las fases efectora post-MVA (P = 0,028) y de memoria tardía (P = 0,051), respectivamente. Se observaron amplitudes mayores para animales sensibilizados con IC48 que para animales sensibilizados con IC1-90 en el máximo de respuesta (P = 0,03). Nuestros resultados indicaron que las vacunas provocaban respuestas de células T de alta frecuencia y anticuerpos anti-Env sensibilizados. También sugieren que la expresión de diferentes formas de VLP tiene un efecto significativo sobre la inmunidad celular y humoral provocada.

Resultados**Inmunógenos de vacuna**

Para evaluar el ensamblaje de VLP, se separaron en bandas los sobrenadantes de cultivo de transfección a través de un gradiente de sacarosa y las posteriores fracciones se examinaron para la presencia de Gag. Se analizaron las fracciones del pico de VLP por inmunotransferencia usando anticuerpo policlonal de conejo anti-p24 (**Fig. 41A**). Se detectaron solamente dos poliproteínas Gag, p55 y p41, para IC1-90. Se observaron tres formas de Gag (p55, p41, y p24) para IC48. La presencia de Gag p24 indica escisión de la poliproteína Gag. Como se ha demostrado previamente, la inhibición completa de la actividad proteasa de VIH por saquinavir (inhibidor de proteasa de VIH-1) o

construcción de vacuna IC25 (modificación genética de la actividad proteasa) provoca que la proteína Gag sea principalmente p55, lo que indica ausencia de escisión de la poliproteína Gag (Ellenberger, D. et al. 2004 *Virology* 319:118-130). Se muestra un resumen de las construcciones de vacuna con correspondientes mutaciones de proteasa que provocan la producción de productos variados, incluyendo agregados proteicos de VIH y VLP que contienen escisión completa a parcial de Gag, en la **Fig. 41B**.

Para confirmar la inhibición parcial del ensamblaje de VLP permitido por la actividad proteasa y la posible maduración de las partículas, se examinaron células transfectadas con construcciones de vacuna mutantes para proteasa por microscopía electrónica (**Fig. 41C**). Para IC1-90, se observaron VLP inmaduras (**Fig. 41C**). Estas partículas eran de tamaño uniforme, abundantes en cantidad, y similares en aspecto (revestimientos electro-densos y centros lúcidos) a las formadas por expresión en presencia de saquinavir e IC25 (Ellenberger, D. et al. 2004 *Virology* 319:118-130). También se observaron estructuras en gemación y numerosas VLP para IC48 (**Fig. 41C**). Sin embargo, se observaron dos morfologías de partícula distintivas: VLP con un revestimiento proteico esférico (inmadura) y otras partículas con centros electro-densos (maduras). Además, las VLP con centros electro-densos tenían un revestimiento proteico esférico delgado, lo que sugiere escisión de Gag p55 y condensación del núcleo viral, comparable con partículas maduras de VIH. También se observó que células transfectadas con IC48 contenían agregados intracelulares de proteínas de VIH (**Fig. 41C**).

Se detectó expresión de Gag total por ELISA de captura de antígeno después de transfección de células 293T; la expresión de IC1-90 pareció bruscamente disminuida en comparación con IC48, 131, y 878 ng/ml, respectivamente. En el sobrenadante y el lisado celular, los niveles de proteína Gag eran de 77 y 54 ng/ml (IC1-90) y 624 y 254 ng/ml (IC48), respectivamente. Sin embargo, como se ha informado previamente (Schneider, R. et al. 1997 *J. Virol.* 71:4892-4903), la eficacia de detección de Gag p55 fue sustancialmente menor que la de Gag p24. Por lo tanto, la cuantificación de proteína Gag total de sobrenadantes de transfección por análisis de transferencia de Western medida por phosphorimager demostró que IC1-90 expresaba proteína Gag hasta un nivel similar a IC48, 1771, y 1570 unidades relativas. Para IC1-90, la proteína Gag era principalmente p55 (61 % de la proteína inmuno-reactiva). La producción de proteína Env también se detectó por ELISA, y los niveles de Env en IC1-90 y IC48 fueron similares, 696 y 665 ng/ml, respectivamente. Se detectó un mayor porcentaje de proteína Env total en el sobrenadante de ambas construcciones.

30 **Ensayo preclínico de seguridad**

Se administraron tres sensibilizaciones de ADN a las 0, 8, y 26 semanas y un único refuerzo de rMVA a las 41 semanas en 1 ml por inyecciones con aguja IM. La sensibilización ADN fue de 0,6 mg de IC1-90 o IC48 por inyección y el refuerzo con MVA fue a 1×10^8 pfu. Los 16 macacos recibieron alícuotas idénticas que diferían solamente en el agente de sensibilización, IC1-90, o IC48. Se completaron exámenes físicos, observaciones diarias, mediciones de peso, hematología, y química clínica. No se observaron rojeces locales o induraciones en el sitio de inyección.

40 **Análisis ELISPOT**

Las células T provocadas por la vacuna se expandieron rápidamente después del refuerzo con MVA (**Fig. 42**). Antes del refuerzo con MVA, las respuestas ELISPOT específicas de VIH-1 estaban en, o por debajo de, nuestro fondo para la detección después de cada sensibilización con ADN. Los análisis ELISPOT temporales revelaron que la mayor respuesta ELISPOT era 1 semana después del refuerzo con MVA (Pico). Se encontraron frecuencias de hasta 5300 manchas por millón de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en la respuesta máxima. Este pico de células específicas experimentó una reducción de tres veces en la combinación de memoria de ADN/MVA (8 semanas post-MVA). Las respuestas de células T se redujeron tres veces más a las 26 semanas después del pico (memoria tardía). Independientemente de la fase inmune (pico, memoria, o memoria tardía) los ELISPOT totales fueron mayores para animales sensibilizados con IC48 que animales sensibilizados con IC1-90; las respuestas de células T para animales IC48 fueron 2,2 veces mayores (media aritmética) que para animales IC1-90. Un modelo de efectos aleatorios usando una regresión lineal de los valores ELISPOT agregados sobre el grupo y el tiempo demuestra que IC48 es mayor que IC1-90, el efecto de grupo tiene valor $P = 0,002$ en el modelo. Además, en la respuesta máxima ($P = 0,028$) y la memoria tardía ($P = 0,051$), se observaron respuestas significativamente mayores por animales sensibilizados con IC-48.

En la respuesta máxima, ambos ADN plasmídicos ensayados sensibilizaron de forma satisfactoria el refuerzo con MVA para una respuesta ELISPOT anti-viral de IFN- γ contra secuencias de Gag, Pol, y Env. Los análisis revelaron diferencias de más de dos veces entre las sensibilizaciones con IC48 y IC1-90 (**Fig. 43**). La diferencia de dos veces fue significativa y se observó en todas las regiones génicas ensayadas del virus, incluyendo Gag ($P = 0,015$), Pol ($P = 0,047$), y Env ($P = 0,0003$). Para Pol y Env, las respuestas medias ELISPOT totales fueron menos que la respuesta observada en Gag, pero la diferencia de dos veces es evidente. Se esperaba respuesta Tat limitada ya que Tat no era un inmunógeno común en el plásmido recombinante y rMVA.

Estuvo presente una amplia respuesta ELISPOT tanto para Gag como para Env 1 semana después del refuerzo con MVA (**Fig. 44**). Se observó mayor amplitud de respuesta contra combinaciones de péptidos para animales sensibilizados con IC48 que para animales sensibilizados con IC1-90 ($P = 0,03$). En la respuesta máxima, cada una

de las 5 combinaciones de péptidos Gag y 7 combinaciones de péptidos Env se reconocieron por al menos 3 de los animales inmunizados. En promedio por animal, 2,8 combinaciones de péptidos Gag y 2,9 combinaciones de péptidos Env estimularon una respuesta celular medida por ELISPOT. Se provocaron frecuencias muy inferiores de respuestas para PR, RT, y Tat, pero estas combinaciones se reconocieron por al menos uno o más de los animales. Cuatro de los 16 animales reconocieron la combinación de péptidos PR, 7 reconocieron una de las 5 combinaciones de péptidos RT, y las células de un animal se estimularon por la combinación de péptidos Tat.

Coherente con la altura de la respuesta ELISPOT, las células T de los animales sensibilizados con IC48 reconocieron más combinaciones de péptidos que las observadas con animales sensibilizados con IC1-90 (Tabla 7). En el grupo IC1-90, 6 de 8 animales respondieron a al menos una combinación de Gag reconociéndose un promedio global de 2,5 de 5 combinaciones (Tabla 7, Fig. 44). Para el grupo IC48, 7 de 8 animales respondieron a al menos dos combinaciones de Gag reconociéndose un promedio global de 3,1 combinaciones. La respuesta a Env fue similar en el grupo IC48 donde 7 de 8 animales respondieron a al menos dos combinaciones. En el grupo IC1-90, solamente 6 de 8 animales respondieron a Env, reconociendo al menos una combinación de Env. En la fase de memoria de la respuesta inmune, menos combinaciones de péptidos estimularon respuestas de células T en todos los animales vacunados, pero los animales IC48 respondieron a más combinaciones de péptidos que el grupo IC1-90 (5,3 frente a 3 combinaciones), respectivamente.

Tabla 7. Cantidad promedio de combinaciones de péptidos por animal registrado como positivo por ELISPOT y análisis de tinción con citoquinas intracelulares

Combinación de péptidos ^e	ELISPOT ^a				Tinción con citoquinas intracelulares ^b			
	Pico ^c		Memoria ^d		CD8		CD4	
	IC1-90	IC48	IC1-90	IC48	IC1-90	IC48	IC1-90	IC48
Gag	2,5	3,1	2,1	2,5	1,1	1,25	2,9	3,0
Pol	1	1,8	0	0,5	ND ^f	ND	ND	ND
Env	2,4	3,4	0,9	2,3	0,75	1,25	3,0	3,6
Total	6	8,3	3	5,3	1,9 ^g	2,5 ^g	5,9 ^h	6,6 ^h

^a Recuentos ELISPOT de dos veces el fondo (>100) se consideraron positivos.
^b Combinación de expresión de IFN- γ e IL-2.
^c Una semana después del refuerzo con MVA.
^d Ocho semanas del refuerzo con MVA.
^e Gag, 5 combinaciones; Pol, 6 combinaciones (incluye combinación de proteasa); Env, 7 combinaciones.
^f ND, no realizado.
^g Respuesta de células CD8⁺ promedio por animal, 2,2 combinaciones.
^h Respuesta de células CD4⁺ promedio por animal, 6,25 combinaciones.

Se retuvo una amplia respuesta tanto para Gag como para Env 8 semanas post-refuerzo con MVA (Fig. 45). En la fase de memoria, los animales sensibilizados con IC48 respondieron a más epítomos (P = 0,004) que los animales sensibilizados con IC1-90. Se encontraron frecuencias de hasta 2125 manchas por millón de PBMC en la fase de memoria. Quince de los 16 animales reconocieron al menos una combinación de péptidos. Los monos AC36 y M509, inicialmente no respondedores 1 semana post-MVA, demostraron reconocer al menos una combinación de Gag a las 8 semanas post-MVA. El animal O2L permaneció insensible a las combinaciones de péptidos. En la respuesta de memoria, cada una de las 5 combinaciones de péptidos Gag y 5 de 7 combinaciones de péptidos Env se reconocieron por al menos uno de los animales inmunizados.

Análisis de citoquinas intracelulares

Para determinar las frecuencias de células T CD4 y CD8 respondedoras, se realizaron ensayos de citoquinas intracelulares (Fig. 46). Se midió la inducción peptídica de expresión de IFN- γ e IL-2 en linfocitos CD4 y CD8, y ambos ADN plasmídicos ensayados sensibilizaron satisfactoriamente el refuerzo con MVA. Una semana después del refuerzo con MVA, se observaron respuestas máximas como se observa por análisis ELISPOT. Independientemente de la región génica, la respuesta por los animales sensibilizados con IC48 fue significativamente mayor que en los animales sensibilizados con IC1-90: Env (P = 0,006) y Gag (P = 0,026). Las células CD8 específicas para epítomos Gag se expandieron a frecuencias tan altas como del 2,6 % de las células T CD8 totales en un animal. La tinción de citoquinas intracelulares para la expresión de IFN- γ e IL-2 reveló una diferencia aproximada de cuatro veces para péptidos Gag entre los plásmidos de ADN; IC48 sensibilizó más células CD8 que IC1-90. La media geométrica del porcentaje específico de células CD8 fue 0,54 frente a 0,14 para el grupo de IC48 y el grupo IC1-90, respectivamente. Se detectó una diferencia de dos veces en la región Env (0,28 frente a 0,14). Se observaron las mismas proporciones independientemente de la citoquina expresada.

En varios animales, las células CD4 específicas para epítomos Gag se expandieron hasta frecuencias tan altas como del 0,5 % de las células T CD4 totales (Fig. 46). Los análisis estadísticos revelaron que se observaba una cantidad significativamente mayor de células CD4 específicas para epítomos Env para los animales sensibilizados con IC48 que para animales IC1-90 (P = 0,006). Sin embargo, la tinción para la expresión de IFN- γ e IL-2 reveló una diferencia

de cuatro veces (medias geométricas de 0,39 frente a 0,11) para péptidos Env y una diferencia de dos veces (0,31 frente a 0,15) para péptidos Gag entre los plásmidos de ADN. Globalmente, las respuestas de células CD4 fueron significativamente mayores que las respuestas de células CD8 ($P < 0,0001$).

- 5 En base a los datos de la **Fig. 46**, se determinaron las medias geométricas para comparar células específicas (CD4 y CD8), citoquinas expresadas (IFN- γ e IL-2), y regiones génicas de VIH. La inducción peptídica de la expresión de IL-2 en linfocitos CD4 fue dos veces mayor que el porcentaje específico de linfocitos CD8 (media geométrica de 0,113 frente a 0,056). Sin embargo, las células CD8 y CD4 fueron similares para la expresión de IFN- γ (media geométrica de 0,089 frente a 0,078). En la región Gag, la expresión de IFN- γ fue significativamente mayor que la expresión de IL-2 ($P = 0,013$), pero las expresiones CD4-IL2, CD8-IL2, y CD8-IFN- γ fueron significativamente mayores que CD4-IFN ($P = 0,032$).

- 15 Se descubrió que la cantidad promedio de combinaciones de péptidos registrada como positiva por tinción de citoquinas intracelulares para incluir tanto la expresión de IFN- γ como de IL-2 era relativamente comparable entre los grupos de sensibilización con ADN independientemente de la región génica (**Tabla 7**). En la respuesta inmune máxima, los animales IC1-90 requerirían un aumento del 31 % y el 11 % en las respuestas a la combinación de péptidos para igualar la respuesta de los animales IC48 para células CD8 y CD4, respectivamente. Sin embargo, tres veces más de combinaciones de péptidos indujeron expresión de IFN- γ e IL-2 en células CD4 que en células CD8 (combinaciones 6,25 frente a 2,2). Esta misma proporción de tres veces se observó para animales sensibilizados tanto con IC1-90 como con IC48.

Respuestas de anticuerpos

- 25 La respuesta de anticuerpos se reforzó fuertemente por el MVA. Por análisis de transferencia de Western, se provocó unión de anticuerpo insignificante por sensibilización con ADN, pero 11 de 16 animales (6 monos IC1-90 y 5 monos IC48) mostraron reactividad Env contra un lisado de virus VIH-1 subtipo AG 3 semanas después del MVA. Los 11 animales reactivos produjeron anticuerpo que detectaba Env gp120 y solamente un animal respondió a Gag p24. No hubo diferencia entre los dos grupos de animales sensibilizados.

- 30 Se determinaron títulos anti-Env para los animales vacunados por ELISA de Env en fase sólida. A las 3 semanas post-MVA, los títulos recíprocos promedio fueron de 1075(± 1569) y 2119(± 1898) para los animales sensibilizados con IC1-90 y con IC48, respectivamente. Los títulos cayeron hasta 953(± 979) y 850(± 563), respectivamente, a las 8 semanas después del refuerzo. No hubo diferencia sustancial observada entre los dos grupos de animales.

- 35 Ensayos para anticuerpo neutralizante revelaron niveles muy bajos de actividad para el aislado primario usado para la vacuna; solamente un animal se valoró positivo. El aislado primario, un VIH-1 recombinante subtipo AG, fue relativamente resistente a neutralización por muchos otros sueros y anticuerpos monoclonales neutralizantes. La actividad neutralizante del plasma tampoco puntuó para VIH-1-MN (subtipo B), un aislado adaptado a laboratorio contra VIH-1.

40

Materiales y métodos

Inmunógenos de ADN

- 45 Se prepararon construcciones de ADN en el vector de expresión pGA1 (GenBank nº de acceso: AF425297) que incluye el intrón A en el casete promotor y usa el promotor inmediato-temprano de CMV y la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina para expresar ARN (Chapman, B.S. et al. 1991 PNAS USA 19:3979-3986 y Ross, T.M. et al. 2000 Nat. Immunol. 1:127-131). Un VIH-1 recombinante subtipo AG accidental (CRF02_AG) cepa IC0928 se transcribió de forma inversa (GenBank nº de acceso: AY227361 y AY227362), y los fragmentos producidos por PCR del ADN se clonaron en el vector de expresión pGA1 (Ellenberger, D.L. et al. 2002 Virology 302:155-163 y Ellenberger, D. et al. 2004 Virology 319:118-130). La construcción y descripción de pGA1/IC48 (IC48) se ha descrito previamente (Ellenberger, D. et al. 2004 Virology 319:118-130). pGA1/IC1-90 (IC1-90) difiere de IC48 por mutaciones puntuales en gag y pol. En resumen, IC1-90 carece de las mutaciones puntuales introducidas en los genes de zinc gag NC y pol RT como se ha descrito previamente para IC48 (Ellenberger, D. et al. 2004 Virology 319:118-130, Smith, J.M. et al. 2004 AIDS Res. Hum. Retrovir. 20:1335-1347 y Smith, J.M. et al. 2004 AIDS Res. Hum. Retrovir. 20:654-665). IC1-90 e IC48 también difieren en su secuencia de proteasa donde hay dos sustituciones en IC1-90, una sustitución Arg-a-Gly en la posición 70 y sustitución Met-a-Leu en la posición 90. IC48 tiene una sustitución Gly-a-Val en la posición 48 como se ha descrito previamente. Las mutaciones de proteasa se hicieron usando un kit de mutagénesis dirigida al sitio (Stratagene La Jolla, CA) siguiendo el protocolo del fabricante.
- 60 Todas las mutaciones se confirmaron por secuenciación.

Inmunógeno de MVA recombinante

- 65 Se ha descrito anteriormente un MVA recombinante que expresa las regiones gag, pol, y env derivadas de IC0928. En resumen, se construyó con *gag-pol* insertada en la delección III y una env truncada en del II como se ha descrito

previamente para MVA/SHIV89.6 (Earl, P.L. et al. 2002 Virology 294:270-281) con la modificación de que se usó un marcador de GFP transitorio para obtener virus recombinante, similar al GUS transitorio descrito por Wyatt *et al.* (Wyatt, L.S. et al. 2004 AIDS Res. Hum. Retrovir. 20:645-653).

5 Línea celular y transfecciones transitorias

Se mantuvieron células 293T humanas, una línea celular derivada de riñón humano, en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10 %. Se añadieron células 293T a 10^6 células/pocillo de placas de 6 pocillos Costar en 2 ml de medio de crecimiento DMEM y se incubaron durante 24 h a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. Después de 24 h, se mezclaron reactivo LipofectAmine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y ADN plasmídico de acuerdo con el protocolo del fabricante y se añadieron a cada pocillo. Se recogieron los sobrenadantes 24 o 48 h después de la adición de los reactivos de transfección.

15 Purificación de partículas

Después de 24 h de transfección transitoria de células 293T, se recuperaron los sobrenadantes de cultivo, se aclararon por centrifugación a 200 x g durante 5 min, y se depositó 1 ml sobre la parte superior de gradientes de sacarosa al 10-50 %. Se añadieron gradientes de 10 ml que consistían en 2 ml de cada una de las soluciones de sacarosa al 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, y 10 % a tubos de centrifuga ultraclear desde el fondo hasta la parte superior. Los gradientes se centrifugaron a 40.000 rpm durante 16 h en rotor SW41Ti. Se recuperaron fracciones de 1 ml, desde el fondo hasta la parte superior. Se analizaron alícuotas de fracción por ensayo de captura de antígeno p24 de VIH-1.

25 Microscopía electrónica

Se fijaron células 293T transfectadas en la placa multi-pocillo usando 1 ml de glutaraldehído al 2,5 % en tampón cacodilato 0,1 M durante 2 h a 4 °C. Después de tres lavados con el mismo tampón, se añadió tetróxido de osmio al 1,0 % en tampón cacodilato 0,1 M, se incubó durante 1 h, se deshidrató a través de una serie de etanol, y se incrustó en resina Eponate 12. Después de la polimerización de la resina, las células se seccionaron en la superficie, se tiñeron con acetato de uranilo al 4 % en agua y citrato de plomo, y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-7500.

35 Ensayo de captura de antígeno

El ensayo se realizó usando un kit EIA de captura de antígeno de VIH-1 (Coulter, Hialeah, FL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

40 ELISA de Env

Se obtuvo inmunoglobulina humana combinada anti-VIH (nº catálogo 3957) del National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Research and Reference Reagent Program (Rockville, MD). El ELISA de Env se hizo como se ha descrito previamente (Ellenberger, D. et al. 2004 Virology 319:118-130).

45 Macacos y ensayo de inmunogenicidad

Se aleatorizaron dieciséis macacos rhesus (*Macaca mulatta*) adultos jóvenes macho exogámicos de origen indio por peso en dos grupos de vacuna de 8. El grupo IC1-90 recibió 0,6 mg de ADN de IC1-90 y el grupo IC48 recibió 0,6 mg de ADN de IC48 por vía intramuscular (IM) en las semanas 0, 8, y 26. Las inmunizaciones con ADN se suministraron en solución salina tamponada con fosfato con una aguja y jeringa. Se suministró un total de 3 inyecciones en el muslo derecho lateral superior en un volumen de 1 ml/inyección. Quince semanas después de la tercera inmunización con ADN (semana 41), todos los animales recibieron 1 x 10⁸ pfu de un refuerzo con virus vaccinia Ankara modificado (MVA/VIH) IM usando una aguja y jeringa en el mucho derecho lateral superior. La inmunización con MVA se suministró en solución salina tamponada con fosfato en un volumen de 1 ml. Los sitios de inyección se controlaron para reacciones inflamatorias locales.

55 Respuestas humorales

Se realizó análisis de transferencia de Western de lisado de virus completo y VLP purificada en sacarosa como se ha descrito previamente (Sambrook, J. et al. 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). El lisado de virus completo (IC0928) se procesó en gel de gradiente del 4-15 % de SDS y se transfirió a nitrocelulosa. Las muestras de plasma se diluyeron 1:100 en tampón de bloqueo. El anticuerpo secundario fue anti-IgG humana (Fab)-fosfatasa y la detección se completó usando el sistema de sustrato de fosfatasa BCIP/NBT (KPL, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis de VLP purificada en sacarosa se completó usando anticuerpo policlonal de conejo anti-p24 (nº de catálogo 4250) que se obtuvo del National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Research and Reference Reagent Program. Se visualizaron bandas de proteína Gag de VIH-1 usando el reactivo de detección de

transferencia de Western ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) como se describe por el fabricante. Los niveles de expresión se determinaron usando un phosphorimager.

5 Para medir los niveles de IgG contra Env en sueros de monos inmunizados, se recubrieron placas de fondo en U de 96 pocillos con anticuerpo de oveja contra el extremo C-terminal de gp120 seguido de CRF02_AG gp140 purificado como se ha descrito previamente (Earl, P.L. et al. 2002 *Virology* 294:270-281). El tiempo de incubación de las diluciones de suero se aumentó de 2 h a durante una noche para sensibilidad potenciada del ELISA.

10 La neutralización se midió como una función de las reducciones en la expresión del gen indicador de luciferasa después de una única ronda de infección en células TZM-bl. Las células TZM-bl se obtuvieron del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, aportadas por John Kappes y Xiaoyun Wu. En resumen, se incubaron 200 TCID₅₀ de virus con diluciones de factor tres en serie de la muestra de suero por triplicado en un volumen total de 150 µl durante 1 h a 37 °C en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos. Se añadieron células recién tratadas con tripsina (10.000 células en 100 µl de medio de crecimiento que contenía 75 µg/ml de DEAE dextrano) a cada pocillo. Se añadió Indinavir a una concentración final de 1 µM para evitar la replicación en el caso de VIH-1 15 MN. Una serie de pocillos de control recibió células + virus (control de virus) y otra serie recibió células solamente (control de fondo). Después de una incubación de 48 h, se transfirieron 100 µl de células a placas sólidas negras de 96 pocillos (Costar) para las mediciones de luminiscencia usando solución de sustrato Bright Glo como se describe por el proveedor (Promega). Se preparó una reserva de ensayo de virus pseudotipado con gp160 de la cepa de vacuna CRF02_AG por transfección en células 293T y se tituló en células TZM-bl. La reserva de ensayo de VIH-1 20 MN se preparó en células H9.

Combinaciones de péptidos

25 Los péptidos de VIH-1 recombinante subtipo CRF02_AG eran 15meros que solapaban en 11 derivados de la cepa de vacuna. Los péptidos se ensamblaron en combinaciones que contenían aproximadamente 25 péptidos. Los péptidos se disolvieron en DMSO a 50-100 mg/ml y las soluciones de reserva se mantuvieron a -70 °C. Las soluciones de trabajo de péptidos se mantuvieron a -20 °C durante 1 semana.

30 Ensayos de células T

Se hicieron ensayos ELISPOT como se ha descrito previamente (Amara *et al.*, 2001 y Amara *et al.*, 2002), excepto que se incluyeron 2 µg/ml de anticuerpo contra CD28 y CD49d humana (Becton Dickinson, San Jose, CA) en las incubaciones (Waldrop, S.L. et al. 1998 *J. Immunol.* 161:5284-5295). Se sembraron PBMC purificadas por duplicado 35 en placas de 96 pocillos a 2 x 10⁵ células/pocillo con combinaciones de péptidos usadas a una concentración final de 10 µg/ml para cada péptido. Cuatro pocillos recibieron solamente medio. Las placas se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 36 h, y se contaron las manchas usando un lector ELISPOT. El fondo se estableció a 2x el promedio de los pocillos de control negativo más 10. Este valor de fondo se sustrajo de los recuentos sin procesar de los pocillos de péptido antes de la conversión a 1 millón de PBMC. Sólo los recuentos ELISPOT de dos veces el fondo (>100) se 40 consideraron significativos.

Los ensayos de tinción de citoquinas intracelulares (ICC) para IFN-γ e IL-2 se han descrito previamente (Amara, R.R. et al. 2001 *Science* 292:69-74 y Amara, R.R. et al. 2002 *J. Virol.* 76:6138-6146). Para esos ensayos, se resuspendió un millón de PBMC en 100 µl de RPMI en un tubo de polipropileno de 5 ml y se estimularon con 100 µg/ml de la combinación de péptidos en presencia de anticuerpo anti-CD28 y anti-CD49d a una concentración final de 1 µg/ml. Las células se incubaron a 37 °C, en una incubadora de cultivo tisular a un ángulo de 5° en 100 µl. A las 2 h, se añadieron 900 µl de medio con 10 µg de Brefeldina A y la incubación continuó durante 4 h adicionales. Las células después se tiñeron para CD3, CD8, CD69, IFN-γ, e IL-2, se fijaron con formaldehído al 1 % en PBS, y se capturaron en 24 h en un FACS caliber (Becton Dickinson, San Jose, CA). Se capturaron aproximadamente 150.000 linfocitos 50 para cada muestra. Los datos se analizaron usando el software FloJo (Tree Star, Inc., San Carlos, CA).

Análisis estadístico

55 Se usó el ensayo de Wilcoxon para muestras independientes y el ensayo de rango con signo para la comparación de ensayos de inmunogenicidad de grupos sensibilizados con las dos vacunas de ADN. Se usó un modelo de efectos mixtos usando una regresión lineal de los valores ELISPOT agregados sobre el grupo (IC-48 o IC1-90) y el tiempo con monos como efecto aleatorio. Además, se usó un modelo de regresión lineal de efectos mixtos para ensayar las respuestas de células T CD4 frente a CD8, las respuestas de células T contra Gag frente a Env, y la expresión de IFN-γ e IL-2. 60

Aunque la presente invención se ha descrito en algún detalle con fines de claridad y comprensión, un especialista en la técnica apreciará que pueden hacerse diversos cambios en forma y detalle sin alejarse del verdadero alcance de la invención definida en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un virus MVA recombinante que expresa un gen *env*, *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo para la producción de un antígeno Env, Gag-Pol de VIH por expresión desde dicho virus MVA recombinante, en donde se modifica dicho gen *env* de VIH para codificar una proteína Env de VIH compuesta de gp120 y el dominio transmembrana y ectodominio de gp41 pero que carece de parte o todo el dominio citoplasmático de gp41, y un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- 5 en donde dicho gen *env*, *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo se toman del clado AG y dicho gen *env* de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 12, y dicho gen *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 13, y en donde el gen *pol* codifica una asparagina en el aminoácido 185 de la transcriptasa inversa, una treonina en el aminoácido 266 de la transcriptasa inversa y una glutamina en el aminoácido 478 de la transcriptasa inversa;
- 10 o dicho gen *env*, *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo se toman del clado B y dicho gen *env* de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 23, y dicho gen *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 24, y en donde el gen *pol* codifica una asparagina en el aminoácido 185 de la transcriptasa inversa, una treonina en el aminoácido 266 de la transcriptasa inversa y una glutamina en el aminoácido 478 de la transcriptasa inversa;
- 15 o dicho gen *env*, *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo se toman del clado C y dicho gen *env* de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 39, y dicho gen *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 40, y en donde el gen *pol* codifica una asparagina en el aminoácido 185 de la transcriptasa inversa, una treonina en el aminoácido 266 de la transcriptasa inversa y una glutamina en el aminoácido 478 de la transcriptasa inversa;
- 20 en donde dicho gen *env* se inserta en la delección II del virus MVA y dicho gen *gag-pol* se inserta en la delección III del virus MVA; y en donde dicho gen *env* y dicho gen *gag-pol* están bajo el control del promotor mH5.
- 25 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho gen *env*, *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo se toman del clado AG y dicho gen *env* de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 12, y dicho gen *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 13 y en donde el gen *pol* codifica una asparagina en el aminoácido 185 de la transcriptasa inversa, una treonina en el aminoácido 266 de la transcriptasa inversa y una glutamina en el aminoácido 478 de la transcriptasa inversa.
- 30 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho gen *env*, *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo se toman del clado AG y dicho gen *env* de VIH o gen modificado del mismo es idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 12, y dicho gen *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 13 y en donde el gen *pol* codifica una asparagina en el aminoácido 185 de la transcriptasa inversa, una treonina en el aminoácido 266 de la transcriptasa inversa y una glutamina en el aminoácido 478 de la transcriptasa inversa.
- 35 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho gen *env*, *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo se toman del clado B y dicho gen *env* de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 23, y dicho gen *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 24, y en donde el gen *pol* codifica una asparagina en el aminoácido 185 de la transcriptasa inversa, una treonina en el aminoácido 266 de la transcriptasa inversa y una glutamina en el aminoácido 478 de la transcriptasa inversa.
- 40 45 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho gen *env*, *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo se toman del clado B y dicho gen *env* de VIH o gen modificado del mismo es idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 23, y dicho gen *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo es idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 24.
- 50 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho gen *env*, *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo se toman del clado C y dicho gen *env* de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 39, y dicho gen *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 40; y en donde el gen *pol* codifica una asparagina en el aminoácido 185, una treonina en el aminoácido 266 y una glutamina en el aminoácido 478.
- 55 7. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho gen *env*, *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo se toman del clado C y dicho gen *env* de VIH o gen modificado del mismo es idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 39, y dicho gen *gag-pol* de VIH o gen modificado del mismo es idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 40.
- 60 8. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho virus MVA recombinante expresa adicionalmente un gen adicional de VIH o gen modificado del mismo para la producción de un antígeno de VIH mediante la expresión a partir de dicho virus MVA recombinante, en donde dicho gen adicional de VIH es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu* y *nef*.
- 65

9. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho virus MVA recombinante es MVA 1974/NIH clon 1.
- 5 10. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que una secuencia intermedia entre el extremo del promotor mH5 y el sitio de inicio del gen env, o de gen modificado del mismo, carece de un codón de inicio intermedio.
- 10 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en la que la secuencia intermedia tiene la secuencia de AGCCCGGGACC o AGCCCGGGGATCCTCTAGAGTCGAGCGGCCGCACC.
- 15 12. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el refuerzo de una respuesta inmune de células T CD8+ contra un antígeno Env, Gag-Pol de VIH en un primate, en la que la composición farmacéutica tiene que administrarse al primate, mediante lo cual se refuerza una respuesta inmune de células T CD8+ contra el antígeno previamente sensibilizado en el primate.
- 20 13. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en la inducción de una respuesta inmune de células T CD8+ contra un antígeno Env, Gag-Pol de VIH en un primate, en donde la composición farmacéutica tiene que administrarse al primate, mediante la cual se induce una respuesta inmune de células T CD8+ contra el antígeno en el primate.
- 25 14. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en la inducción de una respuesta inmune de células T CD8+ contra un antígeno Env, Gag-Pol de VIH en un primate, en donde se tiene que administrar al primate una composición de sensibilización que comprende un ácido nucleico que codifica dicho antígeno y después tiene que administrarse al primate una composición de refuerzo que comprende la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, mediante lo cual se induce una respuesta inmune de células T CD8+ contra el antígeno.
- 30 15. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde el primate es un ser humano.
- 35 16. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde la administración del virus MVA recombinante es por inyección sin aguja.
- 40 17. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la composición de sensibilización comprende ADN plasmídico que codifica dicho antígeno.
- 45 18. Un método para preparar una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 que comprende preparar un vector de transferencia plasmídico que codifica un gen env, gag-pol de VIH o gen modificado del mismo, en donde se modifica dicho gen env de VIH para codificar una proteína Env de VIH compuesta de gp120 y el dominio transmembrana y ectodominio de gp41 pero que carece de parte o todo el dominio citoplasmático de gp41, en donde dicho gen env, gag-pol de VIH o gen modificado del mismo se toma del clado AG y dicho gen env de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 12, y dicho gen gag-pol de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 13, y en donde el gen pol codifica una asparagina en el aminoácido 185 de la transcriptasa inversa, una treonina en el aminoácido 266 de la transcriptasa inversa y una glutamina en el aminoácido 478 de la transcriptasa inversa;
- 50 o dicho gen env, gag-pol de VIH o gen modificado del mismo se toman del clado B y dicho gen env de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 23, y dicho gen gag-pol de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 24, y en donde el gen pol codifica una asparagina en el aminoácido 185 de la transcriptasa inversa, una treonina en el aminoácido 266 de la transcriptasa inversa y una glutamina en el aminoácido 478 de la transcriptasa inversa;
- 55 o dicho gen env, gag-pol de VIH o gen modificado del mismo se toman del clado C y dicho gen env de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 39, y dicho gen gag-pol de VIH o gen modificado del mismo es al menos un 97 % idéntico a la secuencia expuesta en la Figura 40, y en donde el gen pol codifica una asparagina en el aminoácido 185 de la transcriptasa inversa, una treonina en el aminoácido 266 de la transcriptasa inversa y una glutamina en el aminoácido 478 de la transcriptasa inversa;
- y recombinar dicho vector de transferencia plasmídico con un virus MVA definido en la reivindicación 1 para producir una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

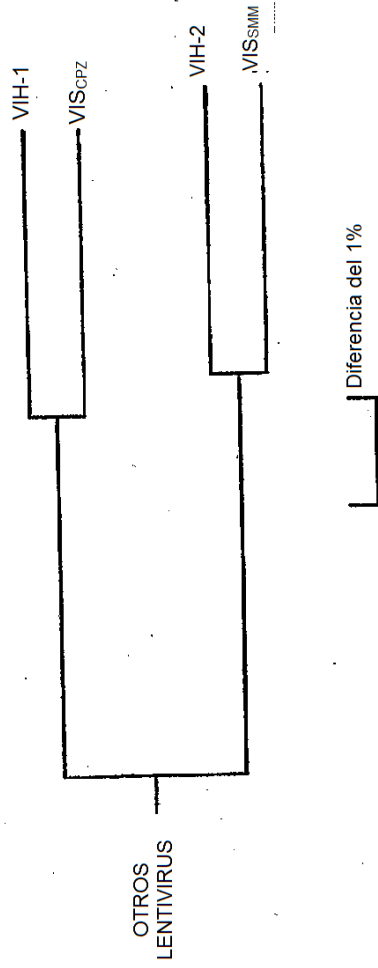


FIG. 1

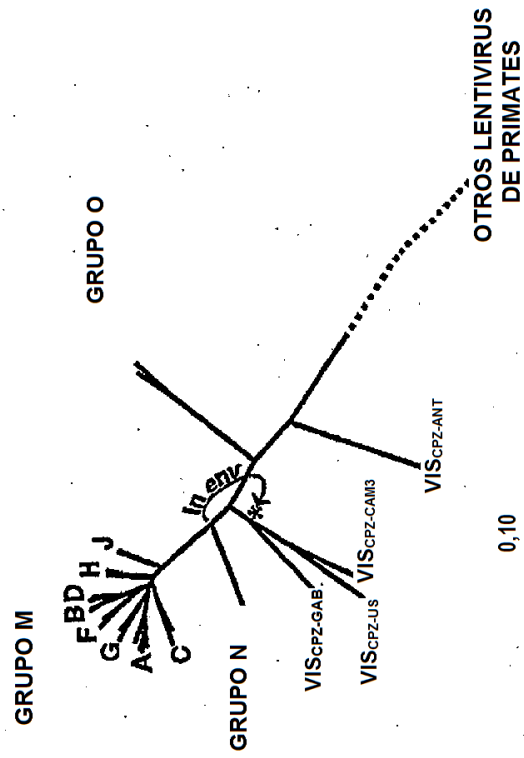


FIG. 2

Receptor de quimioquinas usado	Replicación en PBMC	Replicación en macrófagos	Replicación en línea de células T	Fenotipo replicativo	Fenotipo inductor de sincitios
X4	+	-	+	Rápido/alto	++
R5	+	+	-	Lento/bajo	-
R5/X4	+	+	+	Rápido/alto	+

FIG. 3

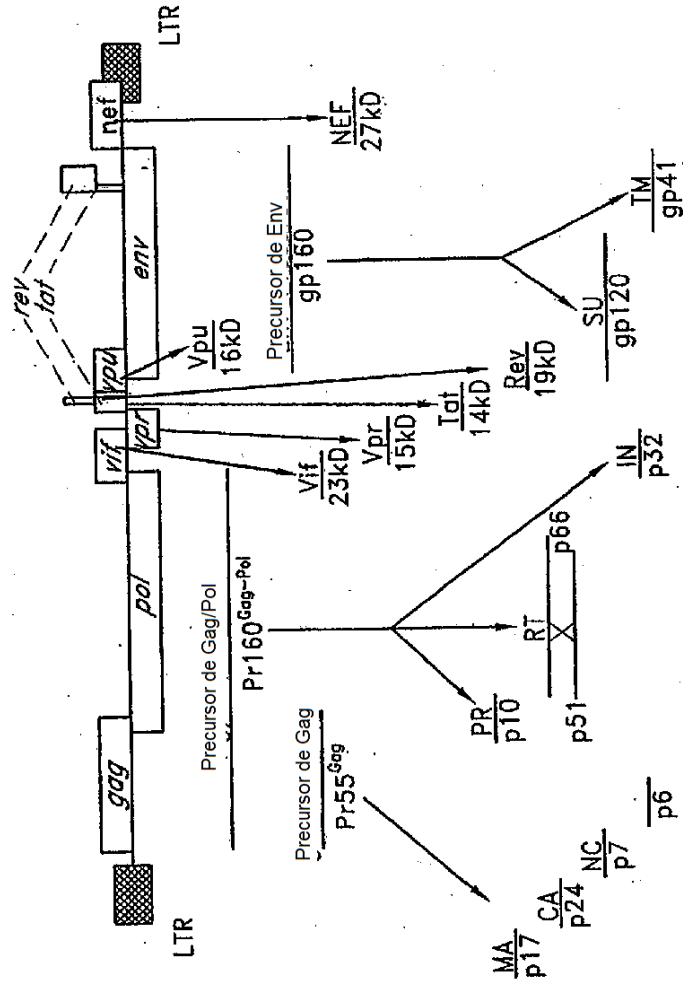


FIG. 4

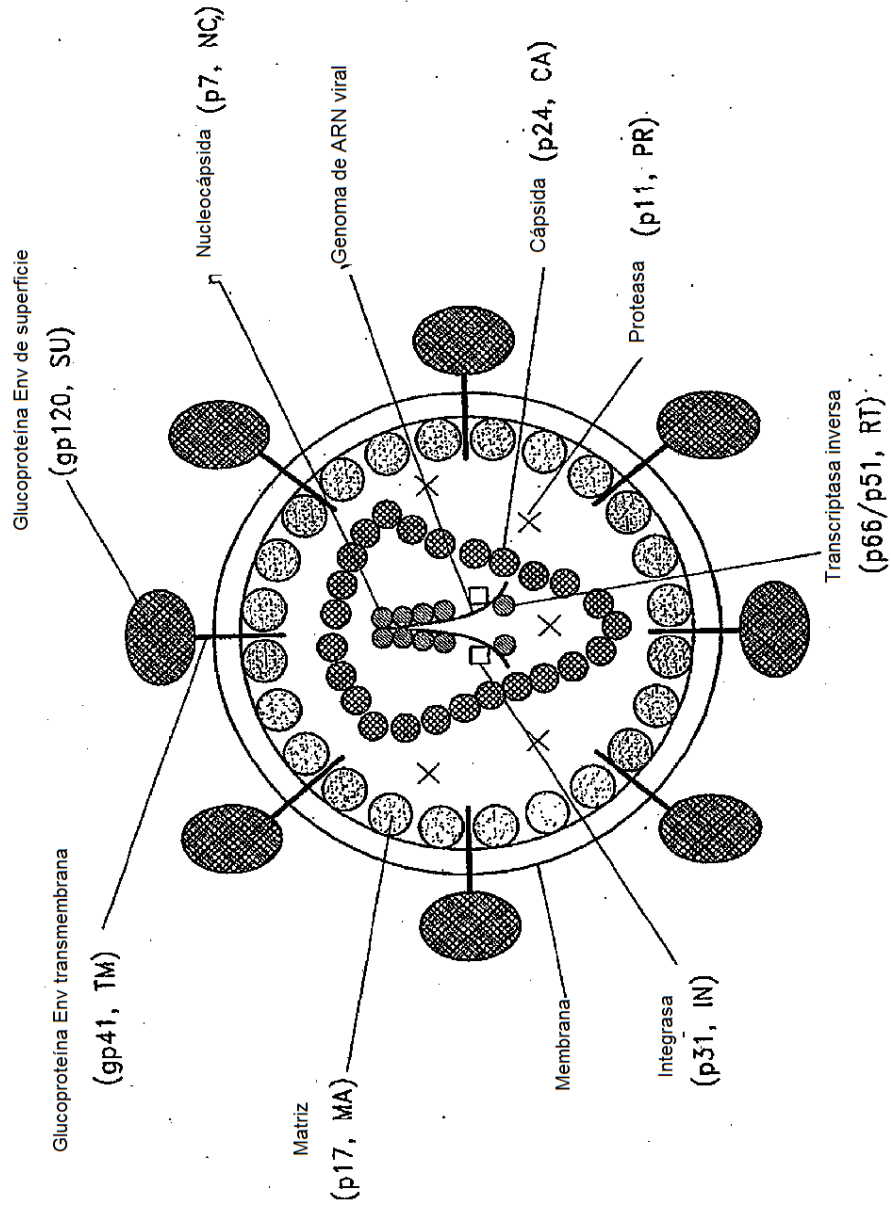


FIG. 5

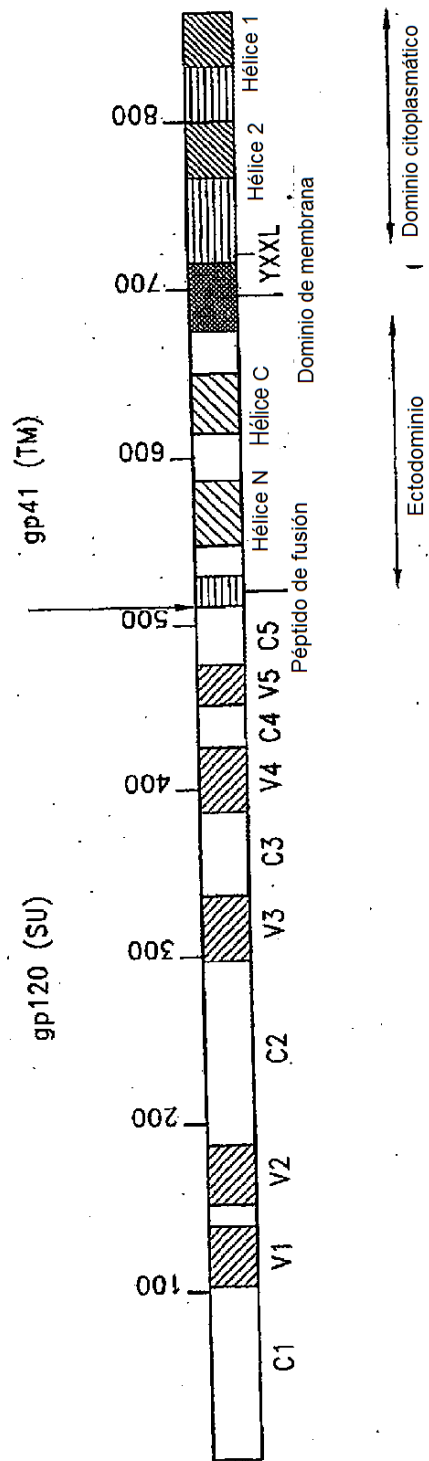


FIG. 6

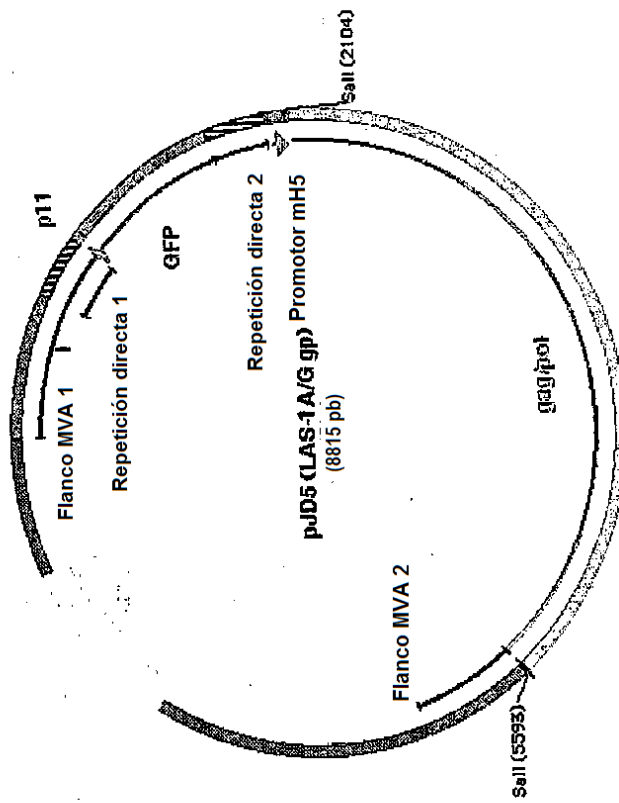


Figura 7

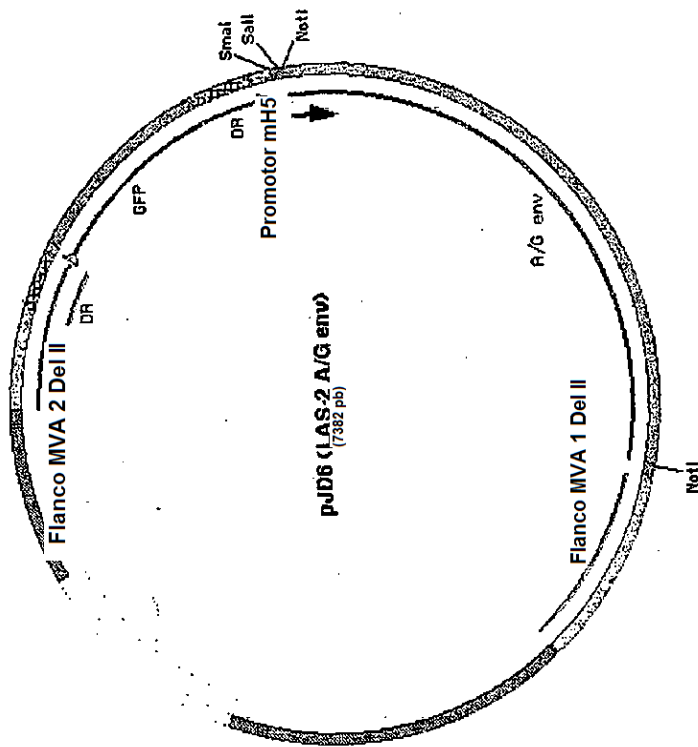


Figura 8

Construcción de MVA 65A/G recombinante
(todos los pasos en SPF CEF primarios o secundarios)

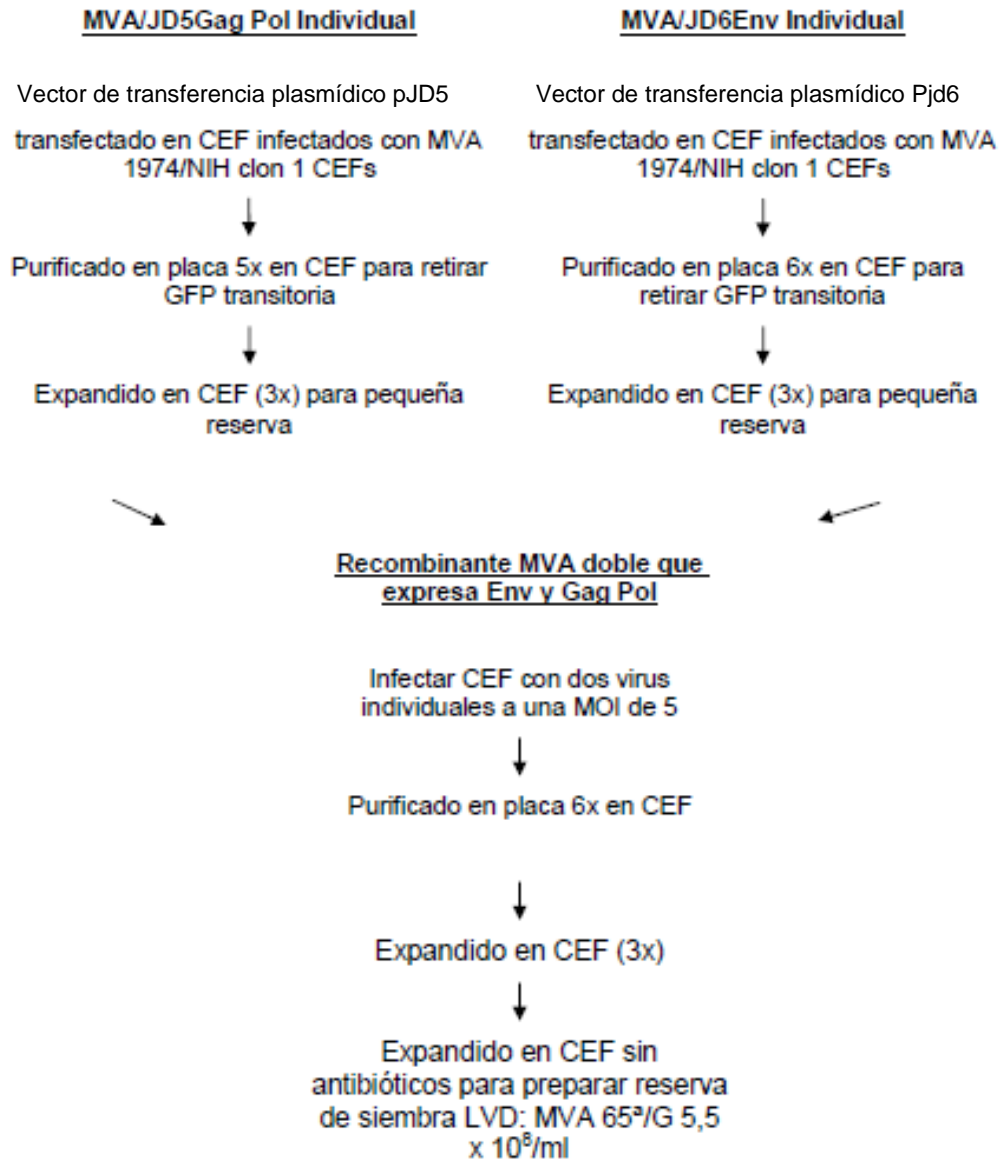


Figura 9

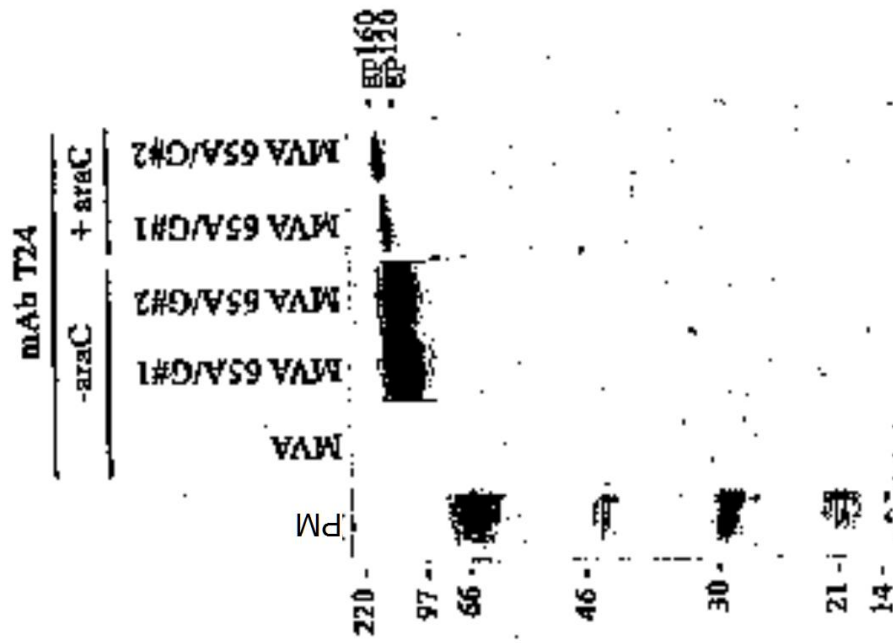


Figura 10

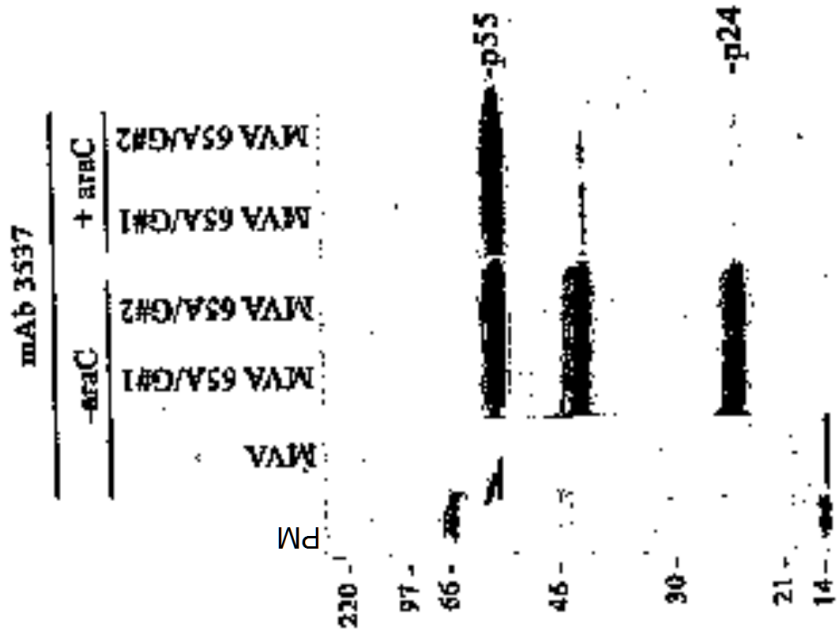


Figure 11

Secuencia de MVA 65A/G Env

ATGAGAGTGATGGGGATACAGAAGAATTATCCACTCTTATGGAGAGGGGGTATGACAA
 TATTTGGTTAATGATGATTTGTAATGCTGAAAAGTTGTGGGTCACAGTCTACTATGGG
 GTACCTGTGTGGAGAGACGCAGAGACCACCCTATTCTGTGCATCAGATGCTAAAGCAT
 ATGACAAAAGAAGCACACAATGTCTGGGCTACGCATGCCTGCGTACCCACAGACCCTGA
 CCCACAAGAATTACCTTTGGTAAATGTAACAGAAGAGTTTAAACATGTGGAAAAAATAAT
 ATGGTAGAACAGATGCATGAAGATATAATTAGTCTATGGGACCAAAGCTTAAAGCCAT
 GTGTACAGCTAACCCCTCTCTGCGTTACTTTAGGGTGTGCTGACGCTCAAACGTCACC
 GACACCAACACCACCATATCTAATGAAATGCAAGGGGAAATAAAAACTGCTCTTTCA
 ATATGACCACAGAATTAAGAGATAAGAAGCAGAAAGTGTATGCACTTTTCTATAGACC
 TGATGTAATAGAAATTAATAAACTAAGATTAACAATAGTAATAGTAGTCAGTATATG
 TTAATAAATTGTAATACCTCAACCATTACACAGACTTGTCCAAAGGTATCCTTTGAGCC
 AATCCCACATATTATTGTGCCCCAGCTGGTTTTGCAATTCTAAAGTGTAAATGATACGG
 AGTTCAGTGGAAAAGGGACATGCAAGAGTGTGACGACAGTACAATGCACACATGGAA
 TCAAGCCAGTAGTATCAACTCAACTGCTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGGAAAGAT
 AGCGATTAGATCTGAGAATATCTCAAACAATGCCAAAACCTATAATAGTACAATTGACT
 GAGCCTGTAGAAATTAATTGTATCAGACCTGGCAACAATACAAGAAAAAGTGTACGCA
 TAGGACCAGGACAAACATTCTATGCAACAGGTGACATAATAGGAGATATAAGACAAG
 CACTGTAAATGTTAGTAAAATAGCATGGGAAGAACTTTACAAAAGGTAGCTGCACA
 ATTAAGGAAGCACTTTCAGAATGCCACAATAAAATTTACTAAACACTCAGGAGGGGAT
 TTAGAAATTACAACACATAGTTTTAATTGTGGAGGAGAATTCTTCTATTGCAATACAAC
 AAAGCTGTTAATAGCACTTGAATAAATGATAACTCAAACCTCACAGAGGAAAAGAGA
 AAGGAAAACATAACTCTCCACTGCAGAATAAAGCAAATTGTAATATGTGGCAGAGA
 GTAGGACAAGCAATATATGCCCTCCCATCCAGGAAACATAACTTGTGGATCAAACA
 TTAAGGCTACTATTAACAAGAGATGGAGGGAATAATGGTACAAATGATACTGAGAC
 CTTCAGGCCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATAT
 AAAGTAGTAAAAAATTGAACCACTAGGTGTAGCACCAACCCCTGCAAAAAGAAGAGTG
 GTGGAAAGAGAAAAAAGAGCAGTTGGAATGGGAGCTTTGATCTTTGAGTTCTTAGGAG
 CAGCAGGAAGCACTATGGGCGCGGCTCAATGGCGCTGACGGTACAGGCCAGACAAT
 TATTGTCTGGTATAGTGCAACAGCAGAGCAATCTGCTGAAGGCTATAGAGGCTCAACA
 ACATCTGTTGAGACTCACGGTCTGGGGCATTAAACAGCTCCAGGCAAGAGTCTGGCT
 CTGGAAAGATAACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGGAATTTGGGGCTGCTCTGGAAAC
 TCATTTGCACCACTGCTGTACCTTGAACCTCTAGCTGGAGTAATAAAAAGTTATAATGAC
 ATATGGGATAACATGACCTGGCTGCAATGGGATAAAGAAATTAACAATTACACATACA
 TAATATATAATCTACTTGAAAAATCGCAGAACCAGCAGGAAATTAATGAACAAGACTT
 ATTGGCATTAGACAAGTGGGCAAGTCTGTGGAATTGGTTTGACATAACAAGCTGGCTA
 TGGTATATAAGATTAGGTATAATGATAGTAGGAGGCGTAATAGGCTTAAGAATAATTT
 TTGCTGTGCTTACTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATACTCACCTTTGTCATTCCAG
 ACCCTTGCCACCACCAGAGGGAACCCGACAGGCCCGAAAGAATCGAAGAAGGAGGT
 GCGGAGCAAGACTAA

Figura 12

Secuencia de MVA 65 A/G Gag Pol

ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTGTAAACGGGGGGAAAATTAGATTCATGGGAGAAAATT
 AGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAGATATAGACTAAAACACCTAGTATGGGCAAGC
 AGGGAGCTGGAGAGATTTCGCACTTAACCCTGGCCTATTAGAAACAGCAGAAGGATGTC
 AACAACTAATGGGACAGTTACAACCAGCTCTCAGGACAGGATCAGAAGAGTTTAAATC
 ATTATATAATATAGTAGCAACCCTTTGGTGCGTACATCAAAGAATAGACATAAAAGAC
 ACCCAGGAGGCCTTAGATAAAGTAGAGGAAAAACAAAATAAGAGCAAGCAAAAAGGCA
 CAGCAGGCAGCAGCTGCAACAGCCGCCACAGGAAGCAGCAGCCAAAATTACCCTATA
 GTGCAAAATGCACAAGGGCAAATGTACATCAGTCCATGTCACCTAGGACTTTAAATG
 CATGGGTGAAGGTAATAGAAGAAAAGGCTTTTAGCCCAGAGGTAATACCCATGTTTTTC
 AGCATTATCAGAGGGAGCCACCCACAAGATTTAAATATGATGCTAAACATAGTGGGG
 GGACACCAGGCAGCAATGCAGATGTTAAAAGATACCATCAATGATGAAGCTGCAGAA
 TGGGACAGAGTACATCCAGTACATGCAGGGCCTATTCCACCAGGCCAAATGAGGGAA
 CAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACACTAGTACCCTTCAAGAACAAATAGGATGGA
 TGACAAGTAATCCACCTATCCCAGTGGGAGAAATCTATAAAAGATGGATAGTCCTGGG
 ATAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCATTTTGGACATAAGACAAGGG
 CAAAAGAACCCTTTAGAGATTATGTAGACAGGTTCTTTAAAACCTTGAGAGCTGAAC
 AAGCTACGCAGGAGGTAAAAAAGTGGATGACAGAAAACCTTGTGGTCCAAAATGCGA
 ATCCAGACTGCAAGTCCATTTAAGAGCATTAGGACCAGGGGCTACATTAGAAGAAAT
 GATGACATCATGTCAGGGAGTGGGAGGACCTGGCCATAAAGCAAGGGTTTTGGCTGAG
 GCAATGAGTCAAGTACAACAGACCAATGTAATGATGCAGAGAGGCAATTTTAGAGGCC
 AGAGAATAATAAAGTGTTCAACTGTGGCAAAGAAGGACACCTAGCCAGAAATTGCA
 AGGCTCCTAGAAAGAGAGGGCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAATGAAAG
 ACTGTACTGAAAGACAGGCTAATTTTTAGGGAAAATTTGGCCTTCCACAAGGGGAG
 GCCAGGAAAATTTCCCTCAGAGCAGACCAGAACCAACAGCCCCGCCAGCAGAGAGCTTT
 GGAGTGGGGGAAGAGATACCCTCCTCTCCGAAGCAGGAGCCGAGGGACAAGGGACTA
 TATCCTCCCTTAACTTCCCTCAAATCACTCTTTGGCAACGACCAGTAGTCACAGTAAGA
 ATAGGGGGACAGCCAATAGAAGCCCTATTAGACACAGGAGCAGATGATACAGTATTA
 GAAGAAATAAGTTTTACCAGGAAAATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGAATTGGAGGT
 TTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGATATCTATAGAAATTTGTGGAAAAAGGGCCA
 TAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGACGAAATATGTTGAC
 TCAGATTGGTTGTACTTTAAATTTCCAATTAGTCCTATTGAAACTGTGCCAGTAAAAT
 TAAAGTCAGGAATGGATGGCCAAAGGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAAA
 TAAAAGCATTAAAAGAAATTTGTGCAGAGATGGAAAAGGAAGGAAAAATTTCAAAA
 TTGGGCCTGAAAACCCATACAATACTCCAATATTTGCCATAAAGAAAAAAGATAGTAC
 TAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTAGAGAACTCAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGG
 GAGGTCCAATTAGGAATACCTCATCCTGCGGGATTAAGAAAGAAAAAATCAGTAACAG
 TACTAGATGTGGGGGATGCATATTTTTAGTTCCTTAGATGAAGACTTTAGAAAAATAT
 ACTGCATTCACCATACCTAGTTTAAATAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACA
 ATGTACTCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTTAGGCAAGCATGACAAA
 AATCTTAGAGCCCTTTAGAGCAAAAAATCCAGAGATAGTATCTACCAATATATGAAC
 GATTTATATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAGCAAAAAATAGAGGAGT
 TGAGAGAACATCTATTGAAATGGGGATTTACCACACCAGACAAAAAACATCAGAAAG
 AACCTCCATTTCTTTGGATGGGATATGAACTCCATCCTGACAAATGGACAGTCCAGCCT
 ATACAGCTGCCAGAAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGATATACAAAAATTAGTGGGA
 AACTAAATACCGCAAGTCAGATTTATGCAGGAATTAAAGTAAAGCAATTGTGTAGAC
 TCCTCAGGGGAGCCAAAGCGCTAACAGATGTAGTAACACTGACTGAGGAAGCAGAATT
 AGAATTGGCAGAGAACAGGGAAATTCTAAAAGAACCTGTACATGGAGTATATTATGAC

Figura 13

CCAACAAAAGACTTAGTGGCAGAAATACAGAAACAAGGGCAAGATCAATGGACATAT
CAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTAAAGACAGGAAAATATGCAAAAAGAGG
TCGGCCCACTAATGATGTAAAACAATTAACAGAGGTAGTGCAGAAAATAGCCATAG
AAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACCCCTAAATTTAGACTACCCATACAAAAGAGAAA
CATGGGAAGCATGGTGGATGGAGTATTGGCAGGCTACCTGGATTCTGAATGGGAGTT
TGTC AATACCCCTCCTCTAGTAAAATTATGGTACCAGTTAGAGAAGGACCCCAT AATG
GGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGGGGCAGCTAATAGGGAGACTAAGCTAGGAAAA
GCAGGGTATGTC ACTGACAGAGGAAGACAAAAGGTTGTTCCCTAATTGAGACAACAA
ATCAAAAAGACTCAGTTACATGCAATTCATCTAGCCTTGCAGGATTCAGGATCAGAAGT
AAATATAGTAACAGACTCACAGTATGCATTAGGAATCATT CAGGCACAACCAGACAGG
AGTGAATCAGAGTTAGTCAATCAAATAATAGAGAACTAATAGAAAAGGACAAAGTC
TACCTGTCATGGGTACCAGCACACAAAAGGATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAA
TTAGTCAGTAGTGG AATCAGAAAAGGTA CTATTTTTAGATGGAATAGATAAAGCCCAAG
ATGAACATTAG

Figura 13, continuación

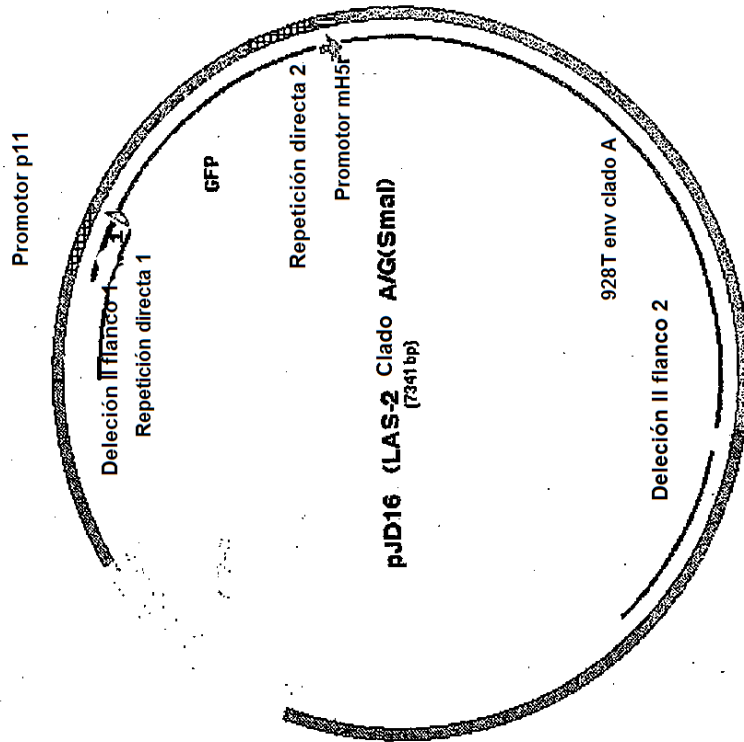


Figura 14

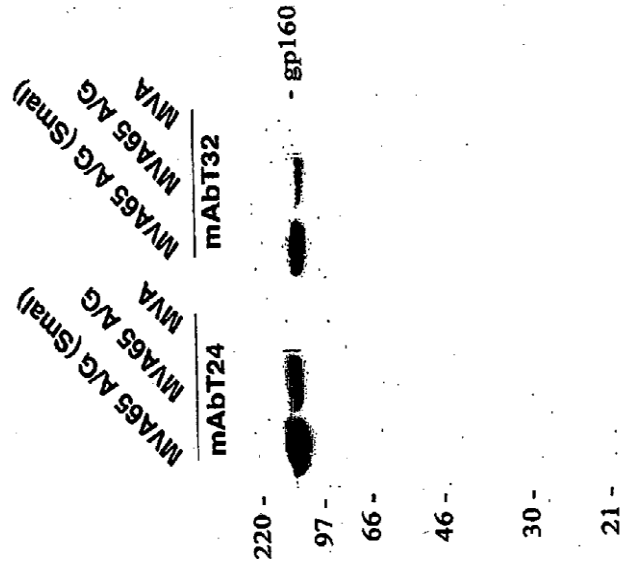


Figura 15

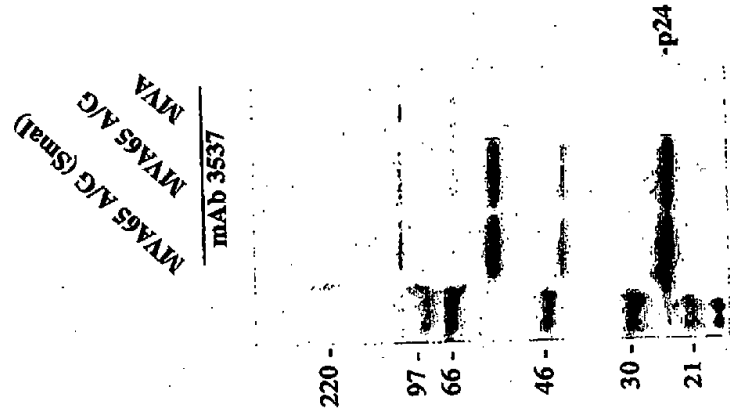


Figura 16

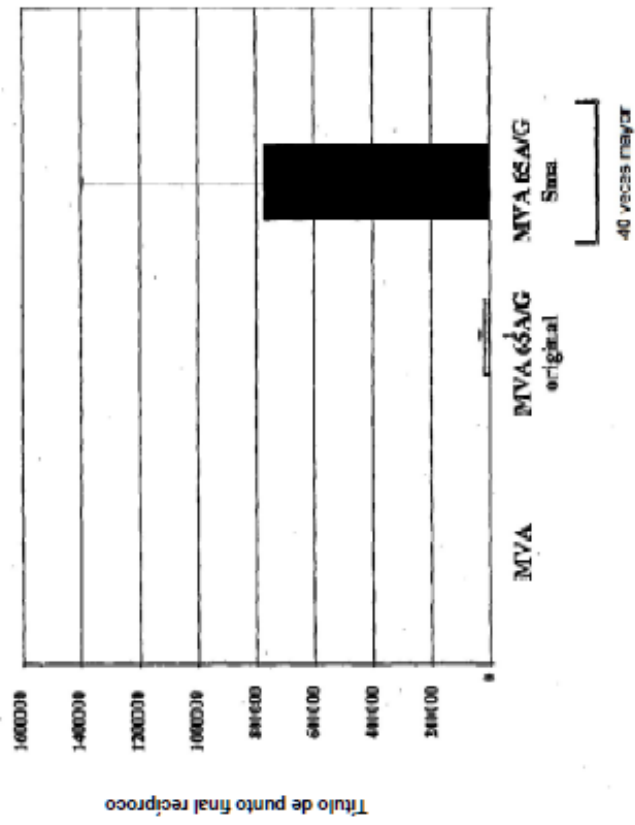


Figura 17

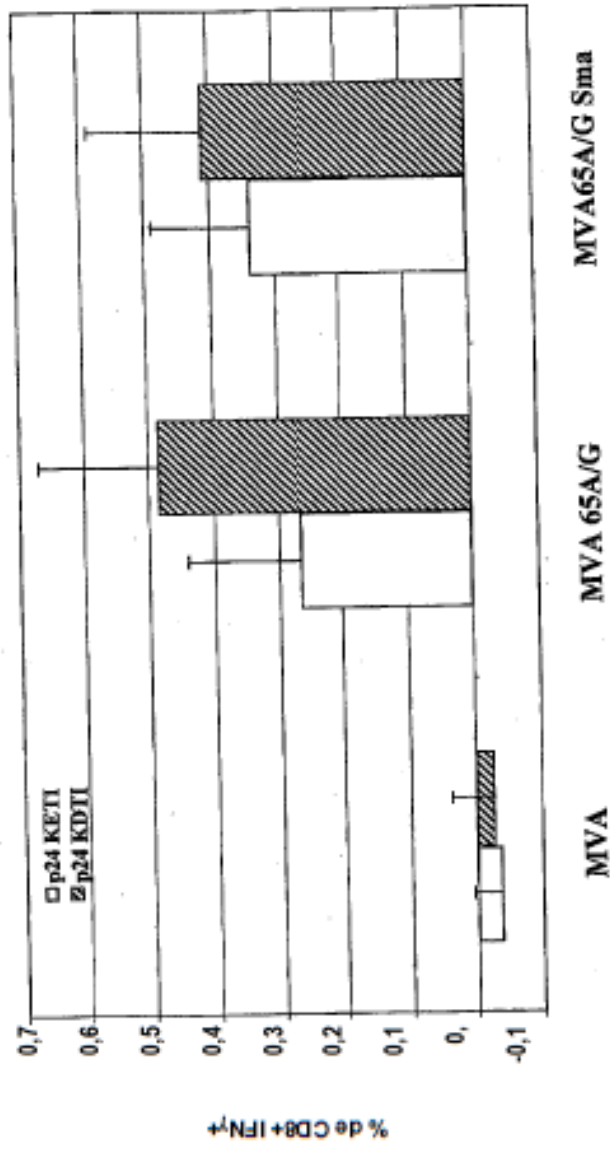


Figura 18

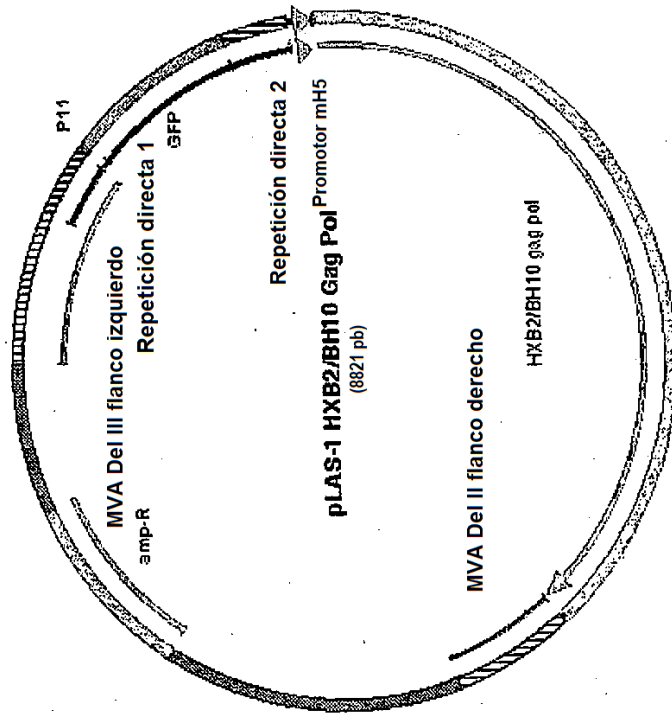


Figura 19

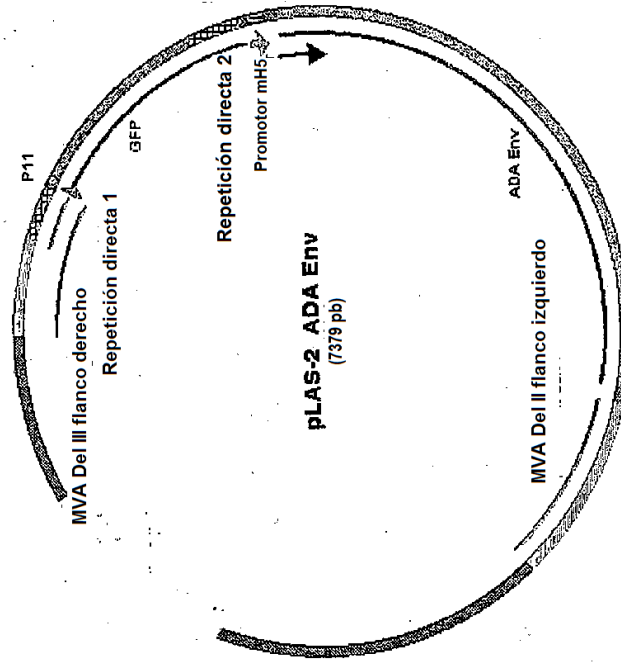
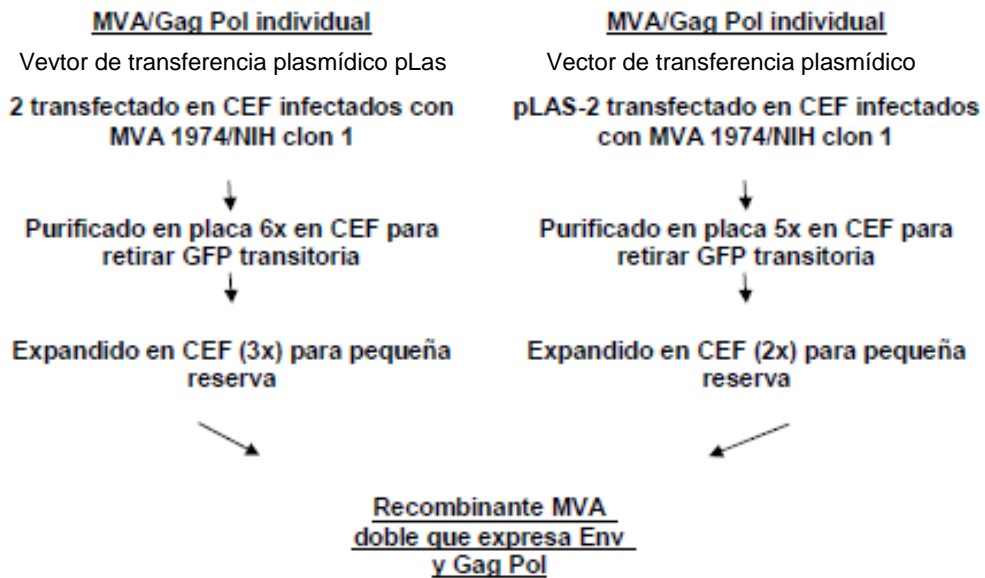


Figura 20

Construcción de MVA 62B recombinante

(todos los pases en SPF CEF primarios o secundarios)



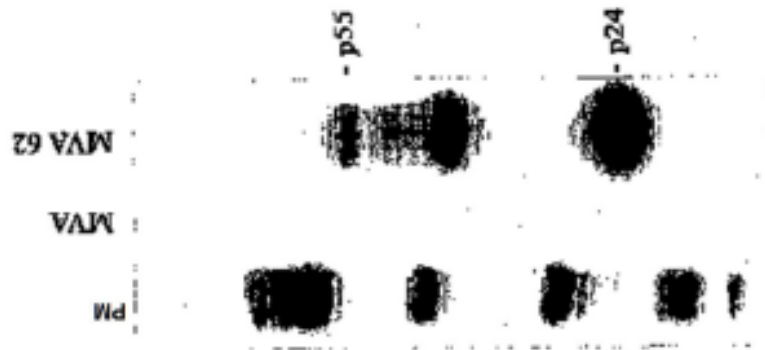
Infecar CEF con dos virus individuales a una MOI de 5

Purificado en placa 5x en CEF

Expandido en CEF (2x)
Expandido en CEF 2x sin antibióticos para preparar reserva de siembra LVD:
MVA/IIIIV 62 $5,5 \times 10^8$ /ml

Figura 21

3537 (mAb contra Gag)



T8 (mAb contra Env)

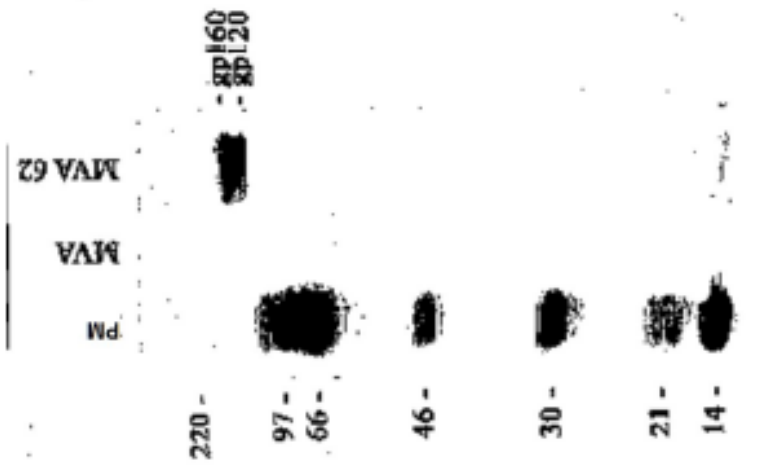


Figura 22

Secuencia de MVA 62B ADA

ATGAAAGTGAAGGGGATCAGGAAGAATTATCAGCACTTGTGGAAATGGGGCAT
 CATGCTCCTTGGGATGTTGATGATCTGTAGTGCTGTAGAAAATTTGTGGGTCAC
 AGTTTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAAGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTGC
 ATCAGATGCTAAAGCATATGATACAGAGGTACATAATGTTTGGGCCACACATG
 CCTGTGTACCCACAGACCCCAACCCACAAGAAGTAGTATTGGAAAATGTGACA
 GAAAATTTTAAACATGTGGAAAAATAACATGGTAGAACAGATGCATGAGGATAT
 AATCAGTTTATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTGTAATAAACCCTCTG
 TGTACTTTAAATTGCACTGATTTGAGGAATGTTACTAATATCAATAATAGTAG
 TGAGGGAATGAGAGGAGAAATAAAAACTGCTCTTTCAATATCACCACAAGCA
 TAAGAGATAAGGTGAAGAAAGACTATGCACTTTTCTATAGACTTGATGTAGTA
 CCAATAGATAATGATAACTAGCTATAGGTTGATAAATTGTAATACCTCAACC
 ATTACACAGGCCTGTCCAAAGGTATCCTTTGAGCCAATTCCCATACATTATTGT
 ACCCCGGCTGGTTTTGCGATTCTAAAGTGTAAGACAAGAAGTTCAATGGAAC
 AGGGCCATGTAAAAATGTCAGCACAGTACAATGTACACATGGAATTAGGCCAG
 TAGTGTCAACTCAACTGCTGTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGAAGAGGTAGTA
 ATTAGATCTAGTAATTTACAGACAATGCAAAAAACATAATAGTACAGTTGAA
 AGAATCTGTAGAAATTAATTGTACAAGACCCAACAACAATACAAGGAAAAAGTA
 TACATATAGGACCAGGAAGAGCATTTTATACAACAGGAGAAATAATAGGAGAT
 AATAAGACAAGCACATTGCAACATTAGTAGAACAATAATGGAATAACACTTTAAA
 TCAAATAGCTACAAAATTAAGAACAATTTGGGAATAATAAAAACAATAGTCT
 TTAATCAATCCTCAGGAGGGGACCCAGAAATTGTAATGCACAGTTTTAATTGTG
 GAGGGGAATTCTTCTACTGTAATTCAACACAACCTGTTAATAGTACTTGGAAAT
 TTAATGGTACTTGGAAATTAACACAATCGAATGGTACTGAAGGAAATGACACT
 ATCACACTCCCATGTAGAATAAAACAAATTATAAATATGTGGCAGGAAGTAGG
 AAAAGCAATGTATGCCCTCCCATCAGAGGACAAATTAGATGCTCATCAAATA
 TTACAGGGCTAATATTAACAAGAGATGGTGGAACTAACAGTAGTGGGTCCGAG
 ATCTTCAGACCTGGGGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATA
 TAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAA
 AAAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAACGATAGGAGCTAT
 GTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATAA
 CGCTGACGGTACAGGCCAGACTATTATTGTCTGGTATAGTGCAACAGCAGAAC
 AATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGG
 GGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAGTCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAGGGA
 TCAACAGCTCCTAGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTCATCTGCACCACTGC
 TGTGCCTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATAAACTCTGGATATGATTTGGGATAA
 CATGACCTGGATGGAGTGGGAAAGAGAAATCGAAAATTACACAGGCTTAATAT
 ACACCTTAATTGAGGAATCGCAGAACCAACAAGAAAAGAATGAACAAGACTT
 ATTAGCATTAGATAAGTGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTGACATATCAAATTG
 GCTGTGGTATGTAAAAATCTTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGATAGGTTAAG
 AATAGTTTTACTGTACTTTCTATAGTAAATAGAGTTAGGCAGGGATACTCACC
 ATTGTCATTTACAGACCCACCTCCAGCCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAG
 GAATCGAAGAAGAAGGTGGAGACAGAGACTAA

Figura 23

Secuencia de MVA 62B Pol

ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGAAA
 AAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTTAAAACATATAGT
 ATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAA
 CATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACA
 GGATCAGAAGAAGCTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTG
 CATCAAAGGATAGAGATAAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGG
 AAGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGG
 ACACAGCAATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGC
 AAATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTA
 GTAGAAGAGAAGGCTTTTCAGCCAGAAGTGATACCCATGTTTTTCAGCATTATC
 AGAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGA
 CATCAAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGA
 ATGGGATAGAGTGCATCCAGTGCATGCAGGGCCTATTGCACCAGGCCAGATGA
 GAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAAGTACTAGTACCCTTCAGGAACA
 AATAGGATGGATGACAAATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAATTTATAAAA
 GATGGATAATCCTGGGATTAATAAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCAGC
 ATTCTGGACATAAGACAAGGACCAAAAAGAACCCTTTAGAGACTATGTAGACCG
 GTTCTATAAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAGGAGGTAAAAAATTGGA
 TGACAGAAACCTTGTTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTTAA
 AAGCATTGGGACCAGCGGCTACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGG
 AGTAGGAGGACCCGGCCATAAGGCAAGAGTTTTGGCTGAAGCAATGAGCCAA
 GTAACAAATTCAGCTACCATAATGATGCAGAGAGGCAATTTTAGGAACCAAAG
 AAAGATTGTTAAGTGTTCATTGTGGCAAAGAAGGGCACACAGCCAGAAATT
 GCAGGGCCCCIAGGAAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCA
 AATGAAAGATTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTT
 CCTACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCC
 CCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTCTGGGGTAGAGACAACAACCTCCCCCTCAGAA
 GCAGGAGCCGATAGACAAGGAAGTGTATCCTTTAACTTCCCTCAGATCACTCTT
 TGGCAACGACCCCTCGTCAATAAAGATAGGGGGGCAACTAAAGGAAGCTCT
 ATTAGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTAGAAGAAATGAGTTTGCCAGGAA
 GATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACA
 GTATGATCAGATACTCATAGAAATCTGTGGACATAAAGCTATAGGTACAGTAT
 TAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTG
 GTTGCACTTTTAAATTTCCATTAGCCCTATTGAGACTGTACCAGTAAAATTTAA
 AGCCAGGAATGGATGGCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAA
 AATAAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAAAGGAAGGGAAAATT
 TCAAAAATTGGGCCTGAGAATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAA
 AAAAGACAGTACTAAATGGAGGAAATTAGTAGATTTTCAGAGAAGTAAATAAGA
 GAACTCAAGACTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCCCGCAGGGTTA
 AAAAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTTTCAGT
 TCCCTTAGATGAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAA
 CAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGA

Figura 24

AAGGATCACCAGCAATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTT
 AAAAAACAAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGAACGATTTGTATGT
 AGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAGCTGAGA
 CAACATCTGTTGAGGTGGGGACTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAGA
 ACCTCCATTCCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACA
 GCCTATAGTGCTGCCAGAAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAGT
 TAGTGGGGAAATTGAATACCGCAAGTCAGATTTACCCAGGGATTAAAGTAAGG
 CAATTATGTAACTCCTTAGAGGAACCAAAGCACTAACAGAAGTAATACCACT
 AACAGAAGAAGCAGAGCTAGAACTGGCAGAAAACAGAGAGATTCTAAAAGAA
 CCAGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAGACTTAATAGCAGAAATACA
 GAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAA
 ATCTGAAAACAGGAAAATATGCAAGAATGAGGGGTGCCACACTAATGATGTA
 AAACAATTAACAGAGGCAGTGCAAAAATAACCACAGAAAGCATAGTAATAT
 GGGGAAAGACTCCTAAATTTAACTACCCATACAAAAGGAAACATGGGAAAC
 ATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGTTA
 ATACCCCTCCTTTAGTGAATATGGTACCAGTTAGAGAAAGAACCCATAGTA
 GGAGCAGAAACCTTCTATGTAGATGGGGCAGCTAACAGGGAGACTAAATTAGG
 AAAAGCAGGATATGTTACTAACAAAGGAAGACAAAAGGTTGTCCCCCTAACTA
 ACACAACAATCAGAAAACCTCAGTTACAAGCAATTTATCTAGCTTGCAGGAT
 TCAGGATTAGAAGTAAACATAGTAACAGACTCACAATATGCATTAGGAATCAT
 TCAAGCACAAACCAGATAAAAGTGAATCAGAGTTAGTCAATCAAATAATAGAGC
 AGTTAATAAAAAAGGAAAAGGTCTATCTGGCATGGGTACCAGCACACAAAGG
 AATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAATTAGTCAGTGCTGGAATCAGGAAA
 ATACTATTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGATGAACATTAG

Figura 24, continuación

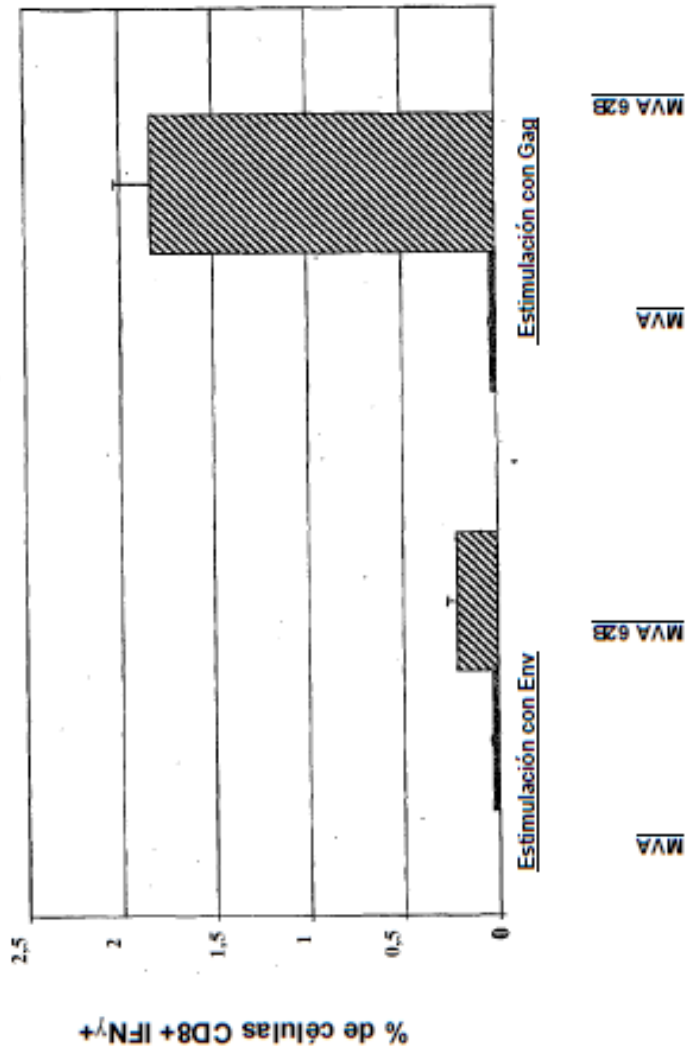


Figura 25

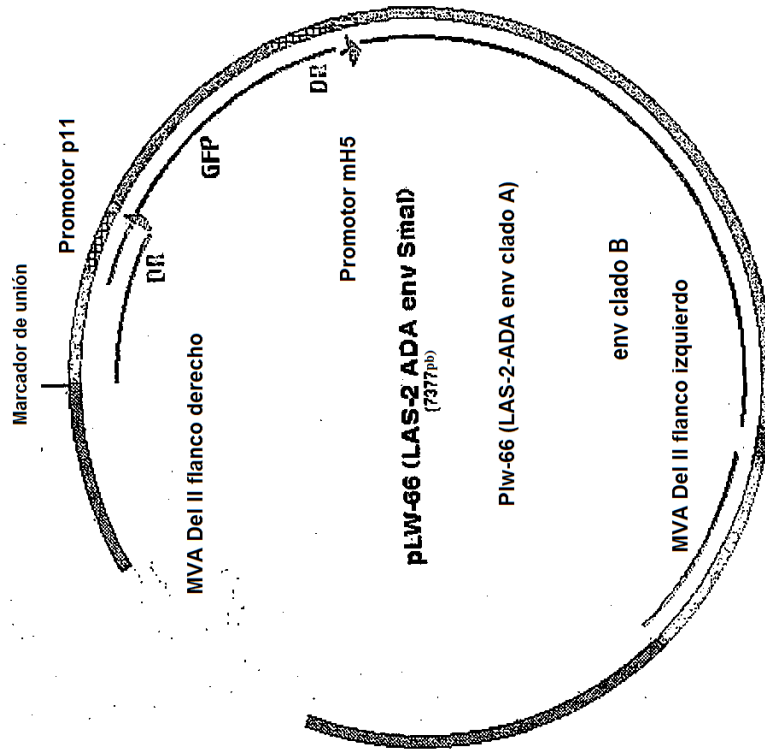


Figura 26

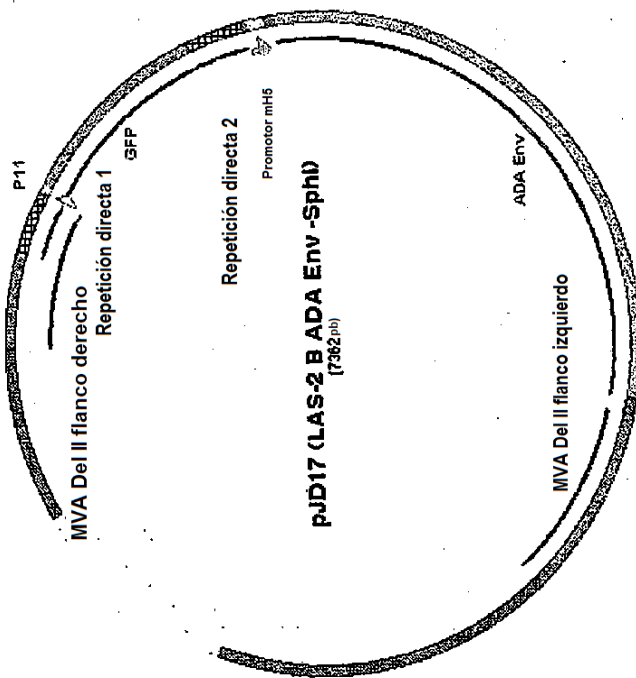


Figura 27

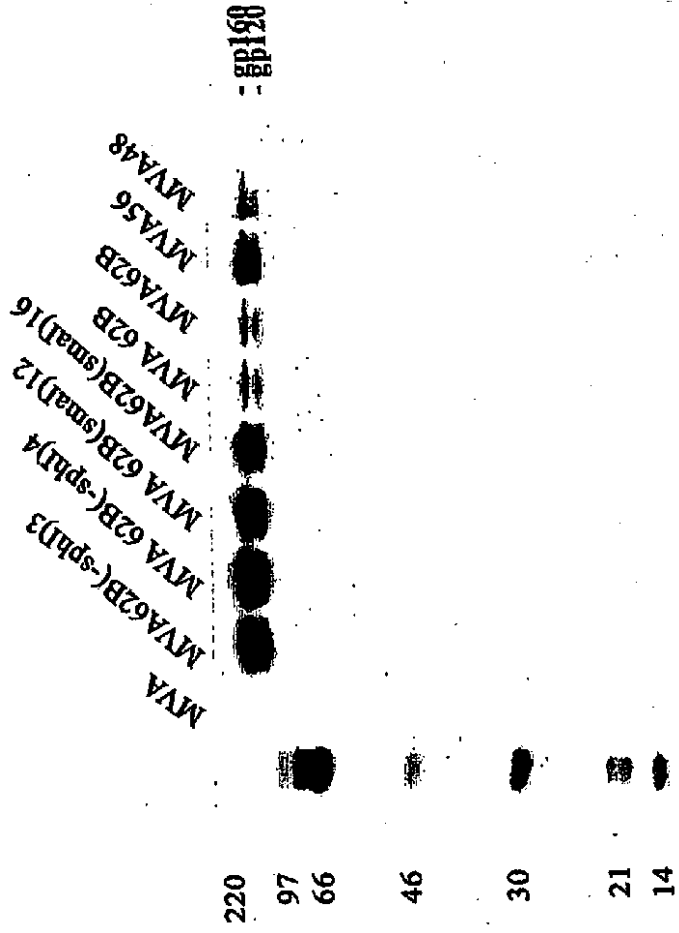


Figura 28

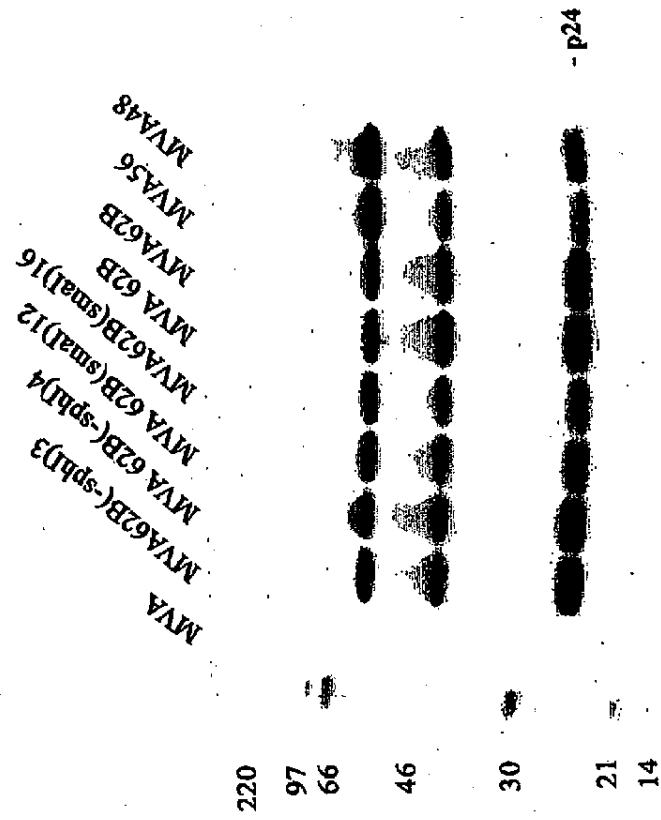
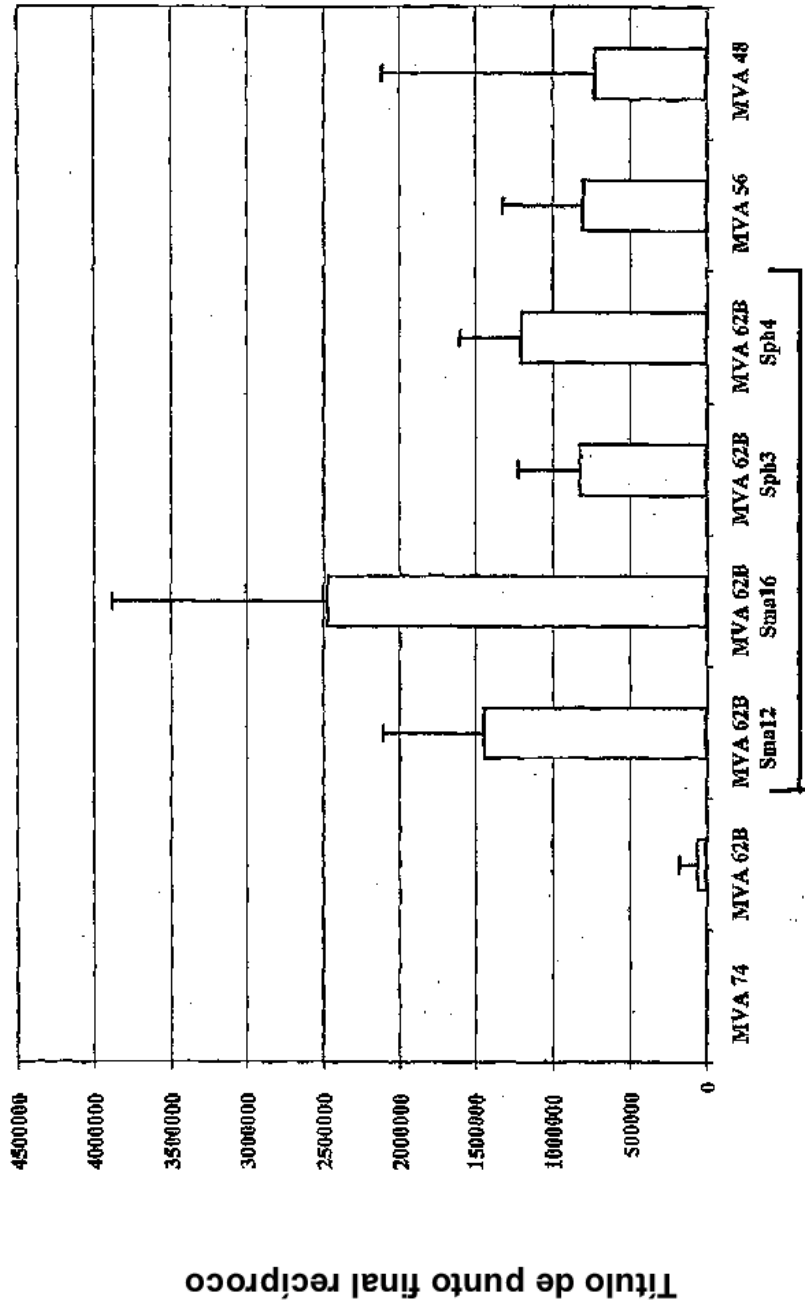


Figura 29



11-32 veces mayor que MVA 62B original

Figura 30

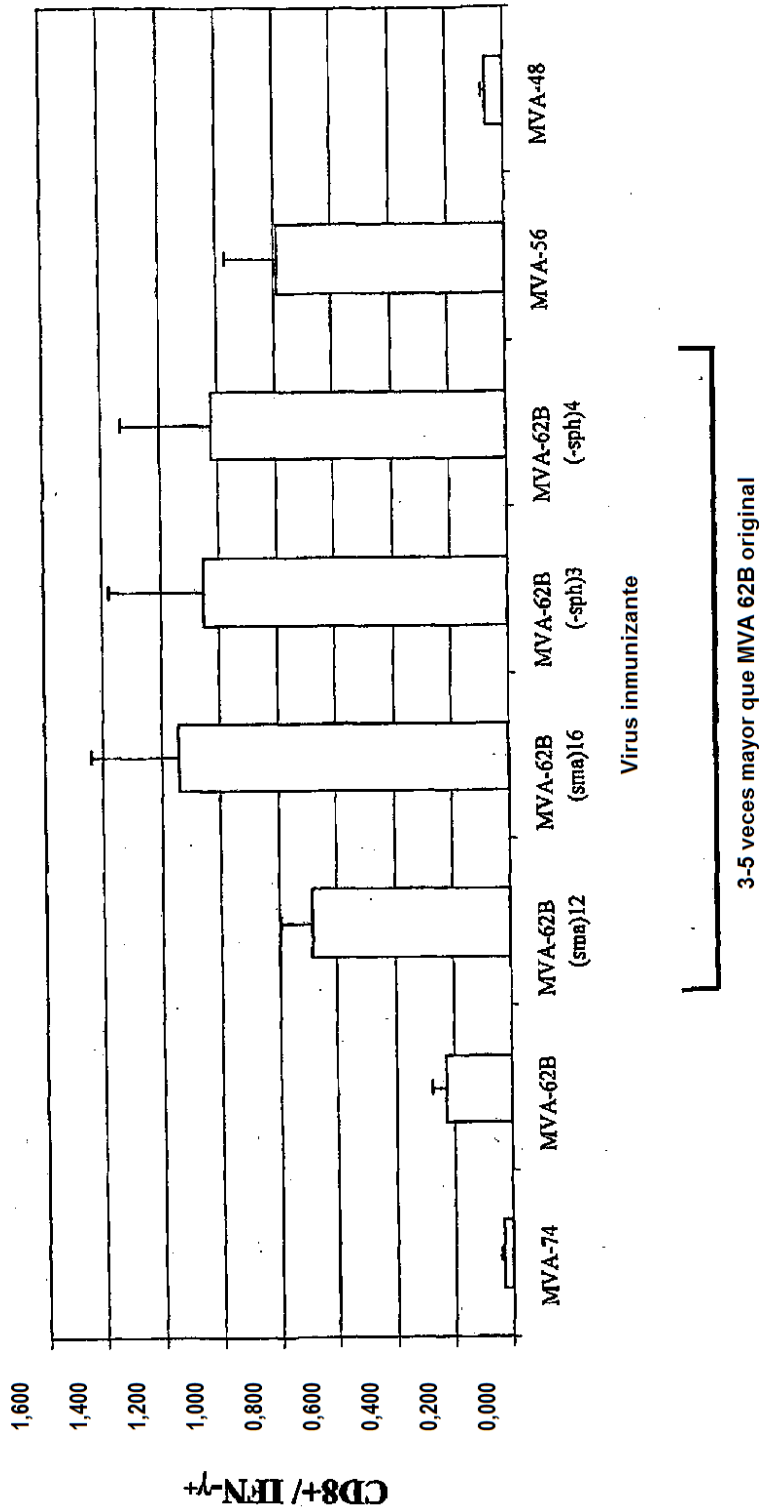


Figura 31

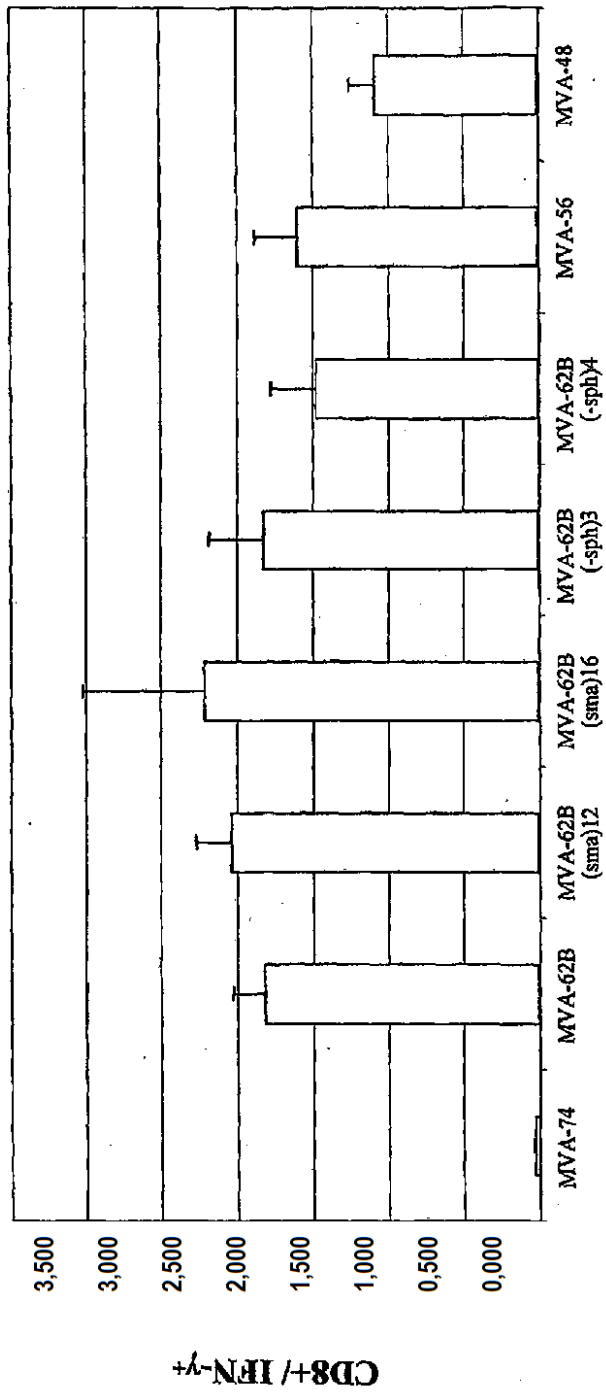


Figura 32

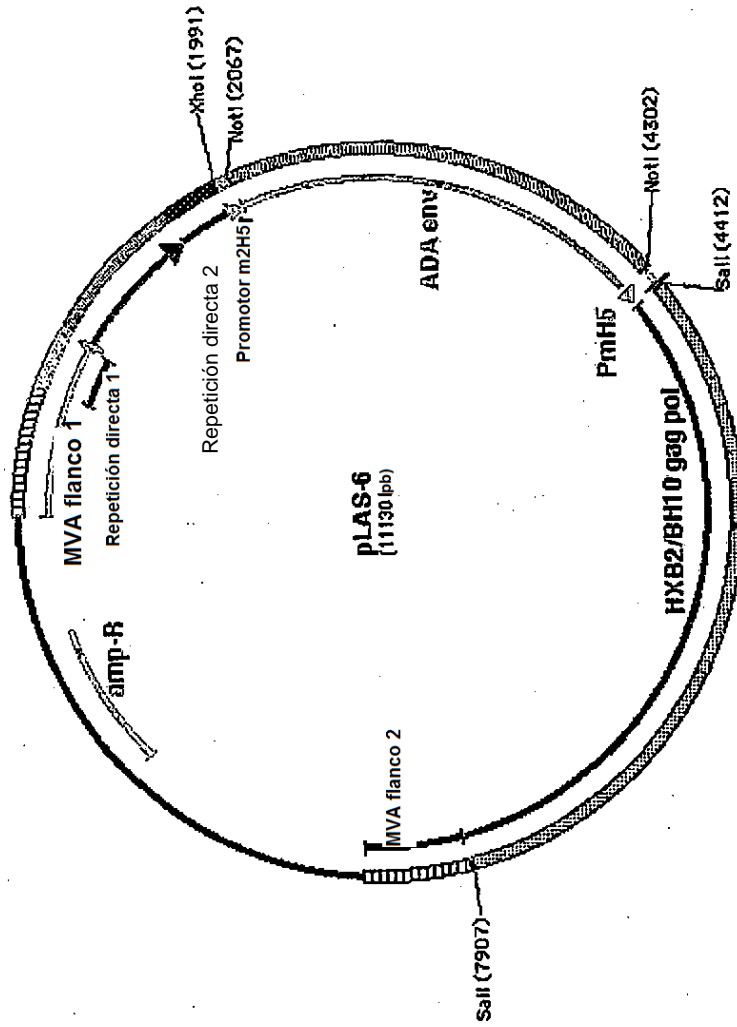


Figura 33

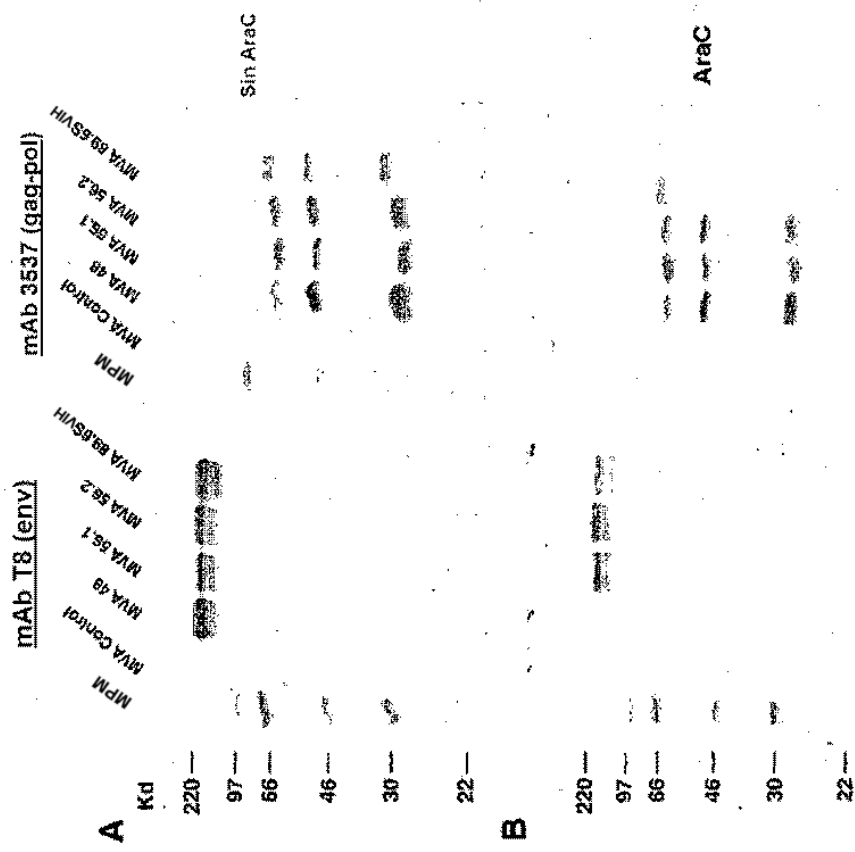


Figura 34

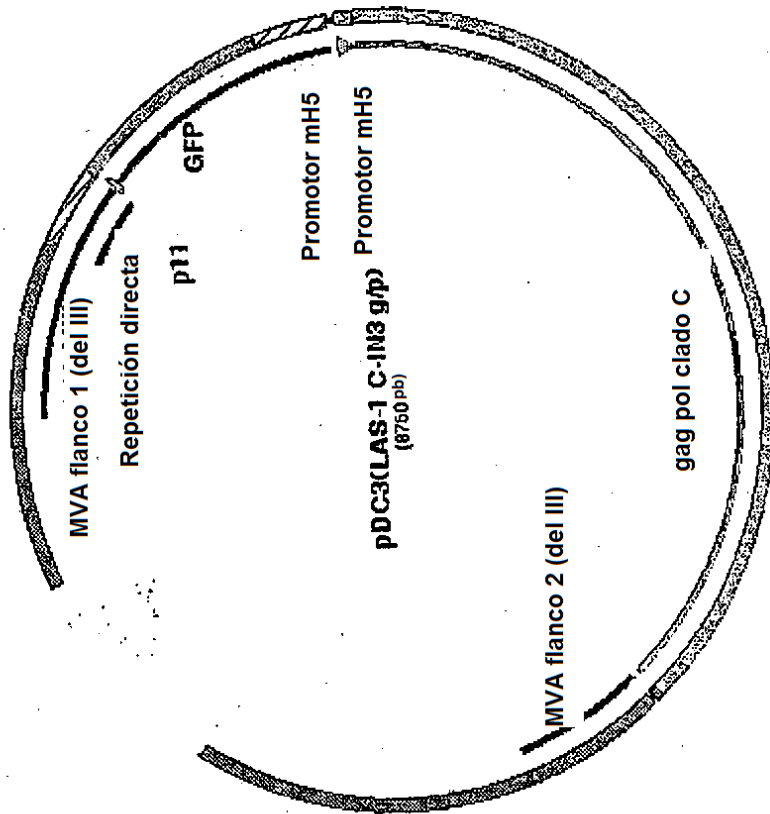


Figura 35

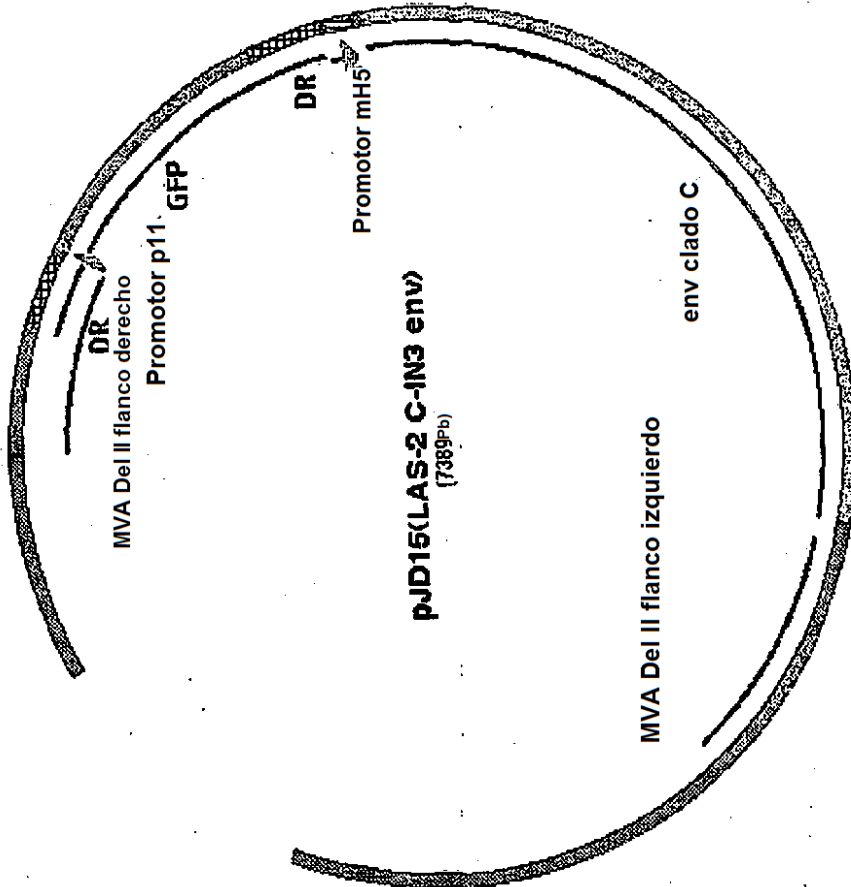


Figura 36

Construcción de MVA/HIV 71 C recombinante

MVA/Gag Pol individual

1. Vector de transferencia plasmídica Pdc3 (LAS-1 gag pol) transfectado en CEF infectados con MVA 1974/NIH clon 1
2. Purificado en placa 6x en CEF para retirar GFP transitoria
3. Expandido en CEF (3x) para pequeña reserva MVA/HIV 68C (LAS-1 Gag Pol) (este virus se usó para preparar el recombinante doble)

MVA doble/ Env y Gag Pol

4. Infectar CEF con MVA/HIV 68C (LAS-1 Gag Pol) a una MOI de 0,05 y transfectar pJD15 (LAS-2 Env)
5. Purificado en placa 7x en CEF
6. Expandido en CEF (2x)
7. Expandido en CEF 2x sin antibióticos para preparar reserva de siembra LVD: MVA/HIV 71C $3,1 \times 10^8/\text{ml}$

Figura 37

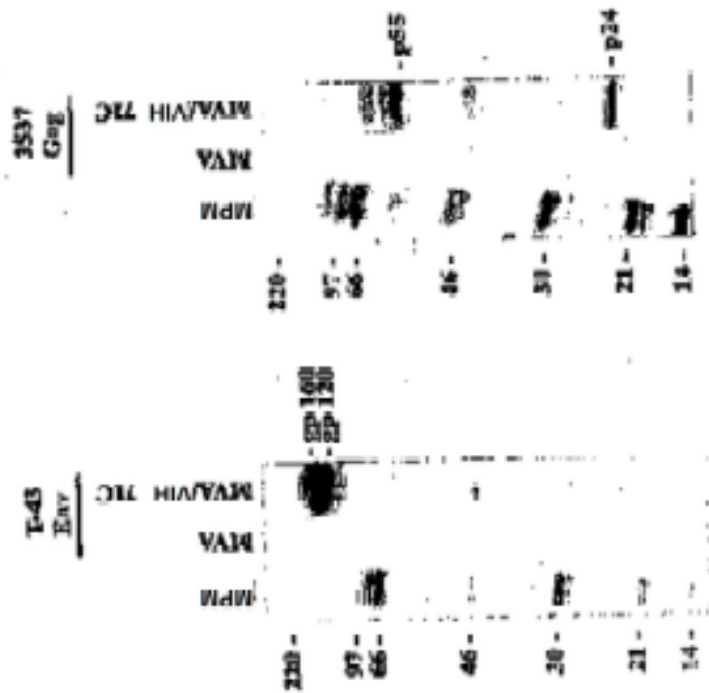


Figura 38

Secuencia de MVA/VIH 71C Env

ATGAGAGTGAAGGGGATACTGAGGAATTATCGACAATGGTGGATATGGGGCATCTTAG
 GCTTTTGGATGTTAATGATTTGTAATGGAACTTGTGGGTACACAGTCTATTATGGGGTA
 CCTGTGTGGAAAGAAGCAAAACTACTCTATTCTGTGCATCAAATGCTAAAGCATATG
 AGAAAGAAGTACATAATGTCTGGGCTACACATGCCTGTGTACCCACAGACCCCAACCC
 ACAAGAAATGGTTTTGGAAAACGTAACAGAAAATTTAACATGTGGAAAAATGACATG
 GTGAATCAGATGCATGAGGATGTAATCAGCTTATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG
 TAAAGTTGACCCCACTCTGTGTCACTTTAGAATGTAGAAAGGTTAATGCTACCCATAAT
 GCTACCAATAATGGGGATGCTACCCATAATGTTACCAATAATGGGCAAGAAATACAAA
 ATTGCTCTTCAATGCAACCACAGAAATAAGAGATAGGAAGCAGAGAGTGTATGCACT
 TTTCTATAGACTTGATATAGTACCCTGATAAGAACAACCTCTAGTAAGAACAACCTCTA
 GTGAGTATTATAGATTAATAAATGTAATACCTCAGCCATAACACAAGCATGTCCAAA
 GGTCAAGTTTTGATCCAATTCCTATACACTATTGTGCTCCAGCTGGTTATGCGATTCTAA
 AGTGTAAACAATAAGACATTCAATGGGACAGGACCATGCAATAATGTCAGCACAGTACA
 ATGTACACATGGAATTAAGCCAGTGGTATCAACTCAGCTATTGTTAAACGGTAGCCTA
 GCAGAAGGAGAGATAATAATTAGATCTGAAAATCTGACAGACAATGTCAAAAACAATA
 ATAGTACATCTTGATCAATCTGTAGAAATTTGTGTGTACAAGACCCAACAATAATACAA
 GAAAAAGTATAAGGATAGGGCCAGGACAAACATTCTATGCAACAGGAGGCATAATAG
 GGAACATACGACAAGCACATTGTAACATTAGTGAAGACAAATGGAATGAAACTTTACA
 AAGGGTGGGTAAAAAATTAGTAGAACACTTCCCTAATAAGACAATAAAAATTGCACCA
 TCCTCAGGAGACCTAGAAATTACAACACATAGCTTTAATTGTAGAGGAGAATTCT
 TCTATTGCAGCACATCAAGACTGTTAATAGTACATACATGCCTAATGATACAAAAAGT
 AAGTCAAACAACCAATCACAAATCCCATGCAGCATAAAAACAATTGTAAACATGTGGC
 AGGAGGTAGGACGAGCAATGTATGCCCTCCCAATTGAAGGAAACATAACCTGTAGATC
 AAATATCACAGGAATACTATTGGTACGTGATGGAGGAGTAGATTCAGAAGATCCAGAA
 AATAATAAGACAGAGACATTCCGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGAACAATTGGAGA
 AGTGAATTATATAAATAAAGCGGCAGAAATTAAGCCATTGGGAGTAGCACCCACTC
 CAGCAAAAAGGAGAGTGGTGGAGAGAGAAAAAAGAGCAGTAGGATTAGGAGCTGTGT
 TCCTTGGATTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATAACGCTGAC
 GGTACAGGCCAGACAATTGTTGCTGGTATAGTGCAACAGCAAAGCAATTTGCTGAGG
 GCTATCGAGGCGAACAGCATCTGTTGCAACTCACGGTCTGGGGCATTAAAGCAGCTCC
 AGACAAGAGTCCTGGCTATCGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGGGCTTTG
 GGGCTGCTCTGGAAAACCTCATCTGCACCACTAATGTACCTTGGAACCTCCAGTTGGAGTA
 ACAAATCTCAAACAGATATTTGGGAAAACATGACCTGGATGCAGTGGGATAAAGAAGT
 TAGTAATTACACAGACACAATATAACAGGTTGCTTGAAGACTCGCAAACCCAGCAGGAA
 AGAAATGAAAAGGATTTATTAGCATTGGACAATTGGAAAAATCTGTGGAATTGGTTTA
 GTATAACAACTGGCTGTGGTATATAAAAATATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGAT
 AGGCTTAAGAATAATTTTTGCTGTGCTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATACT
 CACCTTTGTCGTTTCAGACCCCTACCCCAACCCAAGGGGACCCGACAGGCTCGGAAG
 AATCGAAGAAGAAGGTGGAGGGCAAGACAGAGACTAA

Figura 39

Secuencia de MVA/VIH 71C Gag Pol

ATGGGTGCGAGAGCGTCAATATTAAGAGGGGGAAAATTAGATAAATGGGAAAAGATTAGGTTAAGGCCAG
GGGAAAAGAAACACTATATGCTAAAACACCTAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTGGAAAAGATTTGCACTTAA
CCCTGGCCCTTTTAGAGACATCAGAAGGCTGTAACAATAATAAAAACAGCTACAACCAGCTCTTCAGACAG
GAACAGAGGAACCTTAGGTCATTATTCATGCAGTAGCAACTCTCTATTGTGTACATGCAGACATAGAGGTA
CGAGACACCAAAGAAGCATTAGACAAGATAGAGGAAGAACAACAAAAGTCAGCAAAAACGCAGCAG
GCAAAAAGAGGCTGACAAAAGGTCGTCAAAAATTATCCTATAGTGCAGAATCTTCAAGGGCAAATGGT
ACACCAGGCACTACCTAGAACTTTGAATGCATGGGTAAAAGTAATAGAAGAAAAAGCCTTTAGCCCGG
AGGTAATACCCATGTTACAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGTTAAATACC
GTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAATGTTAAAAGATACCATCAATGAGGAGGCTGCAGAATGGGATA
GATTACATCCAGTACATGCAGGGCCTGTTGCCACAGGCCAAAATGAGAGAACCAAGGGGAAAGTGCATAGC
AGGAACACTAGTAACTTCAGGAACAAAATAGCATGGATGACAAGTAACCCACCTATTCCAGTGGGAGATA
TCTATAAAAGATGGATAATTCTGGGGTTAAATAAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTGTCAGCATTITAGAC
ATAAGACAAGGGCCAAAGGAACCCCTTAGAGATTATGTAGACCGGTTCTTTAAAACCTTTAAGAGCTGAACA
AGCTTCACAAGATGTAAAAAATTGGATGGCAGACACCTTGTTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATTGTAAGA
CCATTTAAGAGCATTAGGACCAGGAGCTACATTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAAGGAGTGGGAGG
ACCTAGCCACAAAGCAAGAGTGTGGCTGAGGCAATGAGCCAAACAGGCAGTACCATAATGATGCAGAGA
AGCAATTTAAAGGCTCTAAAAGAAGCTGTTAAATGCTTCAACTGTGGCAAGGAAGGGCACATAGCTAGAAA
TTGCAGGGCCCTAGGAAAAAAGGCTGTTGGAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAATGAAAGACTGTGCT
GAGAGGCAGGCTAATTTTTAGGGAAAATTTGGCCCTCCCAAGGGGAGGCCAGGGAATTTCCCTCAGAA
CAGGCCAGAGCCAACAGCCCCACCAGCAGAGAGCTTCAGGTTGAGGAGACAACCCCTGCTCCGAAGCAG
GAGCTGAAAGACAGGGAACCCCTAACCTCCCTCAAATCACTCTTTGGCAGCGAOCCTTGTCTCAATAAAA
ATAGGGGGCCAGATAAAGGAGGCTCTTAGACACAGGAGCAGATGATACAGTATTAGAAGAAATGAAT
TGCCAGGAAAATGGAAACCAAAAATGATAGGAGGAATGGAGGTTTTATCAAAGTAAAGACAGTATGATCA
AATACTTATAGAAATTTGTGGAAAAAAGGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCCACACCTGTCAACATAA
TTGGAAGAAATATGCTGACTCAGATTGGATGCACGCTAAATTTCCAATTAGTCCCATTTGAAACTGTACCAG
TAAATTTAAAGCCAGGAATGGATGGCCAAAGGTTAAACAATGGCCATTGACAGAGGAGAAAATAAAAGC
ATTAACAGCAATTTGTGATGAAATGGAGAAGGAAGGAAAAATTACAAAATTTGGCCCTGAAAATCCAT
AACACTCCAATATTCGCCATAAAAAAGAAGGACAGTACTAAGTGGAGAAAATTAGTAGATTTAGAGAACT
TAATAAAAGAAGTCAAGACTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCACACCCAGCAGGGTTAAAAAAGAAA
AAATCAGTGACAGTACTAGATGTGGGGGATGCATATTTTTCAAGTTCCTTAGATGAAAAGCTTTAGGAGGTAT
ACTGCATTCACCATACCTAGTAGAAACAATGAAACACCAGGGATTAGATATCAATATAATGTGCTCCACA
AGGATGAAAAGGATCACCAGCAATATCCAGAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCCTTTAGAGCACAA
AATCCAGAAATAGTCATCTATCAATATATGAATGACTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAAATAGGGCAACA
TAGAGCAAAGATAGAGGAATTAAGAGAACATCTATTAAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAGAAACAT
CAGAAAGAACCCCATTTCTTTGGATGGGGTATGAACTCCATCCTGACAAATGGACAGTACAGCCTATACA
GCTGCCAGAAAAGGAGAGCTGGACTGTCAATGATATACAGAAGTTAGTGGGAAAATTAACACGGCAAGC
CAGATTTACCCAGGGATTAAGTAAGACAACCTTTGTAGACTCCTTAGAGGGGCCAAAGCCTAACAGACAT
AGTACCCTAAGTGAAGAACAGAAATTAGAATTGGCAGAGAACAGGGAAATTTCTAAAAGAACCAGTACAT
GGAGTATATATGACCCCTTCAAAGACTTGATAGCTGAAATACAGAAAACAGGGACATGACCAATGGACATA
TCAAATTTACCAAGAACCATTCAAAAATCTGAAAACAGGGAAAGTATGCAAAAATGAGGACTGCCACACTA
ATGATGTAACCGTTAACAGAGGCAGTGCAAAAAATAGCCTTAGAAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGAT
TCCTAAACTTAGGTTACCCATCCAAAAGAAACATGGGAGACATGGTGGACTGACTATTGGCAAGCCACCT
GGATTCCTGAGTGGGAATTTGTTAATACTCCTCCCTAGTAAAATTTAGTACCAGCTAGAGAAGGAACCC
ATAATAGGAGTAGAACTTTCTATGTAGATGGAGCAGCTAATAGGGAAACCAAAAATAGGAAAAGCAGGGT
ATGTTACTGACAGAGGAAGGCAGAAAATGTTTCTTAAGTAAAACAATAAGAACTCAATTACAA
GCAATTTATCTAGCTTTGCAAGATTCAAGGATCAGAAGTAAACATAGTAACAGACTCACAGTATGCATTAGG
AATTATTCAAGCACAAACAGATAAGAGTGAATCAGGGTTAGTCAACCAAAATAATAGAACAATTAATAAAA
AAGGAAAAGGGTCTACCTGTCATGGGTACCAGCACATAAAGGTATTGGAGGAAATGAACAAGTAGACAAAT
TAGTAAGTAGTGGAAATCAGGAGAGTGCTATAG

Figura 40

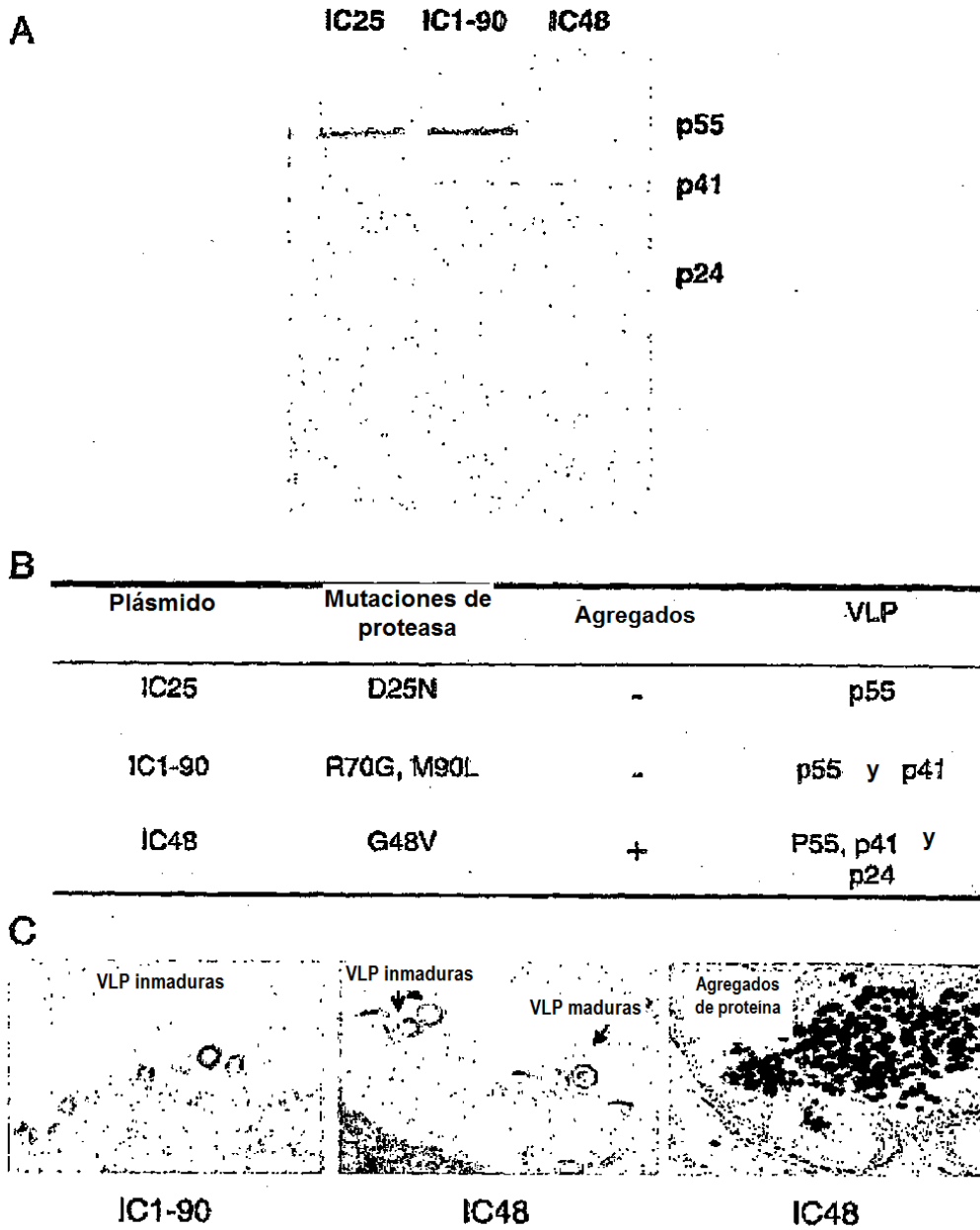


Figura 41

ELISPOT de IFN-γ totales por millón de PBMC

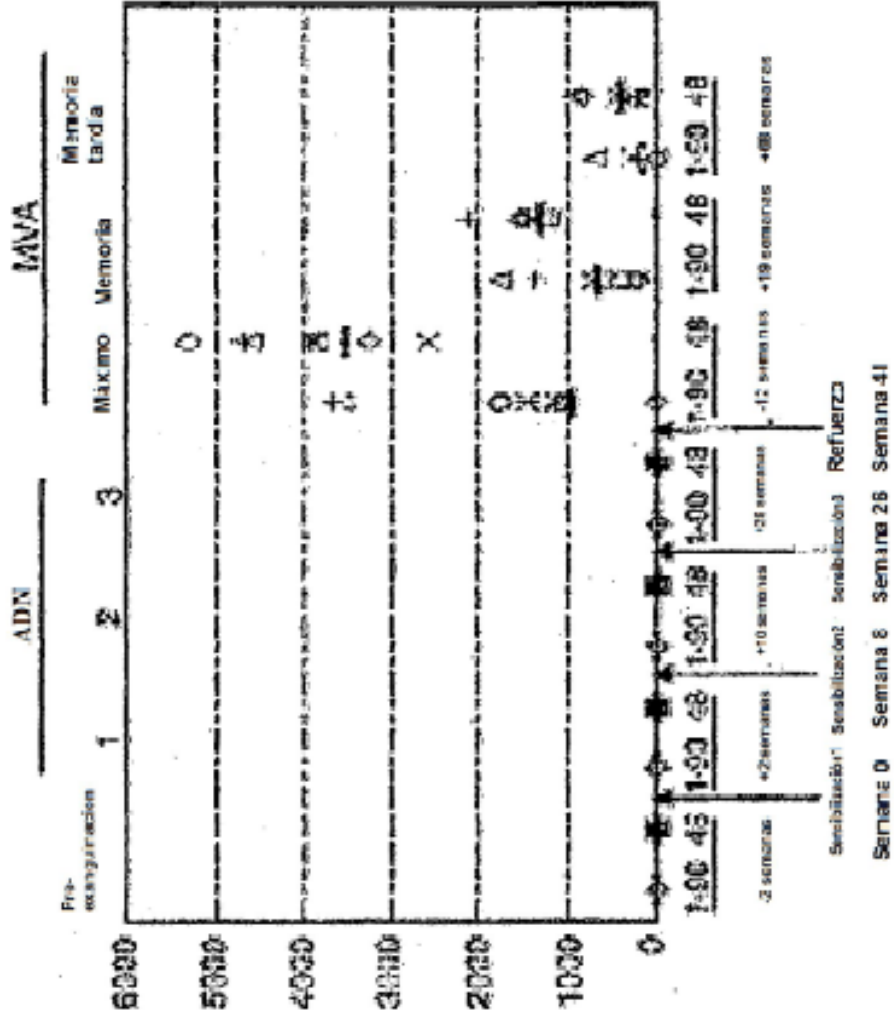


Figura 42

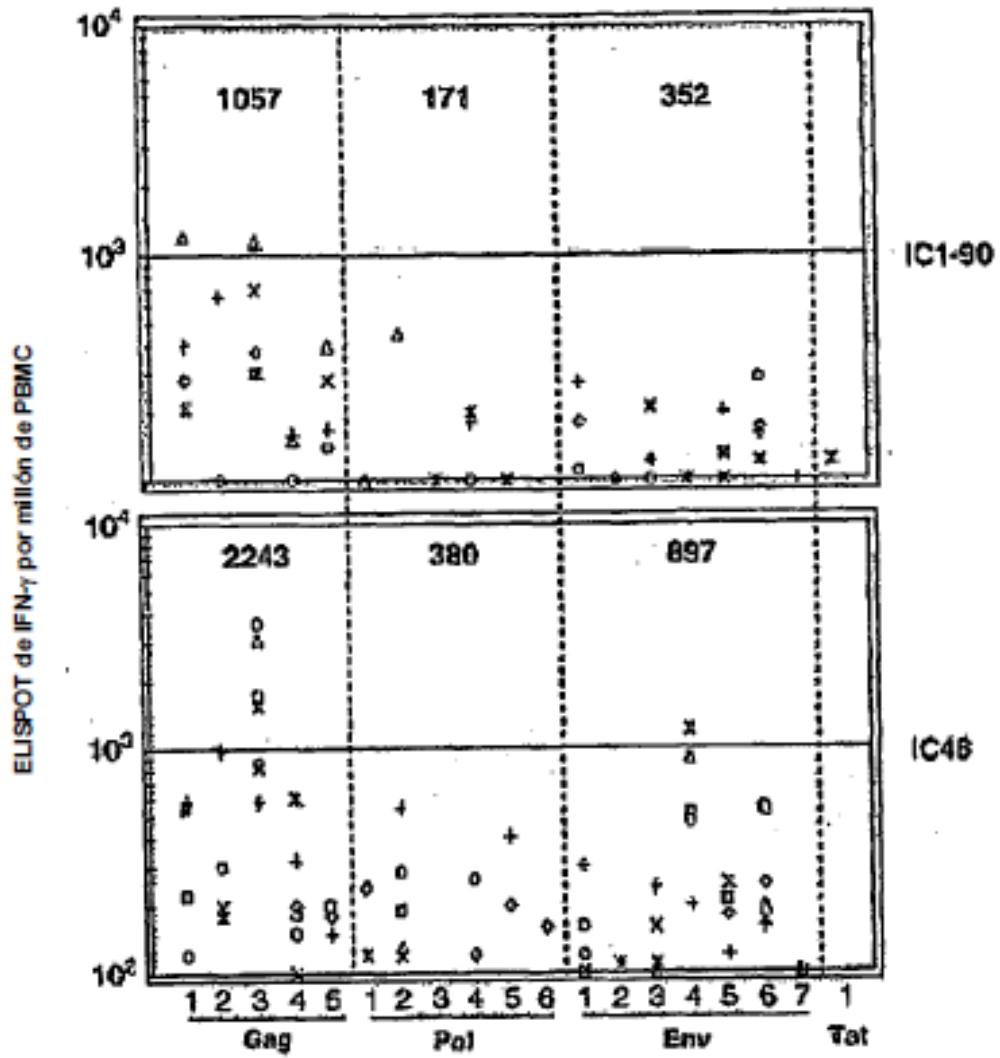


Figura 43

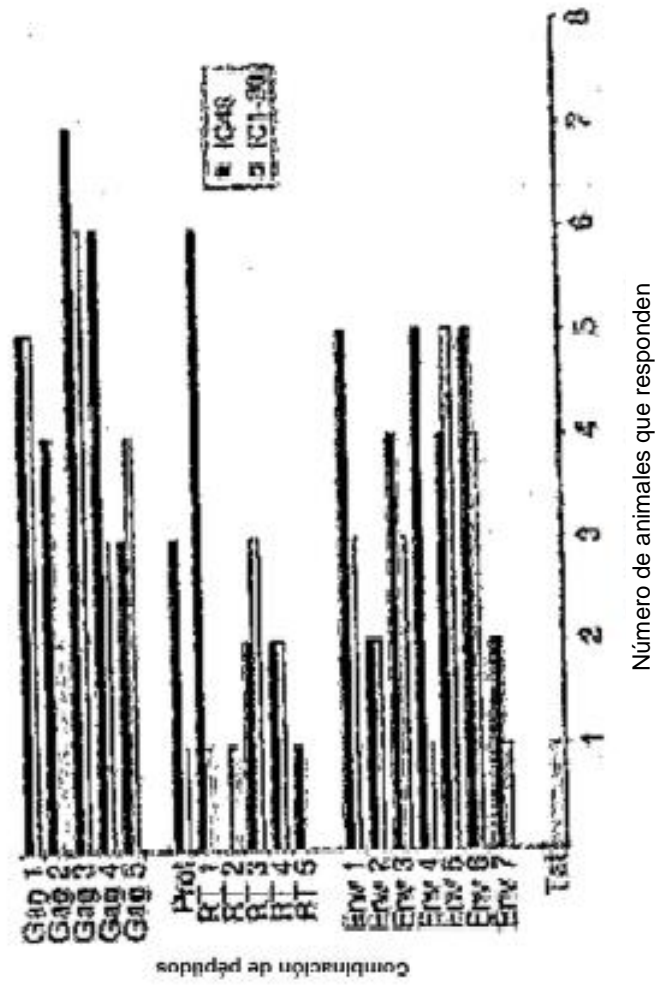


Figura 44

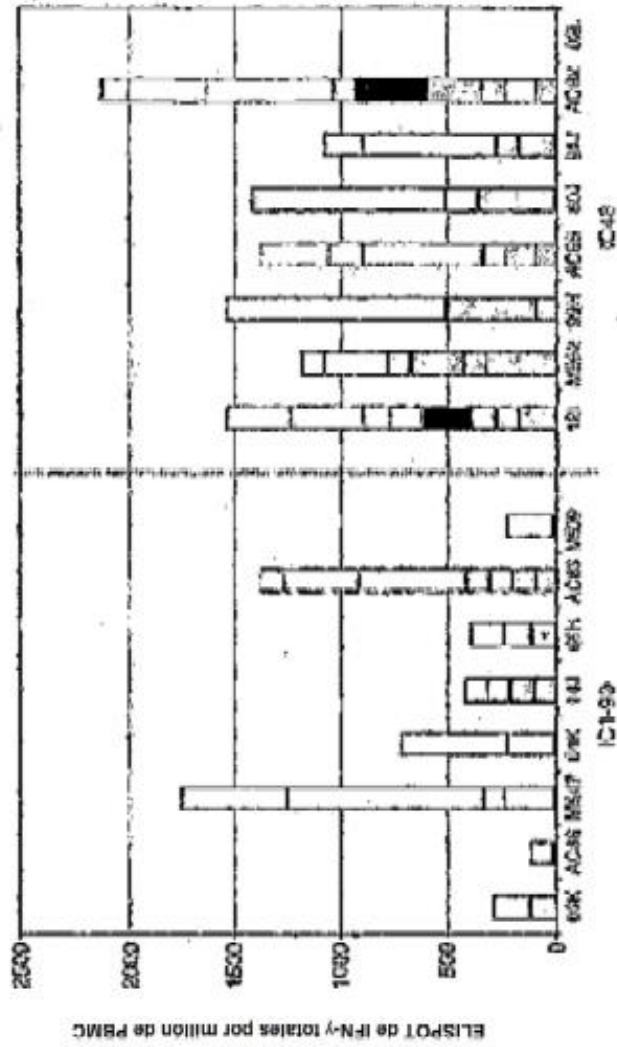


Figura 45

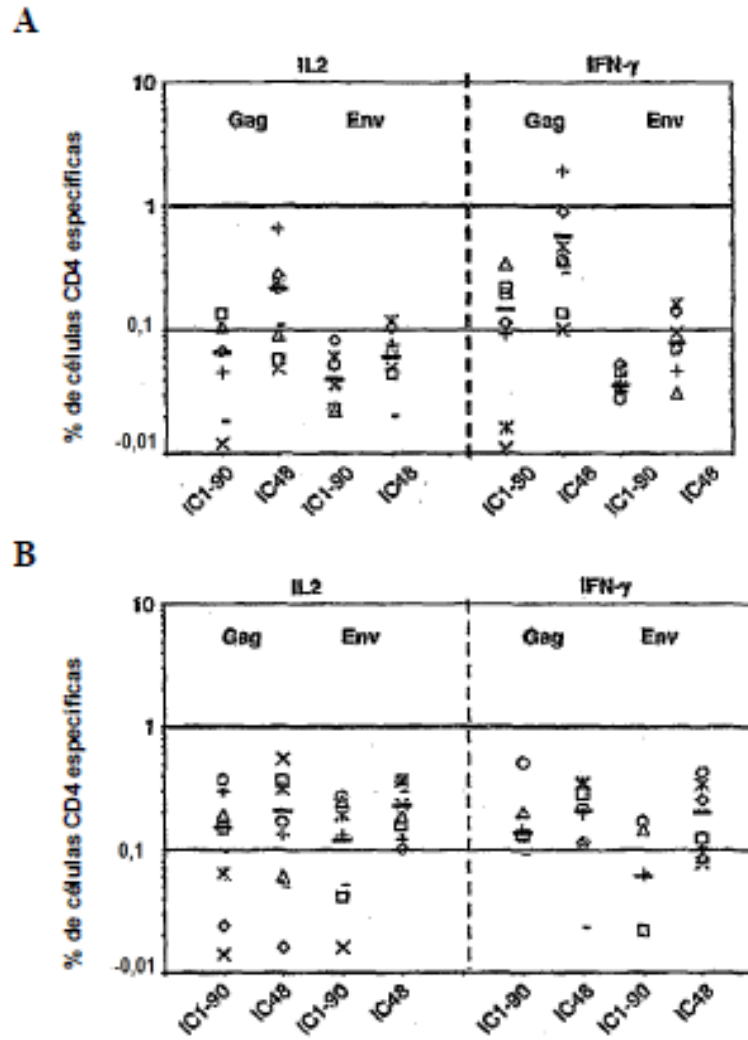


Figura 46

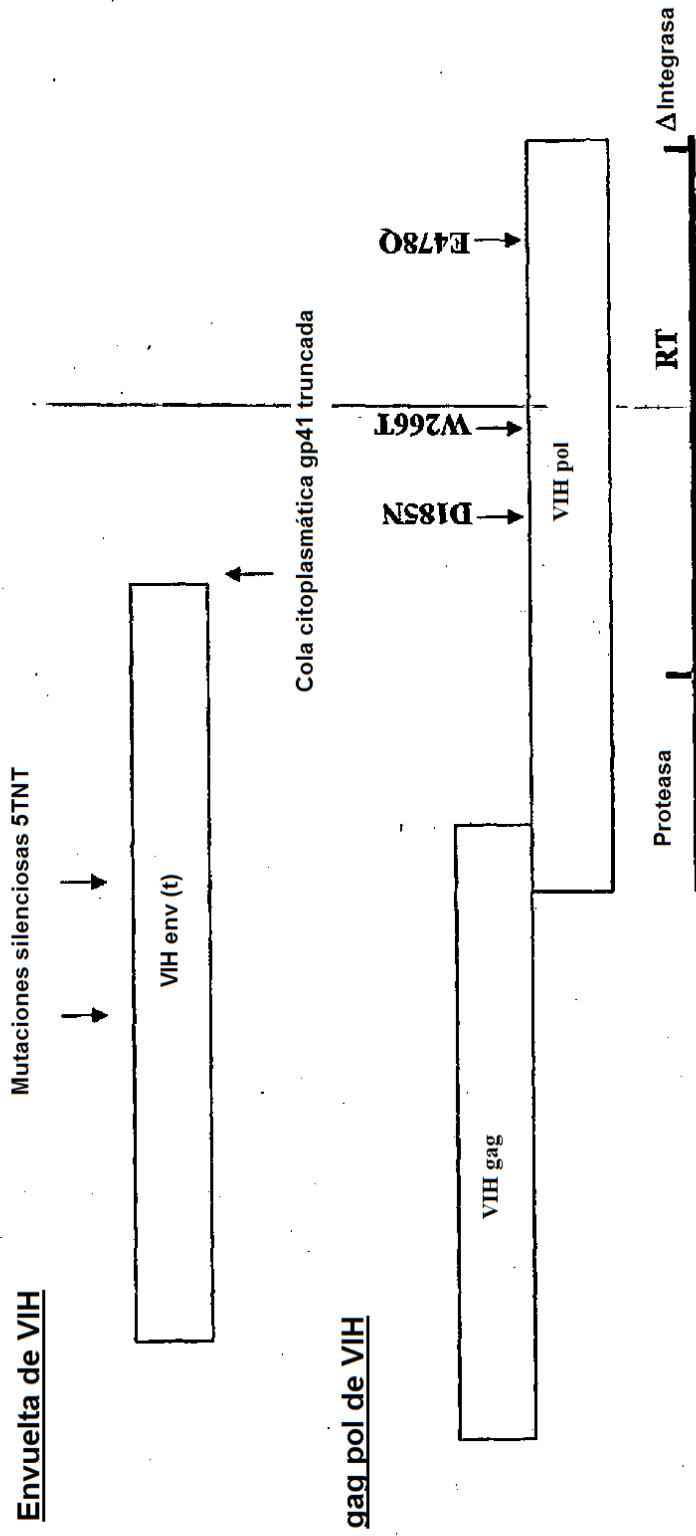


Figura 47

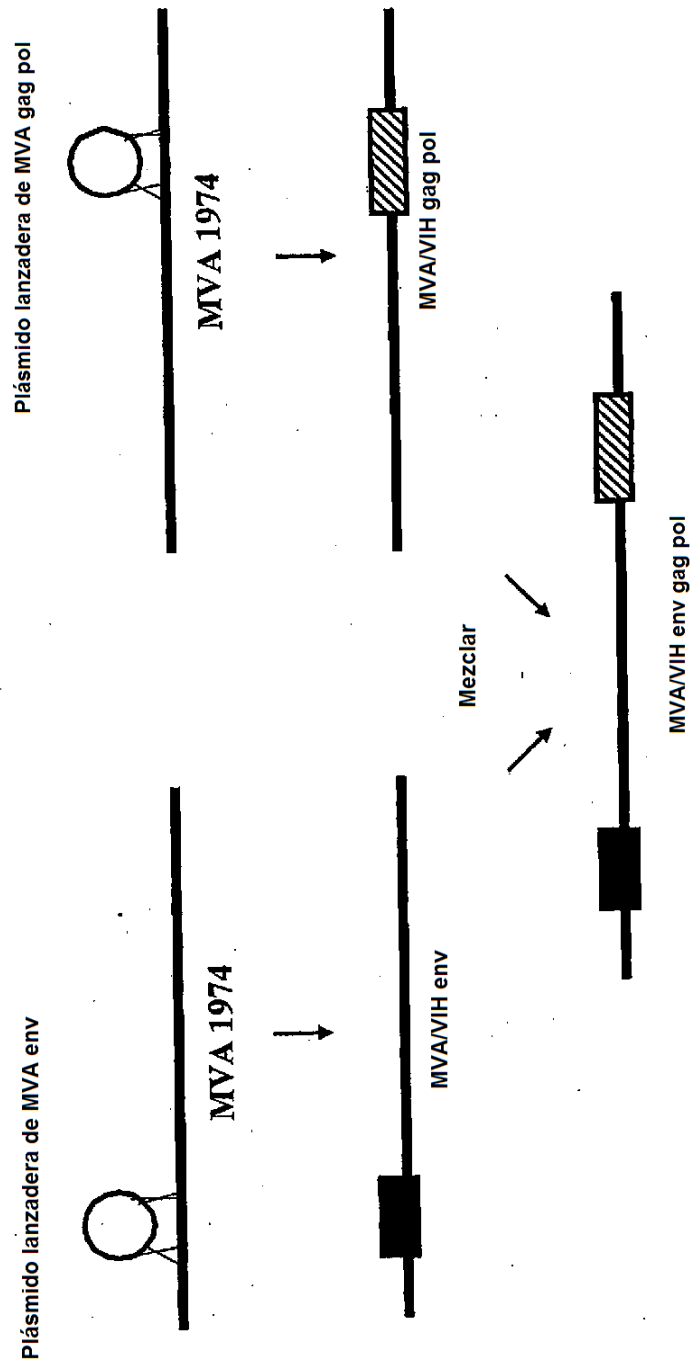


Figura 48