

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 406**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/38** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

**A61K 39/245** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2011 PCT/US2011/029930**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO11119920**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2011 E 11760283 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2550362**

54 Título: **Glicoproteínas de CMV y vectores recombinantes**

30 Prioridad:

**25.03.2010 US 317647 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.07.2017**

73 Titular/es:

**OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY  
(100.0%)  
2525 SW First Avenue, Suite 120  
Portland, OR 97201, US**

72 Inventor/es:

**PICKER, LOUIS;  
FRUEH, KLAUS;  
HANSEN, SCOTT G. y  
POWERS, COLIN**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 625 406 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

Glicoproteínas de CMV y vectores recombinantes

5 **Sector de la técnica**

La presente divulgación se refiere a vectores de citomegalovirus recombinantes, a métodos de fabricación de los mismos, a usos para los mismos, a productos de expresión a partir de los mismos y a usos para los productos de expresión. La presente divulgación también se refiere a glicoproteínas de citomegalovirus US2, US3, US6 y US11, en particular, a vectores de citomegalovirus recombinantes que carecen de una o más de las glicoproteínas US2, US3, US6 y US11. La presente divulgación se refiere también a vectores recombinantes que expresan una o más de las glicoproteínas US2, US3, US6 y US11 del HCMV y las proteínas homólogas Rh182, Rh184, Rh185 y Rh189 del RhCMV.

15 **Estado de la técnica**

El HCMV es un virus omnipresente que está presente en más del 60 % de la población dependiendo del estatus socioeconómico. Tras la infección primaria, el HCMV persiste durante toda la vida del hospedador. Aunque, en general, el HCMV es benigno en los individuos sanos, el virus puede causar una enfermedad devastadora en las poblaciones inmunocomprometidas, lo que se traduce en morbilidad y mortalidad altas (para una revisión, véase (Pass, R. F. 2001. "Cytomegalovirus", pág. 2675-2705. En P. M. H. David M. Knipe, Diane E. Griffin, Robert A. Lamb Malcolm A. Martin, Bernard Roizman y Stephen E. Straus (ed.), *Fields Virology*, 4ª ed. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia)). Los aumentos recientes en el número de pacientes sometidos a terapia inmunosupresora después del trasplante de órganos sólidos (SOT) o de células hematopoyéticas alogénicas (HCT), así como el uso extendido de HCT para enfermedades tales como la anemia de las células falciformes, la esclerosis múltiple y los cánceres sólidos han aumentado el número de las poblaciones de pacientes susceptibles a la enfermedad por HCMV (Chou, S. 1999. *Transpl Infect Dis* 1:105-14, Nichols, W. G. y M. Boeckh. 2000. *J Clin Virol* 16:25-40 y Sepkowitz, K. A. 2002. *Clin Infect Dis* 34:1098-107). El HCMV también es la infección vírica congénita más común y la principal causa infecciosa del mal desarrollo del sistema nervioso central en recién nacidos (Fowler, K. B. *et al.* 1997. *J Pediatr* 130:624-30, Larke, R. P. *et al.* 1980. *J Infect Dis* 142:647-53 y Peckham, C. S. *et al.* 1983. *Lancet* 1:1352-5). En este sentido, el HCMV se considera la causa principal de la sordera neurosensorial en los neonatos independientemente del estado infeccioso (Fowler, K. B. *et al.* 1997. *J Pediatr* 130:624-30). Por lo tanto, el HCMV sigue siendo una causa importante de mortalidad en múltiples poblaciones de pacientes, haciendo hincapié en la necesidad de nuevas estrategias farmacológicas y vacunales antivíricas. La inmunidad inducida por la infección por CMV natural de tipo silvestre (WT) se ha demostrado sistemáticamente incapaz de prevenir la reinfección por CMV (véase más adelante). Esta característica única del CMV presumiblemente explica la escasa eficacia de las vacunas candidatas en los ensayos para prevenir la infección por CMV (Pass, R. F. *et al.* 2009. *N Engl J Med* 360:1191-9). Sin embargo, se ha demostrado que la inmunidad a HCMV adquirida mediante infección natural reduce significativamente la transmisión de la madre al feto del HCMV durante el embarazo. Esta observación indicaría que la inducción de una inmunidad en mujeres embarazadas que fuera comparable a la inducida por la infección natural por CMV, pero que se indujera de manera segura, podría ser capaz de reducir la transmisión de madre a feto y tener un impacto significativo en la enfermedad clínica por CMV en el recién nacido. También se ha demostrado que la inmunidad hacia los linfocitos T específicos del HCMV proporciona protección contra la enfermedad por CMV en pacientes trasplantados, presentando otra población en la que la capacidad para inducir con seguridad una inmunidad comparable a la adquirida mediante la infección natural por CMV tendría un impacto clínico en la enfermedad por CMV (Leen, A. M., y H. E. Heslop. 2008. *Br J Haematol* 143:169-79, Riddell, S. R. y P. D. Greenberg. 2000. *J Antimicrob Chemother* Supl. T3:35-43 y Riddell, S. R. *et al.* 1994. "Bone Marrow Transplantation" 14:78-84). El citomegalovirus es altamente inmunogénico, pero ha desarrollado mecanismos de evasión inmune para permitir la persistencia del virus y la reinfección del hospedador seropositivo:

Los recursos inmunológicos dedicados específicamente al control de la infección por HCMV son enormes, siendo el CMV uno de los virus más inmunogénicos que se conocen. Los altos títulos de anticuerpos se dirigen contra la glicoproteína de la envoltura del HCMV principal (gB) durante la infección primaria de individuos sanos (Alberola, J. *et al.* 2000. *J Clin Virol* 16:113-22 y Rasmussen, L. *et al.* 1991. *J Infect Dis* 164:835-42) y contra múltiples proteínas víricas (tanto estructurales como no estructurales) durante la infección por MCMV de ratones (Farrell, H. E. y G. R. Shellam. 1989. *J Gen Virol* 70 (Pt 10):2573-86). Una gran proporción del repertorio de los linfocitos T del hospedador también se dirige contra los antígenos CMV, con frecuencias medias de respuesta de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de 5 a 10 veces superiores hacia el HCMV que hacia los virus agudos (sarampión, paperas, gripe, adenovirus) o incluso otros virus persistentes tales como el virus del herpes simple y varicela-zoster (Sylwester, A. W. *et al.* 2005. *J Exp Med* 202:673-85). También se observa normalmente una alta frecuencia de respuestas CD8<sup>+</sup> hacia epítopos o proteínas del HCMV definidos (Gillespie, G. M. *et al.* 2000. *J Virol* 74:8140-50, Kern, F. *et al.* 2002. *J Infect Dis* 185:1709-16, Kern, F. *et al.* 1999. *Eur J Immunol* 29:2908-15, Kern, F. *et al.* 1999. *J Virol* 73:8179-84 y Sylwester, A. W. *et al.* 2005. *J Exp Med* 202:673-85). En un estudio humano a gran escala que cuantificaba las respuestas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> hacia todo el genoma del HCMV, las frecuencias medias de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicos del CMV superaron el 10 % de la población de memoria de ambos subconjuntos (Sylwester, A. W. *et al.* 2005. *J Exp Med* 202:673-85). En este estudio, no era inusual que los linfocitos T específicos del CMV representaran más del

25 % del repertorio de los linfocitos T de memoria de un individuo específico o en sitios tisulares específicos. La importancia clínica de este alto nivel de inmunidad específica del CMV se demuestra más claramente por la aparición de la enfermedad de CMV multiorgánica en individuos inmunosuprimidos durante el trasplante y la capacidad de transferencia adoptiva de los linfocitos T para proteger a estos pacientes de la enfermedad por CMV (Riddell, S. R. *et al.*, 1994. "Bone Marrow Transplantation" 14: 78-84).

Paradójicamente, los altos niveles de inmunidad específica del CMV no pueden erradicar el virus del individuo infectado sano ni conferir protección al individuo CMV seropositivo frente a la reinfección. Se cree que esta capacidad del CMV para escapar a la erradicación por parte del sistema inmune y volver a infectar al hospedador seropositivo está vinculada a los múltiples inmunomoduladores víricos codificados por el virus (para una revisión, véase (Mocarski, E. S., Jr. 2002. *Trends Microbiol* 10:332-9)). La familia de proteínas US6 del HCMV (homólogos de RhCMV: Rh182-Rh189) son las estudiadas más ampliamente de estos inmunomoduladores (Loenen, W. A. *et al.* 2001. *Semin Immunol* 13:41-9). Se sabe que al menos cuatro genes diferentes, US2, US3, US6 y US11 y los respectivos homólogos de RhCMV (Rh182, Rh184, Rh185 y Rh189) interfieren en el transporte de moléculas de MHC I (Ahn, K. *et al.* 1996. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 93:10990-5, Ahn, K. *et al.* 1997. *Immunity* 6:613-21, Jones, T. R. *et al.* 1995. *J Virol* 69:4830-41, Pande, N. T. *et al.* 2005. *J Virol* 79:5786-98, Wiertz, E. J. *et al.* 1996. *Cell* 84:769-79 y Wiertz, E. J. *et al.* 1996. *Nature* 384:432-8). Cada una de estas cuatro moléculas interfiere en diferentes puntos esenciales de la maduración de la proteína MHC I. En resumen, US2 se une a la cadena pesada recién sintetizada (HC) y transloca de forma inversa la proteína a través del canal de translocación SEC61 de nuevo en el citosol, donde la HC es degradada por el proteasoma (Wiertz, E. J. *et al.* 1996. *Cell* 84:769-79 y Wiertz, E. J. *et al.* 1996. *Cell* 84:769-). US3 y US6 actúan posteriormente en el proceso de ensamblaje de MHC-I (Ahn, K. *et al.* 1996. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 93:10990-5 y Ahn, K. *et al.* 1997. *Immunity* 6:613-21), reteniendo US3 los heterotrímeros completamente formados en el ER, evitando así su transporte a la superficie celular (Ahn, K. *et al.* 1996. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 93:10990-5 y Jones, T. R. *et al.* 1996. *PNAS EE.UU.* 93:11327-33), e impidiendo US6 el transporte de péptidos por TAP (y, por lo tanto, la formación del complejo trimérico de HC,  $\beta$ 2m y péptido) (Ahn, K. *et al.* 1997. *Immunity* 6:613-21, Hengel, H. *et al.* 1997. *Immunity* 6:623-32 y Lehner, P. J. *et al.* 1997. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 94:6904-9).

En consonancia con la replicación persistente/reactivación crónica dentro del hospedador, el CMV también induce y mantiene una característica y una única respuesta inmune de los linfocitos T. Los linfocitos T de memoria inducidos por la vacunación o la infección pueden caracterizarse ampliamente en de memoria efectora ( $T_{EM}$ ) o central ( $T_{CM}$ ), que se desprenden de las distintas funciones de estas dos poblaciones de memoria (Cheroutre, H. y L. Madakamutil. 2005. *Cell Mol Life Sci* 62:2853-66, Mackay, C. R. *et al.* 1990. *J Exp Med* 171:801-17, Masopust, D. *et al.* 2001. *Science* 291:2413-7, Sallusto, F. *et al.* 1999. *Nature* 401:708-12 y Wherry, E. J. *et al.* 2003. *Nat Immunol* 4:225-34). Los  $T_{EM}$  están diseñados para la función inmediata contra el patógeno invasor, están altamente enriquecidos en las superficies mucosas epiteliales, son polifuncionales que expresan altos niveles de múltiples citocinas efectoras (que expresan las moléculas efectoras TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , MIP-1 $\beta$ ) y tienen alto potencial citotóxico (CD8 $^+$ ). Los  $T_{EM}$  y  $T_{CM}$  también se pueden distinguir fácilmente basándose en los marcadores de superficie celular, siendo  $T_{EM}$  CCR7 $^-$ , CD28 $^{+/-}$ , y siendo  $T_{CM}$  CCR7 $^+$ , CD28 $^+$ . Múltiples estudios indican que los virus que se replican persistentemente tales como el CMV mantienen una respuesta de los linfocitos T que está fuertemente sesgada hacia el fenotipo  $T_{EM}$  (Amyes, E. *et al.* 2003. *J Exp Med* 198:903-11, Appay V. y S. Rowland-Jones, 2002. *J Immunol Methods* 268:9, Champagne, P. *et al.* 2001. *Nature* 410:106-11, Halwani, R. *et al.* 2006. *Springer Semin Immunopathol* 28:197-208 y Robinson, H. L. y R. R. Amara. 2005. *Nat Med* 11:S25-32). De hecho, el CMV se considera el inductor prototípico de  $T_{EM}$  a largo plazo (Halwani, R. *et al.* 2006. *Springer Semin Immunopathol* 28:197-208, Holtappels, R. *et al.* 2000. *Journal of Virology* 74:11495-503, Robinson, H. L. y R. R. Amara. 2005. *Nat Med* 11:S25-32 y Sierro, S. *et al.* 2005. *Eur J Immunol* 35:1113-23). Por el contrario, el análisis de las respuestas de los linfocitos T contra los virus no persistentes (es decir, virus de la gripe) en seres humanos no infectados agudamente, o después de la inmunización con vacunas vivas basadas en virus no persistentes (YFV-17D, vacuna contra la fiebre amarilla o vacuna contra la viruela Dryvax) muestra que después de un fenotipo de los linfocitos T efectores de corta duración, los linfocitos T de memoria específicos del virus de larga duración contra estos virus no persistentes se mantienen principalmente como  $T_{CM}$  (Lucas, M. *et al.*, 2004. *J Virol* 78:7284-7 y Miller, J. D. *et al.* 2008. *Immunity* 28:710-22).

- Hansen *et al.*, 2009, *Nature Med.* 15(3): 293-299, desvelan un vector vírico que expresa la totalidad de US2-11 para su uso en un método de superinfección de un animal.
- El documento WO2006/031264 describe un método de generación de un CD8 $^+$  contra un inmunógeno derivado de patógeno (VIH/SIV) que se expresa desde un vector de CMV.
- El documento WO9604383 desvela una región génica del CMV humano que participa en la regulación negativa de la expresión de la cadena pesada de MHC de clase I.
- Hansen *et al.*, 2010, *Science* 328: 102-106, describen la evasión de los linfocitos T CD8 $^+$  en la superinfección por citomegalovirus.

- El documento WO2011/143653 forma parte de la técnica anterior en virtud del Artículo 54(3) EPC y desvela vacunaciones con vectores de CMV que codifican un epítipo de patógenos con una región US2-11 eliminada.
- BESOLD K *et al*, 2009, *Virology*, vol. 391, pág. 5-19, describen que las proteínas de evasión inmune gpUS2 y pgUS11 del citomegalovirus humano protegen de forma incompleta a las células infectadas del reconocimiento de los linfocitos T CD8.

**Objeto de la invención**

La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.

La presente divulgación se refiere a vectores recombinantes, ventajosamente, vectores víricos que expresan glicoproteínas del citomegalovirus humano (HCMV) US2, US3, US6 y US11 o glicoproteínas de citomegalovirus de Rhesus (RCMV) Rh182, Rh184, Rh185 y Rh189. La invención también se refiere a vectores de HCMV que tienen las glicoproteínas de HCMV US2, US3, US6 y US11 eliminadas de los mismos.

Otros objetos de la divulgación incluyen cualquiera o todos los de: proporcionar productos de expresión a partir de dichos recombinantes, métodos de expresión de productos a partir de dichos recombinantes, composiciones que contienen los recombinantes o los productos de expresión, métodos de uso de los productos de expresión, métodos de uso de las composiciones, ADN de los recombinantes, y métodos de replicación de ADN a partir de los recombinantes.

Una realización de la divulgación se refiere a un método de superinfección o infección de forma repetida de un animal (incluyendo un ser humano) que puede comprender (a) construir un vector que contiene y expresa al menos una glicoproteína de citomegalovirus humano (HCMV), en el que la glicoproteína es US2, US3, US6 o US11 (o los correspondientes homólogos de RhCMV); y (b) administrar el vector al animal, pudiendo el animal haberse infectado ya con el mismo vector.

El vector puede ser un vector de adenovirus, vector de virus adenoasociado (AAV), vector de alfavirus, vector de herpesvirus (incluyendo HCMV), vector de retrovirus y vector de poxvirus. El vector puede contener y expresar US2, US3, US6 y US11 o Rh182, Rh184, Rh185 y Rh189 o el vector puede contener y expresar todas las glicoproteínas dentro de la región US2 a US11 del HCMV o la región Rh182-189 de RhCMV.

La presente invención incluye un método de determinación de la eficacia de una vacuna del HCMV, que puede comprender (a) administrar una vacuna del HCMV a un sujeto de ensayo; (b) exponer al sujeto de ensayo a un vector de HCMV, en el que las glicoproteínas dentro de la región US2 a US11 de HCMV se eliminan del vector de HCMV, y en el que el vector de HCMV contiene y expresa al menos un inmunógeno de la vacuna contra el HCMV; y (c) medir una respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> protectora, en la que la vacuna contra el HCMV es eficaz si una respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> protege contra la exposición al vector de HCMV con las glicoproteínas dentro de la región US2 a US11 del CMV eliminadas.

El vector de HCMV con eliminación de US2-11, y en el que el vector de HCMV contiene y expresa al menos un inmunógeno de la vacuna contra el HCMV, puede ser una vacuna contra el VIH. Ventajosamente, el antígeno del VIH puede ser una proteína VIH.

El vector de HCMV con eliminación de US2-11 puede ser una vacuna contra el HCMV.

Una realización adicional de la presente divulgación se refiere a un método de inducción de una respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> diferente en un animal o un ser humano, que puede comprender (a) administrar un vector de HCMV con al menos una glicoproteína de citomegalovirus (CMV) eliminada del vector de CMV, en el que la glicoproteína es US2, US3, US6 o US11 y en el que el vector de CMV contiene y expresa al menos un inmunógeno; y (b) administrar el vector al animal o al ser humano, en el que la respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el animal o ser humano difiere en comparación con un vector de CMV que contiene y expresa el mismo al menos un inmunógeno y en el que una glicoproteína de CMV no está eliminada del vector de CMV.

Un vector puede tener las glicoproteínas del CMV US2, US3, US6 y US11 eliminadas individualmente del vector de CMV. El vector de uso en la invención también puede tener todas las glicoproteínas de dentro de la región US2 a US11 de CMV eliminadas del vector de CMV.

Cabe señalar que en la presente divulgación y, en particular, en las reivindicaciones y/o en los párrafos, los términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la Ley de Patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y las expresiones tales como "que consisten esencialmente en" y "consisten esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de Patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos no citados explícitamente, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan a característica básica o nueva de la invención.

Estas y otras realizaciones se desvelan o son evidentes a partir de y englobadas en la siguiente descripción detallada.

### Descripción de las figuras

5 La siguiente descripción detallada, dada a modo de ejemplo, pero no destinada a limitar la invención únicamente a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse mejor junto con las figuras adjuntas.

10 FIG. 1A-1C. Los macacos Rhesus infectados con el CMV no están protegidos contra la superinfección con RhCMV, y la superinfección de animales RhCMV positivos es independiente de la dosis vírica. (A) El día 0, dos cohortes de cuatro animales RhCMV<sup>+</sup> cada una fueron infectadas por vía subcutánea con 10<sup>2</sup> o 10<sup>4</sup> ufp de RhCMV (gagL). Se controlaron las respuestas de los linfocitos T específicas de SIVgag en PBMC o en lavado broncoalveolar (BAL) mediante análisis de citometría de flujo de tinción de citocinas intracelulares (ICCS) para CD69 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (S. G. Hansen *et al.*, *Science* 328, 5974 (2010)) (véanse las FIG. 6 y 7). (B) Día de la primera detección del virus que expresa SIVgag en la orina o hisopos bucales recogidos en los intervalos indicados de cada animal DE las dos cohortes mostradas en (A). También se incluyen los resultados de una tercera cohorte de ocho animales RhCMV<sup>+</sup> inoculados con 10<sup>7</sup> unidades formadoras de placa (ufp) de RhCMV (gagL). La expresión de SIVgag se determinó mediante inmunotransferencia usando anticuerpo contra SIVgag de cocultivos víricos (S. G. Hansen *et al.*, *Science* 328, 5974 (2010)). Cada círculo representa un animal individual. (C) Secreción a largo plazo del virus que expresa SIVgag. Se aisló orina en los días indicados después de la infección (PID) de cada uno de los MR infectados con RhCMV(gagL), y se detectó la expresión de SIVgag a partir del virus cocultivo por inmunotransferencia. Para el control, se incluyó un animal RhCMV positivo que no recibió RhCMV (gagL).

25 FIG. 2A-2C. No se requiere la interferencia con el ensamblaje del MHC-I para la infección primaria de los animales sin tratamiento previo del CMV. Se inocularon tres cohortes de dos MR cada una por vía subcutánea con 10<sup>7</sup> ufp de  $\Delta$ US2-11(gag) recombinante,  $\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11(gag) o RhCMV (gag).  $\Delta$ US2-11(gag) carece de la región del gen RhCMV Rh182-Rh189 que codifica los homólogos de HCMV US2-11 (N. T. Pande *et al.*, *J Virol* 79:5786 (2005)),  $\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11(gag) carece además del gen de RhCMV Rh178, que codifica el inhibidor vírico de la expresión de la cadena pesada (VIHCE) (C. J. Powers *et al.*, *PLoS Pathog* 4: e1000150 (2008)). (A) Se determinaron la respuesta de los linfocitos T específica de RhCMV en PBMC y la respuesta de los linfocitos T específica de SIVgag en PBMC y BAL en los días indicados después de la infección usando péptidos superpuestos a los genes tempranos directos de RhCMV IE1 e IE2 o SIVgag mediante análisis de citometría de flujo de ICCS para CD69, TNF- $\alpha$  e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (S. G. Hansen *et al.*, *Science* 328, 5974 (2010)) (véanse las FIG. 6 y 7). (B) Inmunotransferencia de RhCMV-IE2 o SIVgag expresados en cocultivos de muestras de orina obtenidas de animales infectados con  $\Delta$ US2-11(gag) o  $\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11(gag). La transferencia de IE2 confirma que los animales eran negativos para RhCMV antes de la infección, en consonancia con los resultados de ensayos con linfocitos T (tabla 1B). (C) Análisis por PCR del ADN genómico vírico aislado de cocultivos víricos a los 428 días después de la infección. La presencia o ausencia de los ORF indicados se determinó por PCR usando cebadores específicos (S. G. Hansen *et al.*, *Science* 328, 5974 (2010)). Uno de los animales infectados con RhCMV(gag) sirvió como control.

40 FIG. 3A-3D. El RhCMV con eliminación de US2-11 no puede superinfectar macacos Rhesus RhCMV<sup>+</sup>. (A) Una cohorte de cuatro MR RhCMV<sup>+</sup> se inoculó por vía subcutánea con 10<sup>7</sup> ufp de  $\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11(gag) ( $\Delta$ V $\Delta$ U) los días 0 y 91. Se controló la respuesta de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a SIVgag o RhCMV-IE mediante análisis de citometría de flujo de ICCS para CD69, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en PBMC. Se muestra el porcentaje de los linfocitos T específicos que responden, dentro del subconjunto de memoria general, para cada punto de tiempo. El día 154 y de nuevo el día 224, se inoculó la misma cohorte con 10<sup>7</sup> ufp de  $\Delta$ US2-11(gag) ( $\Delta$ U), y se controlaron las respuestas de los linfocitos T específicas de RhCMV-IE y SIVgag cada dos semanas. El día 737, la cohorte se inoculó con  $\Delta$ VIHCE(gag) ( $\Delta$ V), y se controló la respuesta de los linfocitos T como antes. El día 989, la cohorte se inoculó con  $\Delta$ Rh186-8(retanef) ( $\Delta$ R). Además de SIVgag, se detectó una respuesta de los linfocitos T a SIVrev/nef/tat por ICCS en los cuatro animales (líneas negras) usando los correspondientes péptidos solapantes. (Inset) Se infectó una cohorte separada de cuatro animales con RhCMV(gag) de tipo silvestre, y se controló la respuesta de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicos de RhCMV-IE y SIVgag como se ha descrito anteriormente en los puntos de tiempo indicados para 133 días. (B) Se midió la respuesta de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a SIVgag en BAL en paralelo a las respuestas de los linfocitos T de PBMC mostradas en (A). (C) RhCMV secretado en la orina recogida de la cohorte infectada con RhCMV(gag), o virus con eliminación  $\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11(gag) o  $\Delta$ US2-11(gag), marcado con  $\Delta$ CMV. El virus se aisló en los días indicados mediante cocultivo con fibroblastos de Rhesus telomerizados (TRF), y se sondaron los lisados celulares para la expresión de SIVgag mediante inmunotransferencia. (D) Expresión de RhCMV-IE2, SIVgag y SIVretanef por virus secretado en orina recogida en los días indicados. Cabe señalar que todos los animales eran IE2 positivos al inicio del experimento, confirmando su estado de los linfocitos T RhCMV positivos (Tabla 1D).

60 FIG. 4A-4D. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> protegen a los macacos Rhesus de la infección por RhCMV que carece de inhibidores de MHC-I. (A) En los días indicados, se trataron cuatro MR CMV positivos con CM-T807, un anticuerpo contra CD8, antes y después de la inoculación con 10<sup>7</sup> ufp de  $\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11(gag) (dos animales, líneas negras) o  $\Delta$ US2-11(gag) (dos animales, líneas rojas). Los recuentos absolutos de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la sangre de cada animal se muestran con el tiempo. (B) Se muestra la presencia de poblaciones de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en PBMC de un animal representativo durante los días indicados. (C) Se controlaron las

respuestas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas de SIVgag en PBMC y BAL de animales con linfocitos T CD8<sup>+</sup> agotados por ICCS para CD69, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , y se muestran como un porcentaje de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> de memoria total. Cabe señalar la aparición retardada de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de SIVgag. **(D)** Expresión de SIVgag o IE2 por RhCMV secretado en la orina de animales infectados tras el agotamiento de CD8<sup>+</sup>.

FIG. 5. Diagrama de virus usado en el Ejemplo 1. La estrategia de eliminación se describe en (S. G. Hansen *et al.*, Science 328, 5974 (2010)). Las regiones del genoma que se alteraron para crear virus mutantes se muestran en detalle. Todos los ORF de RhCMV se representan como flechas que corresponden a la dirección del ORF dentro del genoma. Las flechas azules representan genes que regulan negativamente el MHC de clase I. La nomenclatura de RhCMV se usa para todos los ORF (S. G. Hansen *et al.*, J. Virol 77, 6620 (2003)). Para los ORF con homología con genes de HCMV, se muestra entre paréntesis el nombre del correspondiente homólogo de HCMV.

FIG. 6. Estrategia de formación de ventanas de análisis de la frecuencia de respuesta. Los linfocitos procedentes de PBMC y BAL se estimularon con Ag, se tiñeron y se recogieron en un citómetro de flujo como se describe en el Ejemplo 1. Los datos se analizaron usando una estrategia de formación de ventanas de análisis jerárquica para delinear los subgrupos de respuesta a Ag. Las ventanas de análisis se representan en el presente documento en rosa, con los nombres de los subconjuntos correspondientes numerados y mostrados por encima de los diagramas de citometría. Para la FIG. 1, se determinaron las frecuencias de respuesta usando el subgrupo CD69<sup>+</sup>/TNF $\alpha$ <sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>, trazado citométrico 6a, CD8<sup>+</sup>, gráfico citométrico 8a). Los valores de la respuesta para el resto de las figuras se determinaron usando el análisis booleano para delinear las células que son CD69<sup>+</sup> y TNF $\alpha$ <sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, TNF $\alpha$ <sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> o TNF $\alpha$ <sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, ("Respondedores booleanos", gráfica citométrica 6c, CD8<sup>+</sup>, gráfica citométrica 8c).

FIG. 7. Jerarquía de ventanas de análisis de corrección de memoria. Se tiñeron los preparados de células y se recogieron los datos como se describe (C. J. Pitcher *et al.*, J Immunol 168, 29 (2002)), seguido por el análisis jerárquico mostrado en el presente documento. Los recuadros de color rosa de la gráfica citométrica 2 y 3 indican las ventanas de análisis de totalidad de los linfocitos T y de los subconjuntos de los linfocitos T, respectivamente. Los valores de corrección de memoria usados para los cálculos de la respuesta de las PBMC reflejan el porcentaje de los eventos dentro de la ventana de análisis de memoria de los perfiles abiertos por linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> (gráficas citométricas 4 y 5, respectivamente).

FIG. 8A-8C. Caracterización de los RhCMV recombinantes *in vitro*. A) RT-PCR. Se infectaron los TRF a una MOI = 1 con el virus indicado, y se recogió el ARN total a las 24 hpi. Se sintetizó el ADNc mediante cebado hexamérico al azar, y se amplificaron las transcripciones con cebadores específicos para los ORF indicados a la izquierda. Los genes que flanquean las regiones eliminadas se incluyeron para detectar posibles cambios en la transcripción debido a las eliminaciones. WT = RhCMV de tipo silvestre derivado de BAC. RT = transcriptasa inversa. B) Expresión de SIVgag por virus recombinantes. Análisis de inmunotransferencia de SIVgag marcado con FLAG expresado por los virus indicados. Los TRF se infectaron a MOI = 1 y se recogió el lisado total en los momentos indicados. Los anticuerpos se describen en el Ejemplo 1. CRT = calreticulina. C) Crecimiento vírico en múltiples etapas. Se infectaron los TRF se a una MOI = 1, y se tituló el sobrenadante mediante ensayo de placa en los momentos indicados. El crecimiento se compara con el RhCMV de tipo silvestre derivado de BAC.

FIG. 9. Secuenciación del genoma comparativo de RhCMV recombinante. El panel superior muestra las intensidades de la señal de la sonda para los fragmentos de ADN genómico marcados obtenidos de la cohibridación de  $\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11(gag) ( $\Delta$ V $\Delta$ U, canal de Cy5, verde) y RhCMV derivado de BAC (WT, canal Cy3, azul) a la micromatriz de ADN de RhCMV de oligonucleótidos solapantes. Las diferencias en las señales de hibridación entre los genomas de referencia y de prueba se muestran en rojo como la proporción de las intensidades de la sonda para WT frente a  $\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11(gag). Los paneles segundo y tercero muestran las proporciones de las intensidades de la sonda para WT frente a  $\Delta$ US2-11(gag) ( $\Delta$ U) y WT frente a  $\Delta$ VIHCE(gag) ( $\Delta$ V). El panel inferior muestra los números de nucleótidos del genoma de RhCMV, representados en incrementos de 20 kpb. También se indican las posiciones de las eliminaciones de VIHCE y US2-11. Los picos rojos positivos representan las señales que están presentes en la referencia, pero ausentes en los virus de eliminación. Estos picos corresponden a la localización esperada de las eliminaciones. Cabe señalar que no se observaron diferencias significativas fuera de las regiones eliminadas, lo que indica que los genomas de los virus de eliminación son idénticos a los del BAC parental en todas las regiones excepto las eliminadas.

FIG. 10. Resultado de la exposición a SIVmac239 intrarrectal en dosis limitante, repetida, de MR vacunados con A) solo vectores de RhCMV (que codifican gag, retanef, pol y env; dada en las semanas 0,14); Grupo B) los mismos vectores de RhCMV/SIV (semana 0) seguidos por vectores de Ad5 pan-proteómico (semana 14); Grupo C) ADN pan-proteómico (semanas, 0,4,8), seguido de vectores de Ad5 pan- proteómico (semana 14); y Grupo D) controles no vacunados (con la exposición iniciada en la semana 59). Se expusieron estos MR semanalmente hasta la primera carga vírica plasmática por encima del umbral (> 30 copias/ml) considerándose el inicio de la infección mediante el desavío la semana anterior. Los valores de *p* se refieren a la diferencia en la fracción de MR "protegido" (rojo) frente a infectado progresivamente (negro) en los grupos de solo CMV y CMV/Ad5 frente a los controles no vacunados. De los 24 MR que recibieron una pauta que contenía vectores de RhCMV/SIV (gag/env/rev/nef/tat/pol) (Grupos A y B), 13 (54 %) manifestaron una infección por SIVmac239 inicial con un estallido de tamaño variable de la viremia en plasma seguido por el control inmediato a la detección inferior. Aunque los MR protegidos manifestaron "interrupciones irregulares" víricas de bajo nivel aproximadamente una vez cada 10 semanas (lo que gradualmente se redujo a ninguno), el control vírico global fue suficientemente pronto y riguroso para evitar cualquier agotamiento de los linfocitos diana CD4<sup>+</sup>, así como para evitar la inducción

(Grupo A) o el refuerzo (Grupo B) de la respuesta de los anticuerpos anti-SIVenv.

FIG. 11. Ningún agotamiento de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el sitio de efector en MR vacunados con el vector de RhCMV protegido ("Controladores"). Análisis de la extensión y cinética del agotamiento de los linfocitos T de la memoria CD4<sup>+</sup> en el BAL después de la infección de los controladores (rojo) frente a los no controladores (negro) en los grupos A-D, con la importancia de las diferencias en el agotamiento medio de los días 21-70 pi de los controladores del Grupo A y B frente al Grupo C determinado mediante la prueba de suma de clasificación de Wilcoxon.

FIG. 12. Se inducen o potencian los títulos de Ab neutralizantes contra SIVmac251 adaptado al laboratorio con el inicio de la infección sistémica en MR de control no vacunados, MR vacunados con ADN/AD5 y no controladores en los grupos vacunados con el vector de RhCMV; sin embargo, los controladores (rojo) de los últimos grupos muestran poca o ninguna inducción o refuerzo, de acuerdo con la exposición limitada al Ag y, por tanto, un control virológico estricto. [RP = progresor rápido];

FIG. 13. Respuestas de los linfocitos T de memoria CD8<sup>+</sup> específicos de SIV (gag, env, rev/nef/tat y pol) totales en sangre durante la fase de vacunación de los Grupos A y B con los controladores subsiguientes mostrados en rojo y los no controladores en negro. Cabe señalar que, en ambos grupos, el máximo de respuesta posterior al refuerzo, pero no la respuesta a la exposición, se correlacionó con el resultado.

FIG. 14A-14B. Control de los picos y posterior a los picos y respuestas de refuerzo en los MR de estudio con infección progresiva (los MR protegidos en los grupos de CMV/CMV y CMV/Ad5 no se incluyen en esta figura). Cabe señalar que la supresión vírica de los picos y posterior a los picos se correlaciona con la capacidad para manifestar un refuerzo anamnésico de la respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> a la infección. Se usaron ensayos cuantitativos en tiempo real de RT-PCR y PCR dirigidos a una secuencia altamente conservada en Gag para mediciones convencionales del ARN de SIV en plasma, y el ARN y ADN de SIV asociados a células en sangre periférica y células mononucleares de ganglios linfáticos, como se ha descrito anteriormente (Cline, A. N. *et al.*, *J. Med Primatol* 34, 303-312, (2005), Venneti, S. *et al.*, *Am J Pathol* 172, 1603-1616, (2008)).

FIG. 15. SIV asociado a linfocitos T CD4<sup>+</sup> en un MR protegido.

FIG. 16. El "blindaje del vector de CMV/SIV": los vectores de CMV inducen y mantienen linfocitos T específicos de SIV de alta frecuencia en sitios efectores-sitios que contienen altas densidades de células diana SIV y comprenden los sitios probables de amplificación del SIV temprana después de la inoculación de la mucosa; [% de cuadrantes mostrados; el fondo fue irrelevante para todos los ensayos]. Se muestran datos de la necropsia de un animal siete años después de la inoculación con RhCMV(gagL).

FIG. 17. Las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicas de SIV generado por el vector de RhCMV/SIV no incluyen las respuestas inmunodominantes típicas que están dirigidas en la propia infección de SIV o después de la vacunación con ADN y/o vectores víricos convencionales. La figura muestra respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de sangre periférica a una mezcla total de péptidos SIVgag 15meros (azul) o al epítipo SIVgag CM9 restringido a Mamu A\*01 (rojo) en 2 MR Mamu A\*01+ representativos, uno que recibió RhCMV/gag dos veces (semana 0, 14) y uno que recibió RhCMV/gag en la semana 0 y Ad5/gag en la semana 14. Cabe señalar que las respuestas de CM9 no surgen después de la vacunación de RhCMV/gag, sino que se desarrollan después de la vacunación de Ad5/gag subsiguiente.

FIG. 18. Comparación de la capacidad de vectores de RhCMV(gag) (wt) frente a vectores ΔUS2-11(gag) (US2-11 KO) para infectar MR RhCMV seronegativo (sin tratamiento previo de CMV) (panel izquierdo), MR RhCMV seropositivos (panel medio) y MR de RhCMV seropositivos con agotamiento de los linfocitos CD8<sup>+</sup> con mAb cMT807 en el momento de la inoculación (panel derecho, agotamiento de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> al 100 % en sangre durante 14 días). Los vectores de RhCMV US2-11(gag) (US2-11 KO) pueden infectar MR sin tratamiento previo del RhCMV, pero no MR RhCMV+, a menos que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se agoten durante las 2 primeras semanas. La infección o la falta de infección se confirmó por el aislamiento o la falta de aislamiento, respectivamente, del vector designado después del cocultivo de orina en todos los casos.

FIG. 19. Comparación de la dirección del epítipo de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de las respuestas específicas de SIVgag que surgen después de la vacunación de Mamu A\*01+, MR sin tratamiento previo de CMV con vectores de RhCMV(gag) wt frente a vectores de ΔUS2-11(gag) (US2-11 KO RhCMV(gag)). El vector de US2-11 KO provoca respuestas a todos los epítipos gag restringidos a Mamu A\*01 previamente caracterizados, mientras que los vectores de CMV wt inducen respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicas de gag que no se dirigen a estos epítipos (gag = mezclas totales de gag 15meros).

FIG. 20 Reconocimiento de péptidos 15meros gag consecutivos, individuales, por cada 3 Mamu A\*01+, MR sin tratamiento previo de CMV vacunados con vectores de RhCMV(gag) (WT) frente a ΔUS2-11(gag) (KO). Cabe señalar que mientras que tanto los vectores wt como KO inducen un diverso reconocimiento de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de los epítipos gag, solo las respuestas generadas por el vector KO incluyen el reconocimiento de péptidos que contienen epítipos inmunodominantes convencionales (rectángulos amarillos, epítipos designados en la parte superior).

FIG. 21. Ensayos de respuesta específica de antígeno: panel de tinción rutinaria.

FIG. 22. La eliminación de Rh110 homólogo de pp71 atenúa RhCMV *in vitro*. Reducción del crecimiento de ΔRh110 y ΔRh110(retanef) de RhCMV, pero no del virus RhCMV WT de control en fibroblastos de Rhesus telomerizados (tRF). El crecimiento es rescatado por el crecimiento en las células complementarias que expresan pp71 (tRF+pp71 tet). Los fibroblastos se infectaron con los virus indicados a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01. El sobrenadante de cultivo se recogió en los días indicados, y se determinó el título vírico en las células complementarias que expresaban pp71. Las curvas de crecimiento de múltiples etapas muestran una deficiencia de replicación de solo ΔRh110 y ΔRh110(retanef), pero no RhCMV WT en tRF normales. El rescate del

crecimiento normal de  $\Delta$ Rh110 y  $\Delta$ Rh110(retanef) en células complementarias pp71 (cTRF/pp71) muestra que la deficiencia de crecimiento se debe a la falta de expresión de pp71.

FIG. 23.  $\Delta$ Rh110 de RhCMV se atenúa *in vivo* y protege contra la estimulación con  $\Delta$ US2-11(gag). Paneles superiores: se inocularon dos MR seronegativos s.c. con 10 ufp de  $\Delta$ Rh110 de RhCMV el día 0. La respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> contra el lisado de RhCMV se midió mediante ICCS en PBMC y BAL en los intervalos indicados. El día 231, se expusieron los animales infectados con  $\Delta$ Rh110 a 10<sup>7</sup> ufp de  $\Delta$ US2-11(gag) de RhCMV ( $\Delta$ Ugag), y se midió la respuesta de los linfocitos T contra el lisado de RhCMV en los intervalos indicados. La ausencia de un refuerzo de los linfocitos T indica que los animales estaban protegidos contra la exposición a  $\Delta$ US2-11. Paneles inferiores: Detección de RhCMV en orina recogida en los días indicados a partir de dos MR infectados con RhCMV(gag) o dos MR infectados con  $\Delta$ Rh110. Se determinó la expresión de SIVgag, IE de RhCMV o la proteína celular GAPDH (incluida como control de carga) a partir de cocultivos víricos mediante inmunotransferencia usando anticuerpos específicos (S. G. Hansen *et al.*, *Science* 328, 5974 (2010)). Los dos animales infectados con RhCMV(gag) secretaron RhCMV (como se muestra por la expresión de IE), porque eran CMV positivos al inicio del experimento. El día 56, estos animales también secretaron SIVgag que expresaba RhCMV indicando infección. Por el contrario, los dos MR negativos para CMV infectados con  $\Delta$ Rh110 no secretaron RhCMV como se indica por la ausencia de cocultivos positivos para IE hasta el día 231. Este resultado indica que  $\Delta$ Rh110 se atenúa *in vivo*.

FIG. 24. Se creó RhCMV carente de las proteínas de tegumento pp65a y pp65b ( $\Delta$ Rh111-112) codificadas por los genes Rh111 y Rh112, respectivamente. Panel superior:  $\Delta$ Rh111-112 crece como RhCMV WT en cultivo de tejidos. Se infectaron fibroblastos de Rhesus telomerizados (tRF) con los virus indicados a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01. El sobrenadante de cultivo se recogió en los días indicados y se determinó el título vírico. Panel inferior izquierdo:  $\Delta$ Rh110-112 induce una respuesta de los linfocitos T específica de IE, pero no de pp65. Se infectaron dos animales negativos para CMV (rojo, verde) con 5 x 10<sup>6</sup> ufp de  $\Delta$ Rh111-112, y se infectó un animal con RhCMV WT (azul) al día 0. Se midieron las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> a CMV mediante tinción intracelular de citocinas (TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ) en lavados broncoaveolares (BAL, paneles superiores) o PBMC (paneles inferiores) usando péptidos solapantes para IE de RhCMV o pp65 de RhCMV. Los paneles muestran el % de los linfocitos T reactivos a cada grupo de péptidos. Panel inferior derecho: RhCMV $\Delta$ Rh111-112 es secretado por animales infectados. La orina se recogió a los 56 días después de la infección con RhCMV WT (animales 25104 y 25546) o  $\Delta$ Rh111-112 (animales 22037 y 23016). La expresión de IE de RhCMV o pp65 de RhCMV se determinó a partir de cocultivos víricos mediante inmunotransferencia usando anticuerpos específicos. Todos los animales infectados con WT y  $\Delta$ Rh111-112 secretaron RhCMV como se muestra por la expresión de IE. Mientras que el virus secretado de animales infectados con WT también expresó pp65, esto no se observó para  $\Delta$ Rh111-112, porque este virus carece de los genes que codifican pp65a y pp65b. Esto demuestra que el virus secretado corresponde a  $\Delta$ Rh111-112, y que este virus no se atenúa *in vivo*.

FIG. 25. RhCMV que carece de pp65 protege contra la exposición con  $\Delta$ US2-11(gag). Se infectaron dos animales con 5 x 10<sup>6</sup> ufp de  $\Delta$ Rh111-112, y se determinaron la respuesta de los linfocitos T a SIV gag (15-meros solapantes, 4 aminoácidos de solapamiento) y la respuesta de los linfocitos T a lisado de RhCMV por ICCS en los días indicados. El día 673, se expusieron los animales por inoculación subcutánea a 10<sup>7</sup> ufp de  $\Delta$ US2-11(gag), y se midió la respuesta de los linfocitos T a RhCMV y SIVgag. La ausencia de un refuerzo en la respuesta de los linfocitos T específicos de RhCMV y la ausencia de una respuesta *de novo* a SIVgag indica que ambos animales estaban protegidos contra la exposición a  $\Delta$ US2-11(gag). Este resultado indica que CMV con eliminación de pp65 induce respuestas de los linfocitos T protectoras a largo plazo. Al día 855, se expusieron los animales a RhCMV(gag) que contenía US2-11. Ambos animales mostraron un refuerzo en la respuesta de los linfocitos T específicos de CMV y desarrollaron una respuesta de los linfocitos T *de novo* hacia SIVgag coincidente con la superinfección por RhCMV(gag). Este resultado indica que, de forma similar a los animales infectados de manera natural, los animales infectados experimentalmente con vacunas de CMV recombinantes de replicación no están protegidos contra la superinfección con virus que contienen US2-11.

### Descripción detallada de la invención

La divulgación se refiere a un método de un vector capaz de infectar de forma repetida un organismo que puede comprender (a) construir un vector que contenga y exprese al menos una glicoproteína de citomegalovirus (CMV), en el que la glicoproteína sea US2, US3, US6 o US11; y (b) administrar el vector de forma repetida al animal o ser humano. Cuando se desea una superinfectividad, cualquier vector, ventajosamente un vector vírico, puede expresar una o más de las glicoproteínas de HCMV US2, US3, US6 y US11 (o los homólogos de RhCMV Rh182, Rh184, Rh185, Rh189). Los vectores de expresión víricos son bien conocidos por los expertos en la materia, e incluyen, por ejemplo, virus tales como adenovirus, virus adenoasociados (AAV), alfavirus, herpesvirus (incluyendo el propio citomegalovirus), retrovirus y poxvirus, incluyendo virus avipox, poxvirus atenuados, virus vacuna y, en particular, el virus Ankara vacuna modificado (MVA, n.º de referencia ATCC VR-1566). Dichos virus, cuando se usan como vectores de expresión, son innatamente no patógenos en los sujetos seleccionados, tales como seres humanos o se han modificado para hacerlos no patógenos en los sujetos seleccionados. Por ejemplo, los adenovirus y los alfavirus defectuosos en la replicación son bien conocidos, y se pueden usar como vectores de administración génica. Sin US2-11, todos estos vectores (excepto el CMV, que contiene US2-11 de manera natural) generan una inmunidad específica del vector que prohíbe su uso repetido.

En una realización de la divulgación en la que se desea una infección repetida de un vector, cualquier vector,

ventajosamente un vector vírico, puede expresar una o más de las glicoproteínas US2, US3, US6 y US11. En una realización particularmente ventajosa, el vector expresa las glicoproteínas US2, US3, US6 y US11. Más ventajosamente, el vector contiene y expresa todas las glicoproteínas dentro de la región US2 a US11 de CMV. En una realización ventajosa, una o más de las glicoproteínas US2, US3, US6 y US11 pueden incluir, pero sin limitación, las glicoproteínas de las patentes de EE.UU. n.º 7.892.564; 7.749.745; 7.364.893; 6.953.661; 6.913.751; 6.740.324; 6.613.892; 6.410.033; 6.140.114; 6.103.531; 6.033.671; 5.908.780; 5.906.935; 5.874.279; 5.853.733; 5.846.806; 5.843.458; 5.837.532; 5.804.372; 5.753.476; 5.741.696; 5.731.188; 5.720.957; 5.676.952; 5.599.544; 5.593.873 y 5.334.498.

En una realización de la divulgación en la que se desea una infección repetida de un vector, cualquier vector, ventajosamente un vector vírico, puede expresar una o más de las glicoproteínas homólogos de RhCMV Rh182, Rh184, Rh185, Rh189. En una realización particularmente ventajosa, el vector expresa las glicoproteínas homólogos de RhCMV Rh182, Rh184, Rh185 y Rh189. En una realización ventajosa, una o más de las glicoproteínas Rh182, Rh184, Rh185 y Rh189 pueden incluir, pero sin limitación, las glicoproteínas de las patentes de EE.UU. n.º 7.635.485; 7.323.619; 6.964.762; 6.712.612; 6.544.780; 6.426.196; 6.391.632; 5.858.740; 5.834.256; 5.767.250 y 5.750.106.

La presente invención engloba un método de determinación de la eficacia de una vacuna contra el CMV. Actualmente, la eficacia de las vacunas contra el CMV es difícil de medir, porque el CMV superinfecta fácilmente a los individuos inmunes al CMV. La invención comprende (a) administrar una vacuna contra el CMV a un sujeto de ensayo; (b) exponer al sujeto de ensayo a un vector de CMV, en el que las glicoproteínas de dentro de la región US2 a US11 del CMV están eliminadas del vector de CMV y en el que el vector de CMV contiene y expresa al menos un inmunógeno de la vacuna contra el CMV; y (c) medir una respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, en la que la vacuna contra el CMV es eficaz si una respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> es capaz de prevenir la infección con el vector de CMV carente de las glicoproteínas de dentro de la región US2 a US11 de CMV y en el que el vector de CMV contiene y expresa al menos un inmunógeno de la vacuna contra el CMV.

Los solicitantes han infectado macacos Rhesus con RhCMV carente del gen Rh110 que codifica el transactivador vírico pp71. RhCMVΔRh110 es deficiente en el crecimiento *in vitro* y se atenúa *in vitro*, ya que no se secreta de monos infectados (véase la FIG. 22). Por lo tanto, RhCMVΔRh110 representa un ejemplo para una vacuna atenuada contra el CMV. Los solicitantes probaron si los monos infectados con RhCMVΔRh110 estaban protegidos contra la estimulación con RhCMVΔUS2-11 que expresaba el antígeno de SIV Gag como marcador inmunológico. La protección contra la infección con RhCMVΔUS2-11 se demostró por la ausencia de un refuerzo en las respuestas de los linfocitos T específicos del RhCMV y la ausencia de una respuesta inmune específica de SIVgag. Por el contrario, los monos infectados con el virus de tipo silvestre normalmente muestran un refuerzo de la respuesta de los linfocitos T específicos de CMV y desarrollan una respuesta *de novo* a SIVgag (véase la FIG. 43). Este resultado indica que el CMV atenuado con deficiencia de propagación es capaz de inducir una respuesta de los linfocitos T que protege contra la exposición al virus con eliminación de US2-11. Este resultado también indica que se puede usar un virus con eliminación de US2-11 para controlar la eficacia de la respuesta de los linfocitos T. Debido a las similitudes entre RhCMV y HCMV, los solicitantes creen que se puede usar un vector de CMV que carece de pp71 como una vacuna contra el CMV. Los solicitantes creen además que se puede validar una vacuna contra HCMV mediante la exposición al HCMV que carece de US2-11.

En un experimento similar, los solicitantes crearon un RhCMV que carecía de las proteínas de tegumento pp65a y pp65b codificadas por los genes Rh111 y Rh112, respectivamente (véase la FIG. 24). Estas proteínas no son necesarias para el crecimiento vírico *in vitro* o *in vivo*, puesto que los solicitantes observaron que RhCMVΔRh111-112 es secretado a partir de animales infectados. Sin embargo, pp65 es una proteína inmunodominante que se incluye en formulaciones corrientes de vacunas de subunidades para el CMV desarrolladas por diversos investigadores. Para examinar si los linfocitos T específicos de pp65 son necesarios para la protección contra la exposición a ΔUS2-11, los solicitantes infectaron macacos Rhesus con RhCMVΔRh111-112. Como era de esperar, los solicitantes observaron una respuesta inmune contra las proteínas IE de CMV, pero no contra pp65. Por el contrario, se detectó fácilmente una respuesta de los linfocitos T específicos de pp65 en animales infectados con RhCMV (línea azul). Los solicitantes probaron si los monos infectados con RhCMVΔRh111-2 están protegidos contra la exposición a RhCMVΔUS2-11 que expresa el antígeno de SIV Gag como marcador inmunológico. La protección contra la infección por RhCMVΔUS2-11 se demostró por la ausencia de un refuerzo en las respuestas de los linfocitos T específicos de RhCMV y la ausencia de una respuesta inmune específica de SIVgag (véase la FIG. 25). Por el contrario, los monos infectados con el virus de tipo silvestre normalmente muestran un refuerzo de la respuesta de los linfocitos T específicos de CMV y desarrollan una respuesta *de novo* a SIVgag (véase la FIG. 25).

La presente divulgación también se refiere a un método de inducción e una respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> diferente en un animal, que puede comprender (a) administrar un vector de CMV con al menos una glicoproteína de citomegalovirus (CMV) eliminada del vector de CMV, en el que la glicoproteína es US2, US3, US6 o US11, y en el que el vector de CMV contiene y expresa al menos un inmunógeno; y (b) administrar el vector al animal o ser humano, difiriendo la respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el animal o ser humano en comparación con un vector de CMV que contiene y expresa el mismo inmunógeno y en el que una glicoproteína de CMV no está eliminada del vector de CMV.

La presente divulgación también se refiere a un método de inducción de una respuesta diferente de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de un patógeno en un animal, que puede comprender (a) administrar un vector de CMV con al menos una glicoproteína de citomegalovirus (CMV) eliminada del vector de CMV, en el que la glicoproteína es US2, US3, US6 o US11, y en el que el vector de CMV contiene y expresa al menos un inmunógeno derivado de patógeno; y (b) administrar el vector al animal, en el que la respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el animal difiere en comparación con una vacuna contra el CMV con un vector de CMV que contiene y expresa el mismo inmunógeno y en el que una glicoproteína de CMV no está eliminada del vector de CMV.

5 Ventajosamente, el animal es un ser humano.

El patógeno puede ser un patógeno vírico, y el inmunógeno puede ser una proteína derivada del patógeno vírico. Los virus incluyen, pero sin limitación, Adenovirus, coxsackievirus, virus de la hepatitis A, poliovirus, rinovirus, Herpes simple, tipo 1, Herpes simple, tipo 2, virus de varicela-zoster, virus Epstein-barr, citomegalovirus humano, herpesvirus humano, tipo 8, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus del Nilo Occidental, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la gripe, virus del sarampión, virus de las paperas, virus paragripal, virus respiratorio sincitial, metapneumovirus humano, virus del papiloma humano, virus de la rabia, virus de la rubéola, bocavirus humano y parvovirus B19.

El patógeno puede ser un patógeno bacteriano, y el inmunógeno puede ser una proteína derivada del patógeno bacteriano. Las bacterias patógenas incluyen, pero sin limitación, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus gripee*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsii*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholera* y *Yersinia pestis*.

El patógeno puede ser un parásito, y el inmunógeno puede ser una proteína derivada del patógeno parásito. El parásito puede ser un organismo protozoario o enfermedad causada por un organismo protozoario tal como, pero sin limitación, Acanthamoeba, Babesiosis, Balantidiasis, Blastocistosis, Coccidia, Dientamoebiasis, Amibiasis, Giardia, Isosporiasis, Leishmaniasis, meningoencefalitis amebiana primaria (PAM), malaria, rinosporidiosis, toxoplasmosis-neumonía parasitaria, tricomonirosis, enfermedad del sueño y enfermedad de Chagas. El parásito puede ser un organismo helminto o gusano o una enfermedad causada por un organismo helminto tal como, pero sin limitación, ancilostomiasis/anguinosis, anisakiasis, neumonía por ascárides-parásito, ascárides - Baylisascariosis, tenia - infección por tenia, Clonorchiasis, infección por *Dioctophyme renalis*, difilobotriasis - tenia, gusano de Guinea - Dracunculiasis, equinococosis - tenia, oxiuro - enterobiasis, esquistosomiasis hepática - fasciolosis, fasciolopsiasis - esquistosomiasis intestinal, gnatostomiasis, himenolepiasis, filariosis Loa loa, hinchazón de Calabar, mansoneliasis, filariasis, metagonimiasis - esquistosomiasis intestinal, oncocercosis, esquistosomiasis hepática china, paragonimiasis, esquistosomiasis pulmonar - bilharzia, bilharziosis o fiebre del caracol (todos los tipos), esquistosomiasis intestinal, esquistosomiasis urinaria, esquistosomiasis por *Schistosoma japonicum*, esquistosomiasis intestinal asiática, esparganosis, estrombiloidiasis-neumonía parasitaria, tenia de la carne de vaca, tenia de cerdo, toxocariasis, triquinosis, picazón del nadador, gusano de lagartija y elefantiasis filariasis linfática. El parásito puede ser un organismo o una enfermedad causada por un organismo tal como, pero sin limitación, gusano parásito, síndrome de Halzoun, miasis, pulga de Chigoe, Botfly humano y Candiru. El parásito puede ser un ectoparásito o una enfermedad causada por un ectoparásito tal como, pero sin limitación, chinche, piojo de la cabeza-pediculosis, piojo del cuerpo-pediculosis, piojo de cangrejo-pediculosis, Demodex-demodicosis, sarna, gusano de chorlito y *Cochliomyia*.

El patógeno puede ser un cáncer, y el inmunógeno puede ser una proteína derivada del cáncer. Los cánceres incluyen, pero sin limitación, leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; carcinoma adrenocortical; cánceres relacionados con el SIDA; linfoma relacionado con el SIDA; cáncer anal; cáncer de apéndice; astrocitoma, cerebeloso o cerebral infantil; carcinoma de células Basales; cáncer del conducto biliar, extrahepático; cáncer de vejiga; cáncer óseo, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno; glioma del tronco encefálico; tumor cerebral; tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso; tumor cerebral, astrocitoma cerebral/glioma maligno; tumor cerebral, ependimoma; tumor cerebral, meduloblastoma; tumor cerebral, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales; tumor cerebral, vía visual y glioma hipotalámico; cáncer de mama; adenomas/carcinoides bronquiales; linfoma de Burkitt; tumor carcinoide, infantil; tumor carcinoide, gastrointestinal; carcinoma de primario desconocido; linfoma del sistema nervioso central, primario; astrocitoma cerebeloso, infantil; astrocitoma cerebral/glioma maligno, infantil; cáncer de cuello uterino; cánceres infantiles; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; trastornos mieloproliferativos crónicos; cáncer de colon; linfoma cutáneo de los linfocitos T; tumor desmoplásico de células redondas pequeñas; cáncer endometrial; ependimoma; cáncer de esófago; sarcoma de Ewing de la familia de tumores de Ewing; tumor de células germinales extracraneales, infantil; tumor de células germinales extragonadales;

cáncer de vías biliares extrahepáticas; cáncer ocular, melanoma intraocular; cáncer ocular, retinoblastoma; cáncer de la vesícula biliar; cáncer gástrico (estómago); tumor carcinoide gastrointestinal; tumor estromal gastrointestinal (GIST); tumor de células germinales: extracraneal, extragonadal u ovárico; tumor trofoblástico gestacional; glioma del tronco encefálico; glioma, astrocitoma cerebral infantil; glioma, vía visual de la infancia e hipotalámico; carcinoide gástrico; leucemia de células pilosas; cáncer de cabeza y cuello; cáncer del corazón; cáncer hepatocelular (hepático); linfoma de Hodgkin; cáncer hipofaríngeo; glioma hipotalámico y de la vía visual, infantil; melanoma intraocular; carcinoma de células de los islotes (páncreas endocrino); sarcoma de Kaposi; cáncer de riñón (cáncer de células renales); cáncer laríngeo; leucemias; leucemia, linfoblástica aguda (también denominada leucemia linfocítica aguda); leucemia mieloide aguda (también denominada leucemia mielógena aguda); leucemia, linfocítica crónica (también denominada leucemia linfocítica crónica); leucemia, mielógena crónica (también denominada leucemia mieloide crónica); leucemia, célula pilosa; cáncer de labio y cavidad oral; cáncer de hígado (primario); cáncer de pulmón, no microcítico; cáncer de pulmón, microcítico; linfomas; linfoma relacionado con el SIDA; linfoma, Burkitt; linfoma cutáneo de los linfocitos T; linfoma, Hodgkin; linfomas, no Hodgkin (una antigua clasificación de todos los linfomas, excepto los de Hodgkin); linfoma, sistema nervioso central primario; Marcus Whittle, enfermedad mortal; macroglobulinemia, Waldenström; histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma; meduloblastoma, infantil; melanoma; melanoma intraocular (Ojo); carcinoma de células de Merkel; mesotelioma, adulto maligno; mesotelioma, infantil; cáncer de cuello escamoso metastásico con primaria oculta; cáncer de la boca; síndrome de neoplasia endocrina múltiple, infantil; mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas; micosis fungoides; síndromes de mielodisplasia; enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas; leucemia mielógena, crónica; leucemia mieloide, aguda adulta; leucemia mieloide infantil aguda; mieloma, múltiple (cáncer de la médula ósea); trastornos mieloproliferativos crónicos; cáncer de la cavidad nasal y seno paranasal; carcinoma nasofaríngeo; neuroblastoma; linfoma de no Hodgkin; cáncer de pulmón no microcítico; cáncer oral; cáncer orofaríngeo; osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso; cáncer de ovarios; cáncer epitelial ovárico (tumor epitelial-estromal superficial); tumor de células germinales ováricas; tumor maligno de bajo potencial ovárico; cáncer de páncreas; cáncer pancreático, célula de los islotes; cáncer de seno paranasal y cavidad nasal; cáncer de paratiroides; cáncer de pene; cáncer faríngeo; feocromocitoma; astrocitoma pineal; germinoma pineal; pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, infantil; adenoma pituitario; neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple; blastoma pleuropulmonar; linfoma primario del sistema nervioso central; cáncer de próstata; cáncer de recto; carcinoma de células renales (cáncer de riñón); pelvis renal y uréter, cáncer de células de transición; retinoblastoma; Rhabdomyosarcoma, infantil; cáncer de la glándula salival; sarcoma, familia de tumores de Ewing; sarcoma, Kaposi; sarcoma, tejido blando; sarcoma, uterino; síndrome de Sezary; cáncer de piel (no melanoma); cáncer de piel (melanoma); carcinoma cutáneo, célula de Merkel; cáncer de pulmón microcítico; cáncer del intestino delgado; sarcoma de tejido blando; carcinoma de células escamosas – véase el cáncer de piel (no melanoma); cáncer de cuello escamoso con primario oculto, metastásico; cáncer de estómago; tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial, infantil; linfoma de los linfocitos T, cutáneo (micosis fungoide y síndrome de Sezary); cáncer testicular; cáncer de garganta; timoma, infantil; timoma y carcinoma tímico; cáncer de tiroides; cáncer de tiroides, infantil; cáncer de células de transición de pelvis renal y uréter; tumor trofoblástico, gestacional; carcinoma de sitio primario desconocido, adulto; carcinoma de sitio primario desconocido, infantil; pelvis renal y uréter, cáncer de células de transición; cáncer de uretra; cáncer uterino, de endometrio; sarcoma uterino; cáncer vaginal; glioma de vía visual e hipotalámico, infantil, cáncer vulvar, macroglobulinemia de Wilms (cáncer renal), infantil.

Los solicitantes demuestran que el vector con eliminación de US2-11 puede inducir una respuesta inmune cualitativamente diferente a un antígeno heterólogo en comparación con un virus de tipo silvestre recombinante (véanse las FIG. 19 y 20). Los solicitantes inoculan animales que portan diferentes vectores con eliminación de US2-11 que expresan antígenos de SIV y que examinan respuestas de los linfocitos T a antígenos SIV tales como gag, retanf, env y pol, que se usan para vacunar macacos Rhesus (MR) sin tratamiento previo de CMV contra SIV. La respuesta de los linfocitos T se determina como se indica a continuación.

Es un objeto de la divulgación proporcionar un citomegalovirus recombinante (CMV).

La invención se refiere a dicho recombinante que contiene ADN exógeno, preferentemente en una región no esencial, y que tiene una o más glicoproteínas US2, US3, US6 y US11, eliminadas del mismo.

Es también un objeto de la divulgación proporcionar un ADN exógeno que contenga CMV recombinante.

Otros objetos de la divulgación incluyen cualquiera o todos los de: proporcionar productos de expresión de dichos recombinantes, métodos de expresión de productos de dichos recombinantes, composiciones que contienen los recombinantes o los productos de expresión, métodos de uso de los productos de expresión, métodos de uso de las composiciones, ADN de los recombinantes y métodos de replicación de ADN de los recombinantes.

Por consiguiente, la invención se refiere un CMV modificado sintéticamente para contener en el mismo ADN exógeno. Ventajosamente, el CMV ha tenido una o más glicoproteínas US2, US3, US6 y US11, eliminadas del mismo.

La divulgación también se refiere a cualquier vector vírico que contenga y exprese una o más glicoproteínas de CMV

US2, US3, US6 y US11.

La divulgación proporciona además un vector para la clonación o expresión de ADN heterólogo que comprende el CMV recombinante.

5 El ADN heterólogo codifica un producto de expresión que comprende: un epítipo de interés, un modulador de respuesta biológica, un factor de crecimiento, una secuencia de reconocimiento, un gen terapéutico o una proteína de fusión.

10 Un epítipo de interés es un antígeno o inmunógeno o fragmento inmunológicamente activo del mismo de un patógeno o una toxina de interés veterinario o humano.

15 Un epítipo de interés puede ser un antígeno de patógeno o toxina, o de un antígeno de un patógeno o toxina, u otro antígeno o toxina que genere una respuesta con respecto al patógeno, de otro antígeno o toxina que genere una respuesta con respecto al patógeno.

20 Un epítipo de interés puede ser un antígeno de un patógeno humano o de una toxina humana, o de un antígeno de un patógeno humano o de una toxina humana, u otro antígeno o toxina que genere una respuesta con respecto al patógeno, o de otro antígeno o toxina que genere una respuesta con respecto al patógeno, tal como, por ejemplo: un antígeno de Morbillivirus, por ejemplo, un antígeno del virus del sarampión tal como HA o F; una glicoproteína de la rabia, por ejemplo, glicoproteína G del virus de la rabia; un antígeno de la gripe, por ejemplo, el virus de la gripe HA o N; un antígeno de Herpesvirus, por ejemplo, una glicoproteína de un virus del herpes simple (HSV), un citomegalovirus humano (HCMV), Epstein-Barr; un antígeno de flavivirus, un JEV, un virus de la fiebre amarilla o antígeno del virus del dengue; un antígeno del virus de la hepatitis, por ejemplo, HBsAg; un antígeno del virus de la inmunodeficiencia, por ejemplo, un antígeno del VIH tal como gp120, gp160; un antígeno del virus Hantaan; un antígeno de *C. tetani*; un antígeno de parotiditis; un antígeno neumocócico, por ejemplo, PspA; un antígeno de *Borrelia*, por ejemplo, OspA, OspB, OspC de *Borrelia* asociado con la enfermedad de Lyme tal como *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia atzelli* y *Borrelia garinii*; un antígeno de la varicela (varicela zoster); o un antígeno de *Plasmodium*.

30 Ventajosamente, el epítipo de interés es un antígeno de inmunodeficiencia, ventajosamente VIH o SIV.

35 Como es evidente, las listas anteriores pretenden ser ilustrativas, ya que el epítipo de interés puede ser un antígeno de cualquier patógeno veterinario o humano, o de cualquier antígeno de cualquier patógeno veterinario o humano.

40 Dado que el ADN heterólogo puede ser un factor de crecimiento o un gen terapéutico, el CMV recombinante se puede usar en terapia génica. La terapia génica implica la transferencia de información genética; y, con respecto a la terapia génica y la inmunoterapia, se hace referencia a la patente de EE.UU. n.º 5.252.479, que se incorpora en el presente documento por referencia, junto con los documentos citados en la misma y en su cara, y al documento WO 94/16716 y la solicitud de patente de EE.UU. n.º 08/184.009, presentada el 19 de enero de 1994, cada una de las cuales se incorpora también en el presente documento por referencia, junto con los documentos citados en el mismo. El factor de crecimiento o el gen terapéutico, por ejemplo, pueden codificar una proteína que combata la enfermedad, una molécula para tratar el cáncer, un supresor de tumores, una citocina, un antígeno asociado a un tumor o interferón; y el factor de crecimiento o el gen terapéutico puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en un gen que codifica alfa-globina, beta-globina, gamma-globina, factor de estimulación de colonias de macrófagos de granulocitos, factor de necrosis tumoral, una interleucina, factor de estimulación de colonias de macrófagos, factor de estimulación de colonias de granulocitos, eritropoyetina, factor de crecimiento de mastocitos, supresor de tumores p53, retinoblastoma, interferón, antígeno asociado al melanoma o B7.

50 La divulgación proporciona además una composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna que contenga el virus o vector de CMV recombinante, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Una composición inmunológica que contenga el virus o el vector de CMV recombinante (o un producto de expresión del mismo) genera una respuesta inmunológica local o sistémica. La respuesta puede, pero no necesita ser, protectora. Una composición inmunogénica que contiene el virus o vector de CMV recombinante (o un producto de expresión del mismo) también genera una respuesta inmunológica local o sistémica que puede, pero no necesita ser, protectora. Una composición de vacuna genera una respuesta protectora local o sistémica. Por consiguiente, las expresiones "composición inmunológica" y "composición inmunogénica" incluyen una "composición de vacuna" (pues las dos expresiones anteriores pueden ser composiciones protectoras).

60 Por lo tanto, la divulgación también proporciona un método de inducción de una respuesta inmunológica en un vertebrado hospedador que comprende administrar al hospedador una composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna que comprenda el virus o vector de CMV recombinante y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Para los fines de la presente memoria descriptiva, "animal" incluye todas las especies de vertebrados, excepto seres humanos; y "vertebrado" incluye todos los vertebrados, incluyendo animales (como se usa "animal" en el presente documento) y seres humanos. Y, como es evidente, un subconjunto de "animal" es "mamífero", que para los fines de esta memoria descriptiva incluye todos los mamíferos, a excepción de los seres humanos.

5 La divulgación proporciona incluso una composición terapéutica que contiene el virus o vector de CMV recombinante y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica es útil en la terapia génica y las realizaciones de inmunoterapia de la divulgación, por ejemplo, en un método para transferir información genética a un animal o ser humano que lo necesite, que comprende administrar al hospedador la composición; y, por consiguiente, la divulgación incluye métodos para transferir información genética.

10 En otra realización más, la divulgación se refiere un método de expresión de una proteína o un producto génico o un producto de expresión que comprende infectar o transfectar una célula *in vitro* con un virus o vector de CMV recombinante de la invención y, opcionalmente, extraer, purificar o aislar la proteína, el producto génico o producto de expresión o ADN de la célula. La divulgación proporciona además un método de clonación o replicación de una secuencia de ADN heteróloga que comprende infectar o transfectar una célula *in vitro* o *in vivo* con un virus o vector de CMV recombinante de la invención y, opcionalmente, extraer, purificar o aislar el ADN de la célula o virus de la progenie.

15 La divulgación, en otro aspecto, proporciona un método de preparación del virus o vector de CMV recombinante para su uso en la invención que comprende insertar el ADN exógeno en una región no esencial del genoma del CMV.

20 El método puede comprender además la eliminación de una región no esencial del genoma del CMV, preferentemente antes de insertar el ADN exógeno.

25 El método puede comprender la recombinación *in vivo*. Por lo tanto, el método puede comprender transfectar una célula con ADN de CMV en un medio compatible con células en presencia de ADN donante que comprenda el ADN exógeno flanqueado por secuencias de ADN homólogas con partes del genoma de CMV, mediante lo que el ADN exógeno se introduce en el genoma del CMV y, opcionalmente, después la recuperación del CMV modificado mediante la recombinación *in vivo*.

30 El método también puede comprender la escisión de ADN de CMV para obtener ADN de CMV escindido, ligando el ADN exógeno al ADN de CMV escindido para obtener ADN exógeno de CMV híbrido, transfiriendo una célula con el ADN exógeno de CMV híbrido y, opcionalmente, recuperando luego el CMV modificado mediante la presencia del ADN exógeno.

35 Dado que se engloba la recombinación *in vivo*, la divulgación también proporciona un plásmido que comprende ADN donante que no se da de manera natural en el CMV que codifica un polipéptido foráneo al CMV, el DNA donante está dentro de un segmento de ADN de CMV que, de otro modo, sería colineal con una proteína región no esencial del genoma del CMV de modo que el ADN de una región no esencial de CMV está flanqueando el ADN donante.

40 El ADN exógeno puede insertarse en el CMV para generar el CMV recombinante en cualquier orientación que proporcione una integración estable de ese ADN, y su expresión, cuando se desee.

45 El ADN exógeno en el virus o vector de CMV recombinante de la divulgación puede incluir un promotor. El promotor puede provenir de un herpesvirus. Por ejemplo, el promotor puede ser un promotor de citomegalovirus (CMV), tal como un promotor de CMV humano (CMVH) o un promotor de CMV murino.

50 El promotor puede ser un promotor transcripcionalmente activo truncado que comprenda una región transactivada con una proteína de transactivación proporcionada por el virus y la región promotora mínima del promotor de longitud completa a partir de la cual se deriva el promotor transcripcionalmente activo truncado. Para los fines de la presente memoria descriptiva, un "promotor" se compone de una asociación de secuencias de ADN que corresponden al promotor mínimo y secuencias reguladoras cadena arriba. Un "promotor mínimo" se compone del sitio CAP más la caja TATA (secuencias mínimas para el nivel básico de transcripción, nivel no regulado de transcripción); y "secuencias reguladoras cadena arriba" se componen de uno o varios elementos cadena arriba y de una o varias secuencias potenciadoras. Además, el término "truncado" indica que el promotor de longitud completa no está totalmente presente, es decir, que se ha eliminado alguna parte del promotor de longitud completa. Además, el promotor truncado puede derivarse de un herpesvirus tal como MCMV o HCMV, por ejemplo, HCMV-IE o MCMV-IE.

60 Al igual que el promotor mencionado anteriormente, el promotor de la invención es preferentemente un herpesvirus, por ejemplo, un MCMV o HCMV tal como el promotor MCMV-IE o HCMV-IE; y, puede haber hasta un 40 % e incluso hasta un 90 % de reducción en el tamaño, a partir de un promotor de longitud completa, basándose en pares de bases.

65 Por lo tanto, la divulgación también proporciona un casete de expresión para su inserción en un virus o plásmido recombinante que comprende el promotor transcripcionalmente activo truncado. El casete de expresión puede incluir además una señal de poliadenilación truncada funcional; por ejemplo, una señal de poliadenilación de SV40 que está truncada, pero funcional. Teniendo en cuenta que la naturaleza proporciona una señal mayor, es de hecho

sorprendente que una señal de poliadenilación truncada sea funcional; y una señal de poliadenilación truncada aborda los problemas de limitación del tamaño de la inserción de virus recombinantes tales como CMV. El casete de expresión también puede incluir ADN exógeno o heterólogo con respecto al virus o sistema en el que se inserte; y que el ADN puede ser ADN exógeno o heterólogo como se describe en el presente documento.

En un aspecto más específico, la presente divulgación engloba CMV, recombinantes que comprenden el promotor de HCMV-IE o MCMV-IE, preferentemente un promotor truncado de los mismos. Preferentemente, el promotor de HCMV-IE o MCMV-IE o un promotor truncado de los mismos son transactivados por productos génicos inducidos por el CMV.

La divulgación comprende además anticuerpos generados por las composiciones y/o los recombinantes de la divulgación y usos para dichos anticuerpos. Los anticuerpos, o el producto (epítomos de interés) que los generan, o anticuerpos monoclonales de los anticuerpos, se pueden usar en ensayos de unión, pruebas o kits para determinar la presencia o ausencia de un antígeno o anticuerpo.

El ADN flanqueante usado en la invención puede ser del sitio de inserción o de una parte del genoma adyacente al mismo (en el que "adyacente" incluye secuencias contiguas, por ejemplo, codón o codones, así como hasta tantas secuencias, por ejemplo codón o codones, antes de que haya un sitio de inserción intermedio).

El ADN exógeno o heterólogo (o ADN foráneo al CMV, o ADN que no ocurre de manera natural en el CMV) puede ser ADN que codifica cualquiera de los epítomos de interés anteriormente mencionados, como se ha enumerado anteriormente. El ADN exógeno puede incluir un marcador, por ejemplo, un marcador de color o luz. El ADN exógeno también puede codificar para un producto que sería perjudicial para un insecto hospedador de manera que el producto de expresión pueda ser un pesticida o insecticida. El ADN exógeno también puede codificar un polipéptido antifúngico; y, para la información sobre dicho polipéptido y ADN para el mismo, se hace referencia a la patente de EE.UU. n.º 5.421.839 y los documentos citados en la misma, incorporados en el presente documento por referencia.

El ADN heterólogo o exógeno de los recombinantes usados en la invención codifica preferentemente un producto de expresión que comprende: un epítomo de interés, un modulador de respuesta biológica, un factor de crecimiento, una secuencia de reconocimiento, un gen terapéutico o una proteína de fusión. Con respecto a estos términos, se hace referencia a la siguiente descripción y, en general, a Kendrew, "THE ENCYCLOPEDIA OF MOLECULAR BIOLOGY" (Blackwell Science Ltd 1995) y Sambrook, Fritsch, Maniatis, Molecular Cloning, "A LABORATORY MANUAL" (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

En cuanto a los antígenos para su uso en vacunas o composiciones inmunológicas, véase también "Stedman's Medical Dictionary" (24ª edición, 1982, por ejemplo, la definición de vacuna (para una lista de antígenos usados en formulaciones de vacunas, dichos antígenos o epítomos de interés de esos antígenos se pueden usar en la invención, ya sea como un producto de expresión del virus recombinante de la invención, o en una composición multivalente que contiene un virus recombinante de la invención o un producto de expresión del mismo).

En cuanto a los epítomos de interés, un experto en la materia puede determinar un epítomo o una región inmunodominante de un péptido o polipéptido y ergo el ADN codificante del mismo a partir del conocimiento de las secuencias de aminoácidos y de ADN correspondientes del péptido o polipéptido, así como de la naturaleza de los aminoácidos particulares (por ejemplo, tamaño, carga, etc.) y el diccionario de codones, sin necesidad de experimentación.

Un método general para determinar qué partes de una proteína se usan en una composición inmunológica se centra en el tamaño y en la secuencia del antígeno de interés. "En general, las proteínas grandes, debido a que tienen más determinantes potenciales, son mejores antígenos que las pequeñas. Cuanto más foráneo sea un antígeno, es decir, menos similar a las configuraciones propias que inducen tolerancia, más eficaz es en provocar una respuesta inmune". Ivan Roitt, *Essential Immunology*, 1988.

En cuanto al tamaño: el experto en la materia puede aumentar al máximo el tamaño de la proteína codificada por la secuencia de ADN que se va a insertar en el vector vírico (teniendo en cuenta las limitaciones de empaquetamiento del vector). Para reducir al mínimo el ADN insertado mientras se aumenta al máximo el tamaño de la proteína expresada, la secuencia de ADN puede excluir intrones (regiones de un gen que se transcriben pero que posteriormente se escinden de la transcripción de ARN primaria).

Como mínimo, la secuencia de ADN puede codificar un péptido de al menos 8 o 9 aminoácidos de longitud. Esta es la longitud mínima que un péptido necesita para estimular una respuesta de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (que reconoce células infectadas por virus o células cancerosas). Una longitud peptídica mínima de 13 a 25 aminoácidos es útil para estimular una respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (que reconoce las células presentadoras de antígenos especiales que han engullido al patógeno). Véase Kendrew, *supra*. Sin embargo, como éstas son longitudes mínimas, es probable que estos péptidos generen una respuesta inmunológica, es decir, un anticuerpo o una respuesta de los linfocitos T; pero, para una respuesta protectora (como a partir de una composición de vacuna), se

prefiere un péptido más largo.

Con respecto a la secuencia, la secuencia de ADN codifica preferentemente al menos regiones del péptido que generan una respuesta de anticuerpo o una respuesta de los linfocitos T. Un método de determinación de los epítomos de los linfocitos T y B implica la cartografía de epítomos. La proteína de interés "se fragmenta en péptidos solapantes con enzimas proteolíticas. A continuación, los péptidos individuales se ensayan para determinar su capacidad para unirse a un anticuerpo generado por la proteína nativa o para inducir la activación de los linfocitos T o linfocitos B. Este enfoque ha sido particularmente útil en la cartografía de los epítomos de los linfocitos T, ya que el linfocito T reconoce los péptidos lineales cortos complejados con moléculas de MHC (véase la FIG. 20). El método es menos eficaz para determinar los epítomos de los linfocitos B" puesto que los epítomos de los linfocitos B no suelen ser una secuencia de aminoácidos lineal, sino que, más bien, resultan de la estructura terciaria de la proteína tridimensional plegada. Janis Kuby, *Immunology*, (1992), pág. 79-80.

Otro método de determinación de un epítomo de interés es elegir las regiones de la proteína que son hidrófilas. Los restos hidrófilos suelen estar en la superficie de la proteína y, por lo tanto, suelen ser las regiones de la proteína que son accesibles al anticuerpo. Janis Kuby, *Immunology*, (1992) pág. 81.

Otro método de determinación de un epítomo de interés es realizar un análisis cristalográfico por rayos X del complejo de antígeno (de longitud completa)-anticuerpo. Janis Kuby, *Immunology*, (1992) pág. 80.

Otro método más para elegir un epítomo de interés que pueda generar una respuesta de los linfocitos T es identificar de la secuencia de proteínas los motivos potenciales de unión de anclaje de HLA, que son secuencias de péptidos que se sabe que es probable que se unan a la molécula de MHC.

El péptido que es un epítomo putativo de interés, para generar una respuesta de los linfocitos T, debe presentarse en un complejo de MHC. El péptido contiene preferentemente motivos de anclaje apropiados para la unión a las moléculas de MHC, y debería unirse con afinidad suficientemente alta para generar una respuesta inmune. Los factores que se pueden considerar son: el tipo HLA del paciente (vertebrado, animal o ser humano) que se espera inmunizar, la secuencia de la proteína, la presencia de motivos de anclaje apropiados y la aparición de la secuencia peptídica en otras células vitales.

Una respuesta inmune se genera, en general, de la siguiente manera: los linfocitos T reconocen las proteínas solo cuando la proteína ha sido escindida en péptidos más pequeños y se presenta en un complejo denominado "complejo principal de histocompatibilidad MHC" situado en la superficie de otra célula. Hay dos clases de complejos de MHC-clase I y clase II, y cada clase está compuesta de muchos alelos diferentes. Diferentes pacientes tienen diferentes tipos de alelos de complejos de MHC; se dice que tienen un tipo de HLA diferente.

Los complejos de MHC de Clase I se encuentran en casi cada célula, y presentan péptidos de proteínas producidas dentro de la célula. Por lo tanto, los complejos de MHC de Clase I son útiles para destruir células que cuando son infectadas por virus o que se han vuelto cancerosas y como resultado de la expresión de un oncogén. Los linfocitos T que tienen una proteína denominada CD8 en su superficie se unen a las células de MHC de clase I y secretan linfocinas. Las linfocinas estimulan una respuesta; las células llegan y destruyen a las células infectadas por el virus.

Los complejos de MHC de Clase II se encuentran solamente en células presentadoras de antígeno, y se usan para presentar péptidos de patógenos circulantes que han sido endocitados por las células presentadoras de antígeno. Los linfocitos T que tienen una proteína denominada CD4 se unen a las células de MHC de clase II y destruyen a la célula por exocitosis de gránulos líticos.

Algunas pautas para determinar si una proteína es un epítomo de interés que estimulará una respuesta de los linfocitos T incluyen: la longitud del péptido - el péptido debe tener al menos 8 o 9 aminoácidos de longitud para encajar en el complejo del MHC de clase I y al menos de 13 a 25 aminoácidos de longitud para encajar en un complejo de MHC de clase II. Esta longitud es un mínimo para que el péptido se una al complejo de MHC. Se prefiere que los péptidos sean más largos que estas longitudes, porque las células pueden cortar los péptidos expresados. El péptido debe contener un motivo de anclaje apropiado que le permita unirse a las diversas moléculas de clase I o clase II con una especificidad suficientemente alta para generar una respuesta inmune (véase Bocchia, M. *et al*, "Specific Binding of Leukemia Oncogene Fusion Protein Peptides to HLA Class I Molecules", *Blood* 85:2680-2684; Englehard, V H, "Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules", *Ann. Rev. Immunol.* 12:181 (1994)). Esto puede hacerse, sin excesiva experimentación, comparando la secuencia de la proteína de interés con las estructuras publicadas de péptidos asociados con las moléculas de MHC. Los epítomos de proteínas reconocidos por los receptores de los linfocitos T son péptidos generados por degradación enzimática de la molécula proteica, y se pretensan en la superficie celular en asociación con moléculas MHC de clase I o clase II.

Además, el experto en la materia puede determinar un epítomo de interés comparando la secuencia de proteínas con las secuencias enumeradas en la base de datos de proteínas. Las regiones de la proteína que comparten poca o ninguna homología son mejores opciones para ser un epítomo de esa proteína y, por lo tanto, son útiles en una

vacuna o composición inmunológica. Se han de evitar las regiones que comparten una gran homología con las secuencias ampliamente encontradas presentes en las células vitales.

5 Es más, otro método es simplemente generar o expresar partes de una proteína de interés, generar anticuerpos monoclonales hacia aquellas partes de la proteína de interés, y luego determinar si dichos anticuerpos inhiben el crecimiento *in vitro* del patógeno del que la proteína se derivó. El experto en la materia puede usar las otras directrices expuestas en la presente divulgación y en la técnica para generar o expresar partes de una proteína de interés para el análisis en cuanto a si los anticuerpos a la misma inhiben el crecimiento *in vitro*. Por ejemplo, el  
10 experto en la materia puede generar partes de una proteína de interés mediante: la selección de 8 a 9 o 13 a 25 partes de longitud de aminoácidos de la proteína, la selección de regiones hidrófilas, la selección de partes que muestran unirse a partir de datos de rayos X del complejo de antígeno (longitud completa)-anticuerpo, seleccionando regiones que difieran en secuencia de otras proteínas, seleccionando posibles motivos de unión al anclaje de HLA, o cualquier combinación de estos métodos u otros métodos conocidos en la técnica.

15 Los epítomos reconocidos por los anticuerpos se expresan en la superficie de una proteína. Para determinar las regiones de una proteína que estimulan con mayor probabilidad una respuesta de anticuerpos, un experto en la materia puede realizar preferentemente un mapa de epítomos, usando los métodos generales descritos anteriormente, u otros métodos de cartografía conocidos en la técnica.

20 Como puede deducirse de lo anterior, sin la necesidad de experimentación, a partir de la presente divulgación y del conocimiento en la técnica, el experto en la materia puede determinar la secuencia de aminoácidos y la correspondiente secuencia de ADN de un epítomo de interés para obtener una respuesta de los linfocitos T, linfocitos B y/o anticuerpos. Además, se hace referencia a Gefter *et al.*, patente de EE.UU. n.º 5.019.384, expedida el 28 de mayo de 1991, y los documentos que cita, incorporada en el presente documento por referencia (cabe señalar, en especial, el apartado de "Bibliografía relevante" de dicha patente, y la columna 13 de dicha patente que desvela que:  
25 "Se ha definido un gran número de epítomos para una amplia variedad de organismos de interés. Son de particular interés los epítomos a los que se dirigen los anticuerpos neutralizantes.

30 Con respecto a la expresión de un modulador de respuesta biológica, se hace referencia a Wohlstadter, "Selection Methods", WO 93/19170, publicado el 30 de septiembre de 1993, y los documentos citados en el mismo, incorporados en el presente documento por referencia.

35 Por ejemplo, un modulador de respuesta biológica modula la actividad biológica; por ejemplo, un modulador de respuesta biológica es un componente modulador tal como una proteína de alto peso molecular asociada con receptores de aminoácidos excitatorios no NMDA y que regula alostéricamente la afinidad de unión a AMPA (véase Kendrew, *supra*). El recombinante de la presente invención puede expresar dicha proteína de alto peso molecular.

40 Más en general, la naturaleza ha proporcionado una serie de precedentes de los moduladores de la respuesta biológica. La modulación de la actividad puede llevarse a cabo a través de mecanismos tan complicados e intrincados como el cambio cuaternario de inducción alostérica a sistemas de simple presencia/ausencia, por ejemplo, expresión/degradación. De hecho, la represión/activación de la expresión de muchas moléculas biológicas está mediada por moléculas cuyas actividades son capaces de ser moduladas a través de una variedad de mecanismos.

45 La Tabla 2 de Neidhardt *et al.*, "Physiology of the Bacterial Cell" (Sinauer Associates Inc., Publishers, 1990), en la página 73, enumera las modificaciones químicas en las proteínas bacterianas. Como se observa en dicha tabla, algunas modificaciones están implicadas en el ensamblaje apropiado y otras modificaciones no lo están, pero en cualquier caso, dichas modificaciones son capaces de provocar la modulación de la función. A partir de esa tabla, se pueden determinar modulaciones químicas análogas para las proteínas de otras células, sin la necesidad de  
50 experimentación.

55 En algunos casos, la modulación de las funciones biológicas puede medirse simplemente a través de la ubicación apropiada/inadecuada de una molécula. Las moléculas pueden funcionar para proporcionar una ventaja o desventaja de crecimiento solo si están dirigidas a un determinado lugar. Por ejemplo, una molécula normalmente no puede ser tomada o usada por una célula, en función de que dicha molécula sea primero degradada por la célula mediante la secreción de una enzima para esa degradación. Así pues, la producción de la enzima por un recombinante puede regular el uso o la captación de la molécula por una célula. Del mismo modo, el recombinante puede expresar una molécula que se une a la enzima necesaria para la captación o el uso de una molécula, regulando así de manera similar su captación o uso.  
60

65 La dirección de la ubicación de las proteínas llevadas a cabo a través de la escisión de péptidos señal de otro tipo de modulación o regulación. En este caso, una actividad catalítica de endoproteasa específica puede ser expresada por el recombinante.

Otros ejemplos de mecanismos a través de los cuales puede producirse la modulación de la función son las poliproteínas de virus de ARN, los efectos alostéricos y el impedimento estérico general covalente y no covalente. El VIH es un ejemplo bien estudiado de un virus de ARN que expresa construcciones de poliproteína no funcionales. En el VIH, "las poliproteínas gag, pol y env se procesan para producir, respectivamente, las proteínas estructurales víricas p17, p24 y p15- transcriptasa inversa e integrasa- y las dos proteínas de envoltura gp41 y gp120" (Kohl *et al.*, PNAS EE.UU. 85: 4686-90 (1988)). La escisión apropiada de las poliproteínas es crucial para la replicación del virus, y los viriones que portan la proteasa de VIH mutante inactiva no son infecciosos. Este es otro ejemplo de la fusión de proteínas que modulan negativamente su actividad. Por lo tanto, es posible construir virus recombinantes que expresan moléculas que interfieren con endoproteasas, o que proporcionan endoproteasas, para inhibir o potenciar la expresión natural de ciertas proteínas (interfiriendo en o potenciando la escisión).

La utilidad funcional de las enzimas también se puede modular modificando su capacidad de catalizar una reacción. Los ejemplos ilustrativos de moléculas moduladas son zimógenos, formación/disociación de complejos funcionales de múltiples subunidades, cadenas de poliproteínas de virus de ARN, interacciones alostéricas, impedimento estérico general (covalente y no covalente) y una variedad de modificaciones químicas tales como fosforilación, metilación, acetilación, adenilación y uridenilación (véase la Tabla 1 de Neidhardt, *supra*, en la página 315 y la Tabla 2 en la página 73).

Los zimógenos son ejemplos de fusiones de proteínas naturales que causan la modulación de la actividad enzimática. Los zimógenos son una clase de proteínas que se convierten en su estado activo a través de proteólisis limitada. Véase la Tabla 3 de Reich, "Proteases and Biological Control". Vol. 2, (1975) en la página 54. La naturaleza ha desarrollado un mecanismo de modulación negativa de la actividad de ciertas enzimas, tales como la tripsina, expresando estas enzimas con secuencias peptídicas "líderes" adicionales en sus extremos amino. Con la secuencia peptídica adicional, la enzima está en el estado de zimógeno inactivo. Tras la escisión de esta secuencia, el zimógeno se convierte en su estado enzimáticamente activo. Las velocidades de reacción globales del zimógeno son "aproximadamente de  $10^5$  a  $10^6$  veces inferiores a las de la enzima correspondiente" (véase la Tabla 3 de Reich, *supra* en la página 54).

Por lo tanto, es posible modular negativamente la función de ciertas enzimas simplemente mediante la adición de una secuencia peptídica a uno de sus extremos. Por ejemplo, con el conocimiento de esta propiedad, un recombinante puede expresar secuencias peptídicas que contienen aminoácidos adicionales en uno o ambos extremos.

La formación o disociación de las enzimas de múltiples subunidades es otra forma a través de la cual puede producirse la modulación. Diferentes mecanismos pueden ser responsables de la modulación de la actividad tras la formación o disociación de enzimas de múltiples subunidades.

Por lo tanto, obstaculizar estéricamente las interacciones específicas apropiadas de la subunidad reducirá la actividad catalítica. Por consiguiente, el recombinante de la divulgación puede expresar una molécula que impida estéricamente una enzima o un complejo enzimático natural, con el fin de modular funciones biológicas.

Ciertos inhibidores enzimáticos proporcionan buenos ejemplos de modulación funcional negativa mediante impedimento estérico covalente o modificación. Los sustratos suicidas que se unen irreversiblemente al sitio activo de una enzima en un aminoácido catalíticamente importante del sitio activo son ejemplos de modificaciones covalentes que bloquean estéricamente el sitio activo enzimático. Un ejemplo de un sustrato suicida es TPCK para la quimotripsina (Fritsch, "Enzyme Structure and Mechanism", 2ª edición, Freeman & Co. Publishers, 1984)). Este tipo de modulación es posible por el recombinante que expresa un sustrato suicida adecuado, para modular con ello las respuestas biológicas (por ejemplo, limitando la actividad enzimática).

También hay ejemplos de impedimento estérico no covalente que incluyen muchas moléculas represoras. El recombinante puede expresar moléculas represoras que sean capaces de obstaculizar estéricamente y, por lo tanto, modular negativamente la función de una secuencia de ADN evitando interacciones de ADN-ARN polimerasa particulares.

Los efectos alostéricos son otra forma a través de la que se lleva a cabo la modulación en algunos sistemas biológicos. La aspartato transcarbamoylase es una enzima alostérica bien caracterizada. La interacción con las subunidades catalíticas son dominios reguladores. Tras la unión a CTP o UTP, las subunidades reguladoras son capaces de inducir un cambio estructural cuaternario en la holoenzima que genera la modulación negativa de la actividad catalítica. Por el contrario, la unión de ATP a las subunidades reguladoras es capaz de provocar una modulación positiva de la actividad catalítica (Fritsch, *supra*). Usando los métodos de la divulgación, se pueden expresar moléculas que sean capaces de unirse y producir cambios de modulación cuaternarios o terciarios.

Además, se puede llevar a cabo una variedad de modificaciones químicas, por ejemplo, fosforilación, metilación, acetilación, adenilación y uridenilación, para modular la función. Se sabe que modificaciones tales como estas desempeñan papeles importantes en la regulación de muchos componentes celulares importantes. La Tabla 2 de Neidhardt, *supra*, de la página 73, enumera diferentes enzimas bacterianas que experimentan dichas

modificaciones. A partir de dicha lista, un experto en la materia puede determinar otras enzimas de otros sistemas que experimentan las mismas modificaciones o modificaciones similares, sin la necesidad de experimentación. Además, muchas proteínas que están implicadas en la enfermedad humana también experimentan dichas modificaciones químicas. Por ejemplo, se ha encontrado que muchos oncogenes están modificados por la fosforilación o para modificar otras proteínas mediante fosforilación o desfosforilación. Por lo tanto, es importante la capacidad proporcionada por la divulgación para expresar moduladores que pueden modificar o alterar la función, por ejemplo, la fosforilación.

De lo anterior, el experto en la materia puede usar la presente divulgación para expresar un modulador de respuesta biológica, sin la necesidad de experimentación.

Con respecto a la expresión de las proteínas de fusión por los recombinantes de la invención, se hace referencia a Fritsch, Maniatis. *Molecular Cloning, "A LABORATORY MANUAL"* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) (en especial, el volumen 3) y Kendrew, *supra*, incorporado en el presente documento por referencia. Las enseñanzas de Sambrook *et al.*, pueden modificarse adecuadamente, sin la necesidad de experimentación, a partir de dicha divulgación, para que el experto en la materia genere recombinantes que expresen proteínas de fusión.

Con respecto a la terapia génica y la inmunoterapia, se hace referencia a las patentes de EE.UU. n.º 4.690.915 y 5.252.479, que se incorporan en el presente documento por referencia, junto con los documentos citados en las mismas y en su cara, y al documento WO 94/16716 y la solicitud de patente de EE.UU. n.º 08/184.009, presentada el 19 de enero de 1994, cada una de las cuales también se incorpora en el presente documento por referencia, junto con los documentos citados en las mismas.

Un factor de crecimiento puede definirse como péptidos de señalización intercelular de acción local, multifuncionales, que controlan tanto la ontogenia como el mantenimiento del tejido y la función (véase Kendrew, en especial, las páginas 455 y siguientes).

El factor de crecimiento o el gen terapéutico, por ejemplo, puede codificar una proteína que combata la enfermedad, una molécula para tratar el cáncer, un supresor de tumores, una citocina, un antígeno asociado a un tumor o interferón; y, por ejemplo, el factor de crecimiento o el gen terapéutico pueden seleccionarse del grupo que consiste en un gen que codifica alfa-globina, beta-globina, gamma-globina, factor de estimulación de colonias de macrófagos de granulocitos, factor de necrosis tumoral, una interleucina (por ejemplo, una interleucina seleccionada de las interleucinas 1 a 14 o 1 a 11, o cualquier combinación de las mismas), factor estimulante de colonias de macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos, eritropoyetina, factor de crecimiento de mastocitos, supresor de tumores p53, retinoblastoma, interferón, antígeno asociado a melanoma o B7. La patente de EE.UU. n.º 5.252.479 proporciona una lista de proteínas que pueden expresarse en un sistema de adenovirus para terapia génica, y el experto en la materia se dirige a esa divulgación. El documento WO 94/16716 y la solicitud de EE.UU. n.º 08/184.009, presentada el 19 de enero de 1994, proporcionan genes para citocinas y antígenos asociados a tumores y métodos de inmunoterapia, incluyendo métodos *ex vivo*, y el experto en la materia se dirige a dichas divulgaciones.

Por lo tanto, un experto en la materia puede crear recombinantes que expresen un factor de crecimiento o gen terapéutico, y usar los recombinantes de la presente divulgación y del conocimiento en la materia, sin la necesidad de experimentación.

Además, a partir de lo anterior y del conocimiento en la materia, no se requiere experimentación para que el experto en la materia construya un recombinante de la invención que exprese un epítipo de interés, un modulador de respuesta biológica, un factor de crecimiento, una secuencia de reconocimiento, un gen terapéutico o una proteína de fusión; o para que el experto en la materia use dicho recombinante.

Se observa que el ADN exógeno o heterólogo puede incluir por sí mismo un promotor para impulsar la expresión en el CMV recombinante, o el ADN exógeno puede simplemente ser ADN codificante y colocarse apropiadamente cadena abajo de un promotor endógeno para dirigir la expresión. Además, se pueden hacer múltiples copias del ADN codificante o el uso de un promotor potente o temprano o un promotor temprano y tardío, o cualquier combinación de los mismos, para amplificar o aumentar la expresión. Por lo tanto, el ADN exógeno o heterólogo puede colocarse adecuadamente con respecto a un promotor endógeno como los promotores E3 o MLP, o dichos promotores pueden ser translocados para ser insertados en otra ubicación, con el ADN exógeno o heterólogo. El ADN codificante puede ser ADN que codifica de más de una proteína de manera que tenga expresión de más de un producto del CMV recombinante.

Los productos de expresión pueden ser antígenos, inmunógenos o epítopos de interés; y, por lo tanto, la invención se refiere además a composiciones inmunológicas, antigénicas o de vacuna que contienen los productos de expresión. Además, dado que el vector de CMV, en ciertos casos, se puede administrar directamente a un hospedador adecuado, la invención se refiere a composiciones que contienen el vector de CMV. Además, como el producto de expresión puede aislarse del vector de CMV *in vitro* o de células infectadas o transfectadas por el vector de CMV *in vitro*, la divulgación se refiere a procedimientos de expresión de un producto, por ejemplo, que comprende insertar el ADN exógeno en un vector de CMVs, por ejemplo, por restricción/ligación o por

recombinación seguida de la infección o transfección de células adecuadas *in vitro* con un CMV recombinante, y opcionalmente, la extracción, la purificación o el aislamiento del producto de expresión de las células. Se puede emplear cualquier técnica de extracción, purificación o aislamiento adecuada.

5 En particular, tras infectar células con el CMV recombinante, la/s proteína/s de la expresión del ADN exógeno se recogen mediante técnicas conocidas tales como cromatografía (véase Robbins, EPA 0162738A1; Panicali, EPA 0261940A2); Richardson, *supra*; Smith *et al.*, *supra*; Pennock *et al.*, *supra*; publicación de patente EP n.º 0265785). La/s proteína/s recogida/s se puede/n emplear entonces en una vacuna, composición antigénica o inmunológica que también contenga un vehículo adecuado.

10 De este modo, el CMV recombinante se puede usar para preparar proteínas tales como antígenos, inmunógenos, epítomos de interés, etc., que puedan usarse además en composiciones inmunológicas, antigénicas o de vacuna. Se observa que se puede usar un CMV recombinante que expresa un producto perjudicial para el crecimiento o desarrollo de insectos para preparar un insecticida y un CMV recombinante que exprese un producto perjudicial para el crecimiento de plantas se puede usar para preparar un herbicida (aislando el producto de expresión y mezclándolo con un vehículo o diluyente insecticida o herbicidamente aceptable) y un CMV recombinante que exprese un polipéptido antifúngico se puede usar para preparar un preparado antifúngico (aislando el producto de expresión y mezclándolo con un vehículo o diluyente adecuado).

15 Como los productos de expresión pueden proporcionar una respuesta antigénica, inmunológica o protectora (vacuna), la divulgación se refiere además a productos de la misma; en concreto, anticuerpos y usos de los mismos. Más en particular, los productos de expresión pueden generar anticuerpos. Los anticuerpos se pueden formar en anticuerpos monoclonales; y los anticuerpos o productos de expresión se pueden usar en kits, pruebas, ensayos y similares que impliquen la unión, de modo que la divulgación se refiere también a estos usos. Además, puesto que los recombinantes de la invención se pueden usar para replicar ADN, la divulgación se refiere a CMVs recombinante como un vector y métodos para replicar ADN mediante la infección o transfección de células con su DNA recombinante y de recolección. El ADN resultante se puede usar como sondas o cebadores o para amplificación.

20 El procedimiento de administración para el CMV recombinante o producto de expresión del mismo, las composiciones de la divulgación tales como composiciones inmunológicas, antigénicas o vacunales, o composiciones terapéuticas puede ser por vía parenteral (intradérmica, intramuscular o subcutánea). Dicha administración permite una respuesta inmune sistémica. La administración puede ser a través de una vía mucosa, por ejemplo, oral, nasal, genital, etc. Dicha administración permite una respuesta inmune local.

25 De manera más general, las composiciones antigénicas, inmunológicas o de vacuna, o las composiciones terapéuticas de la invención (composiciones que contienen los CMV recombinantes de los productos de expresión de la divulgación) se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en las técnicas farmacéuticas. Dichas composiciones se pueden administrar en dosis y mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica médica teniendo en cuenta factores tales como la raza o especie, edad, sexo, peso y estado del paciente en particular, y la vía de administración. Las composiciones pueden administrarse solas, o pueden administrar simultánea o secuencialmente con otras composiciones de la divulgación o con otras composiciones inmunológicas, antigénicas o vacunales, o composiciones terapéuticas. Dichas otras composiciones pueden incluir antígenos o epítomos nativos purificados, o antígenos o epítomos de la expresión mediante un CMV recombinante u otro sistema vectorial; y se administran teniendo en cuenta los factores anteriormente mencionados.

30 Los ejemplos de composiciones de la divulgación incluyen preparados líquidos para orificios, por ejemplo, administración oral, nasal, anal, genital, por ejemplo, vaginal, etc., administración tal como suspensiones, jarabes o elixires; y, preparados para la administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (por ejemplo, administración inyectable) tal como suspensiones o emulsiones estériles. En dichas composiciones, el recombinante puede estar mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado, tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa o similares.

35 Las composiciones antigénicas, inmunológicas o de vacuna normalmente pueden contener un adyuvante y una cantidad del CMV recombinante o producto de expresión para generar la respuesta deseada. En aplicaciones humanas, el alumbre (fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio) es un adyuvante típico. La saponina y su componente purificado Quil A, el adyuvante completo de Freund y otros adyuvantes usados en investigaciones y aplicaciones veterinarias tienen toxicidades que limitan su uso potencial en vacunas humanas. También se pueden usar los preparados definidos químicamente tales como dipéptido de muramilo, monofosforil lípido A, conjugados de fosfolípidos tales como los descritos por Goodman-Snitkoff *et al.* *J. Immunol.* 147: 410-415 (1991) e incorporado por referencia en el presente documento, la encapsulación de la proteína dentro de un proteoliposoma según lo descrito por Miller *et al.*, *J. Exp. Med.* 176: 1739-1744 (1992) e incorporado por referencia en el presente documento, la encapsulación de la proteína en vesículas lipídicas tales como vesículas lipídicas Novasome (Micro Vesicular Systems, Inc., Nashua, N.H.).

65

La composición puede envasarse en una sola forma farmacéutica para la inmunización por administración parenteral (es decir, intramuscular, intradérmica o subcutánea) o administración por orificios, por ejemplo, administración perlingual (es decir, oral), intragástrica, mucosa incluyendo intraoral, intraanal, intravaginal y similares. De nuevo, la dosis eficaz y la vía de administración están determinadas por la naturaleza de la composición, por la naturaleza del producto de expresión, por el nivel de expresión si se usa directamente CMV recombinante y por factores conocidos, tales como la raza o especie, edad, sexo, peso, estado y naturaleza del hospedador, así como la DL<sub>50</sub> y otros procedimientos de detección que son conocidos y no requieren experimentación. Las dosis del producto expresado pueden variar entre unos cuantos y unos cuantos cientos de microgramos, por ejemplo, de 5 a 500 µg. El recombinante de la invención se puede administrar en cualquier cantidad adecuada para conseguir la expresión a estos niveles de dosificación. El CMV vacunal se administra en una cantidad de aproximadamente 10<sup>3.5</sup> ufp; por lo tanto, el recombinante de la invención se administra preferentemente al menos en esta cantidad; más preferentemente de aproximadamente 10<sup>4</sup> ufp a aproximadamente 10<sup>6</sup> ufp. Otros vehículos o diluyentes adecuados pueden ser agua o una solución salina tamponada, con o sin un conservante. El producto de expresión o CMV recombinante puede estar liofilizado para volver a suspenderlo en el momento de la administración o puede estar en solución.

El vehículo también puede ser un sistema polimérico de liberación retardada. Los polímeros sintéticos son particularmente útiles en la formulación de una composición que tenga liberación controlada. Un ejemplo temprano de esto fue la polimerización de metacrilato de metilo en esferas que tienen diámetros inferiores a un micrómetro para formar las denominadas nanopartículas, publicadas por Kreuter, J., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacology", M. Donbrow (Ed). CRC Press, pág. 125-148.

La microencapsulación se ha aplicado a la inyección de productos farmacéuticos microencapsulados para dar una liberación controlada. Una serie de factores contribuyen a la selección de un polímero en particular para la microencapsulación. La reproducibilidad de la síntesis de polímeros y el proceso de microencapsulación, el coste de los materiales y procesos de microencapsulación, el perfil toxicológico, los requisitos para la cinética de liberación variable y la compatibilidad fisicoquímica del polímero y los antígenos son todos factores que se deben tener en cuenta. Los ejemplos de polímeros útiles son policarbonatos, poliésteres, poliuretanos, poliortoésteres y poliamidas, particularmente aquellos que son biodegradables.

Una elección frecuente de un vehículo para productos farmacéuticos y, más recientemente, para antígenos es poli (d,l-lactida-co-glicolida) (PLGA). Este es un poliéster biodegradable que tiene una larga historia de uso médico en suturas erosionables, placas óseas y otras prótesis temporales donde no ha mostrado ninguna toxicidad. Se ha formulado una amplia variedad de fármacos, incluyendo péptidos y antígenos, en microcápsulas de PLGA. Se ha acumulado un conjunto de datos sobre la adaptación de PLGA para la liberación controlada del antígeno, por ejemplo, según lo revisado por Eldridge, J. H., *et al.* "Current Topics in Microbiology and Immunology". 1989, 146:59-66. Se ha demostrado que el atrapamiento de antígenos en microesferas de PLGA de 1 a 10 micrómetros de diámetro tiene un efecto adyuvante notable cuando se administran por vía oral. El proceso de microencapsulación de PLGA usa una separación de fases de una emulsión de agua en aceite. El compuesto de interés se prepara como una solución acuosa y el PLGA se disuelve en disolventes orgánicos adecuados tales como cloruro de metileno y acetato de etilo. Estas dos soluciones inmiscibles se emulsionan conjuntamente mediante agitación a alta velocidad. A continuación, se añade un no disolvente para el polímero, provocando la precipitación del polímero alrededor de las gotitas acuosas para formar microcápsulas embrionarias. Las microcápsulas se recogen y se estabilizan con uno de un surtido de agentes (alcohol polivinílico (PVA), gelatina, alginatos, polivinilpirrolidona (PVP), metilcelulosa) y el disolvente se elimina mediante secado al vacío o extracción con disolvente.

Así pues, se prevén composiciones sólidas, incluyendo líquidas que contienen sólido, líquidas y gel (incluyendo las "cápsulas de gel").

Además, los vectores de la invención, por ejemplo, CMV recombinante, y los productos de expresión a partir de los mismos pueden estimular una respuesta inmune o de anticuerpos en animales. A partir de esos anticuerpos, mediante técnicas bien conocidas en la técnica, se pueden preparar anticuerpos monoclonales y dichos anticuerpos monoclonales pueden emplearse en conocidos ensayos de unión a anticuerpos, kits de diagnóstico o pruebas para determinar la presencia o ausencia de/de los antígeno/s y, a partir de ello, la presencia o ausencia del agente causante natural del antígeno o, para determinar si una respuesta inmune a ese agente o al/a los antígeno/s simplemente se ha estimulado.

Los anticuerpos monoclonales son inmunoglobulinas producidas por células de hibridoma. Un anticuerpo monoclonal reacciona con un único determinante antigénico y proporciona una mayor especificidad que un anticuerpo convencional derivado de suero. Además, la detección de un gran número de anticuerpos monoclonales hace posible seleccionar un anticuerpo individual con la especificidad, avidéz e isotipo deseados. Las líneas celulares de hibridoma proporcionan una fuente económica, constante, de anticuerpos químicamente idénticos, y las preparaciones de dichos anticuerpos pueden normalizarse fácilmente. Los métodos de producción de anticuerpos monoclonales son bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, Koprowski, H. *et al.*, patente de EE.UU. n.º 4.196.265, expedida el 1 de abril de 1989, incorporada en el presente documento por referencia.

Se conocen usos de anticuerpos monoclonales. Uno de dichos usos se encuentra en los métodos de diagnóstico, por ejemplo, David, G. y Greene, H., patente de EE.UU. n.º 4.376.110, expedida el 8 de marzo de 1983, incorporada en el presente documento por referencia.

5 También se han usado anticuerpos monoclonales para recuperar materiales mediante cromatografía de inmunoadsorción, por ejemplo, Milstein, C., 1980, *Scientific American* 243:66, 70, incorporado en el presente documento por referencia.

10 Además, los CMV recombinantes o productos de expresión de los mismos de la invención se pueden usar para estimular una respuesta en células *in vitro* o *ex vivo* para la reinfusión posterior en un paciente. Si el paciente es seronegativo, la reinfusión es estimular una respuesta inmune, por ejemplo, una respuesta inmunológica o antigénica tal como una inmunización activa. En un individuo seropositivo, la reinfusión es estimular o reforzar el sistema inmune contra un patógeno.

15 Los CMV recombinantes para su uso en la invención también son útiles para generar ADN para sondas o para cebadores de PCR que se pueden usar para detectar la presencia o ausencia de ADN hibridable o para amplificar ADN, por ejemplo, para detectar un patógeno en una muestra o para amplificar ADN.

20 Además, como se ha descrito anteriormente, la divulgación engloba promotores y casetes de expresión que son útiles en sistemas de adenovirus, así como en cualquier sistema vírico o celular que proporcione una proteína transactivante.

25 El casete de expresión de la divulgación puede incluir además una señal de poliadenilación truncada funcional; por ejemplo, una señal de poliadenilación de SV40 que está truncada, pero que es funcional. El casete de expresión puede contener ADN exógeno o heterólogo (con respecto al virus o sistema en el que se está insertando el promotor o casete de expresión); por ejemplo, ADN codificante exógeno o heterólogo como se ha descrito anteriormente, y en los ejemplos. Este ADN puede colocarse adecuadamente y unirse operativamente al promotor para la expresión. El casete de expresión se puede insertar en cualquier orientación; preferentemente, la orientación que obtiene la máxima expresión del sistema o virus en el que se inserta el casete de expresión.

30 Aunque el promotor y el casete de expresión se ilustran específicamente con referencia al adenovirus, el experto en la materia puede adaptar estas realizaciones de la divulgación a otros virus ya plásmidos para células tales como células eucariotas, sin la necesidad de experimentación, simplemente verificando si el virus, la célula o el sistema proporcionan la proteína transactivante.

35 En cuanto a los promotores de HCMV, se hace referencia a las patentes de EE.UU. n.º 5.168.062 y 5.385.839, incorporadas en el presente documento por referencia. En cuanto a la transfección de células con ADN plasmídico para su expresión a partir del mismo, se hace referencia a Feigner *et al.* (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 2550-2561, incorporado en el presente documento por referencia. Y, en cuanto a la inyección directa de ADN plasmídico como un método sencillo y eficaz de vacunación contra una variedad de enfermedades infecciosas, se hace referencia a *Science*, 259: 1745-49, 1993, incorporado en el presente documento por referencia. Por lo tanto, está dentro del alcance de la presente divulgación que el promotor y el casete de expresión de la invención se usen en sistemas distintos del adenovirus; por ejemplo, en plásmidos para la inyección directa de ADN plasmídico.

45 Los fragmentos de proteína de la presente divulgación forman un aspecto adicional de la invención; y dichos compuestos se pueden usar en métodos de tratamientos médicos, tales como para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento del VIH, o para la generación de anticuerpos para el diagnóstico del VIH, incluyendo el uso en vacunas. Además, dichos compuestos se pueden usar en la preparación de medicamentos para dichos tratamientos o prevención, o composiciones para fines de diagnóstico. Los compuestos se pueden emplear solos o en combinación con otros tratamientos, vacunas o conservantes; y los compuestos se pueden usar en la preparación de medicamentos combinados para dichos tratamientos o prevención, o en kits que contengan el compuesto y el otro tratamiento o conservante.

50 En otra realización más, la presente divulgación también engloba el uso de los fragmentos de proteína de la presente divulgación descritos en el presente documento como inmunógenos, ventajosamente como componentes de vacuna de VIH-1.

55 Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido", y la expresión "secuencia de aminoácidos" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de restos de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos o análogos de aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por fracciones químicas distintas de los aminoácidos. Los términos también engloban un polímero de aminoácidos que ha sido modificado de manera natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje o bioactivo.

65

Como se usan en el presente documento, los términos "antígeno" o "inmunógeno" se usan indistintamente para referirse a una sustancia, normalmente una proteína, que es capaz de inducir una respuesta inmune en un sujeto. El término también se refiere a proteínas que son inmunológicamente activas en el sentido de que una vez administradas a un sujeto (ya sea directamente o mediante la administración al sujeto de una secuencia de nucleótidos o vector que codifique la proteína) es capaz de generar una respuesta inmune de tipo humoral y/o celular dirigida contra esa proteína.

El término "anticuerpo" incluye moléculas intactas, así como fragmentos de las mismas, tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv y scFv que son capaces de unirse al determinante del epítipo. Estos fragmentos de anticuerpo conservan cierta capacidad para unirse selectivamente con su antígeno o receptor, e incluyen, por ejemplo:

- a. Fab, el fragmento que contiene un fragmento monovalente de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo puede producirse por digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una parte de una cadena pesada;
- b. Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo se puede obtener tratando un anticuerpo completo con pepsina, seguido de la reducción, para producir una cadena ligera intacta y una parte de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;
- c. F(ab')<sub>2</sub>, el fragmento del anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin la reducción subsiguiente; F(ab')<sub>2</sub> es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos por dos enlaces disulfuro;
- d. ScFv, incluyendo un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de una cadena pesada y una cadena ligera como una molécula monocatenaria fusionada.

Los métodos generales de fabricación de estos fragmentos son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988), que se incorpora en el presente documento por referencia).

Un "anticuerpo neutralizante" puede inhibir la entrada del virus VIH-1, por ejemplo, SF162 y/o JRCSF con un índice de neutralización > 1,5 o > 2,0. Los anticuerpos neutralizantes amplios y potentes pueden neutralizar más de aproximadamente el 50 % de virus VIH-1 (de diversos clados y diferentes cepas dentro de un clado) en un ensayo de neutralización. La concentración inhibitoria del anticuerpo monoclonal puede ser inferior a aproximadamente 25 mg/ml para neutralizar aproximadamente el 50 % del virus de entrada en el ensayo de neutralización.

Se ha de entender que las proteínas, incluyendo los anticuerpos y/o antígenos de la divulgación, pueden diferir de las secuencias exactas ilustradas y descritas en el presente documento. Por lo tanto, la divulgación engloba eliminaciones, adiciones y sustituciones a las secuencias mostradas, siempre y cuando las secuencias funcionen de acuerdo con los métodos de la divulgación. En este sentido, las sustituciones particularmente preferidas, en general, serán de naturaleza conservativa, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se dividen, en general, en cuatro familias: (1) ácido--aspartato y glutamato; (2) básica--lisina, arginina, histidina; (3) no polar--alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polar sin carga -- glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces como aminoácidos aromáticos. Es razonablemente predecible que una sustitución aislada de leucina con isoleucina o valina, o viceversa; un aspartato con un glutamato o viceversa; una treonina con una serina o viceversa; o una sustitución conservativa similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado, no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Las proteínas que tienen esencialmente la misma secuencia de aminoácidos que las secuencias ilustradas y descritas, pero que poseen sustituciones de aminoácidos menores que no afectan esencialmente a la inmunogenicidad de la proteína están, por lo tanto, dentro del alcance de la invención.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "secuencias de nucleótidos" y "secuencias de ácido nucleico" se refieren a secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), incluyendo, sin limitación, ARN mensajero (ARNm), híbridos de ADN/ARN o ácidos nucleicos sintéticos. El ácido nucleico puede ser monocatenario, o parcial o completamente bicatenario (dúplex). Los ácidos nucleicos dúplex pueden ser homodúplex o heterodúplex.

Como se usa en el presente documento, el término "transgén" se puede usar para referirse a secuencias de nucleótidos "recombinantes" que pueden derivarse de cualquiera de las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la presente divulgación. El término "recombinante" significa una secuencia de nucleótidos que ha sido manipulada "artificialmente" y que no ocurre en la naturaleza, o está unida a otra secuencia de nucleótidos o se encuentra en una disposición diferente en la naturaleza. Se entiende que manipulado "artificialmente" significa manipulado por algunos medios artificiales, incluso mediante el uso de máquinas, optimización de codones, enzimas de restricción, etc.

Por ejemplo, en una realización, las secuencias de nucleótidos se pueden mutar de manera que se anule la actividad de las proteínas codificadas *in vivo*. En otra realización, las secuencias de nucleótidos pueden optimizarse con codones, por ejemplo, los codones pueden optimizarse para uso humano. En realizaciones preferidas, las

secuencias de nucleótidos de la divulgación están tanto mutadas para anular la función normal *in vivo* de las proteínas codificadas como optimizadas en codones para uso humano. Por ejemplo, cada una de las secuencias de Gag, Pol, Env, Nef, RT e Int de la divulgación puede ser modificada de estas maneras.

5 En cuanto a la optimización de codones, las moléculas de ácido nucleico usadas en la invención tienen una secuencia de nucleótidos que codifica los antígenos usados en la invención y pueden diseñarse para emplear codones que se usen en los genes del sujeto en el que se vaya a producir el antígeno. Muchos virus, incluyendo el VIH y otros lentivirus, usan un gran número de codones raros y, al alterar estos codones para que correspondan a codones comúnmente usados en el sujeto deseado, se puede potenciar la expresión de los antígenos. En una  
10 realización preferida, los codones usados son codones "humanizados", es decir, los codones son aquellos que aparecen frecuentemente en genes humanos altamente expresados (Andre *et al.*, *J. Virol.* 72: 1497-1503, 1998) en lugar de aquellos codones que son usados frecuentemente por el VIH. Dicho uso de codones proporciona una expresión eficaz de las proteínas transgénicas del VIH en células humanas. Se puede usar cualquier método adecuado de optimización de codones. Dichos métodos, y la selección de dichos métodos, son bien conocidos por los expertos en la materia. Además, hay varias compañías que optimizarán codones de secuencias, como Genearth (genearth.com). Así pues, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden someterse fácilmente a la optimización de los codones.

20 La divulgación engloba además secuencias de nucleótidos que codifican variantes y derivados funcionalmente y/o antigénicamente equivalentes de los antígenos usados en la invención y fragmentos funcionalmente equivalentes de los mismos. Estas variantes, derivados y fragmentos funcionalmente equivalentes muestran la capacidad de retener la actividad antigénica. Por ejemplo, los cambios en una secuencia de ADN que no cambian la secuencia de aminoácidos codificada, así como los que dan lugar a sustituciones conservativas de restos de aminoácidos, una o algunas eliminaciones o adiciones de aminoácidos, y la sustitución de restos de aminoácidos por análogos de  
25 aminoácidos son aquellos que no afectarán significativamente a las propiedades del polipéptido codificado. Las sustituciones conservativas de aminoácidos son glicina/alanina; valina/isoleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutámico; serina/treonina/metionina; lisina/arginina; y fenilalanina/tirosina/triptófano. En una realización, las variantes tienen al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de homología o identidad con el antígeno, epítipo, inmunógeno, péptido o polipéptido de interés.

35 Para los fines de la presente invención, la identidad u homología de secuencia se determina comparando las secuencias cuando están alineadas para aumentar al máximo el solapamiento y la identidad, reduciendo a la vez al mínimo los huecos de secuencia. En particular, la identidad de secuencia se puede determinar usando cualquiera de una serie de algoritmos matemáticos. Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático usado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 1990; 87: 2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 1993; 90: 5873-5877.

40 Otro ejemplo de un algoritmo matemático usado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, *CABIOS* 1988; 4:11-17. Dicho algoritmo se incorpora al programa ALIGN (versión 2.0) que forma parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla de restos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Otro algoritmo útil para identificar regiones de similitud de secuencia local y alineación es el algoritmo FASTA descrito en Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 1988; 85:2444-2448.

50 Es ventajoso para el uso de acuerdo con la presente invención el software WU-BLAST (Universidad de Washington BLAST) versión 2.0. Los programas ejecutables de WU-BLAST versión 2.0 para varias plataformas UNIX se pueden descargar desde <ftp://blast.wustl.edu/blast/executables>. Este programa se basa en WU-BLAST versión 1.4, que a su vez se basa en el dominio público NCBI-BLAST versión 1.4 (Altschul y Gish, 1996. "Local alignment statistics", Doolittle ed., *Methods in Enzymology* 266: 460-480; Altschul *et al.*, *Journal of Molecular Biology* 1990; 215: 403-410; Gish y States, 1993; *Nature Genetics* 3: 266-272; Karlin y Altschul, 1993; *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 5873-5877, estando todos ellos incorporados en el presente documento por referencia).

60 Las diversas secuencias de nucleótidos recombinantes y anticuerpos y/o antígenos de la divulgación se preparan usando técnicas de ADN recombinante y clonación convencionales. Dichas técnicas son bien conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989).

65 Las secuencias de nucleótidos de la presente divulgación pueden insertarse en "vectores". El término "vector" es ampliamente usado y comprendido por los expertos en la materia, y como se usa en la presente memoria, el término "vector" se usa de acuerdo con su significado para los expertos en la materia. Por ejemplo, el término "vector" es comúnmente usado por los expertos en la materia para referirse a un vehículo que permite o facilita la transferencia de moléculas de ácido nucleico de un entorno a otro, o que permite o facilita la manipulación de una molécula de

ácido nucleico.

Se puede usar cualquier vector que permita la expresión de los anticuerpos y/o antígenos de la presente invención de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, los antígenos y/o anticuerpos de la presente divulgación se pueden usar *in vitro* (tal como usando sistemas de expresión exentos de células) y/o en células cultivadas *in vitro* con el fin de producir los antígenos de VIH codificados y/o anticuerpos que se pueden usar después para diversas aplicaciones tales como en la producción de vacunas proteínicas. Para dichas aplicaciones, se puede usar cualquier vector que permita la expresión de los antígenos y/o los anticuerpos *in vitro* y/o en células cultivadas.

Para las aplicaciones en las que se desee expresar los anticuerpos y/o antígenos *in vivo*, por ejemplo, cuando los transgenes de la invención se usan en vacunas que contienen ADN o ADN, se puede usar cualquier vector que permita la expresión de los anticuerpos y/o antígenos de la presente divulgación y sea seguro para su uso *in vivo*. En realizaciones preferidas, los vectores usados son seguros para su uso en seres humanos, mamíferos y/o animales de laboratorio.

Para expresar los anticuerpos y/o antígenos de la presente divulgación, la secuencia codificante de la proteína debe estar "unida operativamente" a secuencias reguladoras o de control de ácidos nucleicos que dirijan la transcripción y la traducción de la proteína. Como se usa en el presente documento, se dice que una secuencia codificante y una secuencia o promotor de control de ácido nucleico están "unidas operativamente" cuando están unidas covalentemente de manera que coloquen la expresión o la transcripción y/o la traducción de la secuencia codificante bajo la influencia o el control de la secuencia de control del ácido nucleico. La "secuencia de control de ácido nucleico" puede ser cualquier elemento de ácido nucleico tal como, pero sin limitación, promotores, potenciadores, IRES, intrones y otros elementos descritos en el presente documento que dirigen la expresión de una secuencia de ácido nucleico o secuencia codificante que esté unida operativamente al mismo. El término "promotor" se usará en el presente documento para referirse a un grupo de módulos de control de la transcripción que están agrupados alrededor del sitio de iniciación para la ARN polimerasa II y que cuando están unidos operativamente a las secuencias codificantes de la proteína de la invención conducen a la expresión de la proteína codificada. La expresión de los transgenes de la presente invención puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible que inicie la transcripción solo cuando se exponga a algún estímulo externo particular, tal como, sin limitación, antibióticos tales como tetraciclina, hormonas tales como ecdisona o metales pesados. El promotor también puede ser específico de un determinado tipo de célula, tejido u órgano. Se conocen en la técnica muchos promotores y potenciadores adecuados, y cualquier promotor o potenciador adecuado se puede usar para la expresión de los transgenes de la invención. Por ejemplo, se pueden seleccionar promotores y/o potenciadores adecuados de la Base de Datos de Promotores Eucarióticas (EPDB).

La presente invención se refiere a un vector recombinante que expresa un epítipo foráneo. Ventajosamente, el epítipo es un epítipo de VIH. En una realización ventajosa, el epítipo de VIH es un fragmento de proteína de la presente divulgación; sin embargo, la presente divulgación puede englobar antígenos, epítopos o inmunógenos adicionales del VIH. De forma ventajosa, el epítipo del VIH es un antígeno del VIH, un epítipo del VIH o un inmunógeno del VIH, tal como, pero sin limitación, los antígenos del VIH, epítopos del VIH o inmunógenos del VIH de las patentes de EE.UU. n.º 7.341.731; 7.335.364; 7.329.807; 7.323.553; 7.320.859; 7.311.920; 7.306.798; 7.285.646; 7.285.289; 7.285.271; 7.282.364; 7.273.695; 7.270.997; 7.262.270; 7.244.819; 7.244.575; 7.232.567; 7.232.566; 7.223.844; 7.223.739; 7.223.534; 7.223.368; 7.220.554; 7.214.530; 7.211.659; 7.211.432; 7.205.159; 7.198.934; 7.195.768; 7.192.555; 7.189.826; 7.189.522; 7.186.507; 7.179.645; 7.175.843; 7.172.761; 7.169.550; 7.157.083; 7.153.509; 7.147.862; 7.141.550; 7.129.219; 7.122.188; 7.118.859; 7.118.855; 7.118.751; 7.118.742; 7.105.655; 7.101.552; 7.097.971; 7.097.842; 7.094.405; 7.091.049; 7.090.648; 7.087.377; 7.083.787; 7.070.787; 7.070.781; 7.060.273; 7.056.521; 7.056.519; 7.049.136; 7.048.929; 7.033.593; 7.030.094; 7.022.326; 7.009.037; 7.008.622; 7.001.759; 6.997.863; 6.995.008; 6.979.535; 6.974.574; 6.972.126; 6.969.609; 6.964.769; 6.964.762; 6.958.158; 6.956.059; 6.953.689; 6.951.648; 6.946.075; 6.927.031; 6.919.319; 6.919.318; 6.919.077; 6.913.752; 6.911.315; 6.908.617; 6.908.612; 6.902.743; 6.900.010; 6.893.869; 6.884.785; 6.884.435; 6.875.435; 6.867.005; 6.861.234; 6.855.539; 6.841.381; 6.841.345; 6.838.477; 6.821.955; 6.818.392; 6.818.222; 6.815.217; 6.815.201; 6.812.026; 6.812.025; 6.812.024; 6.808.923; 6.806.055; 6.803.231; 6.800.613; 6.800.288; 6.797.811; 6.780.967; 6.780.598; 6.773.920; 6.764.682; 6.761.893; 6.753.015; 6.750.005; 6.737.239; 6.737.067; 6.730.304; 6.720.310; 6.716.823; 6.713.301; 6.713.070; 6.706.859; 6.699.722; 6.699.656; 6.696.291; 6.692.745; 6.670.181; 6.670.115; 6.664.406; 6.657.055; 6.657.050; 6.656.471; 6.653.066; 6.649.409; 6.649.372; 6.645.732; 6.641.816; 6.635.469; 6.613.530; 6.605.427; 6.602.709; 6.602.705; 6.600.023; 6.596.477; 6.596.172; 6.593.103; 6.593.079; 6.579.673; 6.576.758; 6.573.245; 6.573.040; 6.569.418; 6.569.340; 6.562.800; 6.558.961; 6.551.828; 6.551.824; 6.548.275; 6.544.780; 6.544.752; 6.544.728; 6.534.482; 6.534.312; 6.534.064; 6.531.572; 6.531.313; 6.525.179; 6.525.028; 6.524.582; 6.521.449; 6.518.030; 6.518.015; 6.514.691; 6.514.503; 6.511.845; 6.511.812; 6.511.801; 6.509.313; 6.506.384; 6.503.882; 6.495.676; 6.495.526; 6.495.347; 6.492.123; 6.489.131; 6.489.129; 6.482.614; 6.479.286; 6.479.284; 6.465.634; 6.461.615; 6.458.560; 6.458.527; 6.458.370; 6.451.601; 6.451.592; 6.451.323; 6.436.407; 6.432.633; 6.428.970; 6.428.952; 6.428.790; 6.420.139; 6.416.997; 6.410.318; 6.410.028; 6.410.014; 6.407.221; 6.406.710; 6.403.092; 6.399.295; 6.392.013; 6.391.657; 6.384.198; 6.380.170; 6.376.170; 6.372.426; 6.365.187; 6.358.739; 6.355.248; 6.355.247; 6.348.450; 6.342.372; 6.342.228; 6.338.952; 6.337.179; 6.335.183; 6.335.017; 6.331.404; 6.329.202; 6.329.173; 6.328.976; 6.322.964; 6.319.666; 6.319.665; 6.319.500; 6.319.494; 6.316.205;

## ES 2 625 406 T3

6.316.003; 6.309.633; 6.306.625 6.296.807; 6.294.322; 6.291.239; 6.291.157; 6.287.568; 6.284.456; 6.284.194;  
 6.274.337; 6.270.956; 6.270.769; 6.268.484; 6.265.562; 6.265.149; 6.262.029; 6.261.762; 6.261.571; 6.261.569;  
 6.258.599; 6.258.358; 6.248.332; 6.245.331; 6.242.461; 6.241.986; 6.235.526; 6.235.466; 6.232.120; 6.228.361;  
 6.221.579; 6.214.862; 6.214.804; 6.210.963; 6.210.873; 6.207.185; 6.203.974; 6.197.755; 6.197.531; 6.197.496;  
 5 6.194.142; 6.190.871; 6.190.666; 6.168.923; 6.156.302; 6.153.408; 6.153.393; 6.153.392; 6.153.378; 6.153.377;  
 6.146.635; 6.146.614; 6.143.876 6.140.059; 6.140.043; 6.139.746; 6.132.992; 6.124.306; 6.124.132; 6.121.006;  
 6.120.990; 6.114.507; 6.114.143; 6.110.466; 6.107.020; 6.103.521; 6.100.234; 6.099.848; 6.099.847; 6.096.291;  
 6.093.405; 6.090.392; 6.087.476; 6.083.903; 6.080.846; 6.080.725; 6.074.650; 6.074.646; 6.070.126; 6.063.905;  
 6.063.564; 6.060.256; 6.060.064; 6.048.530; 6.045.788; 6.043.347; 6.043.248; 6.042.831; 6.037.165; 6.033.672;  
 10 6.030.772; 6.030.770; 6.030.618; 6.025.141; 6.025.125; 6.020.468; 6.019.979; 6.017.543; 6.017.537; 6.015.694;  
 6.015.661; 6.013.484; 6.013.432 6.007.838; 6.004.811; 6.004.807; 6.004.763; 5.998.132; 5.993.819; 5.989.806;  
 5.985.926; 5.985.641; 5.985.545; 5.981.537; 5.981.505; 5.981.170; 5.976.551; 5.972.339; 5.965.371; 5.962.428;  
 5.962.318; 5.961.979; 5.961.970; 5.958.765; 5.958.422; 5.955.647; 5.955.342; 5.951.986; 5.951.975; 5.942.237;  
 5.939.277; 5.939.074; 5.935.580; 5.928.930; 5.928.913; 5.928.644; 5.928.642; 5.925.513; 5.922.550; 5.922.325;  
 15 5.919.458; 5.916.806; 5.916.563; 5.914.395; 5.914.109; 5.912.338; 5.912.176; 5.912.170; 5.906.936; 5.895.650;  
 5.891.623; 5.888.726; 5.885.580 5.885.578; 5.879.685; 5.876.731; 5.876.716; 5.874.226; 5.872.012; 5.871.747;  
 5.869.058; 5.866.694; 5.866.341; 5.866.320; 5.866.319; 5.866.137; 5.861.290; 5.858.740; 5.858.647; 5.858.646;  
 5.858.369; 5.858.368; 5.858.366; 5.856.185; 5.854.400; 5.853.736; 5.853.725; 5.853.724; 5.852.186; 5.851.829;  
 5.851.529; 5.849.475; 5.849.288; 5.843.728; 5.843.723; 5.843.640; 5.843.635; 5.840.480; 5.837.510; 5.837.250;  
 20 5.837.242; 5.834.599; 5.834.441; 5.834.429; 5.834.256; 5.830.876; 5.830.641; 5.830.475; 5.830.458; 5.830.357;  
 5.827.749; 5.827.723; 5.824.497 5.824.304; 5.821.047; 5.817.767; 5.817.754; 5.817.637; 5.817.470; 5.817.318;  
 5.814.482; 5.807.707; 5.804.604; 5.804.371; 5.800.822; 5.795.955; 5.795.743; 5.795.572; 5.789.388; 5.780.279;  
 5.780.038; 5.776.703; 5.773.260; 5.770.572; 5.766.844; 5.766.842; 5.766.625; 5.763.574; 5.763.190; 5.762.965;  
 5.759.769; 5.756.666; 5.753.258; 5.750.373; 5.747.641; 5.747.526; 5.747.028; 5.736.320; 5.736.146; 5.733.760;  
 25 5.731.189; 5.728.385; 5.721.095; 5.716.826; 5.716.637; 5.716.613; 5.714.374; 5.709.879; 5.709.860; 5.709.843;  
 5.705.331; 5.703.057; 5.702.707 5.698.178; 5.688.914; 5.686.078; 5.681.831; 5.679.784; 5.674.984; 5.672.472;  
 5.667.964; 5.667.783; 5.665.536; 5.665.355; 5.660.990; 5.658.745; 5.658.569; 5.643.756; 5.641.624; 5.639.854;  
 5.639.598; 5.637.677; 5.637.455; 5.633.234; 5.629.153; 5.627.025; 5.622.705; 5.614.413; 5.610.035; 5.607.831;  
 5.606.026; 5.601.819; 5.597.688; 5.593.972; 5.591.829; 5.591.823; 5.589.466; 5.587.285; 5.585.254; 5.585.250;  
 30 5.580.773; 5.580.739; 5.580.563; 5.573.916; 5.571.667; 5.569.468; 5.558.865; 5.556.745; 5.550.052; 5.543.328;  
 5.541.100; 5.541.057; 5.534.406 5.529.765; 5.523.232; 5.516.895; 5.514.541; 5.510.264; 5.500.161; 5.480.967;  
 5.480.966; 5.470.701; 5.468.606; 5.462.852; 5.459.127; 5.449.601; 5.447.838; 5.447.837; 5.439.809; 5.439.792;  
 5.418.136; 5.399.501; 5.397.695; 5.391.479; 5.384.240; 5.374.519; 5.374.518; 5.374.516; 5.364.933; 5.359.046;  
 5.356.772; 5.354.654; 5.344.755; 5.335.673; 5.332.567; 5.320.940; 5.317.009; 5.312.902; 5.304.466; 5.296.347;  
 35 5.286.852; 5.268.265; 5.264.356; 5.264.342; 5.260.308; 5.256.767; 5.256.561; 5.252.556; 5.230.988; 5.230.887;  
 5.227.159; 5.225.347; 5.221.610 5.217.861; 5.208.321; 5.206.136; 5.198.346; 5.185.147; 5.178.865; 5.173.400;  
 5.173.399; 5.166.050; 5.156.951; 5.135.864; 5.122.446; 5.120.662; 5.103.836; 5.100.777; 5.100.662; 5.093.230;  
 5.077.284; 5.070.010; 5.068.174; 5.066.782; 5.055.391; 5.043.262; 5.039.604; 5.039.522; 5.030.718; 5.030.555;  
 5.030.449; 5.019.387; 5.013.556; 5.008.183; 5.004.697; 4.997.772; 4.983.529; 4.983.387; 4.965.069; 4.945.082;  
 40 4.921.787; 4.918.166; 4.900.548; 4.888.290; 4.886.742; 4.885.235; 4.870.003; 4.869.903; 4.861.707; 4.853.326;  
 4.839.288; 4.833.072 y 4.795.739.

En otra realización, el VIH, o sus fragmentos inmunogénicos, se pueden utilizar como el epítipo de VIH. Por  
 ejemplo, los nucleótidos de VIH de las patentes de EE.UU. n.º 7.393.949; 7.374.877; 7.306.901; 7.303.754;  
 45 7.173.014; 7.122.180; 7.078.516; 7.022.814; 6.974.866; 6.958.211; 6.949.337; 6.946.254; 6.896.900; 6.887.977;  
 6.870.045; 6.803.187; 6.794.129; 6.773.915; 6.768.004; 6.706.268; 6.696.291; 6.692.955; 6.656.706; 6.649.409;  
 6.627.442; 6.610.476; 6.602.705; 6.582.920; 6.557.296; 6.531.587; 6.531.137; 6.500.623; 6.448.078; 6.429.306;  
 6.420.545; 6.410.013; 6.407.077; 6.395.891; 6.355.789; 6.335.158; 6.323.185; 6.316.183; 6.303.293; 6.300.056;  
 6.277.561; 6.270.975; 6.261.564; 6.225.045; 6.222.024; 6.194.391; 6.194.142; 6.162.631; 6.114.167; 6.114.109;  
 50 6.090.392; 6.060.587; 6.057.102; 6.054.565; 6.043.081; 6.037.165; 6.034.233; 6.033.902; 6.030.769; 6.020.123;  
 6.015.661; 6.010.895; 6.001.555; 5.985.661; 5.980.900; 5.972.596; 5.939.538; 5.912.338; 5.869.339; 5.866.701;  
 5.866.694; 5.866.320; 5.866.137; 5.864.027; 5.861.242; 5.858.785; 5.858.651; 5.849.475; 5.843.638; 5.840.480;  
 5.821.046; 5.801.056; 5.786.177; 5.786.145; 5.773.247; 5.770.703; 5.756.674; 5.741.706; 5.705.612; 5.693.752;  
 5.688.637; 5.688.511; 5.684.147; 5.665.577; 5.585.263; 5.578.715; 5.571.712; 5.567.603; 5.554.528; 5.545.726;  
 55 5.527.895; 5.527.894; 5.223.423; 5.204.259; 5.144.019; 5.051.496 y 4.942.122 son útiles para la presente invención.

En la presente invención, se puede usar cualquier epítipo reconocido por un anticuerpo contra el VIH. Por ejemplo,  
 los anticuerpos anti-VIH de las patentes de EE.UU. n.º 6.949.337; 6.900.010; 6.821.744; 6.768.004; 6.613.743;  
 6.534.312; 6.511.830; 6.489.131; 6.242.197; 6.114.143; 6.074.646; 6.063.564; 6.060.254; 5.919.457; 5.916.806;  
 60 5.871.732; 5.824.304; 5.773.247; 5.736.320; 5.637.455; 5.587.285; 5.514.541; 5.317.009; 4.983.529; 4.886.742;  
 4.870.003 y 4.795.739 son útiles para la presente invención. Además, los anticuerpos anti-VIH monoclonales de las  
 patentes de EE.UU. n.º 7.074.556; 7.074.554; 7.070.787; 7.060.273; 7.045.130; 7.033.593; RE39.057; 7.008.622;  
 6.984.721; 6.972.126; 6.949.337; 6.946.465; 6.919.077; 6.916.475; 6.911.315; 6.905.680; 6.900.010; 6.825.217;  
 6.824.975; 6.818.392; 6.815.201; 6.812.026; 6.812.024; 6.797.811; 6.768.004; 6.703.019; 6.689.118; 6.657.050;  
 65 6.608.179; 6.600.023; 6.596.497; 6.589.748; 6.569.143; 6.548.275; 6.525.179; 6.524.582; 6.506.384; 6.498.006;  
 6.489.131; 6.465.173; 6.461.612; 6.458.933; 6.432.633; 6.410.318; 6.406.701; 6.395.275; 6.391.657; 6.391.635;

5 6.384.198; 6.376.170; 6.372.217; 6.344.545; 6.337.181; 6.329.202; 6.319.665; 6.319.500; 6.316.003; 6.312.931;  
6.309.880; 6.296.807; 6.291.239; 6.261.558; 6.248.514; 6.245.331; 6.242.197; 6.241.986; 6.228.361; 6.221.580;  
6.190.871; 6.177.253; 6.146.635; 6.146.627; 6.146.614; 6.143.876; 6.132.992; 6.124.132; RE36.866; 6.114.143;  
6.103.238; 6.060.254; 6.039.684; 6.030.772; 6.020.468; 6.013.484; 6.008.044; 5.998.132; 5.994.515; 5.993.812;  
5.985.545; 5.981.278; 5.958.765; 5.939.277; 5.928.930; 5.922.325; 5.919.457; 5.916.806; 5.914.109; 5.911.989;  
5.906.936; 5.889.158; 5.876.716; 5.874.226; 5.872.012; 5.871.732; 5.866.694; 5.854.400; 5.849.583; 5.849.288;  
5.840.480; 5.840.305; 5.834.599; 5.831.034; 5.827.723; 5.821.047; 5.817.767; 5.817.458; 5.804.440; 5.795.572;  
5.783.670; 5.776.703; 5.773.225; 5.766.944; 5.753.503; 5.750.373; 5.747.641; 5.736.341; 5.731.189; 5.707.814;  
5.702.707; 5.698.178; 5.695.927; 5.665.536; 5.658.745; 5.652.138; 5.645.836; 5.635.345; 5.618.922; 5.610.035;  
10 5.607.847; 5.604.092; 5.601.819; 5.597.896; 5.597.688; 5.591.829; 5.558.865; 5.514.541; 5.510.264; 5.478.753;  
5.374.518; 5.374.516; 5.344.755; 5.332.567; 5.300.433; 5.296.347; 5.286.852; 5.264.221; 5.260.308; 5.256.561;  
5.254.457; 5.230.998; 5.227.159; 5.223.408; 5.217.895; 5.180.660; 5.173.399; 5.169.752; 5.166.050; 5.156.951;  
5.140.105; 5.135.864; 5.120.640; 5.108.904; 5.104.790; 5.049.389; 5.030.718; 5.030.555; 5.004.697; 4.983.529;  
4.888.290; 4.886.742 y 4.853.326, también son útiles para la presente invención.

15 La presente invención se refiere a un vector recombinante que expresa un epítipo foráneo. Ventajosamente, el epítipo es un epítipo de SIV. Se entiende por un experto en la materia que cualquier cosa que se refiera al VIH en la memoria descriptiva también se aplica al SIV. En una realización ventajosa, el epítipo de SIV es un fragmento de proteína de la presente divulgación; sin embargo, la presente divulgación puede englobar otros antígenos, epítopos o inmunógenos de SIV. De manera ventajosa, el epítipo del SIV es un antígeno de SIV, un epítipo de SIV o un inmunógeno de SIV tal como, pero sin limitación, los antígenos de SIV, epítopos de SIV o inmunógenos de SIV de las patentes de EE.UU. n.º 7.892.729; 7.886.962; 7.879.914; 7.829.287; 7.794.998; 7.767.455; 7.759.477; 7.758.869; 7.754.420; 7.749.973; 7.748.618; 7.732.124; 7.709.606; 7.700.342; 7.700.273; 7.625.917; 7.622.124; 7.611.721; 7.608.422; 7.601.518; 7.585.675; 7.534.603; 7.511.117; 7.508.781; 7.507.417; 7.479.497; 7.464.352; 7.457.973;  
20 7.442.551; 7.439.052; 7.419.829; 7.407.663; 7.378.515; 7.364.760; 7.312.065; 7.261.876; 7.220.554; 7.211.240;  
25 7.198.935; 7.169.394; 7.098.201; 7.078.516; 7.070.993; 7.048.929; 7.034.010; RE39.057; 7.022.814; 7.018.638;  
6.955.919; 6.933.377; 6.908.617; 6.902.929; 6.846.477; 6.818.442; 6.803.231; 6.800.281; 6.797.811; 6.790.657;  
6.712.612; 6.706.729; 6.703.394; 6.682.907; 6.656.706; 6.645.956; 6.635.472; 6.596.539; 6.589.763; 6.562.571;  
6.555.523; 6.555.342; 6.541.009; 6.531.574; 6.531.123; 6.503.713; 6.479.281; 6.475.718; 6.469.083; 6.468.539;  
30 6.455.265; 6.448.390; 6.440.730; 6.423.544; 6.365.150; 6.362.000; 6.326.007; 6.322.969; 6.291.664; 6.277.601;  
6.261.571; 6.255.312; 6.207.455; 6.194.142; 6.117.656; 6.111.087; 6.107.020; 6.080.846; 6.060.064; 6.046.228;  
6.043.081; 6.027.731; 6.020.123; 6.017.536; 6.004.781; 5.994.515; 5.981.259; 5.961.976; 5.950.176; 5.929.222;  
5.928.913; 5.912.176; 5.888.726; 5.861.243; 5.861.161; 5.858.366; 5.830.475; 5.817.316; 5.804.196; 5.786.177;  
5.759.768; 5.747.324; 5.705.522; 5.705.331; 5.698.446; 5.688.914; 5.688.637; 5.654.195; 5.650.269; 5.631.154;  
35 5.582.967; 5.552.269; 5.512.281; 5.508.166; 5.470.572; 5.312.902; 5.310.651; 5.268.265; 5.254.457; 5.212.084;  
5.087.631 y 4.978.687.

Los vectores usados de acuerdo con la presente invención deben elegirse normalmente de manera que contengan una región reguladora de genes adecuada, tal como un promotor o potenciador, de manera que se puedan expresar los antígenos y/o anticuerpos usados en la invención.

40 Cuando el objetivo es expresar los anticuerpos y/o antígenos de la divulgación *in vivo* en un sujeto, por ejemplo, para generar una respuesta inmune contra un antígeno del VIH-1 y/o inmunidad protectora contra el VIH-1, se deben escoger los vectores de expresión que sean adecuados para la expresión en ese sujeto y que sean seguros para su uso *in vivo*. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede desear expresar los anticuerpos y/o antígenos de la divulgación en un animal de laboratorio, tal como para pruebas preclínicas de las composiciones inmunógenas y vacunas para el VIH-1 de la divulgación. En otras realizaciones, será deseable expresar los anticuerpos y/o antígenos de la invención en sujetos humanos, tal como en ensayos clínicos y para el uso clínico real de las composiciones inmunógenas y la vacuna de la divulgación. Puede emplearse cualquier vector que sea adecuado para dichos usos, y es competencia del experto en la materia seleccionar un vector adecuado. En algunas realizaciones, se puede preferir que los vectores usados para estas aplicaciones *in vivo* estén atenuados para el vector a partir de la amplificación en el sujeto. Por ejemplo, si se usan vectores plasmídicos, preferentemente carecerán de un origen de replicación que funcione en el sujeto para aumentar la seguridad para su uso *in vivo* en el sujeto. Si se usan vectores víricos, preferentemente están atenuados o son defectuosos en la replicación en el sujeto, de nuevo, para potenciar la seguridad para su uso *in vivo* en el sujeto.

En realizaciones preferidas de la presente invención, se usan vectores víricos. Ventajosamente, el vector es un vector de CMV, preferentemente carente de una o más de las glicoproteínas US2, US3, US6 y US11. En otra realización más, todos los genes entre la región US2 y US11 del genoma de CMV están eliminados. En otra realización, en la que se desea superinfectividad o infectividad repetida, cualquier vector, ventajosamente un vector vírico, puede expresar una o más de las glicoproteínas US2, US3, US6 y US11. Los vectores de expresión vírica son bien conocidos por los expertos en la materia, e incluyen, por ejemplo, virus tales como adenovirus, virus adenoasociados (AAV), alfavirus, herpesvirus, retrovirus y poxvirus, incluyendo virus avipox, poxvirus atenuados, virus vacuna y, en particular, el virus vacuna de Ankara modificado (MVA, n.º de referencia ATCC VR-1566). Dichos virus, cuando se usan como vectores de expresión, son innatamente no patógenos en los sujetos seleccionados, tales como seres humanos o se han modificado para volverlos no patogénicos en los sujetos seleccionados. Por

ejemplo, los adenovirus y los alfavirus de replicación defectuosa son bien conocidos y se pueden usar como vectores de administración génica. Sin embargo, estos vectores son inmunogénicos e inducen inmunidad contra el vector que prohíbe su uso repetido a menos que expresen US2-11.

5 En una realización en la que se desea una superinfectividad o infectividad repetida, cualquier vector, ventajosamente un vector vírico, puede expresar una o más de las glicoproteínas US2, US3, US6 y US11. En una realización particularmente ventajosa, el vector expresa las glicoproteínas US2, US3, US6 y US11. Más ventajosamente, el vector contiene y expresa todas las glicoproteínas de dentro de la región US2 a US11 de CMV. En una realización ventajosa, la una o más glicoproteínas US2, US3, US6 y US11 pueden incluir, pero sin limitación, las glicoproteínas  
10 de las patentes de EE.UU. n.º 7.892.564; 7.749.745; 7.364.893; 6.953.661; 6.913.751; 6.740.324; 6.613.892; 6.410.033; 6.140.114; 6.103.531; 6.033.671; 5.908.780; 5.906.935; 5.874.279; 5.853.733; 5.846.806; 5.843.458; 5.837.532; 5.804.372; 5.753.476; 5.741.696; 5.731.188; 5.720.957; 5.676.952; 5.599.544; 5.593.873 y 5.334.498.

15 Las secuencias de nucleótidos y los vectores de la divulgación se pueden suministrar a las células, por ejemplo, si el objetivo es expresar los antígenos del VIH-1 en las células para producir y aislar las proteínas expresadas, tales como las células cultivadas en cultivo. Para expresar los anticuerpos y/o antígenos en células, se pueden usar métodos de transfección, transformación o administración génica adecuados. Dichos métodos son bien conocidos por los expertos en la materia, y el experto en la materia podría seleccionar fácilmente un método adecuado dependiendo de la naturaleza de las secuencias de nucleótidos, de los vectores y de los tipos de células usados. Por  
20 ejemplo, se podría usar transfección, transformación, microinyección, infección, electroporación, lipofección o administración mediada por liposomas. La expresión de los anticuerpos y/o antígenos puede llevarse a cabo en cualquier tipo adecuado de células hospedadoras, tales como células Bacterianas, levaduras, células de insecto y células de mamífero. Los anticuerpos y/o antígenos de la divulgación también pueden expresarse usando sistemas de transcripción/traducción *in vitro*. La totalidad de dichos métodos es bien conocida por los expertos en la materia, y el experto en la materia podría seleccionar fácilmente un método adecuado dependiendo de la naturaleza de las  
25 secuencias de nucleótidos, de los vectores y de los tipos de células usados.

En realizaciones preferidas, las secuencias de nucleótidos, anticuerpos y/o antígenos de la divulgación se administran *in vivo*, por ejemplo, cuando el objetivo es producir una respuesta inmunogénica en un sujeto. Un  
30 "sujeto", en el contexto de la presente invención, puede ser cualquier animal. Por ejemplo, en algunas realizaciones puede ser deseable expresar los transgenes de la divulgación en un animal de laboratorio, tal como para pruebas preclínicas de las composiciones inmunógenas y las vacunas contra el VIH-1 de la divulgación. En otras realizaciones, será deseable expresar los anticuerpos y/o antígenos de la divulgación en sujetos humanos, tales como en ensayos clínicos y para el uso clínico real de las composiciones inmunógenas y la vacuna de la divulgación. En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano, por ejemplo, un ser humano que está infectado con o que está en riesgo de infección con el VIH-1.

Para dichas aplicaciones *in vivo*, las secuencias de nucleótidos, anticuerpos y/o antígenos de la divulgación se administran preferentemente como un componente de una composición inmunogénica que comprende las  
40 secuencias de nucleótidos y/o antígenos de la divulgación en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones inmunogénicas de la divulgación son útiles para estimular una respuesta inmune contra el VIH-1 y se pueden usar como uno o más componentes de una vacuna profiláctica o terapéutica contra el VIH-1 para la prevención, la mejora o el tratamiento del SIDA. Los ácidos nucleicos y los vectores usados en la invención son particularmente útiles para proporcionar vacunas genéticas, es decir, vacunas para suministrar los ácidos nucleicos  
45 que codifican los anticuerpos y/o antígenos de la divulgación a un sujeto, tal como un ser humano, de modo que los anticuerpos y/o antígenos se expresen luego en el sujeto para generar una respuesta inmune.

Las composiciones de la divulgación pueden ser suspensiones inyectables, soluciones, pulverizados, polvos liofilizados, jarabes, elixires y similares. Se puede usar cualquier forma adecuada de composición. Para preparar dicha composición, se mezcla un ácido nucleico o vector de la invención, que tiene el grado de pureza deseado, con uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos y excipientes deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con el resto de ingredientes de la composición. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol o combinaciones de los mismos, tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como el cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexame-tonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico, alquilparabenos tales como metil- o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).  
65

Una composición inmunogénica o inmunológica también se puede formular en forma de una emulsión de aceite en agua. La emulsión de aceite en agua se puede basar, por ejemplo, en aceite de parafina líquido ligero (tipo farmacopea europea); aceite de isoprenoide tal como escualano, escualeno, EICOSANE™ o tetratetracontano; aceite resultante de la oligomerización de alqueno/s, por ejemplo, isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contengan un grupo alquilo lineal tal como aceites vegetales, oleato de etilo, di(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos ramificados o alcoholes, por ejemplo, ésteres de ácido isoesteárico. El aceite se usa ventajosamente en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes pueden ser tensioactivos no iónicos, tales como ésteres de sorbitán, mannido (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), glicerol, poliglicerol, propilenglicol y ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico o hidroxisteárico, opcionalmente etoxilados, y bloques de copolímero de polioxiopropileno-polioxi-etileno, tal como los productos Pluronic®, por ejemplo, L121. El adyuvante puede ser una mezcla de emulsionante/s, agente formador de micelas y aceite tal como el que se encuentra disponible en el mercado con el nombre de Provac® (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA).

Las composiciones inmunogénicas de la divulgación pueden contener sustancias adicionales, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes o adyuvantes para potenciar la eficacia de las vacunas ("Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª edición, Mack Publishing Company, (ed.) 1980).

También pueden incluirse adyuvantes. Los adyuvantes incluyen, pero sin limitación, sales minerales (por ejemplo,  $AlK(SO_4)_2$ ,  $Al-Na(SO_4)_2$ ,  $AlNH(SO_4)_2$ , sílice, alumbre,  $Al(OH)_3$ ,  $Ca_3(PO_4)_2$ , caolín o carbono), polinucleótidos con o sin complejos estimulantes inmunes (ISCOM) (por ejemplo, oligonucleótidos CpG, tales como los descritos en Chuang, T. H. *et al.*, (2002) *J. Leuk. Biol.* 71(3): 538-44; Ahmad-Nejad, P. *et al* (2002) *Eur. J. Immunol.* 32(7): 1958-68; Poli-IC o poli AU ácidos, poliarginina con o sin CpG (también conocida en la técnica como IC31, véase Schellack, C. *et al* (2003) Proceedings of the 34th Annual Meeting of the German Society of Immunology; Lingnau, K. *et al* (2002) *Vaccine* 20(29-30): 3498-508), JuvaVax™ (patente de EE.UU. n.º 6.693.086), ciertas sustancias naturales (por ejemplo, cera D de *Mycobacterium tuberculosis*, sustancias encontradas en *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis* o miembros del género *Brucella*), flagelina (ligando de receptor 5 de tipo Toll, véase McSorley, S. J. *et al.* (2002) *J. Immunol.* 169(7): 3914-9), saponinas tales como QS21, QS17 y QS7 (patentes de EE.UU. n.º 5.057.540; 5.650.398; 6.524.584; 6.645.495), monofosforil-lípido A, en particular, monofosforil-lípido A 3-de-O-acilado (3D-MPL), imiquimod (también conocido en la materia como IQM y disponible en el mercado como Aldara®; patentes de EE.UU. n.º 4.689.338; 5.238.944; Zuber, A. K. *et al.*, (2004) 22(13-14): 1791-8), y el inhibidor de CCR5 CMPD167 (véase Veazey, R. S. *et al* (2003) *J. Exp. Med.* 198: 1551-1562).

El hidróxido o el fosfato de aluminio (alumbre) se usan comúnmente en una solución del 0,05 a 0,1 % en solución salina tamponada con fosfato. Otros adyuvantes que se pueden usar, en especial, con vacunas de ADN, son la toxina del cólera, especialmente CTA1-DD/ISCOM (véase Mowat, A. M. *et al* (2001) *J. Immunol.* 167(6): 3398-405), polifosfacenos (Allcock, H. R. (1998) *App. Organo-metallic Chem.* 12(10-11): 659-666; Payne, L. G. *et al* (1995) *Pharm. Biotechnol.* 6: 473-93), citocinas tales como, pero sin limitación, IL-2, IL-4, GM-CSF, IL-12, IL-15, IGF-1, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$  (Boyer *et al.*, (2002) *J. Liposome Res.* 121:137-142; WO01/095919), proteínas inmunorreguladoras tales como CD40L (ADX40, véase, por ejemplo, el documento WO03/063899), y el ligando de CD1a a de células linfocíticas naturales (también conocido como CRONY o  $\alpha$ -galactosil-ceramida, véase Green, T. D. *et al*, (2003) *J. Virol.* 77(3): 2046-2055), proteínas de fusión inmunoestimuladoras tales como IL-2 fusionada al fragmento Fc de inmunoglobulinas (Barouch *et al.*, *Science* 290:486-492, 2000) y moléculas estimuladoras B7.1 y B7.2 (Boyer), pudiéndose administrar todas ellas bien como proteínas o en forma de ADN, en los mismos vectores de expresión que los que codifican los antígenos de la divulgación o en vectores de expresión separados.

Las composiciones inmunogénicas pueden diseñarse para introducir los ácidos nucleicos o vectores de expresión en un sitio de acción deseado y liberarlos a una velocidad apropiada y controlable. Los métodos de preparación de formulaciones de liberación controlada son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las preparaciones de liberación controlada pueden producirse mediante el uso de polímeros para complejar o absorber el inmunógeno y/o la composición inmunogénica. Se pueden preparar formulaciones de liberación controlada usando macromoléculas apropiadas (por ejemplo, poliésteres, poliaminoácidos, polivinilo, pirrolidona, etilenvinilacetato, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o sulfato de protamina) conocidas para proporcionar las características de liberación controlada o perfil de liberación deseados. Otro método posible para controlar la duración de la acción mediante una preparación de liberación controlada es incorporar los principios activos a partículas de un material polimérico tales como, por ejemplo, poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de estos ácidos o copolímeros de etileno-acetato de vinilo. Como alternativa, en lugar de incorporar estos principios activos a partículas poliméricas, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o de polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de polimetilmetacrilato, respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en "New Trends and Developments in Vaccines", Voller *et al.* (eds.), University Park Press, Baltimore, Md., 1978 y "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16ª edición.

Las dosis adecuadas de los ácidos nucleicos y vectores de expresión de la divulgación (en conjunto, los inmunógenos) en la composición inmunogénica de la divulgación pueden ser fácilmente determinadas por los

expertos en la materia. Por ejemplo, la dosis de los inmunógenos puede variar dependiendo de la vía de administración y del tamaño del sujeto. Las dosis adecuadas pueden ser determinadas por los expertos en la materia, por ejemplo, midiendo la respuesta inmune de un sujeto, tal como un animal de laboratorio, usando técnicas inmunológicas convencionales, y ajustando las dosis según sea apropiado. Dichas técnicas de medición de la respuesta inmune del sujeto incluyen, pero sin limitación, ensayos de liberación de cromo, ensayos de unión a tetrámeros, ensayos ELISPOT de IFN- $\gamma$ , ensayos ELISPOT de IL-2, ensayos de citocinas intracelulares y otros ensayos de detección inmunológica, por ejemplo, los detallados en el texto "Antibodies: A Laboratory Manual" de Ed Harlow y David Lane.

Cuando se proporcionan profilácticamente, las composiciones inmunogénicas de la divulgación se administran idealmente a un sujeto antes de la infección por VIH, o evidencia de infección por VIH, o antes de cualquier síntoma debido al SIDA, en especial, en sujetos de alto riesgo. La administración profiláctica de las composiciones inmunogénicas puede servir para proporcionar inmunidad protectora de un sujeto contra la infección por VIH-1, o para prevenir o atenuar la progresión del SIDA en un sujeto ya infectado con VIH-1. Cuando se proporcionan terapéuticamente, las composiciones inmunogénicas pueden servir para mejorar y tratar los síntomas del SIDA, y se usan ventajosamente lo antes posible tras la infección, preferentemente antes de la aparición de cualquier síntoma del SIDA, pero también se pueden usar en (o después) del inicio de los síntomas de la enfermedad.

Las composiciones inmunogénicas pueden administrarse usando cualquier método de administración adecuado incluyendo, pero sin limitación, la administración intramuscular, intravenosa, intradérmica, mucosa y tópica. Dichas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica. Los ejemplos más específicos de métodos de administración son inyección intramuscular, inyección intradérmica e inyección subcutánea. Sin embargo, la administración no debe limitarse a los métodos de inyección. Además, la administración de ADN en tejido animal se ha conseguido mediante liposomas catiónicos (Watanabe *et al.*, (1994) *Mol. Reprod. Dev.* 38:268-274; y el documento WO 96/20013), inyección directa de ADN desnudo en tejido muscular animal (Robinson *et al.*, (1993) *Vaccine* 11:957-960; Hoffman *et al.*, (1994) *Vaccine* 12: 1529-1533; Xiang *et al.*, (1994) *Virology* 199: 132-140; Webster *et al.*, (1994) *Vaccine* 12: 1495-1498; Davis *et al.*, (1994) *Vaccine* 12: 1503-1509; y Davis *et al.* (1993) *Hum. Mol. Gen.* 2: 1847-1851) o inyección intradérmica de ADN usando tecnología de "pistola de genes" (Johnston *et al.*, (1994) *Meth. Cell Biol.* 43:353-365). Como alternativa, las vías de administración pueden ser orales, intranasales o por cualquier otra vía adecuada. La administración también se realiza a través de una superficie de la mucosa tal como la mucosa anal, vaginal u oral.

Los esquemas de inmunización (o pautas) son bien conocidos para los animales (incluyendo los seres humanos), y pueden determinarse fácilmente para el sujeto y la composición inmunogénica en particular. Por lo tanto, los inmunógenos se pueden administrar una o más veces al sujeto. Preferentemente, existe un intervalo de tiempo establecido entre administraciones separadas de la composición inmunogénica. Aunque este intervalo varía para cada sujeto, normalmente varía de 10 días a varias semanas, y suele ser de 2, 4, 6 u 8 semanas. Para los seres humanos, el intervalo es normalmente de 2 a 6 semanas. En una realización particularmente ventajosa de la presente divulgación, el intervalo es más largo, ventajosamente de aproximadamente 10 semanas, 12 semanas, 14 semanas, 16 semanas, 18 semanas, 20 semanas, 22 semanas, 24 semanas, 26 semanas, 28 semanas, 30 semanas, 32 semanas, 34 semanas, 36 semanas, 38 semanas, 40 semanas, 42 semanas, 44 semanas, 46 semanas, 48 semanas, 50 semanas, 52 semanas, 54 semanas, 56 semanas, 58 semanas, 60 semanas, 62 semanas, 64 semanas, 66 semanas, 68 semanas o 70 semanas. En una realización más ventajosa, el intervalo es de aproximadamente 16 semanas o aproximadamente 53 semanas.

Las pautas de inmunización tienen normalmente de 1 a 6 administraciones de la composición inmunogénica, pero pueden tener tan solo una o dos o cuatro. Los métodos de inducción e una respuesta inmune también pueden incluir la administración de un adyuvante con los inmunógenos. En algunos casos, la vacunación de refuerzo anual, bianual u otro intervalo largo (5-10 años) puede complementar el protocolo de inmunización inicial.

Los presentes métodos también incluyen una variedad de pautas de sensibilización-refuerzo, por ejemplo, pautas de sensibilización de ADN-refuerzo de adenovirus. En estos métodos, una o más inmunizaciones de sensibilización son seguidas por una o más inmunizaciones de refuerzo. La composición inmunogénica real puede ser igual o diferente para cada inmunización y el tipo de composición inmunogénica (por ejemplo, que contiene proteína o vector de expresión), la vía y la formulación de los inmunógenos también se pueden variar. Por ejemplo, si se usa un vector de expresión para las etapas de sensibilización y refuerzo, puede ser del mismo o de diferente tipo (por ejemplo, vector de expresión de ADN o bacteriano o vírico). Una pauta de sensibilización-refuerzo útil proporciona dos inmunizaciones de sensibilización, separadas cuatro semanas, seguidas de dos inmunizaciones de refuerzo a las 4 y 8 semanas después de la última inmunización de sensibilización. También debe ser fácilmente evidente para un experto en la materia que hay varias permutaciones y combinaciones que se engloban en el uso de los vectores de expresión de ADN, bacterianos y víricos de la divulgación para proporcionar pautas de sensibilización y de refuerzo. En caso de que los vectores víricos expresen US2-11, se pueden usar de forma repetida mientras se expresan diferentes antígenos derivados de diferentes patógenos.

Una realización específica de la divulgación proporciona métodos de inducción de una respuesta inmune contra el VIH en un sujeto mediante la administración de una composición inmunogénica de la divulgación, que comprende

preferentemente un vector de adenovirus que expresa US2-11 que contiene ADN que codifica uno o más de los epítomos de la divulgación una o más veces a un sujeto en el que los epítomos se expresan a un nivel suficiente para inducir una respuesta inmune específica en el sujeto. Dichas inmunizaciones pueden repetirse varias veces a intervalos de tiempo de al menos 2, 4 o 6 semanas (o más) de acuerdo con una pauta de inmunización deseada.

Las composiciones inmunogénicas de la divulgación pueden administrarse solas, o pueden administrarse simultáneamente o administrarse secuencialmente con otros inmunógenos del VIH y/o composiciones inmunógenas del VIH, por ejemplo, con "otras" composiciones inmunológicas, antigénicas o vacunales, o terapéuticas, proporcionando así agentes multivalentes o "cóctel" o combinaciones de la divulgación y métodos para emplearlas. De nuevo, los ingredientes y la forma (simultánea o secuencial) de la administración, así como las dosis se pueden determinar teniendo en cuenta factores tales como la edad, el sexo, el peso, la especie y el estado del sujeto en particular, y la vía de administración.

Cuando se usan en combinación, los otros inmunógenos del VIH pueden administrarse al mismo tiempo o en momentos diferentes como parte de una pauta de inmunización global, por ejemplo, como parte de una pauta de sensibilización-refuerzo u otro protocolo de inmunización. En una realización ventajosa, el otro inmunógeno del VIH es env, preferentemente el trímero env del VIH.

Muchos otros inmunógenos del VIH son conocidos en la técnica, uno de dichos inmunógenos preferido es HIVA (descrito en el documento WO 01/47955), que puede administrarse como una proteína, en un plásmido (por ejemplo, pThr.HIVA) o en un vector vírico (por ejemplo, MVA.HIVA). Otro dicho inmunógeno para el VIH es RENTA (descrito en el documento PCT/US2004/037699), que también se puede administrar como una proteína, en un plásmido (por ejemplo, pTHR.RENTA) o en un vector vírico (por ejemplo, MVA.RENTA).

Por ejemplo, un método de inducción de una respuesta inmune contra el VIH en un sujeto humano comprende administrar al menos una dosis de sensibilización de un inmunógeno del VIH y al menos una dosis de refuerzo de un inmunógeno del VIH, en el que el inmunógeno de cada dosis puede ser el mismo o diferente, siempre que al menos uno de los inmunógenos sea un epítopo de la presente divulgación, un ácido nucleico que codifique un epítopo de la divulgación o un vector de expresión, preferentemente un vector VSV, que codifique un epítopo de la invención, y en el que los inmunógenos se administren en una cantidad o se expresen a un nivel suficiente para inducir una respuesta inmune específica del VIH en el sujeto. La respuesta inmune específica del VIH puede incluir una respuesta inmune de los linfocitos T específicos del VIH o una respuesta inmune de los linfocitos B específicos del VIH. Dichas inmunizaciones pueden realizarse en intervalos, preferentemente de al menos 2 a 6 semanas o más.

Aunque la presente invención y sus ventajas se han descrito en detalle, se ha de entender que es posible realizar en el presente documento diversos cambios, sustituciones y alteraciones sin apartarse del espíritu ni del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

## Ejemplos

### *Ejemplo 1: La evasión de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> es fundamental para la superinfección por citomegalovirus*

El citomegalovirus (CMV) puede superinfectar de manera persistente a los hospedadores infectados a pesar de la inmunidad humoral y celular específica del CMV; sin embargo, sigue sin definirse cómo lo hace. Los solicitantes han demostrado que la superinfección de macacos Rhesus (MR) infectados con CMV de Rhesus requiere la evasión de la inmunidad de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> por inhibidores codificados por virus de la presentación del antígeno de complejo de histocompatibilidad de clase I principal (MHC-I), en particular, los homólogos de CMV humano US2, 3, 6 y 11. Por el contrario, la interferencia del MHC-I era dispensable para la infección primaria de los MR o para el establecimiento de una infección secundaria persistente en los MR infectados por CMV transitoriamente con agotamiento de los linfocitos CD8<sup>+</sup>. Estos hallazgos demuestran que las glicoproteínas US2-11 potencian la evasión de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> *in vivo*, apoyando así la replicación vírica y la diseminación durante la superinfección, un proceso que complica el desarrollo de vacunas preventivas del CMV, pero que se puede aprovecharse para el desarrollo de vectores a base de CMV.

Una característica general de la respuesta inmune adaptativa a los virus es su capacidad para prevenir o extinguir rápidamente infecciones secundarias por virus idénticos o estrechamente relacionados. Una excepción notable es el miembro de la familia del herpesvirus citomegalovirus (CMV), que puede establecer de forma repetida una infección persistente en hospedadores inmunocompetentes (S. B. Boppana *et al.* *N. Engl. J. Med.* 344, 1366 (2001), S. Gorman *et al.*, *J. Gen. Virol.* 87, 1123 (2006) y S. G. Hansen *et al.*, *Nat. Med.* 15, 293 (2009)). Las infecciones secuenciales son probablemente la razón de la presencia de múltiples genotipos humanos de CMV (HCMV) en el hospedador humano (Meyer-König *et al.* *Lancet* 352, 1280 (1998)). Esta capacidad para establecer infecciones secundarias persistentes a pesar de la preexistencia de virus persistentes (denominada "superinfección") es particularmente notable, porque los individuos sanos infectados con CMV desarrollan respuestas de anticuerpos neutralizantes de alto título y manifiestan respuestas de los linfocitos T específicos de CMV CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de muy alta frecuencia (> 10 % de los linfocitos T de memoria circulantes pueden ser específicos del CMV) (A. W. Sylwester *et al.*, *J. Exp. Med.* 202, 673 (2005)). Esta evasión de la inmunidad preexistente ha frustrado los intentos de

desarrollar vacunas preventivas del CMV ((S. P. Adler *et al.*, *J. Infect. Dis.* 171, 26 (1995) y S. A. Plotkin *et al.*, *J. Infect. Dis.* 159, 860 (1989)), pero pueden explotarse para el desarrollo de vectores de CMV capaces de iniciar de forma repetida respuestas de los linfocitos T *de novo* a patógenos heterólogos en hospedadores positivos para CMV (S. G. Hansen *et al.*, *Nat. Med.* 15, 293 (2009)).

La importancia biológica de esta capacidad de superinfección ha motivado la investigación de los solicitantes sobre su extensión y mecanismo. Los solicitantes mostraron anteriormente que la inoculación de macacos Rhesus (MR) RhCMV<sup>+</sup> con 10<sup>7</sup> unidades formadoras de placas (ufp) de RhCMV genéticamente modificado (cepa 68-1) que expresa antígenos del virus de inmunodeficiencia simiesco (SIV) dio lugar a una superinfección manifestada por el desprendimiento persistente del CMV modificado genéticamente en la orina y la saliva, y por la inducción y el mantenimiento a largo plazo de las respuestas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> *de novo* específicas de la inserción de SIV (S. G. Hansen *et al.*, *Nat. Med.* 15, 293 (2009)). Para determinar si RhCMV sería capaz de superar la inmunidad a dosis más bajas, más fisiológicas de la infección, como se informó para EL HCMV (S. A. Plotkin *et al.* *J. Infect. Dis.* 159, 860 (1989)), se inoculó un RhCMV recombinante que contenía un casete de expresión flanqueado con loxP para SIVgag [RhCMV(gagL)] (FIG. 5) por vía subcutánea a dosis de 10<sup>4</sup> o 10<sup>2</sup> ufp en cuatro MR infectados de manera natural por RhCMV, manifestado por la presencia de respuestas potentes de los linfocitos T específicos de RhCMV (Tabla 1A). Se controlaron las respuestas de los linfocitos T específicos de SIVgag en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o en linfocitos de lavado broncoalveolar (BAL) mediante análisis citométrico de flujo de tinción intracelular de citocinas (ICCS) (FIG. 6 y 7) tras la estimulación con péptidos de 15 aminoácidos solapantes consecutivos correspondientes a SIVgag. La reducción de la dosis de inoculación tuvo un impacto mínimo sobre la dinámica de superinfección. Todos los animales desarrollaron respuestas de los linfocitos T específicos de SIVgag en 2 semanas (FIG. 1A), y se observó secreción del virus que expresa SIVgag en orina o hisopos bucales a las 4 a 10 semanas de la infección en ambas cohortes (FIG. 1B). El tiempo hasta la primera detección del virus secretado en estos MR expuestos a dosis bajas no fue sustancialmente diferente del de ocho animales RhCMV<sup>+</sup> infectados con 10<sup>7</sup> ufp de RhCMV(gagL) (FIG. 1B). Además, las respuestas de los linfocitos T específicos de SIVgag y la secreción de RhCMV(gagL) fueron estables durante más de 3 años independientemente de la dosis inicial (FIG. 1, A y C). Estos datos indican que, coincidiendo con el HCMV en seres humanos, el RhCMV es capaz de superar niveles elevados de inmunidad específica de CMV y de establecer infecciones persistentes secundarias, incluso con dosis bajas de virus de exposición.

**Tabla 1. Respuestas basales de los linfocitos T específicos de RhCMV en PBMC del los MR de estudio.** Se muestran los números de animales, así como el porcentaje de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicos de RhCMV medidos mediante tinción intracelular de citocinas.

	Figuras	Virus infeccioso	n.º de MR	CD4	CD8	
A	Figura 1	10 <sup>4</sup> ufp de RhCMV (gagL)	21.385	1,70	0,68	
			22.046	1,29	0,37	
			22.463	1,27	0,36	
			22.499	1,71	0,30	
		10 <sup>2</sup> ufp de RhCMV (gagL)	22.052	2,04	0,12,	
			22.063	2,37	0,43	
			22.511	3,16	0,55	
			22.559	1,05	0,42	
				Media ± DT	1,82 ± 0,69	0,41 ± 0,16

	Figuras	Virus infeccioso	n.º de MR	CD4	CD8
B	Figura 2	$\Delta$ US2-11 (gag)	21.973	0	0
			24.350	0	0
		$\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11 (gag)	23.609	0	0
			23.634	0	0
			Media $\pm$ DT	0	0
C	Figura 3	$\Delta$ VIHCE (gag) $\Delta$ Rh186-8(retanef)	23.101	2,112	0,576
			23.126	2,242	0,809
			23.132	2,273	1,343
			23.244	3,295	0,779
			Media $\pm$ DT	2,48 $\pm$ 0,55	0,88 $\pm$ 0,33
D	Figura 4	$\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11(gag)	21.308	0,612	0,197
			21.456	1,167	0,238
		$\Delta$ US2-11(gag)	21.794	0,961	0,214
			23.923	0,942	0,166
				Media $\pm$ DT	0,92 $\pm$ 0,23

Los solicitantes plantearon la hipótesis de que una etapa esencial durante la superinfección por CMV es la capacidad del virus para eliminar un punto de control inicial inmunológico. Un candidato probable para dicha barrera inmunológica son los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (CTL), porque son cruciales para el control de enfermedades asociadas con el CMV (E. A. Walter *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 333, 1038 (1995)). La importancia del control de los CTL para el CMV también es sugerida por la expresión vírica de múltiples proteínas que inhiben la presentación de antígenos de péptidos víricos a linfocitos T CD8<sup>+</sup> a través de moléculas de complejo de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) mayores (A. K. Pinto, A. B. Hill, *Viral Immunol.* 18, 434 (2005)). El HCMV codifica al menos cuatro glicoproteínas relacionadas, cada una con un mecanismo único para prevenir la presentación de antígenos: US2 y US11 median en la translocación retrógrada de MHC-I en el citosol para la destrucción proteosómica (F. J. van der Wal *et al. Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 269, 37 (2002)), US3 retiene MHC-I en el retículo endoplásmico interfiriendo con la carga de péptido controlada por chaperona (Z. Liu *et al. Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 503 (2009)), y US6 inhibe la translocación de péptidos víricos y hospedadores a través de la membrana del retículo endoplásmico por el transportador de péptidos dedicado TAP (transportador asociado con el procesamiento del antígeno) (E. W. Hewitt *et al., EMBO J.* 20, 387 (2001)). RhCMV codifica secuencias y homólogos funcionales de estos genes en una región genómica que engloba Rh182 (US2) a Rh189 (US11) (FIG. 5) (N. T. Pande *et al., J. Virol.* 79, 5786 (2005)). Además, el gen Rh178 codifica el inhibidor vírico específico de RhCMV de expresión de cadena pesada (VIHCE), que evita la traducción/translocación dependiente de la secuencia de señal de MHC-I (C. J. Powers, K. Früh, *PLoS Pathog.* 4, e1000150 (2008)).

Para determinar si la interferencia de MHC-I y la evasión de CTL desempeñaban un papel en la capacidad del CMV para superinfectar animales CMV<sup>+</sup>, los solicitantes sustituyeron toda la región de RhUS2-11 con un casete de expresión de SIVgag usando mutagénesis de cromosomas artificiales bacterianos (BAC), dando lugar a virus  $\Delta$ US2-11(gag). Los solicitantes también eliminaron Rh178 para generar  $\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11(gag) (FIG. 5). Los solicitantes mostraron anteriormente que la expresión de MHC-I se restablece parcialmente tras la eliminación de US2-11, mientras que la eliminación adicional de Rh178 restablece por completo la expresión de MHC-I en fibroblastos infectados con RhCMV (C. J. Powers, K. Früh, *PLoS Pathog.* 4, e1000150 (2008)). El análisis *in vitro* mostró que se eliminaron todos los virus para los marcos de lectura abiertos de RhCMV (ORF) dirigidos, no contenían ninguna mutación no deseada y se replicaron comparativamente con RhCMV de tipo silvestre (Figuras 8 y 9). En primer

lugar, los solicitantes examinaron si estos virus eran capaces de infectar animales que estaban sin tratamiento previo para CMV, como se muestra por la falta de respuestas de los linfocitos T específicos de CMV (Tabla 1B). Se expusieron tres grupos de animales a  $10^7$  ufp de  $\Delta$ US2-11(gag) (n = 2),  $\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11(gag) (n = 2) o RhCMV derivado de BAC (tipo silvestre) (n = 2). Las respuestas de los linfocitos T frente tanto a CMV como a SIVgag en PBMC y contra SIVgag en BAL fueron comparables entre los animales infectados con los mutantes de eliminación y el control de RhCMV(gag) de tipo silvestre (FIG. 2A). Además, todos los animales secretaron el virus que expresaba SIVgag a partir del día 56 durante el experimento (> 700 días) (FIG. 2B). El análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ADN aislado de un virus cocultivado de orina al día 428 confirmó que los virus secretados carecían de las respectivas regiones de genes y eran capaces de persistir en el hospedador (FIG. 2C). Conjuntamente, estos resultados muestran que la interferencia vírica de MHC-I es dispensable para la infección primaria, y el establecimiento y mantenimiento de la infección persistente, a pesar del desarrollo de una respuesta sustancial de los linfocitos T específicos de CMV.

Para examinar si era necesaria la interferencia vírica de MHC-I para la superinfección de MR RhCMV<sup>+</sup>, los solicitantes expusieron dos cohortes de cuatro MR infectados de manera natural con  $10^7$  ufp de  $\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11(gag) o RhCMV (gag). Todos los animales mostraron las respuestas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas del gen (IE) temprano de inmediato antes de la exposición (FIG. 3A y Tabla 1C). De acuerdo con los resultados anteriores (S. G. Hansen *et al.*, *Nat. Med.* 15, 293 (2009)), los MR inoculados con RhCMV(gag) de tipo silvestre mostraron el refuerzo de la respuesta de los linfocitos T específicos de RhCMV y desarrollaron una respuesta inmune específica de SIVgag (FIG. 3, A y B, inserciones). También secretaron virus que expresaban SIVgag (FIG. 3C). Por el contrario, los solicitantes no detectaron respuestas de los linfocitos T específicos de SIVgag en PBMC o BAL en MR inoculadas con  $\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11(gag), ni siquiera después de la inoculación repetida (FIG. 3, A y B) y no se detectó virus que expresaba SIVgag en las secreciones (FIG. 3C). Estos resultados sugieren que la interferencia del MHC-I es esencial para la superinfección. La inoculación de los mismos animales con  $\Delta$ US2-11(gag) y, posteriormente,  $\Delta$ VIHCE(gag) demostró que la superinfección requería la región de US2-11 conservada, pero no la región de VIHCE. El desarrollo de las respuestas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicos de SIVgag en sangre y BAL (FIG. 3, A y B), así como el refuerzo de las respuestas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicos de RhCMV preexistentes en sangre (FIG. 3A), o el desprendimiento de RhCMV que expresa SIVgag (FIG. 3D) solo fueron detectables tras la exposición a  $\Delta$ VIHCE(gag), pero no con  $\Delta$ US2-11(gag).

Los resultados de los solicitantes muestran que los genes de dentro de la región US2-11 son esenciales para la superinfección, lo que coincide con la función conocida de US2, US3, US6 y US11 como inhibidores de la presentación de antígeno de MHC-I. Hay, sin embargo, tres genes de función desconocida (Rh186 a Rh188) codificados entre US6 y US11. Rh186 y Rh187 están más estrechamente relacionados con las glicoproteínas de HCMV US8 y US10, respectivamente (N. T. Pande *et al.*, *J. Virol.* 79, 5786 (2005)), mientras que Rh188 es un ORF específico de RhCMV. Aunque se ha informado de la unión de HCMV-US8 y US10 a MHC-I, no está claro si esto afecta a la presentación de antígenos, porque la expresión de superficie de MHC-I no es reducida por US8 ni US10 de HCMV o RhCMV (N. T. Pande *et al.* *J. Virol.* 79, 5786 (2005), R. S. Tirabassi, H. L. Ploegh, *J. Virol.* 76, 6832 (2002) y M. H. Furman *et al.*, *J. Virol.* 76, 11753 (2002)). Para determinar si Rh186, Rh187 o Rh188 son necesarios para la superinfección, los solicitantes generaron el virus de eliminación  $\Delta$ Rh186-8. Para poder controlar la superinfección por este recombinante en la misma cohorte de animales que ya habían sido reinfectados con  $\Delta$ VIHCE(gag), los solicitantes aplicaron un marcador inmunológico distinto, SIVretanef, una proteína de fusión que consiste en proteínas rev, tat y nef de SIV (S. G. Hansen *et al.*, *Nat. Med.* 15, 293 (2009)). Se elimina  $\Delta$ Rh186-8(retanef) para Rh186-188 y contiene el casete de expresión Retanef entre los ORF Rh213 y Rh214 (FIG. 5). Los solicitantes inocularon la misma cohorte con  $\Delta$ Rh186-8(retanef) y controlaron la respuesta de los linfocitos T a esta proteína de fusión, así como a RhCMV-IE y SIVgag usando los péptidos correspondientes. Como se muestra en la FIG. 3, A y B, los cuatro MR desarrollaron una respuesta de los linfocitos T específica de SIVretanef dentro de las 2 semanas posteriores a la exposición, indicando la correcta superinfección. Además, el virus que expresa SIVretanef se desprendió en las secreciones de animales infectados junto con  $\Delta$ VIHCE que expresa SIVgag(gag) (FIG. 3D). Los solicitantes concluyen así que la región de Rh186-8 es dispensable para la superinfección.

Conjuntamente, los resultados de los solicitantes sugirieron que RhCMV era incapaz de superinfectar en ausencia de los homólogos de US2, US3, US6 y US11, porque el virus ya no era capaz de evitar la eliminación por CTL. Para examinar más a fondo esta hipótesis, un nuevo grupo de MR RhCMV<sup>+</sup> (Tabla ID) se sometió al agotamiento de los linfocitos CD8<sup>+</sup> mediante el tratamiento con cM-T807, un anticuerpo monoclonal humanizado contra CD8, antes de la superinfección con  $\Delta$ US2-11(gag) o  $\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11(gag). El análisis por citometría de flujo de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales reveló que el agotamiento era extenso, pero transitorio, con detección de la recuperación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> comenzando al día 21 después de la exposición (FIG. 4, A y B). Tras la inoculación con  $\Delta$ US2-11(gag) o  $\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11(gag), se registraron respuestas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicas de SIVgag tan pronto como al séptimo día de la exposición, mostrando la capacidad de los virus de eliminación para superinfectar estos animales (FIG. 4C). Además, se observaron linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de SIVgag dentro de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que se volvieron a unir en sangre y BAL el día 21 en dos MR y el día 28 en un tercero; en el cuarto MR, dichas respuestas solo se observaron en BAL después del día 56. A partir de estos datos, los solicitantes concluyen que los linfocitos CD8<sup>+</sup>, muy probablemente linfocitos T CD8<sup>+</sup>, eran esenciales para prevenir la superinfección por el virus  $\Delta$ US2-11, indicando con fuerza que la función inhibidora de MHC-I de estas moléculas es necesaria para la superinfección del hospedador CMV-positivo. En particular, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del CMV no pudieron eliminar el RhCMV

que carecía de inhibidores del MHC-I una vez que se había establecido una infección persistente (FIG. 4D), proporcionando evidencias adicionales de que la infección persistente es insensible a la inmunidad de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> incluso cuando la capacidad del virus para prevenir la presentación del MHC-I está comprometida.

5 Los datos de los solicitantes implican que la evasión de los linfocitos T no es necesaria para el establecimiento de una infección primaria por CMV o una vez que se han ocupado los sitios de persistencia (por ejemplo, células epiteliales de riñón y glándulas salivales), sino que es esencial para permitir al CMV que alcance estos sitios de persistencia del sitio periférico de inoculación en el hospedador inmune al CMV. Un posible escenario es que la  
10 infección vírica de las células circulantes, por ejemplo, los monocitos, solo puede producirse satisfactoriamente si el virus previene la eliminación de estas células por CTL específicos del virus. Sin embargo, se necesitará más trabajo para identificar el tipo de célula que soporta la superinfección.

Aunque las funciones bioquímicas y de biología celular de US2, US3, US6 y US11 han sido ampliamente estudiadas (C. Powers *et al. Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325, 333 (2008)), su papel en la patogénesis vírica seguía siendo un  
15 enigma. Se ha encontrado que las funciones de los genes análogos en el CMV murino (MCMV) eran prescindibles tanto para la infección primaria como persistente (A. K. Pinto, A. B. Hill, *Viral Immunol.* 18, 434 (2005)), aunque se ha informado de títulos reducidos para MCMV eliminado en estos genes (A. Krmpotic *et al., J. Exp. Med.* 190, 1285 (1999)). Por lo tanto, la razón por la que todos los CMV conocidos dedican múltiples productos génicos a la regulación negativa del MHC-I se había mantenido esquivada. Los resultados actuales de los solicitantes identifican  
20 ahora un papel fundamental para estos inmunomoduladores para permitir la superinfección del hospedador positivo en CMV. Además, estos resultados sugieren que la capacidad de superinfección es una función evolutiva conservada entre los CMV y, por lo tanto, podría desempeñar un papel importante en la biología de estos virus. La superinfección podría potenciar el mantenimiento de la diversidad genética de las cepas de CMV de una población hospedadora altamente infectada, lo que podría proporcionar una ventaja evolutiva. Sin embargo, hay otra  
25 posibilidad. El CMV es un virus grande con miles de posibles epítomos de los linfocitos T y, por lo tanto, un alto potencial para la reactividad cruzada de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (L. K. Selin *et al., Immunol. Rev.* 211, 164 (2006)). De hecho, en un estudio de respuestas de células T del HCMV del pan- proteómico, el 40 % de los subconjuntos HCMV seronegativos manifestó una o más respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de reactividad cruzada a epítomos codificados por HCMV (A. W. Sylwester *et al., J. Exp. Med.* 202, 673 (2005)). Como el reconocimiento de CMV por  
30 los linfocitos T citotóxicos parece bloquear eficazmente la infección primaria por CMV, los individuos con inmunidad a linfocitos T CD8<sup>+</sup> reactiva cruzada podrían ser resistentes al CMV. Por lo tanto, la función de US2-11 puede ser necesaria para eludir dichas respuestas y establecer la infección en esta gran población de individuos que, de otro modo, podrían ser resistentes al CMV.

35 Los resultados de los solicitantes también pueden explicar por qué, hasta la fecha, no ha sido posible desarrollar una vacuna que proteja eficazmente a los seres humanos de la infección por HCMV. Aunque la inmunidad de la mucosa mediada por anticuerpos podría reducir la tasa de superinfección (S. A. Plotkin *et al. J. Infect. Dis.* 159, 860 (1989) y L. K. Selin *et al., Immunol. Rev.* 211, 164 (2006)), una vez que se rompe esta capa de defensa, los CTL específicos del CMV parecen ser incapaces de prevenir la diseminación vírica, debido a la regulación negativa de MHC-I por  
40 US2-11. Por lo tanto, aunque las vacunas contra el CMV podrían ser capaces de limitar la viremia por CMV y la morbilidad asociada, esta interferencia del MHC-I hace improbable que la protección esterilizante contra la infección por CMV sea una meta alcanzable.

**Anticuerpos.** Se usaron los siguientes anticuerpos para inmunotransferencia: Ab anti-Gag del NIH AIDS Repository para todos los SIVgag que expresan recombinantes de RhCMV o anti-FLAG (Sigma) para SIVgag marcado con  
45 FLAG; anti-V5 (Invitrogen) para SIVretanef marcado con V5 y anti-calreticulina (SPA-601, StressGen) para el control. Anti-RhCMV-IE1 se ha descrito previamente (S. G. Hansen *et al., Nat Med* 15, 293 (2009)). Los siguientes anticuerpos usados en citometría de flujo fueron de BD Bioscience: L200 (CD4; AmCyan); SP34-2 (CD3, Alex700, PacBlu); SK1 (CD8alfa; TruRed); DX2 (CD95; PE); 25723.11 (IFN- $\gamma$ ; APC); 6.7 (TNF, FITC). Los siguientes anticuerpos se obtuvieron en el contador Beckman: CD28.2 (CD28; PE-Texas Red); L78 (CD69; PE).  
50

**Construcción de RhCMV recombinante.** Todos los virus recombinantes usados en este estudio se obtuvieron de la cepa RhCMV 68-1 (S. G. Hansen *et al., J. Virol* 77, 6620 (2003)) y se representan gráficamente en la FIG. 5. Se generó RhCMV(gagL) reemplazando la proteína verde fluorescente reforzada (EGFP) flanqueada por loxP en  
55 RhCMV-EGFP (W. L. Chang *et al., J. Virol* 76, 9493 (2002)) con un casete de expresión flanqueado con loxP para SIVmac239-gag bajo el control del promotor EF1 $\alpha$  mediante recombinación *in vivo* en cultivo de tejidos. Todos los otros virus recombinantes se crearon usando el cromosoma artificial bacteriano RhCMV (RhCMV-BAC) (W. L. Chang, P. A. Barry, *J. Virol* 77, 5073 (2003)) (FIG. 5). El casete de BAC se insertó entre los homólogos de RhCMV de US1 y US2 y autoescisiones a través de Cre-recombinasa (W. L. Chang, P. A. Barry, *J. Virol* 77, 5073 (2003)). El virus recombinante RhCMV(gag) contiene una secuencia de SIVmac239-gag marcada con FLAG con optimización  
60 de codones, bajo el control del promotor EF1 $\alpha$  insertado entre los ORF R213 y R214 (S. G. Hansen *et al., Nat Med* 15, 293 (2009)). La eliminación de la región de US2-11 mediante recombinación homóloga (clonación de ET) con un casete de resistencia a la kanamicina flanqueado con FRT (KanR) se ha descrito anteriormente (C. J. Powers, K. Fröh, *PLoS Pathog* 4, e1000150 (2008)).  $\Delta$ US2-11(gag) se creó reemplazando toda la región Rh182-189 (pares de bases 184489-191243) usando los mismos cebadores y estrategia de mutagénesis que antes (C. J. Powers, K. Fröh, *PLoS Pathog* 4, e1000150 (2008)) a excepción de que el fragmento insertado contenía tanto el casete KanR como el  
65

casete SIVgag marcado con FLAG con optimización de codones. El casete KanR se eliminó mediante expresión de FLP inducida por arabinosa (C. J. Powers, K. Früh, *PLoS Pathog* 4, e1000150 (2008)). Se creó  $\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11 (gag) mediante la eliminación posterior de Rh178 (VIHCE, pares de bases 181320-182060). Dado que  $\Delta$ US2-11(gag) contiene un único sitio de recombinación TRF a partir de la escisión de KanR, los solicitantes usaron un casete de KanR flanqueado por la secuencia TRF mutante F5 para la eliminación de VIHCE. Esto evita la posible recombinación entre sitios TRF nuevos y existentes cuando se crean recombinantes duales. El casete de KanR flanqueado con TRF mutante se obtuvo a partir del plásmido pOri6K-F5 (E. M. Borst, M. Messerle, *J Virol* 79, 3615 (2005)) usando los cebadores 5'-TAAAAGTGTGCGGATGAATGTGCGGGCCCAACACGCAGACCCGAAAAGTGCCACCTGC AGAT-3' y 5'-GCCTGACTGATGACTAGTCATCGCAGCCTCTTCCC GCCCAGGAACACTTAACGGC TGA-3'.  $\Delta$ VIHCE se creó reemplazando los pares de bases 181320-182060 con el casete de expresión de SIVgag usando los cebadores 5'-TTTGTTCGTATAAAAAGTGTGCGGATGAATGTGCGG CGCCAACACGCAGACCCGAAAACGACGGCCAGT-3' y 5'-CGCTC-CCTCG GCCTGACTGATGACTAGTCATCGCAGCCTCTTCCC GCCCGTATGTTGTGTGGAATT GTGAG-3'.  $\Delta$ Rh186-8(retanef) se creó a partir del RhCMV(retanef) marcado con V5 previamente descrito (S. G. Hansen *et al.*, *Nat Med* 15, 293 (2009)) mediante la eliminación de pares de bases 187934-190031 usando el casete de KanR flanqueado por los sitios TRF de mutante F5. Todos los BAC recombinantes se verificaron para las eliminaciones correctas mediante la digestión de restricción, la transferencia de Southern y el análisis de secuencia de los bordes de inserción. El virus RhCMV se reconstituyó mediante electroporación de fibroblastos de Rhesus telomerizados (TRF) (V. Kirchoff *et al.*, *Arch Virol* 147, 321 (2002)).

**Caracterización de virus recombinantes por RT-PCR.** Los virus resultantes se purificaron en placa y se caracterizaron por la expresión génica de genes eliminados y flanqueantes mediante RT-PCR (FIG. 8). Se infectaron los TRF a una MOI = 1, y se recogió el ARN total a las 24 h de la infección usando el mini kit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se trataron 4  $\mu$  de ARN con DNasa I (Applied Biosystems) durante 30 min a 37 °C. Se usó 1  $\mu$ g de ARN tratado con DNasa en una reacción de transcripción inversa de 20  $\mu$ l que contenía 50 ng de hexámeros al azar, dNTP 0,5 mM, DTT 10 mM y 1  $\mu$ l de superscript III RT en 1 x tampón RT (Invitrogen) durante 1 hora a 37 °C. Se usó 1  $\mu$ L de la reacción de RT para la PCR semicuantitativa con taq polimerasa Platinum (Invitrogen) en las siguientes condiciones: 1 x tampón taq Platinum, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, 0,5  $\mu$ M de cada cebador y 1,5 U de polimerasa. Se realizaron 35 ciclos de amplificación en las siguientes condiciones: 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 15 segundos. Se usaron los siguientes pares de cebadores: SIVgag 5'-ACCCACAACCAGTCCACAA-3' y 5'-ATCCACTGGATCTGTTTCGTCAA-3'; Rh156 5'-CAATGAGGATAGGTTCCAGTTG-3' y 5'-GCCAGTGGGATGTCAGTACCA-3'; Rh175 5'-CTAGCAGTACTGAGAGCTAG-3' y 5'-TCACGCCAATCGACAGT-GCACG-3'; Rh178 5'-CGCATACTGACAAGCCAGGGC-3' y 5'-GCGAAAGAAGGTGCACATGAC-3'; Rh181 5'-CCT-CACGGAGTCGTCGTTGAC-3' y 5'-TGTGTCGTCTCTTCTCCGCAG-3'; Rh182 5'-GATTTTCGTTGAACATGTC-CGAC-3' y 5'-GTTATGTGTACAGAAAGTCCG GCT-3'; Rh189 5'-TGCTTCGTCCTGGTGTGT-3' y 5'-TTAG-CAGTTTCATGGTTG CGA-3'; Rh190 5'-GAAATGGATAGCGGTGCTCAC-3' y 5'-CAGACAACAGGTTG TTCAGG-3'; GAPDH 5'-GCACCACCAACTGCTTAGCAC-3' y 5'-TCTTCTGGGTGG CAGTGATG-3'. Para la caracterización del virus Rh $\Delta$ 186-8(retanef), se realizó RT-PCR como se ha descrito anteriormente con los siguientes pares de cebadores: Rh185 5'-AGCGTAGCTCCTCCATACCG CT-3' y 5'-ATCCGCGGACTGTTTGGGTGT-3'; Rh186 5'-GCTTCTCCAGAAGTT-GCA TAGGATGA-3' y 5'-CGACTTCCGGATCCTACGTGGC-3'; Rh187 5'-TACATGCCATGCTGTCGCA-3' y 5'-GCGCCATCCCGTGTACCC-3'; Rh188 5'-AGAGCTCTGGTCGTGCGCGT-3' y 5'-TGGCTGGCCACCA-GATGGATG-3'; Rh189 5'-AACCAGTAGGAGCGCCCGGT-3' y 5'-CGACTCCTGCATGCTTACTGGGGA-3';  $\beta$ -actina 5'-TCACCCACACTGTGCCATCTACGA-3' y 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'.

**Caracterización de virus recombinantes por secuenciación del genoma comparativo.** Para confirmar que la manipulación genética del genoma de RhCMV no introdujo mutaciones no deseadas fuera de las regiones a las que se dirigió la eliminación, los solicitantes usaron la secuenciación de genoma comparativa (CGS) para comparar los virus de eliminación con RhCMV-BAC. Las diferencias de nucleótidos individuales entre las cepas de referencia y de ensayo de herpesvirus pueden identificarse con CGS (O. Timoshenko *et al.*, *J Med Virol* 81, 511 (2009) y D. Estep *et al.*, *J Virol* 81, 2957 (2007)). La CGS del ADN vírico se realizó usando una técnica basada en hibridación de micromatrices con los servicios proporcionados por NimbleGen Systems, Inc. (Madison, WI). Se creó una matriz de hibridación genómica comparativa de RhCMV usando la secuencia publicada para RhCMV 68.1 (S. G. Hansen *et al.*, *J. Virol* 77, 6620 (2003)). Los oligonucleótidos que comprendían esta matriz se diseñaron para estar entre 29 y 32 pb, con secuencias solapantes de al menos 7 pb, con cobertura de ambas cadenas del genoma de RhCMV 68.1. El ADN vírico se aisló usando métodos convencionales de a) RhCMV-BAC parental (W. L. Chang, P. A. Barry, *J Virol* 77, 5073 (2003)), b)  $\Delta$ VIHCE $\Delta$ US2-11(gag), c)  $\Delta$ US2-11(gag) o d)  $\Delta$ VIHCE(gag). En resumen, se produjo el virus en fibroblastos de Rhesus telomerizados (TRF), se recogieron los sobrenadantes y, tras el tratamiento con proteinasa K, se aisló el ADN mediante centrifugación en gradiente de cloruro de cesio. Se hizo precipitar el ADN vírico resultante con etanol y se llevó a una concentración final de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. El ADN vírico se fragmentó y se marcó con Cy3 (RhCMV-BAC por patrón) o Cy5 (virus de eliminación). Se hicieron hibridaciones de las sondas de ADN víricas de referencia y de ensayo marcadas con las matrices de mosaico y se escanearon las señales de Cy3 y Cy5. Se usó el software SignalMap (NimbleGen Systems, Inc.) para analizar todos los datos de la CGS.

**Macacos Rhesus.** En este estudio, se usó un total de 28 macacos Rhesus (MR) (*Macaca mulatta*) de origen genético indio, jóvenes y adultos, criados para este fin, de los que cuatro animales eran animales libres de patógenos específicos (SPF) y carecían de los linfocitos T específicos de RhCMV y anticuerpos. Todos los demás animales usados en el estudio adquirieron RhCMV de manera natural mientras estaban en la colonia. Se confirmó la presencia o ausencia de respuestas de los linfocitos T específicos de RhCMV mediante tinción de citocinas intracelulares de PBMC estimuladas con Ag de RhCMV (Tabla 1). Todos los MR estaban libres de herpesvirus 1 de cercopithecina, retrovirus simiesco de tipo D, virus T-linfotrópico simiesco de tipo 1 e infección por SIV. Los protocolos de los animales fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales del Centro Nacional de Investigación de Primates de Oregón, bajo las normas de los Institutos Nacionales de la Guía de Salud de Estados Unidos para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Los animales se inocularon con  $10^2$ - $10^7$  ufp de virus recombinante por vía subcutánea. Para el agotamiento de los linfocitos CD8<sup>+</sup>, se trataron MR con 10, 5, 5 y 5 mg por kg de peso corporal del anticuerpo monoclonal humanizado cM-T807 (J. E. Schmitz *et al.*, *Am J Pathol* 154, 1923 (1999)) un día antes de la infección vírica y en los días 2, 6 y 9 después de la infección, respectivamente.

**Análisis virológico de macacos Rhesus.** Se realizó el aislamiento y el cocultivo de virus de orina e hisopos bucales como se ha descrito anteriormente (S. G. Hansen *et al.*, *Nat Med* 15, 293 (2009)). En resumen, se concentró el virus a partir de orina limpia y se cultivó junto con fibroblastos de Rhesus, y se recogieron lisados celulares tras observarse los efectos citopáticos o después de 28 días.

**Análisis por PCR del virus cocultivado.** Se usó sobrenadante de células preparadas a partir de cocultivos de orina para infectar TRF nuevos. Cuando las células alcanzaron 90-100 % del efecto citopático, se recogió el ADN total. Se rasparon las células y se lisaron en 300  $\mu$ l de un tampón que contenía Tris-HCl 10 mM, pH 8,5, EDTA 5 mM, NaCl 0,2 M y SDS al 0,2 % durante 5 minutos a 60 °C, seguido de la adición de 10  $\mu$ g de ARNasa A y 5  $\mu$ l de proteinasa K Fermentas, ~20 mg/ml) durante 1 hora a 60 °C. A continuación, se hizo precipitar la proteína con 150  $\mu$ l de NaCl 5 M y se incubó en hielo durante 5 min. Los restos se sedimentaron a 16.000 xg durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y se precipitó ADN con 450  $\mu$ l de isopropanol. Se usaron 50 ng de ADN para análisis de PCR en las siguientes condiciones: 1 x tampón taq Platinum, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, 0,5  $\mu$ M de cada cebador y 1,5 U de taq polimerasa Platinum. Se realizaron 35 ciclos de amplificación en las siguientes condiciones: 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 80 segundos. Se usaron los siguientes pares de cebadores: Rh156 5'-GTTTAGGGAACCGCCATTCTG-3' y 5'-GTATC-CGCGTTCCAATGCA-3'; SIVgag 5'-ACCCACAACCAGCTCCACAA-3' y 5'-CTGCCATTAATCTAGC-3'; Rh189 5'-CTCTGGTCGTCGGCGTATG-3' y 5'-TGCTTCGTCTGGTGTGTGT-3'; Rh180 5'-GGCAAGGGAGCTCAAT-GGAAAC-3' y 5'-TCAACGCCCATCTAAAGCCG-3'; Rh178 5'-CGTTTGCTTCCTATGTCCGC-3' y 5'-CATTT-GCATGCAGCTGTGCG-3'.

**Análisis inmunológico de macacos Rhesus.** Se realizó la recogida de BAL como se ha descrito anteriormente (C. J. Pitcher *et al.*, *J Immunol* 168, 29 (2002)). Se midieron las respuestas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> mediante análisis de citocinas intracelulares de citometría de flujo de células PBMC y BAL, como se ha descrito anteriormente (S. G. Hansen *et al.*, *Nat Med* 15, 293 (2009)). Para los ensayos de estimulación con linfocitos T, se usaron lisados de RhCMV (cepa 68-1) o péptidos 15-meros solapantes representantes de las proteínas SIVmac239 Gag, Rev/Tat/Nef o las proteínas Early 1 y 2 inmediatas de RhCMV (solapamiento = 11 aminoácidos) en presencia de mAb CD16 y CD49d (BD Biosciences) coestimuladores. La coestimulación en ausencia de antígeno sirvió como un control de fondo. Se incubaron las células con antígeno y las moléculas coestimuladoras solas durante 1 h, y luego en presencia del inhibidor de secreción Brefeldin A (10  $\mu$ g/ml, Sigma Aldrich) durante 8 h más. Después de la tinción superficial e intracelular con mAb conjugados, se realizó un análisis citométrico de flujo policromático (6 a 8 parámetros) en un instrumento LSR II Becton Dickinson. Se analizaron los archivos de datos multiparamétricos en modo de lista mediante el software FlowJO (versión 8.8.6, Tree Star, Inc.). Usando este software, se dividieron los linfocitos CD3<sup>+</sup> en subconjuntos de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y luego se analizaron para un subconjunto que manifestaba la regulación positiva del marcador de activación CD69 y citocina, ya sea TNF $\alpha$  solo (datos de la FIG. 1) o TNF $\alpha$  y/o IFN- $\gamma$  (FIG. 2-4) (véase la FIG. 6). Para las PBMC, se dividió este valor restado del fondo entre la fracción de células de memoria total (determinada como se describe a continuación) para obtener la frecuencia de respuesta "corregida de la memoria" informada (C. J. Pitcher *et al.*, *J Immunol* 168, 29 (2002)). Para el BAL, las respuestas informadas fueron respuesta de fondo (sin antígeno) solo restada, pues los linfocitos T de BAL son enteramente células de memoria. (C. J. Pitcher *et al.*, *J Immunol* 168, 29 (2002)). Para determinar la fracción de memoria de los linfocitos T circulantes, se delimitaron las poblaciones de subconjuntos de los linfocitos T sin tratamiento previo y de memoria, basándose en los patrones de expresión de CD28 y CD95, como se describe en (C. J. Pitcher *et al.*, *J Immunol* 168, 29 (2002)) (véase la FIG. 7).

### Ejemplo 2

En el presente ejemplo, los solicitantes desarrollan una serie de vacunas contra el RhCMV atenuado para examinar el nivel más alto de atenuación que todavía puede conseguir protección contra  $\Delta$ US2-11-Gag. Una limitación de los datos preliminares de los solicitantes era que los solicitantes solo habían mostrado que la infección natural con RhCMV era protectora contra la reinfección con  $\Delta$ US2-11, pero los solicitantes todavía tenían que demostrar que la infección experimental con RhCMV recombinante sería protectora. Los solicitantes demuestran ahora que un virus recombinante que carece de las principales proteínas de tegumento pp65a y pp65b o pp71 protege contra la

reinfección por  $\Delta$ US2-11-Gag.

PP65 es una de las proteínas más abundantes en partículas de HCMV y el componente más abundante del tegumento vírico, una estructura proteica amorfa estratificada entre la cápside y la envoltura. Además de su papel en eludir respuestas inmunes innatas, pp65 es una de las proteínas más inmunogénicas codificadas por el HCMV y, por lo tanto, se incluye en la mayoría de las vacunas experimentales y los linfocitos T específicos de pp65 se incluyen rutinariamente en protocolos de transferencia adoptivos. Sin embargo, nunca se ha examinado el papel de pp65 para la infección aguda y persistente *in vivo*.

El RhCMV codifica dos homólogos de HCMV pp65 (UL83), pp65a (Rh111) y pp65b (Rh112). Usando la mutagénesis BAC, los solicitantes eliminaron Rh111 y Rh112 del genoma de RhCMV.  $\Delta$ Rh111-2 no muestra un defecto de crecimiento en cultivos de fibroblastos (datos no mostrados). Los solicitantes infectaron a dos animales seronegativos con  $5 \times 10^6$  ufp de  $\Delta$ Rh111-2. La infección se controló inmunológicamente durante los siguientes meses (FIG. 10). Ambos animales desarrollaron una potente respuesta de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específica de CMV medida por tinción intracelular de citocinas. En contraste con los animales infectados con RhCMV WT (se muestra un animal representativo en la FIG. 10), ninguno de los animales infectados con  $\Delta$ Rh111-2 desarrolló una respuesta inmune a pp65. Para examinar si la respuesta inmune anti-CMV de dos animales infectados con  $\Delta$ Rh111-2 era comparable a la infección natural con respecto a la protección contra el virus con eliminación de  $\Delta$ US2-11, los solicitantes inocularon  $10^7$  ufp de  $\Delta$ US2-11-Gag s.c. y controlaron la respuesta inmune específica de Gag. Sin embargo, ninguno de los animales desarrolló una respuesta de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> a Gag en PBMC mientras que permanecieron positivos para IE (FIG. 11, se muestran las respuestas medias).

Sorprendentemente, pp65 no parece ser necesaria para la infección primaria de animales sin tratamiento previo de CMV por RhCMV. Estos datos demuestran además que la infección experimental con RhCMV recombinante puede proteger contra la reinfección con  $\Delta$ US2-11. Curiosamente, la inmunidad de los linfocitos T protectores de  $\Delta$ US2-11 no parece depender de los linfocitos T específicos de pp65 a pesar de su inmunodominancia durante la infección natural tanto en CMV humano como de Rhesus.

Los vectores de RhCMV/SIV pueden: 1) establecer una infección persistente en macacos Rhesus (MR) RhCMV seropositivos; 2) obtener respuestas potentes y duraderas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicos de SN con un fuerte sesgo de "memoria efectora" ( $T_{EM}$ ) (véase la FIG. 16); y 3) proteger ~50 % de los MR vacunados contra la infección progresiva de SIV después de la dosis limitante, exposición intrarrectal con el virus altamente patógeno SIVmac239 (véase la FIG. 10). La protección manifestada en MR vacunados con RhCMV/SIV es distinta de las vacunas contra el SIV de los linfocitos T anteriores en su brusquedad y extensión, manifestando los MR protegidos un estallido vírico en plasma de tamaño variable tras la infección inicial, seguido del control inmediato a niveles no detectables. Mientras que estos MR pueden mostrar posteriormente "irregularidades" periódicas de viremia de bajo nivel, no se observa el agotamiento de la memoria de CD4<sup>+</sup>, y las respuestas de los anticuerpos (Ab) específicos de SIV no aumentan, lo que indica un nivel muy alto de control. Además, hasta la fecha, este estricto control ha sido estable durante > 30 semanas en 16/17 MR protegidos. La protección se correlaciona con las respuestas totales de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de SIV en sangre durante la fase de vacuna, lo que probablemente refleja el grado en que estas células se siembran en tejidos efectores. Tomados en conjunto, estos datos indican un nuevo patrón de protección coincidente con un control muy temprano, que probablemente ocurre en el sitio de la entrada vírica o en los sitios tempranos de replicación y amplificación víricas, y mediada por  $T_{EM}$  CD8<sup>+</sup> del tejido. Significativamente, el epítipo dirigido a las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicas de SIV con vector de RhCMV es distinto de las respuestas obtenidas por vectores víricos convencionales o por el propio SIV: los linfocitos T CD8<sup>+</sup> vectorizados con RhCMV se dirigen a una amplia selección de epítipos (probablemente presentados en forma cruzada) que excluyen los epítipos inmunodominantes típicos (por ejemplo, CM9 o TL8 en *Mamu* A\*01+MR) que son procesados internamente y presentados por células infectadas víricamente (véase la FIG. 20). Esta dirección diferencial de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de vectores de RhCMV de tipo silvestre (wt) está mediada por la actividad de los genes de RhCMV que inhiben la presentación de Ag restringida a MHC de clase I (homólogos US2-11), ya que los vectores de RhCMV con eliminación de US2-11 generan respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que incluyen respuestas destacadas a los epítipos SIV convencionales (véanse las FIG. 17, 19 y 20). En este ejemplo, los solicitantes definen la inmunobiología de la protección mediada por el vector de RhCMV/SIV, incluyendo los mecanismos, el momento y la ubicación de la protección, y el impacto de la dirección diferencial del epítipo T CD8<sup>+</sup> sobre la eficacia del control de SIV, preguntando, en particular, si la ampliación de las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> vectorizados con RhCMV/SIV para incluir epítipos dominantes típicos puede mejorar la calidad de la respuesta y potenciar la eficacia. Los objetivos de este Ejemplo son:

Se sugiere que los patrones diferenciales de dirección de epítipos y la amplitud de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del SIV generados por vectores de RhCMV/SIV con eliminación de US2-11 (nulo-regulación negativa de MHC I) frente al WT se correlacionan con su amplitud y eficacia; los vectores con eliminación de US2-11 dirigen las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> inducidas por vector para incluir epítipos típicos procesados internamente (véanse las FIG. 19 y 20). Por lo tanto, dichos vectores podrían tener una eficacia mejorada frente a la exposición a SIVmac239 intrarrectal de dosis limitante en comparación con los vectores WT. Por homología, se espera que los vectores de HCMV con eliminación de US2-11 que portan antígenos del VIH induzcan una respuesta de los linfocitos T más amplia a los epítipos del VIH que podría correlacionarse con una mejor protección.

Las infecciones por el VIH de los seres humanos y las infecciones por SIV de los macacos asiáticos comparten un patrón de replicación vírico y una constelación de características patológicas que, en ausencia de terapia antirretroviral eficaz, dan lugar a una infección ininterrumpida y una inmunodeficiencia progresiva, mortal en última instancia, en la gran mayoría de los individuos infectados (Levy, J. A. 1993. *Microbiol Rev* 57:183-289. Grovit-Ferbas, K. *et al.* 1999. "Human Immunodeficiency Virus"; en *Persistent Viral Infections*. R. Ahmed, y A. I. Chen, editors. Chichester: John Wiley & Sons. 3-45, Douek, D. C. *et al.* 2003. *Annu Rev Immunol* 21:265-304, Grossman, Z. *et al.* 2006. *Nat Med* 12:289-295, McChesney, M. *et al.* 1999. "Simian Immunodeficiency Virus". en *Persistent Viral Infections*. R. Ahmed y I. S. Chen, editors. Chichester: John Wiley & Sons. 321-345 and Cohen, O. J., y Fauci, A. S. 2001. "Pathogenesis and Medical Aspects of HIV-1 Infection". en *Fields Virology*. D. M. Knipe y P. M. Howley, editores. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins. 2043-2094). Una característica sorprendente de estas infecciones es su inducción de una inmunidad celular y humoral potente, que no se aclara o, en la mayoría de los sujetos, incluso controla eficazmente la replicación vírica. Las adaptaciones de VIH/SIV que proporcionan una evasión inmune eficaz incluyen 1) la replicación masiva, altas tasas de mutación, maleabilidad genética y plasticidad funcional que conducen a una rápida evolución; 2) mecanismos genéticos específicos para frustrar mecanismos inmunes innatos y adaptativos (por ejemplo, contrarrestar los mecanismos antivirales innatos de la teterina, APOBEC, Trim5 $\alpha$  y los linfocitos T citotóxicos mediante la regulación negativa del CMH de clase 1); 3) adaptaciones de env para evitar la neutralización del anticuerpo (Ab); 4) latencia y 5) función inmune desregulada (Evans, D. T., y Desrosiers, R. C. 2001. *Immunol Rev* 183:141-158, Johnson, W. E. y Desrosiers, R. C. 2002. *Annu Rev Med* 53:499-518, Goulder, P. J. y Watkins, D. I. 2008. *Nat Rev Immunol* 8:619-630, Malim, M. H. y Emerman, M. 2008. *Cell Host Microbe* 3:388-398 y Frost, S. D. *et al.* 2008. *Curr Opin HIV AIDS* 3:45-51). Estos mecanismos plantean un conjunto imponente de desafíos para desarrollar una vacuna eficaz contra el VIH/SIDA, pero afortunadamente, cada vez está más claro que el VIH/SIV tiene vulnerabilidades inmunológicas. Las respuestas de los linfocitos T CD8 $^{+}$  y, en menor grado, las respuestas de los Ab pueden modular la replicación vírica y, en ciertos casos, pueden manifestar suficiente actividad antiviral para controlar, aunque no eliminar, la infección (Goulder, P. J. y Watkins, D. I. 2008. *Nat Rev Immunol* 8:619-630, Frost, S. D. *et al.* 2008. *Curr Opin HIV AIDS* 3:45-51, Baker, B. M. *et al.* 2009. *Expert Opin Biol Ther* 9:55-69 y Goonetilleke, N. *et al.* 2009. *J Exp Med* 206:1253-1272). En las infecciones por VIH/SIV de sujetos no tratados previamente, la mayoría de las respuestas inmunes adaptativas solo se desarrollan después de que ya se haya producido una replicación vírica sistémica sustancial y, por lo tanto, para que estas respuestas manifiesten control virológico, deben ser de potencia superlativa y/o tener una dirección epitópica óptima para prevenir la evolución y el escape víricos. Sin embargo, cada vez hay más pruebas de que la cabeza del puente vírico inicial en los primeros días después de la exposición a la mucosa, formada por una o dos especies víricas (Keele, B. F. *et al.* 2008. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 105:7552-7557), es mucho más vulnerable. En esta etapa, la inmunidad actuaría sobre una población vírica mucho más pequeña, menos diversa y localizada, y si dichas respuestas pudieran suprimir la tasa reproductiva vírica ( $R_0$ ) a  $< 1$ , la infección no se establecería por completo (Haase, A. T. 2005. *Nat Rev Immunol* 5:783-792). De hecho, cada vez hay más pruebas que sugieren que la inmunidad tiene el potencial de prevenir y/o controlar estrictamente la infección por VIH/SIV, pero la ventana de oportunidad para esta protección de alto nivel es casi con toda seguridad temprana y corta.

La asociación del control de élite de VIH/SIV en seres humanos y primates no humanos (NHP) con respuestas de los linfocitos T CD8 $^{+}$  dirigidas a epitopos particulares restringidos por alelos específicos de MHC de clase I condujo a la hipótesis de que una vacuna capaz de generar una memoria de los linfocitos T CD8 $^{+}$  específicos del virus diana potente y con amplitud podría, tras la infección, llevar a cabo una presión inmunológica suficiente sobre las secuencias víricas vulnerables para suprimir la replicación vírica y/o forzar cambios genéticos dando lugar a una reducción de la aptitud vírica (Walker, B. D. y Burton, D. R. 2008. *Science* 320:760-764 y Watkins, D. I. *et al.* 2008. *Nat Med* 14:617-621). Si bien no se espera que prevenga la infección, se planteó la hipótesis de que dicha respuesta de los linfocitos T generada por la vacuna reduciría las cargas víricas medianas de la fase máximo y de la meseta en la población, y por lo tanto, como media, retardaría la patogénesis y reduciría la probabilidad de transmisión. En los últimos años, este concepto ha sido ampliamente evaluado en el modelo de MR/SIVmac de origen indio usando vectores cada vez más potentes y combinaciones de "sensibilización-refuerzo", y una variedad de vías de exposición y dosis. Las conclusiones generales de estos estudios son que, en comparación con los MR sin tratamiento previo, las mejores pautas de vacunación pueden reducir las cargas víricas de la fase máximo y meseta de virus SIVmac altamente patógenos y ampliar la supervivencia. Sin embargo, la protección es 1) desigual dentro de las cohortes de MR vacunadas de forma idéntica (y frecuentemente se correlaciona con los alelos protectores del MHC); 2) aparentemente limitada a una reducción logarítmica media de  $\sim 1,5$ -2 en las cargas víricas plasmáticas de la fase máximo y meseta con exposición a SIVmac; y 3) se invierte a lo largo del tiempo (18-29). Este patrón de protección es similar para la exposición mucosa intravenosa, alta (única) y baja (repetida), y parece derivar de una respuesta anamnésica masiva de los linfocitos T CD8 $^{+}$  después de la infección que "intercepta" la replicación vírica bastante tarde durante la diseminación sistémica, manifestándose primero la actividad antivírica mediante una reducción del máximo de replicación de SIV en el día 10 a 14. Como se ilustra en la FIG. 12, los linfocitos T de memoria CD8 $^{+}$  que resultan de las vacunas de sensibilización-refuerzo con vectores no replicantes son espectacularmente expansibles tras la infección, pero la proliferación, diferenciación y administración de células efectoras a los sitios de replicación vírica está bastante retrasada con respecto a la cinética vírica, una relación temporal que limita claramente tanto el alcance como la durabilidad de la protección. De hecho, la primera prueba de este concepto en seres humanos, el ensayo STEP de Merck en fase 2b (HVTN 502), fue un rotundo fracaso. A pesar de la detección de los linfocitos T CD8 $^{+}$  específicos del VIH en el 73 % de los vacunados, no hubo evidencia de protección en términos de adquisición de infección o replicación vírica tras la infección (Buchbinder, S. P. *et al.* 2008. *Lancet* 372:1881-1893, McElrath, M.

J. *et al.* 2008. *Lancet* 372:1894-1905). La pauta de STEP, en retrospectiva, puede haber sido insuficientemente potente (o incapaz de generar una respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del VIH suficientemente amplia) para lograr una protección significativa, pero los resultados ilustran claramente la dificultad para lograr una eficacia significativa con una vacuna diseñada para generar linfocitos T de memoria CD8<sup>+</sup> convencionales.

Si la memoria convencional de los linfocitos T generada por la vacuna (respuestas de memoria que, al encontrarse un patógeno inicial, requieren expansión, diferenciación y migración efectoras para mediar en la actividad antivírica) interviene demasiado tarde en la infección por VIH/SIV, la alternativa es una vacuna diseñada para generar y mantener linfocitos T de "memoria efectora" (T<sub>EM</sub>). Los T<sub>EM</sub> carecen de capacidad de expansión potente, pero se encuentran en sitios efectoros y se preparan para la función efectora inmediata (Bannard, O. *et al.* 2009. *Eur J Immunol* 39:2083-2087, Hansen, S. G. *et al.* 2009. *Nat Med* 15:293-299, Sallusto, F. *et al.* 2004. *Annu Rev Immunol* 22:745-763, Picker, L. J. *et al.* 2006. *J Clin Invest* 116:1514-1524, Pitcher, C. J. *et al.* 2002. *J Immunol* 168:29-43 y Genesca, M. *et al.* 2009. *J Intern Med* 265:67-77). De hecho, los T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> son las principales dianas del VIH/SIV (Grossman, Z. *et al.*, 2006. *Nat Med* 12: 289-295), y como los T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> conviven en los mismos sitios, una respuesta de los T<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> generada por la vacuna estaría teóricamente situada idealmente para interceptar la replicación vírica inicial/temprana en la infección primaria, proporcionando la actividad efectora antivírica durante la fase más vulnerable de la infección. El mantenimiento a largo plazo de las poblaciones de T<sub>EM</sub> se asocia con el Ag persistente y, a la inversa, un marcado sesgo de T<sub>EM</sub> caracteriza las respuestas de los linfocitos T a los agentes crónicos/persistentes, en particular, al CMV (Hansen, S. G. *et al.*, 2009. *Nat Med* 15: 293-299, 35, 38-40). Por lo tanto, los solicitantes iniciaron un programa de desarrollo de vectores de RhCMV para evaluar la capacidad de T<sub>EM</sub> para intervenir de forma temprana en la infección primaria por SIV. Como se ha descrito recientemente (Hansen, S. G. *et al.* 2009. *Nat Med* 15:293-299, Picker, L. J., Reed-Inderbitzin, E. F., Hagen, S. I., Edgar, J. B., Hansen, S. G., Legasse, A., Planer, S. *et al.* 2006. *J Clin Invest* 116:1514-1524, Gauduin, M. C. *et al.* 2006. *J Exp Med* 203:2661-2672, Kern, F. *et al.* 1999. *Eur J Immunol* 29:2908-2915, Champagne, P. *et al.* 2001. *Nature* 410:106-111), el RhCMV se puede modificar para expresar a un alto nivel las proteínas SIV, sin interrupción de otros genes de RhCMV, y con la conservación de las características de crecimiento de tipo silvestre (*in vitro* e *in vivo*). Estos vectores pueden volver a infectar a los MR RhCMV-seropositivos de una manera clínicamente silenciosa, y en el proceso de reinfección, generar respuestas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> indefinidamente persistentes, de alta frecuencia, contra los productos del gen de SIV. Estas respuestas de los linfocitos T específicos del SIV generadas por el vector de RhCMV manifiestan un fenotipo polifuncional altamente sesgado por los T<sub>EM</sub> y, de acuerdo con este fenotipo, estaban enriquecidas en sitios efectoros [(Hansen, S. G. *et al.*, 2009. *Nat Med* 15: 293-299); y véase la FIG. 16]. Los vectores de RhCMV/SIV no generan respuestas significativas de Ab específicos de SIV, ni tampoco parecen ni siquiera sensibilizar para dichas respuestas (Hansen, S. G. *et al.*, 2009. *Nat Med* 15: 293-299). En la primera evaluación de la eficacia de estos vectores, se expusieron MR inmunizados con RhCMV/gag/rev/nef/tat y /env con SIVmac239 intrarrectal de dosis limitante, repetida, 486-615 días después de la última vacunación. Este protocolo de exposición fue diseñado para infectar MR a través de la exposición de la mucosa con dosis víricas más similares a la transmisión sexual del VIH en los seres humanos (24). Los solicitantes encontraron que 4/12 vacunados (frente a 0/16 controles) resultaron infectarse con SIV, pero controlaron completamente la infección, en la medida en que el agotamiento de los linfocitos CD8<sup>+</sup> no pudo generar la recrudescencia vírica (Hansen, S. G. *et al.*, 2009, *Nat Med* 15: 293-299). Como se describe con detalle a continuación, estos resultados iniciales se han confirmado y ampliado en una segunda gran eficacia de los MR usando la misma exposición a SIVmac239 de dosis limitante, repetida. En general, ~50 % de los MR vacunados con RhCMV/SIV han sido altamente protegidos contra la infección progresiva por SIV tras la exposición intrarrectal con SIV altamente patógeno, CCR5-trópico.

A nivel mundial, en 2007, hubo ~2,5 millones de nuevas infecciones por el VIH, viviendo más de 33 millones de personas con el VIH y 2,1 millones de muertes por SIDA (Informe UNAIDS 2008). En el sur de África, las tasas de frecuencia en adultos pueden superar el 15 %. Una vacuna profiláctica eficaz tendría un impacto tremendo en la epidemia, y es probablemente la única manera de realizar la conquista. Como se ha mencionado anteriormente, el VIH es una diana de vacuna extremadamente difícil, y una vacuna eficaz contra el VIH/SIDA probablemente tiene que incluir múltiples componentes, cada uno diseñado para aprovechar diferentes vulnerabilidades inmunes víricas y actuar en diferentes etapas de la infección primaria (FIG. 13). Los vectores de CMV (y el concepto de vacuna de "T<sub>EM</sub>") ofrecen una nueva y potente adición a este "arsenal" de vacunas, y se convierte así en una alta prioridad para definir el/los mecanismo/s mediante el/los que los vectores protegen y optimizan su eficacia. Esta información es fundamental para la "traducción" de los vectores de CMV en la modalidad clínica, así como para el desarrollo de otras modalidades que utilizarían o mejorarían el/los mismo/s mecanismo/s de protección. También debe enfatizarse que la protección temprana mediada por las respuestas generadas por el vector de CMV ofrece tanto una nueva ventana para explorar como un nuevo medio para manipular experimentalmente las interacciones tempranas entre el sistema inmune y VIH/SIV. Por lo tanto, la comprensión de la biología de los T<sub>EM</sub> y los mecanismos mediante los que los T<sub>EM</sub> generados por el vector de CMV realizan la protección arroja luz sobre los acontecimientos tempranos cruciales que siguen a la infección por VIH/SIV por vía mucosa. Este ejemplo aborda estas prioridades al proporcionar un análisis detallado de 1) la distribución y las características funcionales de los linfocitos T específicos de SIV, generados por el vector de RhCMV, y la relación entre estas características y la eficacia; 2) dónde y cómo estas respuestas "interceptan" y suprimen el SIV administrado por vía mucosa en la infección primaria y controlan la replicación de SIV a largo plazo; y 3) la dirección diferencial de epítomos de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> mediada por la función del gen de US2-11 en vectores de CMV/SIV WT frente a mutantes, y el impacto de esta dirección diferencial sobre la eficacia.

Los solicitantes han logrado todos los objetivos anteriores, incluyendo la construcción, optimización y selección de los vectores de RhCMV que expresan SIVgag, rev/nef/tat, env y pol, la evaluación extensa de la biología e inmunogenicidad de los vectores, y lo que es más importante, la evaluación de la eficacia y la delimitación de las correlaciones inmunes. Se ha confirmado la hipótesis de que los vectores de RhCMV y las respuestas de T<sub>EM</sub> que generan pueden ser eficaces contra el SIV altamente patógeno y se ha descubierto un nuevo patrón de protección temprana. Los detalles de estos logros se describen en Hansen *et al.* (Hansen, S. G. *et al.* 2009. *Nat Med* 15: 293-299).

Los solicitantes siguieron los resultados prometedores de la primera evaluación de la eficacia de los solicitantes de los vectores de RhCMV/SIV (Hansen, S.G. *et al.*, 2009. *Nat Med* 15: 293-299) con un ensayo más amplio que incluyó 4 grupos: A) RhCMV/gag, RhCMV/env, RhCMV/rev/nef/tat, RhCMV/pol-1 y RhCMV pol-2 (semanas 0, 14); B) los mismos vectores de RhCMV/SIV (semana 0) seguidos de los vectores de Ad5/SIV pan-proteómico (semana 14); C) ADN pan-proteómico (semanas 0, 4, 8) seguido de vectores de Ad5 pan-proteómico (semana 14); y D) controles adicionales no vacunados. Estos MR se expusieron a la misma pauta de SIVmac239 intrarrectal, de dosis limitante, repetida que en el primer estudio de los solicitantes, con la exposición iniciada en la semana 58. Los resultados de este ensayo no tenían precedentes (FIG. 10). De los 24 MR que recibieron una pauta que contenía el vector de RhCMV/SIV (Grupos A y B), 13 (54 %) manifestaron una infección inicial de SIVmac239 con una variación irregular/estallido de viremia plasmática de tamaño variable, seguida del control inmediato hasta niveles indetectables. Ninguno de los 9 MR vacunados con ADN/Ad5 manifestó dicho control, y solo 1 de LOS 28 MR no vacunados manifestaron una infección inicialmente oculta (que volvió espontáneamente a una infección progresiva EN la semana 16). Los MR vacunados con RhCMV/SIV protegidos manifestaron un número variable de irregularidades víricas de bajo nivel en puntos de tiempo subsiguientes (FIG. 10), pero el control vírico global fue suficientemente temprano y riguroso para evitar cualquier agotamiento de células diana CD4<sup>+</sup> (FIG. 11), así como prevenir la inducción (Grupo A) o el refuerzo (Grupo B) de la respuesta de anticuerpos anti-SIVenv (FIG. 12). Es importante destacar que la protección en ambos grupos vacunados con el vector de RhCMV se correlacionó significativamente con la magnitud de la respuesta total máxima de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del SIV en sangre durante la fase de vacunación (FIG. 13), y no con las respuestas presentes inmediatamente antes de la exposición (y no las respuestas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicas del SIV, no mostradas). Estas respuestas máximas de CD8<sup>+</sup> en la sangre probablemente reflejan el grado en el que los T<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> se siembran en sitios efectores sistémicos durante la vacunación. Las respuestas de los linfocitos T específicos del SIV, vectorizados con RhCMV, fueron fundamentalmente diferentes de las respuestas obtenidas por ADN/Ad5. Estas últimas no proporcionaron la protección inmediata observada en los MR vacunados con el vector de RhCMV/SIV, pero sí demostraron reducciones medias significativas en las cargas víricas de la fase máxima y de meseta temprana, y se asociaron con fuerte refuerzo tras la infección (FIG. 14). Por el contrario, la protección asociada a los vectores de RhCMV/SIV solo fue binaria, proporcionando un control inmediato estricto o ningún control, y en consonancia con esto, estas respuestas no se reforzaron significativamente en los MR no protegidos (infectados progresivamente) (FIG. 14). Los MR que recibieron los vectores de RhCMV/SIV y Ad5/SIV proporcionaron tanto la protección inmediata de "T<sub>EM</sub>", un elemento de control del máximo y posterior al máximo ("T<sub>CM</sub>"), y un refuerzo de la respuesta posterior a la infección, similar, pero menor al grupo vacunado con ADN/Ad5 (FIG. 14). 12/13 de los MR protegidos con el vector de RhCMV mantuvieron una estricta protección durante más de 30 semanas, mientras que 7/9 de los MR vacunados con ADN/Ad5 fueron indistinguibles de los controles en 26 semanas después de la infección.

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que las respuestas de los linfocitos T específicos del SIV con vector de RhCMV interceptan la infección por SIV administrado por vía mucosa muy temprano en la infección primaria, antes de la replicación sistémica extensiva y pueden mantener un control estricto después de esta "intercepción" temprana. Por otro lado, si el virus "gana" la batalla inicial y se lleva a cabo una extensa replicación sistémica, las respuestas de T<sub>EM</sub> vectorizados con RhCMV/SIV no pueden "perseguir" y no proporcionan protección máxima ni posterior a la máxima. En el primer estudio de los solicitantes (Hansen, S. G. *et al.*, 2009. *Nat Med* 15: 293-299), los solicitantes no encontraron evidencias de infección persistente por SIV en los 4 MR protegidos, y los solicitantes especularon que la infección pudo haber sido abortada en la propia mucosa colónica. En el estudio de seguimiento, sin embargo, los solicitantes han documentado mayores estallidos víricos iniciales en plasma, y han encontrado en la mayoría de los MR protegidos una infección persistente de muy bajo nivel (manifestada por "irregularidades" víricas ocasionales). Además, aunque el SIV asociado a células es muy bajo o negativo en las PBMC de la mayoría de las muestras de MR protegidos (datos no mostrados), los solicitantes han documentado inequívocamente linfocitos T CD4<sup>+</sup> positivos en ADN y ARN de SIV en la sangre de MR protegidos (aquellos con los estallidos víricos iniciales más elevados, FIG. 15), estableciendo que la infección por SIV no está totalmente contenida en la mucosa rectal después de la estimulación rectal, y la protección debe ser, al menos en parte, sistémica. Estos datos sugieren con fuerza que hay una fase precoz fuera de la mucosa de amplificación y "difusión" vírica, que es un punto probable (adicional) de intercepción entre las respuestas de los T<sub>EM</sub> específicos del SIV y vectorizados con RhCMV y la infección por SIV en desarrollo. En concordancia con esto, los solicitantes han encontrado que los vectores de RhCMV/SIV mantienen indefinidamente frecuencias sorprendentemente altas de los linfocitos T específicos del SIV en sitios efectores diana ricos en células que son candidatos probables para la infección vírica inicial y la amplificación, incluyendo tanto la mucosa rectal como los sitios de posible propagación vírica hematogénica - bazo, hígado, médula ósea (FIG. 16). Las frecuencias más pequeñas, pero sustanciales, de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del SIV, vectorizados con CMV, se encuentran en los ganglios linfáticos mesentéricos (LN, FIG. 16), otro sitio de posible propagación vírica. Los solicitantes, por lo tanto, tienen la hipótesis de que esta matriz de respuestas

de los T<sub>EM</sub> (CD8<sup>+</sup>) específicos del SIV de alta frecuencia constituyen un "escudo" contra la amplificación vírica temprana, capaz de detener la infección antes de la infección sistémica progresiva.

En el transcurso de la evaluación de la inmunogenicidad del vector de RhCMV/SIV, los solicitantes evaluaron el grado en el que las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> generadas por estos vectores reconocían epítomos que habían sido previamente mostrados como representativos de dianas dominantes en MR infectados con SIV o vacunados con el vector de ADN/Adenovirus/varicela con el alelo restrictivo de MHC de clase I apropiado. Estos epítomos incluían gag-CM9, -LW9, -VL8, -QI9, -VT10, -LF8, -LA9, env-TL9 y tat-SL8 restringidos a *Mamu* A\*01 (12 MR); gag-GY9, env-RY8, y nef-YY9 restringidos a *Mamu* A\*02 (4 MR); nef-RL10 restringido a *Mamu* B\*08 (1 MR) y nef-IW9, -MW9 y env-FW9 restringidos a *Mamu* B\*17 (7 MR) (41-44). Sorprendentemente, ya sea analizadas por unión a tetrámero o tinción de citocina intracelular (ICS), todas estas respuestas de epítomos específicos fueron negativas en los MR vacunados con RhCMV/SIV, a pesar de que estos MR que manifiestan potentes respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, definidas a CFC, a mezclas totales de péptidos 15-meros consecutivos, solapantes, para la proteína SIV relevante (FIG. 17). La falta de identificación de estas respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> inmunodominantes típicas no fue ni técnica ni relacionada con las peculiaridades individuales de los monos, ya que la administración posterior de los vectores de Ad5/SIV (o infección progresiva de SIV) en muchos de estos MR se asoció con la aparición de estas respuestas típicas (FIG. 17, panel derecho). Estos datos indican que las respuestas vectorizadas con RhCMV/SIV difieren del ADN y vectores víricos convencionales (por ejemplo, Ad5) no solo en su fenotipo sesgado por T<sub>EM</sub>, función, distribución y longevidad, sino también en sus patrones de reconocimiento de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

El HCMV codifica 4 glicoproteínas relacionadas que actúan conjuntamente para evitar la presentación de epítomos restringidos por el MHC de clase I por células infectadas: US2 y US11 median en la translocación retrógrada de moléculas de MHC-I en el citosol para la degradación proteosómica; US3 conserva las moléculas de MHC-1 en el retículo endoplásmico (ER); y US6 inhibe la translocación de los péptidos víricos y los péptidos del hospedador a través de la membrana del ER por el transportador de péptidos TAT (Powers, C. *et al.* 2008. *Curr Top Microbiol Immunol* 325:333-359. Liu, Z. *et al.* 2009. *Int J Biochem Cell Biol* 41:503-506, van der Wal, F. J. *et al.* 2002. *Curr Top Microbiol Immunol* 269:37-55 y Hewitt, E. W. *et al.* 2001. *EMBO J* 20:387-396). El RhCMV codifica secuencias y homólogos funcionales de estas 4 proteínas en una región genómica que engloba de Rh182 (US2) a Rh189 (US11) (Powers, C. y Fruh, K. 2008. *Microbiol Immunol* 197:109-115 y Pande, N. T. *et al.* 2005. *J Virol* 79:5786-5798). Para evaluar el papel de estas proteínas en la inmunobiología del vector de RhCMV/SIV, los solicitantes construyeron vectores en los que la región US2-11 se eliminó específicamente (Powers, C.J. y Fruh, K. 2008. *PLoS Pathog* 4:e1000150). Los vectores de RhCMV con desactivación de US2-11 (KO) infectaron fácilmente a los MR sin tratamiento previo con RhCMV (y manifiestan una infección primaria virológica e inmunológicamente "normal"), pero no pudieron volver a infectar a los MR RhCMV seropositivos, a menos que los linfocitos CD8<sup>+</sup> estuvieran agotados durante al menos 2 semanas durante la vacunación (FIG. 18). Curiosamente, tanto en los MR sin tratamiento previo con RhCMV inicialmente como en las MR seropositivos con agotamiento de CD8, la infección por el vector KO fue indefinidamente persistente, incluso después de la aparición (sin tratamiento previo) o reaparición (agotamiento en CD8) de las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de RhCMV. Estos datos indican un punto de control mediado por linfocitos CD8<sup>+</sup> en la reinfección que es evitado por el RhCMV WT por medio de la función de estos genes inhibidores de la presentación de Ag de MHC de clase I. Aunque los solicitantes esperaban que la pérdida de la "protección" mediada por el producto genético US2-11 de los linfocitos T efectoras citolíticas tuviera una consecuencia virológica, fue sorprendente que esta consecuencia solo se manifestara en la reinfección, sugiriendo que la evasión inmune por este mecanismo pudo haber evolucionado para permitir una superinfección o, posiblemente, para prevenir que los linfocitos T de memoria CD8<sup>+</sup> preexistentes y de reacción cruzada (Sylwester, A. W. *et al.*, 2005. *J Exp Med* 202: 673-685) interfirieran con la infección primaria. Aún más sorprendente, sin embargo, fue el efecto de la eliminación de US2-11 en la inducción de la respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. En contraste con los vectores de RhCMV/SIV WT, las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del SIV que se desarrollaron durante la 1<sup>o</sup> infección con los vectores con KO de la región US2-11 se dirigieron de forma destacada a los epítomos del SIV inmunodominantes restringidos a *Mamu* A\*01 convencionales (FIG. 19). Las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de gag generadas por RhCMV/gag WT se dirigieron muy ampliamente, englobando todas las regiones de la proteína gag, pero manifestaron una falta de reactividad con los péptidos 15-meros que contenían epítomos inmunodominantes convencionales, creando distintos "huecos" en la amplitud de la respuesta en MR *Mamu* A\*01<sup>+</sup> (FIG. 20). En las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de gag generados por el vector de RhCMV/gag US2-11 KO, estos "huecos" se llenaron, y las respuestas fueron aún más ampliamente dirigidas. Estas observaciones tienen varias implicaciones importantes. En primer lugar, indican que la falta de reconocimiento de los epítomos inmunodominantes convencionales en los MR vacunados con vectores de RhCMV/SIV WT está relacionada con la prevención de la presentación de Ag restringida por el MHC de clase I por células infectadas, sugiriendo con fuerza que las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> generadas por vectores de RhCMV/SIV WT no se obtienen a través de presentación al Ag por las células infectadas, sino más bien mediante la presentación indirecta. En consonancia con esto, estos resultados son una reminiscencia de los hallazgos de los solicitantes con la proteína gag adyuvada con ligandos poli I:C o TLR 7/8, en los que los solicitantes también observaron el desarrollo de respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de gag que carecían de respuestas medibles al epítomo gag-CM9 restringido a *Mamu* A\*01 (observaciones no publicadas). Sin embargo, las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> generadas por el vector de RhCMV son mucho más potentes y más amplias que la proteína adyuvada, lo que sugiere un mayor grado de eficacia de presentación cruzada, tal vez debido a la captación/al procesamiento de

células dendríticas de células infectadas apoptóticas o cuerpos densos de CMV (Pepperl, S. *et al.*, 2000. *J Virol* 74: 6132-6146). Además, el mecanismo de presentación cruzada de vectores de RhCMV se caracteriza por su aparente exclusión completa de las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> a múltiples epítomos inmunodominantes convencionales, lo que sugiere una inhibición muy eficaz de la presentación directa y un mecanismo distinto de procesamiento de epítomos para la presentación indirecta. La segunda implicación de estos datos, que es más especulativa, pero potencialmente más significativa, es la sugerencia de que la citotoxicidad (destrucción directa de células infectadas con SIV) puede no desempeñar el papel principal en la protección proporcionada por las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> generadas por el vector de RhCMV/SI WT. No es que estas respuestas derivadas de la presentación cruzada carezcan de función citotóxica intrínseca [el aparato citotóxico de T<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> está presente (Hansen, S. G. *et al.*, 2009. *Nat Med* 15: 293-299)], sino más bien que los epítomos dirigidos por estas respuestas no pueden, como grupo, ser procesados y presentados eficientemente por células infectadas, y por lo tanto, podrían ser malas dianas para el reconocimiento directo de células infectadas con SIV que se requiere para que los linfocitos T citotóxicos medien en la destrucción eficaz [en particular, a la luz de la capacidad de nef a las moléculas de MHC1 reguladas negativamente (Evans, D. T. y Desrosiers, R. C. 2001. *Immunol Rev* 183: 141-158)]. Si esto es cierto, se deduce además que la potente protección mediada por las respuestas generadas por vectores de RhCMV/SIV podría deberse muy probablemente a una función efectora más indirecta (por linfocitos T estimulados por APC en las proximidades de las células infectadas), tal como, por ejemplo, la elaboración de quimiocinas de unión a CCR5 (Cocchi, F. *et al.* 1995. *Science* 270:1811-1815 y Arenzana-Seisdedos, F. y Parmentier, M. 2006. *Semin Immunol* 18:387-403). Las respuestas de los linfocitos T específicos de SIV generadas por los vectores de RhCMV/SIV US2-11 KO conservan claramente el reconocimiento amplio de epítomos que surge de la presentación cruzada, y mantienen las mismas capacidades fenotípicas y funcionales de las respuestas generadas por vectores WT (no mostradas), pero además, incluyen el reconocimiento de los epítomos que son procesados de manera eficaz por células infectadas con el SIV y, por lo tanto, incluirían epítomos, como la gag CM9 o tat SL8, que pueden mediar en la citotoxicidad directa (Loffredo, J. T. *et al.*, 2007. *J Virol*, 81: 2624-2634). De este modo, las respuestas generadas por los vectores de RhCMV/SIV US2-11 KO pueden tener una función antivírica potenciada, ya sea mediante citotoxicidad más eficaz o la supresión vírica directa, o simplemente una mayor amplitud de la respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, o ambas. Las respuestas CD8<sup>+</sup> generadas por los vectores con eliminación de US2-11 podrían proteger más eficazmente a los MR de la infección progresiva por el SIV, aumentando la fracción de los MR protegidos por encima del nivel actual, un objetivo importante de los esfuerzos de los solicitantes para optimizar los enfoques de vacunas de T<sub>EM</sub>.

La cuantificación rutinaria de la respuesta de los linfocitos T se realiza mediante citometría de flujo de citocinas (CFC, véase la FIG. 16) usando mezclas de péptidos 15-meros solapantes para SIVgag, env, pol y rev/nef/tat, y RhCMV IE, en comparación con los péptidos de control (mTB Ag85b y ESAT6) y la coestimulación sola (Hansen, S. G. *et al.*, 2009. *Nat Med* 15: 293-299). Durante la fase de vacunación de los MR del Grupo 1, 3 y 4, los solicitantes siguen rutinariamente las respuestas a estas mezclas de péptidos solapantes en PBMC y BAL usando el tubo de CFC n.º 1. En la necropsia, el tubo de CFC n.º 1 se usa en preparaciones de células nuevas de todas las muestras de tejido individuales para todas las proteínas SIV para establecer de forma comprensiva la distribución sistémica de las respuestas de los linfocitos T específicos del SIV. Los tubos de CFC n.º 2 y 3 proporcionan retroactivamente una caracterización funcional y una evaluación fenotípica (expresión de CD25, HLA-DR y PD-1) del grado en el que los linfocitos T específicos de Ag que se están midiendo estaban sujetos a la activación *in vivo*. Estos "tubos" adicionales se aplican de manera más limitada, centrándose en una preparación de células (crioconservada) de cada tejido y en las respuestas dominantes identificadas con el análisis del tubo n.º 1 nuevo. Las células esplénicas crioconservadas (que no son limitantes) se analizan con ELISPOT γ-IFN de un solo péptido para "deconvolucionar" las respuestas generales específicas de la proteína SIV en respuestas de péptidos 15-meros individuales, y luego se confirman estas respuestas de un solo péptido, se tipifica el linaje y se caracterizan funcionalmente con el tubo de CFC n.º 1 de las mismas preparaciones de células esplénicas crioconservadas. Las respuestas a los 5 epítomos de mayor frecuencia (CD8) se analizan mediante el tubo de CFC n.º 1 (y selectivamente los tubos n.º 2 y 3) en todos los tejidos para definir la distribución de estas respuestas de epítomos individuales. En cada tejido, se determinan el potencial proliferativo a las mezclas de péptidos de proteína enteras y a las 5 respuestas de péptidos individuales seleccionadas por MR en cultivos de dilución en CFSE de 6 días de PBMC y preparaciones de células de tejido seleccionadas (Onlamoon, N. *et al.*, 2007. *J Med Primatol* 36: 206-2), y los sobrenadantes de estos cultivos se muestrean después de 48 horas y se analizan los patrones de secreción de citocinas mediante análisis Luminex (IL-2, -4, -5, -13, -17, IFN-γ, GM-CSF, TNF, MCP-1, MIP-1α/β, RANTES) (Giavedoni, L. D. 2005. *J Immunol Methods* 301:89-101). Se realizan ensayos de eliminación vírica en linfocitos T CD4<sup>+</sup> autólogos infectados con SIVmac239 (Vojnov, L. *et al.*, 2009. *J Virol.*) en preparaciones de células seleccionadas para comparar la actividad antiviral de las respuestas en diferentes tejidos y que surgen de diferentes vías de vacunación. Como se ha demostrado anteriormente, las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> generadas por vectores de RhCMV/SIV WT no incluyen los epítomos inmunodominantes típicos definidos para SIV ni otros vectores víricos, excluyendo el uso de tetrámeros existentes para analizar las respuestas generadas por los vectores de RhCMV/SIV WT. Sin embargo, como parte de este ejemplo y de otros trabajos en curso, los solicitantes pueden identificar y determinar el alelo de MHC restrictivo sobre los epítomos generados por vectores de CMV/SIV dominantes, comunes, y tienen tetrámeros construidos para el más común de estos epítomos. A medida que se vuelven disponibles, estos tetrámeros (así como los tetrámeros existentes para los epítomos "típicos" en MR que probablemente tengan dichas respuestas-vacunados con ADN/Ad5 e/o infectados con SIV) se aplican a este ejemplo en los MR apropiados (por ejemplo, los tipos de MHC correctos), tanto para cuantificar directamente como para caracterizar fenotípicamente las respuestas definidas por los

tetrámeros en las PBMC y los tejidos mediante citometría de flujo, pero lo más importante, para la clasificación de poblaciones definidas específicas de epítomos mediante análisis de micromatrices. Las respuestas de los Ab a gag y env se cuantifican en lavados de plasma y rectales mediante ELISA (Lu, X. *et al.*, 1998. *AIDS* 12:1-10), con muestras que presentan títulos de env > 1:100 analizados para la neutralización de SIVmac239 y SIVmac251 adaptado al cultivo de tejidos (Montefiori, D. C. 2005. *Curr Protoc Immunol*, Capítulo 12: Unidad 12 11).

Los vectores de RhCMV/SIV de tipo silvestre (wt) generan respuestas de T<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> dirigidas con alta frecuencia y ampliamente a epítomos de SIV, pero no incluyen respuestas a los epítomos inmunodominantes típicos diana en la propia infección por SIV o después de la vacunación con ADN o vectores víricos convencionales. Los solicitantes han demostrado además que este "hueco" en la dirección de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> generados por el vector de RhCMV/SIV WT es un resultado directo de la acción de los genes de CMV en la región de US2-11 que previenen la presentación restringida al MHC de clase I por células infectadas, un mecanismo que podría servir a la biología del CMV mediante la dirección de las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> lejos de los epítomos más propensos a permitir el reconocimiento directo eficaz de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de células infectadas por CMV y, por lo tanto, la citólisis mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> eficaces. Desde una perspectiva de la vacuna contra el VIH/SIV, esta notable biología tiene varias implicaciones muy significativas, incluyendo la posibilidad de que la protección potente, pero incompleta, generada por los vectores de RhCMV/SIV WT, podría potenciarse ampliando la dirección de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> a epítomos que se procesen de manera más eficaz y sean presentados por células infectadas con SIV. La adición de las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que reconocen dichos epítomos podría mejorar la eficacia de la vacuna aumentando la eficacia del reconocimiento directo de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de células infectadas con SIV, permitiendo una citólisis más eficaz o unos mecanismos efectores no citolíticos (próximos) dirigidos correctamente (en comparación con epítomos presentados indirectamente por células no infectadas cercanas). Según los solicitantes, la capacidad para "desactivar" y "activar" un patrón de reconocimiento de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específico mediante la simple modificación de un vector de vacuna vírico no tiene precedentes, ciertamente en el modelo de vacuna contra el SIV, y ofrece una oportunidad única para definir el impacto del patrón de reconocimiento de CD8<sup>+</sup> sobre la capacidad de las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> generadas por vacunas para suprimir e incluso aclarar la infección primaria por SIV. Dicha información ampliaría claramente la comprensión de los solicitantes de los requisitos inmunológicos para la protección mediada por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el modelo de SIV, pero también tendría un impacto importante en la vía de traducción de vectores de CMV en una vacuna candidata contra el VIH/SIDA en seres humanos. El hallazgo de una eficacia potenciada de vectores con eliminación de US2-11 proporcionaría un fuerte impulso para aprovechar esta protección superior, ya sea dirigiendo el desarrollo de vectores de CMV hacia construcciones con esta eliminación y, por lo tanto, dirigidos a poblaciones sin tratamiento previo del CMV (poblaciones pediátricas, casi con seguridad con modificaciones adicionales de vectores para aumentar la seguridad) o mediante el desarrollo de construcciones que pudieran presentar epítomos "procesados internamente", pero que conservaran la capacidad de reinfectar a individuos CMV seropositivos (quizás mediante eliminaciones más limitadas – subregión o gen específico -- en la región US2-11).

### *Ejemplo 3: Evaluación sistemática de la eficacia de la vacuna contra citomegalovirus*

Aunque el citomegalovirus humano (HCMV) causa una infección persistente e inadvertida, principalmente benigna, en individuos inmunocompetentes, puede causar enfermedad en individuos inmunocomprometidos tales como los pacientes con trasplante o con SIDA. El HCMV también es la causa infecciosa más frecuente de los defectos congénitos, con una estimación del 0,7 % de los bebés que nacen con infección congénita, y generando aproximadamente el 10 % de estas infecciones secuelas a largo plazo (principalmente defectos sensoriales) (Dollard, S. C. *et al.*, 2007. *Rev Med Virol* 17: 355-63). Los costes anuales de salud para cuidar a estos niños se estiman en aproximadamente 1-2 mil millones de dólares (Cannon, M. J. y K. F. Davis. 2005. *BMC Public Health* 5:70). Por estas razones, el Instituto de Medicina y el Comité Consultivo Nacional de Vacunas han concedido una alta prioridad al desarrollo de una vacuna contra el CMV (Arvin, A. M. *et al.*, 2004. *Clin Infect Dis*. 39: 233-9). Sin embargo, el desarrollo de una vacuna ha sido frustrantemente lento a pesar de los esfuerzos realizados durante más de 30 años (Dekker, C. L. y A. M. Arvin. 2009. *N Engl J Med* 360: 1250-2.). Un importante, si no el principal, bloqueo para el desarrollo de la vacuna contra el CMV es el hecho de que la inmunidad de la infección natural o la vacunación ofrece solo protección muy limitada, si la hay, contra la reinfección por CMV (Adler, S. P. *et al.*, 1995. *J Infect Dis* 171: 26-32 y Boppana, S. B. *et al.* 2001. *N Engl J Med* 344: 1366-71). Esta característica única del CMV que evita que la "protección contra la infección" usada como lectura para la eficacia de la vacuna ha hecho muy difícil evaluar vacunas candidatas contra el CMV, con las medidas actuales basándose principalmente en criterios más subjetivos tales como la reducción de los síntomas de la enfermedad (Gonczol, E. y S. Plotkin. 2001. *Expert Opin Biol Ther* 1:401-12). El mecanismo por el cual el CMV logra esta capacidad única de reinfectar en presencia de inmunidad preexistente no se ha entendido hasta hace poco. Usando el modelo de macacos Rhesus (MR), el equipo de los solicitantes demostró que el CMV de Rhesus (RhCMV) puede reinfectar de forma repetida animales seropositivos incluso cuando se usa la misma cepa de CMV y está presente un alto nivel de anticuerpo y de inmunidad de los linfocitos T (Hansen, S. G. *et al.* 2009. *Nat Med* 15:293-9 y Price, D. A. *et al.*, 2008. *J Immunol* 180:269-). En experimentos preliminares, los solicitantes muestran además que dicha reinfección ocurre con tan poco como 100 unidades formadoras de placas (ufp) administradas por vía subcutánea (s.c). De forma notable, se evita la reinfección de animales seropositivos cuando los solicitantes usan un RhCMV recombinante (denominado ΔRh182-9) que ha perdido su capacidad para prevenir la presentación de antígenos por el complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) debido a la eliminación de homólogos de RhCMV de la familia US6 de

inmunovinasas de HCMV, US2-US11. El agotamiento de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> restablece la capacidad de ΔRh182-9 para volver a infectar los MR seropositivos, lo que demuestra que la inhibición de la presentación del antígeno es una de las razones subyacentes para la reinfección.

5 Es importante destacar que la capacidad de inmunidad inducida por la infección natural por CMV para proteger  
 10 contra el virus con eliminación de US2-11 ΔRh182-9 es, por tanto, una excelente medida para la calidad de la  
 15 respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> frente al CMV inducido de manera natural por infección previa o artificialmente por  
 20 vacunación. Esta medida supera con creces el resto de los medios actualmente disponibles para controlar la eficacia  
 de la vacuna contra el CMV, ya que, efectivamente, es "todo o nada": una vez que los sitios de persistencia han sido  
 alcanzados por ΔRh182-9 (incluso por unos cuantos virus), se produce la infección a largo plazo y niveles fácilmente  
 detectables de desprendimiento vírico. Por el contrario, otras medidas tales como la viremia y los signos clínicos de  
 infección son notoriamente variables, subjetivas y especialmente problemáticas cuando los efectos de la vacuna son  
 bastante sutiles. Por lo tanto, los solicitantes proponen usar protección contra ΔRh182-9 para reevaluar  
 sistemáticamente algunos de los supuestos básicos con respecto a los enfoques de vacunas que se han realizado a  
 lo largo de los años con respecto a las vacunas contra el CMV. Esto permite a los solicitantes desarrollar  
 recomendaciones empíricas de la mejor estrategia para desarrollar una vacuna contra el HCMV. Para acelerar el  
 desarrollo futuro de vacunas basadas en HCMV los solicitantes también generan y caracterizan HCMV  
 recombinantes *in vitro* que contienen las mismas perturbaciones genéticas atenuantes presentes en las vacunas  
 atenuadas de RhCMV.

25 Los hallazgos recientes de los solicitantes usando un virus de RhCMV con eliminación de los genes US2-11  
 (ΔRh182-9) muestran que esta familia de genes de evasión inmune es responsable de la capacidad del CMV para  
 volver a infectar al hospedador seropositivo sano. La observación subsiguiente de los solicitantes de que el  
 agotamiento de CD8<sup>+</sup> antes de la exposición supera el bloqueo a la infección por ΔRh182-9 en animales CMV  
 seropositivos muestra que las proteínas de la familia US6 actúan por su efecto sobre la respuesta de los linfocitos T  
 CD8<sup>+</sup> específicos de CMV. Por lo tanto, la infección por ΔRh182-9 puede servir como una lectura de todo o nada  
 para determinar si una respuesta inmune de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de CMV es funcionalmente  
 comparable a la inducida por la infección por CMV WT natural.

30 El CMV posee la notable capacidad de reinfectar y establecer una infección persistente independientemente de la  
 inmunidad hacia el CMV del hospedador (Boppana, S. B. *et al.* 1999. *Pediatrics* 104:55-60, Farroway, L. N. *et al.*  
 2005. *Epidemiol Infect* 133:701-10 y Hansen, S. G. *et al.* 2009. *Nat Med* 15:293-9) (FIG. 31). Después de la infección  
 35 inicial, el CMV se derrama durante años de las superficies epiteliales a los fluidos corporales (saliva, lágrimas, orina,  
 secreciones genitales y leche materna) y, en general, la transmisión implica la exposición de la mucosa a estos  
 fluidos, más comúnmente en la primera infancia o adolescencia (Boppana, S. B. *et al.* 1999. *Pediatrics* 104:55-60 y  
 Pass, R. F. 2001. "Cytomegalovirus", pág. 2675-2705. En P. M. H. David M. Knipe, Diane E. Griffin, Robert A. Lamb  
 Malcolm A. Martin, Bernard Roizman y Stephen E. Straus (ed.), *Fields Virology*, 4<sup>a</sup> ed. Lippincott Williams y Wilkins,  
 Filadelfia). En seres humanos, la incapacidad de la inmunidad natural hacia el HCMV para proteger contra la  
 40 reinfección se demostró inicialmente en un ensayo de vacuna humana temprano, en el que se observó reinfección  
 usando dosis bajas de una cepa de HCMV de replicación, Toledo-1, en HCMV sero-positivos sanos (Plotkin, S. A. *et al.*  
 1989. *J Infect Dis* 159:860-5 y Quinnan, G. V. *et al.* 1984. *Ann Intern Med* 101:478-83). Las pruebas de  
 reinfección y persistencia del virus se observaron mediante el aislamiento del virus de un individuo (grupo de 10 ufp),  
 y la inducción de una respuesta de anticuerpos anti-HCMV amnésica en un segundo individuo (grupo de 100 ufp)-  
 45 aunque ninguno de los individuos que recibieron dosis de 10 (n = 2) o 100 ufp (n = 5) mostraron síntomas asociados  
 al HCMV. Todos los individuos de un tercer grupo seropositivo que recibieron 1.000 ufp de Toledo-1 (n = 5)  
 mostraron evidencia de infección, compuesta de una respuesta de anticuerpos amnésicos y linfocitos T específicos  
 del HCMV. También se detectó virus en hisopos de garganta y orina de un individuo infectado sintomáticamente y en  
 la sangre de un segundo individuo asintomático. Toledo-1 se administró por vía parenteral (subcutánea), y es posible  
 50 que la protección contra la infección natural a través de las vías de la mucosa pueda verse afectada por la  
 inmunidad de HCMV (Adler, S. P. *et al.*, 1995. *J Infect Dis* 171: 26-32). Sin embargo, un estudio realizado en una  
 cohorte de 46 mujeres embarazadas HCMV seropositivas que usan anticuerpos específicos de la cepa de CMV  
 como indicador de la reinfección sugiere que la reinfección natural por HCMV del adulto sano seropositivo es un  
 hecho común (Boppana, S. B. *et al.*, 2001. *N Engl J Med* 344: 1366-71).

55 En contraste con el efecto limitado de inmunidad inducida por HCMV en la prevención de la reinfección, la inmunidad  
 materna hacia el HCMV reduce tanto la transmisión del HCMV al feto (Fowler, K. B. *et al.*, 2003. *JAMA* 289:1008-  
 11), como la aparición de enfermedad después de la infección en los recién nacidos infectados de forma congénita  
 (Fowler, K. B. *et al.*, 1992. *N Engl J Med* 326: 663-7 y Ross, S. A. *et al.* 2006. *J Pediatr* 148: 332-6). En un estudio  
 60 inicial de Fowler *et al.* (Fowler, K. B. *et al.*, 2003. *JAMA* 289: 1008-11), la seropositividad materna de HCMV  
 correspondía a una reducción del 70 % del riesgo de infección congénita por HCMV. Un metanálisis exhaustivo más  
 reciente, que analiza los resultados de estudios epidemiológicos publicados entre 1966 y 2006, mostró que la tasa  
 de transmisión congénita del HCMV era del 1,4 % en comparación con el 32 % en las madres HCMV seropositivas y  
 seronegativas, respectivamente (Keenan, R. J. *et al.* 1991. *Transplantation* 51:433-8). Todavía no se ha explorado a  
 fondo el impacto del serotipo materno de HCMV sobre el resultado de la enfermedad de una infección congénita. Sin  
 65 embargo, la evidencia existente sugiere que la sero-positividad materna de HCMV reduce la gravedad de la  
 enfermedad congénita (Fowler, K. B. *et al.*, 1992. *N Engl J Med* 326: 663-7 y Ross, S. A. *et al.* 2006. *J Pediatr* 148:

332-6). En un estudio, la incidencia de enfermedad sintomática fue del 25 %, en comparación con el 8 % en los recién nacidos infectados de forma congénita de madres infectadas de forma primaria y recurrente, respectivamente (Fowler, K. B. *et al.*, 1992). *N Engl J Med* 326: 663-7). En un segundo estudio, aunque la frecuencia de la pérdida auditiva fue comparable en los recién nacidos infectados de forma congénita tras una infección primaria o recurrente, la gravedad del déficit auditivo fue mayor en los recién nacidos infectados de forma congénita después de la infección primaria materna (Ross, S. A. *et al.* *J Pediatr* 148: 332-6). Las respuestas específicas del CMV tanto humorales y celulares parecen desempeñar un papel en la reducción de la transmisión (para una revisión, véase (Adler, S. P. *J Clin Virol* 41: 231-6)). Esta importancia de las respuestas de los linfocitos T específicos del CMV se demuestra más claramente por el aumento de la incidencia de la transmisión del CMV al feto en madres con deficiencia de los linfocitos T por SIDA (Adler, S. P. 2008. *J Clin Virol*, 41:231-6 y Doyle, M. *et al.* 1996. *Pediatr Infect Dis J* 15:1102-6). En conjunto, estos estudios sugieren que un objetivo realista de una vacuna contra el HCMV es reducir la incidencia y la gravedad de la enfermedad congénita por CMV.

La baja eficacia de cualquier metodología de vacunación ensayada hasta la fecha coincide con la incapacidad de la inmunidad natural contra el CMV para proteger contra la reinfección. Recientemente, se observó el mayor nivel de protección para cualquier ensayo de vacuna humana contra el HCMV usando un gB de envoltura del HCMV expresado de forma recombinante con una metodología basada en adyuvante MF59 en un ensayo clínico controlado con placebo (Pass, R. F. *et al.*, 2009, *N Engl J Med* 360: 1191-9). Sin embargo, la diferencia en la protección entre los vacunados y los controles salinos fue inferior al doble (7,7 % frente al 13,5 % en el grupo de control salino), no fue robusta, ya que la asignación incorrecta de un pequeño número de sujetos podría haber eliminado la significación estadística y, aunque se sugirió una tendencia hacia un efecto sobre la infección congénita (1 caso de infección congénita, en comparación con 3 casos del grupo de control salino; el estudio detuvo 2 infecciones congénitas adicionales en el grupo salino), esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Basándose en el nivel de protección otorgado en este estudio, se estimó que un estudio que adoptara la infección congénita sintomática como punto final requeriría la inscripción de más de 50.000 mujeres (Dekker, C. L. y A. M. Arvin. 2009. *N Engl J Med* 360: 1250-2). La falta de correlación inmune estadísticamente significativa con la protección del feto y las restricciones de seguridad necesariamente rigurosas de los ensayos de vacunas realizados en mujeres en edad reproductiva son preocupaciones adicionales que son esencialmente prohibitivas para cualquier análisis exhaustivo de las vacunas contra el HCMV diseñadas para interrumpir la transmisión del CMV de la madre al feto.

En resumen, aunque la inmunidad inducida por la infección por CMV WT natural no puede proteger contra la reinfección, proporciona un nivel significativo de protección contra la infección congénita y la gravedad de la enfermedad. Esta observación sugeriría que una vacuna que pueda inducir con seguridad un nivel de inmunidad comparable al inducido por la infección por la CMV WT puede tener un impacto significativo en la infección congénita. Las restricciones de seguridad necesariamente estrictas para el análisis de las vacunas candidatas contra el CMV en esta población diana (es decir, mujeres CMV seronegativas en edad fértil y mujeres embarazadas seronegativas) plantean problemas significativos para el desarrollo de vacunas y, probablemente, excluyen el uso de cualquier metodología, excepto de una metodología basada en la replicación defectuosa. Esta limitación de los ensayos con vacunas humanas deja sin respuesta la cuestión fundamental de qué nivel de atenuación de la vacuna se puede lograr mientras se sigue induciendo un nivel de inmunidad comparable al adquirido a través de la infección natural por CMV (es decir, una inmunidad que puede reducir la infección congénita). Actualmente, no existe un modelo de primate no humano para estudiar la transmisión materno-fetal del CMV, y los modelos genéticamente divergentes de roedores no se traducen completamente a la infección humana por HCMV. En este ejemplo, los solicitantes proponen que el uso de una estrategia de doble exposición combinando a) la lectura de todo o nada de la exposición a  $\Delta$ Rh182-9, con b) la variable continua de viremia tras la exposición s.c. al RhCMV WT, son capaces de determinar los requisitos mínimos para la inducción de una inmunidad específica del CMV que recapitule funcionalmente la inmunidad inducida por la infección por CMV WT. La comparación bioquímica de estos RhCMV atenuados en paralelo con sus homólogos de HCMV que contienen la lesión genética idéntica garantiza que cualquier RhCMV atenuado que muestre protección puede traducirse en la "cepa de elección" de HCMV con la confianza de que la eliminación genética dé lugar a una vacuna contra el HCMV con un fenotipo bioquímico comparable.

Existen amplias evidencias de que la reinfección se produce en el HCMV (Boppana, S. B. *et al.* 2001. *N Engl J Med* 344:1366-71 y Ross, S. A. *et al.* 2006. *J Pediatr* 148:332-6). En el modelo de MR, los solicitantes mostraron previamente que los MR positivos para CMV podían reinfectarse de forma repetida con  $10^7$  unidades de formación de placa (ufp) de RhCMV recombinante (Hansen, S. G. *et al.*, 2009. *Nat Med* 15: 293-9). Cada reinfección se detectó como un refuerzo en la respuesta de los linfocitos T anti-CMV y por el desarrollo de una respuesta *de novo* a un nuevo marcador de antígeno de SIV presente solo en el virus de la reinfección. Para determinar si la reinfección también se produce a dosis más bajas de RhCMV, los solicitantes infectaron MR sero-positivos con títulos decrecientes de RhCMV que expresaba SIV Gag (RhCMV-Gag). Se siguió la reinfección inmunológicamente midiendo las respuestas de los linfocitos T específicos de SIV Gag (Hansen, S. G. *et al.*, 2009. *Nat Med* 15: 293-9). Cuando se inocularon animales seropositivos s.c. con  $10^4$  o  $10^2$  ufp de RhCMV-Gag, se observó una respuesta significativa de los linfocitos T específicos de Gag a los 14 días de la infección (p.i.) (FIG. 31). Esta respuesta específica de Gag permaneció detectable mientras duró el experimento. Basándose en la experiencia de los solicitantes en estudios comparables, las respuestas de Gag son detectables durante la vida del animal (> 7 años p.i.), lo que indica una infección persistente a largo plazo.

Para determinar si el virus que expresa Gag fue desprendido por animales infectados, los solicitantes tomaron muestras de saliva y de orina semanalmente. Tras cocultivar sedimentos de virus con fibroblastos de MR (RF), los solicitantes controlaron la expresión de Gag en inmunotransferencias. En los animales que recibieron  $10^7$  ufp de RhCMV-Gag, los solicitantes detectaron el virus Gag-positivo en la orina de algunos animales en el plazo de 7-14 días p.i., y en todos los animales a los 42 días p.i. De forma similar, los hisopos bucales de todos los animales fueron positivos a los 70 días p.i. Los animales inoculados con dosis más bajas resultaron tener una tendencia hacia un tiempo más largo p.i. antes de la detección de RhCMV-Gag en la saliva y la orina, pero todos los animales fueron finalmente positivos. En consonancia con los estudios publicados anteriormente para el HCMV (Plotkin, S. A. *et al.* 1989. *J Infect Dis* 159:860-5 y Quinnan, G. V. *et al.* 1984. *Ann Intern Med* 101:478-83), estos datos muestran que la infección previa por RhCMV no protege contra la reinfección, ni siquiera a dosis de CMV tan bajas como de 100 UFP. Estos resultados también indican que la respuesta inmune *de novo* frente a un antígeno foráneo es un indicador más sensible y reproducible de la reinfección por CMV que la detección de virus en las secreciones.

La facilidad con la que el RhCMV supera una inmensa respuesta inmune anti-CMV preexistente, sustancial, durante la reinfección sugiere que el CMV ha desarrollado mecanismos para evadir la vigilancia inmune del hospedador. Se sabe que la respuesta inmune celular adaptativa es particularmente importante para controlar el CMV. En los seres humanos, los linfocitos T específicos del CMV comprenden aproximadamente una media de un 10 % de los compartimentos de memoria  $CD4^+$  y  $CD8^+$  (Sylwester, A. W. *et al.*, 2005. *J Exp Med* 202: 673-85) lo que sugiere que se destina una enorme cantidad de recursos a controlar este virus. Los solicitantes plantearon la hipótesis de que un aspecto clave de la reinfección podría ser la capacidad del CMV para escapar de la detección de los linfocitos T. Se sabe que todos los CMV codifican múltiples proteínas que previenen la presentación del antígeno por MHC-I, limitando así la capacidad de los linfocitos T  $CD8^+$  para reconocer y eliminar las células infectadas por CMV (Loenen, W. A. *et al.*, 2001. *Semin Immunol* 13: 41-9). Los solicitantes demostraron previamente que la región genómica de RhCMV Rh182-Rh189 codifica homólogos funcionales de las inmunovasinas US2, US3, US6 y US11 de HCMV (Pande, N. T. *et al.*, 2005. *J Virol* 79: 5786-98). Para determinar si estos inhibidores víricos de la presentación del antígeno eran requeridos para la reinfección, los solicitantes sustituyeron la región Rh182-189 con un casete de expresión para el antígeno de SIV Gag, que permitió a los solicitantes controlar las respuestas inmunes específicas de Gag en animales infectados (virus designado  $\Delta$ Rh182-9Gag). La eliminación de la región Rh182-9 se confirmó mediante PCR y transferencia de Southern. Los solicitantes controlaron además el crecimiento *in vitro* en RF primarios y no observaron ninguna diferencia con RhCMV derivado de BAC WT (datos no mostrados). Inicialmente, los solicitantes determinaron si  $\Delta$ Rh182-9Gag podría establecer una infección persistente en animales negativos para CMV. Los solicitantes infectaron dos animales seronegativos con  $5 \times 10^6$  ufp de  $\Delta$ Rh182-9Gag y dos animales de control con el RhCMV-Gag (Hansen, S. G. *et al.*, 2009. *Nat Med* 15: 293-9). La infección se controló inmunológicamente mediante el desarrollo de una respuesta inmune específica de CMV y específica de SIV Gag, y virológicamente por desprendimiento vírico de virus marcados con Gag en la orina y la saliva. Como se muestra en la FIG. 32, una respuesta de los linfocitos T específicos de Gag a  $\Delta$ Rh182-9Gag fue detectable con cinética y magnitud similares a las respuestas contra RhCMV-Gag. Además, se detectó  $\Delta$ Rh182-9Gag (confirmado por inmunotransferencia) en las secreciones de los animales infectados incluso > 1 año p.i. (datos no mostrados). Por lo tanto, los solicitantes concluyen que  $\Delta$ Rh182-9Gag es competente para establecer la infección persistente en animales sin tratamiento previo de CMV.

Para determinar si  $\Delta$ Rh182-9Gag podría volver a infectar animales seropositivos, los solicitantes inocularon MR CMV<sup>+</sup> s.c. con  $10^7$  ufp. En concordancia con las observaciones previas de los solicitantes, RhCMV-Gag de control WT re infectó cuatro animales como lo evidencia la detección de las respuestas de los linfocitos T específicos de SIV Gag en lavado broncoalveolar (BAL) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (FIG. 33A). Por el contrario, ninguno de los cuatro animales infectados con  $\Delta$ Rh182-9Gag mostró signos detectables de reinfección según el ensayo de los linfocitos T (FIG. 33B) o mediante el control de las secreciones de virus (datos no mostrados). Esta falta de reinfección no se debió a que estos animales fueran refractarios a la reinfección, ya que los mismos animales se pudieron re infectar con  $\Delta$ Rh178Gag, un virus que carece de un gen de evasión de MHC-I específico de RhCMV que no tiene homólogo de HCMV (Powers, C. J. y K. Fruh. 2008. *PLoS Pathog* 4:e1000150) (FIG. 33C). Conjuntamente, estos experimentos sugieren que la inhibición de la presentación del antígeno por la familia US6 (genes US2-11) de inmunomoduladores es esencial para la reinfección por RhCMV del hospedador seropositivo.

Dado que  $\Delta$ Rh182-9Gag fue capaz de infectar a los animales sin tratamiento previo del CMV, pero no a los animales CMV-positivos, los solicitantes plantean la hipótesis de que la respuesta inmune específica del CMV y, en particular, la respuesta de los linfocitos T  $CD8^+$ , evitó la reinfección por el virus  $\Delta$ Rh182-9Gag "inmunológicamente indefenso". Para probar esta hipótesis, los solicitantes ensayaron linfocitos T con agotamiento inmune de  $CD8^+$  de MR seropositivos antes de la reinfección con  $\Delta$ Rh182-9Gag. Las inyecciones en serie del anticuerpo cM-T807 (Schmitz, J. E. *et al.*, 1999. *Science* 283:857-60) redujeron temporalmente los linfocitos T  $CD8^+$  durante aproximadamente 2-3 semanas (FIG. 34A). Los cuatro animales CMV-positivos, inmuno-agotados fueron re infectados por  $\Delta$ Rh182-9Gag como se muestra por las respuestas de linfocitos T  $CD4^+$  específicos de SIV Gag que se observaron a los 7 días p.i. (FIG. 34B). Curiosamente, los animales incluso generaron respuestas de los linfocitos T  $CD8^+$  específicas de Gag cuando los niveles de  $CD8^+$  rebotaron. Por otra parte, los linfocitos T tanto  $CD4^+$  como  $CD8^+$  fueron detectables para el resto del experimento, lo que sugiere el establecimiento de una infección persistente. En la actualidad, los solicitantes están examinando secreciones mediante cocultivo para determinar la presencia de  $\Delta$ Rh182-9Gag. Los

solicitantes concluyen que las inmunovasinas codificadas por CMV permiten la reinfección del hospedador seropositivo debido a su capacidad para evadir la respuesta T CD8<sup>+</sup> específica del CMV del hospedador. Sin embargo, la inmunidad inducida por la infección natural por CMV es capaz de proteger contra la reinfección por CMV en ausencia de estas inmunovasas codificadas víricamente.

5 Por primera vez, los datos de los solicitantes establecen una relación causal clara entre la modulación inmunológica vírica (por inmunovasinas) y la capacidad única del CMV para volver a infectar al hospedador seropositivo. Dada la estrecha relación evolutiva entre los seres humanos y los MR, así como la conservación funcional de US2, 3, 6 y 11 entre el HCMV y el RhCMV, los solicitantes consideran altamente probable que la capacidad del HCMV para re infectar a los seres humanos también está mediada por inhibidores de la presentación del antígeno. Estas observaciones también tienen otra implicación que es altamente relevante para el objetivo del desarrollo de vacunas. En concreto, esta es la primera vez que se ha demostrado que la inmunidad específica del CMV en una especie de primate previene completamente la reinfección por CMV, incluso a dosis muy altas de virus de exposición. Los solicitantes concluyen, por lo tanto, que la protección contra  $\Delta$ Rh182-9 es una medida de todo o nada para la calidad de la respuesta inmune específica del CMV preexistente.

15 Por lo tanto, la exposición con  $\Delta$ Rh182-9Gag se puede usar para determinar si cualquier tipo de esfuerzo de vacunación ha generado con éxito una respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que es tan protectora como la inducida por la infección natural. Los solicitantes anticipan que este ensayo es muy superior a cualquier otra medida de la eficacia de la vacuna contra el CMV, ya que esta lectura de todo o nada permite determinar la eficacia de la vacuna candidata usando grupos relativamente pequeños de animales. Usando la exposición a  $\Delta$ Rh182-9Gag, los solicitantes vuelven a examinar si las vacunas de "sensibilización-refuerzo" no replicantes, parcialmente replicantes o no replicantes heterólogas son capaces de inducir una respuesta protectora.

20 Dada la clara demostración de que la reinfección por HCMV del hospedador completamente inmune puede ocurrir eficazmente incluso a dosis bajas de virus, parece que la prevención completa de la infección en vacunados probablemente no sea un objetivo alcanzable de manera realista. Sin embargo, los datos epidemiológicos sustanciales muestran que la inmunidad hacia el CMV proporcionada por la infección natural por CMV reduce significativamente la transmisión de madre al feto del CMV. Por lo tanto, un objetivo razonable y alcanzable para una vacuna contra el CMV es desarrollar una vacuna que imite la inmunidad inducida por la infección primaria y, por lo tanto, reduzca la transmisión del CMV de la madre al feto (Adler, S. P. *et al.*, 1995. *J Infect Dis* 171: 26-32). Dicha vacuna tiene que ser extremadamente segura, ya que la población diana incluye mujeres embarazadas. El descubrimiento de un equilibrio óptimo entre la seguridad y la eficacia ha sido un obstáculo importante en el desarrollo de la vacuna contra el CMV. Esto se debe, en gran parte, a que la capacidad única del CMV para re infectar a los individuos inmunes al CMV dificulta, si no imposibilita, el uso de protección contra la infección como lectura final (al menos en modelos de primates estrechamente relacionados). Por esta razón, una de las principales preguntas no resueltas es a qué nivel de atenuación una vacuna todavía induce un nivel de inmunidad comparable a la infección natural por CMV y, de este modo, lograr el nivel máximo de eficacia "protectora" que se puede alcanzar de una manera realista. El objetivo de los solicitantes es abordar esta cuestión fundamental y determinar el nivel de atenuación del CMV al que todavía se genera una respuesta inmune equivalente a la inmunidad natural. Los solicitantes abordan esta cuestión en el modelo de infección de RhCMV/MR-un modelo que imita de cerca la infección por HCMV en seres humanos, pero que permite un "perfeccionamiento" empírico del nivel de atenuación de CMV. En el primer enfoque, los solicitantes abordan la cuestión de si las vacunas basadas en CMV deficientes en la replicación, ya sean de un solo ciclo o de ciclo bajo, son suficientes para inducir una respuesta inmune específica de CMV y, tras la inducción de una respuesta inmune, cuáles son las características de la inmunidad, con respecto a la duración, la magnitud y el fenotipo de los linfocitos T. En un enfoque separado, los solicitantes introducen un activador/desactivador en el genoma de RhCMV que permite a los solicitantes inhibir o reiniciar la replicación vírica en cualquier momento después de la infección, dirigiéndose así a las funciones de diseminación inicial del virus a sitios de infección latente/persistente del hospedador, así como de replicación aguda frente a persistente en la inducción de una respuesta inmune específica del CMV. Para superar el problema de medir la eficacia de la respuesta inmune inducida por las diversas estrategias de atenuación, los solicitantes proponen usar la capacidad de una vacuna para proteger contra el virus recombinante  $\Delta$ Rh182-9Gag con eliminación de US2-11. Además de las vacunas atenuadas, los solicitantes también evalúan la capacidad de las vacunas "de sensibilización-refuerzo" (IE-1, pp65b, gB) para prevenir la reinfección de  $\Delta$ Rh182-9Gag usando una estrategia de sensibilización de ADN/refuerzo de adenovirus. Los animales vacunados que estaban protegidos contra  $\Delta$ Rh1829Gag se desafiaron además con WT-RhCMV seguido del control de la viremia. Los solicitantes anticipan que esta estrategia de doble exposición muestra que la protección contra la reinfección con  $\Delta$ Rh182-9Gag se correlaciona con la capacidad de una vacuna para reducir la viremia de RhCMV WT, una lectura mucho más difícil de controlar y variable actualmente usada para evaluar la eficacia de la vacuna. La protección contra  $\Delta$ Rh182-9Gag indica, por tanto, que una vacuna dada fue capaz de generar una respuesta inmune específica de CMV, en particular, una respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, similar a la inducida durante la infección natural. Una de las grandes ventajas del modelo de RhCMV es la estrecha relación evolutiva entre los CMV de ser humano y de Rhesus, y sus respectivos hospedadores. Por lo tanto, los solicitantes generan y caracterizan en paralelo construcciones derivadas del HCMV que contienen eliminaciones genéticas idénticas, asegurando de esta manera que cualquiera de las vacunas atenuadas que se muestran prometedoras en el sistema de RhCMV es funcionalmente comparable a su homólogo de HCMV. Los solicitantes anticipan que los resultados obtenidos en este proyecto son directamente transferibles al desarrollo de una vacuna

candidata basada en el HCMV.

*Ejemplo 4: Se puede usar un virus con eliminación de US2-11 como dispositivo de ensayo de la eficacia de la vacuna contra el CMV*

5 Los solicitantes han infectado macacos Rhesus con RhCMV carente del gen Rh110 que codifica el transactivador vírico pp71. RhCMV $\Delta$ Rh110 tiene deficiencia en el crecimiento *in vitro*, pero no se secreta de monos infectados. Los solicitantes han probado si los monos infectados con RhCMV $\Delta$ Rh110 están protegidos contra la exposición con RhCMV $\Delta$ US2-11 que expresa el antígeno de SIV Gag. La protección se demostró por la ausencia de un refuerzo en las respuestas de los linfocitos T específicos de RhCMV. Por el contrario, los monos infectados con el virus de tipo silvestre muestran un refuerzo de la respuesta de los linfocitos T específicos de CMV (véase la FIG. 23). Este resultado indica que el CMV deficiente en la propagación es capaz de inducir una respuesta de los linfocitos T que protege contra la exposición con el virus con eliminación de US2-11. Este resultado también indica que se puede usar un virus con eliminación de US2-11 para controlar la eficacia de la respuesta de los linfocitos T.

15 En un experimento similar, los solicitantes crearon un RhCMV que carecía de las proteínas de tegumento pp65a y pp65b codificadas por los genes Rh111 y Rh112, respectivamente (véase la FIG. 24). Estas proteínas no son necesarias para el crecimiento vírico *in vitro*. Sin embargo, pp65 es una proteína inmunodominante que se incluye en formulaciones actuales de vacunas de subunidades para CMV desarrolladas por diversos investigadores. Para examinar si los linfocitos T específicos de pp65 son necesarios para la protección contra la exposición a  $\Delta$ US2-11, los solicitantes infectaron macacos Rhesus con RhCMV $\Delta$ Rh111-112. Como era de esperar, los solicitantes observaron una respuesta inmune contra las proteínas IE de CMV, pero no contra pp65. Por el contrario, se detectó fácilmente una respuesta de los linfocitos T específicos de pp65 en los animales infectados con RhCMV (línea azul). Los solicitantes también observaron que RhCMV $\Delta$ Rh111-112 se secreta de animales infectados.

25 Así pues, habiendo descrito con detalle las realizaciones preferidas de la presente invención, se ha de entender que la invención definida por los párrafos anteriores no se limita a los detalles concretos expuestos en la descripción anterior, ya que son posibles muchas variaciones evidentes de la misma sin apartarse del alcance de las reivindicaciones.

30

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de determinación de la eficacia de una vacuna contra el CMV, que comprende (a) administrar una vacuna contra el CMV a un sujeto de ensayo; (b) exponer el sujeto de ensayo a un vector de CMV, en el que las glicoproteínas de dentro de la región de US2 a US11 del CMV están eliminadas del vector de CMV, y en el que el vector de CMV contiene y expresa al menos un inmunógeno de la vacuna contra el CMV; y (c) medir una respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, en el que la vacuna contra el CMV es eficaz si una respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> es protectora contra la exposición al vector de CMV carente de las glicoproteínas de dentro de la región de US2 a US11 del CMV y en el que el vector de CMV contiene y expresa al menos un inmunógeno de la vacuna contra el CMV.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la vacuna contra el CMV carece del transactivador pp71.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la vacuna contra el CMV carece de la proteína de tegumento pp65.

A

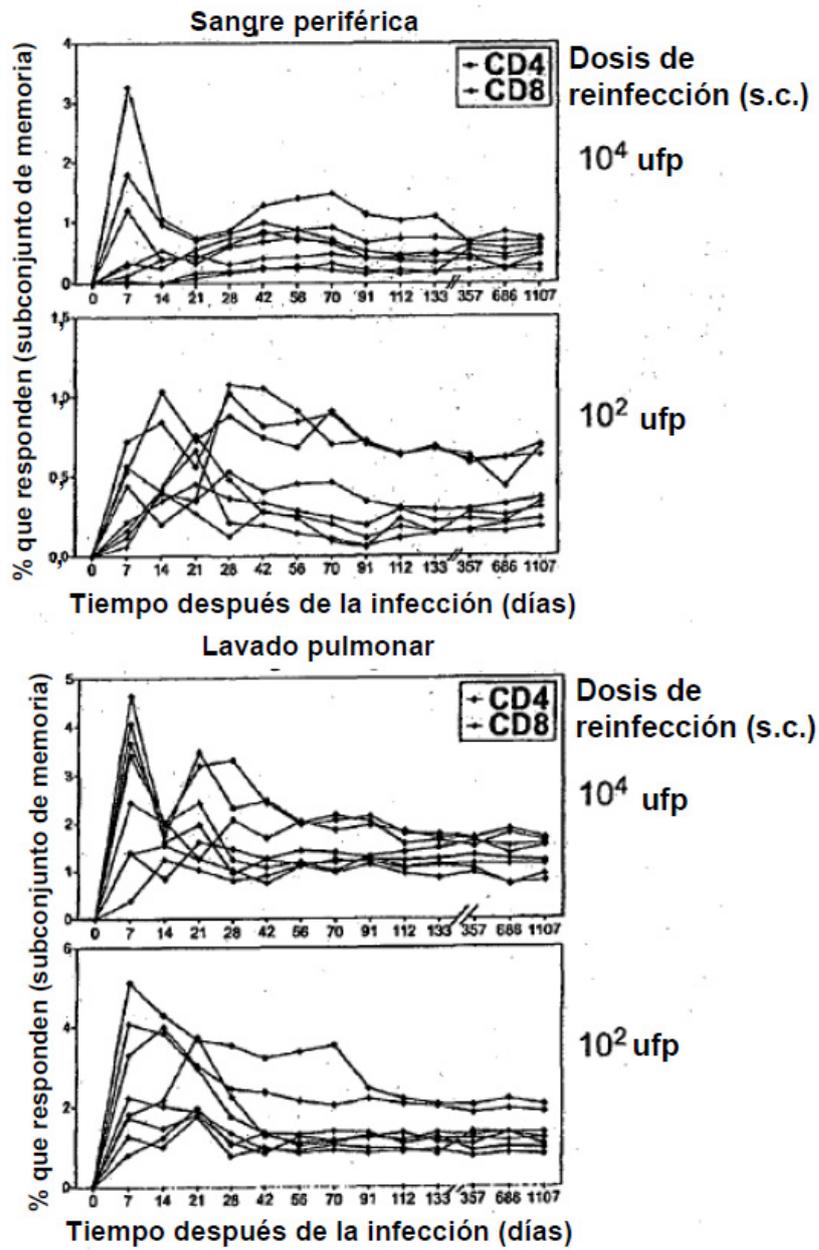


FIG. 1A

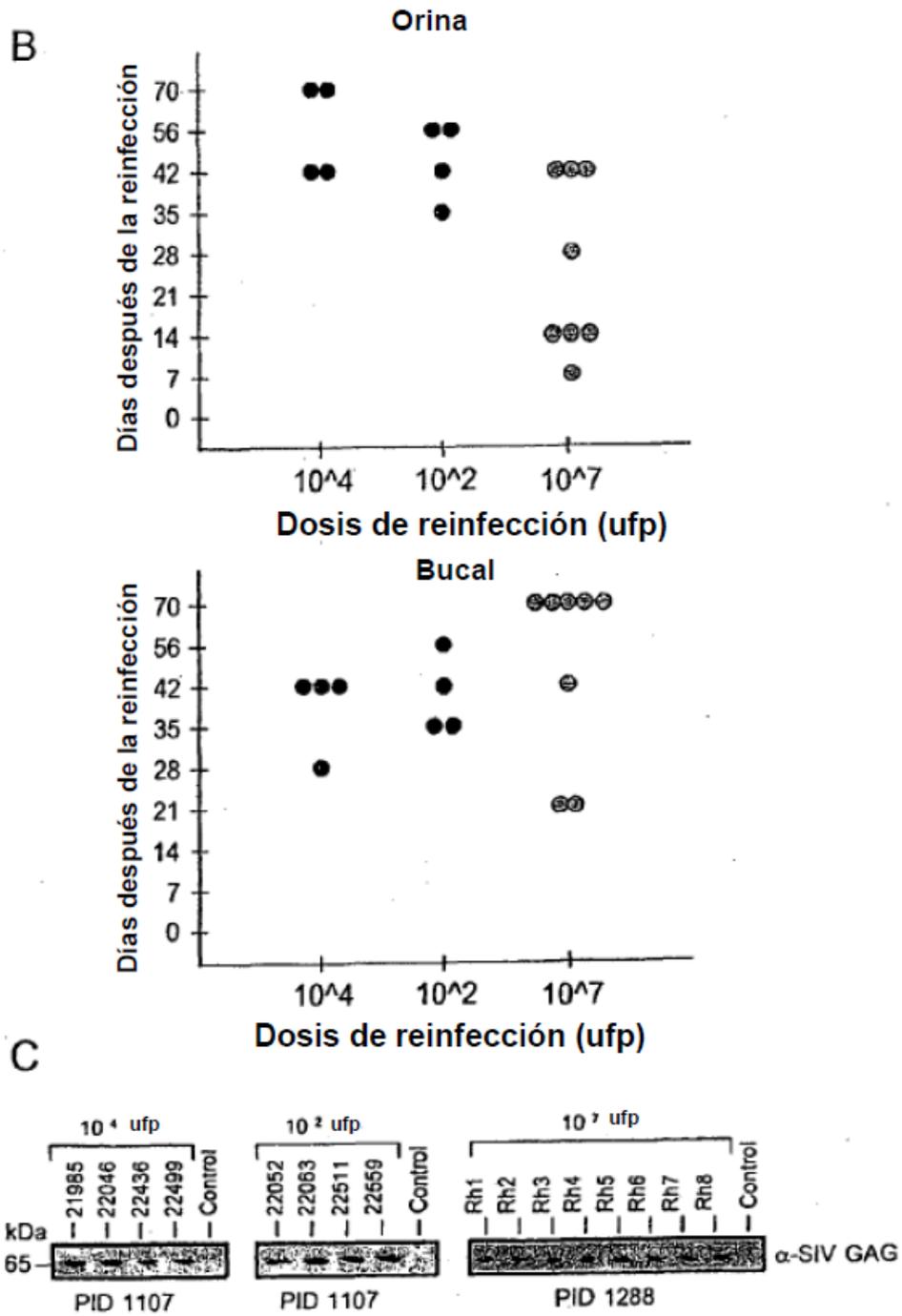


FIG. 1B-1C

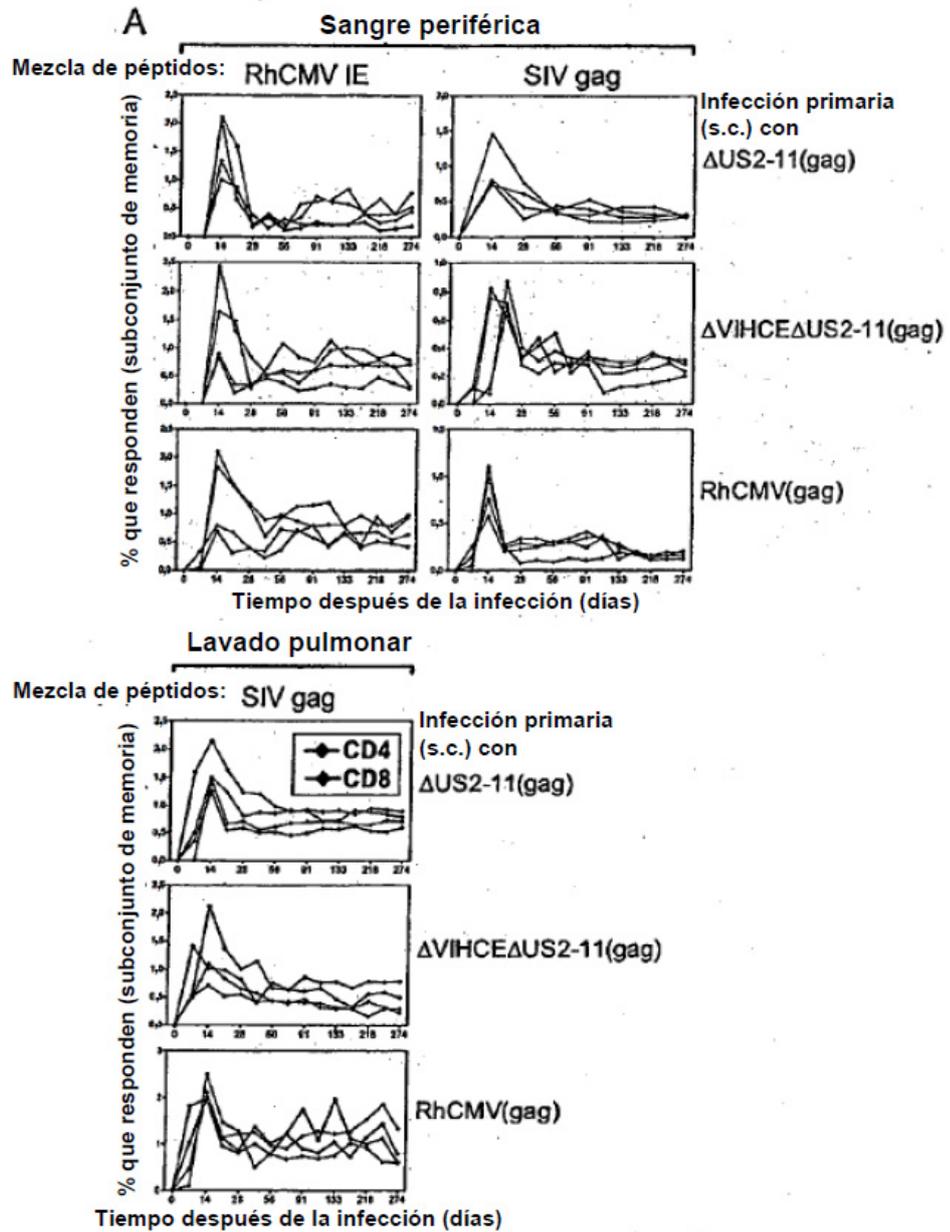


FIG. 2A

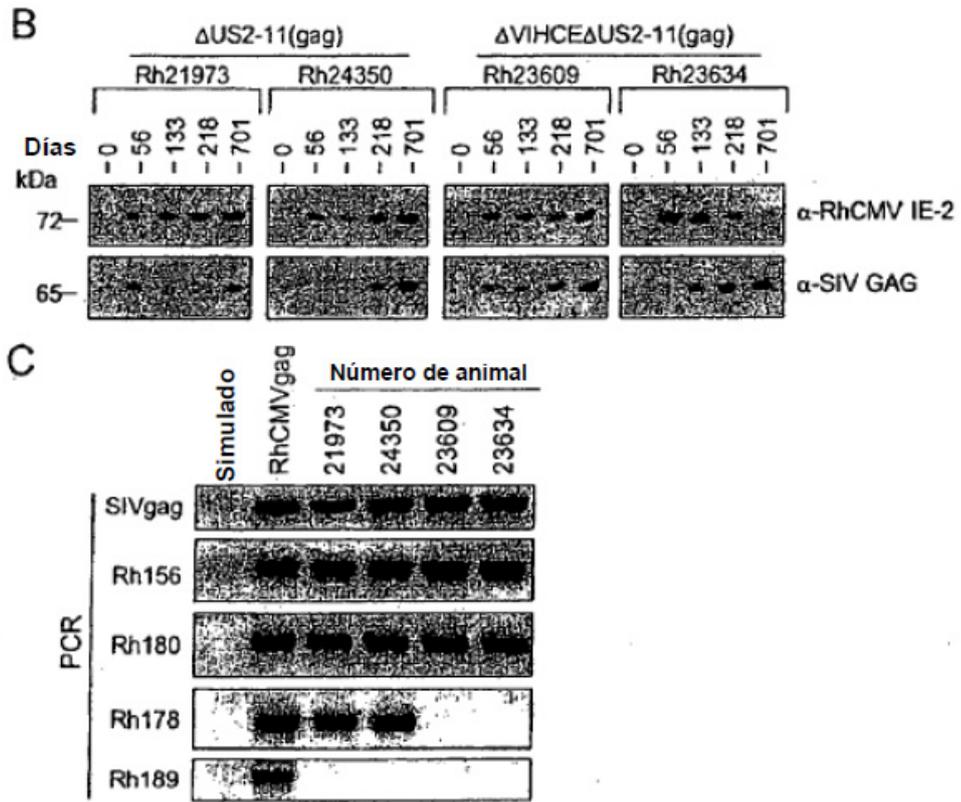


FIG. 2B-2C

A

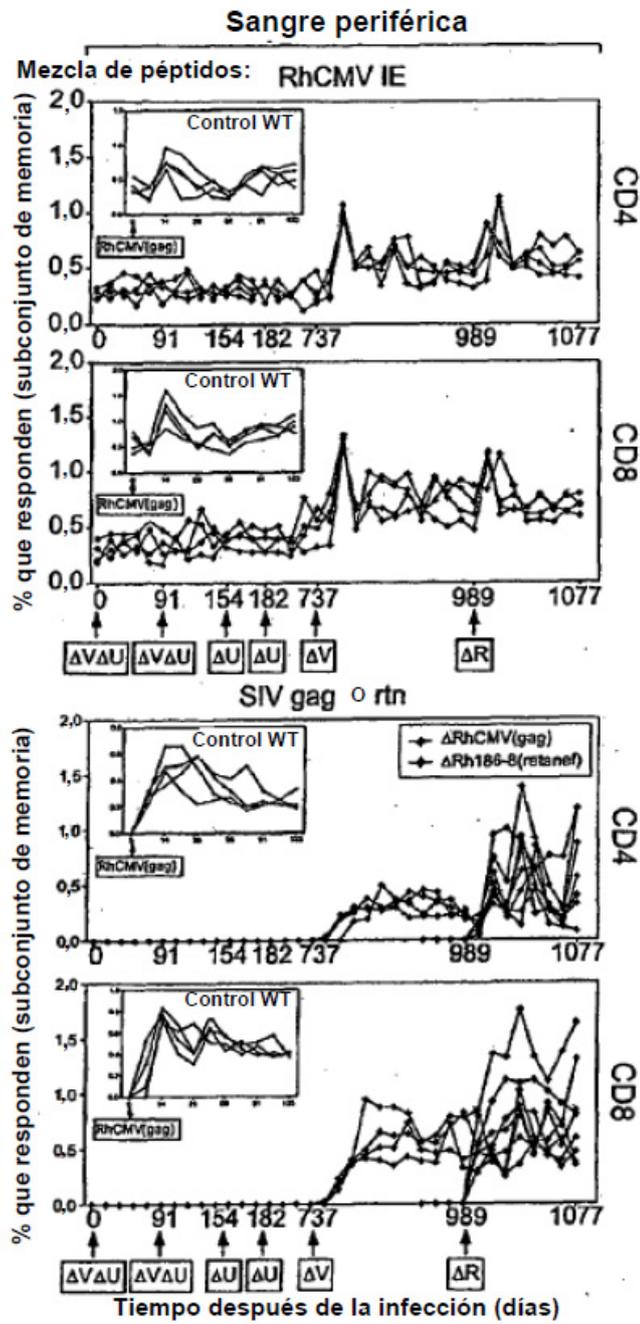
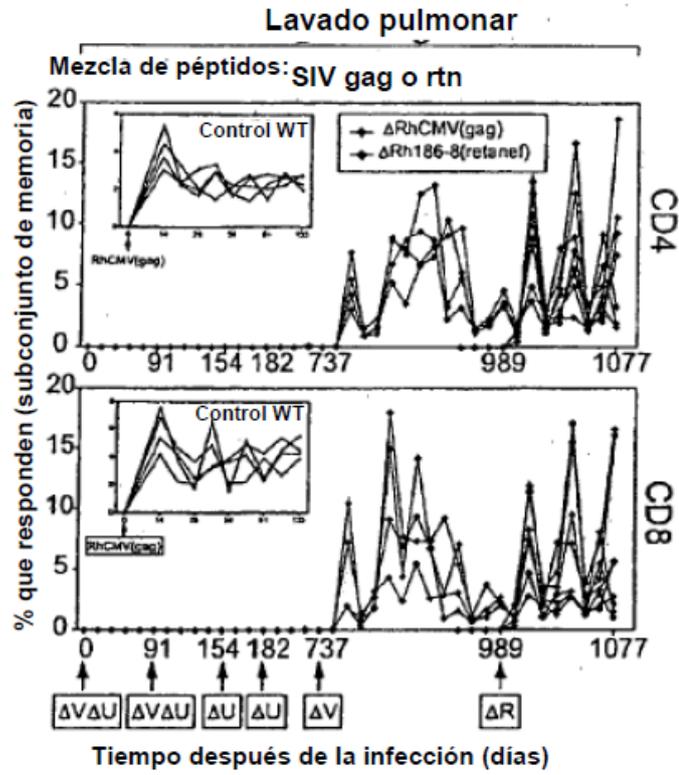


FIG. 3A

B



C

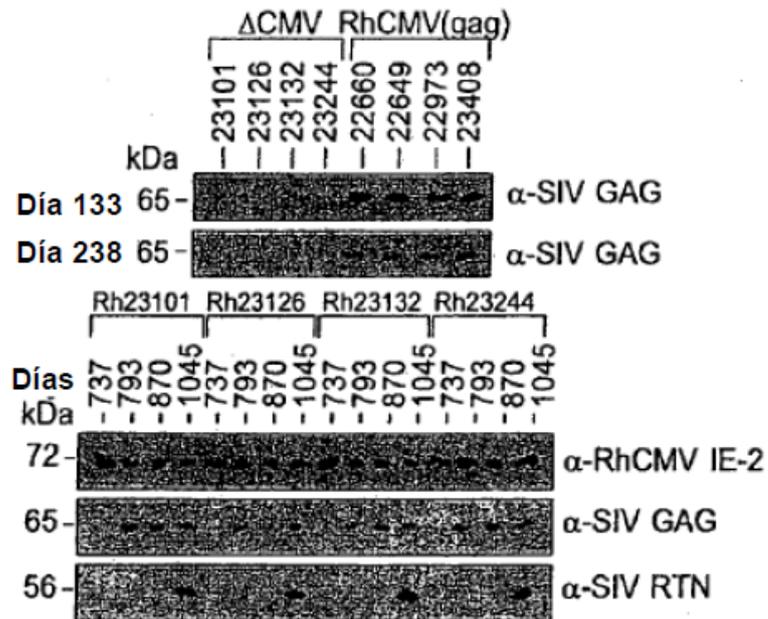


FIG. 3B-3C

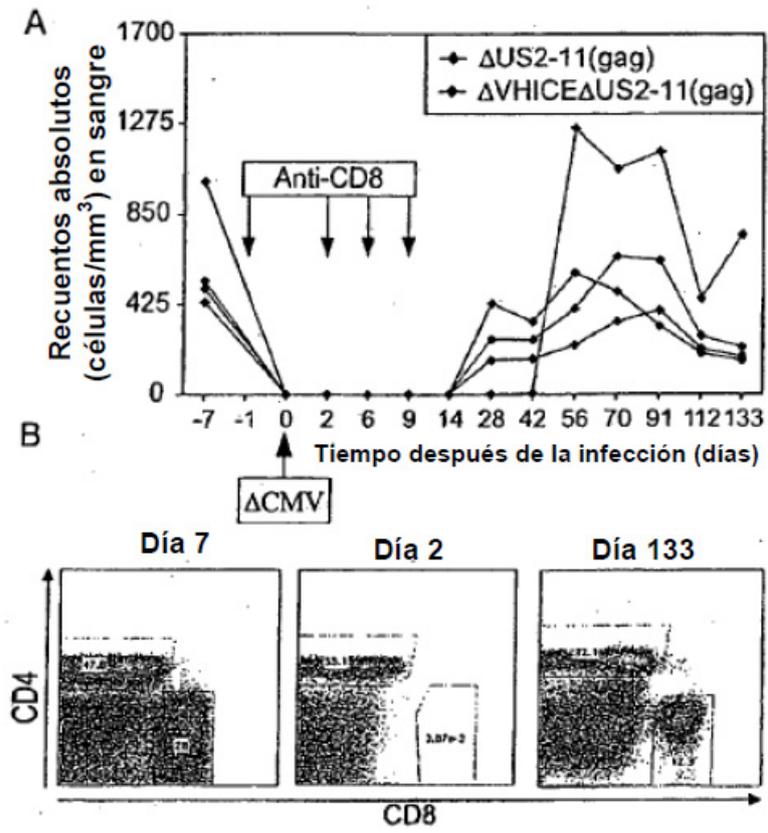


FIG. 4A-4B

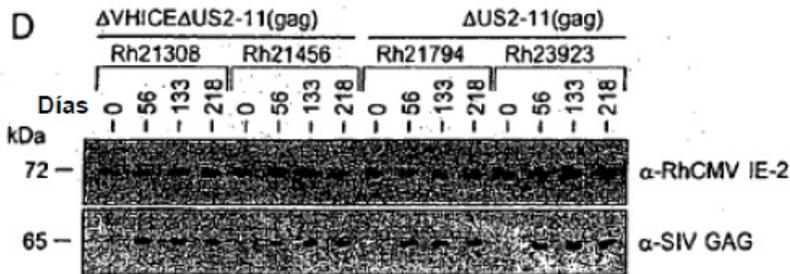
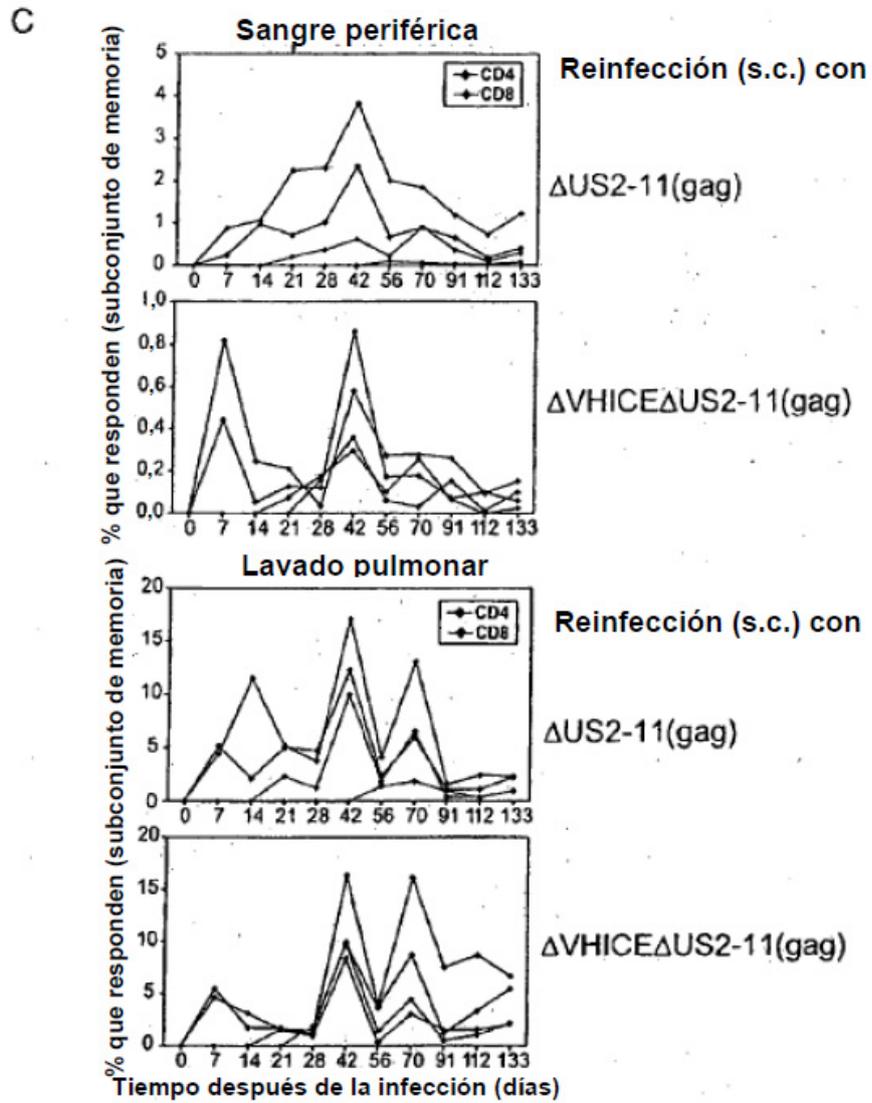


FIG. 4C-4D

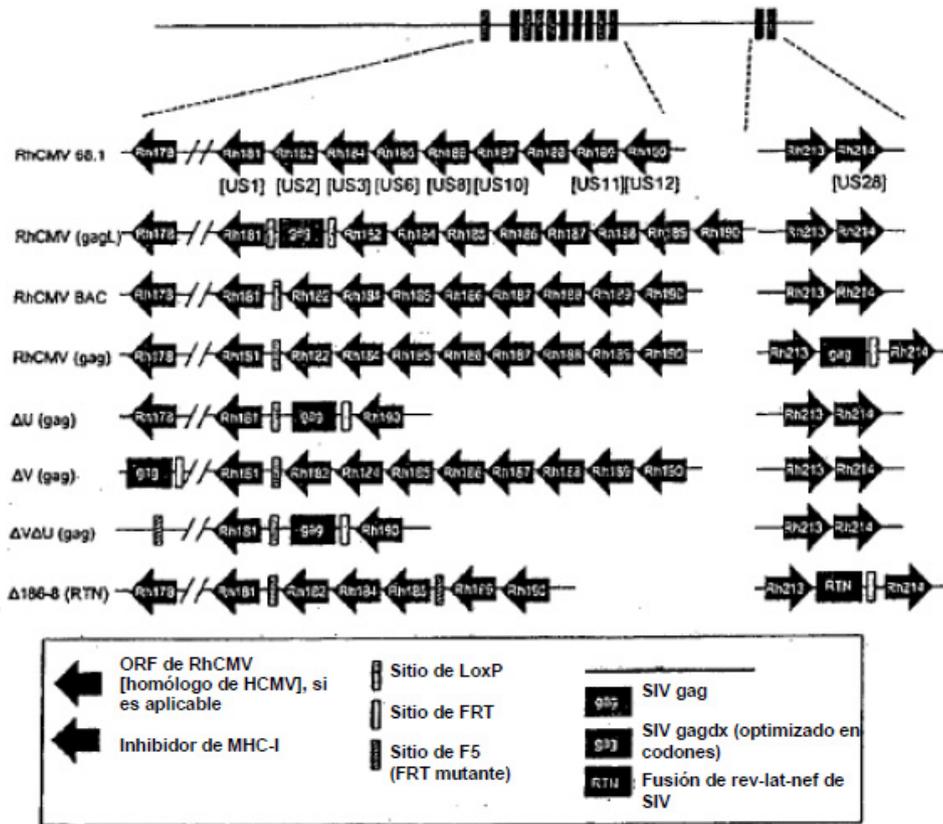


FIG. 5

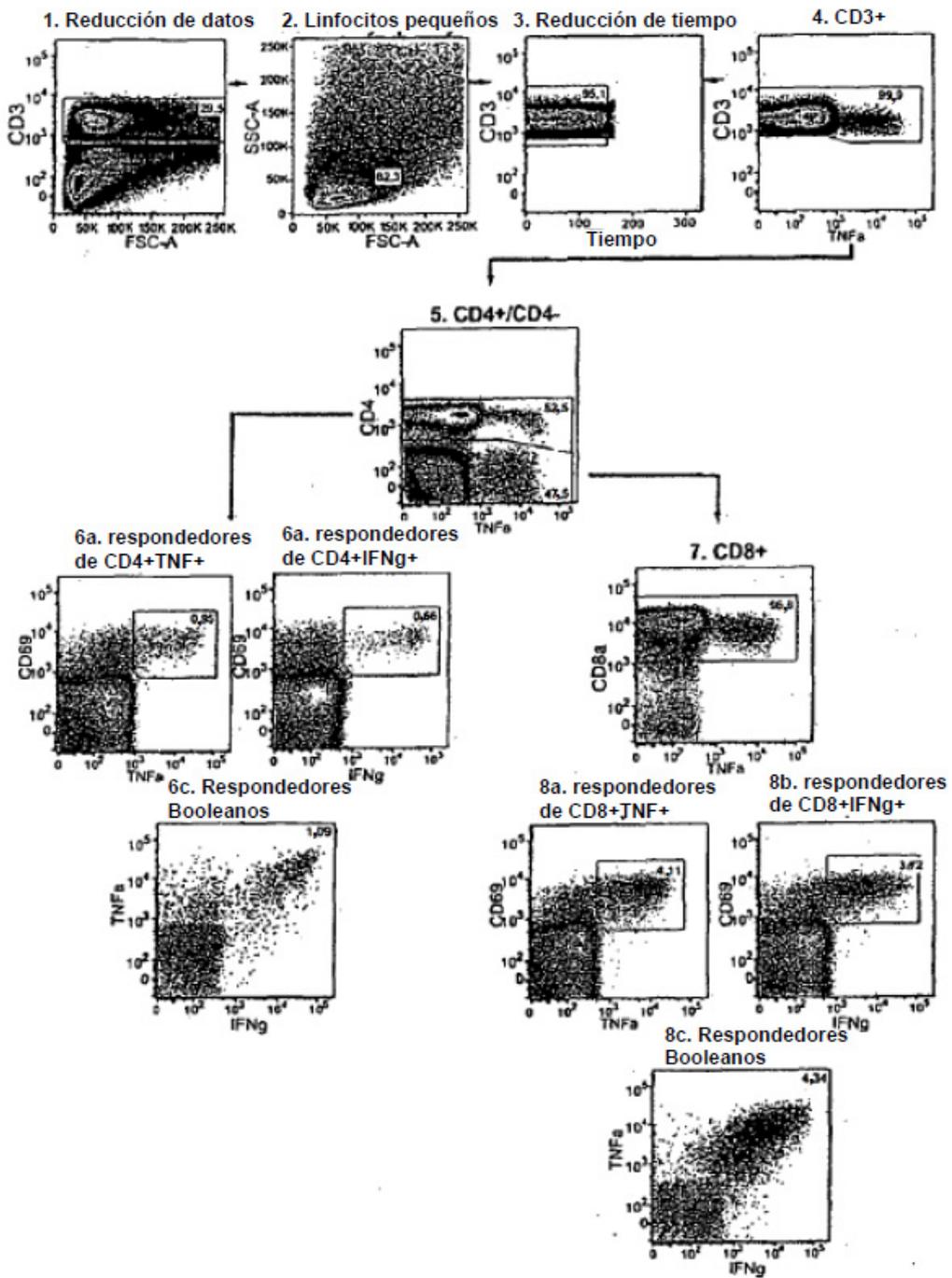


FIG. 6

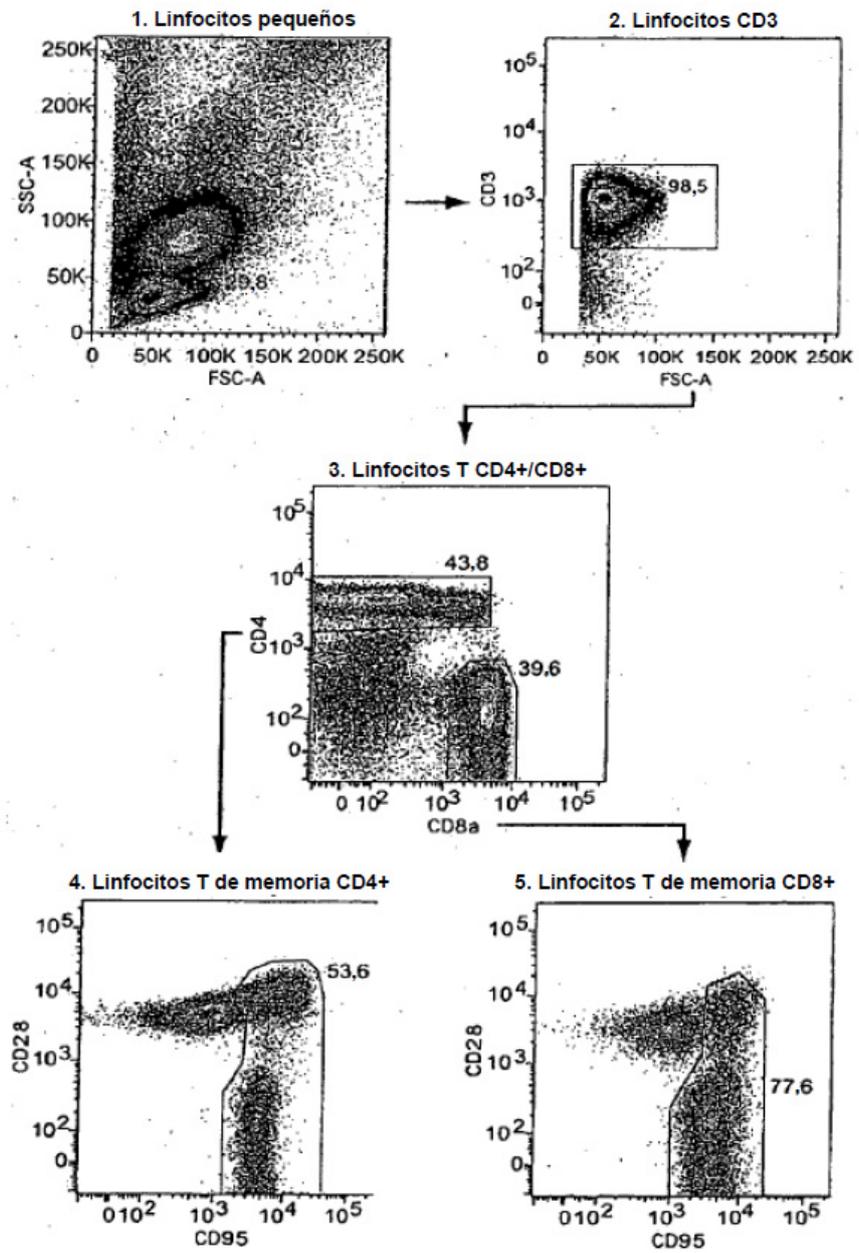


FIG. 7

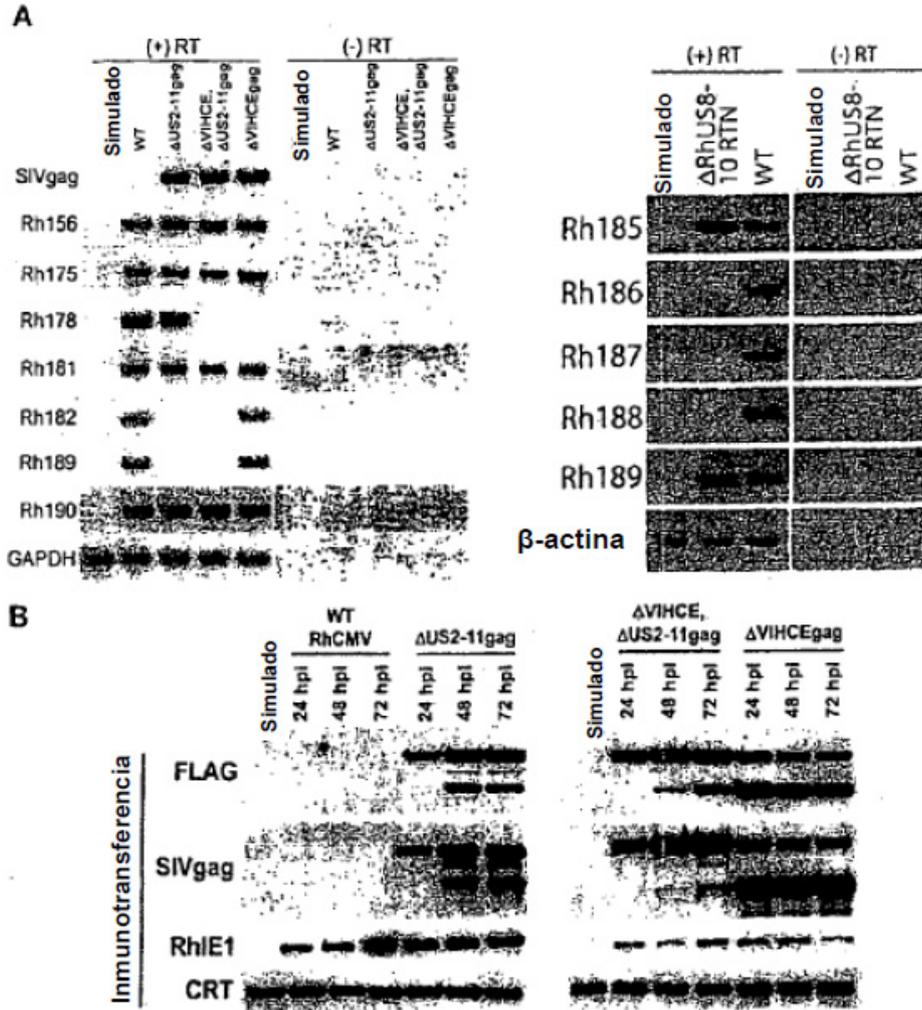


FIG. 8A-8B

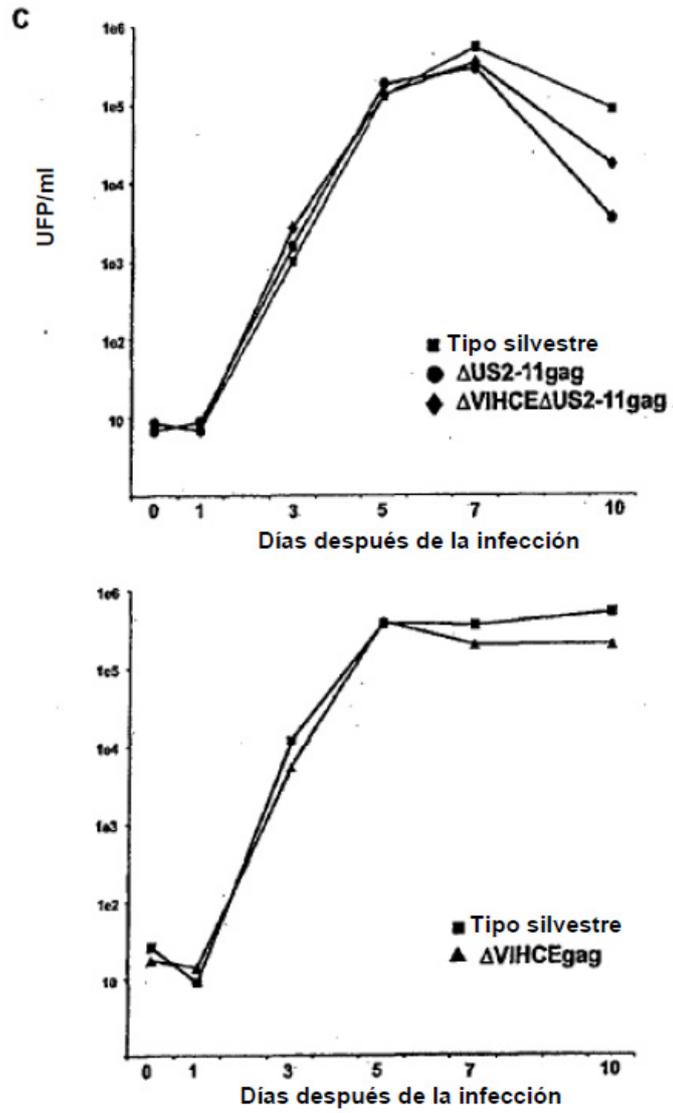


FIG. 8C

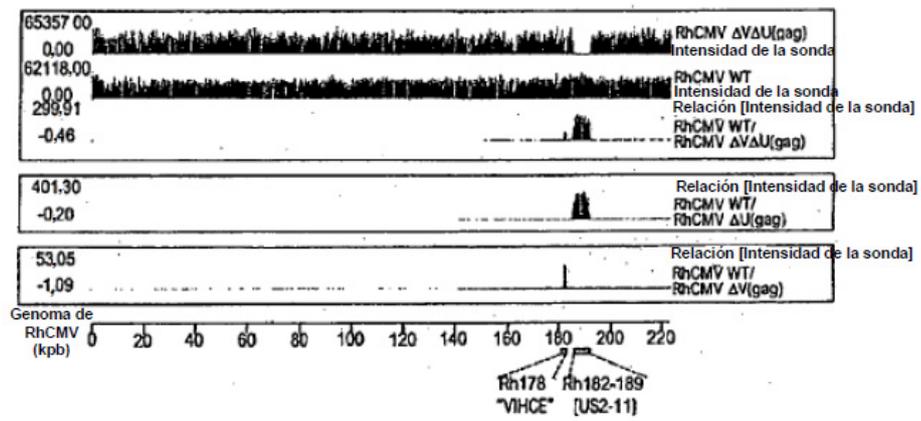


FIG. 9

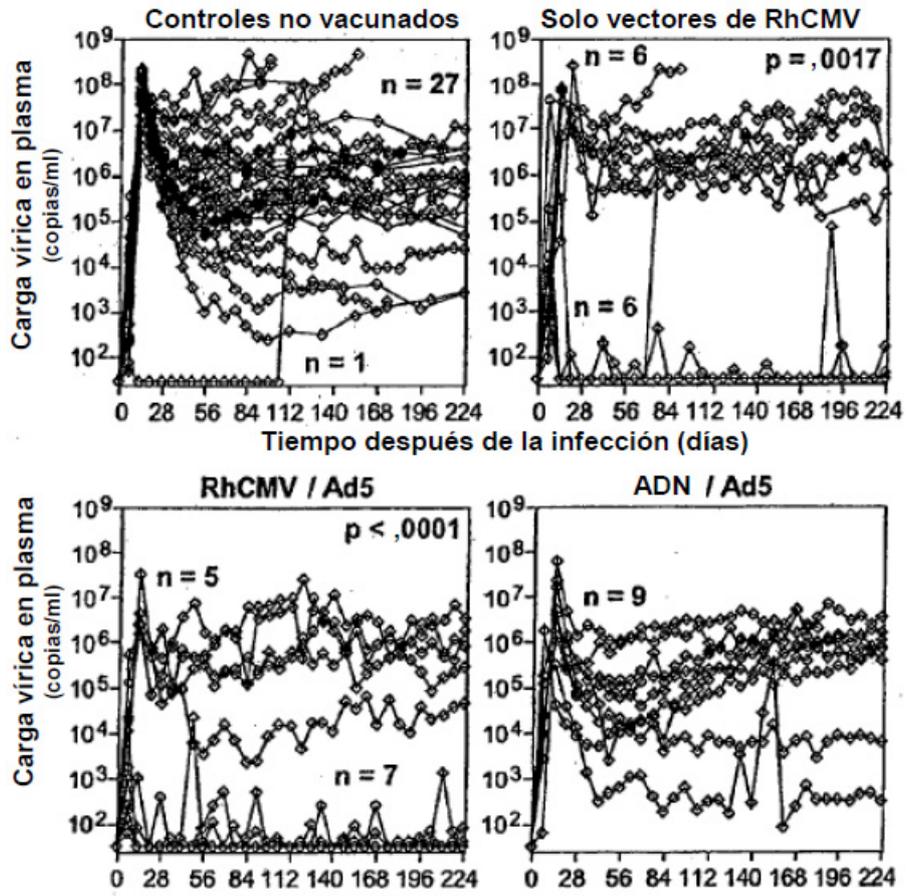


FIG. 10

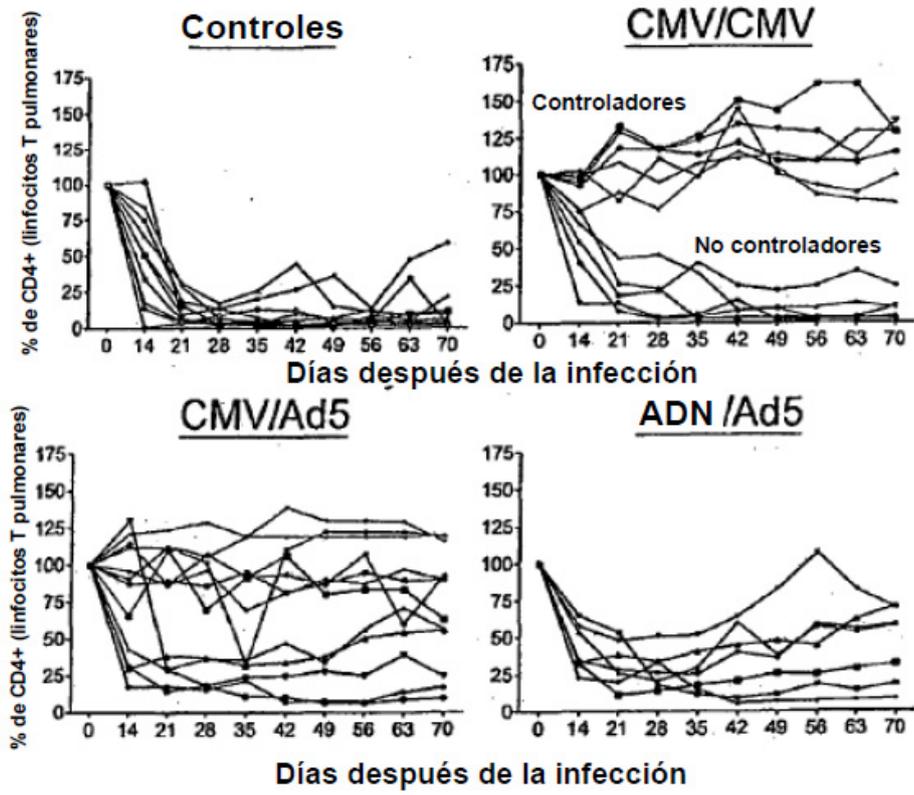


FIG. 11

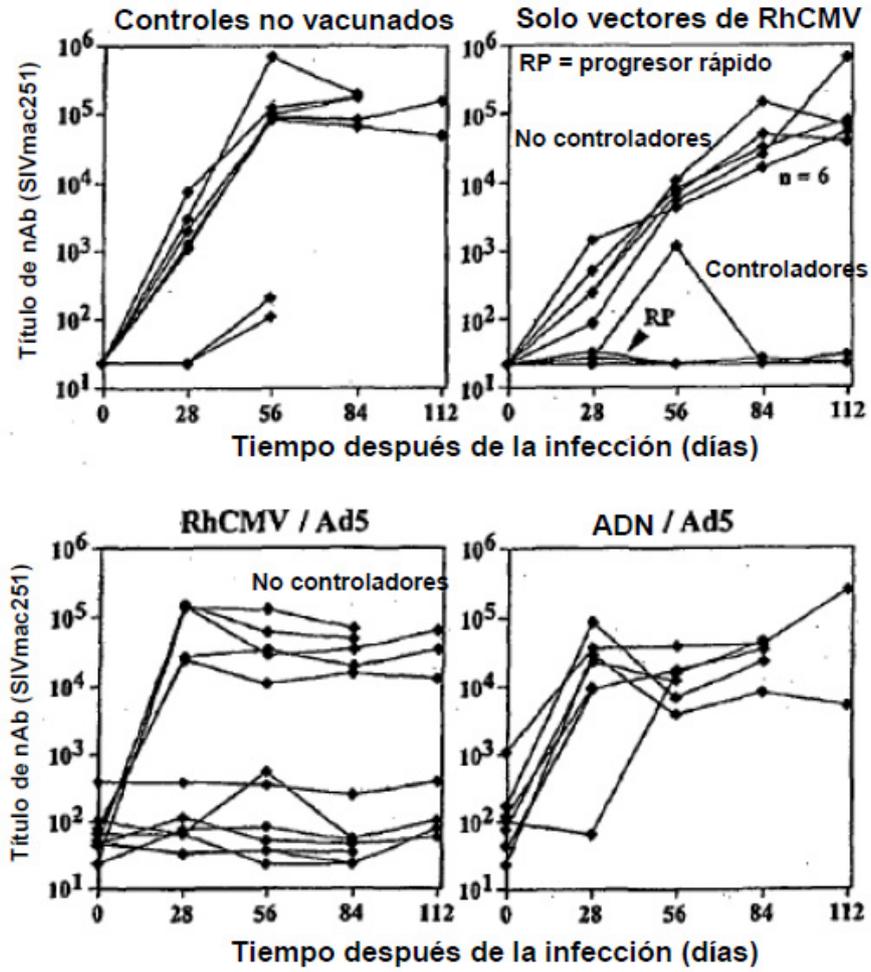


FIG. 12

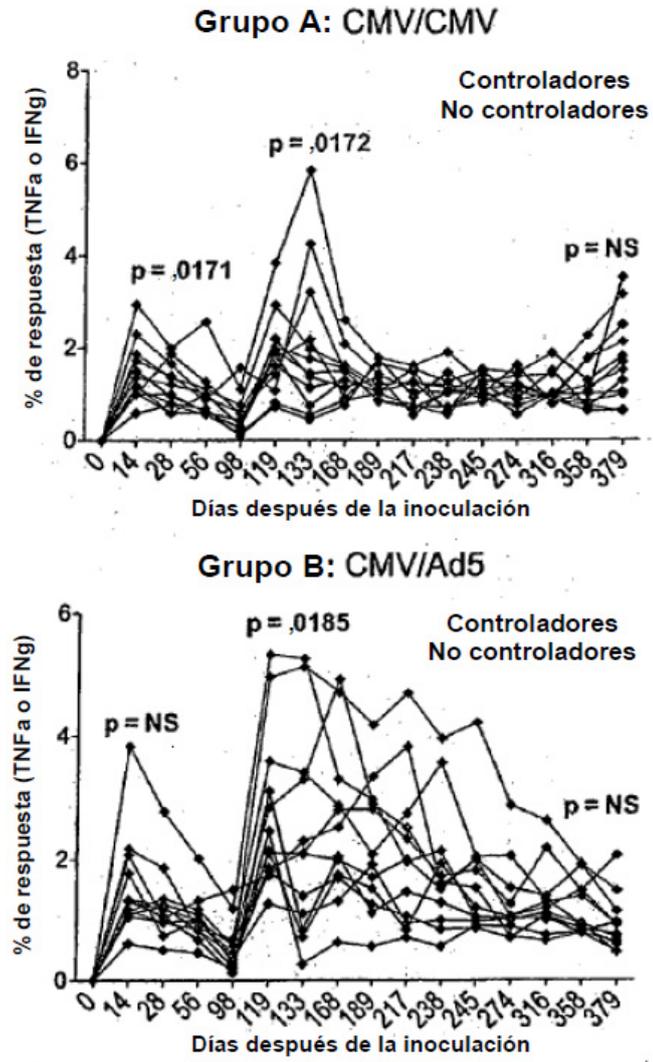


FIG. 13

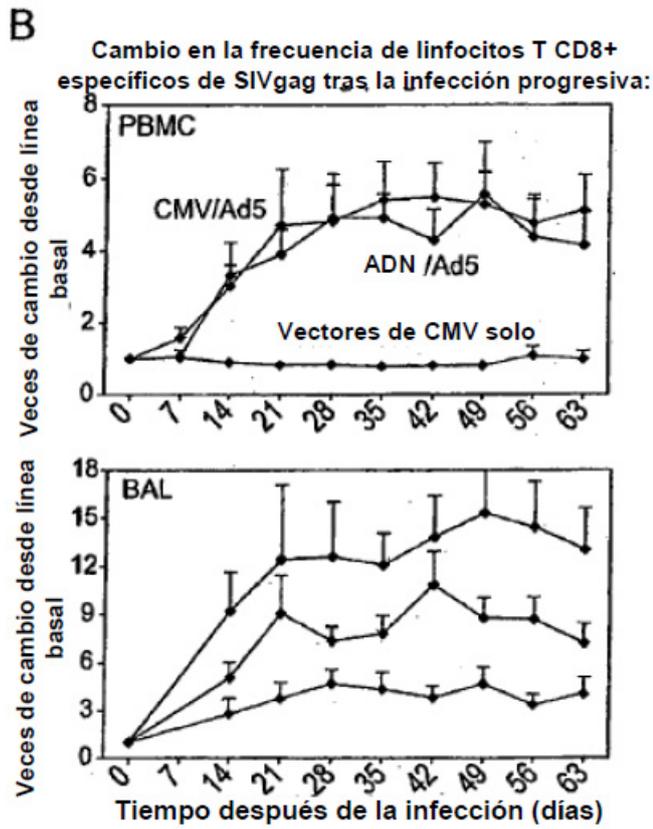
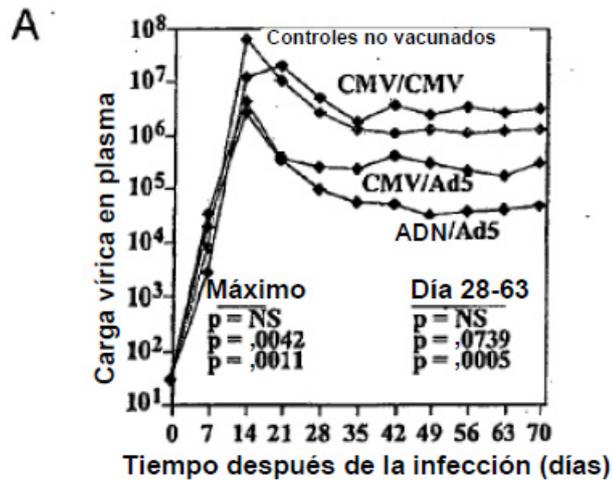


FIG. 14A-14B

**MR n.º 23.716 (CMV/CMV)**

(análisis de linfocitos T CD4+ en sangre purificados)

23.716	Plasma vi	ADN C-A	ARN C-A
Fecha de la extracción	Por ml	Por 10(5)	Por 10 (5)
13/4/09	Inferior a 30	Inferior a 10	Inferior a 10
20/4/09	Inferior a 30	80	Inferior a 10
27/4/09	40.000.000	11.000	28.000
4/5/09	280.000	1.100	1.000
11/5/09	Inferior a 30	Inferior a 10	Inferior a 10
18/5/09	Inferior a 30		
24/5/09	Inferior a 30		
1/6/09	Inferior a 30		
8/6/09	Inferior a 30		
15/6/09	Inferior a 30	330	Inferior a 10
22/6/09	60	120	Inferior a 10
29/6/09	Inferior a 30	30	Inferior a 10
6/7/09	Inferior a 30	40	Inferior a 10

FIG. 15

Linfocitos T CD8+ específicos de SIVgag: 7 años después de la vacunación  
 contra RhCMV/gag

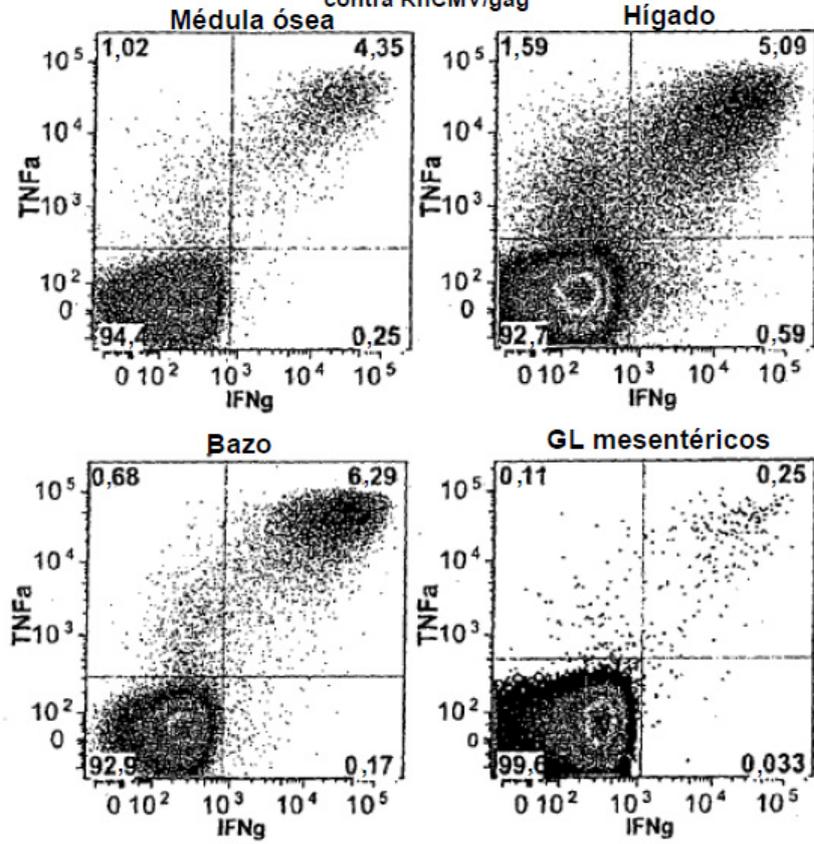
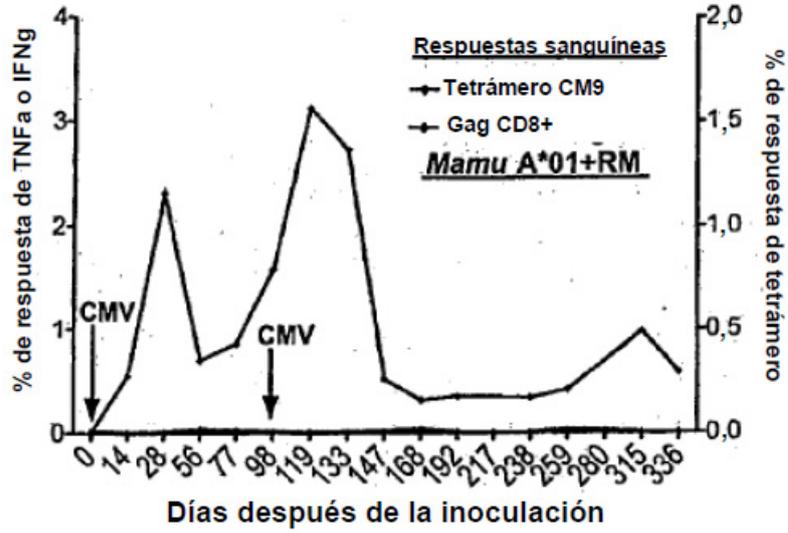


FIG. 16

RhCMV/gag WT x 2



RhCMV/gag WT // Ad5(gag)

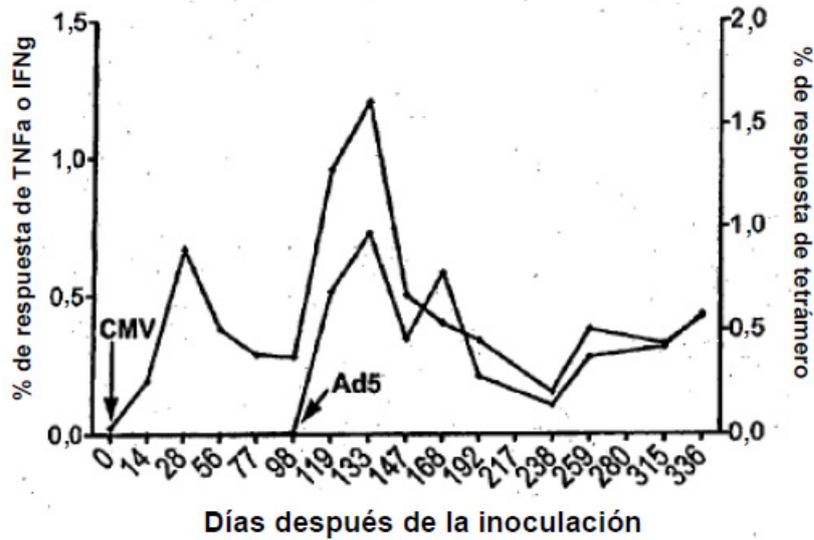


FIG. 17

Infección con vector delimitado por la inducción de una respuesta de linfocitos T CD8+ a inserciones de SIVgag en los CMV recombinantes

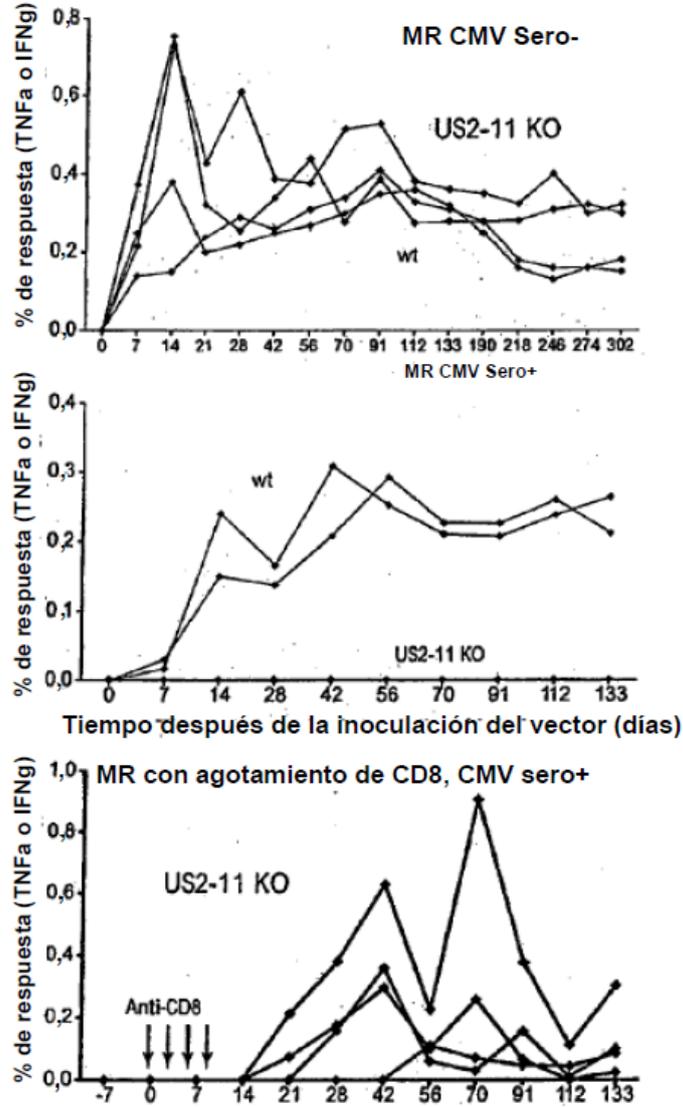


FIG. 18

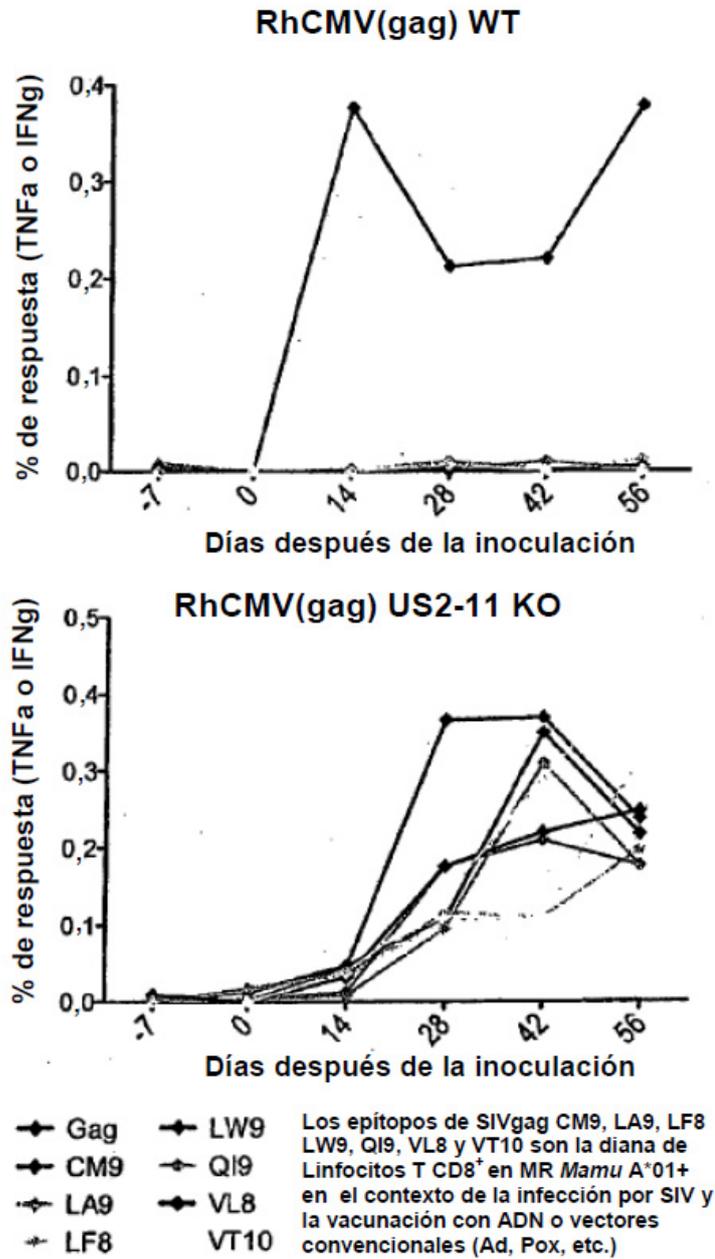


FIG. 19

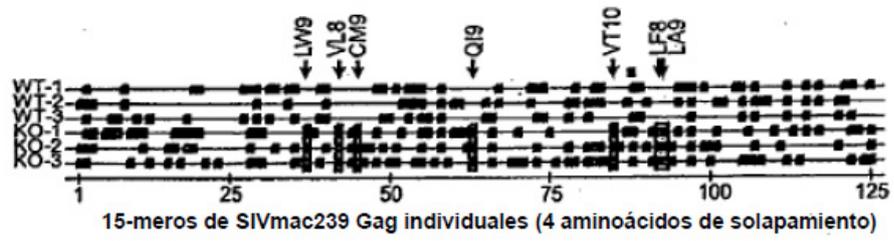


FIG. 20

Ensayos de respuestas específicas del Ag: Panel de tinción rutinaria

	PB	AmCy7	FITC	PE	ECD	TrR	PC7	APC	A700	AC7	CD28	Comentarios
<b>A</b>	Tubos de citometría de flujo de citocinas											
1	CCR7	CD4	IC-67	TNF $\alpha$	CD28*	CD69	CD95	IFN $\gamma$	CD3	CD8	TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$	Prolif. <i>in vivo</i> ; memoria central/efectora
2	CCR7	CD4	CD137**	MIP-1 $\beta$ **	CD28*	CD69	CD95	TNF $\alpha$	CD3	CD8	TNF $\alpha$ , MIP-1 $\beta$	desgranulación, mem. cent./efecto.
3	HLA-DR	CD4	IFN $\gamma$	CD25	CD28*	CD69	TNF $\alpha$	PD-1	CD3	CD8	TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$	Activación <i>in vivo</i>
<b>B</b>	Tubos de dilución de CFSE											
1	CD3	...	CFSE*	IC-67	...	CD4	...	CD8	...	...	...	Capacidad proliferativa

Nota: PB = azul pacífico; AmCy = AmCyan; FITC = fluoresceína; PE = ficoeritrina; ECD = PE-Rojo Texas; TrR = TrueRed (PerCP-Cy5.5); APC = alofocianina;

A700 = Alexa700; PC7 = PE-Cy7; AC7 = APC-Cy7. Los antígenos intracelulares están en negrita; \*Los conjugados de CD28 proporcionados como coestimulación junto con mAb CD49d en el cultivo de estimulación;

\*\*Ab CD107 también incluido con células durante la incubación; \*\*\*IL-2 puede estar sustituida en los análisis seleccionados; ^CFSE se incorpora a las células antes del ensayo.

FIG. 21

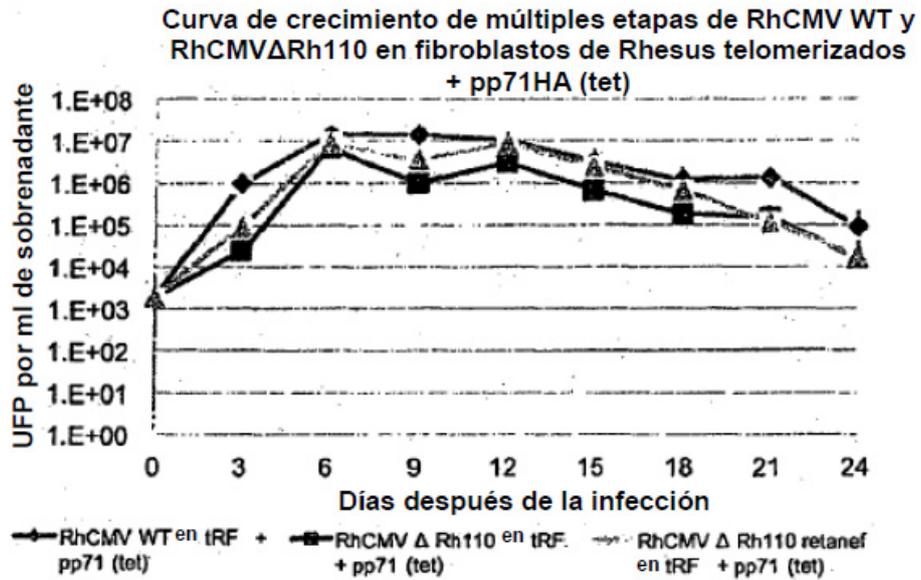
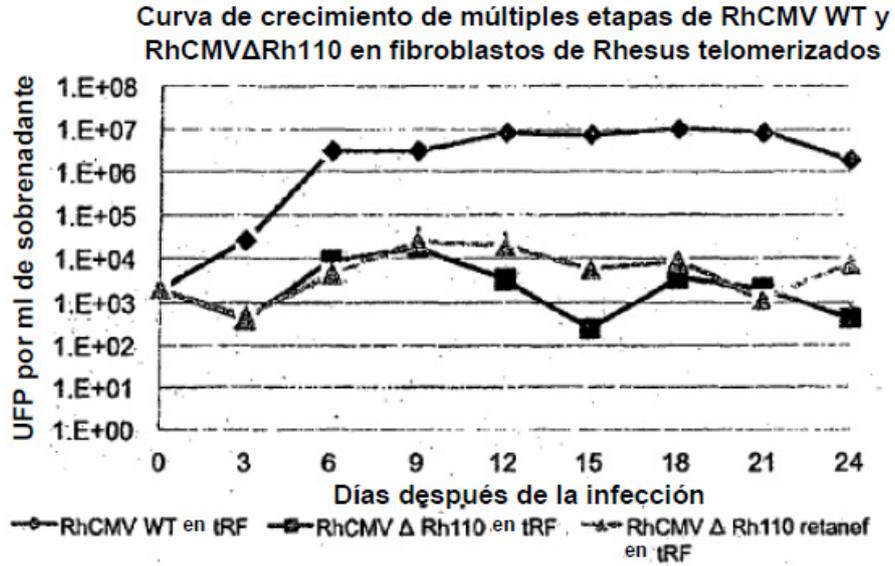


FIG. 22

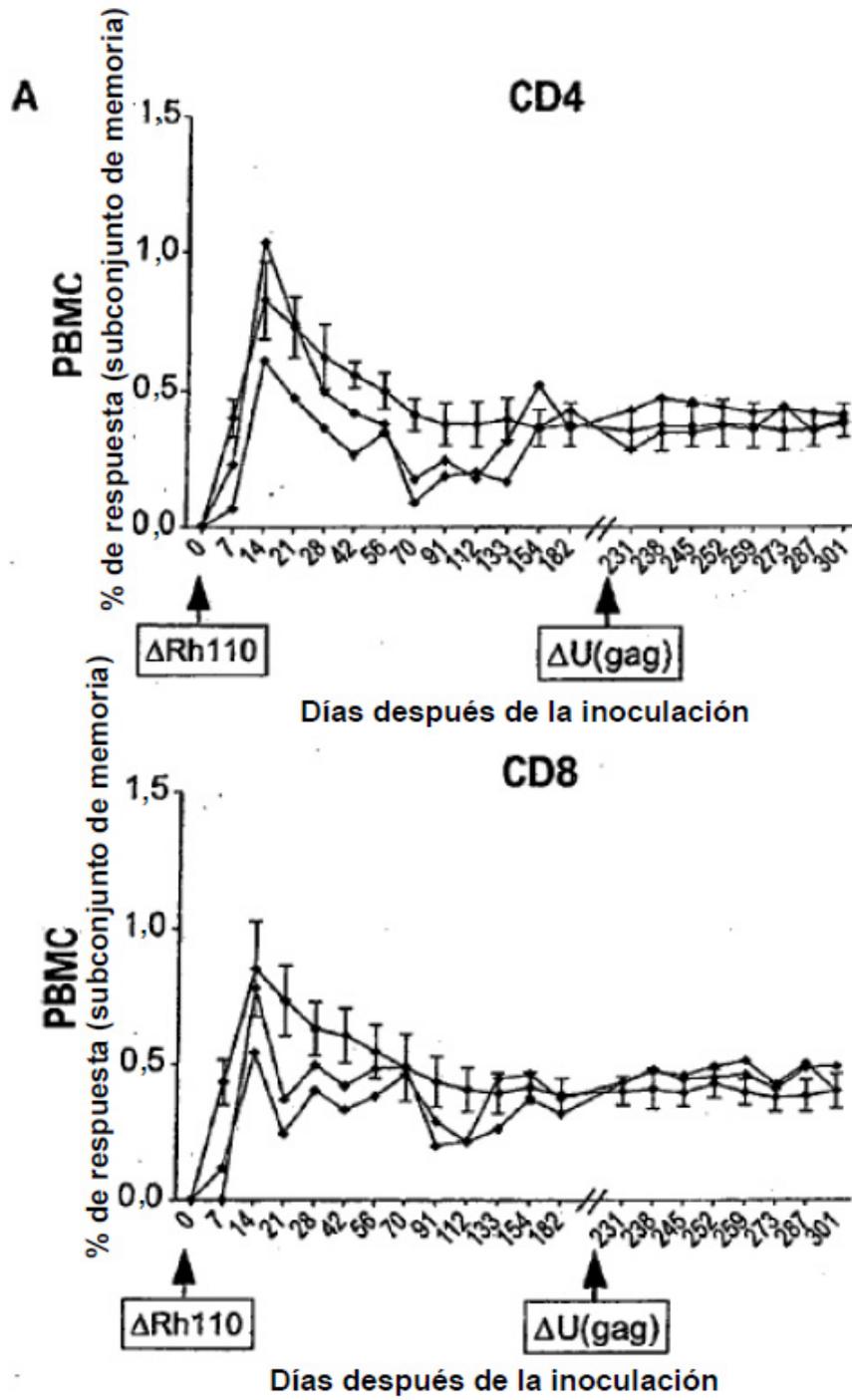


FIG. 23A

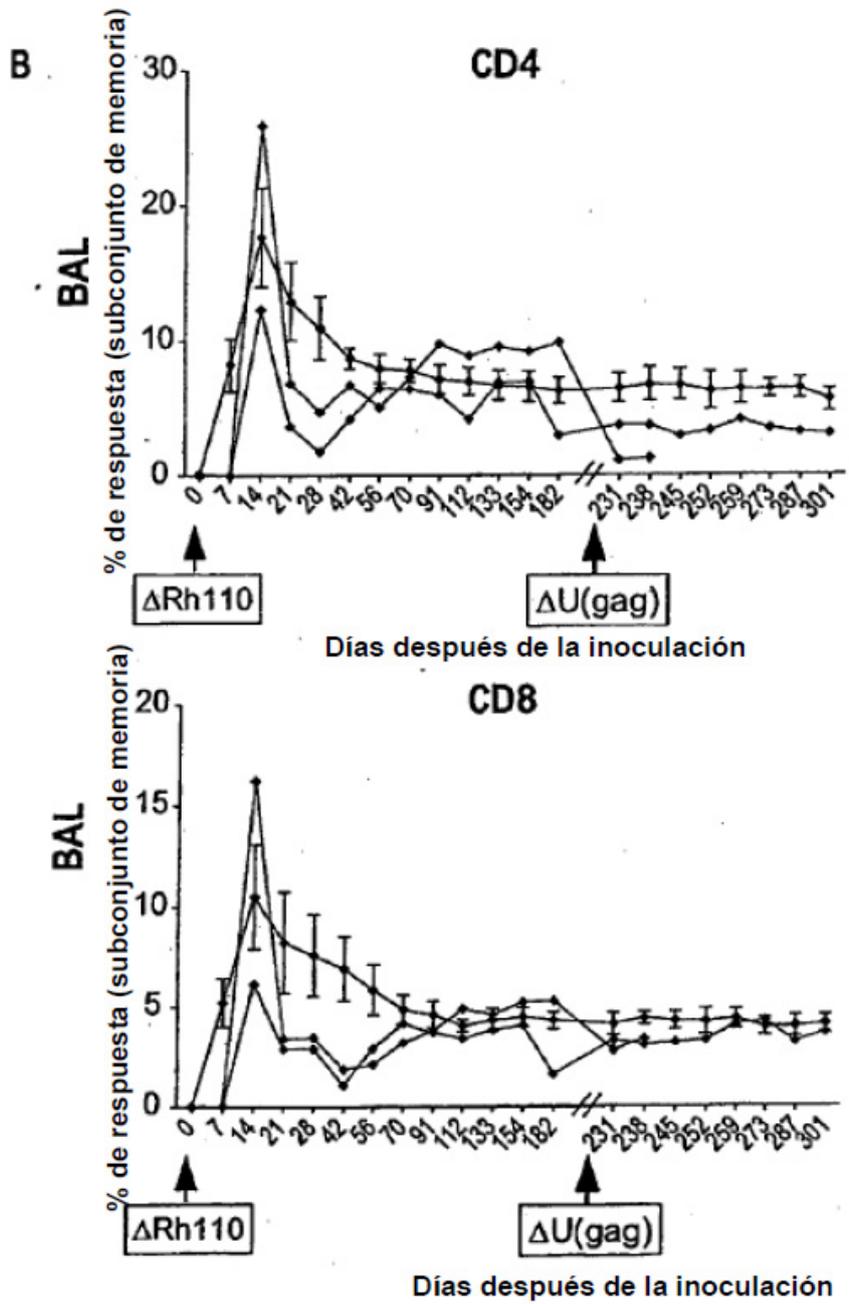


FIG. 23B

C

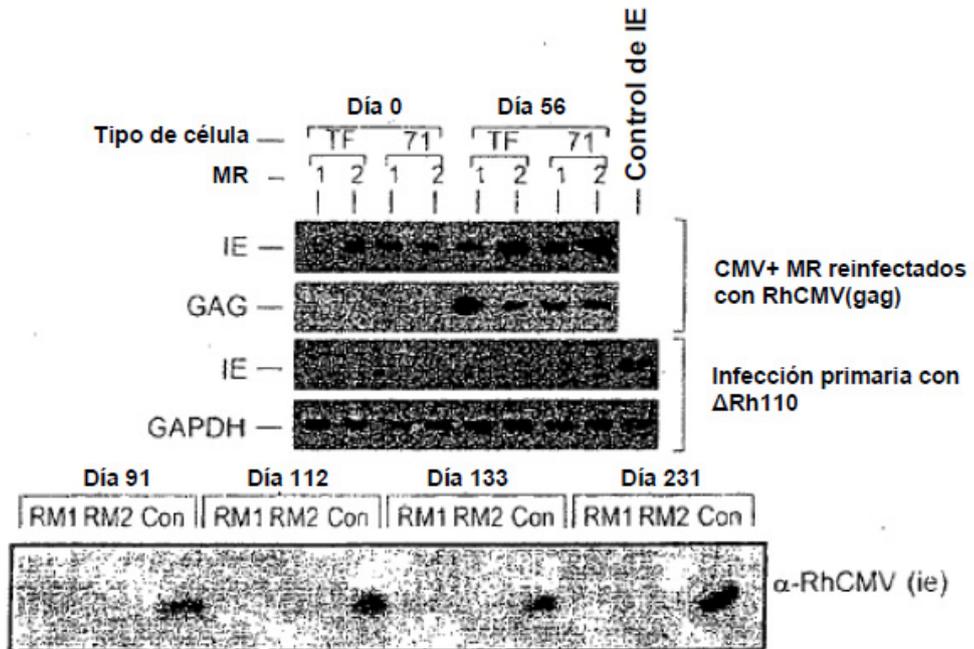
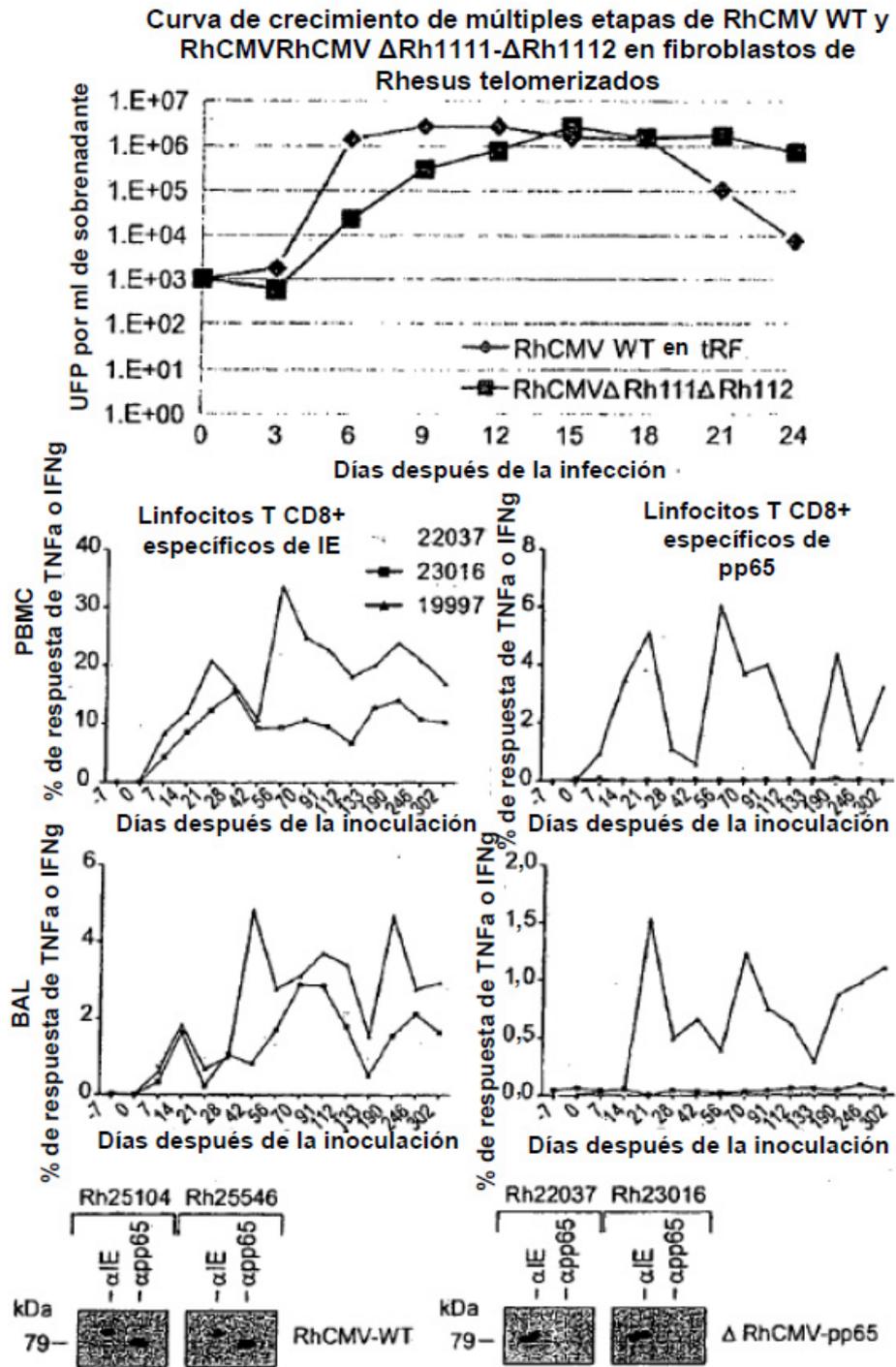


FIG. 23C



A

Respuesta de los linfocitos T al lisado de RhCMV

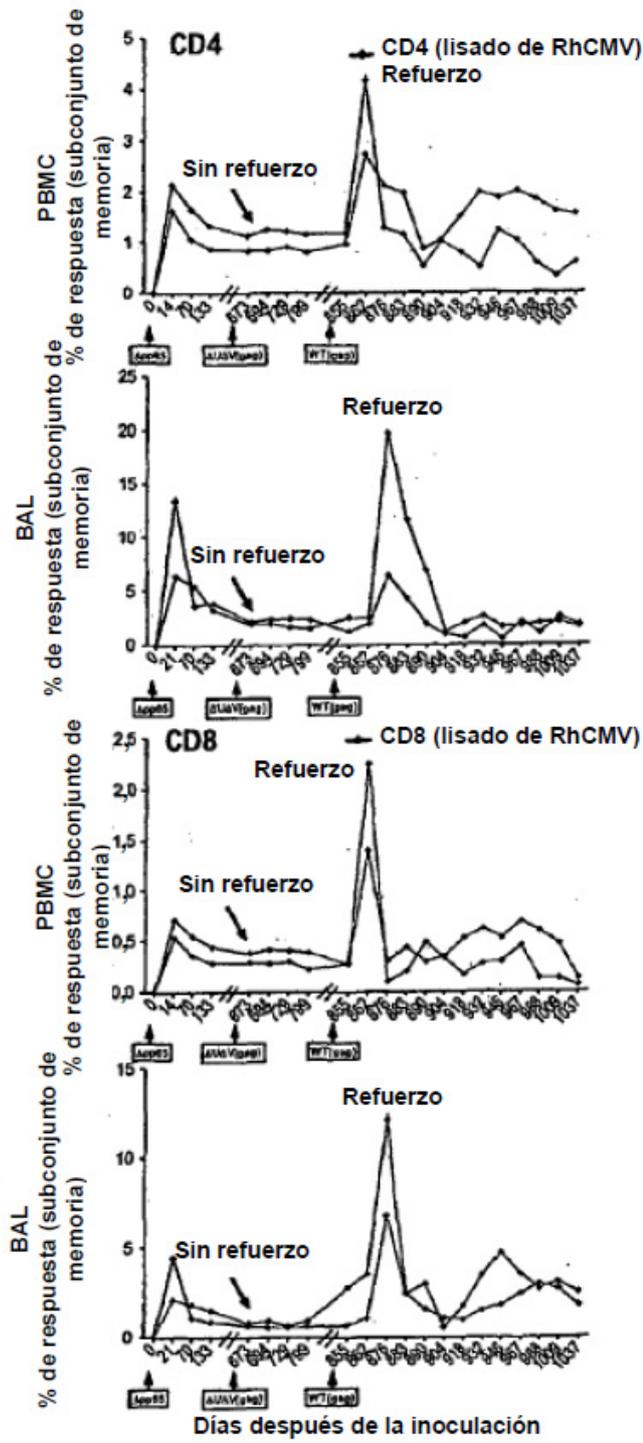


FIG. 25A

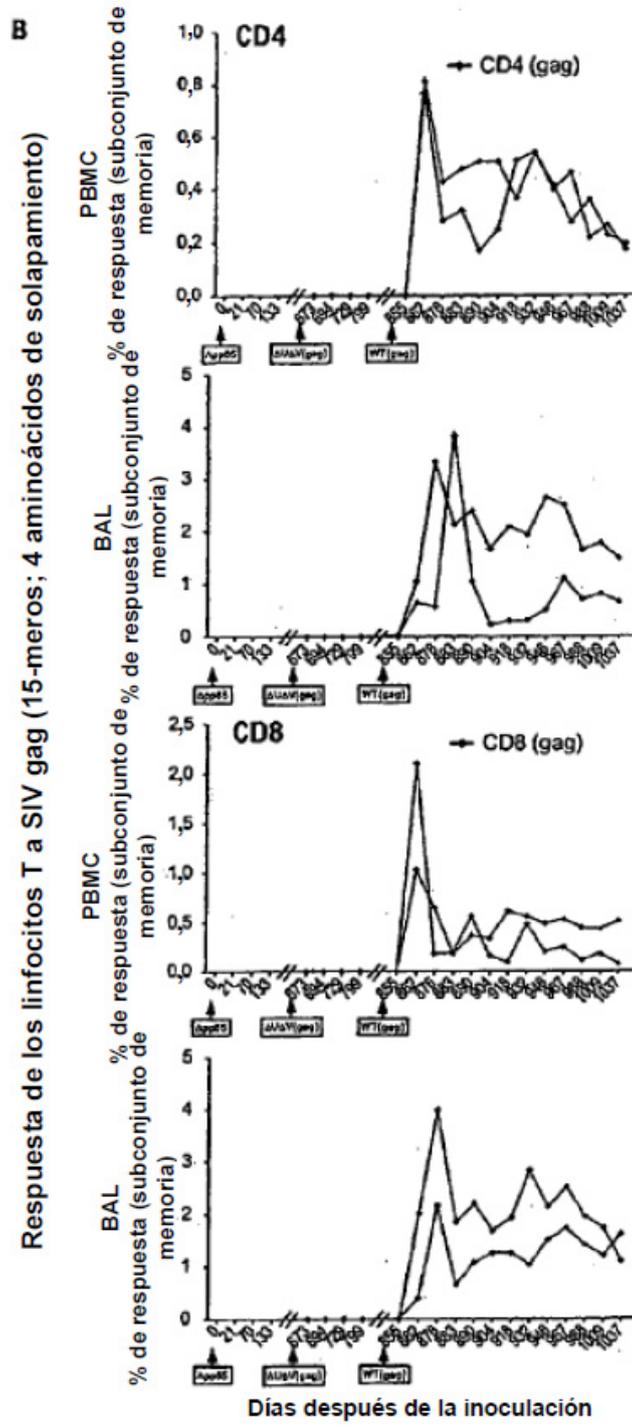


FIG. 25B