

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 961**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012** **PCT/CA2012/001185**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013** **WO13091080**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012** **E 12859997 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017** **EP 2794637**

54 Título: **Virus de la estomatitis vesicular para vacunas de sensibilización y refuerzo**

30 Prioridad:

23.12.2011 US 201161579902 P

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

07.11.2017

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF WESTERN ONTARIO
(100.0%)
Gordon Mogenson Building 100 Collip Circle
Suite 105
London, Ontario N6G 4X8, CA**

72 Inventor/es:

**KANG, CHIL-YONG y
KIM, GYOUNG NYOUN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 640 961 T3

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

DESCRIPCIÓN

Virus de la estomatitis vesicular para vacunas de sensibilización y refuerzo

Campo de la invención

- 5 La presente invención versa, en general, sobre biotecnología e inmunología. En particular, la presente invención versa sobre proteínas matriciales (M) novedales del virus de la estomatitis vesicular (VSV), sobre VSV recombinantes atenuados que expresan las proteínas M novedosas y sobre vacunas de sensibilización y refuerzo basadas en el VSV que inducen respuestas inmunológicas duraderas humorales y mucosales arbitradas por células contra antígenos extraños expresados por el VSV recombinante que contienen los genes extraños.

Antecedentes de la invención

- 10 El virus de la estomatitis vesicular (VSV) es un virus ARN catenario negativo que infecta a la mayoría de las células de los mamíferos y expresa proteínas virales hasta el 60% del total de proteínas de las células infectadas [Kim, G. N., y C. Y. Kang. *Virology* 357:41, 2007]. En la naturaleza, el VSV infecta a cerdos, ganado vacuno y caballos, y causa fiebre aftosa en torno a la boca y las pezuñas. Aunque se ha documentado la infección por VSV en seres humanos, el VSV no causa ningún síntoma grave en seres humanos [Fields, B. N., y K. Hawkins. *N Engl J Med* 277:989, 1967; Johnson, K. M. et al. *Am J Trop Med Hyg* 15:244, 1966].

El VSV codifica cinco proteínas: la proteína nucleocápside (N), la fosfoproteína (P), la proteína matricial (M), la glicoproteína superficial (G) y la ARN polimerasa dependiente de ARN (L). Las proteínas N, P y L del VSV son imprescindibles para la síntesis de ARN y ARNm genómicos codificantes y no codificantes, que son necesarios para la síntesis de proteínas del VSV.

- 20 El bloqueo de la síntesis de proteínas de las células anfitrionas por parte de la proteína matricial (M) del VSV induce la muerte celular. Cambiando un residuo de metionina en la posición 51 de la proteína M por arginina (M51R) en el virus de la estomatitis vesicular de serotipo Indiana (VSV_{Ind}), y cambiando las metioninas en las posiciones 48 (Met48) y 51 (Met51) por Arg en el virus de la estomatitis vesicular de serotipo Nueva Jersey (VSV_{NJ}), el gen M podría negar esta función de la proteína M del VSV (Kim, G. y Kang, C., *Virology*, 357:41-53, 2007). Aunque los VSV con estas mutaciones de Met a Arg en la proteína M tienen efectos citopáticos significativamente reducidos, siguen duplicándose y produciendo una progenie vírica en la célula y en el animal infectado. Uno de los mutantes del gen M sensibles a la temperatura (*ts*) de la cepa Orsay del VSV_{Ind}, el *tsO23*, ha mostrado duplicación limitada en una línea celular glial murina a 37°C y 39°C (Rabinowitz, S. et al. *Infection and Immunity* 33:120-125, 1981). Se ha demostrado que la sensibilidad del *tsO23* a la temperatura era consecuencia de la indebida iniciación o de la ausencia de iniciación del ensamblaje viral con la estructura característica con forma de bala a 39°C (Flood, E. et al. *Virology* 278:520-533, 2000; Lyles, D. et al. *Virology*, 217:76-87, 1996). Además, el *tsO23* perdía su neurovirulencia en ratones incluso después de una inoculación directa en el cerebro (Rabinowitz, S. et al. *Infection and Immunity*, 33:120-125, 1981).

- 35 Hay tres diferencias en aminoácidos entre la M de la forma natural de la cepa Orsay del VSV y la M del *tsO23*, que son glicina (G) a ácido glutámico (E) en el 21^{er} aminoácido (G21E), leucina (L) a fenilalanina (F) en el 111^o aminoácido (L111F), e histidina (H) a tirosina (Y) en el 227^o aminoácido (H227Y) (Morita, K. et al. *J. Virol.* 61:256-263, 1987). La reversión de un solo aminoácido en F111 a L en los revertientes implica que el F111 parece desempeñar un papel fundamental en la sensibilidad a la temperatura del *tsO23*. Sin embargo, las otras dos mutaciones también pueden desempeñar cierto papel, dado que la reversión única de F a L en la 111^a posición no recuperó el virus completamente a su fenotipo de la forma natural (Morita, K. et al. *J. Virol.* 61:256-263, 1987; Li, Y. et al. *J. Virol.* 62:3729-3737, 1988).

- 45 En la actualidad, grupos de investigación han desarrollado un VSV de ensamblaje defectuoso y duplicación competente que tiene un gen de la glicoproteína G (G) borrado (ΔG) o tanto el gen G como el M borrados (ΔMG) como vectores de vacuna más seguros (Kahn, J. et al. *J. Virol.* 75:11079-11087, 2001; Schwartz, J. et al., *Virology* 366:166-73, 2007). Sin embargo, al tener borrado el gen G o borrados los genes M y G, el vector del VSV requiere el suministro de las proteínas G o tanto de M como de G en *trans* para la producción del VSV de ensamblaje defectuoso. Para reducir el coste de producción de vacunas, es necesario generar un sistema que pueda producir los vectores virales de vacunas que puedan duplicarse con titulación elevada. Por lo tanto, se precisa un sistema de vectores de VSV de longitud máxima que haya perdido su virulencia (avirulento) y que siga pudiendo duplicarse con titulación elevada *in vitro* a 31°C, que no pueda ensamblarse debidamente a temperaturas no permisibles y que induzca buenas respuestas inmunitarias contra el gen de interés que expresa.

A partir del siguiente Compendio de la invención, de la Exposición de la invención y de las realizaciones y Ejemplos de la misma se plasmarán objetos ulteriores y adicionales de la invención.

Compendio de la invención

- 55 Los inventores generaron nuevos mutantes de la proteína matricial (M) del virus de la estomatitis vesicular (VSV), incluyendo el VSV de serotipo Indiana (VSV_{Ind}) y el VSV de serotipo Nueva Jersey (VSV_{NJ}). Estos nuevos VSV que

tienen las proteínas M mutantes son esencialmente no citolíticos, significativamente atenuados y avirulentos, incluyendo la neurovirulencia (más seguros). Además, estos nuevos VSV que tienen las proteínas M mutantes son capaces de inducir respuestas inmunitarias contra un antígeno o un epítipo de interés. La respuesta inmunitaria puede ser humoral, celular y mucosal. Además, el VSV_{Ind} que tiene la M mutante puede ser ensamblado y ser liberado de las células infectadas normalmente a 31°C, pero no puede ensamblarse debidamente a 37°C o más, y la liberación de los virus de células infectadas se reduce significativamente en aproximadamente 1000 o 10.000 veces con respecto a la del VSV_{Ind} del tipo natural.

Por ello, en una realización, la presente solicitud versa sobre una proteína matricial modificada (M) de un virus de la estomatitis vesicular (VSV). En una realización, la proteína modificada M comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por: (i) SEQ ID NO: 3, que incluye al menos las sustituciones siguientes: G21E/L11F/M51R; y (ii) SEQ ID NO: 8, que incluye al menos las sustituciones siguientes: G22E/M48R+M51R. En un aspecto de la presente invención, la proteína modificada M de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8, que incluye al menos las sustituciones siguientes: G22E/L110F/M48R+M51R.

En otra realización de la proteína modificada M de la presente invención, la proteína modificada M comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por: SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10.

En otra realización, la presente solicitud proporciona un VSV recombinante (rVSV). En una realización, el rVSV comprende una proteína matricial modificada (M), comprendiendo la proteína modificada M una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por: (i) SEQ ID NO: 3, que incluye al menos las sustituciones siguientes: G21E/L111F/M51R; y (ii) SEQ ID NO: 8, que incluye al menos las sustituciones siguientes: G22E/M48R+M51R.

En una realización de la presente invención, el rVSV es un rVSV quimérico que expresa una proteína de un patógeno extraño, y siendo capaz dicho rVSV quimérico de inducir una respuesta inmunitaria a dicha proteína.

En otra realización del rVSV de la presente invención, el patógeno es un patógeno viral, fúngico, bacteriano o parasitario.

En otra realización del rVSV de la presente invención, el rVSV es esencialmente no citolítico y avirulento.

En una realización de la presente invención, el rVSV es un virus recombinante de la estomatitis vesicular de serotipo Indiana (rVSV_{Ind}), y la proteína modificada M comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, que incluye al menos la sustitución siguiente: G21E/L111F/M51R.

En una realización del rVSV_{Ind} de la presente invención, la proteína modificada M comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

En otra realización del rVSV_{Ind} de la presente invención, la proteína modificada M está codificada por un gen que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2.

En otra realización del rVSV de la presente invención, el rVSV_{Ind} de cualquiera de las realizaciones anteriores es capaz de producir partículas de VSV_{Ind} a temperaturas permisibles e incapaz de producir las partículas a temperaturas no permisibles.

En otra realización de la presente invención, el rVSV es un virus recombinante de la estomatitis vesicular de serotipo Nueva Jersey (rVSV_{NJ}), y la proteína modificada M comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, que incluye al menos las sustituciones siguientes: G22E/M48R+MS1R.

En una realización del rVSV_{NJ} de la presente invención, la proteína modificada M está codificada por un gen que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6.

En otra realización del rVSV_{NJ} de la presente invención, la proteína modificada M comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.

En otra realización del rVSV_{NJ} de la presente invención, la proteína modificada M incluye las sustituciones siguientes: G22E/L110F/M48R+M51R.

En otra realización del rVSV_{NJ} de la presente invención, la proteína modificada M está codificada por un gen que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.

En otra realización del rVSV_{NJ} de la presente invención, la proteína modificada M comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10.

En una realización, la presente invención proporciona una vacuna. En una realización, la vacuna de la presente invención comprende una cantidad efectiva de uno o más rVSV atenuados, incluyendo los uno o más rVSV atenuados una proteína matricial modificada (M), comprendiendo la proteína modificada M una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por: (i) SEQ ID NO: 3, que incluye al menos las sustituciones

siguientes: G21E/L111F/M51R, y (ii) SEQ ID NO: 8, que incluye al menos las sustituciones siguientes: G22E/M48R+M51R.

5 En una realización de la vacuna de la presente invención, el rVSV es un virus recombinante de la estomatitis vesicular de serotipo Indiana (rVSV_{Ind}), y la proteína modificada M comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, que incluye al menos la sustitución siguiente: G21E/L111F/M51R.

En otra realización de la vacuna de la presente invención, la proteína modificada M del rVSV_{Ind} comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

En otra realización de la vacuna de la presente invención, la proteína modificada M del rVSV_{Ind} está codificada por un gen que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2.

10 En otra realización de la vacuna de la presente invención, el rVSV_{Ind} es capaz de producir partículas de VSV_{Ind} a temperaturas permisibles e incapaz de producir las partículas a temperaturas no permisibles.

En una realización de la vacuna de la anterior invención, el rVSV es un virus recombinante de la estomatitis vesicular de serotipo Nueva Jersey (rVSV_{NJ}), y la proteína modificada M comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, que incluye al menos las sustituciones siguientes: G22E/M48R+M51R.

15 En una realización de la vacuna de la presente invención, el rVSV es rVSV_{NJ} y la proteína modificada M está codificada por un gen que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6.

En otra realización de la vacuna de la presente invención, el rVSV es rVSV_{NJ} y la proteína modificada M comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.

20 En otra realización de la vacuna de la presente invención, el rVSV es rVSV_{NJ} y la proteína modificada M incluye las sustituciones siguientes: G22E/L110F/M48R+M51R.

En otra realización de la vacuna de la presente invención, el rVSV es rVSV_{NJ} y la proteína modificada M está codificada por un gen que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.

En otra realización de la vacuna de la presente invención, el rVSV es rVSV_{NJ} y la proteína modificada M comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10.

25 En otra realización de la vacuna de la presente invención, el rVSV según cualquiera de las realizaciones anteriores es un rVSV quimérico que expresa una proteína de un patógeno extraño, y el rVSV quimérico es capaz de inducir una respuesta inmunitaria a dicha proteína.

En otra realización de la vacuna de la presente invención, el rVSV comprende una mezcla de rVSV quiméricos atenuados, expresando al menos dos rVSV quiméricos de la mezcla una proteína diferente del patógeno extraño.

30 En otra realización de la vacuna de la presente invención, el patógeno es un patógeno viral, fúngico, bacteriano o parasitario.

En otra realización de la vacuna de la presente invención, el patógeno es un lentivirus.

En otra realización de la vacuna de la presente invención, el lentivirus es un VIH y el epítipo es una proteína de VIH.

En otra realización de la presente invención, el patógeno es un VHC y el epítipo es una proteína de VHC.

35 En una realización de la presente invención, la vacuna de una cualquiera de las realizaciones anteriores es capaz de inducir una respuesta inmunitaria humoral, celular y mucosal.

En otra realización de la presente invención, la vacuna según una cualquiera de las realizaciones anteriores incluye, además, un adyuvante.

40 En una realización, la presente invención proporciona un método de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto. En una realización de la presente invención, el método comprende administrar al sujeto: (a) una cantidad efectiva de una vacuna que comprende un rVSV atenuado de un serotipo que tiene una primera proteína modificada M, comprendiendo la primera proteína M modificada la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, que incluye al menos las sustituciones siguientes: G21E/L111F/M51R; y (b) una cantidad efectiva de otra vacuna que comprende un rVSV atenuado de otro serotipo que tiene una segunda proteína modificada M, comprendiendo la segunda proteína M modificada la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, que incluye al menos las sustituciones siguientes: G22E/M48R+M51R. En un aspecto de la presente invención, la segunda proteína M modificada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, que incluye al menos las sustituciones siguientes: G22E/L110F/M48R+M51R.

50 En una realización del método de la presente invención, (a) es administrada al sujeto antes de que (b) sea administrada al paciente.

En otra realización del método de la presente invención, (b) es administrada al sujeto más de una vez en el curso de la inducción.

En otra realización del método de la presente invención, (a) es administrada al sujeto y (b) es administrada al sujeto en aproximadamente las semanas tres, ocho y dieciséis posteriores a la administración de (a).

- 5 En otra realización del método de la presente invención, (b) es administrada al sujeto antes de que (a) sea administrada al sujeto.

En otra realización del método de la presente invención, (a) es administrada al sujeto más de una vez en el curso de la inducción.

- 10 En otra realización del método de la presente invención, (b) es administrada al sujeto y (a) es administrada al sujeto en aproximadamente las semanas tres, ocho y dieciséis posteriores a la administración de (b).

En otra realización del método de la presente invención, el rVSV de la vacuna (a) y el rVSV de la vacuna (b) son rVSV quiméricos que expresan una proteína de un patógeno extraño, y siendo capaces los dos rVSV de inducir una respuesta inmunitaria a la proteína.

- 15 En otra realización del método de la presente invención, el patógeno es un patógeno viral, fúngico, bacteriano o parasitario.

En otra realización del método de la presente invención, el patógeno es un lentivirus.

En otra realización del método de la presente invención, el lentivirus es un VIH y la proteína es una proteína de VIH.

- 20 En otra realización del método de la presente invención, el rVSV de un serotipo y el rVSV del otro serotipo incluyen un gen de glicoproteína superficial (G) y un gen de ARN polimerasa dependiente de ARN (L), y siendo un gen para la expresión de la proteína de VIH un gen de VIH insertado entre el gen G y el gen L.

En otra realización del método de la presente invención, el gen de VIH se selecciona del grupo de genes de VIH constituido por gag, env y pol.

En otra realización del método de la presente invención, el patógeno es VHC y la proteína es una proteína de VHC.

- 25 En otra realización del método de la presente invención, el rVSV de un serotipo y el rVSV del otro serotipo incluyen un gen de glicoproteína superficial (G) y un gen de ARN polimerasa dependiente de ARN (L), y estando insertado un gen para la expresión de la proteína de VHC entre el gen G y el gen L del rVSV.

En otra realización del método de la presente invención, la vacuna (a) y la vacuna (b) comprenden una mezcla de rVSV quiméricos atenuados, en la que al menos dos de los rVSV quiméricos atenuados de la mezcla expresan una proteína diferente del patógeno.

- 30 En otra realización del método de la presente invención, cada una de las dos vacunas (a) y (b) induce respuestas inmunitarias humorales, celulares y mucosales.

En otra realización del método de la presente invención, el serotipo del rVSV de la vacuna (a) es Indiana y el serotipo del rVSV de la vacuna (b) es Nueva Jersey.

- 35 En otra realización del método de la presente invención, cada una de la vacuna (a) y la vacuna (b) comprende, además, un adyuvante.

En una realización, la presente invención proporciona una vacuna combinada de sensibilización y refuerzo. En una realización, la vacuna combinada de sensibilización y refuerzo comprende: (a) una cantidad efectiva de una vacuna que comprende un rVSV atenuado de un serotipo que tiene una primera proteína modificada M que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4; y (b) una cantidad efectiva de una vacuna que comprende un rVSV de otro serotipo que tiene una segunda proteína modificada M que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9 o la SEQ ID NO:10.

- 40 En una realización de la vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de la presente invención, la vacuna (a) es una vacuna de sensibilización y la vacuna (b) es una vacuna de refuerzo.

- 45 En otra realización de la vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de la presente invención, la vacuna (b) es una vacuna de sensibilización y la vacuna (a) es una vacuna de refuerzo.

En otra realización de la vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de la presente invención, los dos rVSV atenuados son rVSV quiméricos que expresan una proteína de un patógeno extraño, y los dos rVSV quiméricos son capaces de inducir una respuesta inmunitaria a la proteína.

En otra realización de la vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de la presente invención, el patógeno es un patógeno viral, fúngico, bacteriano o parasitario.

En otra realización de la vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de la presente invención, el patógeno es un lentivirus.

- 5 En otra realización de la vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de la presente invención, el lentivirus es un VIH y la proteína es una proteína de VIH.

10 En otra realización de la vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de la presente invención, el rVSV de un serotipo y el rVSV del otro serotipo incluyen un gen de glicoproteína superficial (G) y un gen de ARN polimerasa dependiente de ARN (L), y estando insertado un gen para la expresión de la proteína de VIH entre el gen G y el gen L.

En otra realización de la vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de la presente invención, el gen de VIH se selecciona del grupo de genes de VIH constituido por env, gag y pol.

En otra realización de la vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de la presente invención, el patógeno es VHC y el epítipo es una proteína de VHC.

- 15 En otra realización de la vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de la presente invención, el rVSV de un serotipo y el rVSV del otro serotipo incluyen un gen de glicoproteína superficial (G) y un gen de ARN polimerasa dependiente de ARN (L), y estando insertado un gen para la expresión de la proteína de VHC entre el gen G y el gen L.

20 En otra realización de la vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de la presente invención, la proteína de VHC es una proteína de VHC estructural o no estructural.

En otra realización de la vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de la presente invención, cada una de las dos vacunas comprende una mezcla de rVSV quiméricos atenuados, y al menos dos de los rVSV quiméricos atenuados de la mezcla tienen una proteína diferente del patógeno.

- 25 En otra realización de la vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de la presente invención, cada una de las dos vacunas es capaz de inducir respuestas inmunitarias humorales, celulares y mucosales.

En otra realización de la vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de la presente invención, el serotipo de la vacuna (a) es Indiana y el serotipo de la vacuna (b) es Nueva Jersey.

En otra realización de la vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de la presente invención, cada una de la vacuna (a) y de la vacuna (b) comprende, además, un adyuvante.

- 30 En una realización, la presente invención proporciona un estuche de administración que comprende: (a) al menos una dosis de una cantidad efectiva de una vacuna que comprende un rVSV_{Ind} que tiene una proteína modificada M que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, y (b) al menos una dosis de una cantidad efectiva de una vacuna que comprende rVSV_{NJ} que tiene una proteína modificada M que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9 o la SEQ ID NO:10.

- 35 En una realización del estuche de administración de la presente invención, (a) y (b) son formuladas en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización adicional, la presente invención proporciona un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de aminoácidos enumerada como las SEQ ID NOs: 4, 9 y 10.

- 40 En una realización, la presente invención proporciona secuencias aisladas de nucleótidos para codificar los péptidos aislados de las SEQ ID NOs: 4, 9 y 10.

Breve descripción de las figuras

Ahora se describirán realizaciones, a título de ejemplo únicamente, con referencia a los dibujos, en los cuales:

La FIG. 1 ilustra la organización de genes del virus de la estomatitis vesicular (VSV) de serotipo Indiana (Ind) con mutaciones en el gen M.

- 45 La FIG. 2 ilustra la organización de genes del virus de la estomatitis vesicular (VSV) Nueva Jersey (NJ) con mutaciones en el gen M.

La FIG. 3 ilustra un sistema genético inverso para la recuperación del VSV del ADNc.

La FIG. 4 ilustra el efecto del número de viriones de la mutación L111F en la proteína M del rVSV_{Ind} a temperatura permisiva [paneles A) y C)] y a temperatura semipermisiva [paneles B) y D)], en células renales

de hámster recién nacido (BHK) infectadas con VSV recombinantes [paneles A) y B)] y en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) infectadas con el rVSV.

La FIG. 5 es un gráfico que representa el efecto del número de viriones de las mutaciones M48R+M51R, G22E, G22E/M48R+M51R, G22E/L110F, G22E/L110F/M48R+M51R en la proteína M del rVSV_{NJ} a 31°C y 37°C en células BHK21.

La FIG. 6 A) es un análisis de transferencia de Western que ilustra el nivel de expresión de proteínas del rVSV del rVSV_{Ind} 1. WT, 2. M51R, 3. G21E 4. G21E/M51R 5. G21E/L111F y 6. G21E/L111F/M51R.

La FIG. 6 B) es un análisis de transferencia de Western que ilustra el nivel de expresión de proteínas del rVSV del rVSV_{NJ} 1. WT, 2. M48R+M51R, 3. G22E 4. G22E/M48R+M51R 5. G22E/L110F y 6. G22E/L110F/M48R+M51R.

La FIG. 7 incluye fotografías de células BHK21 infectadas con rVSV_{Ind} que tiene un gen M de forma natural (paneles B e I) y teniendo el rVSV_{Ind} diferentes mutaciones en el gen M (paneles A, D, E, F, G, H, K, L, M y N) y fotografías de células BHK21 no infectadas (paneles C y J). Las células fueron incubadas a 31°C (paneles A a G) o a 37°C (paneles H a N).

La FIG. 8 incluye fotografías de células SH-SY5Y infectadas con rVSV_{Ind} que tiene diferentes mutaciones en el gen M (paneles C, D, E, F, I, J, K y L) o un gen M de la forma natural (paneles A y G) y fotografías de células SH-SY5S no infectadas (paneles B y H). Las células fueron incubadas a 31°C (paneles A a F) o a 37°C (paneles G a L).

La FIG. 9 incluye fotografías de células BHK21 infectadas con rVSV_{NJ} que tiene diferentes mutaciones en el gen M (paneles A, D, E, F, G, H, K, L, M y N) o un gen M de la forma natural (paneles B e I), y fotografías de células BHK21 no infectadas (paneles C y J). Las células fueron incubadas a 31°C (paneles A a G) o a 37°C (paneles H a N).

La FIG. 10 incluye fotografías de células SH-SY5Y infectadas con rVSV_{NJ} que tiene diferentes mutaciones en el gen M (paneles A, D, E, F, G, H, K, L, M y N) o que tiene un gen M de la forma natural (paneles B e I), y fotografías de células SH-SY5Y no infectadas (paneles C y J). Las células fueron incubadas a 31°C (paneles A a G) o a 37°C (paneles H a N).

La FIG. 11 incluye gráficos que ilustran estudios de neurovirulencia en el ratón Swiss-Webster por inyección ventricular intralateral: A) rVSV_{Ind} G21E/L111F/M51R irradiado con UV, B) rVSV_{Ind} WT, C) rVSV_{Ind} M51R y D) rVSV_{Ind} G21E/L111F/M51R.

La FIG. 12 incluye gráficos que ilustran estudios de neurovirulencia en el ratón Swiss-Webster por inyección ventricular intralateral: A) rVSV_{NJ} WT, B) rVSV_{NJ} M48R+M51R, C) rVSV_{NJ} G22E/M48R+M51R y D) rVSV_{NJ} G22E/L110F/M48R+M51R.

La FIG. 13 (SEQ ID NOS: 11 - 15) A) ilustra la clonación de genes de VIH-1 Gag-En en el clon de ADNc del rVSV. La FIG. 13 B) es un análisis de transferencia de Western de células BHK infectadas con rVSV que expresan Gag-En y que tienen diferentes mutaciones en el gen M, e incubadas a 31°C. La FIG. 13 C) es un análisis de transferencia de Western de células BHK infectadas con rVSV que expresan Gag-En y que tienen diferentes mutaciones en el gen M, e incubadas a 37°C.

La FIG. 14 representa un régimen de vacunación y una tabla de grupos de vacunación.

La FIG. 15 representa un gráfico de la frecuencia de linfocitos T CD8+ IFN gamma+ específicos a péptidos entre los diferentes grupos de vacunación ilustrados en el inserto estimulados con dimetilsulfóxido (DMSO).

La FIG. 16 es un gráfico que ilustra la frecuencia de linfocitos T CD8+ IFN gamma+ específicos al péptido N del VSV entre los diferentes grupos de vacunación ilustrados en el inserto estimulados con VSV N.

La FIG. 17 es un gráfico que ilustra la frecuencia de linfocitos T CD8+ IFN gamma+ específicos al péptido VIH-1 Gag entre los diferentes grupos de vacunación ilustrados en el inserto estimulados con VIH-1 Gag.

La FIG. 18 es un gráfico que ilustra las respuestas del anticuerpo específico a VIH-1 Gag entre los diferentes grupos de vacunación ilustrados en el inserto.

La FIG. 19 es un gráfico que ilustra la frecuencia de linfocitos T CD8+ IFN gamma+ específicos al péptido N del VSV entre diferentes grupos de vacunación vacunados con dosis diversas del rVSV de la Tabla 1.

La FIG. 20 es un gráfico que ilustra la frecuencia de linfocitos T CD8+ IFN gamma+ específicos al péptido VIH-1 Gag entre diferentes grupos de vacunación vacunados con dosis diversas del rVSV de la Tabla 1.

La FIG. 21 es un gráfico que ilustra las respuestas del anticuerpo específico a VIH-1 Gag entre diferentes grupos de vacunación vacunados con dosis diversas del rVSV de la Tabla 1.

La FIG. 22 (SEQ ID NOS: 16 - 26) ilustra la clonación del gen VIH-1 *gag* ligado a nucleótidos que codifican epítomos de linfocitos B y linfocitos T humanos de gp120 y gp41 en el clon de ADNc de rVSV_{Ind} G21E/L111F/M51R y rVSV_{NJ} G22E/M48R+M51R.

La FIG. 23 (SEQ ID NOS: 11-15 y 27 -31, respectivamente) ilustra la clonación del gen VIH-1 *gag* ligado a nucleótidos que codifican epítomos de linfocitos B y linfocitos T humanos de gp41, nef, gp120, RT, Tat y Rev en el clon de ADNc de rVSV_{Ind} G21E/L111F/M51R y rVSV_{NJ} G22E/M48R+M51R. También ilustra la clonación de los genes VIH-1 *pol* y *env* en el clon de ADNc de rVSV_{Ind} G21E/L111F/M51R y rVSV_{NJ} G22E/M48R+M51R.

La FIG. 24 ilustra un análisis de transferencia de Western de células BHK21 infectadas con rVSV_{Ind} G21E/L111F/M51R que expresan Gag A, B, C, En y RT e incubadas a 31°C y 37°C.

La FIG. 25 ilustra un análisis de transferencia de Western de células BHK21 infectadas con rVSV_{NJ} G22E/M48R+M51R que expresan Gag A, B, C, En y RT e incubadas a 31°C y 37°C.

La FIG. 26 ilustra un análisis de transferencia de Western de células BHK21 infectadas con rVSV_{Ind} G21E/L111F/M51R o rVSV_{NJ} G22E/M48R+M51R que expresan el gen VIH-1 *pol*.

La FIG. 27 ilustra un análisis de transferencia de Western de células BHK21 infectadas con rVSV_{Ind} G21E/L111F/M51R o rVSV_{NJ} G22E/M48R+M51R que expresan el gen VIH-1 *gp160mss*.

La FIG. 28 incluye gráficos que ilustran respuestas de los linfocitos T CD8+ específicos a péptidos de proteínas de VSV N y VIH-1 entre los diferentes grupos de vacunación de la Tabla 6: G1, G2, G3, G4, G5 y G5 sin Env P18.

La FIG. 29 es un gráfico que ilustra las respuestas de linfocitos T CD8+ específicos a péptidos de proteínas de VSV N y VIH-1 en el grupo de vacunación G6 de la Tabla 6. Se muestran las secuencias de aminoácidos del péptido N del VSV y de los péptidos de las proteínas del VIH-1 que son usadas para estimular los esplenocitos (SEQ ID NOS: 32 - 37).

La FIG. 30 ilustra las respuestas inmunitarias humores contra VIH-1 Gag (panel A) y Gp120 (panel B) inducidas en grupos de vacunación de la Tabla 6, que fueron determinadas mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

La FIG. 31 representa los genes de la proteína estructural del VHC clonados en el rVSV_{Ind}(GLM), el rVSV_{NJ}(GM) y el rVSV_{NJ}(GLM).

La FIG. 32 ilustra análisis de transferencia de Western de la expresión de las proteínas del núcleo (panel A), E1 (panel B), E2 (panel C) y NS4B (panel D) del VHC a partir del rVSV_{Ind}(GLM), rVSV_{NJ}(GM) y el rVSV_{NJ}(GLM).

La FIG. 33 representa los genes de la proteína no estructural del VHC clonados en el rVSV_{Ind}(GLM), el rVSV_{NJ}(GM) y el rVSV_{NJ}(GLM).

La FIG. 34 ilustra análisis de transferencia de Western de la expresión de NS3 a 37°C y 31°C (panel A), NS5A a 37°C (panel B) y NS5B a 37°C y 31°C (panel C), del VHC, a partir del rVSV_{Ind}(GLM).

La FIG. 35 demuestra la expresión de NS3, NS4B, NS5A y NS5B, del VHC, a partir de rVSV_{NJ}(GM) a 37°C (panel A) y la expresión de NS5AB del VHC a 37°C (panel B). La expresión de las proteínas fue detectada mediante análisis de transferencia de Western.

Descripción detallada de la invención

Visión general

A no ser que se defina algo distinto, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente entendido por una persona con un dominio normal de la técnica a la que pertenece la presente invención. Además, a no ser que se indique algo distinto, salvo en las reivindicaciones, el uso de "o" incluye "y" y viceversa. No debe interpretarse que los términos no limitantes sean limitantes, a no ser que ello se afirme expresamente o el contexto indique con claridad algo distinto (por ejemplo, "incluir", "tener" y "comprender" normalmente indican "incluir sin limitación"). Las formas singulares tales como "un", "una" y "el" y "la" incluyen la referencia plural, a no ser que expresamente se afirme algo distinto, incluyendo en las reivindicaciones. "Consistir esencialmente en" significa que cualquier elemento enumerado está necesariamente incluido, que los elementos que afectarían materialmente a las características básicas y novedosas de los elementos enumerados están excluidos, y que otros elementos pueden estar incluidos opcionalmente. "Consistir en" significa que se excluyen todos los

elementos distintos de los enumerados. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos están dentro del alcance de la presente invención.

Todas las designaciones numéricas —por ejemplo, dimensiones y peso—, incluyendo intervalos, son aproximadamente que normalmente pueden variar (+) o (-) en incrementos de 0,1, 1,0, o 10,0, según resulte apropiado. Se puede entender que todas las designaciones numéricas están precedidas por el término “aproximadamente”.

El término “administrar” incluye cualquier método de administración de un compuesto de la presente invención, incluyendo una composición farmacéutica, una vacuna o un agente terapéutico, en el organismo de un sujeto o en una región particular en o sobre un sujeto. Las frases “administración sistémica”, “administrado sistémicamente”, “administración periférica” y “administrado periféricamente” usadas en la presente memoria significa la administración de un compuesto, un fármaco u otro material de una forma que no es la directa al sistema nervioso central, de modo que entre en el organismo del paciente y, así, sea sometido al metabolismo y a otros procesos similares; por ejemplo, la administración subcutánea. “Administración parenteral” y “administrado parenteralmente” significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, la inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal y la perfusión.

El término “aminoácido” es conocido en la técnica. En general, las abreviaturas usadas en la presente memoria para designar a los aminoácidos y a los grupos protectores se basan en las recomendaciones del Comité IUPAC-IUB sobre nomenclatura bioquímica (véase Biochemistry (1972) 11:1726-1732). Para los aminoácidos relevantes a la presente invención, las designaciones son: M: metionina, R: arginina, G: glicina, E: ácido glutámico, L: leucina, F: fenilalanina. En ciertas realizaciones, los aminoácidos usados en la aplicación de la presente invención son los aminoácidos que se presentan de forma natural encontrados en las proteínas, o los productos anabólicos o catabólicos que se presentan de forma natural de tales aminoácidos que contienen grupos amino y carboxilo. Cadenas laterales de aminoácidos particularmente adecuadas incluyen las cadenas laterales seleccionadas de las de los siguientes aminoácidos: glicina, alanina, valina, cisteína, leucina, isoleucina, serina, treonina, metionina, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, asparagina, lisina, arginina, prolina, histidina, fenilalanina, tirosina y triptófano.

Se pretende que el término “anticuerpo” usado en la presente memoria incluya anticuerpos enteros —por ejemplo, de cualquier isotipo (IgG, IgA, IgM, IgE, etc.), incluyendo los anticuerpos policlonales, monoclonales, recombinantes y humanizados— y fragmentos de los mismos que reconozcan específicamente y sean capaces de unirse a un epítipo de una proteína. Los anticuerpos pueden ser fragmentados usando técnicas convencionales, y los fragmentos ser seleccionados de la misma manera según su utilidad. Así, el término incluye segmentos de porciones escindidas proteolíticamente o preparadas recombinantemente de una molécula de anticuerpo que son capaces de reaccionar selectivamente con cierta proteína. Ejemplos no limitantes de tales fragmentos proteolíticos y/o recombinantes incluyen Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, y anticuerpos monocatenarios (scFv) que contienen un dominio V[L] y/o V[H] unido por un conector de péptidos. Los scFv pueden ligarse de forma covalente o no covalente para formar anticuerpos que tienen dos o más sitios de unión.

Según se usa en la presente memoria, el término “epítipos” se refiere a sitios o fragmento de un polipéptido o proteína que tienen una actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferentemente en un mamífero. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es un sitio o fragmento de un polipéptido o proteína que provoca una respuesta inmunitaria en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es un sitio o fragmento de un polipéptido o proteína al que se une inmuno-específicamente un anticuerpo según se determina por cualquier método muy conocido para un experto en la técnica; por ejemplo, mediante inmunoensayos.

Según se usa en la presente memoria, el término “fragmento”, en el contexto de un agente proteínico, se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 2 residuos contiguos de aminoácidos, al menos 5 residuos contiguos de aminoácidos, al menos 10 residuos contiguos de aminoácidos, al menos 15 residuos contiguos de aminoácidos, al menos 20 residuos contiguos de aminoácidos, al menos 25 residuos contiguos de aminoácidos, al menos 40 residuos contiguos de aminoácidos, al menos 50 residuos contiguos de aminoácidos, al menos 60 residuos contiguos de aminoácidos, al menos 70 residuos contiguos de aminoácidos, al menos 80 residuos contiguos de aminoácidos, al menos 90 residuos contiguos de aminoácidos, al menos 100 residuos contiguos de aminoácidos, al menos 125 residuos contiguos de aminoácidos, al menos 150 residuos contiguos de aminoácidos, al menos 175 residuos contiguos de aminoácidos, al menos 200 residuos contiguos de aminoácidos, o al menos 250 residuos contiguos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de un péptido, polipéptido o proteína. En una realización, un fragmento de una proteína de longitud máxima retiene la actividad de la proteína de longitud máxima; por ejemplo, la actividad inmunogénica. En otra realización, el fragmento de la proteína de longitud máxima no retiene la actividad de la proteína de longitud máxima; por ejemplo, la actividad no inmunogénica.

Según se usa en la presente memoria, el término “fragmento”, en el contexto de un ácido nucleico se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos al menos 2 nucleótidos contiguos, al menos 5 nucleótidos contiguos, al menos 10 nucleótidos contiguos, al menos 15 nucleótidos contiguos, al menos 20

nucleótidos contiguos, al menos 25 nucleótidos contiguos, al menos 30 nucleótidos contiguos, al menos 35 nucleótidos contiguos, al menos 40 nucleótidos contiguos, al menos 50 nucleótidos contiguos, al menos 60 nucleótidos contiguos, al menos 70 nucleótidos contiguos, al menos 80 nucleótidos contiguos, al menos 90 nucleótidos contiguos, al menos 100 nucleótidos contiguos, al menos 125 nucleótidos contiguos, al menos 150 nucleótidos contiguos, al menos 175 nucleótidos contiguos, al menos 200 nucleótidos contiguos, al menos 250 nucleótidos contiguos, al menos 300 nucleótidos contiguos, al menos 350 nucleótidos contiguos, o al menos 380 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido, polipéptido o proteína. En una realización preferente, un fragmento de un ácido nucleico codifica un péptido o polipéptido que retiene la actividad de la proteína de longitud máxima; por ejemplo, la actividad inmunogénica. En otra realización, los fragmentos de la proteína de longitud máxima no retienen la actividad de la proteína de longitud máxima; por ejemplo, la actividad no inmunogénica.

La expresión “esencialmente no citolítico” usado en la presente memoria significa que el virus recombinante de la estomatitis vesicular (rVSV) no daña significativamente ni mata las células que infecta.

Un experto en la técnica sabe que el término “VIH” se refiere al virus de la inmunodeficiencia humana. Hay dos tipos de VIH: el VIH-1 y el VIH-2. Hay muchas cepas diferentes del VIH-1. Las cepas del VIH-1 pueden ser clasificadas en tres grupos: el grupo “principal” M, el grupo “atípico” O y el grupo “nuevo” N. Estos tres grupos pueden representar tres introducciones separadas del virus de inmunodeficiencia simiesca en seres humanos. En el grupo M hay al menos diez subtipos o clados; por ejemplo, los clados A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y K. Un “clado” es un grupo de organismos, tal como una especie, cuyos miembros comparten características homólogas derivadas de un ancestro común. Cualquier referencia al VHC-1 en esta solicitud incluye todas estas cepas.

El término “no infeccioso” significa de capacidad reducida o inexistente de infectar.

Según se usan en la presente memoria, los términos “sujeto” o “paciente” se utilizan de manera intercambiable. Según se usan en la presente memoria, los términos “sujeto” y “sujetos” se refieren bien a un ser humano o bien a un animal no humano.

La expresión “dispositivo de administración farmacéutica” se refiere a cualquier dispositivo que pueda ser usado para administrar un agente terapéutico o agentes a un sujeto. Ejemplos no limitantes de dispositivos de administración farmacéutica incluyen jeringas hipodérmicas, jeringas multicámara, *stents*, catéteres, parches transcutáneos, microagujas, microabrasímetros y dispositivos implantables de liberación controlada. En una realización, la expresión “dispositivo de administración farmacéutica” se refiere a una jeringa de doble cámara capaz de mezclar dos compuestos antes de la inyección.

La frase “farmacéuticamente aceptable” es empleada en la presente memoria para referirse a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas posológicas que, según el alcance del criterio médico fundado, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una proporción razonable de beneficio/riesgo.

La frase “vehículo farmacéuticamente aceptable” usada en la presente memoria significa un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptables, tales como un material de carga líquido o sólido, un diluyente, un excipiente o un disolvente que encapsule material, implicado en portar o transportar el compuesto objeto de un órgano o porción del cuerpo a otro órgano o porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser “aceptable”, en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no dañino para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como fécula de maíz y fécula de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semillas de algodón, aceite de cártamo, aceite de ajonjolí, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como el propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato etílico y laurato etílico; (13) agar; (14) agentes tampón, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) suero fisiológico isotónico; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tampón de pH; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” son usados de manera intercambiable para referirse a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya se trate de desoxirribonucleótidos o de ribonucleótidos, o de análogos de los mismos. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: regiones codificantes o no codificantes de un gen o de un fragmento de gen, *loci* (*locus*) definidos a partir del análisis de ligamiento, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr), ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos nucleótidos. Si están presentes, las modificaciones a la estructura del nucleótido pueden impartirse antes o después del ensamblaje del polímero. La

secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede ser modificado, además, después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de marcado. El término polinucleótido "recombinante" significa un polinucleótido de origen genómico, de ADNc, semisintético o sintético que bien no se da en la naturaleza o bien está ligado a otro polinucleótido en una disposición no natural. Un "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido monocatenario que tiene menos de aproximadamente 100 nucleótidos, menos que aproximadamente, por ejemplo, 75, 50, 25 o 10 nucleótidos.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" (siendo monocatenarios) son usados de forma intercambiable en la presente memoria para referirse a polímeros de aminoácidos. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede ser interrumpido por ácidos no amínicos. Los términos también abarcan un polímero aminoácido que ha sido modificado; por ejemplo, disulfuro, formación de enlaces, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación, tal como la conjugación con un componente de marcado.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de la invención pueden ser sintetizados químicamente, ribosómicamente en un *sistema in vitro* o ribosómicamente en una célula. La síntesis química de polipéptidos de la invención se puede llevar a cabo usando diversos métodos reconocidos en la técnica, incluyendo la síntesis escalonada en fase sólida, la semisíntesis a través de la religadura asistida conformacionalmente de fragmentos de péptidos, de la ligadura enzimática de segmentos de péptidos clonados o sintéticos y de la ligadura química. La ligadura química nativa emplea una reacción quimioselectiva de dos segmentos peptídicos no protegidos para producir un intermedio transitorio ligado por tioésteres. El intermedio transitorio ligado por tioésteres experimenta entonces espontáneamente una reorganización, proporcionando el producto de ligadura de longitud máxima que tiene un enlace peptídico nativo en el sitio de la ligadura. Los productos de ligadura de longitud máxima son químicamente idénticos a las proteínas producidas por síntesis *in vitro*. Los productos de ligadura de longitud máxima pueden ser renaturalizados y/u oxidados, en la medida de lo posible, para formar moléculas proteínicas nativas que contienen disulfuro (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n^{os} 6.184.344 y 6.174.530; y T. W. Muir et al., Curr. Opin. Biotech. (1993): vol. 4, p 420; M. Miller, et al., Science (1989): vol. 246, p 1149; A. Wlodawer, et al., Science (1989): vol. 245, p 616; L. H. Huang, et al., Biochemistry (1991): vol. 30, p 7402; M. Schnolzer, et al., Int. J. Pept. Prot. Res. (1992): vol. 40, p 180-193; K. Rajarathnam, et al., Science (1994): vol. 264, p 90; R. E. Offord, "Chemical Approaches to Protein Engineering", en Protein Design and the Development of New therapeutics and Vaccines, J. B. Hook, G. Poste, Eds., (Plenum Press, Nueva York, 1990) pp. 253-282; C. J. A. Wallace, et al., J. Biol. Chem. (1992): vol. 267, p 3852; L. Abrahmsen, et al., Biochemistry (1991): vol. 30, p 4151; T. K. Chang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91: 12544-12548; M. Schnolzer, et al., Science (1992): vol. 3256, p 221; y K. Akaji, et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokio) (1985) 33: 184).

"VSV" se usa para referirse al virus de la estomatitis vesicular.

"rVSV" se usa para referirse un virus recombinante de estomatitis vesicular.

El término "Indiana" e "IND" se usan para referirse al VSV de serotipo Indiana (VSV_{Ind}).

El término "Nueva Jersey" y "NJ" se usan para referirse al VSV de serotipo Nueva Jersey (VSV_{NJ}).

"MWT" y "M(WT)" se usan para referirse una proteína M de la forma natural. La secuencia de nucleótidos del gen M de la forma natural del VSV_{Ind} puede comprender la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de la proteína M de la forma natural del VSV_{Ind} puede comprender la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3. La secuencia de nucleótidos del gen M de la forma natural del VSV_{NJ} puede comprender la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 5. La secuencia de aminoácidos de la proteína M de la forma natural del VSV_{NJ} puede comprender la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8. "M51R" se usa para referirse a una M(WT) del VSV_{Ind} que tenga un cambio de metionina a arginina en la posición 51. "G21E" se usa para referirse a una M(WT) del VSV_{Ind} que tenga un cambio de glicina a ácido glutámico en la posición 21. "L111F" se usa para referirse a una M(WT) del VSV_{Ind} que tiene un cambio de leucina a fenilalanina en la posición 111. "G22E" se usa para referirse a una M(WT) del VSV_{NJ} que tiene un cambio de glicina (G) a ácido glutámico (E) en la posición 22. "L110F" se usa para referirse a una M(WT) del VSV_{NJ} que tiene un cambio de leucina (L) a fenilalanina (F) en la posición 110. "M48R+M51R" se usa para referirse a una M(WT) del VSV_{NJ} que tiene un cambio de metionina (M) a arginina (R) en las posiciones 48 y 51. "rVSV_{Ind} M(G21E/L111F/M51R)" o "rVSV_{Ind} (GLM)" se usa para referirse a un rVSV_{Ind} que tiene una M(WT) que tiene un cambio de glicina a ácido glutámico en la posición 21, un cambio de leucina a fenilalanina en la posición 111 y un cambio de metionina a arginina en la posición 51. "rVSV_{NJ} M(G22E/M48R+M51R)" o "rVSV_{NJ} (GM)" se usa para referirse a un rVSV_{NJ} que tiene una M(WT) que tiene un cambio de glicina a ácido glutámico en la posición 22 y un cambio de metionina a arginina en las posiciones 48 y 51, y "rVSV_{NJ} M(G22E/L110F/M48R+M51R)" o "rVSV_{NJ} (GLM)" se usa para referirse a un rVSV_{NJ} que tiene una M(WT) que tiene un cambio de glicina a ácido glutámico en la posición 22, a un cambio de leucina a fenilalanina en la posición 110 y un cambio de metionina a arginina en las posiciones 48 y 51.

Visión general

Los inventores generaron proteínas M novedosas y rVSV atenuados novedosos capaces de producir las proteínas M novedosas. Las proteínas novedosas de la presente invención pueden incluir: M(G21E/L111F/M51R), M(G22E/M48R+M51R) y M(G22E/L110F/M48R+M51R). Los rVSV atenuados novedosos de la presente invención pueden ser usados como expresión de proteínas y vectores de vacunas en métodos para la prevención o el tratamiento de infecciones. El rVSV de la presente invención puede ser aplicado para crear vacunas para enfermedades infecciosas de seres humanos y otros animales para inducir respuestas inmunitarias celulares y humorales.

Proteínas aisladas y proteínas M

En una realización, la presente invención versa sobre proteínas aisladas y sobre secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas aisladas. Como tal, en una realización la presente invención versa sobre un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos enumeradas como las SEQ ID NOs: 4, 9 y 10. En otra realización, la presente invención versa sobre secuencias aisladas de nucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada de los polinucleótidos enumerados como las SEQ ID NOs: 2, 6 y 7.

En una realización, la presente invención versa sobre proteínas M novedosas del VSV que tienen al menos una de las sustituciones siguientes: M(G21E/L111F/M51R), M(G22E/M48R+M51R) y M(G22E/L110F/M48R+M51R). En un aspecto, la presente invención versa sobre una proteína M del VSV que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos enumeradas como las SEQ ID NOs: 4, 9 y 10. En otra realización, la presente invención versa sobre secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas M novedosas del VSV de la presente invención. Las secuencias de nucleótidos pueden ser seleccionadas del grupo de secuencias enumeradas como las SEQ ID NOs: 2, 6 y 7.

Métodos de prevención o tratamiento de una infección

Se proporcionan métodos de inducción de una respuesta inmunitaria, de prevención o de tratamiento de infecciones.

En una realización, los métodos pueden incluir administrar a un sujeto: (a) una cantidad efectiva de una vacuna que comprende un rVSV atenuado de un serotipo que tiene (i) una primera proteína M modificada, comprendiendo la primera proteína M modificada la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, que incluye al menos las sustituciones siguientes: G21E/L111F/M51R, y (ii) un epítipo del patógeno; y (b) una cantidad efectiva de otra vacuna que comprende un rVSV atenuado de otro serotipo que tiene: (i) una segunda proteína M modificada, comprendiendo la segunda proteína M modificada la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, que incluye al menos las sustituciones siguientes: G22E/M48R+M51R, y (ii) el epítipo del patógeno. En realizaciones de la presente invención, los métodos pueden incluir administrar a un sujeto (a) una cantidad efectiva de rVSV_{Ind} M(G21E/L111F/M51R), y (b) una cantidad efectiva bien de un rVSV_{NJ} M(G22E/M48R+M51R) o bien de un rVSV_{NJ}M(G22E/L110F/M48R+M51R) en una modalidad de vacunación de sensibilización y refuerzo.

El término "cantidad efectiva" usado en la presente memoria significa una cantidad efectiva y a dosis y durante periodos de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado.

En ciertas realizaciones, (a) es administrada al sujeto antes de que (b) sea administrada al sujeto.

En ciertas realizaciones, (b) es administrada al sujeto más de una vez en el curso del tratamiento o la prevención.

En ciertas realizaciones, (a) es administrada al sujeto necesitado de la misma y (b) es administrada al sujeto necesitado de la misma en aproximadamente las semanas tres, ocho y dieciséis posteriores a la administración de (a).

En ciertas realizaciones, (b) es administrada al sujeto antes de que (a) sea administrada al sujeto.

En ciertas realizaciones, (a) es administrada al sujeto más de una vez en el curso del tratamiento o la prevención.

En ciertas realizaciones, (b) es administrada al sujeto necesitado de la misma y (a) es administrada al sujeto necesitado de la misma en aproximadamente las semanas tres, ocho y dieciséis posteriores a la administración de (b).

Virus recombinante

En ciertas realizaciones, la presente invención versa sobre un virus recombinante de la estomatitis vesicular (rVSV) que puede ser un VSV de longitud máxima, esencialmente no citolítico, avirulento, capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, capaz de reproducir partículas virales con titulación elevada a temperaturas permisivas, de reproducir partículas virales con titulación baja a temperaturas semipermisivas y que puede ser incapaz de producir virus a temperaturas no permisivas, y que puede expresar un epítipo de un patógeno extraño. El rVSV de la presente invención puede ser capaz de inducir respuestas inmunitarias humorales, celulares y mucosales.

En una realización, la presente invención versa sobre el rVSV_{Ind} y el rVSV_{NJ}. El rVSV_{Ind} puede ser un rVSV_{Ind} M(G21E/L111F/M51R) de longitud máxima esencialmente no citolítico capaz de producir partículas virales a una temperatura permisible de aproximadamente 31°C, y que puede ser incapaz o deficientemente capaz de producir partículas virales a temperaturas semipermisivas de aproximadamente 37°C e incapaz de producir partículas virales a temperaturas no permisivas por encima de 37°C; por ejemplo, 39°C. En ciertas realizaciones, el rVSV_{Ind} puede incluir una M(G21E/L111F/M51R). En ciertas realizaciones, el rVSV_{Ind} puede incluir un gen M que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2.

En ciertas realizaciones, el rVSV es un rVSV_{NJ} M (G22E/M48R+M51R) o un M(G22/L110F/M48R+M51R) de longitud máxima esencialmente no citolítico. En ciertas realizaciones, el rVSV es un rVSV_{NJ} esencialmente no citolítico que incluye un gen M, seleccionándose la secuencia de nucleótidos del gen M de la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7.

Los rVSV de la presente invención pueden prepararse usando técnicas conocidas en la técnica. En una realización, los rVSV pueden ser introducidos en una célula anfitriona en condiciones adecuadas para la duplicación y la expresión del rVSV en el anfitrión. En consecuencia, la presente invención también proporciona una célula que tiene un rVSV_{Ind} en el que la secuencia de aminoácidos de la proteína M del virus está modificada para proporcionar una secuencia esencialmente no citotóxica que también permite que el rVSV_{Ind} se duplique de manera efectiva a una temperatura permisible, pero pueda no duplicarse a una temperatura no permisible.

Como tal, la presente invención también versa sobre una célula que tiene uno o más de los VSV recombinantes de la presente invención.

Vacunas o composiciones inmunogénicas de la invención

La presente invención también presenta vacunas o composiciones inmunogénicas que comprende uno o más de los rVSV de la presente invención. En una realización, la presente invención presenta vacunas o composiciones inmunogénicas que comprenden un rVSV_{Ind} y vacunas o composiciones inmunogénicas que comprenden un rVSV_{NJ}, según se ha descrito anteriormente.

En una realización, las vacunas pueden incluir rVSV que expresan un epítipo de un patógeno. En otra realización, las vacunas pueden incluir o mezcla o cóctel de rVSV que expresan diferentes epítipos de un patógeno (véase la Tabla 6, grupos de vacunación 5 y 6).

Las vacunas o composiciones inmunogénicas de la invención son adecuadas para su administración a sujetos en una forma biológicamente compatible *in vivo*. La expresión "forma biológicamente compatible adecuada para su administración *in vivo*" usada en la presente memoria significa una forma de la sustancia que ha de ser administrada en la que cualquier efecto tóxico está compensado por los efectos terapéuticos. Las sustancias pueden ser administradas a cualquier animal o sujeto, preferentemente seres humanos. Las vacunas de la presente invención pueden proporcionarse como un preparado liofilizado. Las vacunas de la presente invención también se pueden proporcionar como una solución que puede ser congelada para su transporte. Además, las vacunas pueden contener conservantes adecuados, tales como glicerol, o puede ser formuladas sin conservantes. Si es apropiado (es decir, si ello no daña el VSV en la vacuna), las vacunas también pueden contener diluyentes, adyuvantes y/o vehículos adecuados.

La dosis de la vacuna puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. La posología puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. La dosis de la vacuna también puede variar dependiendo de las circunstancias para proporcionar una respuesta de dosis preventiva.

Estuches de administración

La presente invención proporciona estuches de administración —por ejemplo, para prevenir o tratar una infección—. Por ejemplo, un estuche de administración puede comprender una o más composiciones farmacéuticas o vacunas según se ha descrito anteriormente y, opcionalmente, instrucciones para su uso. En otras realizaciones adicionales, la invención proporciona estuches de administración que comprenden una o más composiciones farmacéuticas o vacunas y uno o más dispositivos para lograr la administración de tales composiciones.

Los componentes del estuche de administración pueden ser envasados para la puesta en práctica ya sea manual o parcial o totalmente automatizada de los anteriores métodos. En otras realizaciones que implican estuches de administración, esta invención contempla un estuche de administración que incluye composiciones de la presente invención y, opcionalmente, instrucciones para su uso. Tales estuches de administración pueden tener diversos usos, incluyendo, por ejemplo, la formación de imágenes, la diagnosis la terapia y otras aplicaciones.

Ventajas y características únicas de los rVSV de la presente invención

Características novedosas e inusuales de la invención:

El ensamblaje y la liberación normales del rVSV_{Ind} M(G21E/L111F/M51) a temperatura permisiva (aproximadamente 31°C) hicieron posible amplificar los nuevos rVSV mutantes a la temperatura permisiva con una titulación elevada para crear la masa viral. El defecto de ensamblaje del rVSV_{Ind} M(G21E/L111F/M51) a una temperatura no permisiva (aproximadamente 37°C (aproximadamente la temperatura corporal)) aumentó la seguridad del uso del rVSV en seres humanos y otros animales al reducir significativamente el número de virus infecciosos de esa progenie a la temperatura no permisiva. La adición de estas mutaciones a la mutación M51R preexistente en la proteína M del rVSV_{Ind} atenuó adicionalmente la virulencia del VSV_{Ind}.

Las tres mutaciones M(G22E/M48R+M51R) o cuatro mutaciones M(G22E/L110F/M48R+M51R) en la proteína M del rVSV_{NJ} no hicieron al virus sensible a la temperatura para el ensamblaje del virus. Sin embargo, la adición de la mutación G22E o G22E/L110F a las mutaciones M48R+51R hicieron al VSV_{NJ} más atenuado y se volvió significativamente menos patógeno.

La anterior divulgación describe la presente invención en general. Puede lograrse una comprensión más completa con referencia a los siguientes Ejemplos específicos. Estos Ejemplos se describen únicamente con fines de ilustración y no se pretende que limite el alcance de la invención. Se contemplan cambios en forma y sustitución de equivalentes según puedan sugerir o hacer oportuno las circunstancias. Aunque en la presente memoria se han empleado términos específicos, tales términos están pensados en un sentido descriptivo y no con fines de limitación.

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente con los siguientes ejemplos, que no deberían ser interpretados como limitantes en modo alguno.

Ejemplo 1: Introducción de mutaciones en los genes M del rVSV_{Ind} y el rVSV_{NJ} y recuperación del VSV recombinante por genética inversa

Se introdujeron mutaciones en el gen M del VSV_{Ind} (FIG. 1) y del VSV_{NJ} (FIG. 2). Las secuencias de nucleótidos que codificaban los aminoácidos en cada posición fueron mutadas por medio del método de la PCR en megacebador. Cada mutación es expresada como una sustitución de un aminoácido en una posición específica (por ejemplo, M51 en M51R) con otro aminoácido (por ejemplo, R en M51R). Para atenuar adicionalmente la virulencia del VSV, los inventores combinaron mutaciones (G21E y L11F) en el tsO23 con mutaciones de metionina a arginina (M51R) en el gen M, lo que redujo la actividad inhibitoria de la proteína M en la síntesis celular de la proteína y, además, redujo el ensamblaje de las partículas del VSV a temperaturas no permisivas (39°C) y semipermisivas (37°C). Las Tablas 2, 3, 4 y 5 muestran los cambios en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la forma natural a las mutantes en los genes M del rVSV_{Ind} y el rVSV_{NJ}. Los codones de los nucleótidos cambiados están subrayados, y las secuencias de nucleótidos cambiados y las secuencias de aminoácidos están en negrita.

Se recuperaron virus recombinantes de estomatitis vesiculares (rVSV) de forma natural y mutante a partir de plásmidos de ADNc por genética inversa (FIG. 3). La genética inversa del VSV emplea las células BHK21, que expresan la ARN polimerasa dependiente de ADN del bacteriófago T7 (T7), y un plásmido que codifica el ARN genómico de longitud máxima del VSV (pVSV) y 3 plásmidos que expresan la proteína nucleocápside (pN), la fosfoproteína (pP), y la proteína L (pL) de la polimerasa del VSV. La transcripción del ARN genómico de longitud máximo y de los ARN mensajeros para las proteínas N, P y L está bajo el control de la ARN polimerasa del T7. El sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) corriente arriba de cada gen N, P y L del VSV mejora la traducción de proteínas. Los plásmidos son transfectados a las células BHK-T7 con Lipofectamine™ 2000 en concentraciones de 10 µg de pN, 10 µg de pP, 5 µg de pL y 15 µg de pVSV. Los medios de cultivo de las células transfectadas fueron recolectados cuando las células presentaron un CPE de aproximadamente el 50-70%.

Ejemplo 2: La mutación L111F en el gen M reduce significativamente el número de viriones del rVSV_{Ind} a temperatura semipermisiva, 37°C

Los virus recuperados fueron purificados 3 veces por selección de placa y fueron amplificados para un volumen mayor de masa viral infectando células BHK21 con una MDI de 0,1 a 31°C. Los inventores infectaron células BHK21 y células de neuroblastoma humano, SH-SY5Y, con una MDI de 3 de los rVSV. Las células infectadas fueron incubadas a temperatura permisiva (31°C) y temperatura semipermisiva (37°C, temperatura corporal) para determinar la sensibilidad a la temperatura de las nuevas M mutantes en el ensamblaje de partículas virales. Los medios de cultivo de las células infectadas fueron recogidos cada 2 horas hasta 10 horas después de la infección, y el número de partículas virales infecciosas en los medios de cultivo se determinó mediante ensayos en placa con células Vero E6. Las células infectadas con los virus mutantes para el ensayo en placa fueron incubadas a 31°C. La forma natural y todos los mutantes se duplicaron igualmente bien y produjeron un título similar de virus infecciones en todo el periodo de 10 horas de infección (FIG. 4A y C). Sin embargo, los mutantes del rVSV_{Ind}, rVSV_{Ind}-G21E/L111F y del rVSV_{Ind}-G21E/L111F/M51R se duplicaron con un título significativamente menor que la forma natural o el mutante M51R de rVSV_{Ind} a 37°C. Las diferencias en la producción de partículas infecciosas entre la forma natural y la nueva M mutante, rVSV_{Ind}-G21E/L111F/M51R, fueron de hasta cuatro magnitudes logarítmicas (FIG. 4B y D). Las barras de error de la FIG. 4 representan el error estándar de la media. En la FIG. 4B se muestran los valores P para los títulos virales del rVSV_{Ind}-G21E/L111F/M51R a las 4 horas, 6 horas, 8 horas y 10 horas

postinfección obtenidos comparándolos con los títulos del rVSV_{Ind}-WT son $p < 0,0001$, $p = 0,0055$, $p = 0,0040$ y $p = 0,0015$. En la FIG. 4B se muestran los valores P para los títulos virales del rVSV_{Ind}-G21E/L111F a las 4 horas, 6 horas, 8 horas y 10 horas postinfección obtenidos comparándolos con los títulos del rVSV_{Ind}-WT son $p < 0,0001$, $p = 0,0055$, $p = 0,0041$ y $p = 0,0016$. Los valores P de la FIG. 4D fueron valores $P < 0,005$. Los valores P fueron calculados usando pruebas t de Student bilaterales independientes.

Ejemplo 3: Mutaciones en el gen M del rVSV_{NJ} G22E y L110F no reducen el número de viriones del rVSV_{NJ} a 37°C

Se infectaron células BHK21 con una MDI de 3 de la forma natural y los mutantes del gen M del rVSV_{NJ}, incubadas tanto a 37°C (temperatura semipermisiva) como a 31°C (temperatura permisiva) y el medio de cultivo fue recolectado 10 horas postinfección. El título viral de cada virus del medio de cultivo fue determinado mediante ensayo en placa usando células Vero E6. En la tabla se muestra el título viral medio de las muestras duplicadas. La forma natural y todos los M mutantes del rVSV_{NJ} se duplicaron igualmente bien a ambas temperaturas de 31°C y 37°C (FIG. 5), indicando que la introducción de las mutaciones G22E y L110F en el gen M de rVSV_{NJ} no afectó al ensamblaje y la liberación del virus a 37°C. Las barras de error de la FIG. 5 representan el error estándar de la media.

Ejemplo 4: El defecto de ensamblaje a temperatura semipermisiva por la mutación L111F en el gen M del rVSV_{Ind} no afecta a la expresión de proteínas del VSV

Se infectaron células BHK21 con una MDI de 6 de la forma natural y los mutantes del gen M del rVSV_{Ind} y del rVSV_{NJ}. Las células infectadas fueron incubadas tanto a 37°C como a 31°C durante 6 horas. Las células infectadas fueron lisadas 6 horas postinfección; se cargaron 5 µg de la proteína total en el gel de SDS-PAGE, y las proteínas del rVSV fueron detectadas mediante análisis de transferencia de Western usando antisuero de conejo contra el VSV_{Ind} y el VSV_{NJ} (disolución de 1:5000). El resultado demuestra que, a pesar de las mutaciones que redujeron el número de viriones del rVSV_{Ind} a 37°C (L111F en G21E/L111F y G21E/L111F/M51R), el nivel de expresión de proteínas del VSV es comparable al del rVSV_{Ind} de la forma natural (FIG. 6A). La forma natural y todos los mutantes de M del rVSV_{NJ} expresaron sus proteínas a un nivel similar tanto a 31°C como a 37°C (FIG. 6B).

Ejemplo 5: Las mutaciones combinadas G21E/L111F/M51R en el gen M del rVSV_{Ind} redujeron significativamente la citopatogenicidad en células BHK21 y células de neuroblastoma humano, SH-SY5Y

Para examinar los efectos de las mutaciones L111F y M51R del gen M del rVSV_{Ind} en la citopatogenicidad, los inventores infectaron células BHK21 (FIG. 7) y células de neuroblastoma humano (FIG. 8) con una MDI de 0,1 del rVSV_{Ind}. Los efectos citopáticos típicos del VSV son la agrupación de las células infectadas y la lisis celular. 20 horas después de la infección, el efecto citopático causado por el rVSV_{Ind}-G21E/L111F/M51R fue comparado con los del otro rVSV_{Ind}. A las 20 horas de la infección con el rVSV_{Ind}-G21E/L111F/M51R mutante se presentaron los efectos citopáticos más reducidos, ninguna célula o un número pequeño de células agrupadas a 37°C, y la combinación de las mutaciones L111F y M51R (FIG. 7N y FIG. 8L) atenuó la citopatogenicidad del virus más que la mutación única de cada una en las células tanto BHK21 como SH-SY5Y.

Ejemplo 6: Efectos citopáticos reducidos en la célula BHK21 por parte del rVSV_{NJ} con las mutaciones del gen M G22E/M48R+M51R y G22E/L110F/M48R+M51R

Para examinar los efectos de las mutaciones G22E, L110F y M48R+M51R del gen M del rVSV_{NJ} en la citopatogenicidad, los inventores infectaron células BHK21 y células de neuroblastoma humano con una MDI de 0,1 del rVSV_{NJ}. 20 horas después de la infección, los inventores compararon los efectos citopáticos (agrupación y lisis de las células) causados por la forma natural y otros mutantes de M del rVSV_{NJ}. A las 20 horas de la infección con el mutante G22E/M48R+M51R y el mutante G22E/L110F/M48R+M51R se presentaron los efectos citopáticos más reducidos a 37°C, y la combinación de las mutaciones G22E y M48R+M51R atenuó adicionalmente la citopatogenicidad del rVSV_{NJ} en las células tanto BHK21 (FIG. 9L y 9N) como SH-SY5Y (FIG. 10L y 10N).

Ejemplo 7: El rVSV_{Ind} con las mutaciones G21E/L111F/M51R y el rVSV_{NJ} con las mutaciones G22E/M48R+M51R y G22E/L110F/M48R+M51R en la proteína M fueron atenuados hasta un grado en el que los ratones inyectados con el virus en el cerebro no presentaron ningún signo neurológico ni ningún síntoma tal como pérdida de peso

El VSV no presenta neurotropismo en el animal anfitrión durante la infección natural a través de la abrasión de la piel o picaduras de tábano o de mosquito. No obstante, cuando se inyecta el VSV de forma natural directamente en la nariz o el cerebro en ratones o monos, los animales presentan síntomas neurológicos. Para examinar la neurovirulencia de los nuevos mutantes de M de los VSV, los inventores inyectaron en ratones Swiss-Webster 1×10^6 PFU de VSV mutante y 1×10^3 PFU de VSV de la forma natural en el ventrículo intralateral del cerebro. Los inventores adquirieron en el laboratorio Charles River ratones Swiss-Webster de 5 semanas de edad con implante ventricular intralateral. Tres ratones por grupo recibieron inyecciones con virus después de una semana de su llegada a la instalación para animales. Después de la inyección viral, los ratones fueron observados en busca de signos neurológicos y fueron pesados cada dos días durante 4 semanas. Los ratones inyectados con 1×10^3 PFU de rVSV_{Ind} de la forma natural murieron antes de cuatro días después de la inyección (FIG. 11B). Dos ratones

inyectados con 1×10^6 PFU del rVSV_{Ind}-M51R (FIG. 11C) perdieron aproximadamente el 20% de su peso corporal 6 días después de la inyección, y el peso corporal volvió otra vez al peso normal aproximadamente 14 días después de la inyección. Un ratón inyectado con el rVSV_{Ind}-M51R no perdió peso corporal durante el experimento. Los tres ratones inyectados con rVSV_{Ind}-G21E/L111F/M51R no presentaron ningún signo de enfermedad y no perdieron peso corporal durante 4 semanas hasta que los ratones fueron sacrificados (FIG. 11D), indicando que la combinación de mutaciones G21E/L111F y M51R atenuó significativamente el rVSV_{Ind} y perdió su neurovirulencia en ratones. Un ratón inyectado con rVSV_{NJ}-WT presentó parálisis en ambas patas traseras y fue sacrificado en el día 6 después de la infección (FIG. 12A). Dos ratones más inyectados con rVSV_{NJ}-WT y ratones inyectados con rVSV_{NJ}-M48R+M51R, rVSV_{NJ}-G22E/M48R+M51R o rVSV_{NJ}-G22E/L110F/M48R+M51R no presentaron señal alguna de enfermedad ni pérdida de peso durante 4 semanas después de la infección (FIG. 12B, 12C y 12D). Las barras de error de las FIGURAS 11 y 12 representan el error estándar de la media.

Ejemplo 8: Generación de rVSV que expresan la proteína VIH-1 Gag como gen de interés; las proteínas del VIH-1 Gag se expresan igualmente bien tanto a 31°C como a 37°C

Los mutantes M recién generados —el mutante G21E/L111F/M51R del rVSV_{Ind} y los mutantes G22E/M48R+M51R y G22E/L110F/M48R+M51R del rVSV_{NJ}— demostraron una citopatogenicidad reducida y expresiones comparables de proteínas al rVSV de la forma natural a 37°C. Para ser usados como un vector de vacuna, los nuevos mutantes M del rVSV deberían inducir buenas respuestas inmunitarias *in vivo*, respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares. Cuando se expresan solas en las células, las proteínas VIH-1 gag producen partículas virales y las partículas virales son segregadas de las células. Por lo tanto, la proteína gag era la proteína adecuada para expresarse desde los nuevos mutantes M del rVSV para examinar la respuesta inmunitaria tanto celular como humoral. Además, el epítipo de los linfocitos T citotóxicos CD8+, el péptido restringido por H-2K^d (NH₂-AMQMLKETI-COOH) (SEQ ID NO: 33) en el VIH-1 Gag está muy estudiado en el ratón Balb/c. Los inventores insertaron el gen VIH-1 gag de longitud máxima ligado a los epítipos de los linfocitos T CD8+ humanos conservados de gp41, gp120, y la proteína nef del VIH-1 (Gag-En). El gen Gag-En fue insertado en la unión del gen G y el gen L en los clones del ADNc de longitud máxima de la forma natural (WT) y el G21E/L111F/M51R (GLM) del rVSV_{Ind} y la forma natural, el G22E/M48R+M51R (GM) y el G22E/L110F/M48R+M51R (GLM) del rVSV_{NJ}. Los rVSV fueron recuperados de los clones de ADNc mediante genética inversa, según se describe en la FIG. 3, y la expresión de Gag-En de los rVSV fue examinada mediante análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal contra el VIH-1 p24. Para el análisis de transferencia de Western, se infectaron células BHK21 con una MDI de 6 de los rVSV y fueron incubadas a 31°C y 37°C, y se prepararon lisatos celulares 6 horas postinfección. Se cargó una proteína total de 5 µg en el SDS-PAGE para el análisis de transferencia de Western. El rVSV_{Ind}(GLM)-Gag-En, el rVSV_{NJ}(GM)-Gag-En y el rVSV_{NJ}(GLM)-Gag-En expresaron bien la proteína Gag-En (64 kDa) a temperatura semipermissiva (37°C, FIG. 13C), y el nivel de expresión fue similar al de una temperatura permisiva (31°C, FIG. 13B).

Ejemplo 9: Régimen de vacunación con rVSV en ratones

Seis ratones Balb/c por grupo fueron vacunados con el régimen de sensibilización y refuerzo ilustrado en la FIG. 14. Los ratones fueron agrupados según el tipo de vector de vacuna (forma natural en contraposición a mutante) y al régimen (por ejemplo, sensibilizando y reforzando con el mismo serotipo de rVSV o alternando los dos serotipos para la sensibilización y el refuerzo). Los ratones fueron vacunados intramuscularmente como sensibilización con 5×10^6 PFU de los rVSV a la edad de 6 semanas. Tres semanas después de la sensibilización, los ratones fueron vacunados como refuerzo con la misma dosis de rVSV de la vacunación de sensibilización. Una semana después de la inyección de refuerzo, se recogieron esplenocitos y suero para detectar las respuestas inmunitarias celulares y las respuestas inmunitarias humorales de los linfocitos T CD8+ específicos a VIH-1 Gag.

Ejemplo 10: La sensibilización con rVSV_{Ind}(GLM)-VIH-1 Gag-En y el refuerzo con rVSV_{NJ}(GLM)-VIH-1 Gag-En inducen las respuestas inmunitarias más intensas de los linfocitos T CD8+ contra VIH-1 Gag

Los linfocitos T estimulados por la interacción con la molécula MHC I en las células que presentan el antígeno cargadas con el péptido aumentan la secreción de interferón-γ (IFN-γ), que indica las respuestas inmunitarias de los linfocitos T específicos al antígeno. Los esplenocitos fueron doblemente tincionados con FITC-anti-CD8 y APC-anti-IFN-γ para linfocitos T CD8+ con el IFN-γ intracelular aumentado. Para examinar la respuesta inmunitaria de los linfocitos T CD8+ específicos a la proteína VIH-1 Gag, los esplenocitos fueron aislados y se estimularon 1×10^6 células con el péptido VIH-1 Gag restringido por H-2K^d, NH₂-AMQMLKETI-COOH (SEQ ID NO: 33), las células fueron tincionadas con FITC rata anti-ratón CD8 para las moléculas CD8 y tincionadas con APC rata anti-ratón IFN-γ para el IFN-γ intracelular. La secreción de IFN-γ fue bloqueada con brefeldina A antes de tincionarlas. Las respuestas inmunitarias de los linfocitos T CD8+ específicos al VSV fueron examinadas con el uso del péptido específico nucleocápside IN275: NH₂-MPYLIDFGL-COOH (SEQ ID NO: 32). Los linfocitos T CD8+ IFN-γ+ específicos al péptido fueron contadas con FACSCalibur, un citómetro de flujo. Los esplenocitos tratados con DMSO (disolvente para el péptido, FIG. 15) no estimularon los linfocitos T CD8+, lo que indica que el tratamiento de los esplenocitos con los péptidos N del VSV y los péptidos VIH-1 Gag estimulaba específicamente a los linfocitos T CD8+ en la FIG. 16 y la FIG. 17. La vacunación de sensibilización y refuerzo alternando dos serotipos de rVSV(WT) o mutantes de rVSV(GLM) indujo respuestas inmunitarias de los linfocitos T CD8+ más intensas contra las proteínas del VSV, así como del VIH-1 Gag, que usando un único serotipo de rVSV para las vacunaciones de sensibilización y

de refuerzo, como se ve en los grupos 1, 2, 5, 6, 9 y 10 (FIG. 16 y FIG. 17). Con la vacunación con los nuevos mutantes M del rVSV, las respuestas de los linfocitos T CD8+ contra la proteína VIH-1 Gag eran inducidas mejor cuando los ratones eran vacunados con rVSV_{Ind}(GLM)-Gag para la sensibilización y con rVSV_{NJ}(GLM)-Gag para el refuerzo que al revés (FIG 17, grupo 6 en contraposición con el grupo 10). El valor *P* para el grupo 6 de la FIG. 17 fue calculado usando una prueba *t* de Student bilateral de muestras independientes, y el resultado fue comparado con el del grupo 10. Las barras de error de las FIGURAS 16 y 17 representan el error estándar de la media.

Ejemplo 11: Respuestas inmunitarias humores específicas al VIH-1 Gag

La generación del anticuerpo específico al VIH-1 Gag fue examinada con el suero recogido una semana después de la vacuna de refuerzo. El título del anticuerpo específico a Gag fue determinado mediante el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto. Para el ELISA, se cubrió una placa ELISA de 96 pocillos con p55 recombinante a una concentración de 125 ng/pocillo. El suero de ratón fue diluido 1:100. El anticuerpo unido al antígeno, p55, fue detectado con el anticuerpo secundario IgG-HRP oveja anti-ratón. La actividad enzimática de la HRP fue detectada añadiendo sustratos, una mezcla de peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina. El OD de cada muestra se leyó a una longitud de onda de 450 con el lector de microplacas. Las respuestas inmunitarias humores contra el VIH-1 Gag (generación de un anticuerpo contra el VIH-1 Gag) fueron bien inducidas en ratones vacunados con los nuevos mutantes M, y las mejores respuestas inmunitarias humores contra el VIH-1 Gag fueron inducidas cuando se alternaron dos serotipos de rVSV(WT) o rVSV(GLM) para la inyección de sensibilización y la de refuerzo (FIG. 18, grupos 5, 6, 9 y 10). En cuanto a la utilización de los nuevos mutantes M para inducir respuestas inmunitarias humores contra proteínas extrañas, la sensibilización con rVSV_{Ind}(GLM)-Gag y el refuerzo con rVSV_{NJ}(GLM)-Gag funcionaron mejor que al revés (Fig. 18, grupo 6 en contraposición con grupo 10). Las barras de error de la FIG. 18 representan el error estándar de la media.

Ejemplo 12: El incremento de dosis de rVSV_{Ind}(GLM), rVSV_{NJ}(GM) y rVSV_{NJ}(GLM) para la vacunación induce respuestas inmunitarias más intensas en ratones

Según se ilustra en la FIG. 17 y la FIG. 18, se indujeron respuestas inmunitarias de los linfocitos T CD8+ específicos al VIH-1 Gag y respuestas inmunitarias humores más intensas cuando los ratones fueron vacunados como sensibilización con rVSV_{Ind}(GLM)-Gag y vacunados como refuerzo con rVSV_{NJ}(GLM)-Gag. Sin embargo, las respuestas inmunitarias no fueron tan intensas como las inducidas con rVSV_{Ind}(WT)-Gag y rVSV_{NJ}(WT)-Gag. Por lo tanto, los inventores quisieron examinar si podrían incrementar las respuestas inmunitarias si aumentaban las dosis del rVSV_{Ind}(GLM)-Gag y del rVSV_{NJ}(GLM)-Gag. Ratones Balb/c de seis (6) semanas de edad, 6 ratones/grupo, fueron vacunados con rVSV_{Ind}(GLM)-Gag para su sensibilización y con rVSV_{NJ}(GLM)-Gag o rVSV_{NJ}(GM)-Gag para su refuerzo. Dado que el rVSV_{NJ}(GM) estaba tan atenuado como el rVSV_{NJ}(GLM) *in vitro* e *in vivo*, los inventores incluyeron rVSV_{NJ}(GM)-Gag como virus de refuerzo, y compararon las respuestas inmunitarias con la inducida por el rVSV_{NJ}(GLM)-Gag. Los grupos de ratones fueron vacunados con diversas dosis de rVSV_{Ind}(GLM)-Gag, rVSV_{NJ}(GLM)-Gag y rVSV_{NJ}(GLM)-Gag; 5×10^6 PFU/ratón, 5×10^7 PFU/ratón, 5×10^8 PFU/ratón y 5×10^9 PFU/ratón (Tabla 1).

Los ratones fueron vacunados según la planificación mostrada en la FIG. 14 y fueron sacrificados una semana después de la vacunación de refuerzo para obtener esplenocitos y suero. Los esplenocitos fueron doblemente tincionados con FITC-anti-CD8 y APC-anti-IFN- γ para linfocitos T CD8+ con el IFN- γ intracelular aumentado. Para examinar la respuesta inmunitaria de los linfocitos T CD8+ específicos a la proteína VIH-1 Gag, los esplenocitos fueron aislados y se estimularon 1×10^6 células con el péptido VIH-1 Gag restringido por H-2K^d, NH₂-AMQMLKETI-COOH (SEQ ID NO: 33), las células fueron tincionadas con FITC anti-ratón CD8 para las moléculas CD8 y tincionadas con APC anti-ratón IFN- γ para el IFN- γ intracelular. La secreción de IFN- γ fue bloqueada con brefeldina A antes de tincionarlas. Las respuestas inmunitarias de los linfocitos T CD8+ específicos al VSV fueron examinadas con el uso del péptido específico nucleocápside IN275: NH₂-MPYLIDFGL-COOH (SEQ ID NO: 32). Los linfocitos T CD8+ IFN- γ + específicos al péptido fueron contados con FACSCalibur, un citómetro de flujo.

Las respuestas inmunitarias de los linfocitos T CD8+ contra la proteína N del VSV fueron muy similares en todos los grupos de vacunación con diferentes dosis de rVSV_{Ind}(GLM)-Gag, rVSV_{NJ}(GLM)-Gag o rVSV_{NJ}(GM)-Gag (FIG. 19). Las respuestas inmunitarias de los linfocitos T CD8+ específicas al VIH-1 Gag después de la vacunación de sensibilización con rVSV_{Ind}(GLM)-Gag y del refuerzo con rVSV_{NJ}(GLM)-Gag parecieron algo aumentadas cuando aumentaban las dosis de la vacuna, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas (FIG. 20, grupos 2, 3, 4, 5). Sin embargo, cuando los ratones fueron vacunados como sensibilización con rVSV_{Ind}(GLM)-Gag y vacunados como refuerzo con rVSV_{NJ}(GM)-Gag, la frecuencia de los linfocitos T CD8+ específicos al VIH-1 Gag aumentó significativamente con el incremento de la dosis de 5×10^8 PFU. La respuesta de los linfocitos T CD8+ específicos al VIH-1 Gag tuvo intensidad máxima en un grupo vacunado con 5×10^9 PFU/ratón (FIG 20, grupos 6, 7, 8, 9). Los valores *P* de los grupos 8 y 9 de la FIG. 20 fueron calculados usando una prueba *t* de Student bilateral de muestras independientes, el resultado del grupo 8 fue comparado con el del grupo 7, y el resultado del grupo 9 fue comparado con el del grupo 8. Las barras de error de las FIGURAS 19 y 20 representan el error estándar de la media.

La generación del anticuerpo contra la proteína VIH-1 Gag aumentó con las dosis crecientes de rVSV_{Ind}(GLM)-Gag para la sensibilización y el refuerzo con rVSV_{NJ}(GLM)-Gag o rVSV_{NJ}(GM)-Gag (FIG. 21). La vacunación de refuerzo

con rVSV_{NJ}(GLM)-Gag o con rVSV_{NJ}(GM)-Gag generó un nivel similar de anticuerpos específicos a Gag en diversas dosis del virus. Las barras de error de la FIG. 21 representan el error estándar de la media.

Ejemplo 13: Generación de rVSV_{Ind}(GLM) y rVSV_{NJ}(GM) que expresan las proteínas Gag, Pol, Env y RT del VIH-1

5 Para las vacunas de VIH-1 que utilizan el rVSV_{Ind}(GLM) y el rVSV_{NJ}(GM) como vectores de vacuna, los inventores incluyeron genes de VIH que codificaban la mayoría de las poliproteínas grandes, que son escindidas en proteínas funcionales —Gag y Env— y en proteínas con actividades enzimáticas (productos del gen *pol*). Además, el gen *gag* del VIH-1 fue ligado a nucleótidos que codifican epítomos peptídicos para linfocitos T y linfocitos B en seres humanos. Los inventores generaron rVSV_{Ind}(GLM) y rVSV_{NJ}(GM) que tenían casetes que codificaban el VIH-1 Gag
10 ligado a epítomos de linfocitos B a partir de la proteína VIH Env derivada de múltiples clados virales (FIG. 22). Los inventores generaron el rVSV_{Ind}(GLM)-Gag-Env y el rVSV_{NJ}(GM)-Gag-Env, que expresa el gen *gag* y epítomos peptídicos de linfocitos T a partir de Nef, Gp120 y Gp41 (FIG. 23). Los inventores generaron rVSV_{Ind}(GLM) y rVSV_{NJ}(GM) con VIH-1 Gag-RT, que codifica la proteína gag con epítomos peptídicos a partir de las proteínas RT, Tat y Rev (FIG. 23). Además, los inventores generaron rVSV_{Ind}(GLM) y rVSV_{NJ}(GM) con el gen *pol* y el gen *env*, respectivamente (FIG. 23). Previamente, los inventores demostraron que la sustitución del péptido señal de la proteína de envoltura del VIH-1 con el péptido señal de la melitina de abeja melera aumentaba drásticamente las tasas de expresión, glicosilación y secreción de Gp120 (Yan Li et al., PNAS, 93: 9606-9611, 1996). Cabe esperar que la expresión y la secreción mayores de Gp120 potencien la inducción de las respuestas inmunitarias de los linfocitos T y los linfocitos B contra el VIH-1 gp120. Por lo tanto, los inventores generaron unos rVSV con el gen VIH-1 *env* con la secuencia de señal de la melitina (gp160mss). Los VSV recombinantes con las proteínas del VIH-1 fueron purificados en placa y fueron amplificados para obtener la masa viral. La expresión de las proteínas del VIH-1 a 31°C y 37°C a partir del VSV mutante fue examinada mediante análisis de transferencia de Western. Las proteínas Gag marcadas con epítomos de linfocitos T y de linfocitos B provenientes de diversas proteínas del VIH-1 se expresaron bien a partir de rVSV_{Ind}(GLM) y rVSV_{NJ}(GM) tanto a 31°C como a 37°C (FIG. 24 y FIG. 25). El gen *pol* clonado de VIH-1 en el genoma del rVSV codifica una poliproteína, que es escindida formando proteasa (PR, p11), transcriptasa inversa (RT, p66/p51) e integrasa (IN, p31). Los inventores detectaron dos subunidades de productos de RT, p66 y p51. El p51 se genera del p66 mediante escisión proteolítica de un fragmento de p15 en el carboxilo terminal. Los productos de RT p66 y p51 se expresaron igualmente bien a partir tanto de rVSV_{Ind}(GLM) como de rVSV_{NJ}(GM) y tanto a 31°C como a 37°C (FIG. 26). El gen *env* codifica glicoproteína Gp160, que se escinde formando Gp120, de una proteína de unión de receptor, y gp41, de una proteína citoplasmática y transmembranosa inductora de fusión. El Gp160 es escindido por la proteasa celular furina, residente del trans-Golgi. El Gp160 expresado en células BHK21 del rVSV_{Ind}(GLM) y el rVSV_{NJ}(GM) no fue escindido formando Gp120 y Gp41 o la escisión no fue muy eficaz, aunque el nivel de expresión fue bueno tanto a 31°C como a 37°C (FIG. 27). Los datos anteriores de los inventores sobre la expresión del Gp160 en las células BHK21 y la escisión en Gp120 y Gp41 demostraron que el procesamiento no fue muy eficaz (Kunyu Wu et al., Journal of General Virol., 90:1135-1140, 2009).

Ejemplo 14: Estudios de vacunación en ratones con el rVSV_{Ind}(GLM) y el rVSV_{NJ}(GM) con las proteínas Gag, Gp160 y RT del VIH-1

40 Los estudios preliminares de vacunación de sensibilización y refuerzo con el nuevo mutante M en los rVSV rVSV_{Ind}(GLM) y rVSV_{NJ}(GM) revelaron que sensibilizar a los ratones con el rVSV_{Ind}(GLM) y el refuerzo con rVSV_{NJ}(GM) inducían la respuesta inmunitaria de los linfocitos T CD8+ (FIG. 17) y las respuestas inmunitarias humorales (FIG. 18) contra el gen extraño más que al revés. Con la sensibilización con rVSV_{Ind}(GLM)-Gag y el refuerzo con rVSV_{NJ}(GM)-Gag, la dosis de 5×10^8 pfu de cada virus indujeron las respuestas de los linfocitos T CD8+ específicos a Gag mejor que las dosis menores, aunque la respuesta de los linfocitos B contra Gag fue similar a la inducida con las dosis menores (FIG. 20 y FIG. 21). Los inventores eligieron 5×10^8 pfu como dosis para los estudios de vacunación, expresando el rVSV_{Ind}(GLM) y el rVSV_{NJ}(GM) VIH-1 Gag, Gp160 y RT.

Los inventores vacunaron ratones Balb/c sensibilizándolos con un rVSV_{Ind}(GLM) que expresaba proteínas de VIH-1 y los vacunaron como refuerzo con un rVSV_{NJ}(GM) que expresaba proteínas de VIH-1 a las tres semanas después de la sensibilización, según se describe en la Tabla 6. Los inventores examinaron cómo se inducen las respuestas inmunitarias contra las proteínas individuales del VIH-1 con una inyección individual o con la inyección mixta de tres virus diferentes que expresan proteínas separadas. Una semana después de la vacunación de sensibilización, los inventores sacrificaron a los ratones vacunados para obtener sus esplenocitos y su suero. Los 1×10^6 esplenocitos fueron estimulados con péptidos específicos a las proteínas del VIH-1 restringidos por H-2K^d, que son Gag, Env P18, RT354, RT464 y RT472. En la FIG. 29 se muestran las secuencias de péptidos. Los esplenocitos estimulados fueron doblemente tincionados para las moléculas CD8 de la superficie celular y el IFN- γ intracelular de los linfocitos T con FITC rata anti-ratón CD8 y con APC rata anti-ratón IFN- γ . La vacunación del régimen de sensibilización y refuerzo con rVSV_{Ind}(GLM) y rVSV_{NJ}(GM) indujo respuestas inmunitarias de los linfocitos T CD8+ específicas a los péptidos con diferente grado, dependiendo de los péptidos que los inventores usaron para la estimulación. Los linfocitos T CD8+ contra el péptido Env estimularon los linfocitos T CD8+ al máximo hasta el 19%-23% de los linfocitos T CD8+ como promedio (FIG. 28, G3 y GS). Aproximadamente un 4,5% o un 3% de los linfocitos T CD8+ fueron sensibles a la proteína Gag en ratones vacunados con rVSV que expresaba únicamente Gag (FIG. 28, G2) o con tres rVSV mezclados que expresaban Gag A, Gag B y Gag C ligados con diversos epítomos de linfocitos B y T de VIH-1 Gp120

y Gp41 (FIG. 29, G6). Se generaron linfocitos T CD8+ específicos a la RT en aproximadamente el 2% de los linfocitos T CD8+ en ratones inyectados con rVSV con el gen *pol* (FIG. 28, G4). Las respuestas de los linfocitos T CD8+ contra las proteínas individuales Gag y RT del VIH-1 fueron más intensas cuando los ratones recibieron inyecciones con un solo rVSV que expresaba una proteína individual (FIG. 28, G2 y G4) que cuando recibían una inyección con rVSV mezclados que expresaban una sola proteína (FIG. 28, G5). Las respuestas de los linfocitos T CD8+ específicos a Env tuvieron la máxima intensidad y fueron similares tanto en la inyección única como en las inyecciones mixtas. Las respuestas de los linfocitos T CD8+ contra el epítipo del péptido Env son inmunodominantes en los ratones Balb/c. En la actualidad, los inventores no están seguros de por qué las inyecciones mixtas con tres rVSV diferentes que expresaban Gag, Env y RT indujeron respuestas de los linfocitos T CD8+ comparativamente menores contra N, gag y RT del VSV que con la inyección de un solo virus. Es posible que la competición de cada virus por las células que presentan el antígeno en la inyección de virus mixta disminuyera los linfocitos T CD8+ contra Gag y RT. Dado que el rVSV es un vector común para las proteínas del VIH-1 en ratones inyectados ya sea con un único rVSV o con rVSV mezclados, se supone que VSV N induce respuestas de los linfocitos T CD8+ similares o mejores en la inyección mixta. Sin embargo, las respuestas de los linfocitos T CD8+ con VSV N en ratones son menores incluso con las inyecciones únicas cuando se expresa Env (FIG. 28, G3), como en la inyección mixta (FIG. 28, G5). Por lo tanto, puede ser consecuencia de la dominancia inmunológica de la proteína Env en los ratones Balb/c, que afecta negativamente a la presentación de otras proteínas a los linfocitos T CD8+ cuando Env es expresada conjuntamente. Para las vacunaciones combinadas en ratones, los tres rVSV fueron inyectados en el mismo sitio, lo que puede haber dado como resultado la competición de diferentes proteínas por la presentación del antígeno en las mismas células de presentación del antígeno. Los inventores comprobarán la vacunación con las inyecciones mixtas en más de un sitio de inyección para inducir respuestas de los linfocitos T CD8+.

Las proteínas VIH-1 Gag expresadas en las células pueden formar partículas viroides (VLP) y las VLP pueden ser liberadas de las células. Las VLP liberadas pueden inducir respuestas inmunitarias humores contra las proteínas Gag. El gen *env* del VIH-1 codifica proteínas glicosiladas de superficie, que son procesadas mediante la red del RE-Golgi para ser renaturalizadas y escindidas formando la subunidad transmembranosa Gp41 y la unidad superficial Gp120. La Gp41 y la Gp120 están asociadas por un enlace no covalente y maduran formando un trímero de Gp41 y un heterodímero de Gp120. El trímero madurado de Gp41 y la Gp120 son exportados a la superficie celular. La Gp120 tiende a desprenderse de la superficie celular debido a la debilidad del enlace entre Gp41 y Gp120. Por lo tanto, el anticuerpo contra la Gp120 puede ser inducido a la Gp120 de la superficie celular o la Gp120 desprendida. El título del anticuerpo contra la proteína VIH-1 Gag y la Gp120 se determinó mediante ELISA. Para el anticuerpo Gag, la microplaca fue recubierta con 125 ng/pocillo de p55 recombinante (Pierce Biotechnology, RP-4921) y 50 µl de suero de ratón fueron sometidos a ensayo con la disolución de 1:100, 1:200 y 1:400. El anticuerpo Gag se produjo en ratones inyectados con rVSV Gag-Env únicamente (FIG. 30A, G2) y con virus mixtos rVSV-Gag A+rVSV Gag B+rVSV Gag C (FIG. 30A, G6). Para la Gp120, se cubrió una microplaca ELISA de 96 pocillos con 250 ng/pocillo del trímero VIH-1 SF162 Gp140 del clado B (NIH AIDS reagent program, nº de catálogo 12026). Se diluyó suero de ratón al 1:100, 1:200 y 1:400, y se añadieron 50 µl del suero diluido a la microplaca para ELISA. Se generó un anticuerpo específico a la Gp120 en ratones inyectados únicamente con rVSV-VIH-1 Gp160 y en ratones inyectados con los virus mezclados que expresan cada proteína de Gag, Gp160 y RT (FIG. 30B, G3 y G5). El título del anticuerpo Gp120 fue ligeramente menor, aunque no fuera estadísticamente significativo, en ratones inyectados con virus mixtos que en ratones inyectados con un único virus que expresaba Gp160.

Los mutantes M recién generados de rVSVs, rVSV_{Ind}(GLM) y rVSV_{NJ}(GM) indujeron respuestas inmunitarias de los linfocitos T CD8+ y humores contra diversas proteínas del VIH-1 expresadas a partir del vector después de inyectar a los ratones con un virus individual que expresaba un solo virus o con virus mixtos que expresaban diversas proteínas del VIH-1.

Ejemplo 15: Generación de rVSV_{Ind}(GLM), rVSV_{NJ}(GM) y rVSV_{NJ}(GLM) con proteínas estructurales del virus de la hepatitis C

Generalmente, la respuesta inmunitaria humoral es la primera línea de defensa arbitrada por las respuestas inmunitarias adaptativas contra cualquier patógeno. Aunque las respuestas inmunitarias humores contra el VHC y su papel en la prevención de la infección del VHC no están bien estudiados en comparación con las respuestas inmunitarias celulares específicas al VHC, merece la pena incluir vacunas que puedan inducir anticuerpos específicos al VHC. Se ha demostrado que el núcleo de la proteína nucleocápside y las glicoproteínas superficiales E1 y E2 forman partículas viroides (VLP) que pueden ser liberadas de las células (Blanchard, E. et al., J. Virol. 76:4073-4079, 2002). Además, se ha demostrado que la proteína p7 del VHC, una viroporina que forma un canal iónico en el retículo endoplasmático, participa en la liberación de partículas de VHC de la célula infectada (Steinmann, E. et al., PLoS Pathogens 3:962-972, 2007). Otra proteína transmembranosa del VHC, la NS4B, forma una estructura de banda membranosa, que consiste fundamentalmente en el retículo endoplasmático. La banda membranosa formada por la NS4B es una microestructura para la producción de una progenie de VHC. No se conoce bien qué funciones tiene la NS4B en la duplicación del VHC, pero resulta atractivo incluir a la NS4B en los candidatos de vacuna simplemente por su naturaleza formadora de una estructura membranosa RE en la que se localizan otras proteínas del VHC, especialmente el núcleo, E1, E2, p7. Por lo tanto, incluir conjuntamente el núcleo, E1, E2, P7 y NS4B en la vacuna puede inducir respuestas inmunitarias humores y celulares.

Para las vacunas de proteínas estructurales del VHC que usan los nuevos rVSV de mutante M, los inventores insertaron conjuntamente el gen del *núcleo* del VHC, genes *E1E2P7* y *NS4B* (conectados por las secuencias de unión intergénica del VSV), y genes *NúcleoE1E2P7* y *NS4B* juntos (conectados por las secuencias de unión intergénica del VSV) a la unión de los genes G y L del VSV (FIG. 31). Los rVSV —rVSV_{Ind}(GLM)-FC, rVSV_{Ind}(GLM)-CE1E2P7/NS4B, rVSV_{NJ}(GM)-FC y rVSV_{NJ}(GLM)-E1E2P7/NS4B— fueron generados mediante genética inversa. Los inventores tuvieron dificultades para generar el rVSV_{NJ}(GM) con CE1E2P7/NS4B a partir del ADN plasmídico; por lo tanto, los inventores quitaron el núcleo y clonaron el E1E2P7/NS4B en el plásmido del rVSV_{NJ}(GLM) y generaron el rVSV_{NJ}(GLM)-E1E2P7/NS4B. La expresión de Núcleo, E1, E2 y NS4B a partir del VSV recombinante a 31°C y 37°C fue examinada mediante análisis de transferencia de Western usando anticuerpos contra cada proteína (FIG. 32). Las proteínas fueron expresadas de manera similar en cantidad a ambas temperaturas. El núcleo (FIG. 32A), E1 (FIG. 32B) y E2 (FIG. 32C) se expresaron bien a partir del rVSV_{Ind}(GLM)-CE1E2P7/NS4B, pero la expresión de NS4B fue menor que la de las demás proteínas (FIG. 32D).

Ejemplo 16: Generación de rVSV_{Ind}(GLM), rVSV_{NJ}(GM) y rVSV_{NJ}(GLM) con proteínas no estructurales del VHC

Los inventores quieren seleccionar como diana la mayoría de las proteínas de VHC, incluyendo las proteínas de núcleo, E1, E2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, para inducir respuestas inmunitarias de linfocitos T CD8+ y linfocitos T CD4+ específicos al VHC a múltiples proteínas. Las proteínas no estructurales (NS) del VHC —NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B— abarcan más de la mitad de la poliproteína del VHC. Las proteínas NS son escindidas en proteínas individuales por NS3 con la ayuda de NS4A. Varios estudios demuestran que los pacientes que se recuperan de una infección aguda de VHC desarrollan intensas respuestas de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ contra múltiples epítomos en la proteína NS3 (Diepolder, H. M. J. Virol. 71:6011-6019, 1997; Lamonaca, V. et al. Hepatology 30:1088-1098, 1999; Shoukry, N. H. et al. J. Immunol. 172:483-492, 2004), lo que indica que incluir la NS3 en la vacuna candidata es importante para provocar respuestas inmunitarias celulares exitosas contra el VHC. La proteína NS3, una proteasa serina y una ARN helicasa, se asocia con la NS4A y reside en el retículo endoplasmático (Sato, S. et al. J. Virol. 69:4255-4260, 1995; Failla, C. et al. J. Virol. 69:1769-1777, 1995). Se cree que la proteína NS5A, una fosfoproteína, está implicada en la síntesis de ARN del VHC junto con la proteína NS5B, una ARN polimerasa dependiente de ARN (Shirota, Y. et al., J. Biol. Chem., 277:11149-11155, 2002; Shimakami, et al. J. Virol. 78:2738-2748, 2004). La proteína NS5B es una ARN polimerasa dependiente de ARN que sintetiza ARN genómico codificante del VHC, así como ARN genómico no codificante intermedio (Beherens, S. E. EMBO J. 15:12-22, 1996). La proteína NS5B es una proteína anclada por la cola y se asocia con el retículo endoplasmático a través de los 20 aminoácidos de su carboxilo terminal (Yamashita, T. J. Biol. Chem. 273:15479-15486, 1998; Hagedorn, C. H. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 242:225-260, 2000).

Los inventores clonaron los genes NS del VHC como un gen para una sola proteína o un gen para una poliproteína de 2 o 3 proteínas NS. Los genes NS —NS3, NS34AB, NS5A, NS5B, NS5AB— fueron clonados en la unión entre el gen G y el gen L del pVSV_{Ind}(GLM) y del pVSV_{NJ}(GM) (FIG. 33). Los inventores generaron rVSV_{Ind}(GLM)-NS3, rVSV_{Ind}(GLM)-NS34AB, rVSV_{Ind}(GLM)-NS5A, rVSV_{Ind}(GLM)-NS5B y rVSV_{Ind}(GLM)-NS5AB, y la expresión de las proteínas NS a 31°C y 37°C fue determinada mediante análisis de transferencia de Western usando anticuerpos contra cada proteína NS (FIG. 34). Los inventores generaron rVSV_{NJ}(GM)-NS3, rVSV_{NJ}(GM)-NS4B, rVSV_{NJ}(GM)-NS34AB, rVSV_{NJ}(GM)-NS5A, rVSV_{NJ}(GM)-NS5B y rVSV_{NJ}(GM)-NS5AB. La expresión de cada proteína del vector rVSV_{NJ} a 37°C fue examinada mediante análisis de transferencia de Western usando anticuerpos contra cada proteína NS (FIG. 35). Aunque el nivel de expresión de las proteínas NS a partir del rVSV_{Ind} y del rVSV_{NJ} fue diferente, fue lo suficientemente bueno como para usarlas como vacuna contra el VHC.

Tabla 1. Grupos y régimen de vacunación de ratones

Grupos de vacunación	Sensibilización		Refuerzo		Nº de ratones
	Virus	Título (PFU)/50 µl	Virus	Título (PFU)/50 µl	
1	Ind (WT)-Gag	5×10 ⁶	NJ (WT)-Gag	5×10 ⁶	6
2	Ind (GLM)-Gag	5×10 ⁶	NJ (GLM)-Gag	5×10 ⁶	6
3	Ind (GLM)-Gag	5×10 ⁷	NJ (GLM)-Gag	5×10 ⁷	6
4	Ind (GLM)-Gag	5×10 ⁸	NJ (GLM)-Gag	5×10 ⁸	6
5	Ind (GLM)-Gag	5×10 ⁹	NJ (GLM)-Gag	5×10 ⁹	6
6	Ind (GLM)-Gag	5×10 ⁶	NJ (GM)-Gag	5×10 ⁶	6

Grupos de vacunación	Sensibilización		Refuerzo		Nº de ratones
	Virus	Título (PFU)/50 µl	Virus	Título (PFU)/50 µl	
7	Ind (GLM)-Gag	5×10 ⁷	NJ (GM)-Gag	5×10 ⁷	6
8	Ind (GLM)-Gag	5×10 ⁸	NJ (GM)-Gag	5×10 ⁸	6
9	Ind (GLM)-Gag	5×10 ⁹	NJ (GM)-Gag	5×10 ⁹	6
10	NJ (WT)-Gag	5×10 ⁶	Ind (WT)-Gag	5×10 ⁶	6
Total de ratones					60

Tabla 2. Comparación de secuencia de nucleótidos entre genes M del VSV de la forma natural del serotipo Indiana (SEC ID NO: 1) y un mutante G21E/L111F/M51R (SEC ID NO: 2)

```

1                                     50
SEQ ID NO: 1: ATGAGTTCCT TAAAGAAGAT TCTCGGTCTG AAGGGGAAAG GTAAGAAATC
SEQ ID NO: 2: ATGAGTTCCT TAAAGAAGAT TCTCGGTCTG AAGGGGAAAG GTAAGAAATC

51                                     100
SEQ ID NO: 1: TAAGAAATTA GGGATCGCAC CACCCCTTA TGAAGAGGAC ACTAACATGG
SEQ ID NO: 2: TAAGAAATTA GAAATCGCAC CACCCCTTA TGAAGAGGAC ACTAACATGG

101                                    150
SEQ ID NO: 1: AGTATGCTCC GAGCGCTCCA ATTGACAAAT CCTATTTTGG AGTTGACGAG
SEQ ID NO: 2: AGTATGCTCC GAGCGCTCCA ATTGACAAAT CCTATTTTGG AGTTGACGAG

151                                    200
SEQ ID NO: 1: ATGGACACTC ATGATCCGCA TCAATTAAGA TATGAGAAAT TCTTCTTTAC

```

SEQ ID NO: 2: AGGGACACTC ATGATCCGCA TCAATTAAGA TATGAGAAAT TCTTCTTTAC

201 250
 SEQ ID NO: 1: AGTGAAAATG ACGGTTAGAT CTAATCGTCC GTTCAGAACA TACTCAGATG
 SEQ ID NO: 2: AGTGAAAATG ACGGTTAGAT CTAATCGTCC GTTCAGAACA TACTCAGATG

251 300
 SEQ ID NO: 1: TGGCAGCCGC TGTATCCCAT TGGGATCACA TGTACATCGG AATGGCAGGG
 SEQ ID NO: 2: TGGCAGCCGC TGTATCCCAT TGGGATCACA TGTACATCGG AATGGCAGGG

301 350
 SEQ ID NO: 1: AAACGTCCTT TCTACAAGAT CTTGGCTTTT TTGGGTTCTT CTAATCTAAA
 SEQ ID NO: 2: AAACGTCCTT TCTACAAGAT CTTGGCTTTT TTTGGTTCTT CTAATCTAAA

351 400
 SEQ ID NO: 1: GGCCACTCCA GCGGTATTGG CAGATCAAGG TCAACCAGAG TATCAGCTC
 SEQ ID NO: 2: GGCCACTCCA GCGGTATTGG CAGATCAAGG TCAACCAGAG TATCAGCTC

401 450
 SEQ ID NO: 1: ACTGTGAAGG CAGGGCTTAT TTGCCACACA GAATGGGGAA GACCCCTCCC
 SEQ ID NO: 2: ACTGTGAAGG CAGGGCTTAT TTGCCACACA GAATGGGGAA GACCCCTCCC

451 500
 SEQ ID NO: 1: ATGCTCAATG TACCAGAGCA CTTCAGAAGA CCATTCAATA TAGGTCTTTA
 SEQ ID NO: 2: ATGCTCAATG TACCAGAGCA CTTCAGAAGA CCATTCAATA TAGGTCTTTA

501 550
 SEQ ID NO: 1: CAAGGGAACG GTTGAGCTCA CAATGACCAT CTACGATGAT GAGTCACTGG
 SEQ ID NO: 2: CAAGGGAACG GTTGAGCTCA CAATGACCAT CTACGATGAT GAGTCACTGG

551 600
 SEQ ID NO: 1: AAGCAGCTCC TATGATCTGG GATCATTTCA ATTCTTCCAA ATTTTCTGAT
 SEQ ID NO: 2: AAGCAGCTCC TATGATCTGG GATCATTTCA ATTCTTCCAA ATTTTCTGAT

601 650
 SEQ ID NO: 1: TTCAGAGATA AGGCCTTAAT GTTTGGCCTG ATTGTCGAGA AAAAGGCATC
 SEQ ID NO: 2: TTCAGAGATA AGGCCTTAAT GTTTGGCCTG ATTGTCGAGA AAAAGGCATC

651 700
 SEQ ID NO: 1: TGGAGCTTGG GTCCTGGATT CTGTCAGCCA CTTCAAATGA
 SEQ ID NO: 2: TGGAGCTTGG GTCCTGGATT CTGTCAGCCA CTTCAAATGA

Tabla 3. Comparación de secuencias de aminoácidos entre proteínas M del VSV de la forma natural del serotipo Indiana (SEC ID NO: 3) y un mutante G21E/L111F/M51R (SEC ID NO: 4)

```

1                               21                               50
SEQ ID NO: 3: MSSLKILGL KGKCKSKKL GIAPPPYEED TNMEYAPSAP IDKSYFGVDE
SEQ ID NO: 4: MSSLKILGL KGKCKSKKL EIAPPPYEED TNMEYAPSAP IDKSYFGVDE

51                               100
SEQ ID NO: 3: MDTHDPHQLR YEKFFFTVKM TVRSNRPFRT YSDVAAAVSH WDHMYIGMAG
SEQ ID NO: 4: RDTHDPHQLR YEKFFFTVKM TVRSNRPFRT YSDVAAAVSH WDHMYIGMAG

101                             111                             150
SEQ ID NO: 3: KRPFYKILAF LGSSNLKATP AVLADQGQPE YHAHCEGRAY LPHRMGKTPP
SEQ ID NO: 4: KRPFYKILAF FGSSNLKATP AVLADQGQPE YHAHCEGRAY LPHRMGKTPP

151                               200
SEQ ID NO: 3: MLNVPEHFRR PFNIGLYKGT VELTMTIYDD ESLEAAPMIW DHFNSSKFSO
SEQ ID NO: 4: MLNVPEHFRR PFNIGLYKGT VELTMTIYDD ESLEAAPMIW DHFNSSKFSO

201                               229                               250
SEQ ID NO: 3: FRDKALMFGL IVEKKASGAW VLDSVSHFK
SEQ ID NO: 4: FRDKALMFGL IVEKKASGAW VLDSVSHFK

```

Tabla 4. Comparación de secuencias de nucleótidos entre genes M del VSV de la forma natural del serotipo Nueva Jersey (SEC ID NO: 5) y los mutantes G22E/M48R+M51R (SEC ID NO: 6) y G22E/L110F/M48R+M51R (SEC ID NO: 7)

```

1                               50
SEQ ID NO: 5: ATGAGTTCCT TCAAAAAGAT TCTGGGATTT TCTTCAAAAA GTCACAAGAA
SEQ ID NO: 6: ATGAGTTCCT TCAAAAAGAT TCTGGGATTT TCTTCAAAAA GTCACAAGAA
ID NO: 7:      ATGAGTTCCT TCAAAAAGAT TCTGGGATTT TCTTCAAAAA GTCACAAGAA

51                               100
SEQ ID NO: 5: ATCAAAGAAA CTAGGCTTGC CACCTCCTTA TGAGGAATCA AGTCCTATGG
SEQ ID NO: 6: ATCAAAGAAA CTAGAAATTGC CACCTCCTTA TGAGGAATCA AGTCCTATGG
SEQ ID NO: 7: ATCAAAGAAA CTAGAAATTGC CACCTCCTTA TGAGGAATCA AGTCCTATGG

101                             150
SEQ ID NO: 5: AGATTCAACC ATCTGCCCCA TTATCAAATG ACTTCTTCGG AATGGAGGAT
SEQ ID NO: 6: AGATTCAACC ATCTGCCCCA TTATCAAATG ACTTCTTCGG AAGGGAGGAT
SEQ ID NO: 7: AGATTCAACC ATCTGCCCCA TTATCAAATG ACTTCTTCGG AAGGGAGGAT

151                               200
SEQ ID NO: 5: ATGGATTTAT ATGATAAGGA CTCCTTGAGA TATGAGAAGT TCCGCTTTAT

```

SEQ ID NO: 6 : AGGGATTTAT ATGATAAGGA CTCCTTGAGA TATGAGAAGT TCCGCTTTAT
 SEQ ID NO: 7 : AGGGATTTAT ATGATAAGGA CTCCTTGAGA TATGAGAAGT TCCGCTTTAT

201 250
 SEQ ID NO: 5 : GTTGAAGATG ACTGTTAGAG CTAACAAGCC CTTGAGATCG TATGATGATG
 SEQ ID NO: 6 : GTTGAAGATG ACTGTTAGAG CTAACAAGCC CTTGAGATCG TATGATGATG
 SEQ ID NO: 7 : GTTGAAGATG ACTGTTAGAG CTAACAAGCC CTTGAGATCG TATGATGATG

251 300
 SEQ ID NO: 5 : TCACCGCAGC GGTATCACAA TGGGATAATT CATACTTGG AATGGTTGGA
 SEQ ID NO: 6 : TCACCGCAGC GGTATCACAA TGGGATAATT CATACTTGG AATGGTTGGA
 SEQ ID NO: 7 : TCACCGCAGC GGTATCACAA TGGGATAATT CATACTTGG AATGGTTGGA

301 350
 SEQ ID NO: 5 : AAGCGTCCTT TCTACAAGAT AATTGCTCTG ATTGGCTCCA GTCATCTGCA
 SEQ ID NO: 6 : AAGCGTCCTT TCTACAAGAT AATTGCTCTG ATTGGCTCCA GTCATCTGCA
 SEQ ID NO: 7 : AAGCGTCCTT TCTACAAGAT AATTGCTTTT ATTGGCTCCA GTCATCTGCA

351 400
 SEQ ID NO: 5 : AGCAACTCCA GCTGTGTTGG CAGACTTAAA TCAACCAGAG TATTATGCCA
 SEQ ID NO: 6 : AGCAACTCCA GCTGTGTTGG CAGACTTAAA TCAACCAGAG TATTATGCCA
 SEQ ID NO: 7 : AGCAACTCCA GCTGTGTTGG CAGACTTAAA TCAACCAGAG TATTATGCCA

401 450
 SEQ ID NO: 5 : CACTAACAGG TCGTTGTTTT CTTCCTCACC GACTCGGATT GATCCCACCG
 SEQ ID NO: 6 : CACTAACAGG TCGTTGTTTT CTTCCTCACC GACTCGGATT GATCCCACCG
 SEQ ID NO: 7 : CACTAACAGG TCGTTGTTTT CTTCCTCACC GACTCGGATT GATCCCACCG

451 500
 SEQ ID NO: 5 : ATGTTTAATG TGTCCGAAAC TTTCAGAAAA CCATTCAATA TTGGGATATA
 SEQ ID NO: 6 : ATGTTTAATG TGTCCGAAAC TTTCAGAAAA CCATTCAATA TTGGGATATA
 SEQ ID NO: 7 : ATGTTTAATG TGTCCGAAAC TTTCAGAAAA CCATTCAATA TTGGGATATA

501 550
 SEQ ID NO: 5 : CAAAGGGACT CTCGACTTCA CCTTTACAGT TTCAGATGAT GAGTCTAATG
 SEQ ID NO: 6 : CAAAGGGACT CTCGACTTCA CCTTTACAGT TTCAGATGAT GAGTCTAATG
 SEQ ID NO: 7 : CAAAGGGACT CTCGACTTCA CCTTTACAGT TTCAGATGAT GAGTCTAATG

551 600
 SEQ ID NO: 5 : AAAAAGTCCC TCATGTTTGG GAATACATGA ACCCAAATA TCAATCTCAG
 SEQ ID NO: 6 : AAAAAGTCCC TCATGTTTGG GAATACATGA ACCCAAATA TCAATCTCAG
 SEQ ID NO: 7 : AAAAAGTCCC TCATGTTTGG GAATACATGA ACCCAAATA TCAATCTCAG

601 650
 SEQ ID NO: 5 : ATCCAAAAAG AAGGGCTTAA ATTCCGATTG ATTTTAAGCA AGAAAGCAAC
 SEQ ID NO: 6 : ATCCAAAAAG AAGGGCTTAA ATTCCGATTG ATTTTAAGCA AGAAAGCAAC
 SEQ ID NO: 7 : ATCCAAAAAG AAGGGCTTAA ATTCCGATTG ATTTTAAGCA AGAAAGCAAC

651 700
 SEQ ID NO: 5 : GGGAACTTGG GTGTTAGACC AATTGAGTCC GTTTAA
 SEQ ID NO: 6 : GGGAACTTGG GTGTTAGACC AATTGAGTCC GTTTAA
 SEQ ID NO: 7 : GGGAACTTGG GTGTTAGACC AATTGAGTCC GTTTAA

Tabla 5. Comparación de secuencias de aminoácidos entre proteínas M del VSV de la forma natural del serotipo Nueva Jersey (SEC ID NO: 8) y los mutantes G22E/M48R+M51R (SEC ID NO: 9) y G22E/L110F/M48R+M51R (SEC ID NO: 10)

1 22 48 50
 SEQ ID NO: 8 :MSSFKKILGF SSKSHKKSCK LGLPPPYEES SPMEIQPSAP LSNDFFGMED
 SEQ ID NO: 9 :MSSFKKILGF SSKSHKKSCK LELPPPYEES SPMEIQPSAP LSNDFFGRED
 SEQ ID NO: 10:MSSFKKILGF SSKSHKKSCK LELPPPYEES SPMEIQPSAP LSNDFFGRED

51 100
 SEQ ID NO: 8 :MDLYDKDSL R YEKFREMLK TVRANKPFRS YDDVTAASVQ WDNSYIGMVG
 SEQ ID NO: 9 :RDLYDKDSL R YEKFREMLK TVRANKPFRS YDDVTAASVQ WDNSYIGMVG
 SEQ ID NO: 10:RDLYDKDSL R YEKFREMLK TVRANKPFRS YDDVTAASVQ WDNSYIGMVG

101 110 150
 SEQ ID NO: 8 :KRPFYKIIAL IGSSHLQATP AVLADLNQPE YYATLTGRCF LPHRLGLIPP
 SEQ ID NO: 9 :KRPFYKIIAL IGSSHLQATP AVLADLNQPE YYATLTGRCF LPHRLGLIPP
 SEQ ID NO: 10:KRPFYKIIAF IGSSHLQATP AVLADLNQPE YYATLTGRCF LPHRLGLIPP

151 200
 SEQ ID NO: 8 :MFNVSETRK PFNIGIYKGT LDFTFTVSDD ESNEKVPHVW EYMNPKYQSQ
 SEQ ID NO: 9 :MFNVSETRK PFNIGIYKGT LDFTFTVSDD ESNEKVPHVW EYMNPKYQSQ
 SEQ ID NO: 10:MFNVSETRK PFNIGIYKGT LDFTFTVSDD ESNEKVPHVW EYMNPKYQSQ

201 250
 SEQ ID NO: 8 :IQKEGLKFGL ILSKKATGTW VLDQLSPFK
 SEQ ID NO: 9 :IQKEGLKFGL ILSKKATGTW VLDQLSPFK
 SEQ ID NO: 10:IQKEGLKFGL ILSKKATGTW VLDQLSPFK

Tabla 6. Estudios de vacunación en ratones para respuestas de linfocitos T CD8+ de amplio espectro y respuestas inmunitarias humores contra proteínas del VIH-1

Grupos de vacunación	rVSV con proteínas del VIH-1	
	Sensibilización	Refuerzo
G1	rVSV _{Ind} (GLM)	rVSV _{NJ} (GM)
G2	rVSV _{Ind} (GLM)-VIH-1 Gag-En	rVSV _{NJ} (GM)-VIH-1 Gag-En
G3	rVSV _{Ind} (GLM)-VIH-1 Gp160mss	rVSV _{NJ} (GM)-VIH-1 Gp160mss
G4	rVSV _{Ind} (GLM)-VIH-1 Pol	rVSV _{NJ} (GM)-VIH-1 Pol
G5	rVSV _{Ind} (GLM)-VIH-1 Gag-En + rVSV _{Ind} (GLM)-Gp160mss + rVSV _{Ind} (GLM)-VIH-1 Pol	rVSV _{NJ} (GM)-VIH-1 Gag-En + rVSV _{NJ} (GM)-Gp160mss + rVSV _{NJ} (GM)-VIH-1 Pol
G6	rVSV _{Ind} (GLM)-VIH-1 Gag-A+ rVSV _{Ind} (GLM)-VIH-1 Gag-B+ rVSV _{Ind} (GLM)-VIH-1 Gag-C	rVSV _{NJ} (GM)-VIH-1 Gag-A+ rVSV _{NJ} (GM)-VIH-1 Gag-B+ rVSV _{NJ} (GM)-VIH-1 Gag-C

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> KANG, Chil-Yong KIM, Gyoung Nyoun	
5	<120> Virus de la estomatitis vesicular para vacunas de sensibilización y refuerzo	
	<130> 118494.97	
	<150> US 61/579,902	
10	<151> 23-12-2011	
	<160> 37	
	<170> PatentIn versión 3.5	
15	<210> 1	
	<211> 690	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Sintético: Genes de VSV serotipo Indiana, tipo silvestre	
	<400> 1	
	atgagttcct taaagaagat tctcggctctg aaggggaaag gtaagaaatc taagaaatta	60
	gggatcgac caccacctta tgaagaggac actaacatgg agtatgctcc gagcgctcca	120
	attgacaaat cctatttttg agttgacgag atggacactc atgatccgca tcaattaaga	180
	tatgagaaat tcttctttac agtgaaaatg acggtagat etaatcgctc gtccagaaca	240
	tactcagatg tggcagccgc tgtatcccat tgggatcaca tgtacatcgg aatggcaggg	300
	aaacgtccct tctacaagat cttggctttt ttgggttctt ctaatctaaa ggccactcca	360
	gcggtatttg cagatcaagg tcaaccagag tatcacgctc actgtgaagg cagggcttat	420
	ttgccacaca gaatggggaa gaccctccc atgtcaatg taccagagca cttcagaaga	480
	ccattcaata taggtcttta caagggaaacg gttgagctca caatgacat ctacgatgat	540
	gagtcactgg aagcagctcc tatgatctgg gatcatttca attcttccaa attttctgat	600
	ttcagagata aggccttaat gtttggcctg attgtcgaga aaaaggcatc tggagcttgg	660
25	gtcctggatt ctgtcagcca cttcaaatga	690
	<210> 2	
	<211> 690	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sintético: Mutante G21E/L111F/M51R	
35	<400> 2	
	atgagttcct taaagaagat tctcggctctg aaggggaaag gtaagaaatc taagaaatta	60
	gaaatcgac caccacctta tgaagaggac actaacatgg agtatgctcc gagcgctcca	120
	attgacaaat cctatttttg agttgacgag agggacactc atgatccgca tcaattaaga	180

tatgagaaat tcttctttac agtgaaaatg acggtttagat ctaatcgtcc gttcagaaca 240
 tactcagatg tggcagccgc tgtatcccat tgggatcaca tgtacatcgg aatggcaggg 300
 aaacgtccct tctacaagat cttggctttt ttggttctt ctaatctaaa ggccactcca 360
 gcggtattgg cagatcaagg tcaaccagag tatcacgctc actgtgaagg cagggcttat 420
 ttgccacaca gaatggggaa gacccctccc atgctcaatg taccagagca cttcagaaga 480
 ccattcaata taggtcttta caagggaaacg gttgagctca caatgaccat ctacgatgat 540
 gagtcactgg aagcagctcc tatgatctgg gatcatttca attcttccaa attttctgat 600
 ttcagagata aggccttaat gtttggcctg attgtcgaga aaaaggcatc tggagcttgg 660
 gtcctggatt ctgtcagcca cttcaaatga 690

<210> 3
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético: VSV serotipo Indiana tipo silvestre

<400> 3
 Met Ser Ser Leu Lys Lys Ile Leu Gly Leu Lys Gly Lys Gly Lys Lys
 1 5 10 15
 Ser Lys Lys Leu Gly Ile Ala Pro Pro Tyr Glu Glu Asp Thr Asn
 20 25 30
 Met Glu Tyr Ala Pro Ser Ala Pro Ile Asp Lys Ser Tyr Phe Gly Val
 35 40 45
 Asp Glu Met Asp Thr His Asp Pro His Gln Leu Arg Tyr Glu Lys Phe
 50 55 60
 Phe Phe Thr Val Lys Met Thr Val Arg Ser Asn Arg Pro Phe Arg Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ser Asp Val Ala Ala Ala Val Ser His Trp Asp His Met Tyr Ile
 85 90 95
 Gly Met Ala Gly Lys Arg Pro Phe Tyr Lys Ile Leu Ala Phe Leu Gly
 100 105 110
 Ser Ser Asn Leu Lys Ala Thr Pro Ala Val Leu Ala Asp Gln Gly Gln
 115 120 125
 Pro Glu Tyr His Ala His Cys Glu Gly Arg Ala Tyr Leu Pro His Arg
 130 135 140

Met Gly Lys Thr Pro Pro Met Leu Asn Val Pro Glu His Phe Arg Arg
145 150 155 160

Pro Phe Asn Ile Gly Leu Tyr Lys Gly Thr Val Glu Leu Thr Met Thr
165 170 175

Ile Tyr Asp Asp Glu Ser Leu Glu Ala Ala Pro Met Ile Trp Asp His
180 185 190

Phe Asn Ser Ser Lys Phe Ser Asp Phe Arg Asp Lys Ala Leu Met Phe
195 200 205

Gly Leu Ile Val Glu Lys Lys Ala Ser Gly Ala Trp Val Leu Asp Ser
210 215 220

Val Ser His Phe Lys
225

<210> 4

5 <211> 229

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Sintético: Mutante G21E/L111F/M51R

<400> 4

Met Ser Ser Leu Lys Lys Ile Leu Gly Leu Lys Gly Lys Gly Lys Lys
1 5 10 15

Ser Lys Lys Leu Glu Ile Ala Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Asp Thr Asn
20 25 30

Met Glu Tyr Ala Pro Ser Ala Pro Ile Asp Lys Ser Tyr Phe Gly Val
35 40 45

Asp Glu Arg Asp Thr His Asp Pro His Gln Leu Arg Tyr Glu Lys Phe
50 55 60

Phe Phe Thr Val Lys Met Thr Val Arg Ser Asn Arg Pro Phe Arg Thr
65 70 75 80

Tyr Ser Asp Val Ala Ala Ala Val Ser His Trp Asp His Met Tyr Ile
85 90 95

Gly Met Ala Gly Lys Arg Pro Phe Tyr Lys Ile Leu Ala Phe Phe Gly
100 105 110

Ser Ser Asn Leu Lys Ala Thr Pro Ala Val Leu Ala Asp Gln Gly Gln
115 120 125

Pro Glu Tyr His Ala His Cys Glu Gly Arg Ala Tyr Leu Pro His Arg
130 135 140

Met Gly Lys Thr Pro Pro Met Leu Asn Val Pro Glu His Phe Arg Arg
145 150 155 160

Pro Phe Asn Ile Gly Leu Tyr Lys Gly Thr Val Glu Leu Thr Met Thr
165 170 175

Ile Tyr Asp Asp Glu Ser Leu Glu Ala Ala Pro Met Ile Trp Asp His
180 185 190

Phe Asn Ser Ser Lys Phe Ser Asp Phe Arg Asp Lys Ala Leu Met Phe
195 200 205

Gly Leu Ile Val Glu Lys Lys Ala Ser Gly Ala Trp Val Leu Asp Ser
210 215 220

Val Ser His Phe Lys
225

5 <210> 5
<211> 686
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Sintético: VSV serotipo New Jersey tipo silvestre

<400> 5
atgagttcct tcaaaaagat tctgggattt tcttcaaaaa gtcacaagaa atcaaagaaa 60
ctaggcttgc cacctcctta tgaggaatca agtcctatgg agattcaacc atctgcccca 120
ttatcaaatg acttcttcgg aatggaggat atggatttat atgataagga ctccttgaga 180
tatgagaagt tccgctttat gttgaagatg actgtagag ctaacaagcc cttcagatcg 240
tatgatgatg tcaccgcagc ggtatcacaa tgggataatt catacattgg aatgggttga 300
aagcgtcctt tctacaagat aattgctctg attggctcca gtcattctga agcaactcca 360
gctgtgttgg cagacttaaa tcaaccagag tattatgcca cactaacagg tcgttggttt 420
cttcctcacc gactcggatt gatcccaccg atgtttaatg tgtccgaaac tttcagaaaa 480
ccattcaata ttgggatata caaagggact ctgcacttca cctttacagt ttcagatgat 540
gagtcctaag aaaaagtcct tcatgtttgg gaatacatga acccaaaata tcaatctcag 600
atccaaaaag aagggtctaa attcggattg attttaagca agaaagcaac ggggaacttgg 660
gtgttagacc aattgagtcc gtttaa 686

15 <210> 6
<211> 686
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Sintético: G22E/M48R+M51R

<400> 6
atgagttcct tcaaaaagat tctgggattt tcttcaaaaa gtcacaagaa atcaaagaaa 60
ctagaattgc cacctcctta tgaggaaatca agtcctatgg agattcaacc atctgccccca 120
ttatcaaagt acttcttcgg aaggaggat agggatttat atgataagga ctcccttgaga 180
tatgagaagt tccgctttat gttgaagatg actgttagag ctaacaagcc cttcagatcg 240
tatgatgatg tcaccgcagc ggtatcacia tgggataatt catacattgg aatgggttga 300
aagcgtcctt tctacaagat aattgctctg attggctcca gtcattctgca agcaactcca 360
gctgtgttgg cagacttaaa tcaaccagag tattatgcca cactaacagg tcgttggttt 420
cttcctcacc gactcggatt gatcccaccg atgtttaatg tgtccgaaac tttcagaaaa 480
ccattcaata ttgggatata caaagggact ctgcacttca cttttacagt ttcagatgat 540
gagtctaagt aaaaagtccc tcatgtttgg gaatacatga acccaaaata tcaatctcag 600
atccaaaaag aagggtctaa attcggattg attttaagca agaaagcaac gggaaacttg 660
gtgttagacc aattgagtcg gtttaa 686

5 <210> 7
<211> 686
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Sintético: G22E/L110F/M48R+M51R

<400> 7
atgagttcct tcaaaaagat tctgggattt tcttcaaaaa gtcacaagaa atcaaagaaa 60
ctagaattgc cacctcctta tgaggaaatca agtcctatgg agattcaacc atctgccccca 120
ttatcaaagt acttcttcgg aaggaggat agggatttat atgataagga ctcccttgaga 180
tatgagaagt tccgctttat gttgaagatg actgttagag ctaacaagcc cttcagatcg 240
tatgatgatg tcaccgcagc ggtatcacia tgggataatt catacattgg aatgggttga 300
aagcgtcctt tctacaagat aattgctttt attggctcca gtcattctgca agcaactcca 360
gctgtgttgg cagacttaaa tcaaccagag tattatgcca cactaacagg tcgttggttt 420
cttcctcacc gactcggatt gatcccaccg atgtttaatg tgtccgaaac tttcagaaaa 480
ccattcaata ttgggatata caaagggact ctgcacttca cttttacagt ttcagatgat 540
gagtctaagt aaaaagtccc tcatgtttgg gaatacatga acccaaaata tcaatctcag 600
atccaaaaag aagggtctaa attcggattg attttaagca agaaagcaac gggaaacttg 660
gtgttagacc aattgagtcg gtttaa 686

15 <210> 8
<211> 229
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Sintético: VSV serotipo New Jersey tipo silvestre

ES 2 640 961 T3

<400> 8

Met Ser Ser Phe Lys Lys Ile Leu Gly Phe Ser Ser Lys Ser His Lys
1 5 10 15

Lys Ser Lys Lys Leu Gly Leu Pro Pro Tyr Glu Glu Ser Ser Pro
20 25 30

Met Glu Ile Gln Pro Ser Ala Pro Leu Ser Asn Asp Phe Phe Gly Met
35 40 45

Glu Asp Met Asp Leu Tyr Asp Lys Asp Ser Leu Arg Tyr Glu Lys Phe
50 55 60

Arg Phe Met Leu Lys Met Thr Val Arg Ala Asn Lys Pro Phe Arg Ser
65 70 75 80

Tyr Asp Asp Val Thr Ala Ala Val Ser Gln Trp Asp Asn Ser Tyr Ile
85 90 95

Gly Met Val Gly Lys Arg Pro Phe Tyr Lys Ile Ile Ala Leu Ile Gly
100 105 110

Ser Ser His Leu Gln Ala Thr Pro Ala Val Leu Ala Asp Leu Asn Gln
115 120 125

Pro Glu Tyr Tyr Ala Thr Leu Thr Gly Arg Cys Phe Leu Pro His Arg
130 135 140

Leu Gly Leu Ile Pro Pro Met Phe Asn Val Ser Glu Thr Phe Arg Lys
145 150 155 160

Pro Phe Asn Ile Gly Ile Tyr Lys Gly Thr Leu Asp Phe Thr Phe Thr
165 170 175

Val Ser Asp Asp Glu Ser Asn Glu Lys Val Pro His Val Trp Glu Tyr
180 185 190

Met Asn Pro Lys Tyr Gln Ser Gln Ile Gln Lys Glu Gly Leu Lys Phe
195 200 205

Gly Leu Ile Leu Ser Lys Lys Ala Thr Gly Thr Trp Val Leu Asp Gln
210 215 220

Leu Ser Pro Phe Lys
225

5

<210> 9

<211> 229

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Sintético: G22E/M48R+M51R

<400> 9

Met Ser Ser Phe Lys Lys Ile Leu Gly Phe Ser Ser Lys Ser His Lys
1 5 10 15

Lys Ser Lys Lys Leu Glu Leu Pro Pro Tyr Glu Glu Ser Ser Pro
20 25 30

Met Glu Ile Gln Pro Ser Ala Pro Leu Ser Asn Asp Phe Phe Gly Arg
35 40 45

Glu Asp Arg Asp Leu Tyr Asp Lys Asp Ser Leu Arg Tyr Glu Lys Phe
50 55 60

Arg Phe Met Leu Lys Met Thr Val Arg Ala Asn Lys Pro Phe Arg Ser
65 70 75 80

Tyr Asp Asp Val Thr Ala Ala Val Ser Gln Trp Asp Asn Ser Tyr Ile
85 90 95

Gly Met Val Gly Lys Arg Pro Phe Tyr Lys Ile Ile Ala Leu Ile Gly
100 105 110

Ser Ser His Leu Gln Ala Thr Pro Ala Val Leu Ala Asp Leu Asn Gln
115 120 125

Pro Glu Tyr Tyr Ala Thr Leu Thr Gly Arg Cys Phe Leu Pro His Arg
130 135 140

Leu Gly Leu Ile Pro Pro Met Phe Asn Val Ser Glu Thr Phe Arg Lys
145 150 155 160

Pro Phe Asn Ile Gly Ile Tyr Lys Gly Thr Leu Asp Phe Thr Phe Thr
165 170 175

Val Ser Asp Asp Glu Ser Asn Glu Lys Val Pro His Val Trp Glu Tyr
180 185 190

Met Asn Pro Lys Tyr Gln Ser Gln Ile Gln Lys Glu Gly Leu Lys Phe

195

200

205

Gly Leu Ile Leu Ser Lys Lys Ala Thr Gly Thr Trp Val Leu Asp Gln
210 215 220

Leu Ser Pro Phe Lys
225

5

<210> 10

<211> 229

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Sintético: G22E/L110F/M48R+M51R

ES 2 640 961 T3

<400> 10

Met Ser Ser Phe Lys Lys Ile Leu Gly Phe Ser Ser Lys Ser His Lys
1 5 10 15

Lys Ser Lys Lys Leu Glu Leu Pro Pro Tyr Glu Glu Ser Ser Pro
20 25 30

Met Glu Ile Gln Pro Ser Ala Pro Leu Ser Asn Asp Phe Phe Gly Arg
35 40 45

Glu Asp Arg Asp Leu Tyr Asp Lys Asp Ser Leu Arg Tyr Glu Lys Phe
50 55 60

Arg Phe Met Leu Lys Met Thr Val Arg Ala Asn Lys Pro Phe Arg Ser
65 70 75 80

Tyr Asp Asp Val Thr Ala Ala Val Ser Gln Trp Asp Asn Ser Tyr Ile
85 90 95

Gly Met Val Gly Lys Arg Pro Phe Tyr Lys Ile Ile Ala Phe Ile Gly
100 105 110

Ser Ser His Leu Gln Ala Thr Pro Ala Val Leu Ala Asp Leu Asn Gln
115 120 125

Pro Glu Tyr Tyr Ala Thr Leu Thr Gly Arg Cys Phe Leu Pro His Arg
130 135 140

Leu Gly Leu Ile Pro Pro Met Phe Asn Val Ser Glu Thr Phe Arg Lys
145 150 155 160

Pro Phe Asn Ile Gly Ile Tyr Lys Gly Thr Leu Asp Phe Thr Phe Thr
165 170 175

Val Ser Asp Asp Glu Ser Asn Glu Lys Val Pro His Val Trp Glu Tyr
180 185 190

Met Asn Pro Lys Tyr Gln Ser Gln Ile Gln Lys Glu Gly Leu Lys Phe
195 200 205

Gly Leu Ile Leu Ser Lys Lys Ala Thr Gly Thr Trp Val Leu Asp Gln
210 215 220

Leu Ser Pro Phe Lys
225

5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Sintético: gp41 HXB2(337-345)

<400> 11

Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu
1 5

15

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

20

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético: Nef HXB2(92-100)

<400> 12
 Lys Glu Lys Gly Gly Leu Asp Gly Leu
 5 1 5

<210> 13
 <213> 10
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético: Nef HXB2(128-137)

<400> 13
 Thr Pro Gly Pro Gly Val Arg Tyr Pro Leu
 1 5 10

<210> 14
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético: gp120 HXB2(584-592)

<400> 14
 Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu
 1 5 10

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético: gp120 HXB2(30-46)

<400> 15
 Ala Ala Glu Asn Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp
 1 5 10 15

Lys

<210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético: bucle v3 de gp120 de la subclase B

<400> 16
 Ser Ile Pro Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Thr Gly Asp
 1 5 10 15

<210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético: bucle v3 de gp120 de la subclase C

<400> 17
 Ser Val Arg Ile Gly Pro Gly Gln Thr Phe Tyr Ala Thr Gly Ala
 1 5 10 15
 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético: bucle v3 de gp120 de la subclase E
 <400> 18
 Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln Val Phe Tyr Arg Thr Gly Asp
 1 5 10 15
 <210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético: bucle v3 de gp120 de la subclase A
 <400> 19
 Ser Val Arg Ile Gly Pro Gly Gln Thr Phe Tyr Ala Thr Gly Asp
 1 5 10 15
 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético: bucle v3 de gp120 de la subclase D
 <400> 20
 Arg Thr Pro Ile Gly Leu Gly Gln Ala Leu Tyr Thr Thr Arg Asp
 1 5 10 15
 <210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético: bucle v3 de gp120 de la subclase F
 <400> 21
 Arg Ile Ser Leu Gly Pro Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Gly Glu
 1 5 10 15
 <210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético: bucle v3 de gp120 de la subclase G
 <400> 22
 Ser Ile Asn Leu Gly Pro Gly Gln Ala Ile Tyr Ala Thr Gly Ala
 1 5 10 15
 <210> 23
 <211> 41

- <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
5 <223> Sintético: región C3 de gp120 de la subclase B
- <400> 23
Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Val Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys
1 5 10 15
Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn
20 25 30
Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp
35 40
- 10 <210> 24
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 15 <220>
<223> Sintético: región C3 de gp120 de la subclase C
- <400> 24
Arg Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ala Gly Asn Ile Thr Cys Lys Ser
1 5 10 15
Asn Ile Arg Ser
20
- 20 <210> 25
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
<223> Sintético: región C3 de gp120 de la subclase E
- <400> 25
Gln Ala Asn Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Lys Ile Asn
1 5 10
- 30 <400> 26
<217> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Sintético: Multi gp 41CNE
- 40 <400> 26
Glu Leu Asp Lys Trp Ala
1 5
- 45 <210> 27
<213> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
<223> Sintético: RT HXB2(309-317)

<400> 27
 Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
 1 5

5 <210> 28
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <400>
 <223> Sintético: RT HXB2(171-190)

<400> 28
 Phe Arg Lys Gln Asn Pro Asp Ile Val Ile Tyr Gln Tyr Met Asp Asp
 1 5 10 15

Leu Tyr Val Gly
 20

15 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Sintético: RT HXB2(156-166)

<400> 29
 Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met Thr Lys
 1 5

25 <210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Sintético: Tat HXB2(2-11)

<400> 30
 Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp
 1 5 10

35 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Sintético: Rev HXB2(69-77)

45 <400> 31
 Pro Ala Glu Pro Val Pro Leu Gln Leu
 1 5

50 <210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético: VSV N275 (275-283)

55 <400> 32
 Met Pro Tyr Leu Ile Asp Phe Gly Leu
 1 5

<210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Sintético: Gag
 <400> 33
 10 Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile
 1 5
 <210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético: Env P18-R15K (315-329)
 20 <400> 34
 Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys
 1 5 10 15
 <210> 35
 <211> 20
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético: RT354 (354-373)
 30 <400> 35
 Arg Thr Lys Ile Glu Glu Leu Arg Gln His Leu Leu Arg Trp Gly Leu
 1 5 10 15
 Thr Thr Pro Asp
 20
 <210> 36
 35 <400> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Sintético: RT364 (464-483)
 <400> 36
 Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr Tyr Asp Pro Ser Lys Asp
 1 5 10 15
 Leu Ile Ala Glu
 20
 45 <210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Sintético: RT472 (472-482)
 <400> 37
 55 Val Tyr Tyr Asp Pro Ser Lys Asp Leu Ile Ala
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Una proteína matricial modificada (M) de un virus de la estomatitis vesicular (VSV) caracterizada porque la proteína modificada M comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por:
 - 5 (i) la SEQ ID NO: 3, que incluye las sustituciones siguientes: G21E/L111F/MS1R; y (ii) la SEQ ID NO: 8, que incluye las sustituciones siguientes: G22E/M48R/M51R.
2. La proteína modificada M de la reivindicación 1 caracterizada porque la SEQ ID NO: 8 incluye, además, la sustitución siguiente: L110F.
3. La proteína modificada M de la reivindicación 1 caracterizada porque dicha proteína modificada M comprende una
 10 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por: SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO: 10.
4. Un virus recombinante de estomatitis vesicular (rVSV) caracterizado porque dicho rVSV comprende una proteína matricial modificada (M), comprendiendo la proteína modificada M una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por: (i) SEQ ID NO: 3, que incluye las sustituciones siguientes: G21E/L111F/MS1R; y (ii) SEQ ID NO: 8, que incluye las sustituciones siguientes: G22E/M48R/M51R.
- 15 5. El rVSV de la reivindicación 4 caracterizado porque el rVSV es un rVSV quimérico que expresa una proteína de un patógeno extraño, preferentemente un patógeno viral, fúngico, bacteriano o parasitario, y siendo dicho rVSV quimérico capaz de inducir una respuesta inmunitaria a dicha proteína.
6. El rVSV de la reivindicación 4 caracterizado porque dicho rVSV se selecciona de (a) un virus recombinante de estomatitis vesicular de serotipo Indiana (rVSV_{Ind}), y en el que la proteína modificada M comprende la secuencia de
 20 aminoácidos de SEQ ID NO: 3, que incluye la sustitución siguiente: G21E/L111F/M51R, y (b) un virus recombinante de estomatitis vesicular de serotipo Nueva Jersey (rVSV_{NJ}), y comprendiendo la proteína modificada M la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, que incluye las sustituciones siguientes: G22E/M48R/M51R.
7. El rVSV de la reivindicación 6 caracterizado porque la proteína modificada M del rVSV_{Ind} está codificada por un gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, y la proteína M del rVSV_{NJ} está codificada por
 25 un gen que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO:7.
8. El rVSV de la reivindicación 6 caracterizado porque dicho rVSV es rVSV_{NJ} y la proteína modificada M incluye, además, la sustitución siguiente: L110F.
9. Una vacuna caracterizada porque la vacuna comprende una cantidad efectiva de uno o más virus recombinantes de estomatitis vesiculares atenuados (rVSVs), incluyendo los uno o más rVSV atenuados una proteína matricial
 30 modificada (M), comprendiendo la proteína modificada M una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por: (i) SEQ ID NO: 3, que incluye las sustituciones siguientes: G21E/L111F/M51R, y (ii) SEQ ID NO: 8, que incluye las sustituciones siguientes: G22E/M48R/M51R.
10. La vacuna de la reivindicación 9 caracterizada porque dicho rVSV se selecciona de: (a) un virus recombinante de estomatitis vesicular de serotipo Indiana (rVSV_{Ind}), y comprendiendo la proteína modificada M la secuencia de
 35 aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, que incluye la sustitución siguiente: G21E/L111F/M51R, y (b) un virus recombinante de estomatitis vesicular de serotipo Nueva Jersey (rVSV_{NJ}), y comprendiendo la proteína modificada M la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, que incluye las sustituciones siguientes: G22E/M48R/M51R.
11. La vacuna de la reivindicación 10 caracterizada porque dicho rVSV es rVSV_{NJ} y la proteína modificada M incluye, además, la sustitución siguiente: L110F.
12. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 9 to 11 caracterizada porque el rVSV es un rVSV quimérico que expresa una proteína de un patógeno extraño, preferentemente un patógeno viral, fúngico, bacteriano o parasitario, en particular un lentivirus o un virus de la hepatitis C, y siendo capaz dicho rVSV quimérico de inducir una respuesta inmunitaria a dicha proteína.
13. Una vacuna combinada de sensibilización y refuerzo caracterizada porque la vacuna combinada de
 45 sensibilización y refuerzo comprende: (a) una cantidad efectiva de una vacuna que comprende un virus recombinante de estomatitis vesicular atenuado (rVSV) de un serotipo que tiene una primera proteína modificada M que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4; y (b) una cantidad efectiva de una vacuna que comprende un rVSV de otro serotipo que tiene una segunda proteína modificada M que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9 o la SEQ ID NO: 10.
14. La vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de la reivindicación 13 caracterizada porque (a) es una
 50 vacuna de sensibilización y (b) es una vacuna de refuerzo.

15. La vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de la reivindicación 13 caracterizada porque los dos rVSV son rVSV quiméricos que expresan una proteína de un patógeno extraño, preferentemente un patógeno viral, fúngico, bacteriano o parasitario, en particular un lentivirus o un virus de la hepatitis C, y siendo capaces los dos rVSV quiméricos de inducir una respuesta inmunitaria a la proteína.

- 5 16. La vacuna combinada de sensibilización y refuerzo de una cualquiera de las reivindicaciones 13-15 caracterizada porque el serotipo de la vacuna (a) es Indiana y el serotipo de la vacuna (b) es Nueva Jersey.

- 10 17. Un estuche de administración que comprende: (a) una dosis de una cantidad efectiva de una vacuna que comprende un virus recombinante de estomatitis vesicular (rVSV) de serotipo Indiana (rVSV_{Ind}) que tiene una proteína modificada M que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, y (b) una dosis de una cantidad efectiva de una vacuna que comprende un rVSV de serotipo Nueva Jersey (rVSV_{NJ}) que tiene una proteína modificada M que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9 o la SEQ ID NO:10.

18. La vacuna de la reivindicación 9, 10, 11 o 12 para ser usada en la inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto.

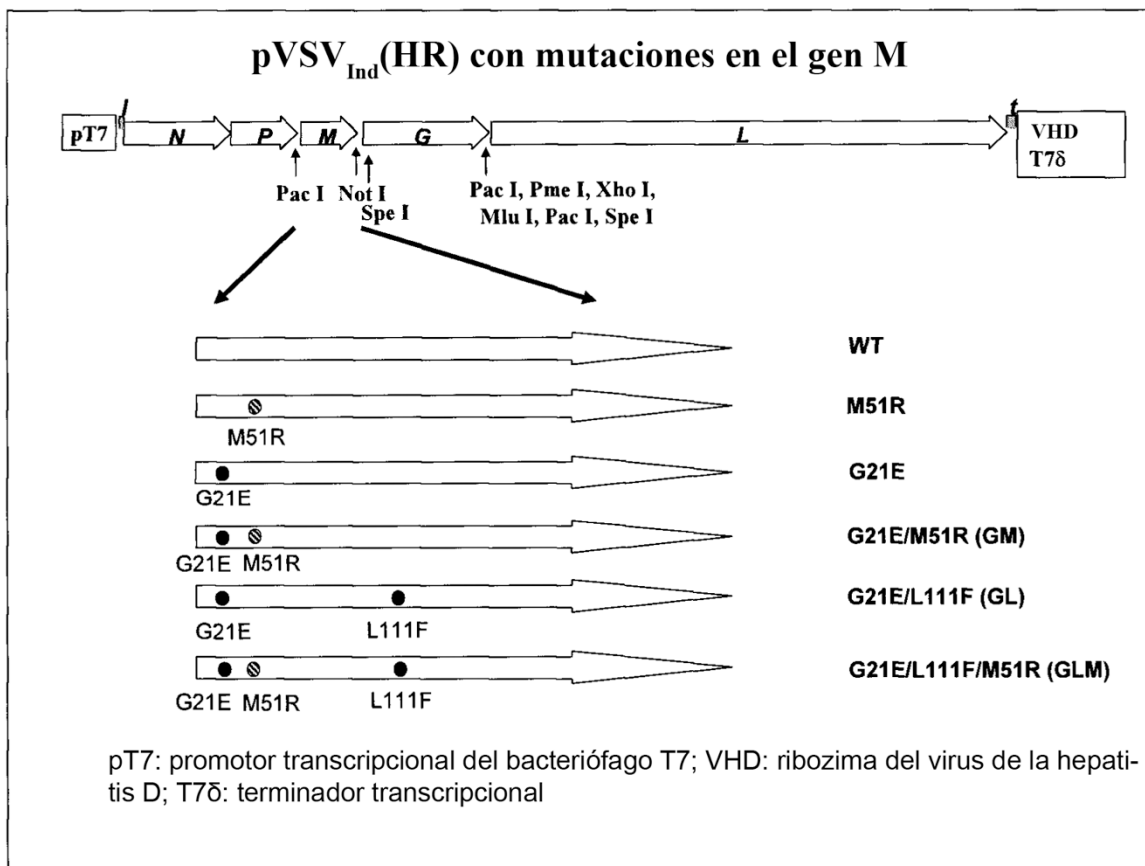


FIGURA 1

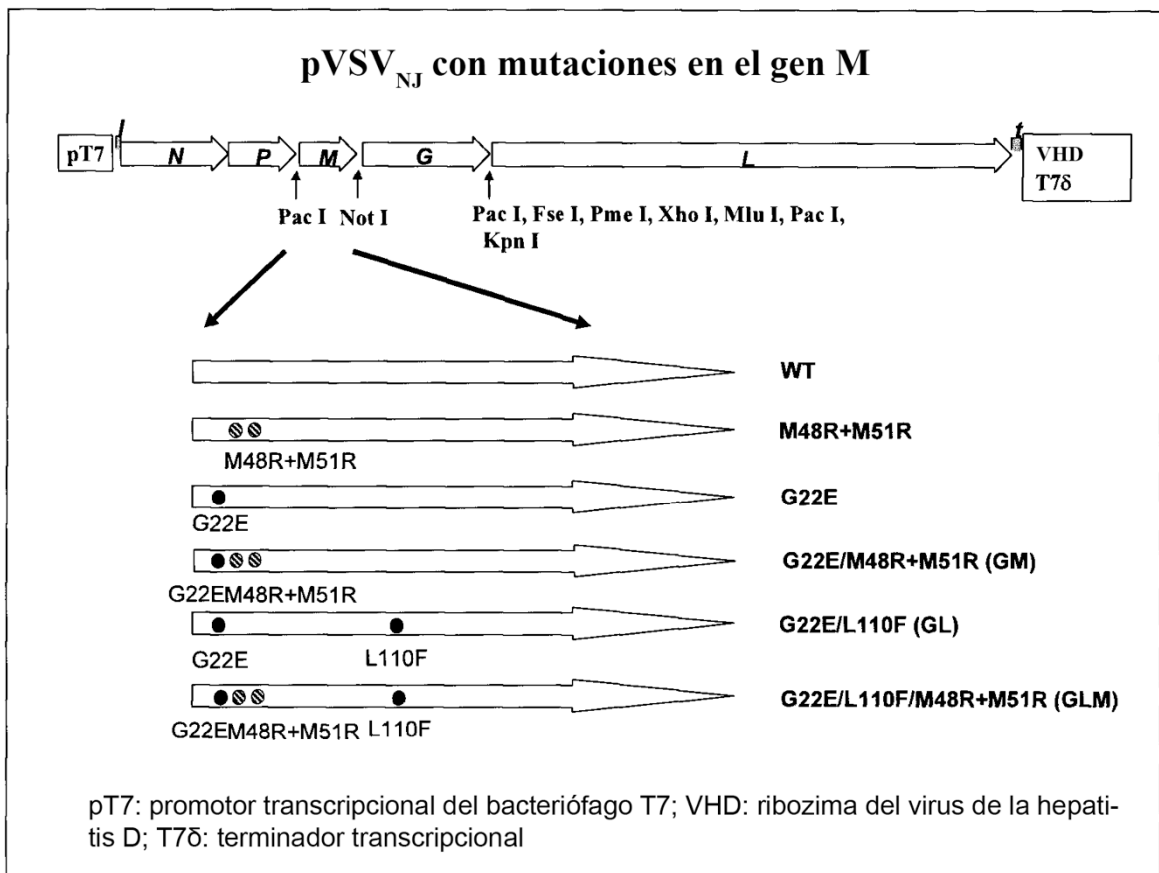
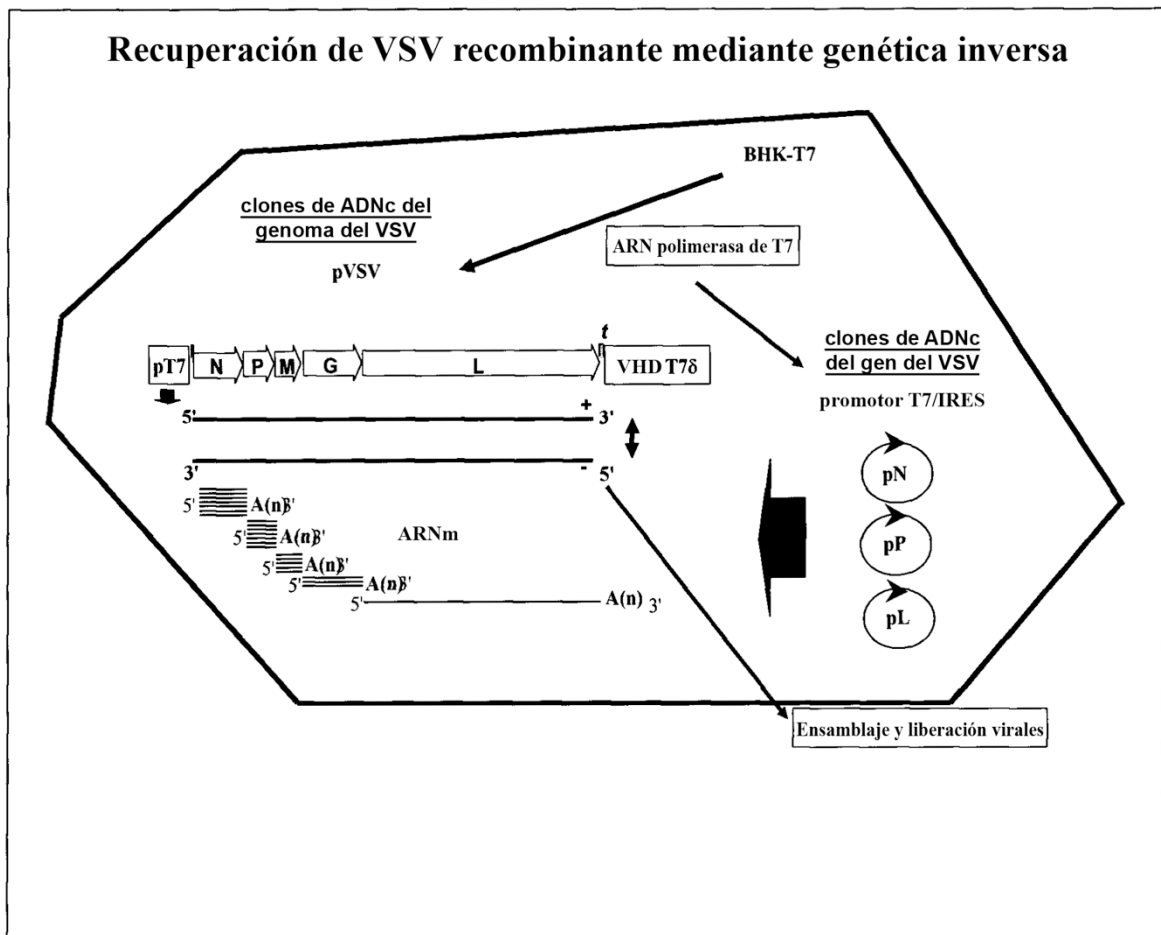


FIGURA 2



pVSV: clon de ADNc de longitud máxima del genoma del VSV; **BHK-T7:** células BHK21 constitutivas que expresan ARN polimerasa dependiente del ADN de T7;

pN: plásmido que expresa la proteína nucleocápside del VSV; **pP:** plásmido que expresa fosfoproteína del VSV;

pL: plásmido que expresa una proteína grande de VSV; **IRES:** sitio interno de entrada al ribosoma

FIGURA 3

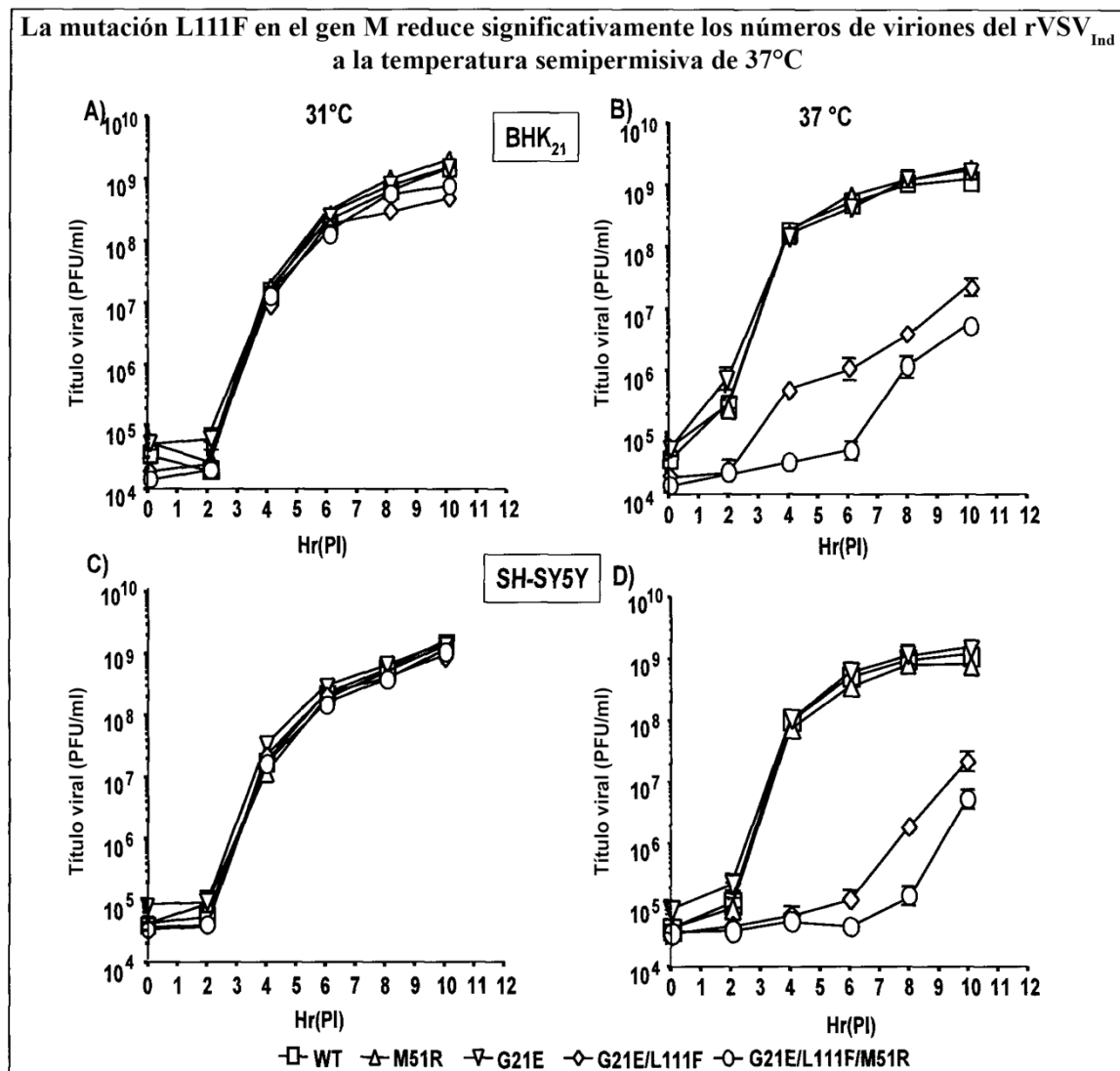


FIGURA 4

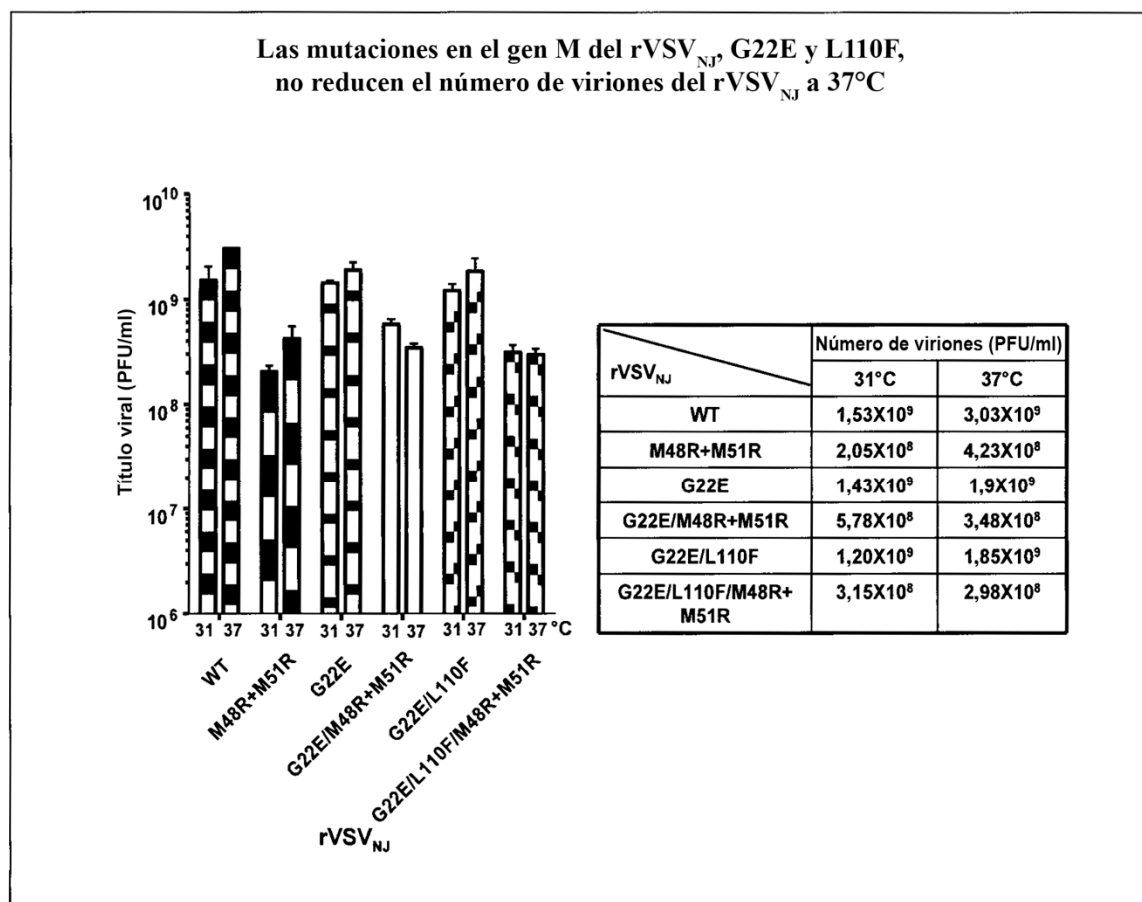


FIGURA 5

El defecto de ensamblaje por la mutación L111F en el gen M del rVSV_{Ind}[?] a temperatura semipermissiva, no afecta a la expresión de las proteínas del VSV

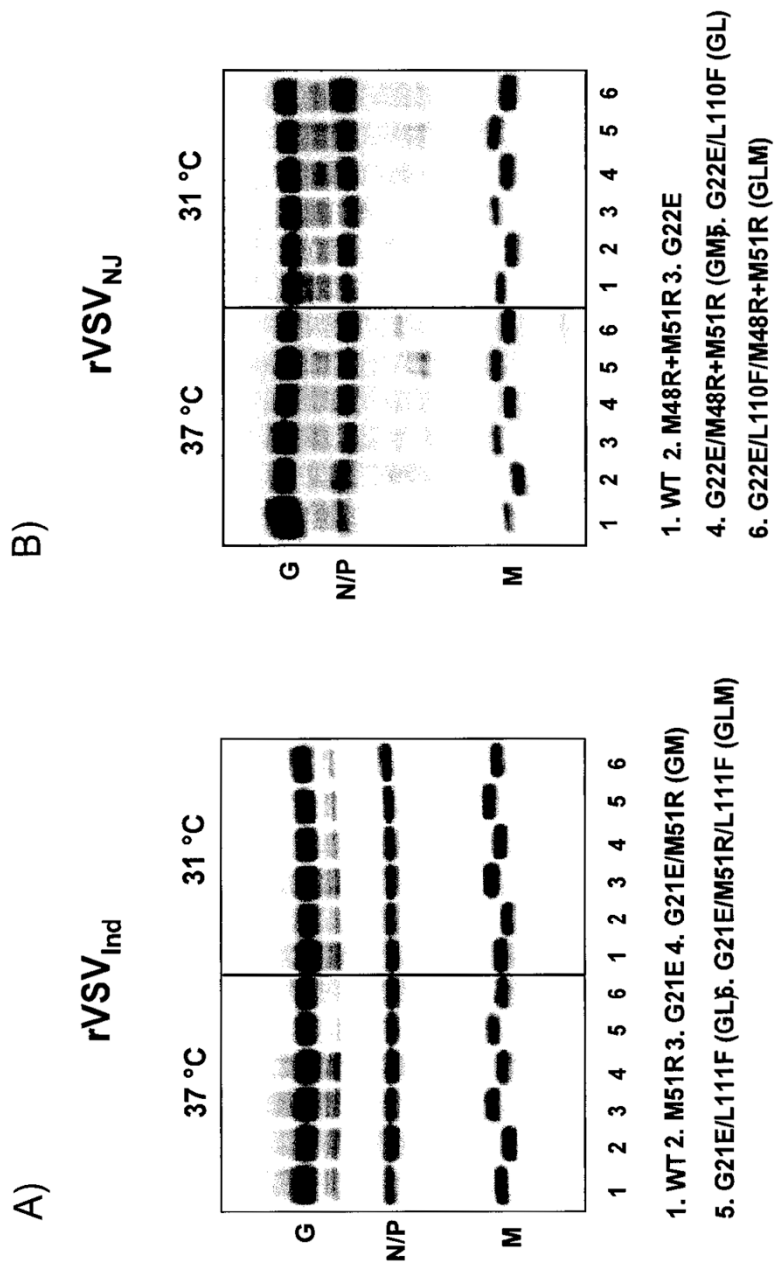


FIGURA 6

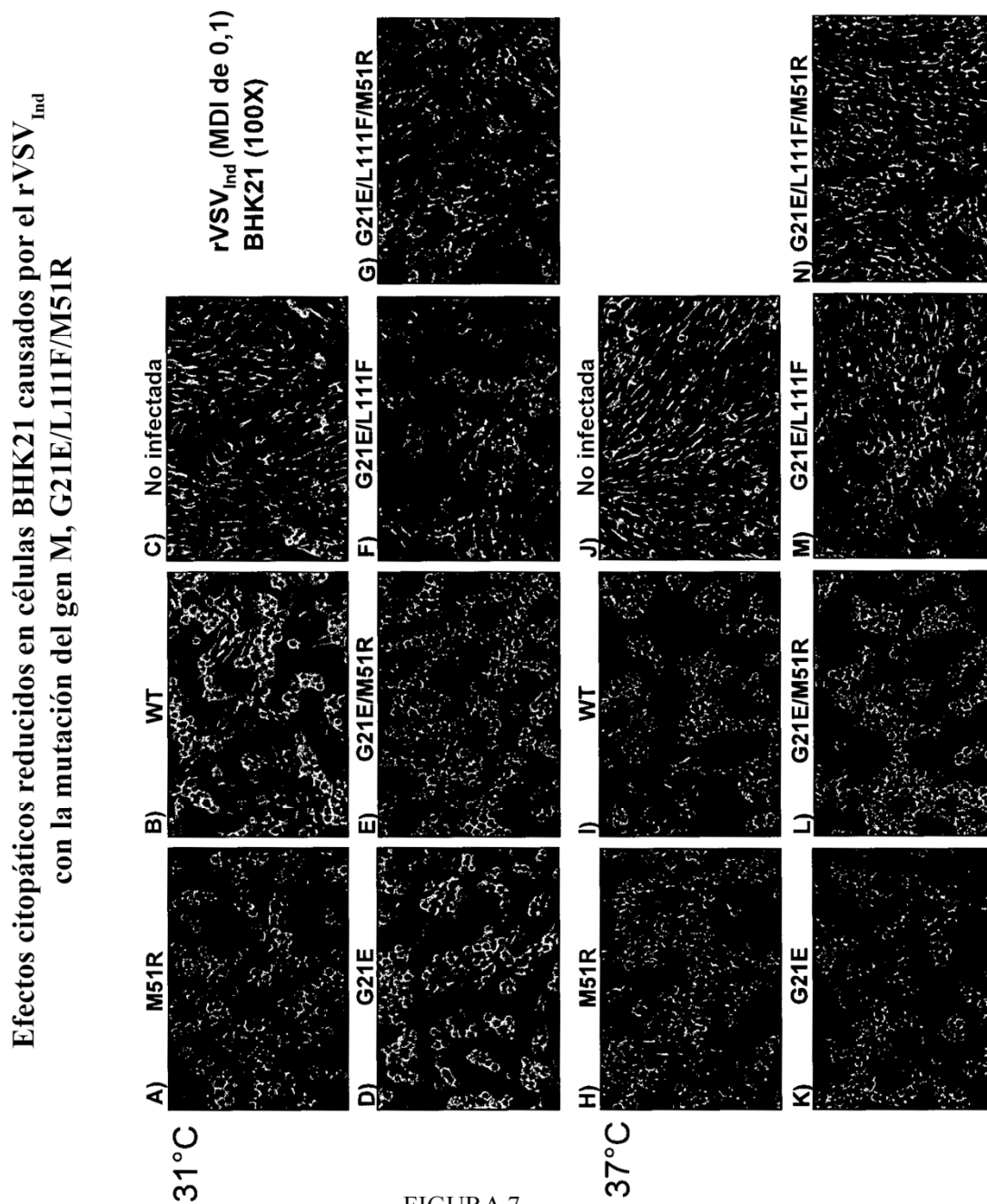


FIGURA 7

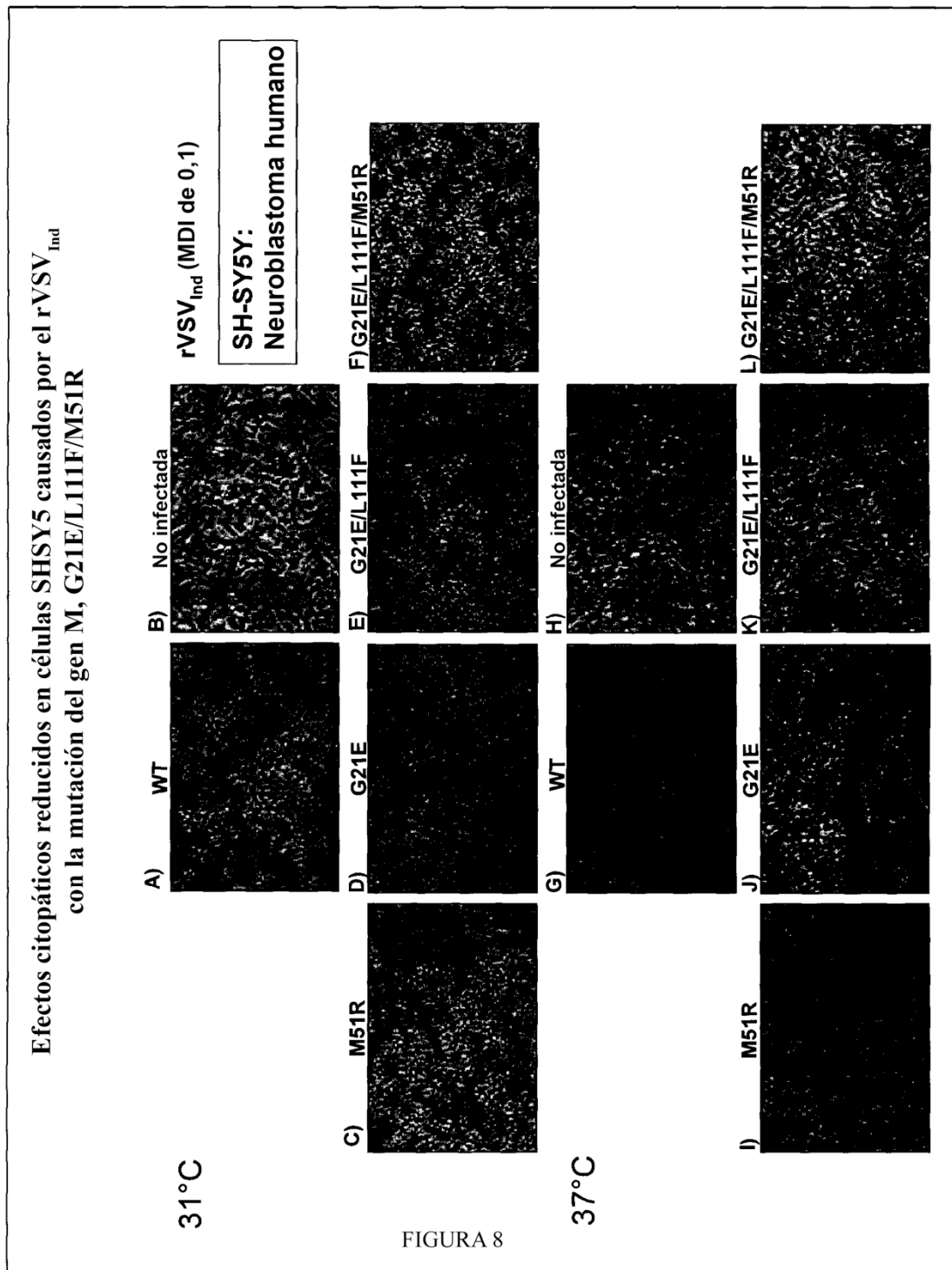
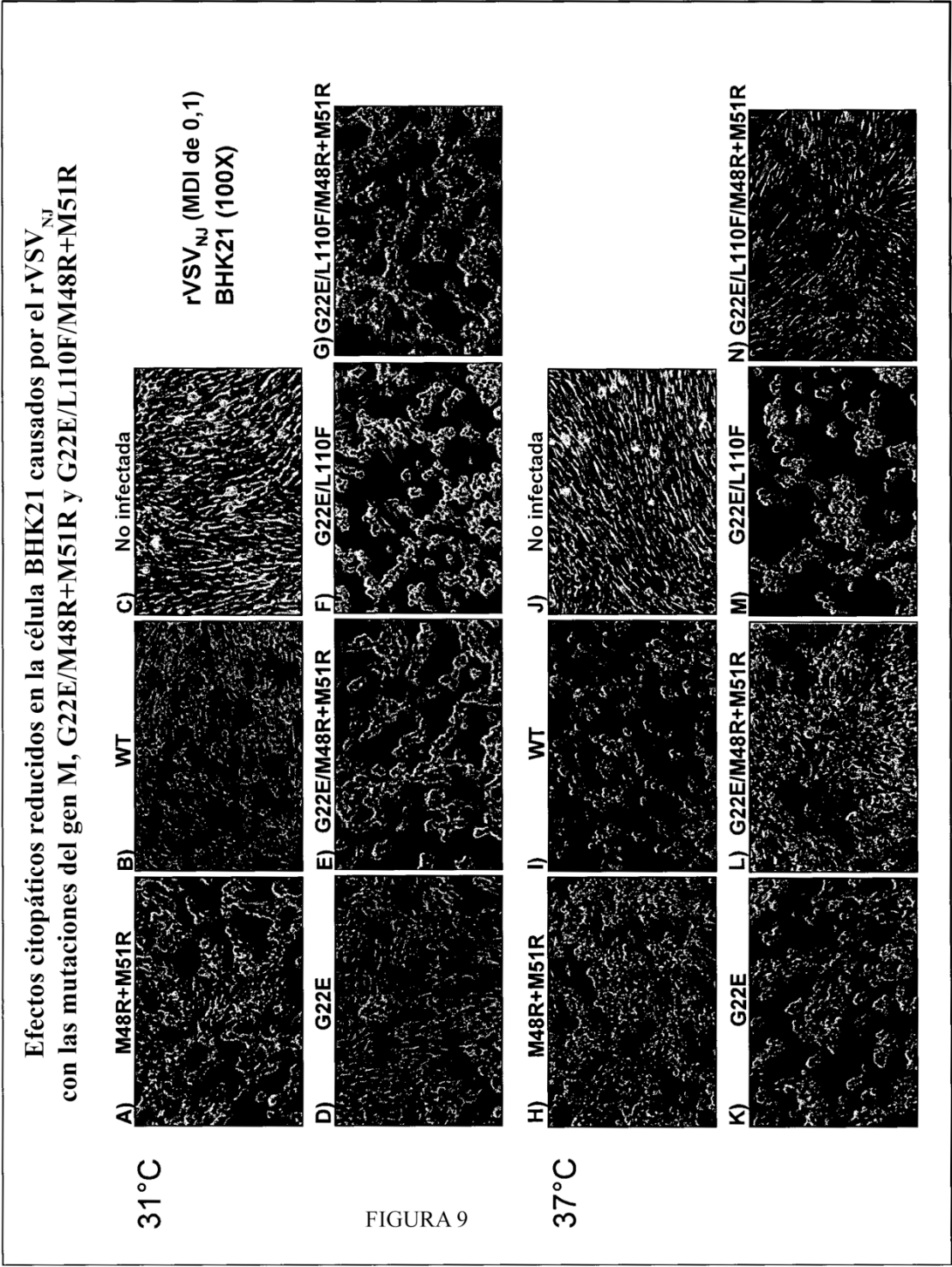


FIGURA 8



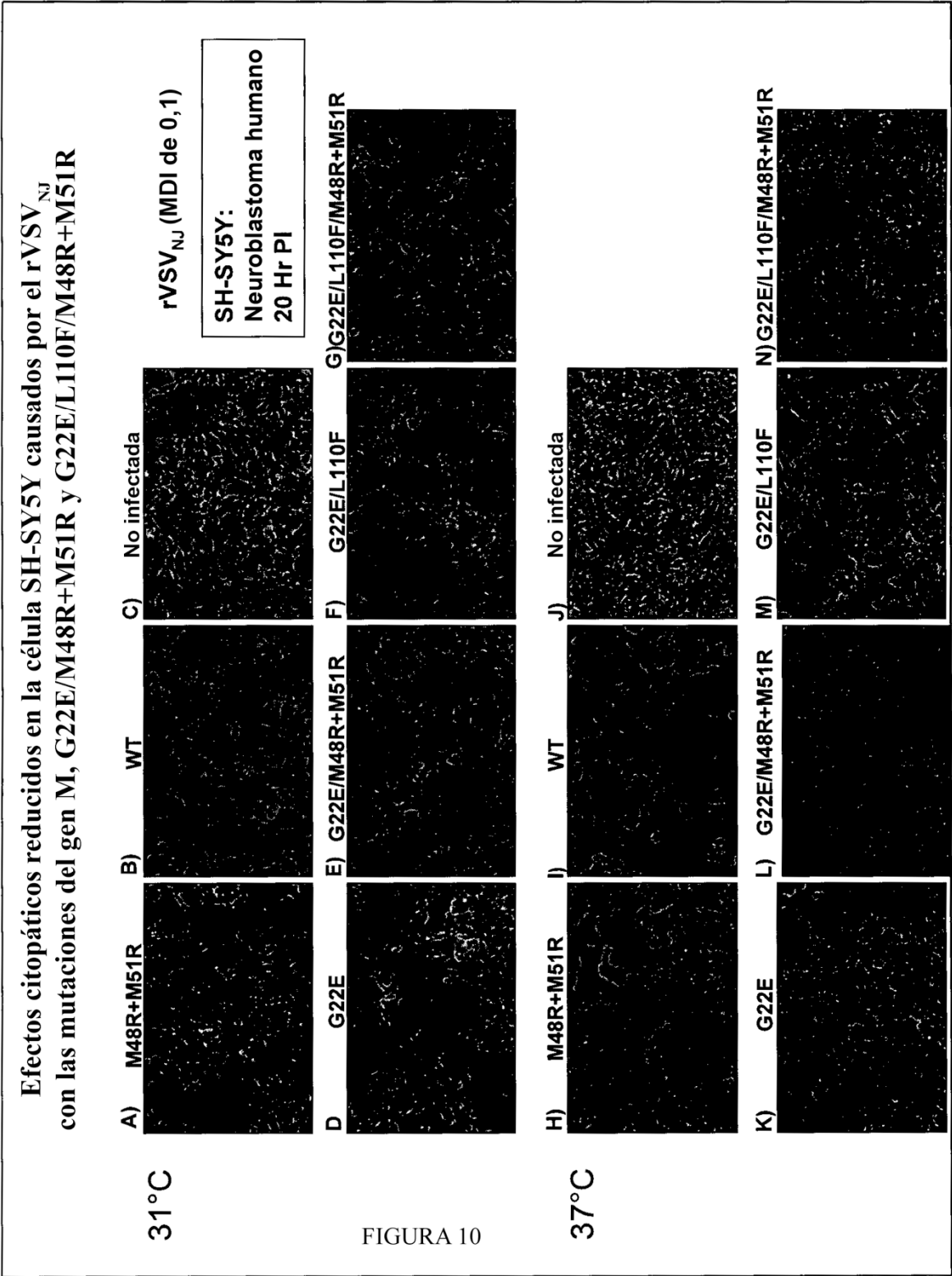


FIGURA 10

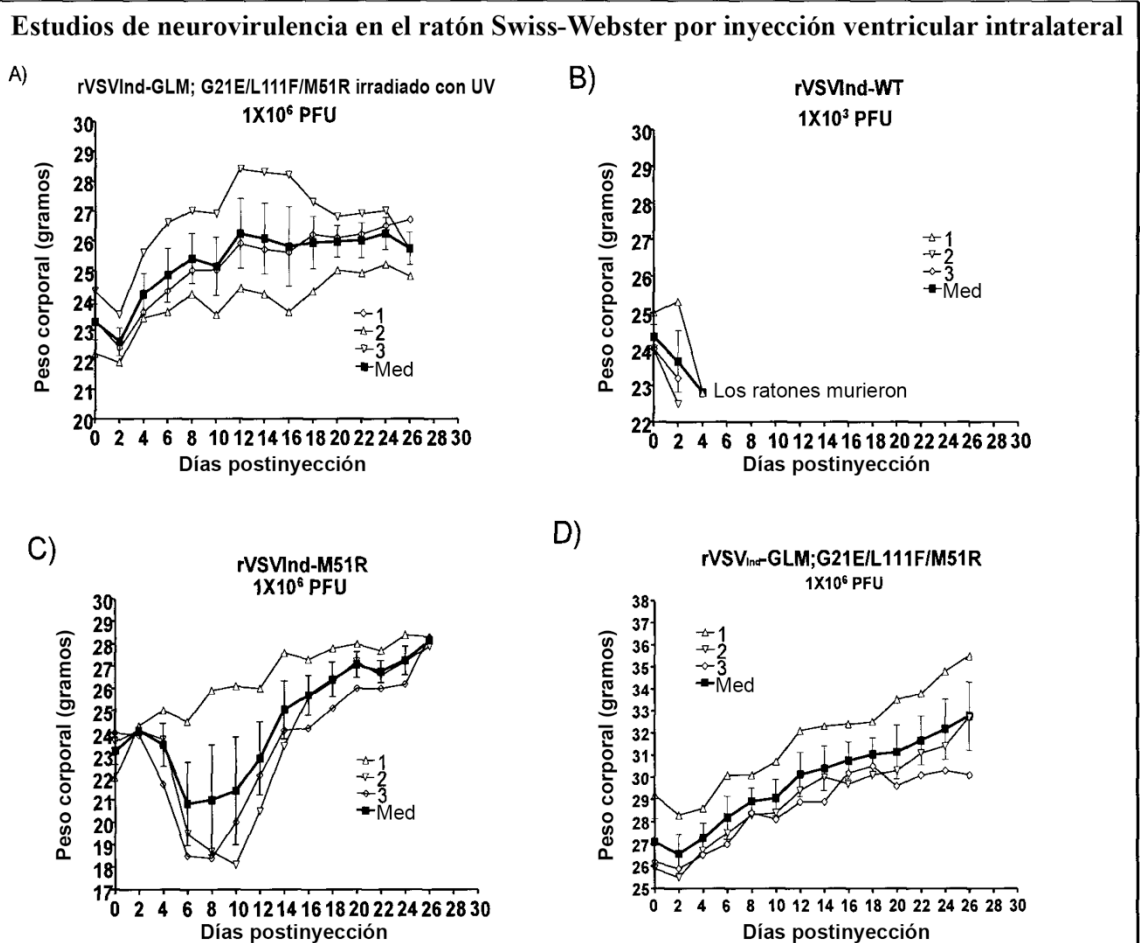


FIGURA 11

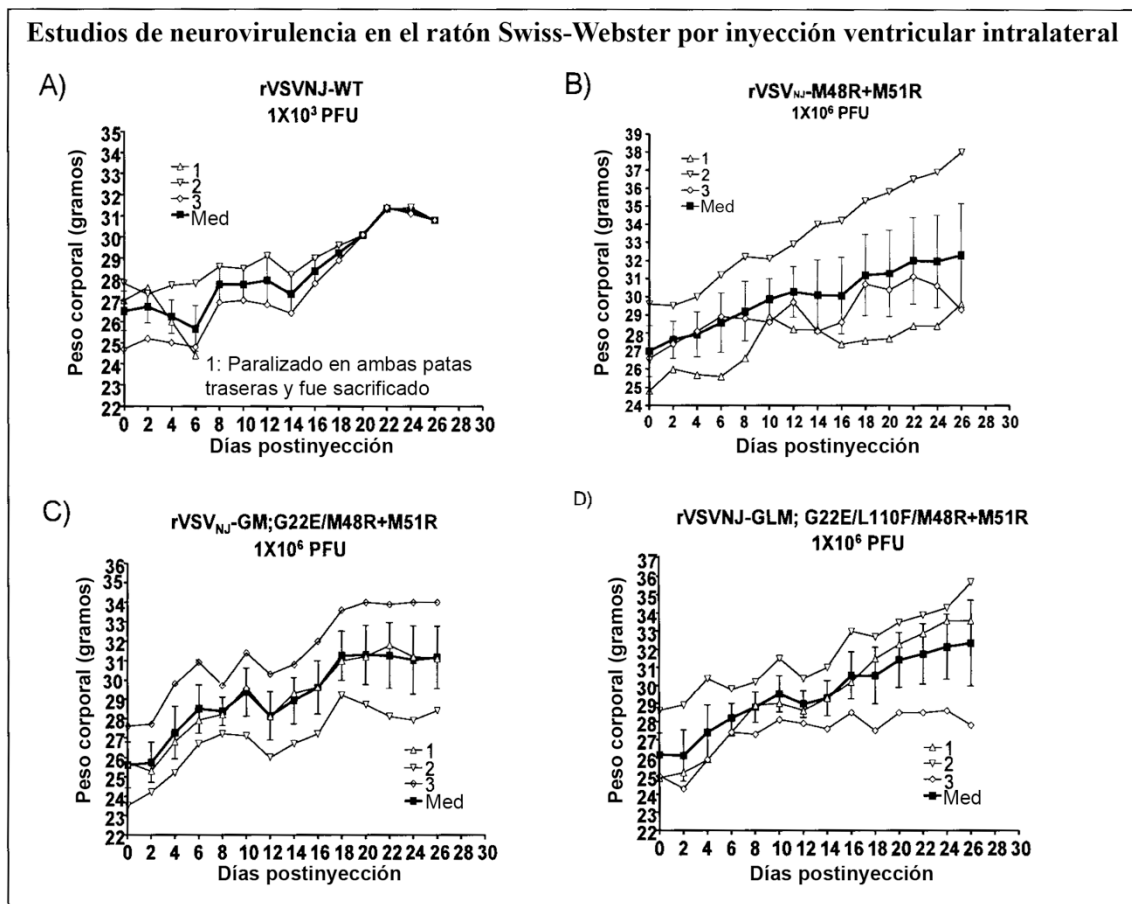
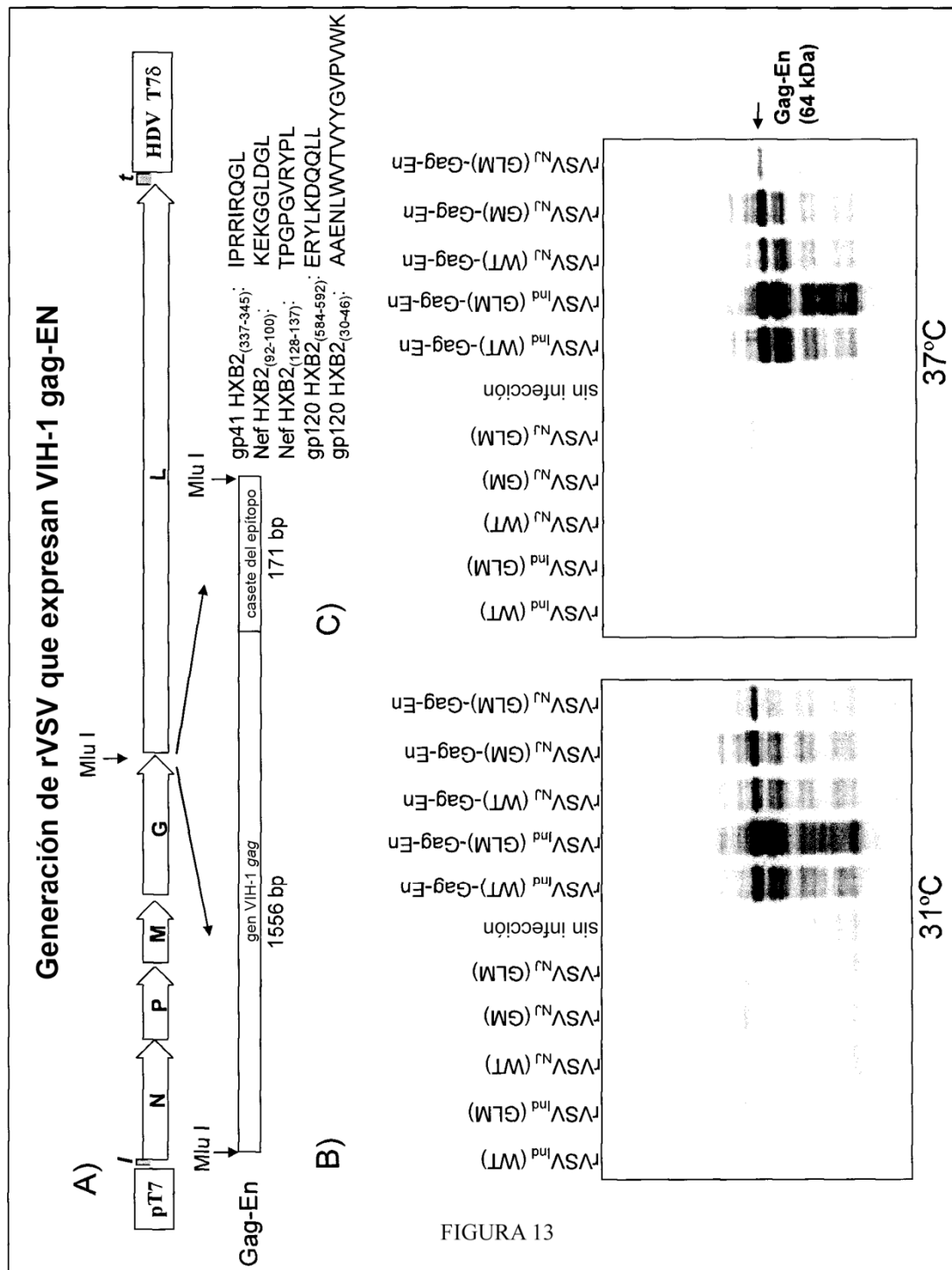


FIGURA 12



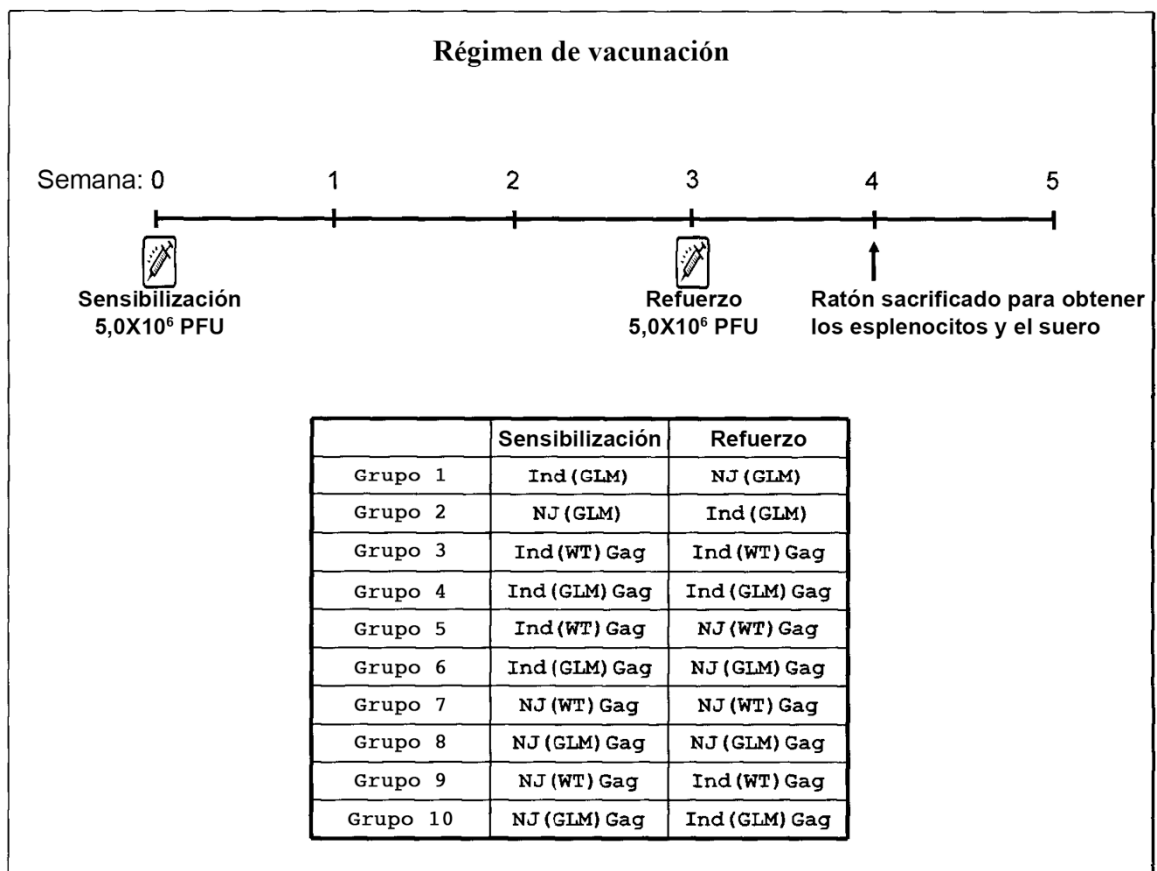


FIGURA 14

Linfocitos T CD8+IFN gamma+ estimulados por DMSO

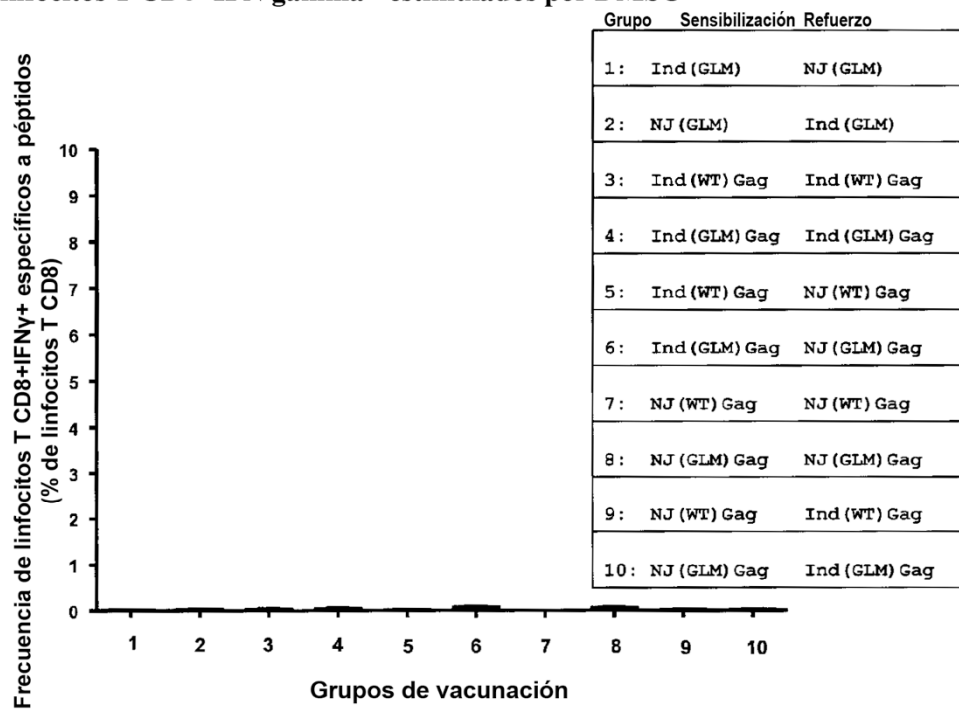


FIGURA 15

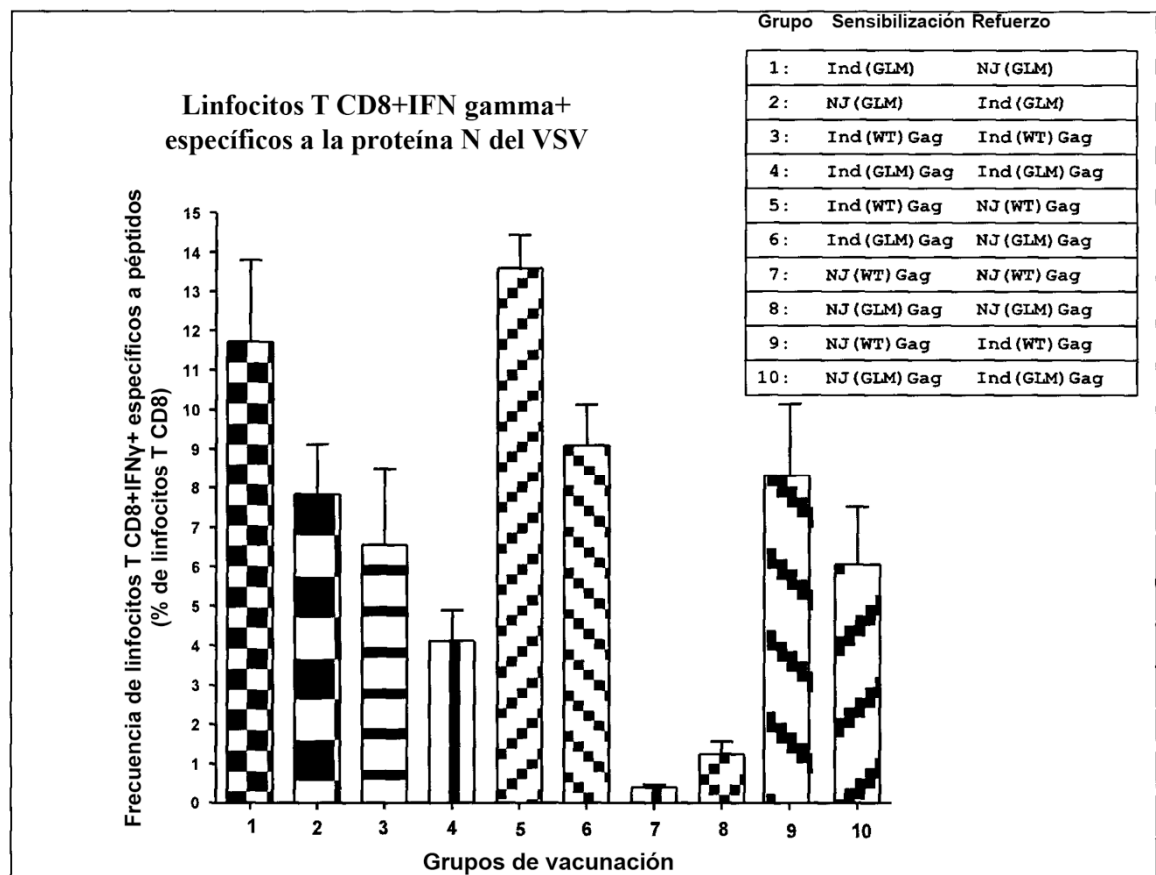


FIGURA 16

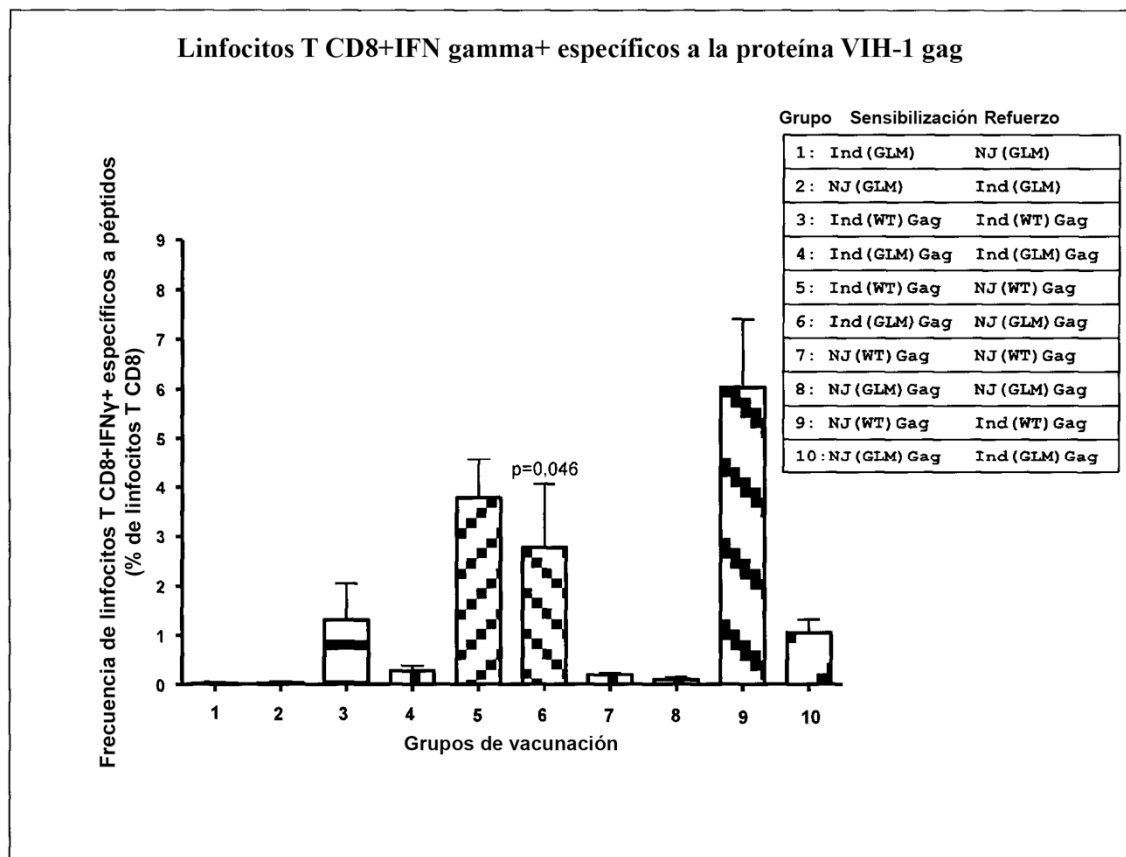


FIGURA 17

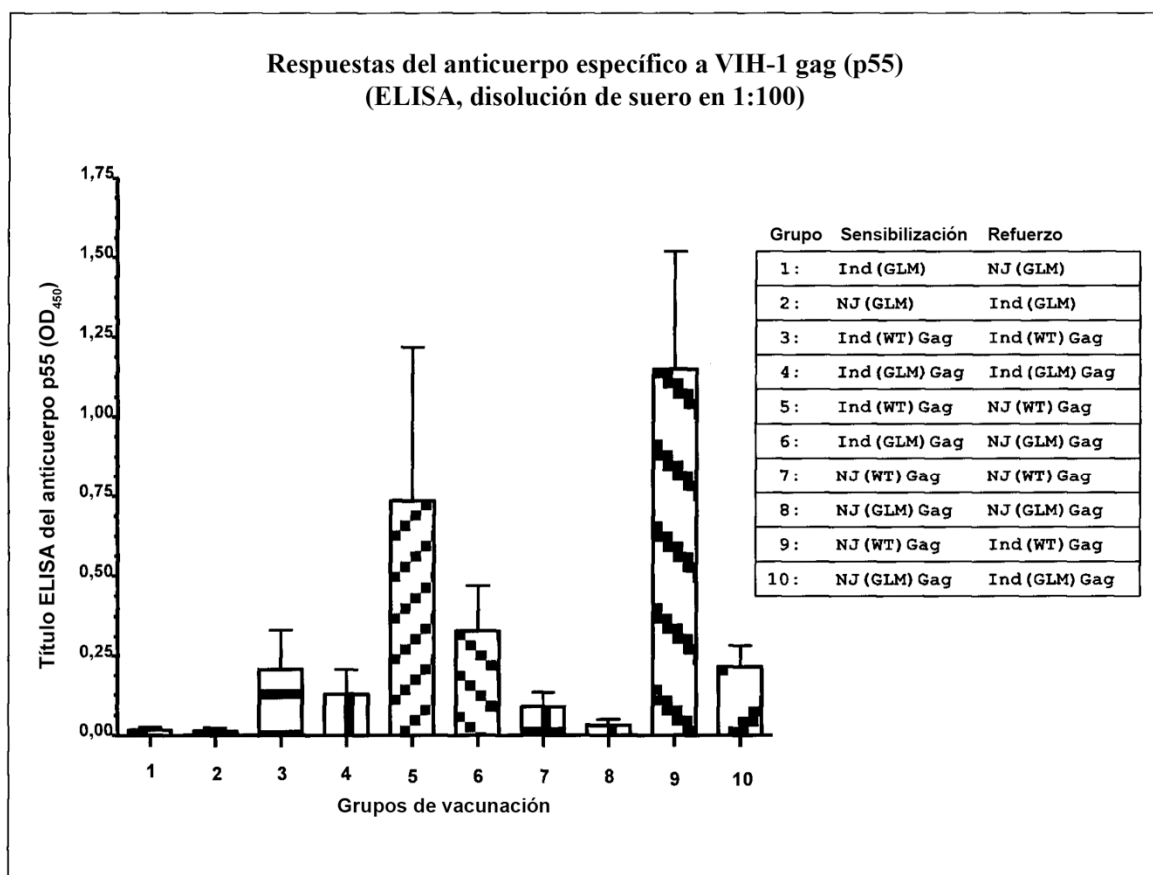


FIGURA 18

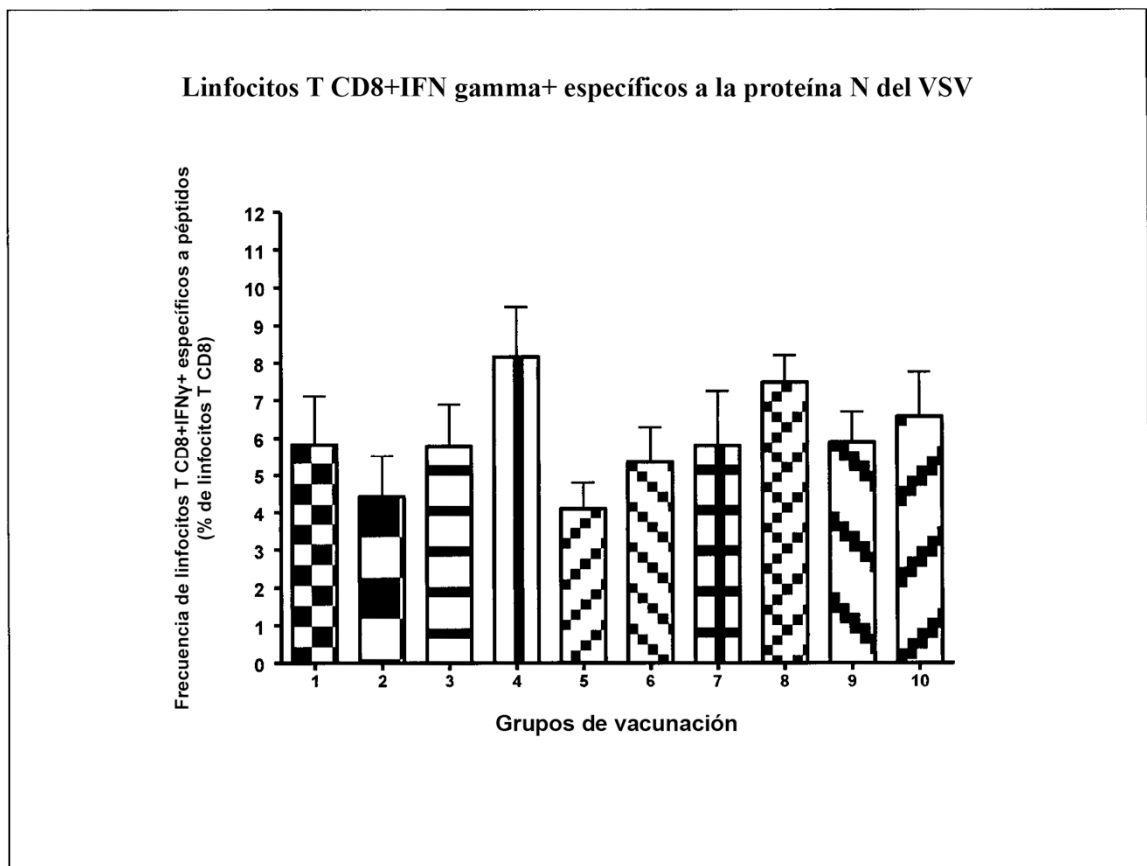


FIGURA 19

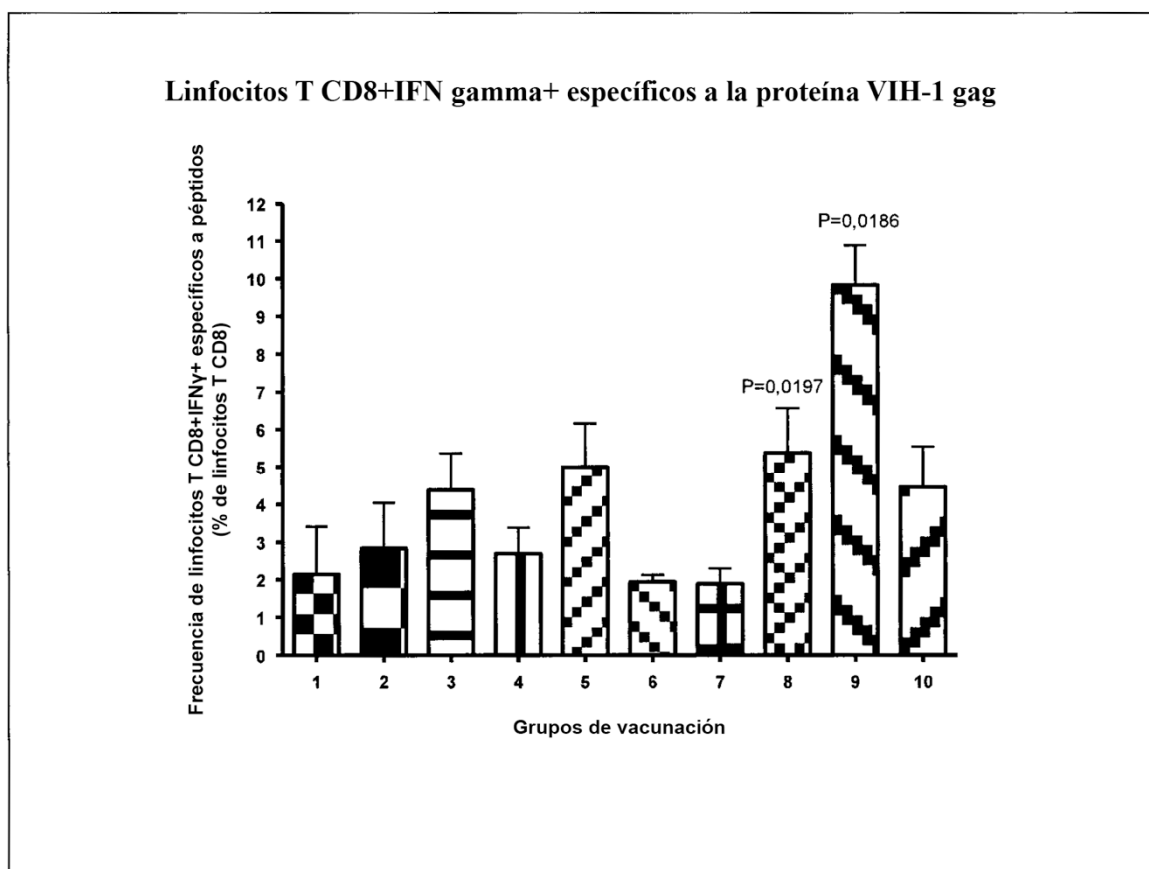


FIGURA 20

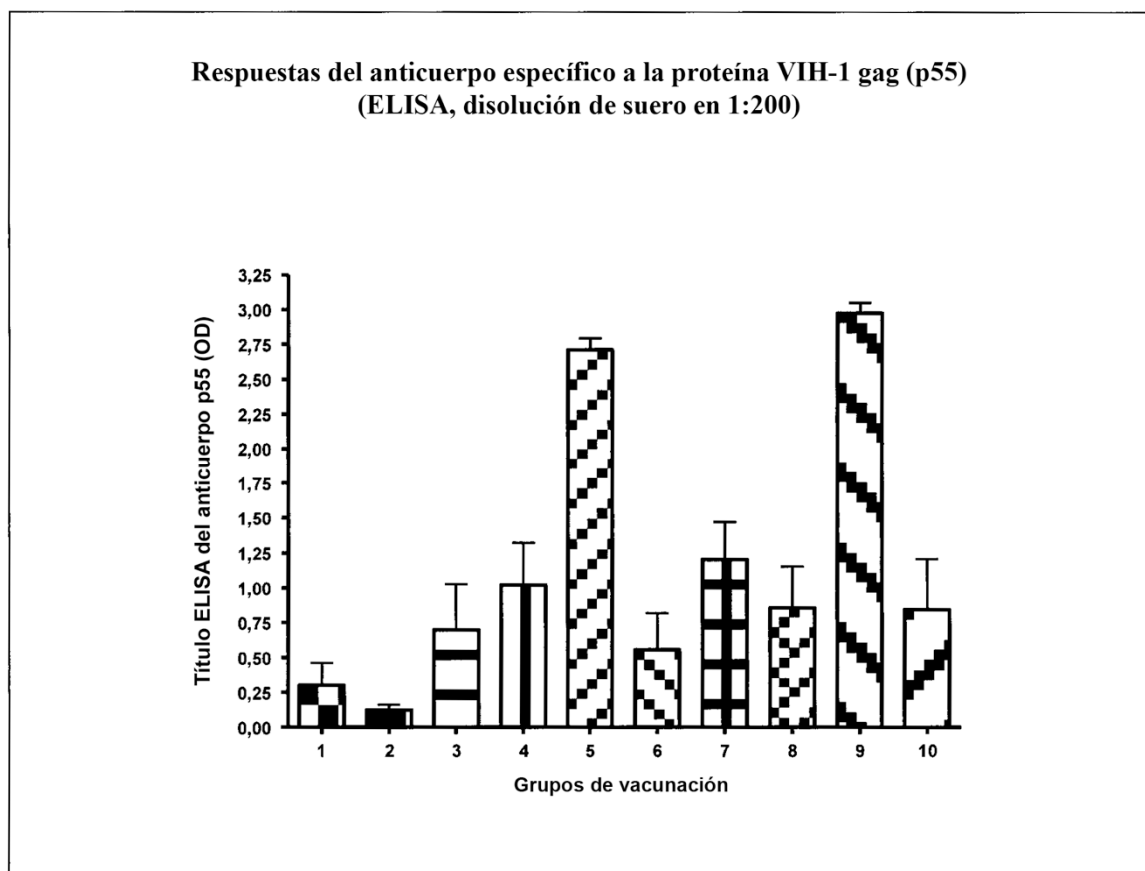


FIGURA 21

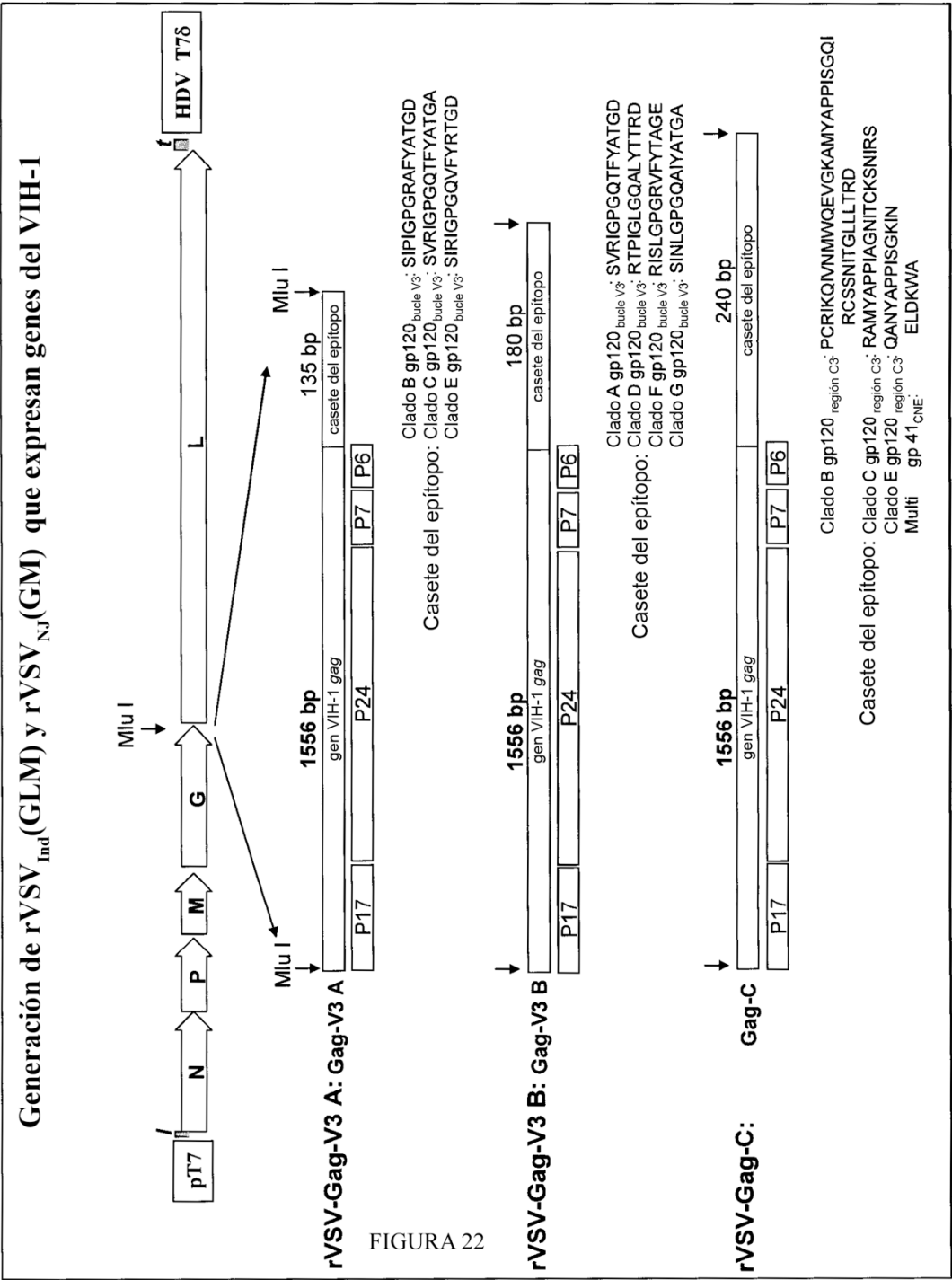
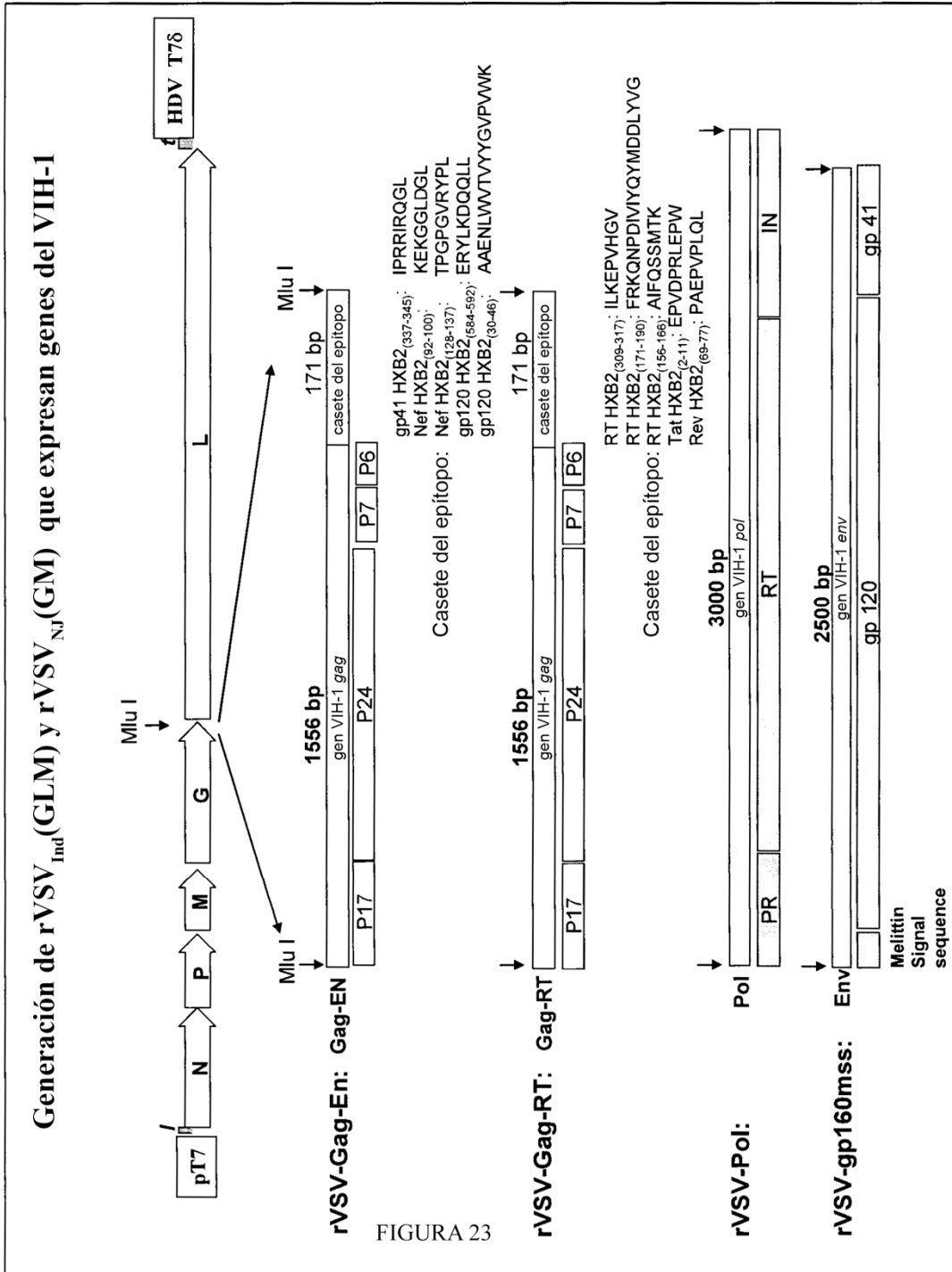


FIGURA 22



Expresión de gag en células BHK21 infectadas con VIH-1 gag del rVSV_{Ind} (GLM)

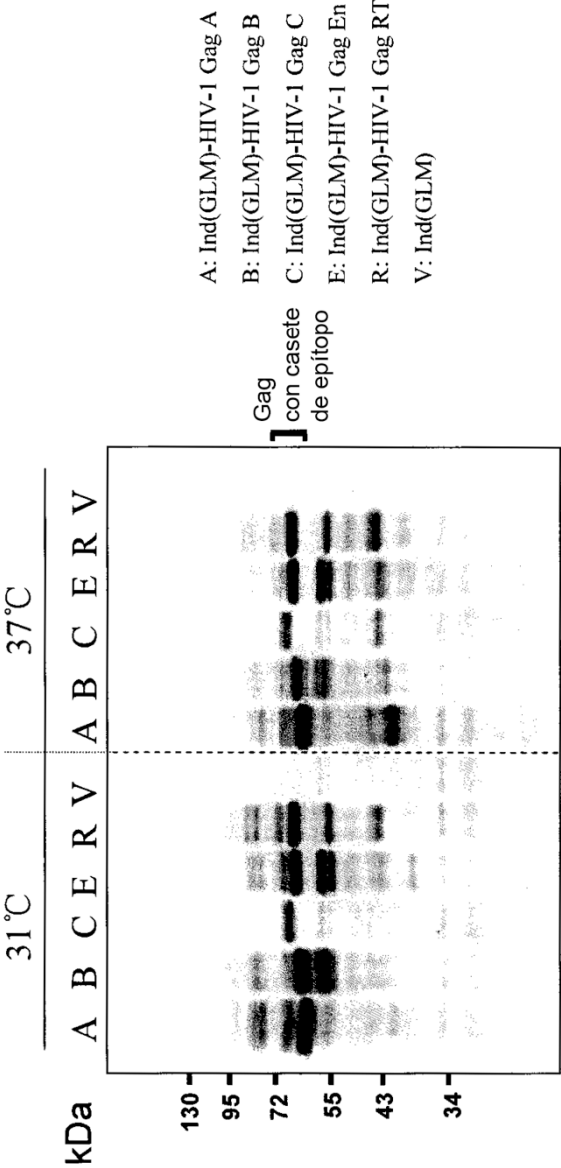


FIGURA 24

Expresión de gag en células BHK infectadas con VIH-1 gag del rVSV_{NJ} (GM)

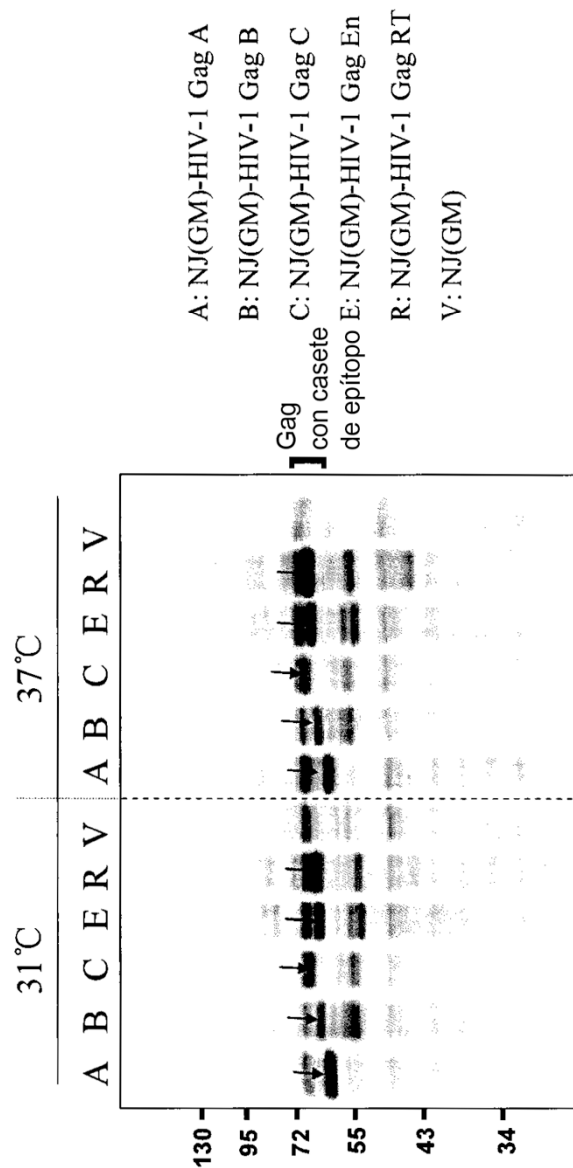


FIGURA 25

Expresión de la transcriptasa inversa en células infectadas con VIH-1 pol del rVSV

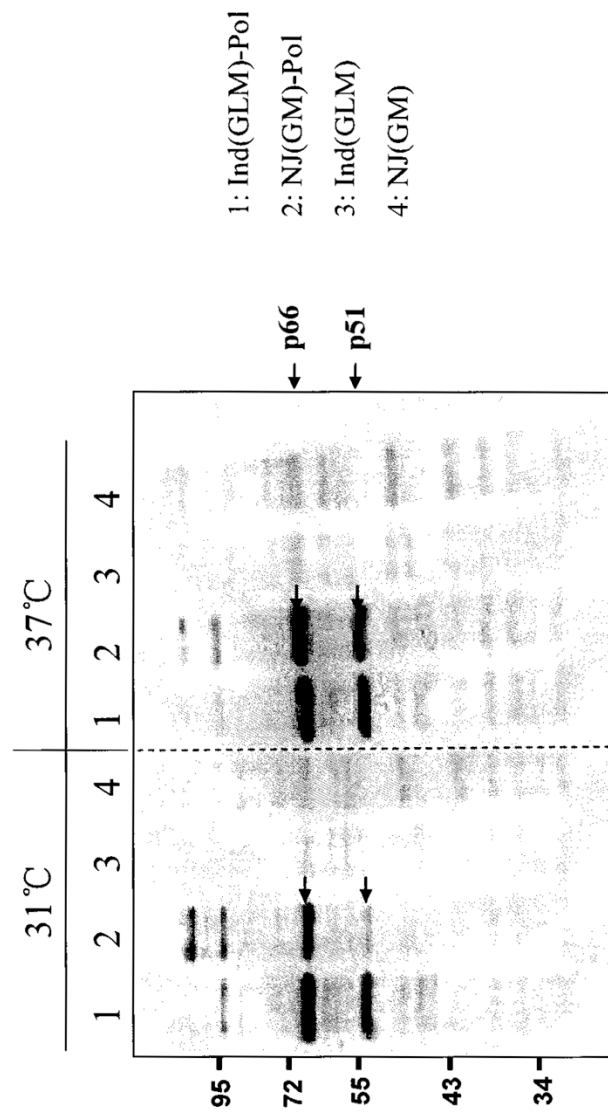


FIGURA 26

Expresión de Gp160 en células infectadas con VIH-1 Gp160mss del rVSV

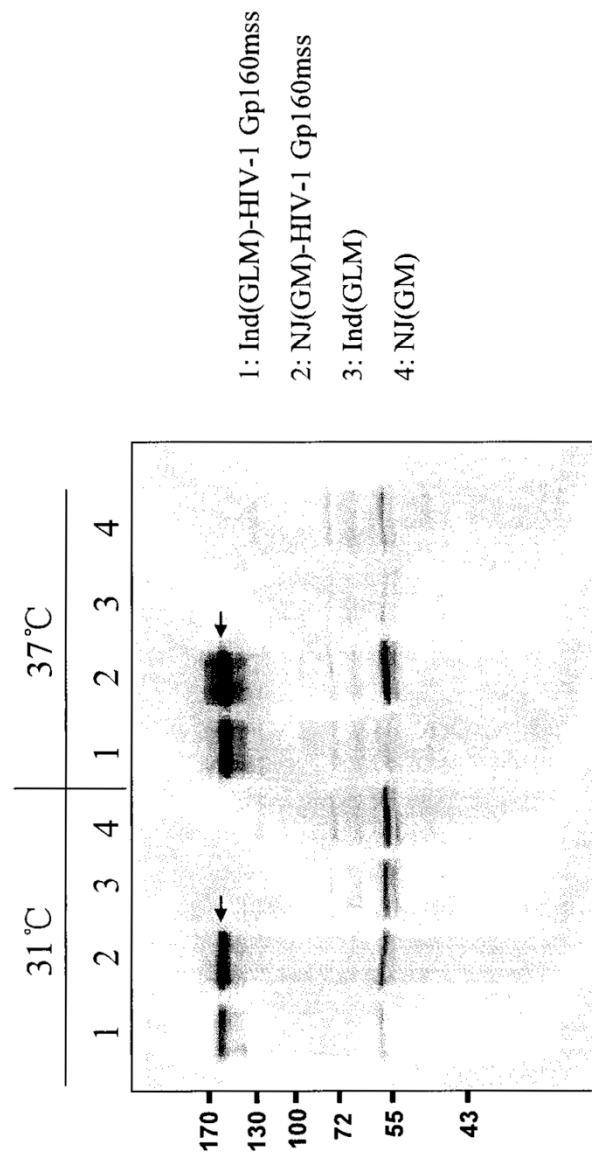


FIGURA 27

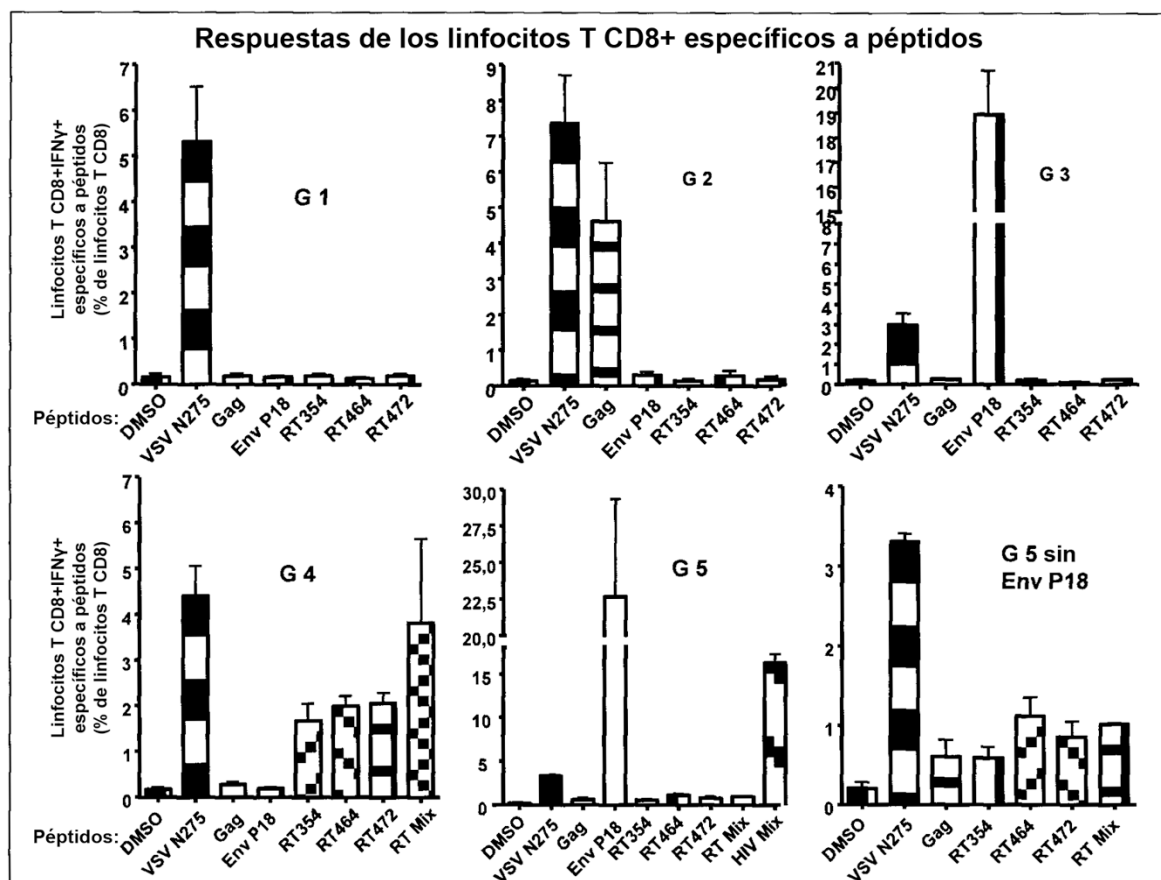


FIGURA 28

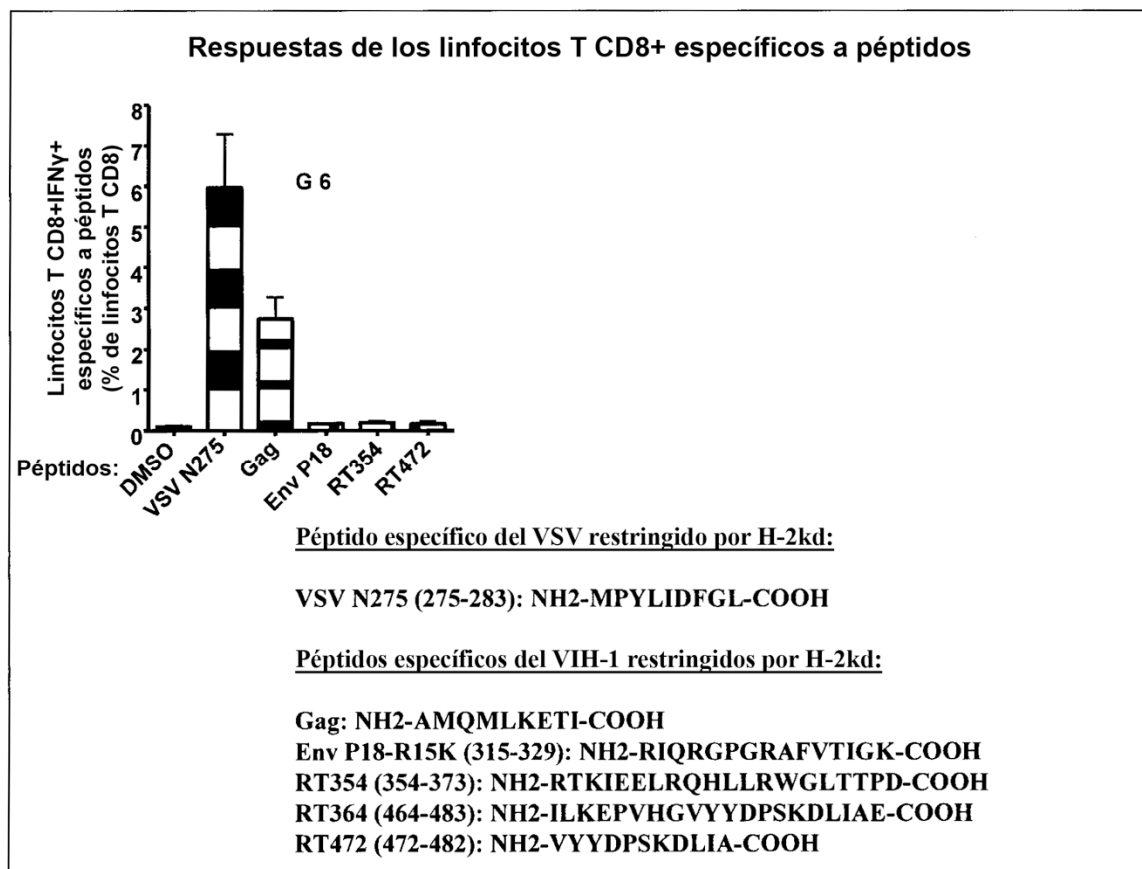


FIGURA 29

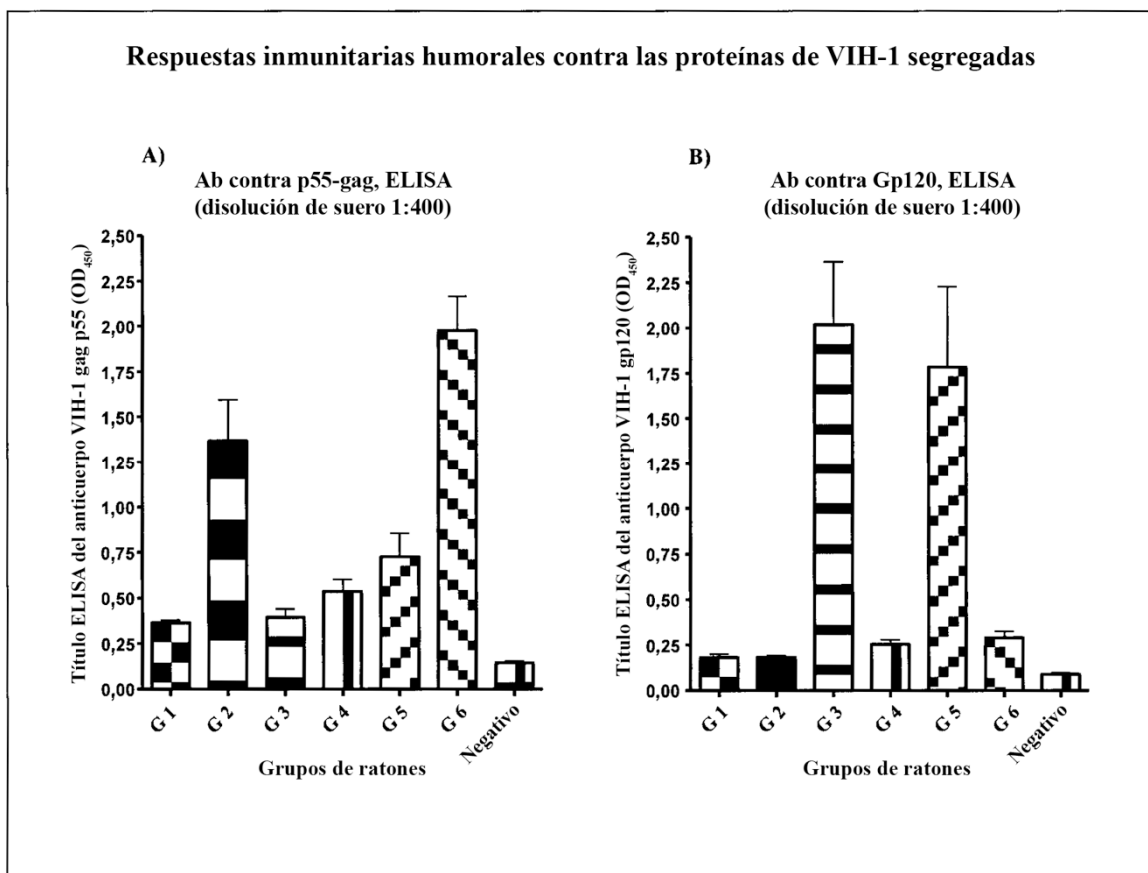


FIGURA 30

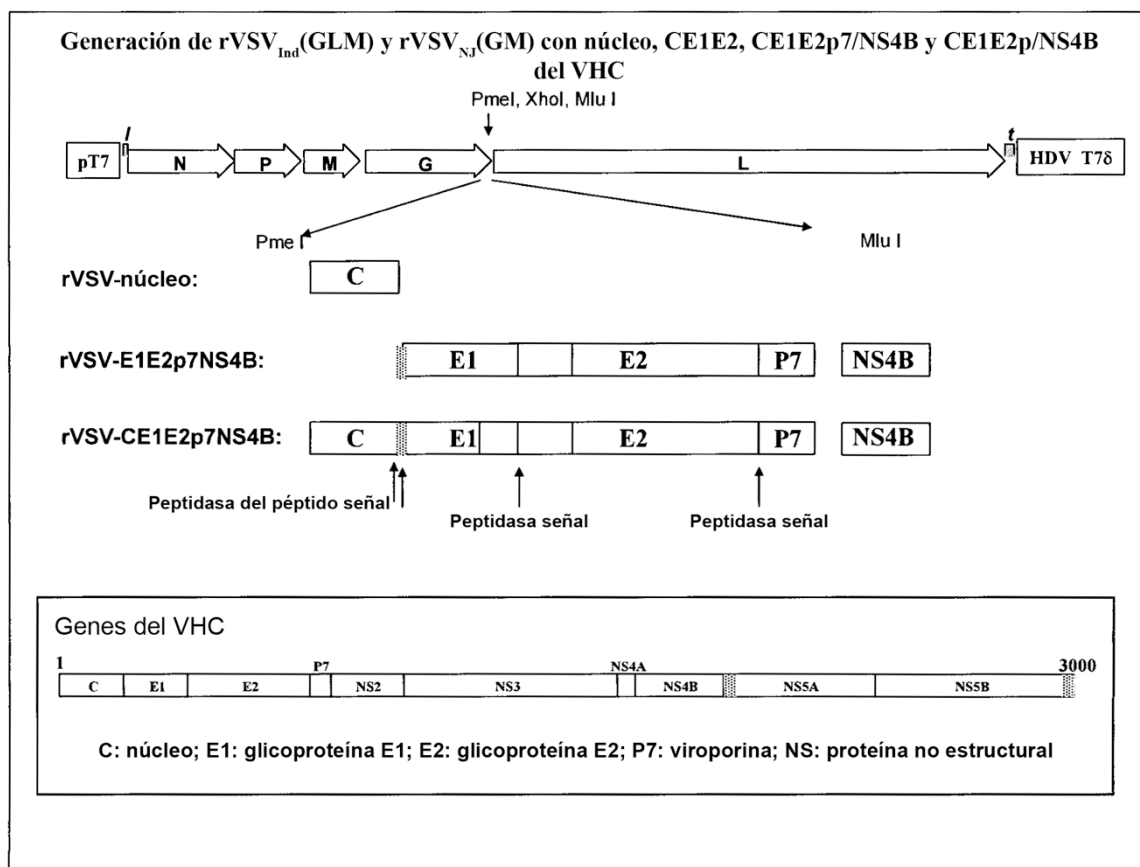


FIGURA 31

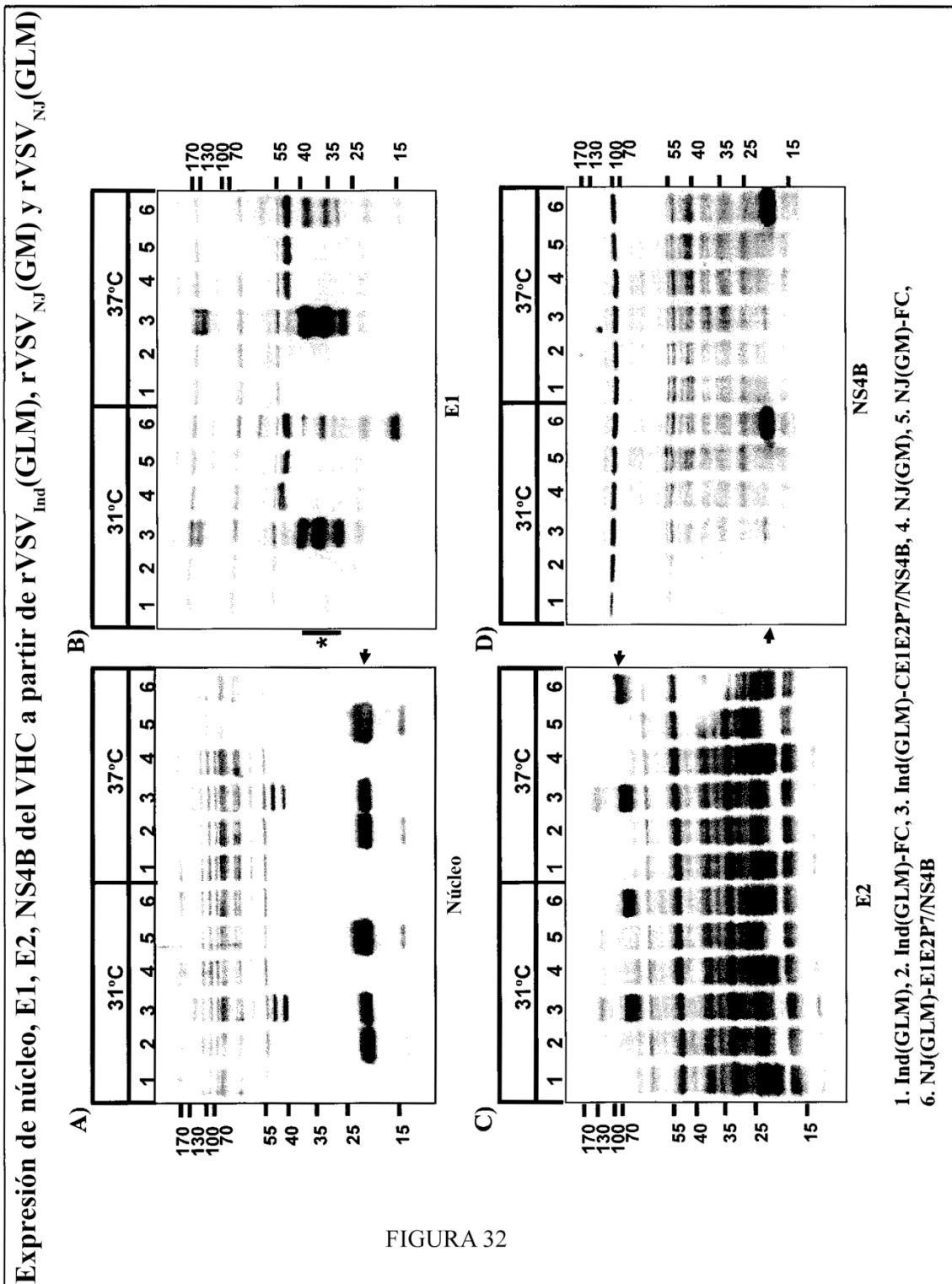


FIGURA 32

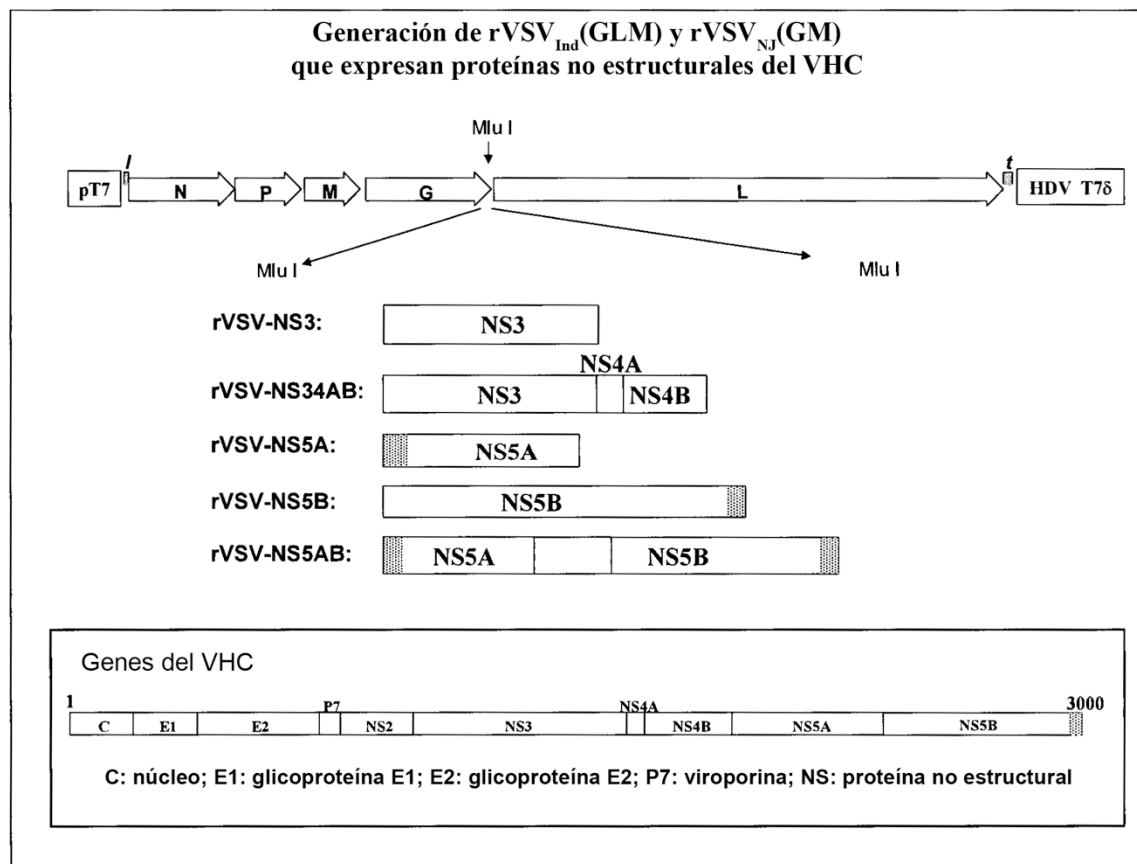


FIGURA 33

Expresión de proteínas no estructurales del VHC a partir del rVSV_{Ind}(GLM)

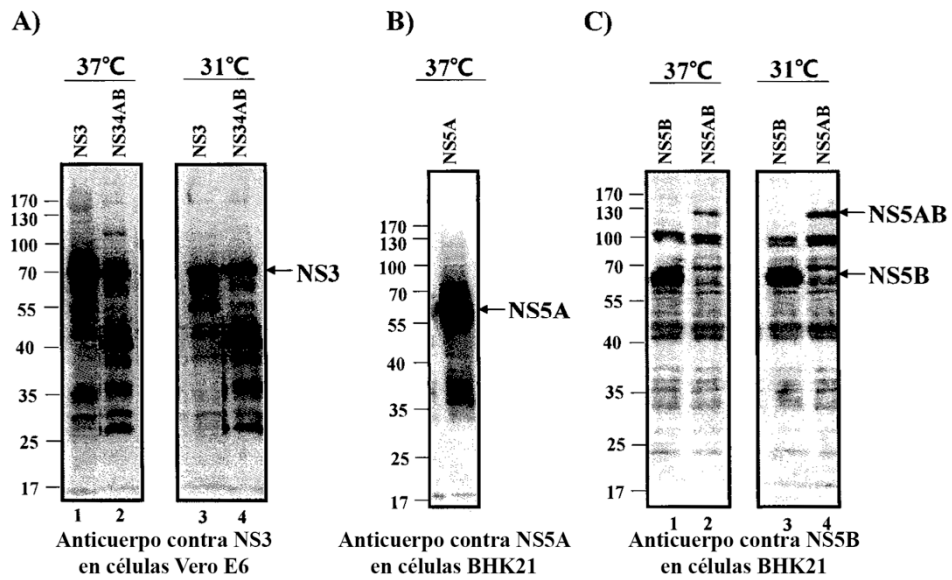


FIGURA 34

Expresión de proteínas no estructurales del VHC a partir del rVSV_{NSJ}(GM)

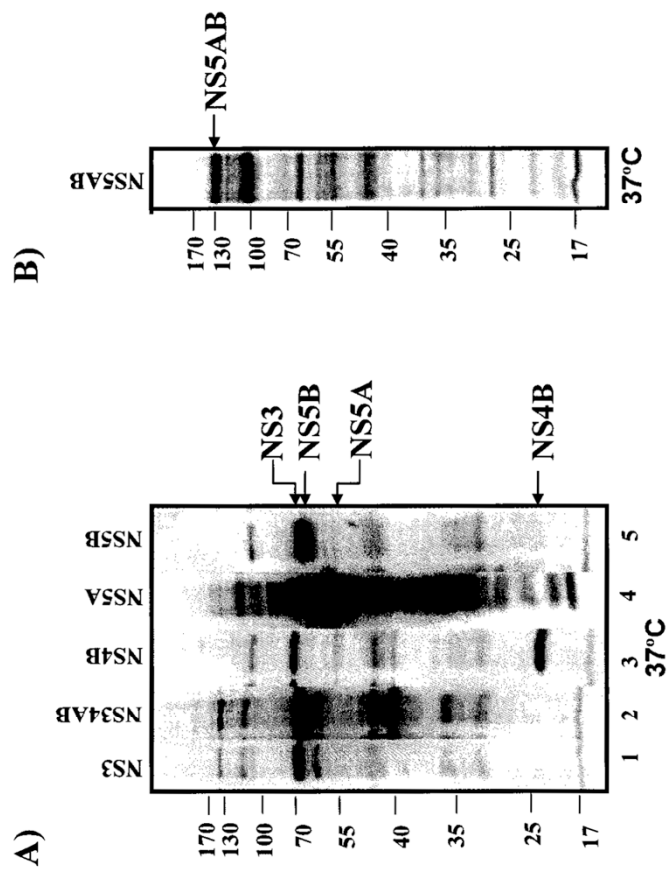


FIGURA 35