



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 767 324**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 39/155** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2008.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013** PCT/EP2013/055483

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014** WO14019718

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013** E 13717721 (8)

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019** EP 2879702

⑮ Título: **Vacuna de virus vaccinia modificado de Ankara (MVA) recombinante para el virus sincicial respiratorio (VRS)**

⑩ Prioridad:

**01.08.2012 US 201261678367 P**  
**01.08.2012 EP 12005594**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.06.2020**

⑮ Titular/es:

**BAVARIAN NORDIC A/S (100.0%)**  
Hejreskovvej 10A  
3490 Kvistgaard, DK

⑮ Inventor/es:

**CHEMINAY, CÉDRIC;**  
**STEIGERWALD, ROBIN y**  
**CHAPLIN, PAUL**

⑮ Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones:**

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 2 767 324 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

Vacuna de virus vaccinia modificado de Ankara (MVA) recombinante para el virus sincicial respiratorio (VRS)

## Campo

La presente invención se refiere a un virus vaccinia modificado de Ankara (virus MVA) recombinante como una vacuna mejorada contra una infección por el virus sincicial respiratorio (virus VRS). Específicamente, la presente invención se refiere a un vector de MVA recombinante genéticamente modificado que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un determinante antigénico de una glucoproteína de membrana del VRS, en donde la secuencia de nucleótidos codifica una glucoproteína de membrana F del VRS de longitud completa, al menos una secuencia de nucleótidos que codifica determinantes antigénicos de proteínas de la nucleocápside del VRS, en donde la secuencia de nucleótidos codifica tanto una proteína de nucleocápside N del VRS de longitud completa como una proteína de la matriz M2 del VRS de longitud completa, y al menos otra secuencia de nucleótidos adicional que codifica un determinante antigénico de una glucoproteína de membrana del VRS, en donde la secuencia de nucleótidos codifica una glucoproteína de membrana G del VRS de longitud completa. La invención también se refiere al MVA recombinante para usar en la prevención de la infección por el VRS.

## 15 Antecedentes

El VRS es un patógeno respiratorio importante. La infección aguda de las vías respiratorias bajas (LRT, por sus siglas en inglés *lower respiratory tract*) causa morbilidad y mortalidad significativas en bebés y niños menores de cinco años en todo el mundo [A.M. Aliyu et al. (2010), Bayero *J. Pure Appl. Sci.* 3(1):147-155]. El virus sincicial respiratorio (VRS) es la causa clínicamente más importante de infección de las LRT; la infección primaria por el VRS en general ocurre a los 2 años [W.P. Glezen (1987), *Ped. Virol.* 2:1-4; Y. Murata (2009), *Clin. Lab. Med.* 29(4):725-739]. Debido a que la infección primaria por el VRS no induce inmunidad completa contra el VRS, se producen reinfecciones frecuentes a lo largo de la vida, desarrollándose las infecciones más graves en pacientes muy jóvenes, muy mayores e inmunocomprometidos de cualquier edad [Y. Murata (2009)].

Hasta 40% de los infectados con el VRS desarrollan finalmente una enfermedad grave de las LRT que requiere hospitalización, dependiendo la gravedad e intensidad de la enfermedad de la magnitud e intensidad de la infección y la respuesta del hospedante [Aliyu et al. (2010)]. El VRS también puede causar enfermedad grave de las LRT en pacientes de cualquier edad con sistemas inmunitario, respiratorio o cardíaco comprometidos, y también puede predisponer a los niños a un desarrollo posterior de asma. Solo en los Estados Unidos, el VRS causa unas 126.000 hospitalizaciones y 300 muertes infantiles al año calculadas [Y. Murata (2009)]. Además, el VRS representa más de 80.000 hospitalizaciones y más de 13.000 muertes cada invierno entre pacientes ancianos y aquellos con afecciones cardiopulmonares o inmunosupresoras subyacentes [Y. Murata (2009)]. Sin embargo, a pesar de la importancia del VRS como patógeno respiratorio, actualmente no hay una vacuna eficaz contra el VRS en el mercado.

El VRS es un virus de ARN con envoltura de la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae* [Aliyu et al. (2010)]. Cada virión de VRS contiene una molécula de ARN monocatenario, no segmentada, de sentido negativo, de aproximadamente 15.191 nucleótidos que contiene diez genes que codifican once proteínas separadas (M2 contiene dos marcos de lectura abiertos), que incluyen ocho proteínas estructurales (G, F, SH, M1, N, P, M2.1 y L) y tres no estructurales (NS1, NS2 y M2.2) [Y. Murata (2009)]. El genoma se transcribe secuencialmente desde NS1 a L, en el siguiente orden: 3'-NS1-NS2-N-P-M1-SH-G-F-M2.1-M2.2-L-5'.

La envoltura viral contiene tres glucoproteínas transmembrana (glucoproteína de unión (G), glucoproteína de fusión (F) y proteína hidrófoba pequeña (SH)), así como la proteína de la matriz (M1) [Y. Murata (2009)]. Durante la replicación del VRS, el virus primero se une a la célula objetivo en un proceso mediado por la proteína G fuertemente glucosilada. Despues el virus se fusiona con la célula hospedante en un proceso mediado por la proteína F, penetrando así en la membrana celular y entrando en la célula hospedante; la proteína F también es necesaria para la formación de sincios característicos de las células infectadas con el VRS. Los procesos de unión y fusión son aumentados por la proteína SH. La proteína M1 regula el ensamblaje del VRS maduro interaccionando con las proteínas de envoltura F y G y con las proteínas de nucleocápside N, P y M2.1 (véase más abajo). Dentro de la envoltura, el ARN viral está encapsulado por un complejo de transcriptasa que consiste en la proteína de nucleocápside (N), fosfoproteína (P), factor de alargamiento de transcripción (M2.1) y proteínas de la ARN polimerasa (L) [Y. Murata (2009)]. N se asocia con el ARN genómico, mientras que P es un cofactor para L, la ARN polimerasa viral. M2.1 es un factor de alargamiento necesario para la transcripción viral, y M2.2 regula la transcripción del genoma viral. Finalmente, NS1 y NS2 inhiben la actividad de interferón tipo I.

Los aislados clínicos del VRS se clasifican según el grupo antigénico (A o B) y se subdividen además en genotipos múltiples (p. ej., A2 o A<sub>Long</sub> para el grupo A; y B1, CH-18537 u 8/60 para el grupo B) basados en la variabilidad genética dentro del genoma viral de cada grupo antigénico [Y. Murata (2009)]. La clasificación se basa en la reactividad de los virus con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la glucoproteína de unión (proteína G) y por diversos análisis genéticos. [M. Sato et al., *J. Clin. Microbiol.* 43 (1): 36-40 (2005)]. Entre los aislados virales, algunas proteínas codificadas por el VRS están altamente conservadas a nivel de secuencia de aminoácidos (p. ej., F), mientras que otras varían ampliamente (p. ej., G) entre y dentro de los dos grupos antigenicos principales [Y. Murata (2009)]. Las

proteínas F de los grupos antigenicos A y B comparten una homología considerable. En cambio, la proteína G difiere considerablemente entre los dos grupos antigenicos.

La proteína G es la proteína del VRS más variable, representando su región C-terminal hipervariable la mayoría de los epítopos específicos de la cepa. La epidemiología molecular y los patrones evolutivos de la proteína G han proporcionado información importante sobre las características clínicas y epidemiológicas del VRS. Típicamente, circulan varios genotipos diferentes a la vez, y el que predomina en una comunidad cada año puede cambiar. Sin embargo, la importancia de la diversidad de cepas para las características clínicas y epidemiológicas del VRS sigue siendo poco conocida. Por lo tanto, las proteínas recombinantes del VRS van acompañadas de una designación de cepa para indicar la cepa original del VRS a partir de la cual se clonó el gen o la proteína. Por ejemplo, una proteína G clonada de la cepa del VRS A<sub>Long</sub> se designa G(A<sub>Long</sub>), G de VRS A<sub>Long</sub>, o proteína G de VRS A<sub>Long</sub>.

El VRS estimula una variedad de respuestas inmunitarias en hospedantes infectados, incluyendo la secreción de quimioquinas y citoquinas, la producción de anticuerpos neutralizantes humorales y de la mucosa, y la producción de células T CD4+ (p. ej., T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2) y CD8+ (p. ej., CTL). Dichas respuestas inmunitarias del hospedante son en gran parte responsables de las manifestaciones clínicas de la infección por el VRS, ya que el virus causa una citopatología celular limitada in vivo [Y. Murata (2009)]. Las manifestaciones fenotípicas y la gravedad de la enfermedad inducida por el VRS son mediadas aparentemente por el equilibrio y las interacciones entre la variedad de respuestas inmunitarias estimuladas por la infección por el VRS [Y. Murata (2009)].

Muchos estudios previos sugieren que las respuestas inmunitarias celulares y humorales tienen diferentes funciones en la inducción de inmunidad contra el VRS y la resolución de la infección por VRS, así como en la evolución de la enfermedad [Y. Murata (2009) y referencias en el mismo]. Por ejemplo, los estudios con un anticuerpo anti-F humanizado mostraron que, aunque los anticuerpos anti-VRS son suficientes para prevenir o limitar la gravedad de la infección, no son necesarios para eliminar la infección viral [Y. Murata (2009); A.F.G. Antonis et al. (2007), *Vaccine* 25:4818-4827]. Por el contrario, las respuestas de células T son necesarias para eliminar las infecciones por VRS establecidas [Y. Murata (2009)]. La respuesta de células T inducida por el VRS también juega un papel clave en la patología pulmonar durante la infección. Por ejemplo, las células T<sub>H</sub>1 que segregan interferón-γ (IFNγ), con o sin una respuesta de CTL CD8+ asociada, eliminan el VRS con patología pulmonar mínima, mientras que las células T<sub>H</sub>2 que segregan interleuquina 4 (IL-4) también eliminan el VRS, pero con frecuencia acompañado de cambios pulmonares significativos, incluyendo la infiltración eosinofílica, una característica distintiva de la enfermedad potenciada observada durante ensayos de vacunas anteriores (véase más abajo)

Sin embargo, a pesar de la abundancia de información disponible relacionada con la inmunología, virología y fisiología de la infección por el VRS, continúa estando poco claro qué tipo de respuesta inmunitaria es probablemente la más eficaz en la inducción de inmunidad duradera sin producir al mismo tiempo una enfermedad potenciada en la exposición al VRS después de vacunación, tal como se describe en más detalle en las siguientes secciones.

#### Desarrollo previo de vacunas

Las vacunas típicamente usan una de varias estrategias para inducir la inmunidad protectora contra un agente o patógeno infeccioso objetivo (p. ej., un virus, bacteria o parásito) que incluyen: (1) preparaciones de patógenos inactivados; (2) preparaciones de patógenos vivos atenuados, que incluyen cepas de patógenos atenuados genéticamente; (3) preparaciones de vacuna con subunidades de proteínas purificadas; (4) vacunas basadas en vectores virales que codifican antígenos de patógenos y/o adyuvantes; y (5) vacunas basadas en ADN que codifican antígenos de patógenos.

Los esfuerzos iniciales para desarrollar vacunas de VRS se centraron en una preparación de virus inactivado, hasta que se llevó a cabo un ensayo clínico que ensayaba la eficacia de una vacuna de VRS inactivado por formalina (FI-VRS) en Estados Unidos durante la década de 1960 con resultados desastrosos [M.R. Olson y S.M. Varga (2007), *J. Immunol.* 179:5415-5424]. Un número significativo de pacientes vacunados desarrollaron una enfermedad pulmonar potenciada caracterizada por infiltraciones de eosinófilos y neutrófilos y una respuesta inflamatoria sustancial después de la posterior infección natural con VRS [Olson y Varga (2007), [Blanco JC et al. (2010) *Hum. Vaccin.* 6:482-92]. Muchos de estos pacientes necesitaron hospitalización y unos pocos pacientes gravemente enfermos murieron. Por consiguiente, los investigadores comenzaron a buscar factores virales y/o del hospedante que contribuyeran al desarrollo de una enfermedad potenciada después de la posterior exposición en un esfuerzo por desarrollar una vacuna de VRS más segura. La búsqueda ha proporcionado mucha información nueva sobre la biología del VRS y el amplio espectro de respuestas inmunitarias que puede inducir, pero sigue siendo difícil de encontrar una vacuna de VRS segura y eficaz.

Los esfuerzos para desarrollar una vacuna después de FI-VRS se han centrado en gran parte en vacunas de antígeno único que usan G, F y, en menor medida, N o M2, con los antígenos virales suministrados por vectores de ADN plasmídico o viral que expresan los genes virales o como proteínas purificadas. [Véase, p. ej., W. Olszewska et al. (2004), *Vaccine* 23:215-221; G. Taylor et al. (1997), *J. Gen. Virol.* 78:3195-3206; y L.S. Wyatt et al. (2000), *Vaccine* 18:392-397]. La vacunación con una combinación de F+G también se ha ensayado en terneros, ratas algodoneras y ratones BALB/c con diferentes resultados [Antonis et al. (2007) (terneros); B. Moss, solicitud de patente de EE.UU. nº 06/849.299 ("la solicitud 299"), presentada el 8 de abril de 1986 (ratas algodoneras); y L.S. Wyatt et al. (2000) (ratones

BALB/c)]. Tanto F como G son inmunogénicas en terneros, ratones, ratas algodoneras, seres humanos y, al menos en cierto grado, en macacos bebés [A.F.G. Antonis et al. (2007) (terneros); B. Moss, la solicitud 299 (ratas algodoneras); L. de Waal et al. (2004), *Vaccine* 22:923-926 (macacos bebés); L.S. Wyatt et al. (2000) (ratones BALB/c); Y. Murata (2009) (seres humanos)].

- 5 Sin embargo, significativamente, la naturaleza y el tipo de respuesta inmunitaria inducida por las vacunas de VRS candidatas varían, a menudo de forma bastante considerable, dependiendo del tipo de vacuna usada, los antígenos seleccionados, la vía de administración e incluso el modelo de organismo usado. Por ejemplo, la inmunización con VRS vivo o con vectores replicantes que codifican la proteína F del VRS induce una respuesta dominante de  $T_{H1}$  acompañada por la producción de anticuerpos neutralizantes anti-F y CTL CD8+, ambos asociados con patología pulmonar mínima después de la exposición al virus posterior a la vacunación [Y. Murata (2009) y referencias citadas en el mismo]. Por el contrario, la inmunización con una preparación de VRS inactivada por FI induce una respuesta de  $T_{H2}$  dominante que carece completamente de una respuesta de CTL CD8+, lo cual produce mayores cambios patológicos en los pulmones [Y. Murata (2009) y referencias citadas en el mismo]. Es interesante que la administración de la proteína G del VRS como una vacuna de subunidad purificada o en un vector replicante induce una respuesta de  $T_{H2}$  dominante que finalmente produce infiltrados pulmonares eosinófilos e hiperreactividad en las vías respiratorias después de la exposición al virus posterior a la vacunación, una respuesta muy similar a la enfermedad potenciada observada con FI-VRS [Y. Murata (2009) y referencias citadas en el mismo]. Además, mientras que la vacunación con el virus vaccinia modificado de Ankara (MVA) que codifica la proteína F del VRS induce anticuerpos anti-F y células T CD8+ específicas de F en temeros, la vacunación con MVA-F+MVA-G induce anticuerpos anti-F y anti-G, pero no células T CD8+ específicas de F o G [A.F.G. Antonis et al. (2007)].

La vacunación de ratones con virus vaccinia (VV) que expresan la proteína F (VV-F) inducía una respuesta fuerte de células T CD8+, lo que llevaba a una eliminación del VRS replicante de los pulmones, acompañado por una pérdida de peso similar o mayor que la de los ratones inmunizados con FI-VRS [W. Olszewska et al. (2004)]. Sin embargo, no estaba relacionada con la enfermedad potenciada inducida por FI-VRS o VV que expresa la proteína G (VV-G) (respuesta de  $T_{H2}$  combinada, eosinofilia pulmonar y pérdida de peso) que resulta de la secreción potenciada de citoquinas  $T_{H2}$  tales como IL-4 e IL-5. Algunas personas en el campo sugirieron que una vacuna de VRS capaz de inducir una respuesta inmunitaria relativamente equilibrada que incluya tanto un componente celular como uno humorral, sería menos probable que presentara inmunopatología potenciada en la exposición posterior a la vacunación [W. Olszewska et al. (2004)].

- 30 Sin embargo, aunque la vacunación de ratones BALB/c con virus vaccinia modificado de Ankara (MVA) que codificaba F, G o F+G inducía solo una respuesta inmunitaria equilibrada, que incluía tanto una respuesta humorral (es decir, una respuesta equilibrada de IgG1 e IgG2a) como una respuesta de  $T_{H1}$  (es decir, mayores niveles de IFNy/interleuquina 12 (IL-12) y niveles menores de interleuquina 4 (IL-4)/interleuquina 5 (IL-5)), los animales vacunados, sin embargo, todavía presentaban algo de pérdida de peso [W. Olszewska et al. (2004)].

- 35 La publicación internacional WO 2012/085936 describe plásmidos de VRS recombinante basados en MVA para el desarrollo de vacunas.

A pesar de invertir considerables esfuerzos para caracterizar la naturaleza y extensión de las respuestas inmunitarias inducidas por diversas vacunas candidatas en varios sistemas de modelos diferentes, sigue estando poco claro de forma precisa qué tipo de respuesta inmunitaria se requiere para obtener inmunidad duradera y completa frente al VRS sin predisponer a los receptores de las vacunas a una enfermedad potenciada. Debido al notable desequilibrio entre la carga clínica del VRS, y las opciones terapéuticas y profilácticas disponibles, el desarrollo de una vacuna del VRS sigue siendo una necesidad médica no satisfecha.

#### Descripción

- 45 Aunque los esfuerzos fallidos previos para desarrollar una vacuna del VRS se centraban principalmente en la vacunación con glucoproteína de membrana F-VRS o G -VRS o ambos, los autores de la presente invención han descubierto que la vacunación con un virus vaccinia de Ankara (MVA) recombinante que expresa al menos un determinante antigénico de una glucoproteína de membrana del VRS y al menos un determinante antigénico de una proteína de la nucleocápside del VRS induce mejor protección. Además, dichas construcciones inducen inmunidad estéril casi completa cuando se aplican por la vía intranasal en comparación con la aplicación subcutánea o incluso cuando se compara con la vía de administración intramuscular usada por Wyatt y colaboradores [L.S. Wyatt et al. (2000)]. Se puede obtener protección mejorada mediante la administración de vacunas de VRS candidatas por vía intranasal en comparación con la administración intramuscular.

- 55 Con MVA recombinantes que expresan ya sea la glucoproteína de membrana F de VRS o G de VRS (o ambas) (p. ej., MVA-mBN199B) o con MVA recombinantes que expresan al menos un determinante antigénico de una glucoproteína de membrana de VRS y al menos un determinante antigénico de una proteína de la nucleocápside del VRS (p. ej., MVA-mBN201B), los autores de la presente invención no observaron VRS replicantes en los pulmones 4 días después de la exposición, aunque los genomas de VRS todavía eran detectables por RT-qPCR. Los MVA recombinantes que expresan al menos un determinante antigénico de una glucoproteína de membrana del VRS y al menos un determinante antigénico de una proteína de la nucleocápside del VRS (p. ej., MVA-mBN201B) inducían

5 mejor protección y una disminución mayor en la carga viral de VRS detectable por RT-qPCR porque inducían una respuesta de células T CD8+ más fuerte contra el determinante antigénico de una proteína de la nucleocápside del VRS. La administración de dichos virus recombinantes por vía intranasal inducía además inmunidad estéril casi completa (casi sin carga viral de VRS detectable por RT-qPCR) porque inducían la respuesta inmunitaria mucosa y la secreción de anticuerpos IgA, respuestas que estaban ausentes cuando dichas construcciones se administraban por vía subcutánea.

10 A diferencia del FI-VRS, dichas construcciones inducen una respuesta inmunitaria de Th1 equilibrada que genera buenas respuestas de anticuerpos, así como respuestas inmunitarias celulares específicas fuertes contra los antígenos de VRS. Con la administración intranasal de la vacuna que produce niveles de anticuerpos IgG incluso más altos que los que resultan de la administración subcutánea convencional además de la inducción de una buena respuesta de anticuerpos IgA, mejora la protección y se reduce la pérdida de peso. Sin embargo, la magnitud de la respuesta inmunitaria celular era independiente de la vía de administración. Es interesante que los autores de la invención observaron un patrón de respuesta de células T inducida por MVA recombinantes que expresan al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica un determinante antigénico de una glucoproteína de membrana 15 de VRS y al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica un determinante antigénico de una proteína de la nucleocápside de VRS (p. ej., MVA-mBN201B, que expresa las proteínas F, G, N y M2 de VRS) que era similar a la respuesta de las células T inducida por las administraciones de VRS, aunque mucho más alta.

20 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un virus vaccinia modificado de Ankara (MVA) recombinante como se define en la reivindicación 1. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el MVA recombinante para usar en la prevención de una infección por el VRS. Se citan realizaciones preferidas en las reivindicaciones dependientes.

#### Virus vaccinia modificado de Ankara (MVA)

25 El MVA se ha generado mediante más de 570 pases en serie en fibroblastos embrionarios de pollo de la cepa dérmica de vaccinia de Ankara [virus Chorioallantois vaccinia virus Ankara, CVA; para una revisión véase Mayr et al. (1975), *Infection* 3, 6-14] que se mantuvo en el Instituto de Vacunación, Ankara, Turquía durante muchos años y se ha usado como la base para la vacunación de seres humanos. Sin embargo, debido a las frecuentes complicaciones graves después de vacunación asociadas con los virus vaccinia, hubo varios intentos para generar una vacuna de la viruela más atenuada.

30 Durante el período de 1960 a 1974, el Prof. Antón Mayr consiguió atenuar el CVA mediante más de 570 pases continuos en células CEF [Mayr et al. (1975)]. Se demostró en una variedad de modelos animales que el MVA resultante era no virulento [Mayr, A. y Danner, K. (1978), *Dev. Biol. Stand.* 41: 225-234]. Como parte del desarrollo previo del MVA como una vacuna pre-viruela, hubo ensayos clínicos que usaron MVA-517 en combinación con Lister Elstree [Stickl (1974), *Prev. Med.* 3: 97-101; Stickl y Hochstein-Mintzel (1971), *Munich Med. Wochenschr.* 113:1149-1153] en sujetos con riesgo de reacciones adversas por vaccinia. En 1976, el MVA derivado de la solución madre 35 semilla de MVA-571 (correspondiente al pase 571) se registró en Alemania como la vacuna de sensibilización en un programa de vacunación parenteral de dos etapas contra la viruela. Posteriormente, se usó el MVA-572 en aproximadamente 120.000 individuos caucásicos, la mayoría niños entre 1 y 3 años de edad, sin efectos secundarios graves comunicados, incluso aunque muchos de los sujetos estaban entre la población con riesgo alto de 40 complicaciones asociadas con vaccinia (Mayr et al. (1978), *Zentralbl. Bacteriol.* (B) 167:375-390). El MVA-572 se depositó en la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales como ECACC V94012707.

45 Como resultado de los pases usados para atenuar el MVA, hay un número de cepas o aislados diferentes, dependiendo del número de pases en células CEF. Por ejemplo, el MVA-572 se usó en Alemania durante el programa de erradicación de la viruela y el MVA-575 se usó extensivamente como una vacuna veterinaria. El MVA-575 se depositó el 7 de diciembre de 2000 en la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales (ECACC) con el número de depósito V00120707. El MVA (Virus vaccinia modificado de Ankara) del virus CVA atenuado se obtuvo por propagación en serie (más de 570 pases) del CVA en fibroblastos embrionarios de pollo primarios.

50 Aunque Mayr et al. demostraron, durante la década de los 1970 que el MVA está muy atenuado y no es virulento en seres humanos y mamíferos, ciertos investigadores han descrito que el MVA no está completamente atenuado en líneas celulares de mamíferos y humanos, ya que puede ocurrir replicación residual en estas células [Blanchard et al. (1998), *J Gen. Virol.* 79:1159-1167; Carroll y Moss (1997), *Virology* 238:198-211; patente de EE.UU. nº 5.185.146; Ambrosini et al. (1999), *J Neurosci Res.* 55: 569]. Se asume que los resultados dados en estas publicaciones se han obtenido con diversas cepas conocidas de MVA, ya que los virus usados difieren esencialmente en sus propiedades, en particular en su comportamiento en el crecimiento en varias líneas celulares. La replicación residual no es deseada por varias razones, que incluyen preocupaciones de seguridad en relación con el uso en seres humanos.

55 Bavarian Nordic ha desarrollado cepas de MVA que tienen perfiles de seguridad mejorados para el desarrollo de productos más seguros, tales como vacunas o productos farmacéuticos: Bavarian Nordic sometió el MVA a pases adicionales y se denominó MVA-BN. El MVA, así como también el MVA-BN, carece de aproximadamente 15% (31 kb de seis regiones) del genoma en comparación con el virus CVA ancestral.

Las eliminaciones afectan a una serie de genes de virulencia y de variedad de hospedantes, así como también al gen para cuerpos de inclusión Tipo A. Se depositó una muestra de MVA-BN correspondiente al pase 583 el 30 de agosto de 2000 en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) con el número V00083008. El MVA-BN se puede unir a y entrar en células humanas donde los genes codificados de forma viral son expresados de forma muy eficaz.

5 Sin embargo, no se produce el ensamblaje y la liberación de virus progenie. El MVA-BN se encuentra fuertemente adaptado a células fibroblastos embrionarios de pollo (CEF) primarios y no se replica en células humanas. En células humanas, los genes virales son expresados y no se produce virus infeccioso. El MVA-BN está clasificado como un organismo de Nivel de bioseguridad 1 de acuerdo con los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades en Estados Unidos. Las preparaciones de MVA-BN y derivados se han administrado a muchos tipos de animales y a 10 más de 2000 sujetos humanos, que incluyen individuos inmunodeficientes. Todas las vacunaciones han demostrado ser generalmente seguras y bien toleradas. A pesar de su alta atenuación y su virulencia reducida, se ha mostrado en estudios preclínicos que el MVA-BN provoca respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares contra vaccinia y contra productos génicos heterólogos codificados por genes clonados en el genoma de MVA [E. Harrer et al. (2005), *Antivir. Ther.* 10(2):285-300; A. Cosma et al. (2003), *Vaccine* 22(1):21-9; M. Di Nicola et al. (2003), *Hum. Gene Ther.* 14 (14):1347-1360; M. Di Nicola et al. (2004), *Clin. Cáncer Res.*, 10(16):5381-5390].

15 "Derivados" o "variantes" del MVA se refiere a virus que presentan esencialmente las mismas características de replicación que el MVA como se describe en la presente memoria, pero que presentan diferencias en una o más partes de sus genomas. El MVA-BN, así como un derivado o variante de MVA-BN, no se puede replicar de forma reproductiva in vivo en seres humanos y ratones, incluso en ratones gravemente inmunosuprimidos. Más específicamente, el MVA-

20 BN o un derivado o variante del MVA-BN también tiene preferiblemente la capacidad de replicación reproductiva en fibroblastos embrionarios de pollo (CEF), pero no capacidad de replicación reproductiva en la línea celular de queratinocitos humanos HaCat [Boukamp et al. (1988), *J Cell Biol* 106: 761-771], la línea celular de osteosarcoma de hueso humano 143B (ECACC Nº 91112502), la línea celular de riñón embrionario humano 293 (ECACC nº 85120602) y la línea celular de adenocarcinoma de cuello uterino humano HeLa (ATCC nº CCL-2). Adicionalmente, un derivado 25 o variante de MVA-BN tiene una relación de amplificación de virus de al menos dos veces menos, más preferiblemente tres veces menos que el MVA-575 en células Hela y líneas celulares HaCaT. Las pruebas y el ensayo para estas propiedades de las variantes del MVA se describen en las publicaciones internacionales WO 02/42480 (US 2003/0206926) y WO 03/048184 (US 2006/0159699).

30 La amplificación o replicación de un virus se expresa normalmente como la relación del virus producido a partir de una célula infectada (salida) a la cantidad usada originalmente para infectar la célula en primer lugar (entrada) denominada la "relación de amplificación". Una relación de amplificación de "1" define un estado de amplificación donde la cantidad de virus producido a partir de células infectadas es la misma que la cantidad usada inicialmente para infectar las 35 células, lo que significa que las células infectadas permiten la infección y reproducción del virus. En cambio, una relación de amplificación de menos de 1, es decir, una disminución en la salida en comparación con el nivel de entrada, indica una falta de replicación reproductiva y, por lo tanto, la atenuación del virus.

40 Las ventajas de la vacuna basada en MVA incluyen su perfil de seguridad, así como la disponibilidad para la producción de vacunas a gran escala. Las pruebas preclínicas pusieron de manifiesto que el MVA-BN demuestra una atenuación y eficacia superiores en comparación con otras cepas del MVA (WO02/42480). Una propiedad adicional de las cepas de MVA-BN es la capacidad de inducir sustancialmente el mismo nivel de inmunidad en regímenes de sensibilización de virus vaccinia/refuerzo de virus vaccinia cuando se compara con los regímenes de sensibilización de ADN/refuerzo de virus vaccinia.

45 Los virus MVA-BN recombinantes, la realización más preferida en la presente memoria, se considera que son seguros debido a su deficiencia en la replicación distintiva en células de mamífero y su no virulencia bien establecida. Asimismo, además de su eficacia, la viabilidad de la fabricación a escala industrial puede ser beneficiosa. Adicionalmente, las vacunas basadas en el MVA pueden proporcionar múltiples antígenos heterólogos y permitir una inducción simultánea de inmunidad humoral y celular.

50 En otro aspecto, una cepa viral de MVA adecuada para generar el virus recombinante puede ser la cepa MVA-572, MVA-575 o cualquier cepa de MVA atenuada de forma similar. También puede ser adecuado un mutante de MVA, tal como el *chorioallantois vaccinia virus Ankara* (dCVA) eliminado. Un dCVA comprende sitios de eliminación del I, del II, del III, del IV, del V y del VI del genoma del MVA. Los sitios son particularmente útiles para la inserción de múltiples secuencias heterólogas. El dCVA se puede replicar de forma reproductiva (con una relación de amplificación mayor que 10) en una línea celular humana (tal como las líneas celulares 293, 143B y MRC-5 humanas), la cual después permite la optimización por mutación adicional útil en una estrategia de vacunación basada en un virus (véase la publicación internacional WO 2011/092029).

## 55 Definiciones

60 La expresión "determinante antigenético" se refiere a cualquiera molécula que estimula el sistema inmunitario de un hospedante para hacer una respuesta inmunitaria específica de antígeno, ya sea una respuesta celular y/o una respuesta humorla de anticuerpos. Los determinantes antigenéticos pueden incluir proteínas, polipéptidos, fragmentos de proteína antigenéticos, antígenos y epítopos que todavía provocan una respuesta inmunitaria en un hospedante y forman parte de un antígeno, homólogo o variante de proteínas, polipéptidos y fragmentos de proteínas antigenéticos,

5 antígenos y epítopos que incluyen, por ejemplo, proteínas glucosiladas, polipéptidos, fragmentos de proteínas antigenicos, antígenos y epítopos, y secuencias de nucleótidos que codifican dichas moléculas. Por lo tanto, las proteínas, polipéptidos, fragmentos de proteínas antigenicos, antígenos y epítopos no se limitan a secuencias de nucleótidos o aminoácidos naturales particulares, sino que abarcan secuencias idénticas a las secuencias naturales así como modificaciones de la secuencia natural, tales como eliminaciones, adiciones, inserciones y sustituciones.

10 Preferiblemente, dichos homólogos o variantes tienen al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60% o 65%, al menos aproximadamente 70% o 75%, al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% u 89%, más típicamente, al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, o 94% e incluso más típicamente al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, más típicamente al menos aproximadamente 99% de identidad con la proteína, polipéptido, fragmento de proteína antigenico, antígeno y epítopo mencionados a nivel de la secuencia de aminoácidos o nucleótidos. El término homólogo o variante también abarca secuencias de nucleótidos o proteínas truncadas, eliminadas o modificadas de otra manera tal como, por ejemplo, (1) las secuencias de nucleótidos de VRS-F o VRS-G que codifican formas solubles de las proteínas VRS-F o VRS-G correspondientes que carecen del péptido señal así como los dominios transmembrana y/o citoplasmático de las proteínas VRS-F o VRS-G de longitud completa, (2) las secuencias de nucleótidos VRS-M2 o VRS-N que codifican versiones eliminadas, truncadas o mutadas de otra manera de las VRS-M2 o VRS-N de longitud completa, (3) las formas solubles de las proteínas VRS-F o VRS-G que carecen de péptido señal así como también los dominios transmembrana y/o citoplasmático de las proteínas VRS-F o VRS-G de longitud completa, o (4) versiones eliminadas, truncadas o mutadas de otra manera de las proteínas VRS-M2 o VRS-N de longitud completa.

15 20 Las técnicas para determinar la identidad de secuencia entre ácidos nucleicos y aminoácidos son conocidas en la técnica. Se pueden comparar dos o más secuencias determinando su "porcentaje de identidad". El porcentaje de identidad de dos secuencias, sean secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, es el número exacto de concordancias entre dos secuencias alineadas dividido entre la longitud de las secuencias más cortas y multiplicadas por 100.

25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 El "porcentaje (%) de identidad de secuencias de aminoácidos" con respecto a proteínas, polipéptidos, fragmentos de proteína antigenicos, antígenos y epítopos descritos en la presente memoria, se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia de referencia (es decir, la proteína, polipéptido, fragmento de proteína antigenico, antígeno o epítopo del que deriva), después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias maneras conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, usando el software informático disponible al público, tal como el software BLAST, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr el alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se están comparando.

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 Lo mismo se aplica al "porcentaje (%) de identidad de secuencia de nucleótidos", *mutatis mutandis*.

Por ejemplo, se proporciona un alineamiento adecuado para las secuencias de ácido nucleico mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, (1981), *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489. Este algoritmo se puede aplicar a secuencias de aminoácidos usando una matriz de puntuación desarrollada por Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M. O. Dayhoff ed., supl.5. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., EE.UU., y normalizada por Gribskov (1986), *Nucl. Acids Res.* 14 (6):6745-6763. Se proporciona un ejemplo de implementación de este algoritmo para determinar el porcentaje de identidad de una secuencia por el Genetics Computer Group (Madison, Wis.) en la aplicación de utilidad "BestFit". Los parámetros por defecto para este método se describen en el Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Versión 8 (1995) (disponible en Genetics Computer Group, Madison, Wis.). Un método preferido para establecer el porcentaje de identidad en el contexto de la presente invención es usar el paquete de programas MPSRCH con derechos de autor de la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrock y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, Calif). A partir de este conjunto de paquetes se puede usar el algoritmo de Smith-Waterman donde se usan parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización por apertura de hueco de 12, penalización de extensión de hueco de uno y un hueco de seis). A partir de los datos generados, el valor de "Concordancia" refleja la "identidad de secuencia". Otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias son generalmente conocidos en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineamiento es BLAST, usado con parámetros por defecto. Por ejemplo, se pueden usar BLASTN y BLASTP usando los siguientes parámetros por defecto: código genético = estándar; filtro=ninguno; cadena=ambas; corte de exclusión=60; esperado=10; Matriz=BLOSUM62; descripción=50 secuencias; separado por= HIGH SCORE; bases de datos =no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR. Se pueden encontrar detalles sobre estos programas en la siguiente dirección de internet: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Como se usa en la presente memoria, se entiende que un gen, ácido nucleico o proteína "heterólogo" es una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos que no está presente en el genoma de poxvirus de tipo natural (p. ej., MVA). El experto entiende que un "gen heterólogo", cuando se encuentra presente en un poxvirus tal como MVA, se incorporará

en el genoma de poxvirus de manera que, después de la administración del poxvirus recombinante a una célula hospedante, se expresa como el producto génico heterólogo correspondiente, es decir, como el "antígeno heterólogo" y/o "proteína heteróloga". La expresión se logra normalmente uniendo operativamente el gen heterólogo a elementos reguladores que permiten la expresión en la célula infectada por el poxvirus. Preferiblemente, los elementos reguladores incluyen un promotor de poxvirus natural o sintético.

5 "Inmunidad estéril", como se usa en la presente memoria, significa inmunidad protectora en ausencia de genoma de VRS detectable cuando se aplican métodos de detección sensibles, tales como RT-qPCR.

Debe indicarse que como se usan en la presente memoria, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un epítopo" incluye uno o más epítopos y la referencia "al método" incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica que podrían ser modificados o sustituidos por los métodos descritos en la presente memoria.

10 A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que la expresión "al menos" que precede a una serie de elementos hace referencia a cada elemento de esa serie. Los expertos en la técnica reconocerán o podrán determinar, usando solamente experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descrita en la presente memoria. Se pretende que dichos equivalentes sean abarcados por la presente invención.

15 A lo largo de esta descripción y las siguientes reivindicaciones, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender", y variaciones como "comprende" o "que comprende", implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas mencionados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. Cuando se usa en la presente memoria, el término "que comprende" se puede sustituir por el término "que contiene" o "que incluye" o a veces cuando se usa en la presente memoria por el término "que tiene". Cualquiera de los términos mencionados antes (que comprende, que contiene, que incluye, que tiene), aunque menos preferido, cuando se usen en la presente memoria en el contexto de un aspecto o realización de la presente invención se pueden sustituir por la expresión "que consiste en".

20 25 Cuando se usa en la presente memoria "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en el elemento de la reivindicación. Cuando se usa en la presente memoria "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o etapas que no afecten materialmente a las características básicas y nuevas de la reivindicación.

30 35 Como se usa en la presente memoria, se entiende que la conjunción "y/o" entre elementos múltiples mencionados comprende tanto las opciones individuales como combinadas. Por ejemplo, donde dos elementos están unidos por "y/o", una primera opción hace referencia a la aplicabilidad del primer elemento sin el segundo. Una segunda opción se refiere a la aplicabilidad del segundo elemento sin el primero. Una tercera opción se refiere a la aplicabilidad del primer y segundo elemento juntos. Se entiende que cualquiera de estas opciones está dentro del significado y que, por lo tanto, satisface el requisito del término "y/o" como se usa en la presente memoria. También se entiende que la aplicabilidad simultánea de más de una de las opciones está dentro del significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término "y/o".

#### Secuencias de nucleótidos y proteínas del VRS

40 Los genes del VRS como se menciona en la presente memoria hacen referencia a los genes, o a un homólogo o variante de los genes, que codifican las proteínas correspondientes en cualquier cepa o aislado de VRS, incluso aunque la secuencia exacta y/o ubicación genómica del gen puede diferir entre cepas o aislados.

45 Asimismo, las proteínas del VRS mencionadas en la presente memoria se refieren a proteínas, o a un homólogo o variante de las proteínas, codificadas y expresadas por el gen de la proteína correspondiente como se ha definido antes.

50 55 A modo de ejemplo, como se usa de forma intercambiable en la presente memoria, las expresiones "gen de la proteína F", "gen de la glucoproteína F", "gen de la proteína F del VRS", "gen de la glucoproteína F del VRS" o "gen F" se refieren al gen, o a un homólogo o variante del gen, que codifica la glucoproteína de fusión de transmembrana en cualquier cepa o aislado de VRS, incluso aunque la secuencia exacta y/o ubicación genómica del gen de la proteína la F pueda diferir entre cepas o aislados. Por ejemplo, en la cepa A2 del VRS, el gen de la proteína F(A2) comprende los nucleótidos 5601-7499 (puntos extremos incluidos) como se numeran en el número de acceso en GenBank M11486. El gen de la proteína F(A2) comprende además un marco de lectura abierto (ORF) que codifica la proteína que abarca los nucleótidos 5614-7338 (puntos extremos incluidos) como se numeran en el nº de acceso en GenBank M11486. La secuencia de nucleótidos del gen de la proteína F del VRS A2 se expone en la SEQ ID NO: 28.

60 También se usan de forma intercambiable en la presente memoria los términos "proteína F", "glucoproteína F", "proteína F del VRS", "glucoproteína F del VRS" o "F" que se refieren a la glucoproteína de fusión transmembrana altamente glucosilada, o a un homólogo o variante de la proteína, codificada y expresada por un gen de la proteína F del VRS como se ha definido antes. La secuencia de aminoácidos de la proteína F del VRS A2 se expone en la SEQ ID NO: 29. La proteína F del VRS(A2) comprende un péptido señal, un dominio extracelular, un dominio

5 transmembrana y un dominio citoplasmático (véase, p. ej., UniProtKB/Swiss-Prot nº de acceso P03420). El péptido señal de la proteína F del VRS A2 consiste en los aminoácidos 1-21 de la SEQ ID NO: 29; el dominio extracelular de la proteína F del VRS A2 consiste en los aminoácidos 1-529 de la SEQ ID NO: 29 o aminoácidos 22-529 de la SEQ ID NO: 29; el dominio transmembrana de la proteína F del VRS A2 consiste en los aminoácidos 530-550 de la SEQ ID NO: 29; y el dominio citoplasmático de la proteína F del VRS A2 consiste en los aminoácidos 551-574 de la SEQ ID NO: 29.

10 Asimismo, las expresiones "gen de la proteína G", "gen de glucoproteína G", "gen de la proteína G del VRS", "gen de la glucoproteína G del VRS" o "gen G" también se usan de forma intercambiable en la presente memoria. Por ejemplo, en la cepa A2 del VRS, el gen de la proteína G(A2) comprende los nucleótidos 4626-5543 (puntos extremos incluidos) como se numeran en el número de acceso en GenBank M11486. El gen de la proteína G(A2) comprende además un marco de lectura abierto (ORF) que codifica la proteína que abarca los nucleótidos 4641-5537 (puntos extremos incluidos) tal como se numeran en el nº de acceso en GenBank M11486. La secuencia de nucleótidos del gen de la proteína G del VRS A2 se expone en la SEQ ID NO: 30.

15 20 Las expresiones "proteína G", "glucoproteína G", "proteína G del VRS", "glucoproteína G del VRS" o "G" se refieren a la glucoproteína de unión transmembrana fuertemente glucosilada, o a un homólogo o variante de la proteína. La secuencia de aminoácidos de la proteína G del VRS A2 se expone en la SEQ ID NO: 31. La proteína G del VRS A2 comprende un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático (véase, p. ej., UniProtKB/Swiss-Prot nº de acceso P03423). El dominio extracelular de la proteína G del VRS A2 consiste en los aminoácidos 67-298 de la SEQ ID NO: 31; el dominio transmembrana de la proteína G del VRS A2 consiste en los aminoácidos 38-66 de la SEQ ID NO: 31; y el dominio citoplasmático de la proteína G del VRS A2 consiste en los aminoácidos 1-37 de la SEQ ID NO: 31.

25 30 También se usan de forma intercambiable en la presente memoria las expresiones "gen de la proteína M2", "gen de la proteína de la nucleocápside M2", "gen de la proteína M2 del VRS", "gen de la proteína de la matriz M2 del VRS", "gen de la proteína de la nucleocápside M2 del VRS" o "gen M2". En la cepa A2 del VRS, el gen de la proteína M2(A2) comprende los nucleótidos 7550-8506 (puntos extremos incluidos) como se numeran en el número de acceso en GenBank M11486. El gen de la proteína M2(A2) comprende además un marco de lectura abierto (ORF) que codifica la proteína que abarca los nucleótidos 7559-8143 (puntos extremos incluidos) como se numeran en el nº de acceso en GenBank M11486. La secuencia de nucleótidos del gen de la proteína M2 del VRS A2 se expone en la SEQ ID NO: 32. También se usan de forma intercambiable en la presente memoria las expresiones "proteína M2", "proteína de la nucleocápside M2", "proteína M2 del VRS", "proteína de la nucleocápside M2 del VRS", "proteína de la matriz M2 del VRS" o "M2". La secuencia de aminoácidos de la proteína M2 del VRS A2 se expone en la SEQ ID NO: 33 (véase, p. ej., UniProtKB/Swiss-Prot nº de acceso P04545).

35 40 También, se pueden usar de forma intercambiable las expresiones "gen de la proteína N", "gen de la proteína de la nucleocápside N", "gen de la proteína N del VRS", "gen de la proteína de la nucleocápside N del VRS" o "gen N". En la cepa A2 del VRS, el gen de la proteína N(A2) comprende los nucleótidos 1081-2277 (puntos extremos incluidos) como se numeran en el número de acceso en GenBank M11486. El gen de la proteína N(A2) comprende además un marco de lectura abierto (ORF) que codifica la proteína que abarca los nucleótidos 1096-2271 (puntos extremos incluidos) como se numeran en el nº de acceso en GenBank M11486. La secuencia de nucleótidos del gen de la proteína N del VRS A2 se expone en la SEQ ID NO: 34.

45 50 La secuencia de aminoácidos de la "proteína N", "proteína de la nucleocápside N", "proteína N del VRS", "proteína de la nucleocápside N del VRS" o "N", son expresiones que se usan de forma intercambiable en la presente memoria, del VRS A2 se expone en la SEQ ID NO: 35 (véase, por ejemplo, UniProtKB/Swiss-Prot nº de acceso P03418).

#### Ciertas realizaciones de la invención

55 60 En ciertas realizaciones, el determinante antigénico F del VRS de longitud completa, deriva de la cepa A2 del VRS. En ciertas realizaciones, el determinante antigénico F del VRS(A2) de longitud completa comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 28 que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29. En ciertas realizaciones, el determinante antigénico F del VRS(A2) comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En ciertas realizaciones, el determinante antigénico F del VRS de longitud completa, deriva de la cepa Along del VRS. En ciertas realizaciones, el determinante antigénico F del VRS(Along) comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

65 70 En ciertas realizaciones, el determinante antigénico G del VRS de longitud completa deriva de la cepa A2 del VRS. En ciertas realizaciones, el determinante antigénico G del VRS(A2) de longitud completa comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, el determinante antigénico G del VRS de longitud completa deriva de la cepa B del VRS.

#### Sitios de integración en el MVA

En ciertas realizaciones, las secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican uno o más determinantes antigenicos de glucoproteínas de membrana del VRS y uno o más determinantes antigenicos de proteínas de la nucleocápside del VRS, se incorporan en una variedad de sitios de inserción en el genoma del MVA, o en el genoma del MVA-BN. Las secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican uno o más determinantes antigenicos de proteínas del VRS se pueden insertar en el MVA recombinante como unidades transcripcionales separadas o como genes de fusión, como se representa en la Figura 1.

En ciertas realizaciones, las secuencias de nucleótidos del VRS heterólogas se insertan en una o más regiones intergénicas (IGR) del MVA. La IGR se puede seleccionar de IGR07/08, IGR 44/45, IGR 64/65, IGR 88/89, IGR 136/137, e IGR 148/149, preferiblemente de IGR64/65, IGR88/89, y/o IGR 148/149. Las secuencias de nucleótidos del VRS heterólogas, adicional o alternativamente, se pueden insertar en uno o más de los sitios de eliminación de origen natural I, II, III, IV, V o VI del MVA. En ciertas realizaciones, menos de 5, 4, 3 o 2 de los sitios de integración comprenden secuencias de nucleótidos del VRS heterólogas.

El número de sitios de inserción del MVA que comprende secuencias de nucleótidos del VRS heterólogas puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más. El MVA recombinante puede comprender secuencias de nucleótidos del VRS heterólogas insertadas en 4, 3, 2 o menos sitios de inserción, pero preferiblemente se usan dos sitios de inserción. En ciertas realizaciones, se usan tres sitios de inserción. Preferiblemente, el MVA recombinante comprende al menos 4, 5, 6 o 7 secuencias de nucleótidos insertadas en 2 o 3 sitios de inserción.

Los virus MVA recombinantes proporcionados en la presente memoria se pueden generar por métodos rutinarios conocidos en la técnica. Los métodos para obtener poxvirus recombinantes o para insertar secuencias de nucleótidos heterólogas en un genoma de poxvirus son bien conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, los métodos para técnicas de biología molecular estándar tales como clonación de ADN, aislamiento del ADN y ARN, análisis de transferencia Western, técnicas de amplificación de RT-PCR y PCR se describen en Molecular Cloning, A laboratory Manual (2<sup>a</sup> Ed.) [J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)], y las técnicas para el manejo y la manipulación de virus de describen en Virology Methods Manual [B.W.J. Mahy et al. (eds.), Academic Press (1996)]. De manera similar, las técnicas y los conocimientos para el manejo, manipulación y la ingeniería genética del MVA se describen en Molecular Virology: A Practical Approach [A.J. Davison y R.M. Elliott (Eds.), The Practical Approach Series, IRL Press en Oxford University Press, Oxford, RU (1993) (véase, p. ej., el capítulo 9: Expression of genes by Vaccinia virus vectors)] y Current Protocols in Molecular Biology [John Wiley & Son, Inc. (1998) (véase, p. ej., el capítulo 16, Sección IV: Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vector)].

Para generar los diferentes MVA recombinantes descritos en la presente memoria, se pueden aplicar diferentes métodos. Las secuencias de nucleótidos que se van a insertar en el virus se pueden poner en una construcción de plásmido de *E. coli* en la que se ha insertado un ADN homólogo a una sección del ADN del MVA. De forma separada, la secuencia de ADN que se va a insertar puede estar ligada a un promotor. La unión promotor-gen se puede poner en la construcción de plásmido de modo que la unión de promotor-gen esté flanqueada en ambos extremos por ADN homólogo a una secuencia de ADN que flanquea una región de ADN del MVA que contiene un locus no esencial. La construcción de plásmido resultante se puede amplificar por propagación con bacterias *E. coli* y aislar. El plásmido aislado que contiene la secuencia de gen de ADN que se va a insertar se puede transfectar en un cultivo celular, p. ej., de fibroblastos embrionarios de pollo (CEF), al mismo tiempo que el cultivo se infecta con MVA. La recombinación entre ADN de MVA homólogo en el plásmido y el genoma viral, respectivamente, puede generar un MVA modificado por la presencia de secuencias de ADN extrañas.

De acuerdo con una realización preferida, una célula de un cultivo celular adecuado como, p. ej., células de CEF, se puede infectar con un poxvirus. La célula infectada se puede transfectar, posteriormente, con un primer vector de plásmido que comprende un gen o genes extraños, preferiblemente bajo el control transcripcional de un elemento de control de expresión del poxvirus. Como se ha explicado antes, el vector plasmídico también comprende secuencias capaces de dirigir la inserción de la secuencia exógena en una parte seleccionada del genoma del poxvirus. Opcionalmente, el vector de plásmido también contiene un casete que comprende un marcador y/o gen de selección operativamente unido al promotor de poxvirus. Los marcadores o genes de selección adecuados son, p. ej., los genes que codifican la proteína verde fluorescente,  $\beta$ -galactosidasa, neomicina-fosforribosiltransferasa u otros marcadores. El uso de cassetes de selección o marcadores simplifica la identificación y aislamiento del poxvirus recombinante generado. Sin embargo, también se puede identificar un poxvirus recombinante por tecnología de PCR. Posteriormente, se puede infectar una célula adicional con el poxvirus recombinante obtenido como se ha descrito antes y transfectar con un segundo vector que comprende un segundo gen o genes extraños. En este caso, este gen se puede introducir en un sitio de inserción diferente del genoma del poxvirus, el segundo vector también difiere en las secuencias homólogas al poxvirus que dirigen la integración del segundo gen o genes extraños en el genoma del poxvirus. Después de que haya ocurrido la recombinación homóloga, el virus recombinante que comprende dos o más genes extraños se puede aislar. Para la introducción de genes extraños adicionales en el virus recombinante, se pueden repetir las etapas de infección y transfección usando el virus recombinante aislado en etapas previas para la infección y usando un vector adicional que comprende un gen o genes extraños adicionales para la transfección.

De manera alternativa, las etapas de infección y transfección como se han descrito antes son intercambiables, es decir, una célula adecuada se puede transfectar primero mediante el vector de plásmido que comprende el gen extraño y, después, se puede infectar con el poxvirus. Como alternativa adicional, se puede introducir cada gen extraño en

5 diferentes virus, coinfectar una célula con todos los virus recombinantes obtenidos y cribar un recombinante que incluya todos los genes extraños. Una tercera alternativa es la ligación del genoma de ADN y secuencias exógenas in vitro y la reconstitución del genoma de ADN del virus vaccinia recombinado usando un virus auxiliar. Una cuarta alternativa es la recombinación homóloga en *E. coli* u otra especie bacteriana entre un genoma del virus vaccinia clonado como un cromosoma bacteriano artificial (BAC) y una secuencia extraña lineal flanqueada con secuencias de ADN homólogas a secuencias que flanquean el sitio deseado de integración en el genoma del virus vaccinia.

#### Expresión de genes del VRS

10 En una realización, la expresión de uno, más o todos las secuencias de nucleótidos de VRS heterólogas están bajo el control de uno o más promotores de poxvirus. En ciertas realizaciones, el promotor de poxvirus es un promotor Pr7.5, un promotor híbrido temprano/tardío, un promotor PrS, un promotor sintético o natural temprano o tardío, o un promotor del virus de la viruela vacuna ATI. En ciertas realizaciones, el promotor de poxvirus se selecciona del grupo que consiste en el promotor PrS (SEQ ID NO: 39), el promotor Pr7.5 (SEQ ID NO: 40), el promotor PrSynIIm (SEQ ID NO: 41), el promotor PrLE1 (SEQ ID NO: 42) y el promotor PrH5m (SEQ ID NO: 43 [L.S. Wyatt et al. (1996), *Vaccine* 14(15):1451-1458]). En ciertas realizaciones, el promotor de poxvirus es el promotor PrS (SEQ ID NO: 39). En ciertas 15 realizaciones, el promotor de poxvirus es el promotor Pr7.5 (SEQ ID NO: 40). En ciertas realizaciones, el promotor de poxvirus es el promotor PrSynIIm (SEQ ID NO: 41). En ciertas realizaciones, el promotor de poxvirus es el promotor PrLE1 (SEQ ID NO: 42). En ciertas realizaciones, el promotor de poxvirus es el promotor PrH5m (SEQ ID NO: 43).

20 Una secuencia o secuencias de nucleótidos de VRS heterólogas se pueden expresar como una única unidad transcripcional. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de VRS heteróloga puede estar operativamente unida a un promotor del virus vaccinia y/o unida a un terminador transcripcional del virus vaccinia. En ciertas realizaciones, una o más secuencias de nucleótidos de VRS heterólogas se expresan como una proteína de fusión. La proteína de fusión puede comprender además un sitio de reconocimiento para una peptidasa o una secuencia de péptido de autoescisión heteróloga. La secuencia de péptido de autoescisión heteróloga puede ser la peptidasa 2A del virus de la fiebre aftosa.

25 En ciertas realizaciones, la "unidad transcripcional" se inserta por sí misma en un sitio de inserción en el genoma del MVA, pero también se puede insertar con otra(s) unidad(es) transcripcional(es) en un sitio de inserción en el genoma del MVA. La "unidad transcripcional" no es de origen natural (es decir, es heteróloga, exógena o extraña) en el genoma del MVA y es capaz de transcripción en células infectadas.

30 Preferiblemente, el MVA recombinante comprende 1, 2, 3, 4, 5 o más unidades transcripcionales insertadas en el genoma del MVA. En ciertas realizaciones, el MVA recombinante expresa de forma estable proteínas del VRS codificadas por 1, 2, 3, 4, 5 o más unidades transcripcionales. En ciertas realizaciones, el MVA recombinante comprende 2, 3, 4, 5 o más unidades transcripcionales insertadas en el genoma del MVA en 1, 2, 3 o más sitios de inserción en el genoma del MVA.

#### Vacunas de VRS y composiciones farmacéuticas

35 Puesto que los virus MVA recombinantes, incluyendo MVA-BN, descritos en la presente memoria están muy restringidos en replicación y, por lo tanto, muy atenuados, son candidatos ideales para el tratamiento de una amplia variedad de mamíferos incluyendo seres humanos e incluso seres humanos inmunocomprometidos. Por lo tanto, en la presente memoria se proporcionan los MVA recombinantes de acuerdo con la presente invención para usar como sustancias farmacéuticas activas, así como también composiciones farmacéuticas y vacunas, todas destinadas a 40 inducir una respuesta inmunitaria en un cuerpo animal vivo, incluyendo un ser humano.

Para esto, el MVA recombinante, vacuna o composición farmacéutica se puede formular en solución en un intervalo de concentración de  $10^4$  a  $10^9$  TCID<sub>50</sub>/ml, de  $10^5$  a  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml, de  $10^6$  a  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml, o de  $10^7$  a  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml. Una dosis preferida para seres humanos comprende entre  $10^6$  a  $10^9$  TCID<sub>50</sub>, incluyendo una dosis de  $10^6$  TCID<sub>50</sub>,  $10^7$  TCID<sub>50</sub>,  $10^8$  TCID<sub>50</sub> o  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir en general uno o más vehículos, aditivos, antibióticos, conservantes, adyuvantes, diluyentes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables y/o aprobados. Dichas sustancias auxiliares pueden ser agua, solución salina, glicerol, etanol, agentes humectantes o emulsionantes, sustancias amortiguadoras del pH o similares. Los vehículos adecuados son típicamente moléculas grandes metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, polí(ácidos lácticos), polí(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de 50 aminoácidos, agregados de lípidos o similares.

Para la preparación de vacunas, los virus MVA recombinantes proporcionados en la presente memoria se pueden convertir en una forma fisiológicamente aceptable. Esto se puede hacer basándose en la experiencia en la preparación de vacunas de poxvirus usadas para la vacunación contra la viruela tal como describen H. Stickl et al., *Dtsch. med. Wschr.* 99:2386-2392 (1974).

55 Por ejemplo, los virus purificados se pueden almacenar a -80°C con un título de  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml formulados en Tris aproximadamente 10 mM, NaCl 140 mM a pH 7,7. Para la preparación de dosis de vacunas, p. ej., se pueden liofilizar  $10^2$ - $10^8$  o  $10^2$ - $10^9$  partículas del virus en 100 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) en presencia de

peptona al 2% y albúmina humana al 1% en una ampolla, preferiblemente una ampolla de vidrio. Alternativamente, las dosis de vacunas se pueden producir por liofilización en etapas del virus en una formulación. Esta formulación puede contener aditivos adicionales tales como manitol, dextrano, azúcar, glicina, lactosa o polivinilpirrolidona u otros adyuvantes tales como antioxidantes o gas inerte, estabilizantes o proteínas recombinantes (p. ej., albúmina de suero humano) adecuados para la administración in vivo. La ampolla de vidrio después se sella y se puede almacenar a entre 4°C y temperatura ambiente durante varios meses. Sin embargo, mientras no exista la necesidad, la ampolla se almacena preferiblemente a temperaturas por debajo de -20°C.

Para la vacunación, el liofilizado se puede disolver en una solución acuosa, preferiblemente solución salina fisiológica o tampón de Tris, y administrar ya sea de forma sistémica o local, es decir, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intranasal o cualquier otra vía de administración conocida por el profesional experto. El modo de administración, la dosis y el número de administraciones pueden ser optimizados por los expertos en la técnica de manera conocida. Sin embargo, lo más habitualmente se vacuna a un paciente con una segunda dosis de vacuna aproximadamente de un mes a seis semanas después de la primera dosis de vacuna.

#### Usos de virus MVA recombinantes

15 También se proporcionan en la presente memoria MVA recombinantes para usar en métodos de inmunización de un sujeto animal. En ciertas realizaciones, el animal es un mamífero. En ciertas realizaciones, el mamífero es una rata, conejo, cerdo, ratón o ser humano, y los métodos comprenden administrar una dosis de uno o más de los MVA recombinantes proporcionados en la presente memoria al sujeto.

20 El sujeto preferiblemente es un ser humano y puede ser un adulto, en donde el adulto puede estar inmunocomprometido. En ciertas realizaciones, el adulto tiene más de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 u 85 años. En otras realizaciones, la edad del sujeto es menos de 5 años, menos de 3 años, menos de 2 años, menos de 15 meses, menos de 12 meses, menos de 9 meses, menos de 6 o menos de 3 meses. La edad del sujeto también puede estar en el intervalo de 0-3 meses, 3-6 meses, 6-9 meses, 9-12 meses, 1-2 años o 2-5 años.

25 En ciertas realizaciones, cualquiera de los MVA recombinantes proporcionados en la presente memoria se administran al sujeto en una dosis de  $10^6$  a  $10^9$  TCID<sub>50</sub>, en una dosis de  $10^6$  a  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> o de  $10^7$  a  $10^8$  TCID<sub>50</sub>.

Los MVA recombinantes proporcionados en la presente memoria también se pueden administrar al sujeto en una dosis de  $10^6$ ,  $10^7$  TCID<sub>50</sub>,  $10^8$  o  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>. En ciertas realizaciones, cualquiera de los MVA recombinantes proporcionados en la presente memoria se administran a un sujeto humano en una dosis de  $10^7$  TCID<sub>50</sub>,  $10^8$  o  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>.

30 Los MVA recombinantes proporcionados en la presente memoria se administran al sujeto en una sola dosis o en múltiples dosis (es decir, 2, 3, 4, etc.). En ciertas realizaciones, los MVA recombinantes se administran en una primera (sensibilización) y segunda (refuerzo) administración. En ciertas realizaciones, la primera dosis comprende de  $10^7$  a  $10^8$  TCID<sub>50</sub> del virus MVA recombinante y la segunda dosis comprende de  $10^7$  a  $10^8$  TCID<sub>50</sub> del virus MVA recombinante.

35 Los MVA recombinantes se pueden administrar de forma sistémica o local, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular o intranasal, preferiblemente por vía subcutánea o intranasal. Los MVA recombinantes también se pueden administrar por cualquier otra vía de administración conocida por el profesional experto.

40 Los autores de la presente invención han encontrado que los métodos actuales de diagnóstico de una infección por VRS pueden proporcionar resultados incorrectos. Por ejemplo, un inmunoensayo que detecta anticuerpos contra el VRS o un ensayo de placas virales puede no identificar necesariamente de manera precisa los individuos con riesgo de una infección recurrente. De hecho, los autores de la presente invención observaron que aun cuando una muestra tomada de un individuo puede dar un resultado negativo en un ensayo de placas virales [véase, p. ej., W. Olszewska et al., 2004.], los resultados a veces pueden ser falsos negativos, puesto que métodos más sensibles a veces demuestran que todavía están presentes las partículas de VRS infecciosas. De hecho, se necesitan métodos tales como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) para confirmar si un sujeto puede estar realmente infectado con el VRS, está en riesgo de infección recurrente o de hecho, si un sujeto vacunado tiene inmunidad estéril adquirida frente al VRS. Esta determinación puede ser crítica, dado que la reinfección después de la vacunación a veces produce la enfermedad potenciada, dando a veces como resultado la muerte.

45 Como se usa de manera intercambiable en la presente memoria, los términos "RT-qPCR" o "qRT-PCR" se refieren a un método conocido como "reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real" En algunos casos, este método también se puede denominar reacción en cadena de la polimerasa cinética (KPCR).

50 Adicional o alternativamente, se proporciona uno cualquiera de los MVA recombinantes descritos en la presente memoria para usar en métodos de inmunización de un sujeto que no ha adquirido inmunidad estéril contra el VRS, comprendiendo el método la administración intranasal de cualquiera de los MVA recombinantes descritos en la presente memoria al sujeto.

55 También se proporciona en la presente memoria uno cualquiera de los MVA recombinantes descritos en la presente memoria para usar en métodos de inducción de inmunidad estéril contra el VRS en un sujeto que no ha adquirido

inmunidad estéril contra el VRS, comprendiendo los métodos administrar por vía intranasal uno cualquiera de los MVA recombinantes descritos en la presente memoria al sujeto.

Los dibujos adjuntos, que se incorporan y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran varias realizaciones de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los genes del VRS heterólogos usados en las construcciones de MVA recombinante ensayadas MVA-mBN199B, MVA-mBN201B, MVA-mBN201BΔM2, MVA-mBN294B, MVA-mBN295B y MVA-mBN330B.

10 La Figura 2 muestra respuestas de IgG específica de VRS en suero medidas por ELISA basado en IBL de Hamburgo. Se inmunizaron ratones (vía s.c o i.n.) dos o tres veces con TBS o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN201BΔM2. Los ratones de control se inmunizaron dos veces por vía i.n. con  $10^6$  ufp de VRS. Los sueros se diluyeron 1/100 y se analizaron usando un ELISA de IgG específico de VRS basado en el kit de IBL de Hamburgo usando placas recubiertas con proteínas F y G del VRS.

15 La Figura 3 muestra las respuestas de IgG específica de VRS en suero medidas por ELISA basado en IBL de Hamburgo después de dilución seriada. Se inmunizaron ratones dos o tres veces (vía s.c. o i.n.) con TBS o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN201BΔM2. Los ratones de control se inmunizaron dos veces por vía i.n. con  $10^6$  ufp de VRS. Se diluyeron los sueros (1/100, 1/200 y 1/400) y se analizaron usando un ELISA de IgG específica de VRS basado en el kit de IBL de Hamburgo que usa placas recubiertas con proteínas F y G del VRS.

20 La Figura 4 muestra las respuestas de IgG específica de VRS en suero medidas por ELISA basado en IBL de Hamburgo usando placas recubiertas sólo con la proteína F. Se inmunizaron ratones por vía s.c o i.n. dos o tres veces con TBS o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN201BΔM2. Los ratones de control se inmunizaron dos veces por vía i.n. con  $10^6$  ufp de VRS. Los sueros se diluyeron 1/100 y se analizaron usando un ELISA de IgG específica de VRS basado en el kit de IBL de Hamburgo usando placas recubiertas sólo con proteínas F del VRS.

25 La Figura 5 muestra respuestas de IgG específica de VRS en suero medidas por ELISA basado en Serion. Se inmunizaron ratones dos o tres veces (vía s.c. o i.n.) con TBS o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN201BΔM2. Los ratones de control se inmunizaron dos veces por vía i.n. con  $10^6$  ufp de VRS. Los sueros se diluyeron 1/100 y se analizaron usando un ELISA de IgG específica de VRS basado en el kit de Serion usando placas recubiertas con un lisado de VRS.

30 La Figura 6 muestra respuestas de IgA frente a IgG específicas de VRS medidas por ELISA basado en IBL de Hamburgo en fluido de lavado broncoalveolar (BAL) y sueros. Se inmunizaron ratones dos o tres veces (vía s.c. o i.n.) con TBS o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN201BΔM2. Los ratones de control se inmunizaron dos veces por vía i.n. con  $10^6$  ufp de VRS. Los sueros y el fluido BAL se diluyeron (1/100) y se analizaron usando un ELISA de IgG o IgA específica de VRS basado en el kit de IBL de Hamburgo usando placas recubiertas con proteínas F y G de VRS.

35 La Figura 7 muestra respuestas de células T específicas de F del VRS, G del VRS y M2 del VRS medidas por ELISPOT. Se inmunizaron ratones dos o tres veces (vía s.c. o i.n.) con TBS o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN201BΔM2. Los ratones de control se inmunizaron dos veces por vía i.n. con  $10^6$  ufp de VRS. Se aislaron los bazos el día 48 y los esplenocitos se volvieron a estimular con tres péptidos específicos de F del VRS diferentes (VRS-1 (SEQ ID NO: 19), VRS-2 (SEQ ID NO: 20) y VRS-3 (SEQ ID NO: 21)), un péptido específico de G del VRS (VRS-4 (SEQ ID NO: 22)), un péptido específico de M2 del VRS (VRS-9 (SEQ ID NO: 27)) o MVA-BN. Se detectaron células secretoras de IFNy por ELISPOT. El índice de estimulación se calculó como se explica en los Ejemplos.

40 La Figura 8 muestra la pérdida de peso corporal relativa después de exposición al VRS(A2). Se inmunizaron ratones dos o tres veces (vía s.c. o i.n.) con TBS o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN201BΔM2. Los ratones de control se inmunizaron dos veces por vía i.n. con  $10^6$  ufp de VRS. Después los ratones se expusieron a  $10^6$  ufp de VRS(A2) el día 49. Se midió el peso diariamente a partir del día de la exposición. Se usó el peso del día de la exposición como valor inicial para calcular el porcentaje del cambio del peso corporal relativo.

45 La Figura 9 muestra la carga de VRS en pulmones medida por ensayo de placas. Se inmunizaron ratones dos o tres veces (vía s.c. o i.n.) con TBS o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN201BΔM2. Los ratones de control se inmunizaron dos veces por vía i.n. con  $10^6$  ufp de VRS. Después los ratones se expusieron a  $10^6$  ufp de VRS(A2) el día 49. Los pulmones se aislaron 4 días después y la carga de VRS (ufp por pulmón) se determinó mediante un ensayo de placas.

50 La Figura 10 muestra la carga de VRS en pulmones medida por RT-qPCR. Se inmunizaron ratones dos o tres veces (vía s.c. o i.n.) con TBS o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN201BΔM2. Los ratones de control se inmunizaron dos veces por vía i.n. con  $10^6$  ufp de VRS. Después los ratones se expusieron a  $10^6$  ufp de

VRS A2 el día 49. Los pulmones se aislaron 4 días más tarde y se determinó la carga de VRS (estimada en función del número de copias del gen L observadas) por RT-qPCR.

La Figura 11 muestra el nivel de IL4 en el lavado broncoalveolar (BAL) 4 días después de exposición a VRS(A2) medido por ELISA. Se inmunizaron ratones dos veces (vía s.c. o i.n.) con TBS o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B o

5 MVA-mBN201B. Los ratones de control se inmunizaron dos veces por vía i.n. con  $10^6$  ufp de VRS. Después los ratones se expusieron a  $10^6$  ufp de VRS A2. Los pulmones se lavaron con 1 ml de PBS 4 días más tarde y se determinó el nivel de IL4 en el BAL por ELISA (n.d. = no detectable).

La Figura 12 muestra el nivel de IL5 en el lavado broncoalveolar (BAL) 4 días después de exposición a VRS(A2) medido por ELISA. Se inmunizaron ratones dos veces (vía s.c. o i.n.) con TBS o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B o

10 MVA-mBN201B. Los ratones de control se inmunizaron dos veces por vía i.n. con  $10^6$  ufp de VRS. Después los ratones se expusieron a  $10^6$  ufp de VRS A2. Los pulmones se lavaron con 1 ml de PBS 4 días más tarde y se determinó el nivel de IL5 en el BAL por ELISA (n.d. = no detectable).

La Figura 13 muestra respuestas de IgG específica de VRS en suero medidas por ELISA basado en Serion. Se inmunizaron ratones por vía s.c dos veces con 3 semanas de diferencia con TBS o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN294A. Los ratones de control se inmunizaron dos veces por vía i.n. con  $10^6$  ufp de VRS.

15 Los sueros de 5 ratones por grupo obtenidos 2 semanas después de la última inmunización se diluyeron y se analizaron usando un ELISA de IgG específica de VRS basado en el kit Serion usando placas recubiertas con un lisado de VRS.

20 La Figura 14 muestra respuestas de anticuerpos neutralizadores específicos de VRS en suero medidas por PRNT. Se inmunizaron ratones por vía s.c dos veces con 3 semanas de diferencia con TBS o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN294A. Los ratones de control se inmunizaron dos veces por vía i.n. con  $10^6$  ufp de VRS. Los sueros de 5 ratones por grupo obtenidos 2 semanas después de la última inmunización se analizaron por PRNT.

25 La Figura 15 muestra respuestas de células T específicas de F del VRS y del VRS medidas por ELISPOT. Se inmunizaron ratones s.c dos veces con 3 semanas de diferencia con TBS o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN294A. Los ratones de control se inmunizaron dos veces por vía i.n. con  $10^6$  ufp de VRS. Los bazo se aislaron el día 34 y los esplenocitos se volvieron a estimular con un péptido específico de F del VRS (VRS-2 (SEQ ID NO: 20), un péptido específico de M2 del VRS (VRS-9 (SEQ ID NO: 27)) o MVA-BN. Se detectaron células secretoras de IFN $\gamma$  por ELISPOT. El índice de estimulación se calculó tal como se explica en los ejemplos.

30 La Figura 16 muestra la carga de VRS en pulmones medida mediante un ensayo de placas. Se inmunizaron ratones por vía s.c dos veces con 3 semanas de diferencia con TBS o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN294A. Los ratones de control se inmunizaron dos veces por vía i.n. con  $10^6$  ufp de VRS o i.m con 50  $\mu$ l de FI-VRS. Después los ratones se expusieron a  $10^6$  ufp de VRS(A2) el día 49. Los pulmones se aislaron 4 días más tarde y la carga de VRS (ufp por pulmón) se determinó por un ensayo de placas.

35 La Figura 17 muestra la carga de VRS en pulmones medida por RT-qPCR. Se inmunizaron ratones por vía s.c dos veces con 3 semanas de diferencia con TBS o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN294A. Los ratones de control se inmunizaron dos veces por vía i.n. con  $10^6$  ufp de VRS o i.m con 50  $\mu$ l de FI-VRS. Después los ratones se expusieron a  $10^6$  ufp de VRS A2 el día 49. Los pulmones se aislaron 4 días más tarde y se determinó la carga de VRS (estimada en función del número de copias del gen L observado) por RT-qPCR.

40 La Figura 18 muestra infiltraciones de eosinófilos y neutrófilos en los fluidos de lavado broncoalveolar (BAL) 4 días después de exposición a VRS(A2). Se inmunizaron ratones por vía s.c dos veces con 3 semanas de diferencia con TBS o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B, MVA-BN201B o MVA-mBN294A. Los ratones de control se inmunizaron dos veces por vía i.n. con  $10^6$  ufp de VRS o i.m con 50  $\mu$ l de FI-VRS. Después los ratones se expusieron a  $10^6$  ufp de VRS A2. Los pulmones se lavaron con 1 ml de PBS 4 días después y se determinó el porcentaje de eosinófilos y neutrófilos en el fluido de BAL.

45 Breve descripción de las secuencias

La SEQ ID NO: 1 es una secuencia de ADN que codifica la proteína G de longitud completa de la cepa A2 del VRS humano (VRSh) (nº de acceso en GenBank M11486).

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de la proteína G de longitud completa de la cepa A2 del VRSh (nº de acceso en GenBank M11486).

50 La SEQ ID NO: 3 es una secuencia de ADN que codifica la proteína F de longitud completa (variante BN) de la cepa A2 del VRSh.

La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de la proteína F de longitud completa (variante BN) de la cepa A2 del VRSh.

La SEQ ID NO: 5 es una secuencia de ADN que codifica la proteína F de longitud completa (variante BN) de la cepa ALong del VRSh.

La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos que codifica la proteína F de longitud completa (variante BN) de la cepa ALong del VRSh.

5 La SEQ ID NO: 7 es una secuencia de ADN que codifica la proteína G truncada que carece de los dominios transmembrana y citoplasmático de la cepa B del VRSh (nº de acceso en GenBank P20896).

La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de la proteína G truncada que carece de los dominios transmembrana y citoplasmático de la cepa B del VRSh (nº de acceso en GenBank P20896).

10 La SEQ ID NO: 9 es una secuencia de ADN que codifica la proteína N que carece de un codón de terminación de la cepa A2 del VRSh (nº de acceso en GenBank M11486).

La SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de la proteína N que carece de un codón de terminación de la cepa A2 del VRSh (nº de acceso en GenBank M11486).

La SEQ ID NO: 11 es una secuencia de ADN que codifica un fragmento de proteasa 2A del virus de la fiebre aftosa que carece de los codones tanto de inicio como de terminación.

15 La SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos de un fragmento de proteasa 2A del virus de la fiebre aftosa que carece de los codones tanto de inicio como de terminación.

La SEQ ID NO: 13 es una secuencia de ADN que codifica la proteína M2 de longitud completa que carece de un codón de inicio de la cepa A2 del VRSh (nº de acceso en GenBank M11486).

20 La SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos que codifica la proteína M2 de longitud completa que carece de un codón de inicio de la cepa A2 del VRSh (nº de acceso en GenBank M11486).

La SEQ ID NO: 15 es una secuencia de ADN que codifica la proteína F truncada que carece de los dominios transmembrana y citoplasmático (variante BN) de la cepa A2 del VRSh (nº de acceso en GenBank M11486). La SEQ ID NO: 16 es la secuencia de aminoácidos de la proteína F truncada que carece de los dominios transmembrana y citoplasmático (variante BN) de la cepa A2 del VRSh (nº de acceso en GenBank M11486).

25 La SEQ ID NO: 17 es una secuencia de ADN que codifica la proteína N que carece de un codón de terminación de la cepa A2 del VRSh (nº de acceso en GenBank M11486) + una secuencia de ADN que codifica el fragmento de proteasa 2A del virus de la fiebre aftosa, que carece tanto de un codón de inicio como de un codón de terminación + una secuencia de ADN que codifica la proteína M2 de longitud completa que carece de un codón de inicio de la cepa A2 del VRSh (nº de acceso en GenBank M11486).

30 La SEQ ID NO: 18 es la secuencia de aminoácidos de la proteína N de la cepa A2 del VRSh (nº de acceso en GenBank M11486) + la secuencia de aminoácidos del fragmento de proteasa 2A del virus de la fiebre aftosa, que carece de un codón de inicio + la secuencia de aminoácidos de la proteína M2 de longitud completa que carece un codón de inicio de la cepa A2 del VRSh (nº de acceso en GenBank M11486).

La SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácidos del péptido VRS-1 derivado de la proteína F del VRS.

35 La SEQ ID NO: 20 es la secuencia de aminoácidos del péptido VRS-2 derivado de la proteína F del VRS.

La SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácidos del péptido VRS-3 derivado de la proteína F del VRS.

La SEQ ID NO: 22 es la secuencia de aminoácidos del péptido VRS-4 derivado de la proteína G del VRS.

La SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácidos del péptido VRS-5 derivado de la proteína G del VRS.

La SEQ ID NO: 24 es la secuencia de aminoácidos del péptido VRS-6 derivado de la proteína G del VRS.

40 La SEQ ID NO: 25 es la secuencia de aminoácidos del péptido VRS-7 derivado de la proteína G del VRS.

La SEQ ID NO: 26 es la secuencia de aminoácidos del péptido VRS-8 derivado de la proteína G del VRS.

La SEQ ID NO: 27 es la secuencia de aminoácidos del péptido VRS-9 derivado de la proteína M2 del VRS.

La SEQ ID NO: 28 es una secuencia de ADN que codifica la proteína F de longitud completa de la cepa A2 del VRSh.

La SEQ ID NO: 29 es la secuencia de aminoácidos de la proteína F de longitud completa de la cepa A2 del VRSh.

45 La SEQ ID NO: 30 es una secuencia de ADN que codifica la proteína G de longitud completa de la cepa A2 del VRSh.

- La SEQ ID NO: 31 es la secuencia de aminoácidos de la proteína G de longitud completa de la cepa A2 del VRSh.
- La SEQ ID NO: 32 es una secuencia de ADN que codifica la proteína M2 de longitud completa de la cepa A2 del VRSh.
- La SEQ ID NO: 33 es la secuencia de aminoácidos de la proteína M2 de longitud completa de la cepa A2 del VRSh.
- La SEQ ID NO: 34 es una secuencia de ADN que codifica la proteína N de longitud completa de la cepa A2 del VRSh.
- 5 La SEQ ID NO: 35 es la secuencia de aminoácidos de la proteína N de longitud completa de la cepa A2 del VRSh.
- La SEQ ID NO: 36 es el Cebador 1 usado en la RT-qPCR.
- La SEQ ID NO: 37 es el Cebador 2 usado en la RT-qPCR.
- La SEQ ID NO: 38 es el Sonda 6 usada en la RT-qPCR.
- La SEQ ID NO: 39 es la secuencia de nucleótidos del promotor PrS.
- 10 La SEQ ID NO: 40 es la secuencia de nucleótidos del promotor Pr7.5.
- La SEQ ID NO: 41 es la secuencia de nucleótidos del promotor PrSynIIm.
- La SEQ ID NO: 42 es la secuencia de nucleótidos del promotor PrLE1.
- La SEQ ID NO: 43 es la secuencia de nucleótidos del promotor PrH5m.

#### Ejemplos

##### 15 Ejemplo 1: Construcción de MVA recombinantes.

La generación de MVA recombinante se hizo por inserción de las secuencias codificantes del VRS junto con los promotores indicados (Figura 1) en el genoma del MVA por recombinación homóloga en células CEF usando un marcador de selección para seleccionar el MVA recombinante. El uso de regiones intergénicas (IGR) como sitios de inserción se describe en la publicación internacional WO 03/097845. Con el fin de eliminar el marcador de selección, 20 se empleó una segunda etapa de recombinación homóloga.

Se usó el virus MVA-BN® como material de partida para la generación del MVA-mBN199B recombinante que contiene los genes para el VRS-A2-G y VRS-F-A2\_BN en la IGR88/89. El material PreMaster de MVA-mBN199 se usó como material de partida para la generación de MVA-mBN201B descrito a continuación.

Inserciones en IGR88/89 (MVA-mBN199B):

25 La secuencia codificante de VRS-A2-G se basa en la secuencia de origen natural de la glucoproteína G de la cepa VRS-A2. La secuencia codificante de la proteína de fusión VRS-F-A2 BN también se basa en la cepa VRS-A2, pero fue modificada por Bavarian Nordic. Ambos genes insertados fueron sintetizados por Geneart con el uso de codones humanos adaptados y se usaron para clonar un plásmido recombinante. La secuencia de proteína de VRS-A2-G muestra 100% de identidad respecto a la secuencia de GenBank P03423.1. La secuencia de proteína de VRS-F-A2 BN muestra sólo 99% de identidad respecto a la secuencia de GenBank P03420.1 debido a un solo intercambio de 30 aminoácidos (P a A) en la posición 103.

Inserciones en IGR148/149 (MVA-mBN201B):

35 Las secuencias codificantes de VRS-N-A2 y VRS-M2-A2 se basan en las secuencias de origen natural de las respectivas glucoproteínas de la cepa VRS-A2. Ambos genes están conectados por una secuencia peptídica de autoescisión 2A [M.D. Ryan et al. (1991), *J. Gen. Virol.* 72(Pt 11):2727-2732] que permite la expresión de dos proteínas nativas separadas bajo el control de un promotor único. Las secuencias codificantes de VRS-G(B) y VRS-F A long BN se truncaron para retirar los dominios transmembrana de modo que las proteínas expresadas puedan ser secretadas. Todos los genes insertados fueron sintetizados por Geneart con uso optimizado de codones y se usaron para clonar el plásmido recombinante. Las secuencias de proteínas de VRS-N-A2 y VRS-M2-A2 muestran 100% de identidad 40 respecto a la secuencia de GenBank P03418.1 y P04545.1, respectivamente. La secuencia de proteína de VRS-G(B) truncada muestra 100% de identidad respecto a la secuencia de GenBank P20896.1. La secuencia codificante de VRS-F A long BN truncada se diseñó para contener los primeros 526 aminoácidos de la proteína VRS-F como se describe en R.P. Du et al. (1994) *Biotechnology* (N Y) 12 (8):813-818.

Mutante de eliminación en M2(A2) de MVA-mBN210BΔM2:

45 El MVA-mBN210BΔM2 incluye una mutación de eliminación en el 12º codón del gen M2(A2) que no permite la expresión de un M2 funcional. Esta eliminación produce la adición de los dos aminoácidos treonina y alanina a los primeros 11 aminoácidos de M2 (A2) seguido de una terminación transcripcional (codón de terminación UGA).

**Ejemplo 2: Inmunogenicidad y eficacia de las vacunas de MVA recombinante que expresan la proteína F del VRS, proteína G del VRS, proteína N del VRS y proteína M2 del VRS.**

La vacuna experimental MVA-mBN199B codifica la glucoproteína (G) y la proteína de fusión (F) del VRS, mientras que MVA-mBN201BΔM2 y MVA-mBN201B expresan versiones truncadas de F y G además de las proteínas F y G de longitud completa, la proteína de la nucleocápside (N) y, en el caso de MVA-mBN201B, también la proteína de la matriz (M2) del VRS (véase la Figura 1). El objetivo de estos experimentos era analizar la inmunogenicidad y eficacia protectora de MVA-mBN201BΔM2 y MVA-mBN201B en comparación con MVA-mBN199B después de dos o tres inmunizaciones por las vías de administración subcutánea (s.c.) o intranasal (i.n.).

La eficacia de estas construcciones se ensayó usando un modelo de exposición de VRS(A2) en ratones BALB/c. Dos inmunizaciones con MVA-mBN199B o MVA-mBN201B ofrecían protección parcial según se consideró por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) cuando se aplicaron por vía subcutánea y una protección casi completa cuando se aplicaron por la vía intranasal. La protección ofrecida por MVA-mBN201B era mejor que la ofrecida por MVA-mBN199B. No había diferencia en las respuestas inmunitarias humorales inducidas por las dos construcciones, aunque se observan diferencias importantes en las respuestas de células T. El MVA-mBN199B inducía una respuesta celular específica de VRS-F buena, mientras que se observó una fuerte respuesta de células T específica de M2 con MVA-mBN201B, así como también una respuesta específica de G más pronunciada en comparación con MVA-mBN199B. Puesto que las respuestas de IgG y células T inducidas después de inmunización subcutánea e intranasal eran similares, la inmunidad estéril casi completa obtenida por inmunizaciones intranasales se correlaciona probablemente con la inducción y secreción de IgA específica de VRS en el sitio de infección de la mucosa. Para el MVA-mBN201BΔM2, la falta de respuestas de células T específica de M2 se correlacionaba con una protección reducida en comparación con MVA-mBN201B y daba como resultado una protección similar a MVA-mBN199B.

Diseño del estudio

Los ratones se trataron por vía subcutánea (s.c.) o intranasal (i.n.) con  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B (Grupos 3, 4 y 5),  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN201B (Grupos 6, 7 y 8) o  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN201BΔM2 (Grupos 9). Los ratones se trataron ya sea dos veces (Grupos 3, 4, 6, 7 y 9) o tres veces (Grupos 5 y 8) de acuerdo con la Tabla 1. Los dos grupos de control se trataron (s.c.) dos veces con TBS (Grupo 1) o i.n. con VRS (Grupo 2) de acuerdo con la Tabla 7. Se recogió sangre el día antes de la inmunización o exposición, así como el día del sacrificio. Los títulos de IgG específica de VRS se determinaron por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). El día 48, la mitad de los ratones fueron sacrificados. Se retiraron sus bazos y se prepararon para el análisis de respuestas de células T específicas de VRS por ensayo de manchas por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISPOT). El día 49, los ratones que quedaban se expusieron (i.n.) a  $10^6$  ufp de VRS A2. Se controlaron el aspecto y el peso corporal diariamente empezando el día de la exposición. Cuatro días después de la exposición, los ratones se sacrificaron por inyección de una dosis elevada de Ketamina-Xilazina y extracción de sangre. Despues del lavado de los pulmones, los pulmones se retiraron y se analizó la carga de VRS por ensayo de placas y por RT-qPCR.

Tabla 1: Diseño experimental

Grupo	Tamaño del grupo	Jaula	Administración de los ítems de ensayo o referencia				Extracción de sangre y ELISPOT (Día)%	Exposición (Día)%, #
			Inyecciones	Programa (Día)%	Vía	Dosis por inyección		
1	5	A	TBS	14 y 35	s.c.	n.a.	13, 34, 48 y 53	49
	5	B					13, 34 y 48&	-
2	5	C	RSV	14 y 35	i.n.	$10^6$ ufp	13, 34, 48 y 53	49
	5	D					13, 34 y 48&	-
3	5	E	MVA-mBN199B	14 y 35	s.c.	$1 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub>	13, 34, 48 y 53	49
	5	F					13, 34 y 48&	-
4	5	G	MVA-mBN199B	14 y 35	i.n.	$1 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub>	13, 34, 48 y 53	49
	5	H					13, 34 y 48&	-
5	5	J	MVA-mBN199B	0, 21 y 35	s.c.	$1 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub>	-1, 20 34, 48 y 53	49
	5	K					-1, 20 34 y 48&	-
6	5	L	MVA-mBN201B	14 y 35	s.c.	$1 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub>	13, 34, 48 y 53	49
	5	M					13, 34 y 48&	-
7	5	N	MVA-mBN201B	14 y 35	i.n.	$1 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub>	13, 34, 48 y 53	49
	5	P					13, 34 y 48&	-
8	5	Q	MVA-mBN201B	0, 21 y 35	s.c.	$1 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub>	-1, 20 34, 48 y 53	49
	5	R					-1, 20 34 y 48&	-
9	5	W	MVA-mBN201BΔM2	14 y 35	s.c.	$1 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub>	13, 34, 48 y 53	49

% Con respecto a la primera inmunización.

# Los ratones se expusieron por la vía intranasal a  $10^6$  ufp de VRS A2. Cuatro días después de exposición, se extrajo sangre de los ratones y se sacrificaron con anestesia. & El día 48, estos ratones se sacrificaron y los bazo se analizaron por ELISPOT.

Programa del estudio: El programa en la fase viva se resume en la Tabla 2.

Tabla 2: Programa de estudio de la fase viva

Día**	Procedimientos
-16	Llegada e importación a instalación animal de ratones 85 BALB/c, distribución de tarjetas de jaulas y distribución de 5 ratones por jaula
-1	Sujección en oreja, reconocimiento de inclusión/exclusión de todos los ratones
-1	Pre-extracción de sangre de los ratones de las jaulas J, K, Q y R (punción de la vena facial del lado derecho)
0	1 <sup>a</sup> administración a ratones de las jaulas J, K, Q y R
13	Pre-extracción de sangre de todos los ratones excepto los ratones de las jaulas J, K, Q y R (punción de la vena facial del lado derecho)
14	1 <sup>a</sup> administración a todos los ratones excepto ratones de las jaulas J, K, Q y R
20	Extracción de sangre de las jaulas J, K, Q y R (punción de la vena facial del lado izquierdo)
21	2 <sup>a</sup> administración a ratones de las jaulas J, K, Q y R
34	Extracción de sangre de todos los ratones (punción de la vena retrobulbar del ojo izquierdo)
35	2 <sup>a</sup> administración a todos los ratones excepto los ratones de las jaulas J, K, Q y R 3 <sup>a</sup> administración a ratones de las jaulas J, K, Q y R
48	Extracción de sangre de todos los ratones (punción de la vena retrobulbar del ojo derecho) Extracción de sangre final para las jaulas B, D, F, H, K, M, P y R
48	Los bazo de los ratones de las jaulas B, D, F, H, K, M, P y R se extrajeron para el análisis por ELISPOT
49	Exposición de todos los ratones
49 a 53	Medición diaria del aspecto y el peso corporal
53	Extracción de sangre final, sangrado y toma de muestra del BAL y pulmón de los ratones que quedan

\*\* Con respecto al día de la 1<sup>a</sup> inmunización

## 5 Material y métodos

Animales experimentales. Se obtuvieron ochenta y cinco ratones hembra BALB/cJ Rj (H-2d) de siete semanas de edad de Janvier (Route des Chênes Secs, F-53940 Le Genest-Saint-Isle, Francia). Todos los ratones estaban exentos de patógenos específicos.

Alojamiento. El estudio se realizó en la habitación 117 de la instalación de animales en Bavarian Nordic-Martinsreid. Esta unidad se proporcionaba con aire filtrado a una temperatura de 20-24°C y una humedad relativa entre 40% y 70%. La sala estaba iluminada artificialmente con un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. El período de aclimatación del estudio era de 15 días. Los animales se alojaron en jaulas transparentes SealSafe™ (jaula H Temp [polisulfona] Tipo II L - estándar Euro), con una superficie de suelo de 530 cm<sup>2</sup>. Las jaulas se cubrieron con una tapa H-Temp SealSafe™. Las jaulas se pusieron en un sistema TECNIPLAST-IVC SealSafe™ con una unidad de circulación SLIMLine™ que proporciona aire filtrado con HEPA a cada una de las jaulas por separado. El lecho de los animales se cambió una vez por semana.

Dieta y agua. Se proporcionó a los ratones acceso libre a la dieta de mantenimiento irradiada (SSNIFF R/M-H, irradiada, V1534-727) y agua (tratada en autoclave a 121°C durante 20 minutos).

Procedimientos previos al tratamiento: Identificación de animales. Para marcar de forma individual a los animales dentro de cada jaula, se realizó la perforación de orejas de acuerdo con procedimientos estándar.

Reconocimiento de inclusión/exclusión. El reconocimiento de inclusión/exclusión se hizo de acuerdo con procedimientos estándar.

Muestras de sangre para la preextracción de sangre. Se obtuvieron muestras de sangre de aproximadamente 150 µl por punción de la vena facial de acuerdo con procedimientos estándar. Las muestras de sangre se transfirieron al laboratorio para procesamiento adicional de acuerdo con procedimientos estándar.

Procedimientos de tratamiento: Preparación y administración de los ítems de ensayo 1 a 3 y los ítems de referencia. La preparación y administración de los ítems de ensayo y de referencia se llevó a cabo en una cabina de seguridad microbiológica clase II (HERAsafe®/clase II tipo H, Kendro) de acuerdo con procedimientos estándar. Brevemente, para la administración s.c., se diluyeron MVA recombinantes en TBS para obtener una solución de trabajo con una concentración de  $2 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml. Se inyectó  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> en 500 µl por vía s.c. de acuerdo con procedimientos

estándar. Para la administración i.n., se diluyeron MVA recombinantes en TBS para obtener una solución de trabajo con una concentración de  $2 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/ml. Se administraron 50  $\mu$ l de los virus diluidos en una fosa nasal de ratones anestesiados (Xilazina/Ketamina) de acuerdo con procedimientos estándar. Se administraron 500  $\mu$ l de TBS por vía s.c. de acuerdo con procedimientos estándar.

- 5 Preparación y administración del ítem de ensayo 4 / exposición al virus. El vial con solución madre de VRS se descongeló y se usó lo más rápidamente posible debido a la inestabilidad del virus (máximo 15 minutos en hielo). El virus se mantuvo en hielo en todo momento y se usó inmediatamente para la exposición de ratones anestesiados (Xilazina/Ketamina) con 100  $\mu$ l de la solución del virus puro por vía intranasal de acuerdo con procedimientos estándar.

Procedimientos posteriores al tratamiento:

- 10 Peso corporal. Los pesos corporales se controlaron diariamente desde el día de la exposición hasta el sacrificio de acuerdo con los procedimientos estándar.

Muestras de sangre. Las muestras de sangre (aproximadamente 150  $\mu$ l) se obtuvieron por punción de la vena retrobulbar o facial (para detalles véase la Tabla 1 y Tabla 2) de acuerdo con procedimientos estándar. Las muestras de sangre se transfirieron al laboratorio para procesamiento adicional de acuerdo con procedimientos estándar.

- 15 Eutanasia. Se llevó a cabo la eutanasia de la mitad de los ratones el día 48 por dislocación cervical. El día 53, los ratones que quedaban recibieron una dosis doble de Ketamina-Xilazina por inyección intraperitoneal y se llevó a cabo la eutanasia cortando la aorta dentro de la cavidad peritoneal.

- 20 Extracción del bazo. Los bazos se trajeron de forma aséptica. Se pusieron en tubos llenos con medio de acuerdo con procedimientos estándar. Estos tubos se habían importado a la instalación animal y después se exportaron de acuerdo con procedimientos estándar.

Lavado de pulmones y extracción de pulmones. El fluido del lavado broncoalveolar (BAL) se recogió lavando con chorro los pulmones 4 veces con 1 ml de PBS. Después, los pulmones se retiraron y se congelaron instantáneamente en dos mitades en nitrógeno líquido para el ensayo de placas y la extracción de ARN posteriores.

- 25 Análisis: Procesamiento de muestras de sangre y almacenamiento de los sueros. Después de la transferencia al laboratorio, las muestras de sangre se procesaron en suero de acuerdo con procedimientos estándar. Después de la preparación, los sueros se almacenaron a -20°C ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) hasta que se requerían para el análisis.

- 30 Análisis de los títulos de anticuerpos específicos de VRS de muestras de suero. Los títulos totales por ELISA de IgG específica de VRS se determinaron a partir de todas las muestras de suero usando un kit de ELISA modificado (Serion ELISA classic, nº de catálogo ESR113G). En lugar de usar el anticuerpo anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina suministrado con el kit, se usó un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Serotec cat: 103004) como el anticuerpo secundario.

- 35 Los títulos por ELISA de IgG específica de VRS-F/G se determinaron a partir de todas las muestras de suero y el fluido BAL usando un kit de ELISA modificado (IBL-Hamburgo Ref. RE56881). En lugar del anticuerpo anti-IgG humana conjugado con POD suministrado con el kit, se usó un anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón conjugado con HRP (ref. BN-687-95/96, Serotec cat: AAC10P) como el anticuerpo secundario.

- 40 Excepto por los grupos 4 y 7, los títulos por ELISA de IgG específica de VRS-F se determinaron a partir de muestras de suero el día 48 usando un kit de ELISA modificado (reactivos de IBL-Hamburgo Ref. RE56881 y tiras de microtitulación de IgG (proteína F) de VRS Ref. RE56692). En lugar del anticuerpo anti-IgG humana conjugado con POD suministrado con el kit, se usó un anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón conjugado con HRP (ref. BN-687-95/96, Serotec cat: AAC10P) como el anticuerpo secundario.

- 45 Las títulos por ELISA de IgA específica de VRS en sueros y fluido de BAL se determinaron a partir de las muestras del día 48 y del día 53, respectivamente, usando un kit de ELISA modificado (IBL-Hamburgo Ref. RE56881): En lugar del anticuerpo anti-IgG humana conjugado con POD suministrado con el kit, se usó un anticuerpo de oveja anti-IgA de ratón conjugado con HRP (ref. BN-687-95/96 Serotec cat: STAR137P) como el anticuerpo secundario.

- 50 Análisis de las respuestas inmunitarias celulares específicas de VRS de esplenocitos. Las respuestas celulares específicas de F de VRS, G de VRS y M2 de VRS se determinaron dos semanas después de la última administración por reestimulación de los esplenocitos con péptidos específicos como se describe en otra parte (véase, p. ej., S.M. Varga et al. (2000); S. Johnstone et al. (2004); S. Jiang et al., (2002); y A.B. Kulkarni et al., *J. Virol.* 67(7):4086-4092 (1993)) y la detección de la liberación de IFNy a partir de los esplenocitos por ensayo ELISPOT.

- 50 Método de ensayo ELISPOT. Se usó el Mouse IFN-Gamma-Kit (BD Biosciences, nº de catálogo 551083) para el ensayo ELISPOT. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las placas se recubrieron con el anticuerpo de captura el día anterior al aislamiento de esplenocitos. Después del aislamiento, las células se transfirieron a las placas ELISPOT y se estimularon con diferentes péptidos (véase la Tabla 3) durante 20 horas a 37°C. La producción de IFNy se detectó usando el anticuerpo de detección. Las placas se revelaron usando

el BD™ ELISPOT AEC Substrate Set (BD Biosciences, nº de catálogo 551951) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 Plan de estimulación de ELISPOT. Todas las condiciones se ensayaron por duplicado. Se usaron los péptidos VRS-1, VRS-2, VRS-3, VRS-4 y VRS-5 (véase la Tabla 3) en una concentración final de 5 µg/ml (1 µg/pocillo) para estimular 5X10<sup>5</sup> y 2,5x10<sup>5</sup> esplenocitos por pocillo. Se usó MVA (control de inmunización) con una multiplicidad de infección (MOI) de 10 para estimular 5X10<sup>5</sup> y 2,5X10<sup>5</sup> esplenocitos por pocillo y se usó concavalina A (ConA [control positivo]) en una concentración final de 0,5 µg/ml para estimular 2,5X10<sup>5</sup> esplenocitos. Como control negativo, se cultivaron 5X10<sup>5</sup> esplenocitos en medio solo (RPMI-1640 complementado con Glutamax, penicilina, estreptomicina, suero fetal bovino al 10% y β-mercaptoetanol 10<sup>-5</sup> M).

10 Tabla 3: Estimulación específica de VRS

Nombre del péptido	Especificidad	Secuencia del péptido
RSV-1	F	TYMLTNSELL (SEQ ID NO: 19)
RSV-2	F	KYKNAVTEL (SEQ ID NO: 20)
RSV-3	F	ELQLLMQSTPAANNR (SEQ ID NO: 21)
RSV-4	G	WAICKRIPNKKPG (SEQ ID NO: 22)
RSV-5	M2	SYIGSINNI (SEQ ID NO: 27)

Análisis de fluido de BAL y pulmones. La caracterización celular del BAL no fue posible debido a problemas de tinción. La carga de VRS en las muestras de pulmón se determinó por ensayo de placa del VRS y por RT-qPCR.

15 Ensayo de placas del VRS. La mitad de cada uno de los pulmones congelados instantáneamente se homogeneizó en 1 ml de medio frío usando una prensa de French (medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero bovino fetal al 7%). Después de una breve centrifugación, se titularon dos tubos de cada líquido sobrenadante en diluciones seriadas de dos veces en monocapas de células Vero cultivadas en placas de fondo plano de 48 pocillos. Seis días después, las monocapas se lavaron y se fijaron con formaldehído al 1%. Después de 24 horas, las monocapas se tiñeron con Rojo neutro al 0,04% y se contaron las placas.

20 20 RT-qPCR de VRS. Se separaron inmediatamente 100 µl del tejido pulmonar homogenizado y se aisló el ARN usando el minikit RNeasy® de Qiagen (nº de catálogo 74104). Se llevó a cabo la reacción de transcripción inversa usando el kit High Capacity RNA-to-cDNA de Applied Biosystems (nº de catálogo 4387406). La PCR específica para el gen L del VRS se llevó a cabo con los siguientes parámetros en un termociclador: (1) 50°C durante 2 minutos; (2) 95°C durante 10 minutos; (3) 45 ciclos de (15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C) usando Universal PCR Master Mix de Applied Biosystems (nº de catálogo 4352042) y una mezcla de tres cebadores: (1) cebador 1 (5'-GAA CTC AGT GTA GGT AGA ATG TTT GCA-3'; SEQ ID NO: 36); (2) cebador 2 (5'-TTC AGC TAT CAT TTT CTC TGC CAA T-3'; SEQ ID NO:37); y (3) sonda 6 (5'-TTT GAA CCT GTC TGA ACA TTC CCG GTT-3'; (SEQ ID NO: 38). Se determinó el número de copias a partir de una curva de referencia del vector plasmídico pMISC202 que contenía un fragmento del gen L del VRS. Se usaron reacciones similares para la beta-actina murina como controles internos para el ADNc de entrada usando una sonda marcada con VIC/MGB de Applied Biosystems (nº de catálogo 4351315).

30 Documentación del estudio. Se preparó un diagrama de flujo de la fase viva para recoger toda la información durante las etapas individuales de la fase viva. Además, se registró la información específica del ratón o jaula en la tarjeta de la jaula correspondiente. Las tarjetas de las jaulas no se consideran como datos sin procesar del estudio, sino que son un requisito del Gobierno de Alta Baviera.

35 35 Se preparó un diagrama de flujo de la fase de análisis para recoger toda la información durante las etapas individuales de la fase de análisis. Los ensayos se documentaron en registros de ensayos específicos del ensayo o libretas de laboratorio; las referencias cruzadas se documentaron en el diagrama de flujo de la fase de análisis. Toda la documentación del ensayo incluyendo los datos sin procesar se revisó de acuerdo con procedimientos estándar. Además, se prepararon las hojas de seguimiento de muestra para las muestras de suero de acuerdo con procedimientos estándar.

40 40 Procesamiento de datos. Los datos sin procesar se transfirieron a los archivos de Excel correspondientes para su análisis posterior de acuerdo con procedimientos estándar.

ELISA. Los valores medios de la DO y los errores estándar de la media se calcularon usando Excel.

45 45 ELISPOT. Las placas de ELISPOT se leyeron con un lector de CTL de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinó el número de células que forman manchas (SFC) para cada pocillo y transfirió a un archivo de Excel para la posterior evaluación. A partir de la incubación con 5x10<sup>5</sup> y 2,5x10<sup>5</sup> células por pocillo, se calculó el número de manchas por 1x10<sup>6</sup> esplenocitos por cada pocillo. Se calculó la media para el control negativo y se restó de cada valor individual antes del cálculo del valor medio por ratón para obtener el valor del índice de estimulación (SI) (frecuencia específica de péptidos de esplenocitos que liberan IFN-γ) por ratón.

5 Para las estimulaciones de péptidos, se obtuvo el SI de los pocillos con  $5 \times 10^5$  y  $2,5 \times 10^5$  células, excepto cuando las manchas eran demasiado numerosas para contarlas o para los animales inmunizados con VRS. En esos casos se usó únicamente la concentración de  $2,5 \times 10^5$ . Para la estimulación de MVA-BN, se obtuvo el SI de los pocillos con  $5 \times 10^5$ , excepto cuando las manchas eran demasiado numerosas para contarlas. En ese caso se usó la concentración de  $2,5 \times 10^5$ . Después de la determinación del SI para animales individuales, se calculó la media del SI (SFC por  $1 \times 10^6$  esplenocitos) y el error estándar de la media (EEM) por grupo.

10 Cambios del peso corporal. Los valores individuales del peso corporal (en gramos) antes de la exposición al VRS se consideraron como valores iniciales. Con estos valores iniciales, se calcularon los cambios de peso corporal de los animales individuales (en %), así como también los cambios de peso corporal medios de los grupos para cada tiempo 10 de medición controlado después de la exposición usando Microsoft Excel.

15 Ensayo de placas del VRS. Se contaron los números de placas en el pocillo con las tres diluciones contables más altas del virus. Después el número medio de placas ajustado por el factor de dilución se multiplicó por 10 para obtener el título de la solución en ufp/ml y finalmente se multiplicó por 2 para obtener el título por pulmón.

20 RT-qPCR de VRS. Las amplificaciones por PCR se midieron en tiempo real usando ABI 7500 de Applied Biosystems (nº de catálogo 4351107) y se analizaron usando el System Software proporcionado por Applied Biosystems. Todos los valores se compararon con la referencia del gen L y se normalizaron respecto a la determinación de la beta-actina murina para cada muestra.

#### Resultados

25 Análisis de la respuesta inmunitaria humoral: Análisis de la respuesta de anticuerpos de IgG específica del VRS de muestras de suero. Los sueros se analizaron primero con un ELISA basado en el kit IBL-Hamburgo usando placas recubiertas solo con proteínas F y G del VRS recombinante (Figura 2 y Figura 3). Como se muestra en la Figura 2, se observaron respuestas de IgG específica del VRS similares (DO en el intervalo entre 0,870 y 1,347) con las tres construcciones (MVA-mBN199B, MVA-mBN201BΔM2 y MVA-mBN201B) después de una sola inmunización e independientemente de la vía usada para la inmunización (s.c. o i.n.). Aunque la segunda inmunización dio como resultado un aumento de 2,0 a casi 3,5 veces la respuesta de anticuerpos (DO en el intervalo entre 2,627 a 3,407), la tercera inyección s.c. tuvo solo un efecto menor en la respuesta de células B, produciendo un aumento de aproximadamente 0,500 unidades de DO en comparación con las DO después de la segunda inmunización. Se obtuvieron resultados similares con un ELISA basado en el kit IBL de Hamburgo usando placas recubiertas solo con la proteína F del VRS recombinante (Figura 4).

30 Después de dilución seriada de los sueros (1/100, 1/200 y 1/400), los resultados de ELISA específicos de F del VRS y G del VRS mostraron que VA-mBN199B, MVA-mBN201BΔM2 y MVA-mBN201B inducían respuestas de IgG específicas de F del VRS y G del VRS similares a pesar de la expresión adicional de una proteína F del VRS truncada y una proteína G del VRS truncada por MVA-mBN201BΔM2 y MVA-mBN201B (Figura 3). Después de dos inmunizaciones por vía s.c. con las construcciones, la respuesta de células B todavía era menor en comparación con 35 la inmunización con VRS solo (control positivo). Para alcanzar el nivel de respuesta de anticuerpos inducida por dos aplicaciones i.n. de VRS se necesitó una tercera inmunización por vía s.c. con las construcciones MVA-mBN. Por el contrario, 2 inmunizaciones por vía i.n. con MVA-mBN199B y MVA-mBN201B inducían respuestas de células B similares a dos inmunizaciones con VRS solo o 3 inmunizaciones por vía s.c. con MVA-mBN199B, MVA-mBN201BΔM2 y MVA-mBN201B, cuando se analizaron con ELISA basado en el kit IBL de Hamburgo (Figura 3).

40 Cuando se analizaron de nuevo los sueros por ELISA basándose en el kit Serion usando placas recubiertas con un lisado de VRS, de nuevo no se encontraron diferencias entre MVA-mBN199B, MVA-mBN201BΔM2 y MVA-mBN201B. Tampoco se observaron diferencia entre 2 y 3 inmunizaciones, o entre las vía de administración s.c. e i.n. Además, las respuestas eran todas menores que la respuesta de anticuerpos inducida por 2 aplicaciones i.n. de VRS (Figura 5).

45 Análisis de las respuestas de anticuerpos de IgA específica de VRS. Se midió la IgA específica de F del VRS y G del VRS (basado en el kit IBL de Hamburgo) en fluido BAL 4 días después de la exposición (Día 53). Además, también se analizó en el BAL y los sueros la IgG específica de F del VRS y G del VRS por ELISA. Los resultados se compararon con los resultados obtenidos en los sueros justo antes de la exposición (Día 48) y se muestran en la Figura 6.

50 Como se esperaba, se detectaron respuestas de IgA solo después de la aplicación i.n. de VRS, MVA-mBN199B y MVA-mBN201B. Aunque también se podía detectar la IgG en el BAL, la IgA se detectó en un nivel mayor después de la aplicación i.n. Los niveles en el suero de IgA eran mucho menores que los niveles de IgG independientemente de la vía de aplicación.

55 Análisis de las respuestas inmunitarias celulares específicas de VRS. Se analizaron las respuestas de células T en el bazo por ELISPOT dos semanas después de la última inmunización (Figura 7). MVA-mBN199B administrado por vía i.n. o s.c. indujo una respuesta de células T específica de F del VRS fuerte. Esta respuesta inmunitaria estaba dirigida principalmente contra el péptido VRS-2 específico de F del VRS, que es inmunodominante en ausencia de VRS-M2. La respuesta era de aproximadamente 2000 manchas por  $10^6$  esplenocitos después de la 2<sup>a</sup> inmunización s.c., y de aproximadamente 4000 después de la 3<sup>a</sup> inyección s.c. o 2<sup>a</sup> aplicación intranasal. De manera similar a la respuesta a

las aplicaciones intranasales de VRS, se detectó una respuesta específica de G baja contra el péptido RSV-4 después de inmunización con MVA-mBN199B (aproximadamente 500 manchas por  $10^6$  esplenocitos) y como se esperaba, MVA-mBN199B no inducía células T específicas de M2. El péptido M2 es el péptido inmunodominante del VRS en ratones. Por consiguiente, las inmunizaciones intranasales de VRS indujeron una buena respuesta de células T específica de M2 por encima de 1000 manchas por  $10^6$  esplenocitos y casi ninguna respuesta de células T específica de F.

Al igual que MVA-mBN199B, MVA-mBN201B inducía una respuesta de células T fuerte, pero era dominada por M2 (por encima de 4000 manchas por  $10^6$  esplenocitos independientemente del número de dosis administradas o la vía de administración). Incluso la respuesta específica de G inducida por MVA-mBN201B era al menos 3 veces mayor que la respuesta específica de G inducida por MVA-mBN199B o VRS. A diferencia de MVA-mBN199B, la respuesta específica de F inducida por MVA-mBN201B era mucho menor, con menos de 600 manchas por  $10^6$  esplenocitos para el péptido VRS-2.

Exposición al VRS con la cepa A2 de VRS. Los ratones se expusieron por vía intranasal a  $10^6$  ufp de VRS(A2) dos semanas después de la última inmunización. El peso corporal se controló diariamente. Cuatro días después de la exposición, se sacrificaron los ratones. Después del lavado pulmonar con 1 ml de PBS, se retiraron los pulmones y se determinó la carga de VRS en el pulmón por ensayo de placas y RT-qPCR realizada como se ha descrito antes.

Cambios del peso corporal. Todos los ratones perdieron peso un día después de la exposición, lo más probablemente debido a la anestesia o la propia exposición i.n. (Figura 8). Los ratones tratados con TBS empezaron a perder peso de manera significativa 4 días después de la exposición al VRS. En cambio, los ratones que recibieron el VRS por vía intranasal por tercera vez no mostraron pérdida de peso corporal. Todos los ratones inmunizados por vía s.c. con MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN201B $\Delta$ M2 perdieron aproximadamente 20% de peso 4 días después de la exposición. Dicha pérdida de peso fue descrita anteriormente por Olszewska et al. (*Vaccine* 23:215 (2004)). Sin embargo, los resultados de RT-qPCR (Figura 10) muestran que se correlacionan con una mejor protección y eliminación más temprana del VRS del pulmón a través de la vacuna-respuesta de CTL sensibilizados en comparación con la depuración normal de la infección por VRS primaria. Cuando se aplica por vía i.n., los ratones inmunizados con VA-mBN201B tenían una pérdida de peso similar a los ratones inmunizados por vía s.c. 2 días después de la exposición, pero se habían recuperado 4 días después de la exposición debido a la baja carga de VRS en los pulmones en comparación con la vía s.c. (Figura 10). Al igual que el grupo inmunizado con VRS, los ratones inmunizados por vía i.n. con MVA-mBN199B no mostraron pérdida de peso.

Carga de VRS medida por el ensayo de placas. Cuatro días después de la exposición, se detectó una media de 57671 ufp por pulmón para los ratones no inmunizados (Figura 9). Como en el grupo de control inmunizado con VRS, no se detectaron placas de VRS A2 en los pulmones de animales inmunizados con MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN201B $\Delta$ M2 después de 2 aplicaciones s.c. o i.n.

Carga de VRS medida por PCR cuantitativa en tiempo real. También se analizó la carga de VRS en el pulmón por RT-qPCR (Figura 10). Aunque no se detectó VRS por el ensayo de placas en ninguno de los ratones vacunados, los genomas de VRS todavía eran detectables en ratones inmunizados tres veces con MVA-mBN199B. Después de 3 inmunizaciones con MVA-mBN199B, la carga de VRS era 38 veces menor en comparación con el grupo de control con TBS. Los genomas de VRS también eran detectables después de tres inmunizaciones con MVA-mBN201B pero la carga era 158 veces menor en comparación con el grupo de control con TBS. No había diferencia significativa entre los ratones inmunizados dos o tres veces. Es interesante que la disminución en la carga de VRS observada con MVA-mBN201B no se observaba después de vacunación con MVA-mBN201B $\Delta$ M2 que en ausencia de M2 era equivalente a MVA-mBN199B.

Se observó una protección casi completa comparable a la obtenida en el grupo tratado con VRS después de inmunización por vía i.n. con MVA-mBN201B, aunque algunas copias del gen L todavía eran detectables en uno de cinco ratones. La inmunización intranasal con MVA-mBN199B también inducía una fuerte disminución de la carga de VRS, pero el gen L todavía se detectaba en un nivel bajo en tres de cuatro ratones.

#### Discusión y conclusiones

Aunque MVA-mBN201B expresa versiones truncadas de las proteínas F y G del VRS además de las proteínas F y G del VRS de longitud completa incluidas también en la construcción MVA-mBN199B, MVA-mBN201B inducía una respuesta inmunitaria humoral de magnitud similar. Ambas construcciones inducían una respuesta de anticuerpos dirigida principalmente contra la proteína F del VRS según se consideró por las respuestas similarmente buenas medidas en el ELISA solo de F del VRS en comparación con el ELISA de F y G del VRS. El nivel de anticuerpos después de dos aplicaciones i.n. era mayor que después de dos aplicaciones s.c. Era necesaria una tercera aplicación s.c. para alcanzar el nivel de respuesta de anticuerpos inducida por dos aplicaciones i.n. En cambio, no se observaron diferencias importantes en las respuestas de células T inducidas usando las vías s.c. frente a i.n., o usando 2 frente a 3 aplicaciones s.c. Sin embargo, MVA-mBN199B inducía una buena respuesta celular específica de F del VRS, mientras que se observó una fuerte respuesta de células T específica de M2 con MVA-mBN201B. La respuesta específica de G del VRS inducida por MVA-mBN201B también era más pronunciada en comparación con MVA-

mBN199B. El patrón de la respuesta de células T inducida por MVA-mBN201B era similar a la respuesta de células T inducida por la inmunización con VRS, aunque mucho mayor.

Independientemente de las vías o el número de aplicaciones, ambas construcciones protegían a los ratones de la exposición al VRS(A2), y no se podían recuperar virus replicantes de los pulmones. Sin embargo, como se observó previamente, las inmunizaciones por vía s.c. con MVA-mBN199B o MVA-mBN201B no daban como resultado inmunidad estéril (es decir, inmunidad que persiste incluso después de que el agente infeccioso objetivo se ha depurado del cuerpo). La carga de VRS genómico (medida por los niveles del gen (L) de la ARN polimerasa viral) en los pulmones de ratones inmunizados por aplicación s.c. de MVA-mBN199B o MVA-mBN201B se reducía significativamente pero todavía era detectable por RT-PCR cuantitativa, y una tercera inmunización por vía s.c. no tenía un impacto beneficioso en la carga viral a pesar de su aumento de los niveles de IgG específicos de VRS. La reducción en la expresión de la proteína L del VRS era un poco más pronunciada después de vacunación con MVA-mBN201B en comparación con MVA-mBN199B, lo cual se puede deber a la mayor respuesta de células T CD8+ específicas de M2, ya que la carga genómica de VRS era mayor en animales vacunados con MVA-mBN201BΔM2 que para los animales vacunados con MVA-mBN201B, como MVA-mBN199B.

15 Casi se obtuvo inmunidad estéril después de dos aplicaciones i.n. de MVA-mBN199B o MVA-mBN201B. Esta observación se correlaciona con la inducción y secreción de IgA específica de VRS en el sitio de infección de la mucosa.

**Ejemplo 3: Seguridad de las vacunas de MVA recombinante que expresan la proteína F del VRS. Proteína G del VRS. Proteína N del VRS y proteína M2 del VRS en comparación con FI-VRS.**

20 La vacuna experimental MVA-mBN199B codifica la glucoproteína (G) y la proteína de fusión (F) del VRS, mientras que MVA-mBN201B expresa versiones truncadas de F y G además de las proteínas de longitud completa, la proteína de la nucleocápside (N) y la proteína de matriz (M2) del VRS (véase la Figura 1). El objetivo de estos experimentos era analizar la seguridad de MVA-mBN199B y MVA-mBN201B en comparación con FI-VRS después de dos inmunizaciones por las vías de administración subcutánea (s.c.) o intranasal (i.n.).

25 La seguridad de estas construcciones se ensayó usando un modelo de exposición de VRS(A2) en ratones BALB/c. Dos inmunizaciones con MVA-mBN199B o MVA-mBN201B no inducían la secreción aumentada de IL4 e IL5 en BAL después de la exposición a VRS(A2), en comparación con FI-VRS.

Diseño del estudio

30 Los ratones se trataron dos veces con separación de tres semanas por vía subcutánea (s.c.) o intranasal (i.n.) con  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN199B (Grupos 3 y 4),  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN201B (Grupos 5 y 6) de acuerdo con la Tabla x. Los tres grupos de control se trataron dos veces (s.c.) con TBS (Grupo 1) o i.n. con VRS (Grupo 2) o i.m. con 30 µg de FI-VRS (Grupo 7), de acuerdo con la Tabla x. El Día 35, los ratones se expusieron (i.n.) a  $10^6$  ufp de VRS A2. Cuatro días después de la exposición, los ratones se sacrificaron por inyección de una dosis elevada de Ketamina-Xilazina y extracción de sangre final. Después del lavado pulmonar, se analizó el nivel de IL4 e IL5 en el BAL por ELISA.

35 Tabla 4: Diseño experimental

Grupo	Tamaño de grupo	Administración de los ítems de ensayo o referencia				Exposición (Día)%, #
		Inyecciones	Programa (Día)%	Vía	Dosis por inyección	
1	5	TBS	0 y 21	s.c.	n.a.	35
2	5	VRS		i.n.	$10^6$ ufp	
3	5	MVA-mBN199B		s.c.	$1 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub>	
4	5			i. n.	$1 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub>	
5	5	MVA-mBN201B		s.c.	$1 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub>	
6	5			i.n.	$1 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub>	
7	5	FI-VSR		i.m.	30 µg	

% Relativo a la primera inmunización.

# Los ratones se expusieron por la vía intranasal a  $10^6$  ufp de VRS A2. Cuatro días después de exposición, se extrajo la sangre de los ratones y sacrificaron con anestesia. Se tomaron muestras del fluido de BAL.

Programa del estudio. El programa de la fase viva se resume en la tabla y.

Tabla 5: Programa de estudio de la fase viva

Día**	Procedimientos
-9	Llegada e importación a la instalación animal de ratones BALB/c, distribución de tarjetas de jaulas y distribución de 5 ratones por jaula
-1	Sujección en oreja, reconocimiento de inclusión/exclusión de todos los ratones

Día**	Procedimientos
0	1 <sup>a</sup> administración a ratones
21	2 <sup>a</sup> administración a ratones
35	Exposición a VRS(A2)
39	Extracción de sangre final, sacrificio y toma de muestra de BAL

\*\* Relativo al día de la 1<sup>a</sup> inmunización.

#### Material y métodos

Animales experimentales. Se obtuvieron ratones hembra BALB/cJ Rj (H-2d) de siete semanas de edad de Janvier (Route des Chênes Secs, F-53940 Le Genest-Saint-Isle, Francia). Todos los ratones estaban exentos de patógenos específicos.

Alojamiento. El estudio se llevó a cabo en la sala 117 de la instalación animal en Bavarian Nordic-Martinsreid. Esta unidad se proporcionó con aire filtrado a una temperatura de 20-24°C y una humedad relativa entre 40% y 70%. La sala estaba iluminada artificialmente con un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. El período de aclimatación del estudio era de 15 días. Los animales se alojaron en jaulas transparentes SealSafe™ (jaula H Temp [polisulfona] Tipo II L - estándar Euro), con una superficie del suelo de 530 cm<sup>2</sup>. Las jaulas se cubrieron con una tapa H-Temp SealSafe™. Las jaulas se pusieron en un sistema TECNIPLAST-IVC SealSafe™ con una unidad de circulación SLIMLine™ que proporciona aire filtrado con HEPA a todas las jaulas por separado. El lecho de los animales se cambió una vez por semana.

Dieta y agua. Se proporcionó a los ratones acceso libre a la dieta de mantenimiento irradiada (SSNIFF R/M-H, irradiada, V1534-727) y agua (sometida a autoclave a 121°C durante 20 minutos).

Procedimientos previos al tratamiento: Identificación de animales. Para marcar de forma individual a los animales dentro de cada jaula, se realizó la perforación de orejas de acuerdo con procedimientos estándar.

Reconocimiento de inclusión/exclusión. El reconocimiento de inclusión/exclusión se hizo de acuerdo con procedimientos estándar.

Muestras de sangre para la extracción de sangre previa. Se obtuvieron muestras de sangre de aproximadamente 150 µl por punción de la vena facial de acuerdo con procedimientos estándar. Las muestras de sangre se transfirieron al laboratorio para procesamiento adicional de acuerdo con procedimientos estándar.

Procedimientos de tratamiento: Preparación y administración de ítems de ensayo e ítems de referencia. La preparación y administración de los ítems de ensayo y de referencia se realizó en una cabina de seguridad microbiológica clase II (HERAsafe®/clase II tipo H, Kendro) de acuerdo con procedimientos estándar. Brevemente, para la administración s.c., se diluyeron MVA recombinantes en TBS para obtener una solución de trabajo con una concentración de  $2 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml. Se inyectó por vía s.c.  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> en 500 µl de acuerdo con procedimientos estándar. Para la administración i.n., se diluyeron MVA recombinantes en TBS para obtener una solución de trabajo con una concentración de  $2 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/ml. Se administraron 50 µl de los virus diluidos en una fosa nasal de ratones anestesiados (Xilazina/Ketamina) de acuerdo con procedimientos estándar. Se administraron 500 µl de TBS por vía s.c. de acuerdo con procedimientos estándar.

Preparación y administración de virus VRS(A2). El vial con solución madre de VRS se descongeló y se usó lo más rápidamente posible debido a la inestabilidad del virus (máximo 15 minutos en hielo). El virus se mantuvo en hielo en todo momento y se usó inmediatamente para exponer los ratones anestesiados (Xilazina/Ketamina) a 100 µl de la solución de virus puro por la vía intranasal de acuerdo con procedimientos estándar.

Preparación y administración de FI-VRS. Se inyectaron 30 µg de FI-RSV en 40 µl por vía intramuscular.

Eutanasia. El día 35, los ratones restantes recibieron una dosis doble de Ketamina-Xilazina por inyección intraperitoneal y se llevó a cabo la eutanasia, cortando la aorta dentro de la cavidad peritoneal.

Lavado pulmonar. El fluido del lavado broncoalveolar (BAL) se recolectó por lavado con chorro de los pulmones 4 veces con 1 ml de PBS.

#### Análisis

Se midieron los niveles de IL-4 e IL-5 en líquido sobrenadante de lavado broncoalveolar (BAL) usando kits de ELISA disponibles en el mercado (mIL4 PLATINUM ELISA de eBIOSCIENCE N° cat. BMS613 y READY-SET-GO MIL-5 ELISA de eBIOSCIENCE N° cat. 88-7054-22).

Documentación del estudio. Se preparó un diagrama de flujo de la fase viva para recoger toda la información durante las etapas individuales de la fase viva. Además, se registró la información específica del ratón o jaula en la tarjeta de

la jaula correspondiente. Las tarjetas de las jaulas no se consideran como datos sin procesar del estudio, sino que son un requisito del Gobierno de Alta Baviera.

Se preparó un diagrama de flujo de la fase de análisis para recoger toda la información durante las etapas individuales de la fase de análisis. Los ensayos se documentaron en registros de ensayos específicos del ensayo o libretas de laboratorio; las referencias cruzadas se documentaron en el diagrama de flujo de la fase de análisis. Toda la documentación del ensayo incluyendo los datos sin procesar se revisó de acuerdo con procedimientos estándar. Además, se prepararon las hojas de seguimiento de muestra para las muestras de suero de acuerdo con procedimientos estándar.

Procesamiento de datos. Los datos sin procesar se transfirieron a los archivos de Excel correspondientes para su análisis posterior de acuerdo con procedimientos estándar.

ELISA. Se determinaron las concentraciones de citoquinas a partir de la curva de referencia de los respectivos kits de ELISA.

#### Resultados

Un aumento de la producción de IL-4 (Figura 11) e IL-5 (Figura 12) como la observada con FI-VRS no se observó para MVA-mBN199B o MVA-mBN201B. Ambas citoquinas estaban por debajo del nivel de detección cuando los ratones se inmunizaron por vía i.n. con MVA-mBN199B o MVA-mBN201B.

#### Discusión y conclusiones

Tanto MVA-mBN199B como MVA-mBN201B, no inducen la enfermedad potenciada en comparación con FI-VRS evaluado por la respuesta de TH2.

#### 20 Ejemplo 4: Comparación de inmunogenicidad, eficacia y seguridad de diferentes vacunas de MVA recombinante que expresan la proteína F del VRS. Proteína G del VRS. Proteína N de VRS y proteínas M2 de VRS.

La vacuna experimental MVA-mBN199B codifica la glucoproteína (G) y la proteína de fusión (F) del VRS, MVA-mBN201B expresa versiones truncadas de F y G además de las proteínas de longitud completa, la proteína de la nucleocápside (N) y la proteína de matriz (M2) del VRS y MVA-mBN294B expresa una proteína F y 2 G de longitud completa, la nucleocápside (N) y la proteína de matriz (M2) del VRS (véase la Figura 1). MVA-mBN294A es un producto intermedio en la clonación de MVA-mBN294B el cual todavía tiene un casete de clonación. Este casete de clonación no tiene impacto ni en la expresión transgénica ni en las propiedades inmunogénicas de las proteínas transgénicas. El objetivo de este experimento era analizar la inmunogenicidad, eficacia y seguridad de MVA-mBN294A en comparación con MVA-mBN199B y MVA-mBN201B después de dos inmunizaciones por la vía de administración subcutánea (s.c.).

La inmunogenicidad, eficacia y seguridad de estas construcciones se ensayó usando un modelo de exposición de VRS(A2) en ratones BALB/c. Se confirmó que a pesar de los cambios en MVA-mBN294A (equivalente a MVA-mBN294B) en comparación con MVA-mBN201B, este inducía respuestas de células T y células B similares y ofrecía protección similar. Este experimento mostraba que cualquiera de las construcciones (MVA-mBN201B o MVA-mBN294A) que expresan al menos un determinante antigénico de una glucoproteína de membrana del VRS (F o G) y al menos un determinante antigénico de una proteína de la nucleocápside del VRS (N o M2) induce mejor protección que una construcción que expresa solo determinantes antigenicos de glucoproteínas de membrana del VRS (MVA-mBN199B).

#### 40 Diseño del estudio

Los ratones se vacunaron (s.c.) con  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> de MVA-mBN294A, MVA-mBN199B o MVA-mBN201B en un programa de sensibilización/refuerzo (Día 0 y 21) de acuerdo con la Tabla 6. Los grupos control se trataron dos veces por vía subcutánea con TBS o con VRS-A2 de acuerdo con la Tabla 6. Se inyectó el (FI)-VRS inactivado con formalina por vía intramuscular (i.m.) una o dos veces de acuerdo con la Tabla 6.

45 Se recogió sangre un día antes de cada inmunización y antes de la exposición, así como el día del sacrificio. Para 5 animales de los grupos 1 a 5 el Día 34, se determinaron los títulos de IgG específica de VRS y títulos de anticuerpos neutralizantes específicos de VRS por ELISA y PRNT respectivamente.

El Día 34, algunos ratones (Tabla 6) se sacrificaron por inyección de una dosis letal de Ketamina-Xilazina y extracción de sangre final. Se retiraron los bazos y se prepararon para el análisis de respuestas de células T específicas de VRS por ELISPOT.

50 El Día 35, los ratones que quedaban (Tabla 6) se expusieron a  $10^6$  ufp de VRS-A2. Cuatro días después de la exposición, los ratones se sacrificaron por inyección de una dosis letal de Ketamina-Xilazina y extracción de sangre final. Despues del lavado de pulmones, los pulmones se retiraron y se analizó la carga de VRS por un ensayo de

placas y RT-qPCR. Se analizaron la infiltración celular y el nivel de citoquinas en fluidos de lavado broncoalveolar (BAL).

Tabla 6: Diseño experimental

Grupo	Tamaño de grupo	Administración de los ítems de ensayo o referencia				Extracción de sangre (Día) <sup>1</sup>	Exposición (Día) <sup>1,2</sup>
		Inyecciones	Programa para inyecciones (Día) <sup>1</sup>	Vía	Dosis por inyección		
1	10	TBS	0 y 21	s.c.	-	-1, 20, 34 y 39	35
	5					-1, 20 y 34 <sup>&amp;</sup>	-
2	10	RSV		i.n.	10 <sup>6</sup> pfu	-1, 20, 34 y 39	35
	5					-1, 20 y 34 <sup>&amp;</sup>	-
3	10	MVA-mBN199B		s.c.	1x10 <sup>8</sup> TCID <sub>50</sub>	-1, 20, 34 y 39	35
	5					-1, 20 y 34 <sup>&amp;</sup>	-
4	10	MVA-mBN201B				-1, 20, 34 y 39	35
	5					-1, 20 y 34 <sup>&amp;</sup>	-
5	10	MVA-mBN294A				-1, 20, 34 y 39	35
	5					-1, 20 y 34 <sup>&amp;</sup>	-
6	10	FI-RSV	0	i.m.	50 µl	-1, 20, 34 y 39	35
	5					-1, 20 y 34 <sup>&amp;</sup>	-
7	5	FI-RSV		i.m.	50 µl	-1, 20, 34 y 39	35

<sup>1</sup>: Relativo a la primera inmunización.

<sup>2</sup>: Los ratones se expondrán por la vía intranasal a 10<sup>6</sup> ufp de VRS A2. Cuatro días después de la exposición, se extraerá sangre de los ratones y sacrificarán con anestesia y se tomarán muestras del BAL y pulmones

& : el Día 34, estos ratones se sacrificarán y se analizarán los bazos por ELISPOT

5 Programa del estudio. El programa de la fase viva se resume en la tabla 7.

Tabla 7: Programa de estudio de la parte 1 de la fase viva

Día <sup>1</sup>	Procedimientos
-9	Llegada e importación a la instalación animal de ratones BALB/c, distribución de tarjetas de jaulas y distribución de 5 ratones por jaula
-1	Sujeción en oreja, reconocimiento de inclusión/exclusión de todos los ratones
-1	Extracción de sangre previa de todos los ratones (punción de la vena facial del lado derecho)
0	1 <sup>a</sup> administración
20	Extracción de sangre de todos los ratones (punción de la vena facial del lado izquierdo)
21	2 <sup>a</sup> administración
34	Extracción de sangre final, sacrificio y toma de muestra de bazo de las jaulas B, D, F, H, K y M
34	Extracción de sangre de todos los ratones que quedan (punción de la vena retro-bulbar del ojo derecho)
35	Exposición de todos los ratones que quedan
35 a 39	Aspecto y medición del peso corporal diarios
39	Extracción de sangre final, sacrificio y toma de muestra de BAL y pulmón de los ratones

<sup>1</sup>: Relativo al día de la 1<sup>a</sup> inmunización.

Material y métodos

Animales experimentales. Se obtuvieron ratones hembra BALB/cJ Rj (H-2d) de siete semanas de edad de Janvier (Route des Chênes Secs, F-53940 Le Genest-Saint-Isle, Francia). Todos los ratones estaban exentos de patógenos específicos.

Alojamiento. El estudio se llevó a cabo en la sala 117 de la instalación animal en Bavarian Nordic-Martinsreid. Esta unidad se proporcionó con aire filtrado a una temperatura de 20-24°C y una humedad relativa entre 40% y 70%. La sala estaba iluminada artificialmente con un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. El período de aclimatación del estudio era de 15 días. Los animales se alojaron en jaulas transparentes SealSafe™ (jaula H Temp [polisulfona] Tipo II L - estándar Euro), con una superficie del suelo de 530 cm<sup>2</sup>. Las jaulas se cubrieron con una tapa H-Temp SealSafe™. Las jaulas se pusieron en un sistema TECNIPLAST-IVC SealSafe™ con una unidad de circulación SLIMLine™ que proporciona aire filtrado con HEPA a todas las jaulas por separado. El lecho de los animales se cambió una vez por semana.

20 Dieta y agua. Se proporcionó a los ratones acceso libre a la dieta de mantenimiento irradiada (SSNIFF R/M-H, irradiada, V1534-727) y agua (sometida a autoclave a 121°C durante 20 minutos).

## Procedimientos previos al tratamiento:

Identificación de animales. Para marcar de forma individual a los animales dentro de cada jaula, se realizó la perforación de orejas de acuerdo con procedimientos estándar.

5 Reconocimiento de inclusión/exclusión. El reconocimiento de inclusión/exclusión se hizo de acuerdo con procedimientos estándar.

Muestras de sangre para la extracción de sangre previa. Se obtuvieron muestras de sangre de aproximadamente 150  $\mu$ l por punción de la vena facial de acuerdo con procedimientos estándar. Las muestras de sangre se transfirieron al laboratorio para procesamiento adicional de acuerdo con procedimientos estándar.

10 Procedimientos de tratamiento: Preparación y administración de ítems de ensayo e ítems de referencia. La preparación y administración de los ítems de ensayo y de referencia se realizó en una cabina de seguridad microbiológica clase II (HERAsafe®/clase II tipo H, Kendro) de acuerdo con procedimientos estándar. Brevemente, para la administración s.c., se diluyeron MVA recombinantes en TBS para obtener una solución de trabajo con una concentración de  $2 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml. Se inyectó por vía s.c.  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> en 500  $\mu$ l de acuerdo con procedimientos estándar. Se administraron 500  $\mu$ l de TBS por vía s.c. de acuerdo con procedimientos estándar.

15 Preparación y administración de virus VRS(A2). El vial con solución madre de VRS se descongeló y se usó lo más rápidamente posible debido a la inestabilidad del virus (máximo 15 minutos en hielo). El virus se mantuvo en hielo en todo momento y se usó inmediatamente para exponer los ratones anestesiados (Xilazina/Ketamina) a 100  $\mu$ l de la solución de virus puro por la vía intranasal de acuerdo con procedimientos estándar.

Preparación y administración de FI-VRS: Se aplicaron 50  $\mu$ l de FI-RSV en por vía i.m.

20 Procedimientos posteriores al tratamiento:

Muestras de sangre. Las muestras de sangre (aproximadamente 150  $\mu$ l) se obtuvieron mediante punción de la vena retrobulbar o facial (para detalles véase la Tabla 7) de acuerdo con los procedimientos estándar. Las muestras de sangre se transfirieron al laboratorio para procesamiento adicional de acuerdo con procedimientos estándar.

25 Eutanasia. Los ratones restantes recibieron una dosis doble de Ketamina-Xilazina por inyección intraperitoneal y se llevó a cabo la eutanasia cortando la aorta dentro de la cavidad peritoneal.

Extracción del bazo. Los bazos se extrajeron de forma aseptica. Se colocaron en tubos llenos con un medio de acuerdo con procedimientos estándar. Estos tubos se habían importado a la instalación animal y después se exportaron de acuerdo con procedimientos estándar.

30 Lavado de pulmones y extracción de pulmones. El fluido del lavado broncoalveolar (BAL) se recogió por lavado con chorro de los pulmones 4 veces con 1 ml de PBS. Después, se extrajeron los pulmones y se congelaron instantáneamente en dos mitades en nitrógeno líquido para el ensayo de placas y la extracción de ARN posteriores.

## Análisis:

35 Procesamiento de muestras de sangre y almacenamiento de los sueros. Después de la transferencia al laboratorio, las muestras de sangre se procesaron en suero de acuerdo con procedimientos estándar. Después de preparar los sueros se almacenaron a -20°C ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) hasta que fueron necesarios para su análisis.

40 Análisis de títulos de anticuerpos específicos del VRS a partir de muestras de suero. Los títulos por ELISA de IgG específica de VRS se determinaron a partir de todas las muestras de suero usando un kit de ELISA modificado (Serion ELISA classic, nº de catálogo ESR113G): En lugar de usar el anticuerpo anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina suministrado con el kit, se usó un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Serotec cat: 103004) como el anticuerpo secundario.

45 Análisis de títulos de anticuerpos neutralizantes específicos del VRS a partir de muestras de suero. Brevemente, se prepararon diluciones seriadas de 2 veces de los sueros de ensayo y se añadió un número definido de unidades formadoras de placas (ufp) de VRS a la dilución de suero. Después de 185 min de incubación a 36°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) y CO<sub>2</sub> al 5% ( $\pm 1\%$ ) se añadió a placas presembradas que contenían células Vero. Las placas se fijaron dos días después, se inmunoñeron con una mezcla de anticuerpos específicos de VRS y se contaron las placas.

Análisis de las respuestas inmunitarias celulares específicas de VRS de esplenocitos. Las respuestas celulares específicas de M2 del VRS y F del VRS se determinaron dos semanas después de la última administración por reestimulación de los esplenocitos con péptidos específicos como se ha descrito en otra parte y detección de la liberación de IFNγ de los esplenocitos por ensayo ELISPOT.

50 Método de ensayo ELISPOT. Se usó el Mouse IFN-Gamma-Kit (BD Biosciences, nº de catálogo 551083) para el ensayo ELISPOT. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las placas se recubrieron con el anticuerpo de captura el día anterior al aislamiento de los esplenocitos. Después del aislamiento,

las células se transfirieron a las placas ELISPOT y se estimularon con diferentes péptidos (véase la Tabla 3) durante 20 horas a 37°C. La producción de IFNy se detectó usando el anticuerpo de detección. Las placas se desarrollaron usando el BD™ ELISPOT AEC Substrate Set (BD Biosciences, nº de catálogo 551951) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 5 Plan de estimulación de ELISPOT. Todas las condiciones se ensayaron por duplicado. Se usaron los péptidos VRS-2 y VRS-5 (véase la Tabla 8) en una concentración final de 5 µg/ml (1 µg/pocillo) para estimular  $5 \times 10^5$  y  $2,5 \times 10^5$  esplenocitos por pocillo. Se usó MVA (control de inmunización) con una multiplicidad de infección (MOI) de 10 para estimular  $5 \times 10^5$  y  $2,5 \times 10^5$  esplenocitos por pocillo y se usó concavalina A (ConA [control positivo]) en una concentración final de 0,5 µg/ml para estimular  $2,5 \times 10^5$  esplenocitos. Como control negativo, se cultivaron  $5 \times 10^5$  esplenocitos en medio solo (RPMI-1640 complementado con Glutamax, penicilina, estreptomicina, suero bovino fetal al 10% y β-mercaptopetanol 10<sup>-5</sup> M).
- 10

Tabla 8: Estimulación específica de VRS

Nombre del péptido	Especificidad	Secuencia peptídica
RSV-2	F	KYKNAVTEL (SEQ ID NO: 20)
RSV-5	M2	SYIGSINNI (SEQ ID NO: 27)

Análisis del fluido BAL:

- 15 Se prepararon dos portaobjetos por centrifugación en Cytospin (800 rpm, 5 minutos) de 100 µl de fluido BAL. Los portaobjetos se secaron durante la noche y después se tiñeron. Los portaobjetos se analizaron por microscopio para determinar el porcentaje de eosinófilos y neutrófilos. Después se centrifugó el resto del BAL (12.000 rpm 5 minutos). Despues de la preparación, los líquidos sobrenadantes de BAL se almacenaron a -20°C (± 5°C) hasta el análisis. Se midieron los niveles de IL-4 e IL-5 en el líquido sobrenadante del lavado broncoalveolar (BAL) usando kits ELISA disponibles en el mercado (mIL4 PLATINUM ELISA de eBIOSCIENCE Nº de cat. BMS613 y READY-SET-GO MIL-5 ELISA de eBIOSCIENCE Nº de cat. 88-7054-22).
- 20

Análisis de la carga de VRS en el pulmón

La carga de VRS en las muestras de pulmón se determinó por ensayo de placas de VRS y por RT-qPCR.

- 25 Ensayo de placas del VRS. Una mitad de cada uno de los pulmones congelados instantáneamente se homogeneizó en 1 ml de medio frío usando una prensa de French (medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero de ternero fetal al 7%). Despues de una breve centrifugación, se titularon dos tubos de cada líquido sobrenadante en diluciones seriadas de dos veces sobre monocapas de células Vero cultivadas en placas de fondo plano de 48 pocillos. Seis días después, las monocapas se lavaron y se fijaron con formaldehído al 1%. Despues de 24 horas, las monocapas se tiñeron con Rojo neutro al 0,04% y se contaron las placas.
- 30 RT-qPCR de VRS. Se separaron inmediatamente 100 µl del tejido pulmonar homogenizado y se aisló el ARN usando el minikit RNeasy® de Qiagen (nº de catálogo 74104). Se llevó a cabo la reacción de transcripción inversa usando el kit High Capacity RNA-to-cDNA de Applied Biosystems (nº de catálogo 4387406). La PCR específica para el gen L del VRS se llevó a cabo con los siguientes parámetros en un termociclador: (1) 50°C durante 2 minutos; (2) 95°C durante 10 minutos; (3) 45 ciclos de (15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C) usando el Universal PCR Master Mix de Applied Biosystems (nº de catálogo 4352042) y una mezcla de tres cebadores: (1) cebador 1 (5'-GAA CTC AGT GTA GGT AGA ATG TTT GCA-3'; SEQ ID NO: 36); (2) cebador 2 (5'-TTC AGC TAT CAT TTT CTC TGC CAA T-3'; SEQ ID NO: 37); y (3) sonda 6 (5'-TTT GAA CCT GTC TGA ACA TTC CCG GTT-3'; (SEQ ID NO: 38). Se determinó el número de copias a partir de una curva de referencia del vector de plásmido pMISC202 que contenía un fragmento del gen L del VRS. Se usaron reacciones similares para la beta-actina murina como controles internos para el ADNc de entrada usando una sonda marcada con VIC/MGB de Applied Biosystems (nº de catálogo 4351315).
- 35
- 40

Documentación del estudio.

- 45 Se preparó un diagrama de flujo de la fase viva para recoger toda la información durante las etapas individuales de la fase viva. Además, se registró la información específica del ratón o jaula en la tarjeta de la jaula correspondiente. Las tarjetas de las jaulas no se consideran como datos sin procesar del estudio, sino que son un requisito del Gobierno de Alta Baviera.
- 50 Se preparó un diagrama de flujo de la fase de análisis para recoger toda la información durante las etapas individuales de la fase de análisis. Los ensayos se documentaron en registros de ensayos específicos del ensayo o libretas de laboratorio; las referencias cruzadas se documentaron en el diagrama de flujo de la fase de análisis. Toda la documentación del ensayo incluyendo los datos sin procesar se revisó de acuerdo con procedimientos estándar.

Además, se prepararon hojas de seguimiento de muestra para las muestras de suero de acuerdo con procedimientos estándar.

Procesamiento de datos. Los datos sin procesar se transfirieron a los archivos de Excel correspondientes para su análisis posterior de acuerdo con procedimientos estándar.

5 ELISA. Los valores medios de la DO y los errores estándar de la media se calcularon usando Excel.

PRNT. Las placas se transfirieron a un macro para calcular un título de PRNT de acuerdo con procedimientos estándar.

10 ELISPOT. Las placas de ELISPOT se leyeron con un lector de CTL de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinó el número de células que forman manchas (SFC) para cada pocillo y se transfirió a un archivo de Excel para la posterior evaluación. A partir de la incubación con  $5 \times 10^5$  y  $2,5 \times 10^5$  células por pocillo, se calculó el número de manchas por  $1 \times 10^6$  esplenocitos por cada pocillo. Se calculó la media para el control negativo y se restó de cada valor individual antes del cálculo del valor medio por ratón para obtener el valor del índice de estimulación (SI) (frecuencia específica de péptidos de esplenocitos que liberan IFN-γ) por ratón.

15 Para las estimulaciones de péptidos, se obtuvo el SI de los pocillos con  $5 \times 10^5$  y  $2,5 \times 10^5$  células, excepto cuando las manchas eran demasiado numerosas para contarlas o para los animales inmunizados con VRS. En esos casos se usó únicamente la concentración de  $2,5 \times 10^5$ . Para la estimulación de MVA-BN, se obtuvo el SI de los pocillos con  $5 \times 10^5$ , excepto cuando las manchas eran demasiado numerosas para contarlas. En ese caso se usó la concentración de  $2,5 \times 10^5$ . Después de la determinación del SI para animales individuales, se calculó la media del SI (SFC por  $1 \times 10^6$  esplenocitos) y el error estándar de la media (SEM) por grupo.

20 Ensayo de placas del VRS. Se contaron los números de placas en el pocillo con las tres diluciones contables más altas del virus. Después el número medio de placas ajustado por el factor de dilución se multiplicó por 10 para obtener el título de la solución en ufp/ml y finalmente se multiplicó por 2 para obtener el título por pulmón.

25 RT-qPCR de VRS. Las amplificaciones por PCR se midieron en tiempo real usando ABI 7500 de Applied Biosystems (nº de catálogo 4351107) y se analizaron usando el System Software proporcionado por Applied Biosystems. Todos los valores se compararon con la referencia del gen L y se normalizaron respecto a la determinación de la beta-actina murina para cada muestra.

ELISA de citoquinas. Las concentraciones de citoquinas se determinaron a partir de la curva de referencia de los respectivos kits de ELISA.

## Resultados

### Análisis de la respuesta inmunitaria humoral:

30 Tanto para las respuestas de IgG específica de VRS (ELISA, Figura 13) como de anticuerpos neutralizantes específicos de VRS (PRNT, Figura 14), no se observó ninguna diferencia entre las tres construcciones (MVA-mBN199B, MVA-mBN201B y MVA-mBN294A)

### Análisis de la respuesta inmunitaria celular:

35 Como se esperaba, MVA-mBN294A tenía un patrón de respuesta de células T similar a MVA-mBN201B (Figura 15), que inducía respuestas específicas tanto de F como de M2 dominadas por la respuesta de células T de M2. En cambio, MVA-mBN199B solo inducía una respuesta específica de F pero con un nivel mayor que MVA-mBN201B y MVA-mBN294A.

### Análisis de la carga de VRS en los pulmones:

40 Exposición a VRS con la cepa VRS A2. Los ratones se expusieron por vía intranasal a  $10^6$  ufp de VRS(A2) dos semanas después de la última inmunización. Cuatro días después de la exposición, los ratones se sacrificaron. Después del lavado pulmonar con 1 ml de PBS, se extrajeron los pulmones y se determinó la carga de VRS en el pulmón por ensayo de placas y RT-qPCR realizada como se ha descrito antes.

45 Carga de VRS medida por ensayo de placas. Cuatro días después de la exposición, se detectó una media de 29842 ufp por pulmón para los ratones no inmunizados (Figura 16). Como en el grupo inmunizado con VRS, no se detectaron placas de VRS A2 en los pulmones de animales inmunizados con MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN294A después de 2 aplicaciones s.c.

50 Carga de VRS medida por PCR cuantitativa en tiempo real. La carga de VRS en el pulmón también se analizó por RT-qPCR (Figura 17). Aunque no se detectó VRS por el ensayo de placa en ninguno de los ratones vacunados, los genomas de VRS todavía eran detectables en ratones inmunizados dos veces por vía s.c. con MVA-mBN199B, MVA-mBN201B o MVA-mBN294A. Para MVA-mBN199B, la carga de VRS era 45 veces menor en comparación con el grupo de control con TBS. Los genomas de VRS también eran detectables para MVA-mBN201B y MVA-mBN294A pero la

carga se reducía mucho en comparación con MVA-mBN199B, 416 veces y 281 veces menor en comparación con el grupo de control con TBS, respectivamente.

Análisis de signos de enfermedad potenciada

5 A diferencia del lote de FI-VRS usado en los experimentos descritos en el Ejemplo 3, el nuevo lote usado en este estudio no mostró ningún aumento de la producción de IL-4 o IL-5. Sin embargo, con este lote era posible detectar infiltraciones de eosinófilos y neutrófilos en el fluido de BAL que es la principal característica distintiva de las enfermedades potenciadas para el FI-VRS. No se detectaron signos de enfermedades potenciadas para MVA-mBN199B, MVA-mBN201B y MVA-mBN294A

Discusión y conclusiones

10 A pesar de las diferencias entre MVA-mBN294A (equivalente a MVA-mBN294B) y MVA-mBN201B, ambos inducían respuestas de células T y células B similares y ofrecen protección similar sin inducir enfermedad potenciada. Ambas construcciones inducían una mejor protección que MVA-mBN199B que expresaba solamente determinantes antigenéticos de glucoproteínas de membrana (F y G).

Lista de secuencias

15 <110> Bavarian Nordic A/S

<120> VACUNA DE VIRUS VACCINIA MODIFICADO DE ANKARA (MVA) RECOMBINANTE PARA EL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL (VRS)

<130> BNI14747PCT

<140> No asignado todavía

20 < 141> 2013-03-15

<150> US 61/678,367

< 151> 2012-08-01

<150> EP 12005594.2

< 151> 2012-08-01

25 <160> 43

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

< 211> 897

< 212> ADN

30 < 213> Virus respiratorio sincicial humano (VRSh), cepa A2

<400> 1

# ES 2 767 324 T3

atgagcaaga acaaggacca gcggaccgccc aagaccctgg aacggacctg ggacaccctg aaccatctgc tggatcatcg tagctgcctg tacaagctga acctgaagtc cgtggccca atcaccctga gcattcctggc catgatcatc agcaccagcc tgatcattgc cgccatcatc tttatcgcca gcgccaaacca caaagtgacc cccaccacag ccatcatcca ggacgccacc tcccagatca agaacaccac ccccacctac ctgacccaga accctcagct gggcatcagc cccagcaacc ccagcgagat caccagccag atcacaacca tcctggcctc caccacccct ggcgtgaagt ccaccctgca gagcaccacc gtgaaaacca agaataaccac caccacacag acccagccca gcaagccac caccaagcag agacagaaca agccccctc caagcccaac aacgacttcc acttcgaggt gttcaacttc gtgcctgca gcatctgcag caacaacccc acctgttggg ccatctgcaa gcggatcccc aacaagaagc cggcaagaa aaccacaacc aaggctacca agaaggctac cctgaaaacc accaagaagg accccaagcc ccagaccacc aagagcaaag aggtgccaac caccaagccc accgaggaac ccaccatcaa caccaccaag accaacatca tcaccacccct gctgacccctc aacaccaccc gcaacccctg gctgacaagc cagatggaaa cttccacag caccagcagc gagggcaacc ctagccctag ccaggtgtcc accacctccg agtacccctc ccagcctagc agccccccca acacccctc acagtga	60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720 780 840 897
<210> 2	
<211> 298	
<212> PRT	
5	<213> VRSh cepa A2
<400> 2	

ES 2 767 324 T3

Met Ser Lys Asn Lys Asp Gln Arg Thr Ala Lys Thr Leu Glu Arg Thr  
1 5 10 15

Trp Asp Thr Leu Asn His Leu Leu Phe Ile Ser Ser Cys Leu Tyr Lys  
20 25 30

Leu Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Ile Thr Leu Ser Ile Leu Ala Met  
35 40 45

Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Ala Ala Ile Ile Phe Ile Ala Ser  
50 55 60

Ala Asn His Lys Val Thr Pro Thr Thr Ala Ile Ile Gln Asp Ala Thr  
65 70 75 80

Ser Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asn Pro Gln  
85 90 95

Leu Gly Ile Ser Pro Ser Asn Pro Ser Glu Ile Thr Ser Gln Ile Thr  
100 105 110

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

Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser  
130 135 140

Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Ser Lys Pro Asn  
145 150 155 160

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys  
165 170 175

Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys  
180 185 190

Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Leu  
195 200 205

Lys Thr Thr Lys Lys Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser Lys Glu  
210 215 220

Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys  
225 230 235 240

# ES 2 767 324 T3

Thr Asn Ile Ile Thr Thr Leu Leu Thr Ser Asn Thr Thr Gly Asn Pro  
 245 250 255

Glu Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly  
 260 265 270

Asn Pro Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu Tyr Pro Ser Gln  
 275 280 285

Pro Ser Ser Pro Pro Asn Thr Pro Arg Gln  
 290 295

<210> 3

< 211> 1725

< 212> ADN

5 < 213> VRSh cepa A2

<400> 3

atggaactgc tgatcctgaa ggccaaacgcc atcaccacaa tcctgaccgc cgtgaccc	60
tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg tagcgccgt	120
agcaagggct acctgagcgc cctgagaacc ggctggtaca cctccgtat caccatcgag	180
ctgtccaca tcaaagaaaa caagtgcac ggcaccgacg ccaaagtgaa gctgatcaag	240
caggaactgg acaagtacaa gaacgcccgtg accgaactcc agtcctcat gcagtccacc	300
cctgccacca acaaccgggc cagaagagaa ctgccccgtt ttatgaacta cacactgaac	360
aacgccaaaa agaccaatgt cactctgagc aagaagcggg agcggccgtt cctggcctt	420
ctgctggcgc tgggcagcgc cattgccagc ggcgtggccg tgtccaaggt gctgcacctg	480
gaaggcgaag tgaacaagat caagagtgcc ctgctctcca caaacaaggc cgtggtgtcc	540
ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aagggtcctgg atctgaagaa ctacatcgac	600
aagcagctcc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagactgtc	660
atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac	720
gcaggcgtga ccaccccggt gtccacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg	780
atcaatgaca tgcccatcac caacgatcag aagaaactca tgagcaacaa cgtgcagatc	840
gtgcggcagc agagttacag tatcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgt	900
gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac accccctgct ggaagctgca caccagcccc	960
ctgtgcacca ccaacacaaa agagggcagt aacatctgcc tgacccggac cgacagaggc	1020
tggtaactgca acaacgcggc cagcgtgtca ttctttccac aggccgagac atgcaagggt	1080
cagagcaacc ggggtttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaagtcaac	1140
ctgtgcacacg tggacatctt caaccccaag tacgactgca agatcatgac ttccaagacc	1200

# ES 2 767 324 T3

gacgtgtcca	gcagcgtgat	tacctccctg	ggcgccatcg	tgtcctgcta	cggcaagacc	1260										
aagtgcaccc	ccagcaacaa	aatagagga	atcatcaaga	ccttcagcaa	cggctgcgac	1320										
tacgtgtcca	ataagggcat	ggacaccgtg	tccgtggca	acacactgta	ctacgtgaat	1380										
aagcaggaag	gcaagagcct	gtacgtgaag	ggcgagccca	tcatcaactt	ctacgacccc	1440										
ctgggtttcc	ccagcgacga	gttcgacgcc	agtatcagcc	aggtcaacga	gaagatcaac	1500										
cagagcctgg	ccttcatcag	aaagagcgac	gaactgctgc	acaatgtgaa	cgctggcaag	1560										
agtaccacaa	acatcatgat	caccaccatc	atcatcgtga	tcattgtat	cctgctgagt	1620										
ctgatcgccg	tgggcctgct	gctgtactgc	aggccgcga	gcaccctgt	gaccctgtcc	1680										
aaggatcagc	tgtccggcat	caacaatatc	gccttctcca	actga		1725										
<210> 4																
< 211> 574																
< 212> PRT																
5	< 213> VRSh cepa A2															
<400> 4																
Met	Glu	Leu	Leu	Ile	Leu	Lys	Ala	Asn	Ala	Ile	Thr	Thr	Ile	Leu	Thr	
1				5						10				15		
Ala	Val	Thr	Phe	Cys	Phe	Ala	Ser	Gly	Gln	Asn	Ile	Thr	Glu	Glu	Phe	
											20		25		30	
Tyr	Gln	Ser	Thr	Cys	Ser	Ala	Val	Ser	Lys	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ala	Leu	
											35		40		45	
Arg	Thr	Gly	Trp	Tyr	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Ile	Glu	Leu	Ser	Asn	Ile	
								50		55		60				
Lys	Glu	Asn	Lys	Cys	Asn	Gly	Thr	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Ile	Lys	
65										70		75		80		
Gln	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Ala	Val	Thr	Glu	Leu	Gln	Leu	Leu	
									85		90		95			
Met	Gln	Ser	Thr	Pro	Ala	Thr	Asn	Asn	Arg	Ala	Arg	Arg	Glu	Leu	Pro	
								100		105		110				
Arg	Phe	Met	Asn	Tyr	Thr	Leu	Asn	Asn	Ala	Lys	Lys	Thr	Asn	Val	Thr	
								115		120		125				
Leu	Ser	Lys	Lys	Arg	Lys	Arg	Arg	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Gly	Val	
									130		135		140			
Gly	Ser	Ala	Ile	Ala	Ser	Gly	Val	Ala	Val	Ser	Lys	Val	Leu	His	Leu	

## ES 2 767 324 T3

145

150

155

160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys  
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val  
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn  
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln  
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn  
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu  
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys  
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile  
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro  
 290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro  
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg  
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe  
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp  
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val  
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr  
 385 390 395 400

# ES 2 767 324 T3

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys  
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile  
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Met Asp  
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly  
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro  
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn  
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu  
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr  
 515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val  
 530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser  
 545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn  
 565 570

<210> 5

< 211> 1725

< 212> ADN

5 < 213> VRSh cepa A-Long

<400> 5

atggaactgc	ccatcctgaa	ggccaaacgcc	atcaccacaa	tcctggccgc	cgtgaccttc	60
tgcttcgcca	gcagccagaa	catcaccgag	gaattctacc	agagcacctg	tagcgcgtg	120
agcaagggct	acctgagcgc	cctgagaacc	ggctggtaca	cctccgtat	caccatcgag	180
ctgtccaaca	tcaaagaaaa	caagtcaac	ggcaccgacg	ccaaagtcaa	gctgatcaag	240
caggaactgg	acaagtacaa	gaacgcccgtg	accgaactcc	agctcctcat	gcagtccacc	300
cctgcccggca	acaaccgggc	cagaagagaa	ctgccccgggt	ttatgaacta	cacactgaac	360
aacaccaaaa	agaccaatgt	gaccctgagc	aagaagcgga	agcggcggtt	cctgggcttt	420

# ES 2 767 324 T3

ctgctggcg tggcagcgc cattgccagc ggcattgccg tgtccaaggt gctgcacctg	480
gaaggcgaag tgaacaagat caagagcgc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc	540
ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aagggtctgg atctgaagaa ctacatcgac	600
aagcagctcc tgcccatcgt gaacaagcag agctgccgga tcagcaacat cgagacagt	660
atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccggagtt cagcgtgaac	720
gtggcgtga ccaccccggt gtccacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg	780
atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aagaaactga tgagcaacaa cgtcagatc	840
gtgcggcagc agagctacag catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgt	900
gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccccgtc ggaagctgca caccagcccc	960
ctgtgcacca ccaacacaaa agagggcagt aacatctgcc tgacccggac cgacagaggc	1020
tggtaactgca acaacgcgg cagcgtgtca ttcttccac aggccgagac atgcaagggt	1080
cagagcaacc gggtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgcctc cgaagtcaac	1140
ctgtgcacg tggacatctt caaccccaag tacgactgca agatcatgac ttccaagacc	1200
gacgtgtcca gcagcgtgat tacccctg ggcgccatcg tgtcctgcta cggcaagacc	1260
aagtgcaccc ccagcaacaa gaatagagga atcatcaaga cttcagcaa cggctgcgac	1320
tacgtgtcca ataagggcgt ggacaccgtg tccgtggca acacactgta ctacgtaat	1380
aagcaggaag gcaagggcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc	1440
ctgggtttcc ccagcgcacga gttcgcacgc accatcagcc aggtcaacga gaagatcaac	1500
cagagcctgg cttcatcag aaagagcgcac gaaactgctgc acaatgtgaa cgctggcaag	1560
agtaccacaa acatcatgat caccaccatc atcatcgtga tcattgtgat cctgctgagt	1620
ctgatgcggc tggcctgct gctgtactgc aaggcccgca gcacccctgt gaccctgtcc	1680
aaggatcagc tgtccggcat caacaatatc gccttctcca actga	1725

<210> 6

<211> 574

<212> PRT

5 <213> VRSh cepa A-Long

<400> 6

Met Glu Leu Pro Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Ala	
1	5
	10
	15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe	
20	25
	30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu	
35	40
	45

ES 2 767 324 T3

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile  
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys  
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu  
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro  
100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Thr Lys Lys Thr Asn Val Thr  
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val  
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu  
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys  
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val  
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn  
195 200 205

Lys Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln  
210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn  
225 230 235 240

Val Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu  
245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys  
260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile  
275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro

## ES 2 767 324 T3

290

295

300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro  
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg  
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe  
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp  
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val  
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr  
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys  
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile  
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp  
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly  
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro  
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn  
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu  
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr  
 515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val  
 530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser  
 545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn  
 565 570

<210> 7

< 211> 738

< 212> ADN

< 213> VRSh cepa B

<400> 7

atgattattt ccactagtct cattatcgct gctattatct tcattcattag tgccaatcat	60
aaagtcaccc tcacaaccgt caccgtgcag accattaaaa accataccga gaagaatatc	120
tcaacatatac tgacacaggt cccccccgaa agagtgaact cttccaaaca gcccacaacc	180
acctccccca ttcataccaa tagtgccaca atttctccca acacaaagtc tgaaacacac	240
cacactactg ctcagacaaa gggccgaatc accacctcta ctcagaccaa taagccatca	300
acaaaaatccc gctccaaaaa cccacctaaa aaacctaaag atgactatca tttcgaagtc	360
ttaatttcg tcccatgttc catttgcgga aacaaccagc tctgtaaatc tatctgtaaa	420
accatccccct ctaacaagcc aaaaaagaaa cctactatta aaccaactaa taagcccacc	480
actaagacta ctaacaaacg cgatccaaaa acacccgcca aaatgcctaa aaaagagatc	540
attacaaacc cagccaagaa accaactctc aaaactaccc aacgggacac ctccatttct	600
cagtctaccg tgctcgatac catcactccc aaatacacta tccagcagca gtcactccac	660
tcaacaacct ccgagaacac cccctcctca acccagattc ctactgcttc cgaaccatcc	720
accctcaacc ccaattga	738

5 <210> 8

< 211> 245

< 212> PRT

< 213> VRSh cepa B

<400> 8

ES 2 767 324 T3

Met Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Ala Ala Ile Ile Phe Ile Ile  
1 5 10 15

Ser Ala Asn His Lys Val Thr Leu Thr Thr Val Thr Val Gln Thr Ile  
20 25 30

Lys Asn His Thr Glu Lys Asn Ile Ser Thr Tyr Leu Thr Gln Val Pro  
35 40 45

Pro Glu Arg Val Asn Ser Ser Lys Gln Pro Thr Thr Ser Pro Ile  
50 55 60  
His Thr Asn Ser Ala Thr Ile Ser Pro Asn Thr Lys Ser Glu Thr His  
65 70 75 80

His Thr Thr Ala Gln Thr Lys Gly Arg Ile Thr Thr Ser Thr Gln Thr  
85 90 95

Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro  
100 105 110

Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile  
115 120 125

Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro Ser  
130 135 140

Asn Lys Pro Lys Lys Pro Thr Ile Lys Pro Thr Asn Lys Pro Thr  
145 150 155 160

Thr Lys Thr Thr Asn Lys Arg Asp Pro Lys Thr Pro Ala Lys Met Pro  
165 170 175

Lys Lys Glu Ile Ile Thr Asn Pro Ala Lys Lys Pro Thr Leu Lys Thr  
180 185 190

Thr Glu Arg Asp Thr Ser Ile Ser Gln Ser Thr Val Leu Asp Thr Ile  
195 200 205

Thr Pro Lys Tyr Thr Ile Gln Gln Gln Ser Leu His Ser Thr Thr Ser  
210 215 220

Glu Asn Thr Pro Ser Ser Thr Gln Ile Pro Thr Ala Ser Glu Pro Ser  
225 230 235 240

Thr Leu Asn Pro Asn  
245

<210> 9

< 211> 1176

5 < 212> ADN

< 213> VRSh cepa A2

<400> 9

# ES 2 767 324 T3

atggccctga	gcaaagtcaa	gctgaacgac	accctgaaca	aggaccagct	gctgtccagc	60
tccaaagtaca	ccatccagag	aagcacccgc	gacagcatcg	acaccccaa	ctacgacgtg	120
cagaaggcaca	tcaataagct	gtgcggcatg	ctgctgatca	ccgaggacgc	caaccacaag	180
ttcacccggcc	tgatcggat	gctgtacgccc	atgagccggc	tggccggga	ggacaccatc	240
aagatcctgc	gggacgcgg	ctaccacgtg	aaggccaacg	gcgtggacgt	gaccacccac	300
cggcaggaca	tcaacggcaa	agaaatgaag	ttcgaggtgc	tgaccctggc	cagcctgacc	360
accgagatcc	agatcaacat	cgagatcgag	agccggaagt	cctacaagaa	aatgctgaaa	420
gaaatggcg	aggtggcccc	cgagtacaga	cacgacagcc	ccgactgcgg	catgatcatc	480
ctgtgtatcg	ccgcctgtt	catcacaaag	ctggccgctg	gcgcacagatc	tggcctgacc	540
gccgtgatca	gacgggccaa	caacgtgctg	aagaacgaga	tgaagcggta	caagggcctg	600
ctgcccagg	atatgccaa	cagcttctac	gaggtgttgc	aaaagcaccc	ccacttcatc	660
gacgtgttgc	tgcacttcgg	cattgcccag	agcagcacca	gaggcggcag	cagagtggag	720
ggcatcttcg	ccggcctgtt	catgaacgccc	tacggcgctg	gccaggtcat	gctgagatgg	780
ggcgtgctgg	ccaagagcgt	gaagaacatc	atgctggcc	acgcccagcgt	gcaggccgag	840
atggaacagg	tggtgaggt	gtacgagtac	gcccagaagc	tggcggcga	ggccggcttc	900
taccacatcc	tgaacaaccc	caaggcctcc	ctgctgtccc	tgaccagtt	ccccacttt	960
agcagcgtgg	tgctcgaaa	tgcagccgg	ctggcgtatca	tggcggagta	ccgcggcacc	1020
cccgaaacc	aggacctgta	cgacgcccgc	aaggcctacg	ccgagcagct	gaaagaaaaac	1080
ggcgtgatca	actacagcgt	gctggacctg	acagccgagg	aactgaaagc	cattaagcac	1140
cagctgaacc	ctaaggacaa	cgacgtggag	ctgtga			1176

<210> 10

< 211> 391

5 < 212> PRT

< 213> VRSh cepa A2

<400> 10

Met	Ala	Leu	Ser	Lys	Val	Lys	Leu	Asn	Asp	Thr	Leu	Asn	Lys	Asp	Gln
1				5				10				15			

Leu	Leu	Ser	Ser	Ser	Lys	Tyr	Thr	Ile	Gln	Arg	Ser	Thr	Gly	Asp	Ser
					20			25				30			

Ile	Asp	Thr	Pro	Asn	Tyr	Asp	Val	Gln	Lys	His	Ile	Asn	Lys	Leu	Cys
							35	40			45				

Gly	Met	Leu	Leu	Ile	Thr	Glu	Asp	Ala	Asn	His	Lys	Phe	Thr	Gly	Leu
	50				55				60						

Ile	Gly	Met	Leu	Tyr	Ala	Met	Ser	Arg	Leu	Gly	Arg	Glu	Asp	Thr	Ile
65					70			75			80				

Lys	Ile	Leu	Arg	Asp	Ala	Gly	Tyr	His	Val	Lys	Ala	Asn	Gly	Val	Asp
					85			90			95				

ES 2 767 324 T3

Val Thr Thr His Arg Gln Asp Ile Asn Gly Lys Glu Met Lys Phe Glu  
100 105 110

Val Leu Thr Leu Ala Ser Leu Thr Thr Glu Ile Gln Ile Asn Ile Glu  
115 120 125

Ile Glu Ser Arg Lys Ser Tyr Lys Lys Met Leu Lys Glu Met Gly Glu  
130 135 140

Val Ala Pro Glu Tyr Arg His Asp Ser Pro Asp Cys Gly Met Ile Ile  
145 150 155 160

Leu Cys Ile Ala Ala Leu Val Ile Thr Lys Leu Ala Ala Gly Asp Arg  
165 170 175

Ser Gly Leu Thr Ala Val Ile Arg Arg Ala Asn Asn Val Leu Lys Asn  
180 185 190

Glu Met Lys Arg Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Lys Asp Ile Ala Asn Ser  
195 200 205

Phe Tyr Glu Val Phe Glu Lys His Pro His Phe Ile Asp Val Phe Val  
210 215 220

His Phe Gly Ile Ala Gln Ser Ser Thr Arg Gly Gly Ser Arg Val Glu  
225 230 235 240

Gly Ile Phe Ala Gly Leu Phe Met Asn Ala Tyr Gly Ala Gly Gln Val  
245 250 255

Met Leu Arg Trp Gly Val Leu Ala Lys Ser Val Lys Asn Ile Met Leu  
260 265 270

Gly His Ala Ser Val Gln Ala Glu Met Glu Gln Val Val Glu Val Tyr  
275 280 285

Glu Tyr Ala Gln Lys Leu Gly Gly Glu Ala Gly Phe Tyr His Ile Leu  
290 295 300

Asn Asn Pro Lys Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr Gln Phe Pro His Phe  
305 310 315 320

Ser Ser Val Val Leu Gly Asn Ala Ala Gly Leu Gly Ile Met Gly Glu  
325 330 335

Tyr Arg Gly Thr Pro Arg Asn Gln Asp Leu Tyr Asp Ala Ala Lys Ala  
340 345 350

Tyr Ala Glu Gln Leu Lys Glu Asn Gly Val Ile Asn Tyr Ser Val Leu  
355 360 365

Asp Leu Thr Ala Glu Glu Leu Glu Ala Ile Lys His Gln Leu Asn Pro  
370 375 380

Lys Asp Asn Asp Val Glu Leu  
385 390

<210> 11

< 211> 54

< 212> ADN

< 213> Virus de la fiebre aftosa (FMDV)

5 <400> 11

ctgaaactcg atctgctgaa actggccggc gacgtggaaa gcaaccctgg cccc 54

<210> 12

< 211> 18

< 212> PRT

10 < 213> FMDV

<400> 12

Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro  
1 5 10 15

Gly Pro

<210> 13

< 211> 585

15 < 212> ADN

< 213> VRSh cepa A2

<400> 13

atgaggcagac ggaaccctg caagttcgag atccggggcc actgcctgaa cggcaagcgg 60  
tgccacttca gccacaacta cttcgagtgg cccctcatg ctctgctggt ccggcagaac 120  
tttatgctga accggatcct gaagtccatg gacaagagca tcgataccct gagcgagatc 180  
agcggagccg ccgaactgga tagaaccgag gaatacgccc tggcgtggt cggagtgctg 240  
gaaagctaca tcggcagcat caacaacatc accaagcaga ggcgcgcgt ggccatgagc 300  
aagctgctga ccgagctgaa cagcgacgt atcaagaagc tgcgcgacaa cgaagaactg 360  
aactccccca agatccgggt gtacaacaca gtgatcagct acattgagag caaccggaag 420  
aacaacaagc agaccatcca tctgctgaag cggctgccc ccgacgtgct gaaaaagacc 480  
atcaagaaca ccctggacat ccacaagtcc atcaccatca ataaccctaa agaaagcacc 540  
gtgtccgaca ccaacgacca cgccaagaac aacgacacca cctga 585

<210> 14

20 < 211> 194

< 212> PRT

< 213> VRSh cepa A2

<400> 14

ES 2 767 324 T3

Met Ser Arg Arg Asn Pro Cys Lys Phe Glu Ile Arg Gly His Cys Leu  
1 5 10 15

Asn Gly Lys Arg Cys His Phe Ser His Asn Tyr Phe Glu Trp Pro Pro  
20 25 30

His Ala Leu Leu Val Arg Gln Asn Phe Met Leu Asn Arg Ile Leu Lys  
35 40 45

Ser Met Asp Lys Ser Ile Asp Thr Leu Ser Glu Ile Ser Gly Ala Ala  
50 55 60

Glu Leu Asp Arg Thr Glu Glu Tyr Ala Leu Gly Val Val Gly Val Leu  
65 70 75 80

Glu Ser Tyr Ile Gly Ser Ile Asn Asn Ile Thr Lys Gln Ser Ala Cys  
85 90 95

Val Ala Met Ser Lys Leu Leu Thr Glu Leu Asn Ser Asp Asp Ile Lys  
100 105 110

Lys Leu Arg Asp Asn Glu Glu Leu Asn Ser Pro Lys Ile Arg Val Tyr  
115 120 125

Asn Thr Val Ile Ser Tyr Ile Glu Ser Asn Arg Lys Asn Asn Lys Gln  
130 135 140

Thr Ile His Leu Leu Lys Arg Leu Pro Ala Asp Val Leu Lys Lys Thr  
145 150 155 160

Ile Lys Asn Thr Leu Asp Ile His Lys Ser Ile Thr Ile Asn Asn Pro  
165 170 175

Lys Glu Ser Thr Val Ser Asp Thr Asn Asp His Ala Lys Asn Asn Asp  
180 185 190

Thr Thr

<210> 15

< 211> 1575

< 212> **ADN**

5 < 213> VRSh cepa A2

<400> 15

atggaactcc ctattctcaa agccaatgct attactacca ttctcgccgc tgtcacctt 60  
 tgtttcgcct cttcccgaaa tattaccgaa gagttttacc agtctacctg ttccgcccgc 120  
 agtaaaaggat acctgtccgc cctccgcaact gttggata ctatgtcat tacaatcgaa 180  
 ctctcaaata taaaagaaaa taagtgtaat gggaccgatg ctaaagtcaa actcattaaa 240  
 caagaactcg ataagtataa gaatgctgtc actgagctgc aactgctgat gcagtctaca 300  
 ccccgagcca ataatcgagc cagacgcgag ctgcctcgct ttatgaatta tactctcaat 360  
 aatactaaaa agacaaacgt caccctcagt aaaaagcga aaagacggtt tctcggattc 420  
 ctccctcgccg tgggctctgc tatcgctagc ggaattgctg tctccaaagt cctccatctg 480  
 gaaggggagg tcaacaaaat taagtctgtc ctccctctca caaacaaggc cgtcgtgtct 540  
 ctctccaaatg gcgtgtctgt gctcacctct aaagtgcgtc acctcaaaaa ttacattgtat 600  
 aaacagctgc tccctattgt gaacaaacag tcttgcgcga ttagcaatat cgaaaccgtc 660  
 attgaatttc aacaaaagaa taatagggtc ctcgaaattt cccgcgaatt ctccgtaat 720  
 gtgggagtca caacacctgt ctctacctat atgctacta actccgaact cctctccctc 780  
 attaacgata tgcccattac aaatgatcag aaaaaactca tgtctaataa cgtccagatt 840  
 gtccgcgcagc agtcttatacg cattatgtcc attatcaaag aggaagtcc cgcttacgtc 900  
 gtccagctcc ctctgtatgg ggtcatcgat acaccttggt ggaaactcca tacctcccc 960  
 ctgtgtacaa ccaataccaa agaagggtcc aatatttgcc tgacaagaac cgaccgcggg 1020  
 tggtaactgtg ataatgcggg ctctgtctcc tttttccccc aggccgaaac ctgtaaagtc 1080  
 cagtctaattc gagtcttttg cgatactatg aattccctca ccctcccttc agaagtgaat 1140  
 ctctgtacg tcgatatttt caaccctaaa tatgattgca aaattatgac cagtaaaact 1200  
 gacgtgtcct cttccgtcat caccccttc ggtgttattg tgtcttgta cggaaaaact 1260  
 aaatgcacgg ctagtaataa gaaccgaggc attattaaga cctttccaa cggctgtgat 1320  
 tatgtgtcta acaaaggcgt ggatactgtc agtgcggaa atacactcta ctatgtcaac 1380  
 aaacaggaag ggaaaagtct ctacgtcaa ggggagccga taatcaattt ttacgatccc 1440  
 ctctgtttc cctccgtatga atttgatgcc agtatttccc aggtgaacga aaaaatcaat 1500  
 cagtctctcg cttttatttag aaaatctgtat gaactcctgc ataacgtcaa tgcaggcaaa 1560  
 agcactacta attga 1575

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 524

<212> **PRT**

5 &lt;213&gt; VRSh cepa A2

&lt;400&gt; 16

ES 2 767 324 T3

Met Glu Leu Pro Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe  
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu  
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile  
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys  
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu  
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro  
100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Thr Lys Lys Thr Asn Val Thr  
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val  
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu  
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys  
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val  
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn  
195 200 205

Lys Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln  
210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn  
225 230 235 240

ES 2 767 324 T3

Val Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu  
245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys  
260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile  
275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro  
290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro  
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg  
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe  
340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp  
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val  
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr  
385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys  
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile  
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp  
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly  
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro  
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn  
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu  
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn  
515 520

<210> 17

< 211> 1809

&lt; 212&gt; ADN

&lt; 213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

5 < 223> ADNc que codifica la proteína de fusión que comprende la proteína N de longitud completa del VRSh cepa A2 fusionada con el fragmento de proteasa 2A del FMDV fusionado con la proteína M2 de longitud completa del VRSh cepa A2.

&lt;400&gt; 17

atggccctga	gcaaagtcaa	gctgaacgac	accctgaaca	aggaccagct	gctgtccagc	60
tccaaagtaca	ccatccagag	aagcaccggc	gacagcatcg	acaccccaa	ctacgacgtg	120
cagaaggcaca	tcaataagct	gtgcggcatg	ctgctgatca	ccgaggacgc	caaccacaag	180
ttcacccggcc	tgatcggat	gctgtacgcc	atgagccggc	tggccggga	ggacaccatc	240
aagatcctgc	gggacgcgg	ctaccacgtg	aaggccaacg	gcgtggacgt	gaccacccac	300
cggcaggaca	tcaacggcaa	agaaatgaag	ttcgagggtgc	tgaccctggc	cagcctgacc	360
accgagatcc	agatcaacat	cgagatcgag	agccggaagt	cctacaagaa	aatgctgaaa	420
gaaatggcg	aggtggcccc	cgagttacaga	cacgacagcc	ccgactgcgg	catgatcatc	480
ctgtgtatcg	ccgcctgg	catcacaaag	ctggccgctg	gcgacagatc	tggcctgacc	540
gccgtgatca	gacgggccaa	caacgtgctg	aagaacgaga	tgaagcgta	caagggcctg	600
ctgcccagg	atatgccaa	cagttctac	gaggtgttcg	aaaagcaccc	ccacttcatc	660
gacgtgttcg	tgcacttcgg	cattgcccag	agcagcacca	gaggcggcag	cagagtggag	720
ggcatcttcg	ccggcctgtt	catgaacgcc	tacggcgctg	gccaggtcat	gctgagatgg	780
ggcgtgctgg	ccaagagcgt	gaagaacatc	atgctggcc	acgcccagcgt	gcaggccgag	840
atggaacagg	tggtgaggt	gtacgactac	gcccagaagc	tggcggcga	ggccggcttc	900
taccacatcc	tgaacaaccc	caaggcctcc	ctgctgtccc	tgaccctgtt	ccccacttt	960
agcagcgtgg	tgctcgaaa	tgcagccgga	ctggccatca	tggcgagta	ccgcggcacc	1020
cccagaaacc	aggacctgt	cgacgcccgc	aaggcctacg	ccgagcagct	gaaagaaaac	1080
ggcgtgatca	actacagcgt	gctggacctg	acagccgagg	aactggaagc	cattaagcac	1140
cagctgaacc	ctaaggacaa	cgacgtggag	ctgctgaact	tcgatctgct	gaaactggcc	1200
ggcgacgtgg	aaagcaaccc	tggccccagc	agacggaacc	cctgcaagtt	cgagatccgg	1260
ggccactgcc	tgaacggcaa	gcggtgccac	ttcagccaca	actacttcga	gtggccccct	1320

catgctctgc tggccggca gaactttatg ctgaaccgga tcctgaagtc catggacaag	1380
agcatcgata ccctgagcga gatcagcgg a cccggccgaac tggatagaac cgaggaatac	1440
gccctggcg tggccggact gctggaaagc tacatcggca gcatcaacaa catcaccaag	1500
cagagcgcct gcgtggccat gagcaagctg ctgaccgagc tgaacagcga cgatatacg	1560
aagctgcgcg acaacgaaga actgaactcc cccaaagatcc ggggtgtacaa cacagtgtac	1620
agctacattg agagcaaccg gaagaacaac aagcagacca tccatctgct gaagcggctg	1680
cccgccgacg tgctgaaaaa gaccatcaag aacaccctgg acatccacaa gtccatcacc	1740
atcaataacc ccaaagaaaag caccgtgtcc gacaccaacg accacgccaa gaacaacgac	1800
accacctga	1809

&lt;210&gt; 18

&lt; 211&gt; 602

&lt; 212&gt; PRT

5 &lt; 213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

< 223> Proteína de fusión que comprende la proteína N de longitud completa del VRSh cepa A2 fusionada con el fragmento de proteasa 2A del FMDV fusionado con la proteína M2 de longitud completa del VRSh cepa A2.

&lt;400&gt; 18

Met Ala Leu Ser Lys Val Lys Leu Asn Asp Thr Leu Asn Lys Asp Gln			
1	5	10	15

Leu Leu Ser Ser Ser Lys Tyr Thr Ile Gln Arg Ser Thr Gly Asp Ser			
20	25	30	

Ile Asp Thr Pro Asn Tyr Asp Val Gln Lys His Ile Asn Lys Leu Cys			
35	40	45	

Gly Met Leu Leu Ile Thr Glu Asp Ala Asn His Lys Phe Thr Gly Leu			
50	55	60	

Ile Gly Met Leu Tyr Ala Met Ser Arg Leu Gly Arg Glu Asp Thr Ile			
65	70	75	80

Lys Ile Leu Arg Asp Ala Gly Tyr His Val Lys Ala Asn Gly Val Asp			
85	90	95	

Val Thr Thr His Arg Gln Asp Ile Asn Gly Lys Glu Met Lys Phe Glu			
100	105	110	

Val Leu Thr Leu Ala Ser Leu Thr Thr Glu Ile Gln Ile Asn Ile Glu			
115	120	125	

10

ES 2 767 324 T3

Ile Glu Ser Arg Lys Ser Tyr Lys Lys Met Leu Lys Glu Met Gly Glu  
130 135 140

Val Ala Pro Glu Tyr Arg His Asp Ser Pro Asp Cys Gly Met Ile Ile  
145 150 155 160

Leu Cys Ile Ala Ala Leu Val Ile Thr Lys Leu Ala Ala Gly Asp Arg  
165 170 175

Ser Gly Leu Thr Ala Val Ile Arg Arg Ala Asn Asn Val Leu Lys Asn  
180 185 190

Glu Met Lys Arg Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Lys Asp Ile Ala Asn Ser  
195 200 205

Phe Tyr Glu Val Phe Glu Lys His Pro His Phe Ile Asp Val Phe Val  
210 215 220

His Phe Gly Ile Ala Gln Ser Ser Thr Arg Gly Gly Ser Arg Val Glu  
225 230 235 240

Gly Ile Phe Ala Gly Leu Phe Met Asn Ala Tyr Gly Ala Gly Gln Val  
245 250 255

Met Leu Arg Trp Gly Val Leu Ala Lys Ser Val Lys Asn Ile Met Leu  
260 265 270

Gly His Ala Ser Val Gln Ala Glu Met Glu Gln Val Val Glu Val Tyr  
275 280 285

Glu Tyr Ala Gln Lys Leu Gly Gly Glu Ala Gly Phe Tyr His Ile Leu  
290 295 300

Asn Asn Pro Lys Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr Gln Phe Pro His Phe  
305 310 315 320

Ser Ser Val Val Leu Gly Asn Ala Ala Gly Leu Gly Ile Met Gly Glu  
325 330 335

Tyr Arg Gly Thr Pro Arg Asn Gln Asp Leu Tyr Asp Ala Ala Lys Ala  
340 345 350

Tyr Ala Glu Gln Leu Lys Glu Asn Gly Val Ile Asn Tyr Ser Val Leu  
355 360 365

Asp Leu Thr Ala Glu Glu Leu Glu Ala Ile Lys His Gln Leu Asn Pro  
370 375 380

ES 2 767 324 T3

Lys Asp Asn Asp Val Glu Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala  
385 390 395 400

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Ser Arg Arg Asn Pro Cys Lys  
405 410 415

Phe Glu Ile Arg Gly His Cys Leu Asn Gly Lys Arg Cys His Phe Ser  
420 425 430

His Asn Tyr Phe Glu Trp Pro Pro His Ala Leu Leu Val Arg Gln Asn  
435 440 445

Phe Met Leu Asn Arg Ile Leu Lys Ser Met Asp Lys Ser Ile Asp Thr  
450 455 460

Leu Ser Glu Ile Ser Gly Ala Ala Glu Leu Asp Arg Thr Glu Glu Tyr  
465 470 475 480

Ala Leu Gly Val Val Gly Val Leu Glu Ser Tyr Ile Gly Ser Ile Asn  
485 490 495

Asn Ile Thr Lys Gln Ser Ala Cys Val Ala Met Ser Lys Leu Leu Thr  
500 505 510

Glu Leu Asn Ser Asp Asp Ile Lys Lys Leu Arg Asp Asn Glu Glu Leu  
515 520 525

Asn Ser Pro Lys Ile Arg Val Tyr Asn Thr Val Ile Ser Tyr Ile Glu  
530 535 540

Ser Asn Arg Lys Asn Asn Lys Gln Thr Ile His Leu Leu Lys Arg Leu  
545 550 555 560

Pro Ala Asp Val Leu Lys Lys Thr Ile Lys Asn Thr Leu Asp Ile His  
565 570 575

Lys Ser Ile Thr Ile Asn Asn Pro Lys Glu Ser Thr Val Ser Asp Thr  
580 585 590

Asn Asp His Ala Lys Asn Asn Asp Thr Thr  
595 600

<210> 19

< 211> 10

< 212> PRT

5 < 213> Artificial

<220>

< 223> Peptido sintético.

<400> 19

Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu  
1 5 10

<210> 20

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial

5 <220>

< 223> Péptido sintético.

<400> 20

Lys	Tyr	Lys	Asn	Ala	Val	Thr	Glu	Leu
1							5	

<210> 21

10 < 211> 15

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Péptido sintético.

15 <400> 21

Glu	Leu	Gln	Leu	Leu	Met	Gln	Ser	Thr	Pro	Ala	Ala	Asn	Asn	Arg
1						5								15

<210> 22

< 211> 13

< 212> PRT

20 < 213> Artificial

<220>

< 223> Péptido sintético.

<400> 22

Trp	Ala	Ile	Cys	Lys	Arg	Ile	Pro	Asn	Lys	Lys	Pro	Gly
1						5						

25 <210> 23

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

30 < 223> Péptido sintético.

<400> 23

Lys	Tyr	Thr	Ile	Gln	Arg	Ser	Thr	Gly
1							5	

<210> 24

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Péptido sintético.

5 <400> 24

Leu	Ser	Leu	Thr	Gln	Phe	Pro	Asn	Phe
1								5

<210> 25

< 211> 9

< 212> PRT

10 < 213> Artificial

<220>

< 223> Péptido sintético.

<400> 25

Ser	Arg	Leu	Gly	Arg	Glu	Asp	Thr	Ile
1								5

15 <210> 26

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

20 < 223> Péptido sintético.

<400> 26

Ile	Pro	Lys	Asp	Ile	Ala	Asn	Ser	Phe
1								5

<210> 27

< 211> 9

25 < 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Péptido sintético.

<400> 27

Ser	Tyr	Ile	Gly	Ser	Ile	Asn	Asn	Ile
1								5

30 <210> 28

< 211> 1725

< 212> ADN

< 213> VRSh cepa A2

&lt;400&gt; 28

atggagttgc	taatcctcaa	agcaaatgca	attaccacaa	tcctcactgc	agtacacattt	60
tgttttgctt	ctggtcaaaa	catcaactgaa	gaattttatc	aatcaacatg	cagtgcgatt	120
agcaaaggct	atcttagtgc	tctgagaact	ggttggata	ccagtgttat	aactatagaa	180
ttaagtaata	tcaaggaaaa	taagtgtaat	ggaacagatg	ctaaggtaaa	attgataaaaa	240
caagaattag	ataaaatataa	aaatgctgta	acagaattgc	agttgctcat	gcaaagcaca	300
ccaccaacaa	acaatcgagc	cagaagagaa	ctaccaaggt	ttatgaatta	tacactcaac	360
aatgccaaaa	aaaccaatgt	aacattaagc	aagaaaagga	aaagaagatt	tcttggttt	420
ttgttaggtg	ttggatctgc	aatcgccagt	ggcggtgctg	tatctaaggt	cctgcaccta	480
gaaggggaag	tgaacaagat	caaaagtgct	ctactatcca	caaacaaggc	tgtagtcagc	540
ttatcaaatg	gagttagtgt	cttaaccagc	aaagtgttag	acctcaaaaa	ctatatacat	600
aaacaattgt	tacctattgt	gaacaagcaa	agctgcagca	tatcaaata	agaaaactgtg	660
atagagttcc	aacaaaagaa	caacagacta	ctagagatta	ccagggatt	tagtgttaat	720
gcaggtgtaa	ctacacctgt	aagcacttac	atgttaacta	atagtgaatt	attgtcatta	780
atcaatgata	tgcctataac	aaatgatcag	aaaaagttaa	tgtccaacaa	tgttcaaata	840
gttagacagc	aaagttactc	tatcatgtcc	ataataaaag	aggaagtctt	agcatatgt	900
gtacaattac	cactatatgg	tgttatagat	acaccctgtt	ggaaactaca	cacatcccct	960
ctatgtacaa	ccaacacaaa	agaagggtcc	aacatctgtt	taacaagaac	tgacagagga	1020
tggtaactgt	acaatgcagg	atcagtatct	ttcttccac	aagctgaaac	atgtaaagtt	1080
caatcaaatc	gagtttttg	tgacacaatg	aacagttaa	cattaccaag	tgaaataaaat	1140
ctctgcaatg	ttgacatatt	caacccaaa	tatgattgt	aaattatgac	ttcaaaaaca	1200
gatgtaaagca	gctccgttat	cacatctcta	ggagccattt	tgtcatgcta	tggaaaaact	1260
aaatgtacag	catccaataa	aaatcggtga	atcataaaga	cattttctaa	cgggtgcgt	1320
tatgtatcaa	ataaaggat	ggacactgtg	tctgttaggt	acacattata	ttatgtaaat	1380
aagcaagaag	gtaaaagtct	ctatgtaaaa	ggtgaaccaa	taataaattt	ctatgaccca	1440
ttagtattcc	cctctgatga	atttgatgca	tcaatatctc	aagtcaacga	gaagattaac	1500
cagagcctag	catttattcg	taaatccgat	gaattattac	ataatgtaaa	tgctggtaaa	1560
tccaccacaa	atatcatgat	aactactata	attatagtga	ttatgtaaat	attgttatca	1620
ttaattgctg	ttggactgct	cttatactgt	aaggccagaa	gcacaccagt	cacactaagc	1680
aaagatcaac	tgagtggat	aaataatatt	gcatttagta	actaa		1725

&lt;210&gt; 29

&lt; 211&gt; 574

5 &lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; VRSh cepa A2

&lt;400&gt; 29

ES 2 767 324 T3

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr  
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe  
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu  
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile  
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys  
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu  
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Pro Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro  
100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr  
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val  
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu  
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys  
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val  
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn  
195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln  
210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn  
225 230 235 240

ES 2 767 324 T3

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu  
245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys  
260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile  
275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro  
290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro  
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg  
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe  
340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp  
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Ile Asn Leu Cys Asn Val  
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr  
385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys  
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile  
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Met Asp  
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly  
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro  
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn  
485 490 495

# ES 2 767 324 T3

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu  
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr  
 515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val  
 530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser  
 545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn  
 565 570

<210> 30

< 211> 897

< 212> ADN

5 < 213> VRSh cepa A2

<400> 30

atgagcaaga acaaggacca gcggaccgccc aagaccctgg aacggacctg ggacaccctg 60  
 aaccatctgc tggatcatcg tagctgcctg tacaagctga acctgaagtc cgtggccca 120  
 atcaccctga gcatcctggc catgatcatc agcaccagcc tgatcattgc cgccatcatc 180  
 tttatcgcca gcgccaaacca caaagtgacc cccaccacag ccatcatcca ggacgccacc 240  
 tccccagatca agaacaccac ccccacctac ctgaccctaga accctcagct gggcatcagc 300  
 cccagcaacc ccagcgagat caccagccag atcacaacca tcctggccctc caccacccct 360  
 ggcgtgaagt ccaccctgca gagcaccacc gtgaaaacca agaataaccac caccacacag 420  
 acccagccca gcaagccac caccaagcag agacagaaca agccccctc caagcccaac 480  
 aacgacttcc acttcgaggt gttcaacttc gtgcctgca gcatctgcag caacaacccc 540  
 acctgttggg ccatctgcaa gcggatcccc aacaagaagc cggcaagaa aaccacaacc 600  
 aagcctacca agaagcctac cctgaaaacc accaagaagg accccaagcc ccagaccacc 660  
 aagagcaaag aggtgccaac caccaagccc accgaggaac ccaccatcaa caccaccaag 720  
 accaacatca tcaccacccct gctgacccctc aacaccaccc gcaacccctc gctgacaagc 780  
 cagatggaaa cttccacacag caccagcagc gagggcaacc ctagccctag ccaggtgtcc 840  
 accacccctccg agtacccctccg ccagccctagc agccccccca acaccccccag acagtga 897

<210> 31

< 211> 298

10 < 212> PRT

< 213> VRSh cepa A2

<400> 31

ES 2 767 324 T3

Met Ser Lys Asn Lys Asp Gln Arg Thr Ala Lys Thr Leu Glu Arg Thr  
1 5 10 15

Trp Asp Thr Leu Asn His Leu Leu Phe Ile Ser Ser Cys Leu Tyr Lys  
20 25 30

Leu Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Ile Thr Leu Ser Ile Leu Ala Met  
35 40 45

Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Ala Ala Ile Ile Phe Ile Ala Ser  
50 55 60

Ala Asn His Lys Val Thr Pro Thr Thr Ala Ile Ile Gln Asp Ala Thr  
65 70 75 80

Ser Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asn Pro Gln  
85 90 95

Leu Gly Ile Ser Pro Ser Asn Pro Ser Glu Ile Thr Ser Gln Ile Thr  
100 105 110

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

Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser  
130 135 140

Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Ser Lys Pro Asn  
145 150 155 160

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys  
165 170 175

Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys  
180 185 190

Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Leu  
195 200 205

Lys Thr Thr Lys Lys Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser Lys Glu  
210 215 220

Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys  
225 230 235 240

ES 2 767 324 T3

Thr Asn Ile Ile Thr Thr Leu Leu Thr Ser Asn Thr Thr Gly Asn Pro  
 245 250 255

Glu Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly  
 260 265 270

Asn Pro Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu Tyr Pro Ser Gln  
 275 280 285

Pro Ser Ser Pro Pro Asn Thr Pro Arg Gln  
 290 295

<210> 32

< 211> 585

< 212> ADN

5 < 213> VRSh cepa A2

<400> 32

atgtcacgaa ggaatccttg caaatggaa attcgaggc attgcttaaa tggtaagagg 60  
 tgtcatttta gtcataattha ttttgaatgg ccaccccatg cactgcttgt aagacaaaac 120  
 tttatgttaa acagaataact taagtctatg gataaaagta tagataccctt atcagaataa 180  
 agtggagctg cagagttgga cagaacagaa gagtatgctc ttgggtgttgt tggagtgcta 240  
 gagagttata taggatcaat aaacaatata actaaacaat cagcatgtgt tgccatgagc 300  
 aaactcctca ctgaactcaa tagtgatgat atcaaaaagc tgaggcacaa tgaagagcta 360  
 aattcacccca agataagagt gtacaatact gtcatatcat atattgaaag caacaggaaa 420  
 aacaataaac aaactatcca tctgttaaaa agattgccag cagacgtatt gaagaaaacc 480  
 atcaaaaaca cattggatat ccataagagc ataaccatca acaacccaaa agaatcaact 540  
 gttagtgata caaatgacca tgccaaaaat aatgatacta cctga 585

<210> 33

< 211> 194

10 < 212> PRT

< 213> VRSh cepa A2

<400> 33

Met Ser Arg Arg Asn Pro Cys Lys Phe Glu Ile Arg Gly His Cys Leu  
 1 5 10 15

Asn Gly Lys Arg Cys His Phe Ser His Asn Tyr Phe Glu Trp Pro Pro  
 20 25 30

His Ala Leu Leu Val Arg Gln Asn Phe Met Leu Asn Arg Ile Leu Lys  
 35 40 45

Ser Met Asp Lys Ser Ile Asp Thr Leu Ser Glu Ile Ser Gly Ala Ala

## ES 2 767 324 T3

50

55

60

Glu Leu Asp Arg Thr Glu Glu Tyr Ala Leu Gly Val Val Gly Val Leu  
 65 70 75 80

Glu Ser Tyr Ile Gly Ser Ile Asn Asn Ile Thr Lys Gln Ser Ala Cys  
 85 90 95

Val Ala Met Ser Lys Leu Leu Thr Glu Leu Asn Ser Asp Asp Ile Lys  
 100 105 110

Lys Leu Arg Asp Asn Glu Glu Leu Asn Ser Pro Lys Ile Arg Val Tyr  
 115 120 125

Asn Thr Val Ile Ser Tyr Ile Glu Ser Asn Arg Lys Asn Asn Lys Gln  
 130 135 140

Thr Ile His Leu Leu Lys Arg Leu Pro Ala Asp Val Leu Lys Lys Thr  
 145 150 155 160

Ile Lys Asn Thr Leu Asp Ile His Lys Ser Ile Thr Ile Asn Asn Pro  
 165 170 175

Lys Glu Ser Thr Val Ser Asp Thr Asn Asp His Ala Lys Asn Asn Asp  
 180 185 190

Thr Thr

<210> 34

< 211> 1176

< 212> ADN

5 < 213> VRSh cepa A2

<400> 34

atggctctta	gcaaagtcaa	gttgaatgat	acactcaaca	aagatcaact	tctgtcatcc	60
agcaaataca	ccatccaacg	gagcacagga	gatagtattt	atactcctaa	ttatgtatgt	120
cagaaacaca	tcaataagtt	atgtggcatg	ttattaatca	cagaagatgc	taatcataaa	180
ttcactgggt	taataggtat	gttatatgcg	atgtctagg	taggaagaga	agacaccata	240
aaaatactca	gagatgcggg	atatcatgta	aaagcaaatg	gagtagatgt	aacaacacat	300
cgtcaagaca	ttaatggaaa	agaaatgaaa	tttgaagtgt	taacattggc	aagcttaaca	360
actgaaattc	aaatcaacat	tgagatagaa	tctagaaaaat	cctacaaaaaa	aatgctaaaa	420
gaaatggag	aggttagctcc	agaatacagg	catgactctc	ctgattgtgg	gatgataata	480
ttatgtatag	cagcattagt	aataactaaa	ttagcagcag	ggcacagatc	tggcttaca	540

# ES 2 767 324 T3

gccgtgatta ggagagctaa taatgtccta aaaaatgaaa tgaaacgtta caaaggctta	600
ctacccaagg acatagccaa cagcttctat gaagtgtttt aaaaacatcc ccactttata	660
gatgtttttg ttcattttgg tatagcacaa tcttctacca gaggtggcag tagagttgaa	720
gggatttttg caggattgtt tatgaatgcc tatggtgcaag ggcaagtgtat gttacggtgg	780
ggagtcttag caaaatcagt taaaaatatt atgttaggac atgctagtgt gcaagcagaa	840
atggaacaag ttgttgaggt ttatgaatat gcccaaaaat tgggtggtga agcaggattc	900
taccatatat tgaacaaccc aaaagcatca ttattatctt tgactcaatt tcctcacttc	960
tccagtgttag tattaggca tgctgctggc ctaggcataa tgggagagta cagaggtaca	1020
ccgaggaatc aagatctata tgatgcagca aaggcatatg ctgaacaact caaagaaaaat	1080
ggtgtgatta actacagtgt actagacttg acagcagaag aactagaggc tatcaaacat	1140
cagcttaatc caaaagataa tgatgttagag ctttga	1176
<210> 35	
< 211> 391	
< 212> PRT	
5 < 213> VRSh cepa A2	
<400> 35	
Met Ala Leu Ser Lys Val Lys Leu Asn Asp Thr Leu Asn Lys Asp Gln	
1 5 10 15	
Leu Leu Ser Ser Ser Lys Tyr Thr Ile Gln Arg Ser Thr Gly Asp Ser	
20 25 30	
Ile Asp Thr Pro Asn Tyr Asp Val Gln Lys His Ile Asn Lys Leu Cys	
35 40 45	
Gly Met Leu Leu Ile Thr Glu Asp Ala Asn His Lys Phe Thr Gly Leu	
50 55 60	
Ile Gly Met Leu Tyr Ala Met Ser Arg Leu Gly Arg Glu Asp Thr Ile	
65 70 75 80	
Lys Ile Leu Arg Asp Ala Gly Tyr His Val Lys Ala Asn Gly Val Asp	
85 90 95	
Val Thr Thr His Arg Gln Asp Ile Asn Gly Lys Glu Met Lys Phe Glu	
100 105 110	
Val Leu Thr Leu Ala Ser Leu Thr Thr Glu Ile Gln Ile Asn Ile Glu	
115 120 125	
Ile Glu Ser Arg Lys Ser Tyr Lys Lys Met Leu Lys Glu Met Gly Glu	

## ES 2 767 324 T3

130

135

140

Val Ala Pro Glu Tyr Arg His Asp Ser Pro Asp Cys Gly Met Ile Ile  
 145 150 155 160

Leu Cys Ile Ala Ala Leu Val Ile Thr Lys Leu Ala Ala Gly Asp Arg  
 165 170 175

Ser Gly Leu Thr Ala Val Ile Arg Arg Ala Asn Asn Val Leu Lys Asn  
 180 185 190

Glu Met Lys Arg Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Lys Asp Ile Ala Asn Ser  
 195 200 205

Phe Tyr Glu Val Phe Glu Lys His Pro His Phe Ile Asp Val Phe Val  
 210 215 220

His Phe Gly Ile Ala Gln Ser Ser Thr Arg Gly Gly Ser Arg Val Glu  
 225 230 235 240

Gly Ile Phe Ala Gly Leu Phe Met Asn Ala Tyr Gly Ala Gly Gln Val  
 245 250 255

Met Leu Arg Trp Gly Val Leu Ala Lys Ser Val Lys Asn Ile Met Leu  
 260 265 270

Gly His Ala Ser Val Gln Ala Glu Met Glu Gln Val Val Glu Val Tyr  
 275 280 285

Glu Tyr Ala Gln Lys Leu Gly Gly Glu Ala Gly Phe Tyr His Ile Leu  
 290 295 300

Asn Asn Pro Lys Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr Gln Phe Pro His Phe  
 305 310 315 320

Ser Ser Val Val Leu Gly Asn Ala Ala Gly Leu Gly Ile Met Gly Glu  
 325 330 335

Tyr Arg Gly Thr Pro Arg Asn Gln Asp Leu Tyr Asp Ala Ala Lys Ala  
 340 345 350

Tyr Ala Glu Gln Leu Lys Glu Asn Gly Val Ile Asn Tyr Ser Val Leu  
 355 360 365

Asp Leu Thr Ala Glu Glu Leu Glu Ala Ile Lys His Gln Leu Asn Pro  
 370 375 380

Lys Asp Asn Asp Val Glu Leu  
 385 390

<210> 36

< 211> 27

5 < 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> Cebador de RT-PCR.

<400> 36

gaactcagtg taggtagaat gtttgca 27

5 <210> 37

< 211> 25

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

10 < 223> Cebador de RT-PCR.

<400> 37

ttcagctatc attttctctg ccaat 25

<210> 38

< 211> 27

15 < 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> Sonda de RT-PCR.

<400> 38

20 ttggAACCTG tctgaacatt cccgggtt 27

<210> 39

< 211> 40

< 212> ADN

< 213> Artificial

25 <220>

< 223> Promotor sintético.

<400> 39

aaaaattgaa attttatTTT ttTTTTTgg aatataaata 40

<210> 40

30 < 211> 104

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> Promotor sintético.

35 <400> 40

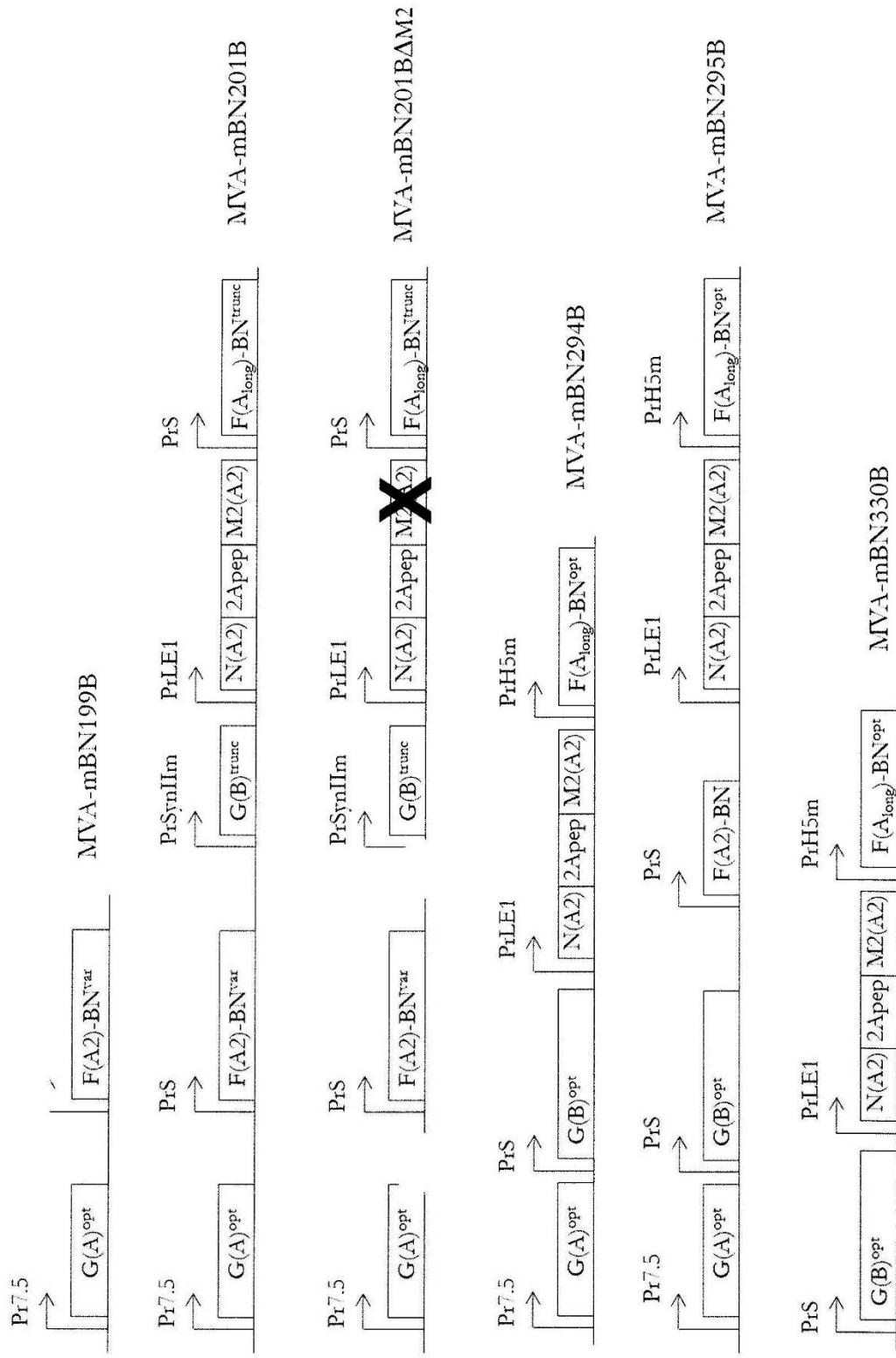
tccaaaccca cccgcTTTT atagtaagtt tttcacccat aaataataaa tacaataatt 60

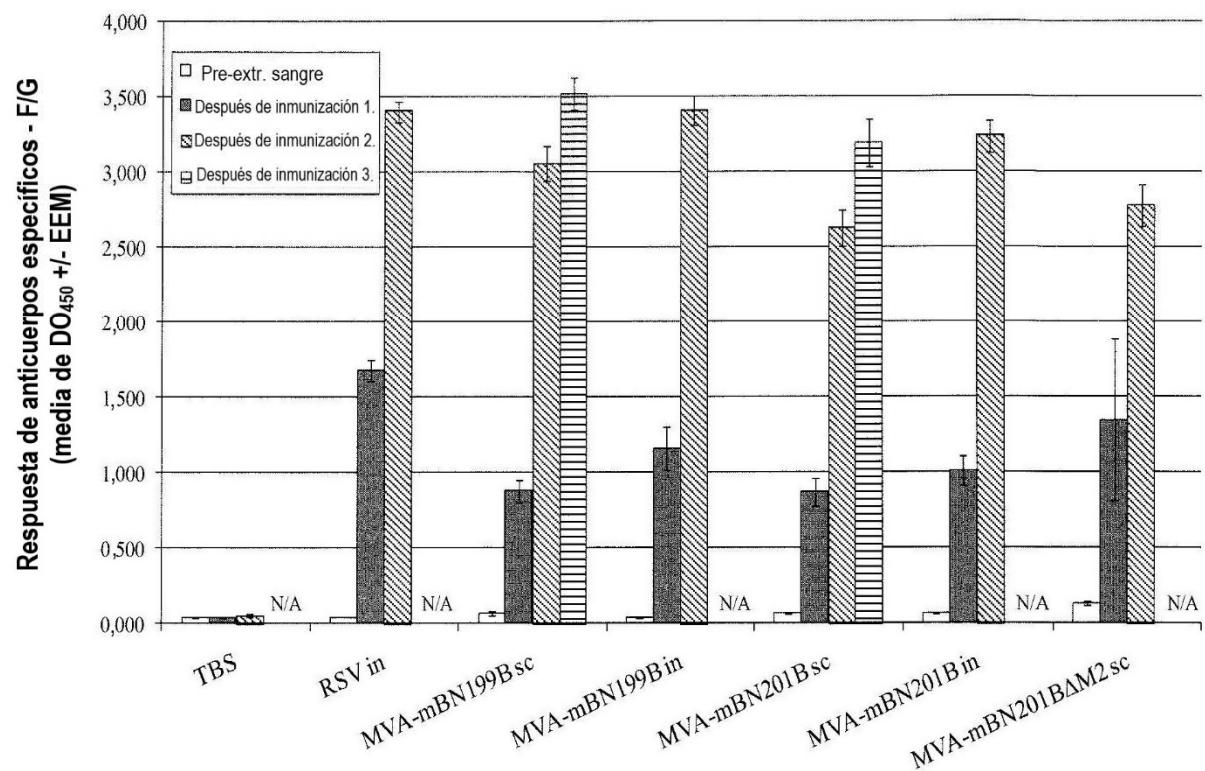
	aatttctcgtaaaagttagaa aatatattct aatttattgc acgg	104
	<210> 41	
	<211> 73	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Promotor sintético.	
	<400> 41	
	taaaaattga aaaaatattc taatttataag gacggtttg attttctttt tttctattct	60
	ataaataata aat	73
10	<210> 42	
	<211> 227	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Promotor sintético.	
	<400> 42	
	gttttgaaaa ttttttata ataaatatcc gtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat	60
	tgcacggtcc gtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat tgcacggtcc gtaaaaatt	120
	gaaaaactat tctaatttat tgcacggtcc gtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat	180
	tgcacggtcc gtaaaaatt gaaaaactat tctaatttat tgcacgg	227
	<210> 43	
	<211> 112	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Promotor sintético.	
	<400> 43	
25		
	tactaaaaaa ttgaaaataa atacaaggt tcttgagggt tgggtttaaat tgaaagcgag	60
	aaataatcat aaataatttc attatcgcgat tatccgttaa gtttgtatcg ta	112

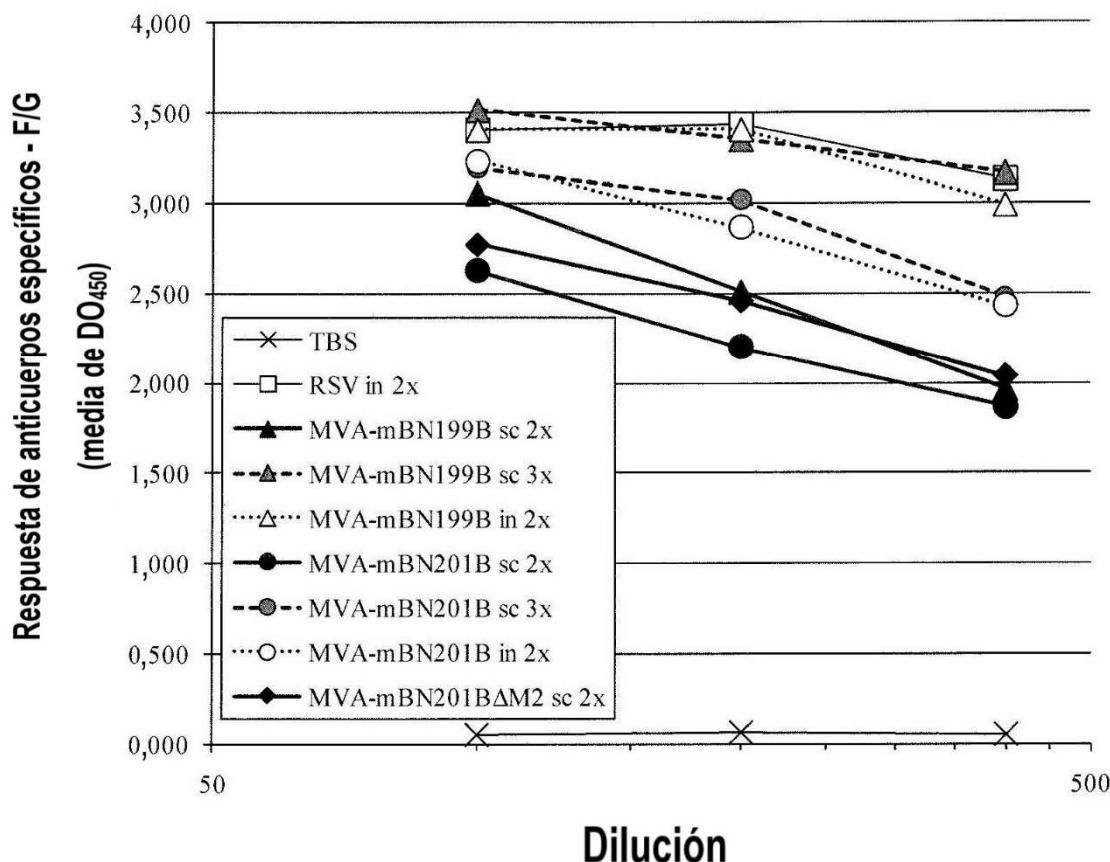
**REIVINDICACIONES**

1. Un virus vaccinia modificado de Ankara (MVA) recombinante que comprende:
  - (a) al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un determinante antigénico de una glucoproteína de membrana del virus respiratorio sincicial (VRS), en donde
- 5 la secuencia de nucleótidos codifica una glucoproteína de membrana F del VRS de longitud completa; y
  - (b) al menos una secuencia de nucleótidos que codifica determinantes antigénicos de la nucleocápside del VRS, en donde la secuencia de nucleótidos codifica tanto una proteína de la nucleocápside N del VRS de longitud completa como una proteína de la matriz M2 del VRS de longitud completa, que son codificadas por un único marco de lectura abierto, en donde
- 10 el único marco de lectura abierto comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 o comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 17;  
y que comprende, además:
  - (c) al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un determinante antigénico de una glucoproteína de membrana G del VRS, en donde la secuencia de nucleótidos codifica una glucoproteína de membrana G del VRS de longitud completa.
- 15
- 20 2. El MVA recombinante de la reivindicación 1, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la glucoproteína de membrana F del VRS es de la cepa A del VRS, preferiblemente de A2 y/o A<sub>long</sub>.
3. El MVA recombinante de la reivindicación 1 o 2, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la glucoproteína de membrana F del VRS comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5.
- 25 4. El MVA recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la glucoproteína de membrana G del VRS es de la cepa A del VRS, preferiblemente de la cepa A2 y/o B.
5. El MVA recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la glucoproteína de membrana G del VRS comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o comprende la secuencia de nucleótidos secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.
- 25 6. El MVA recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el MVA usado para generar el MVA recombinante es MVA-BN depositado en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) con el número V00083008.
- 30 7. Un MVA recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para usar para prevenir una infección por el VRS.
8. El MVA recombinante para usar de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el MVA recombinante se administra por vía intranasal y/o subcútanea, preferiblemente intranasal.

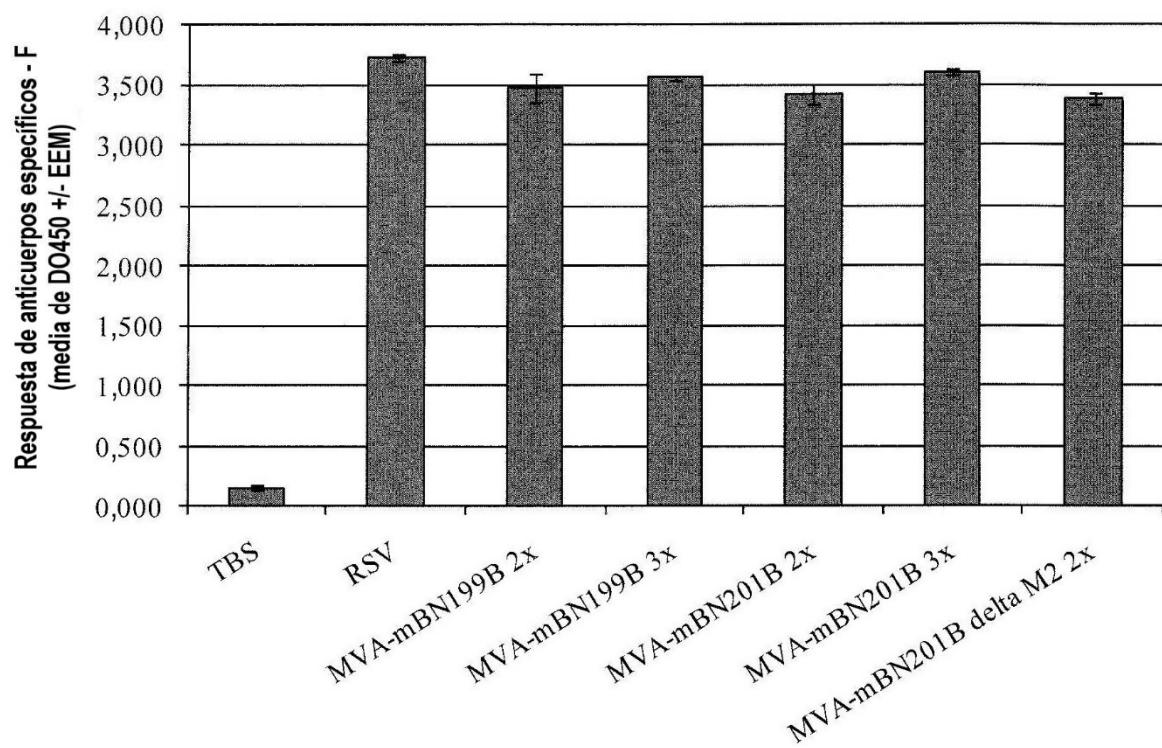
FIGURA 1

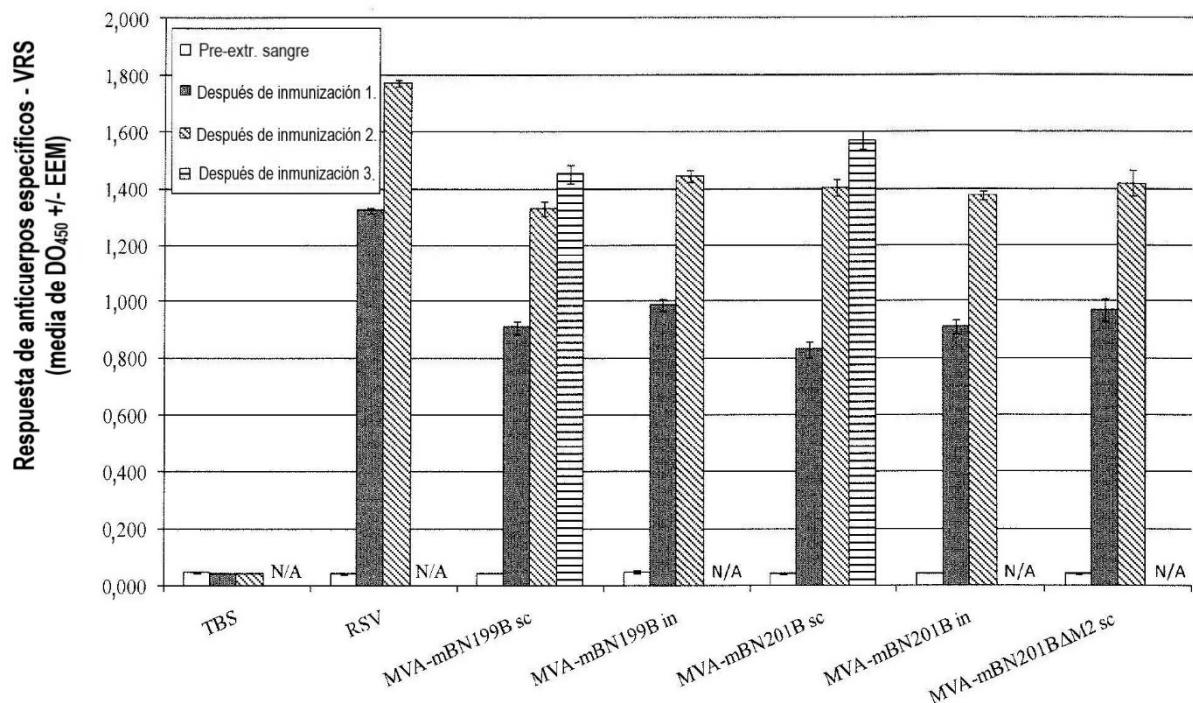


**FIGURA 2**

**FIGURA 3**

**FIGURA 4**



**FIGURA 5**

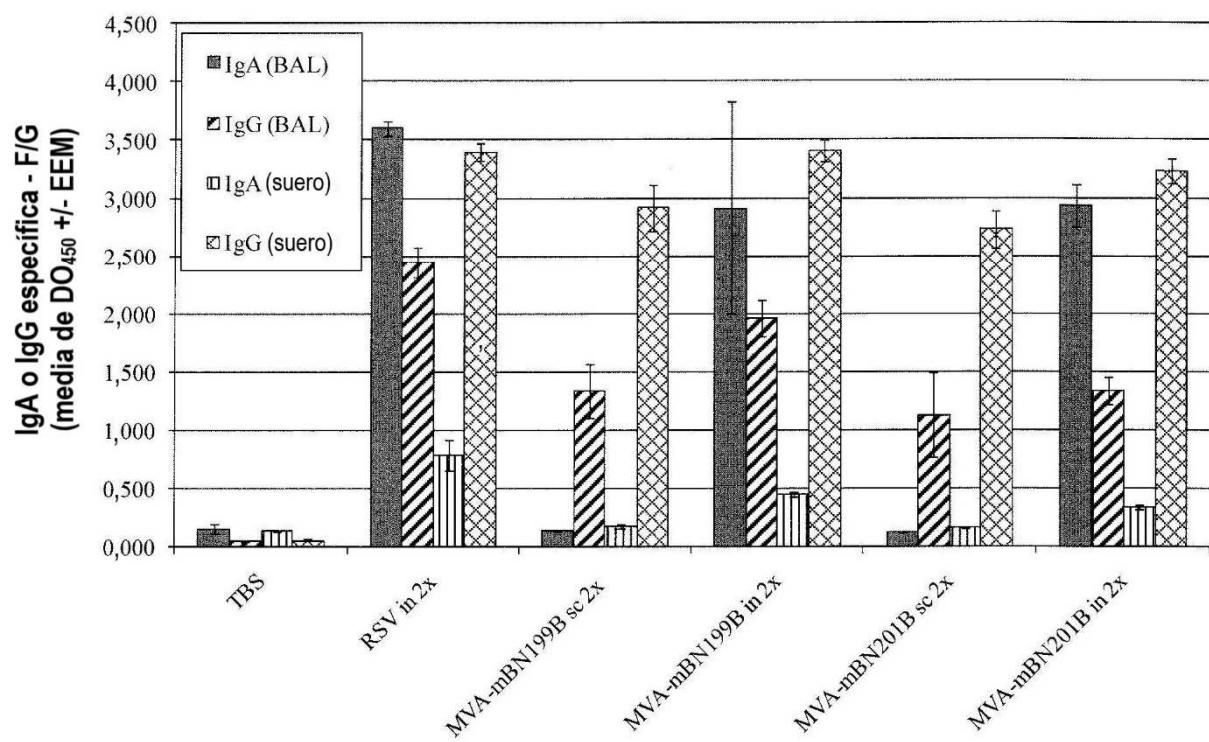
**FIGURA 6**

FIGURA 7

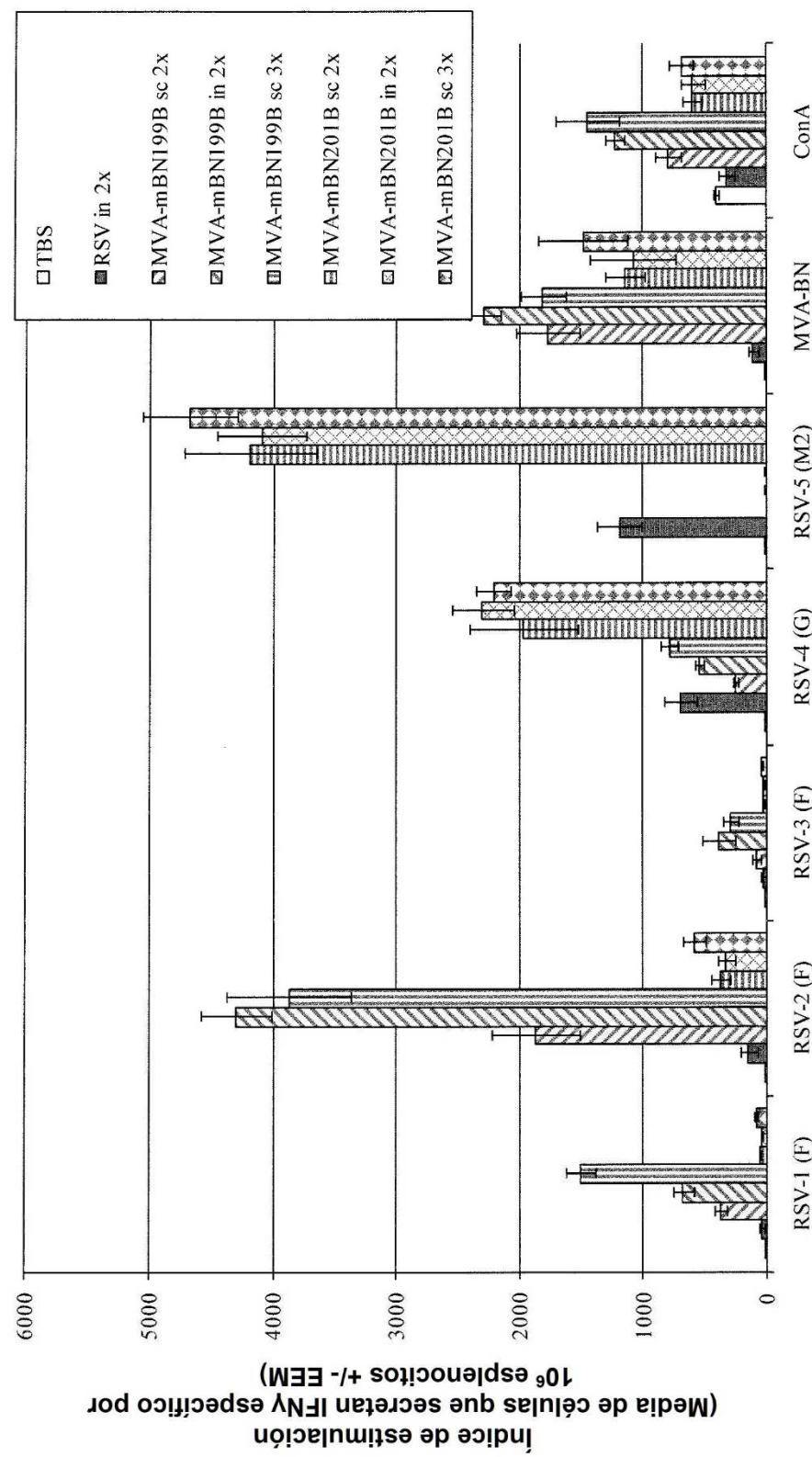
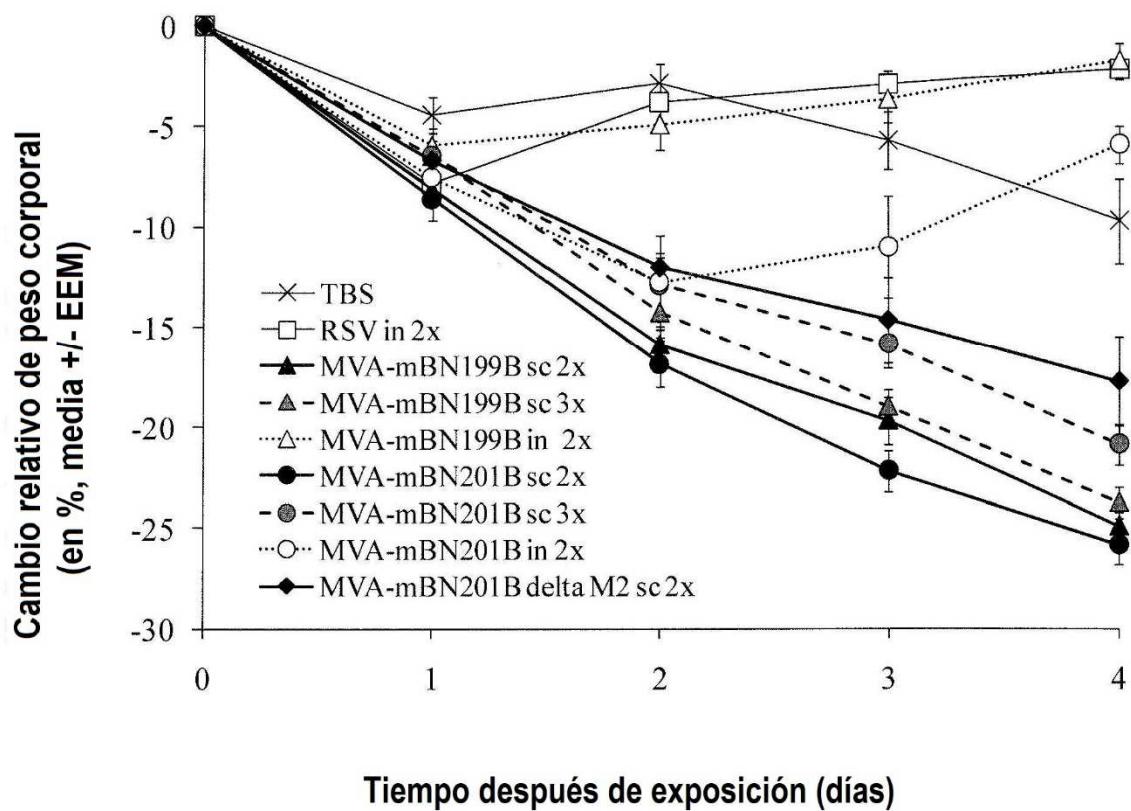
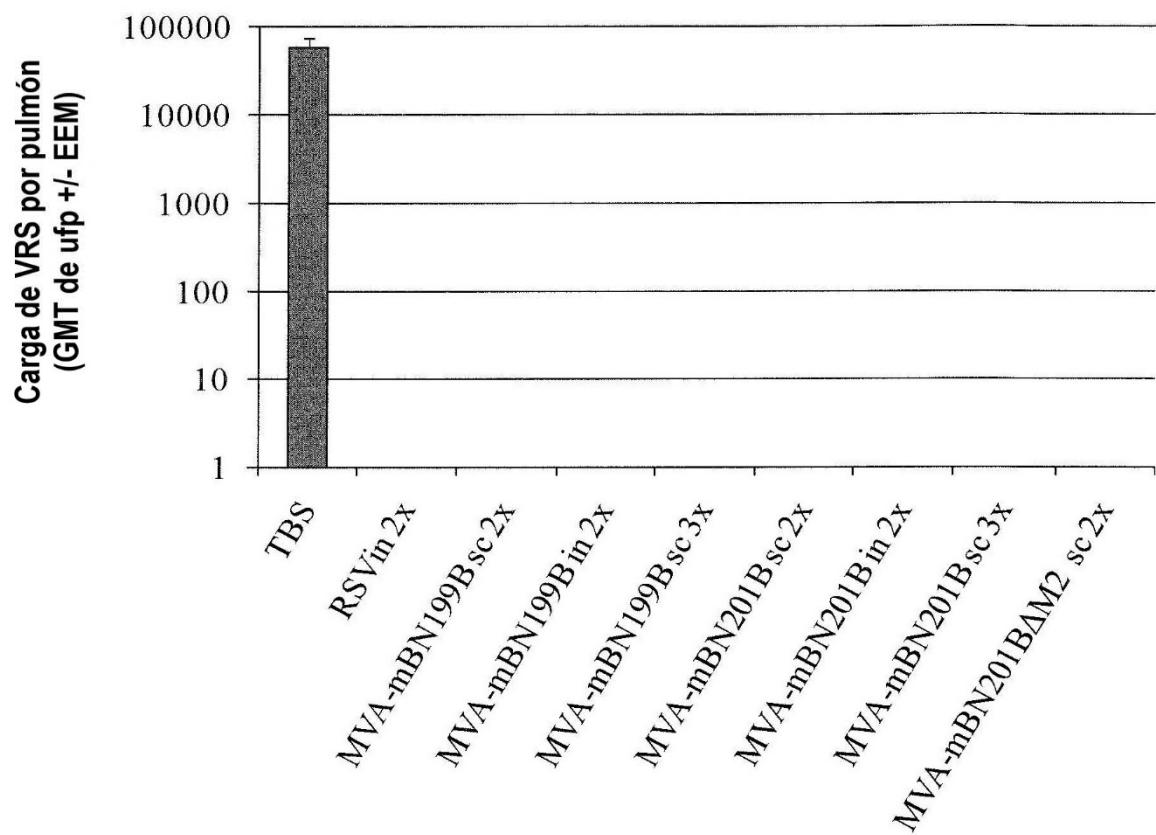
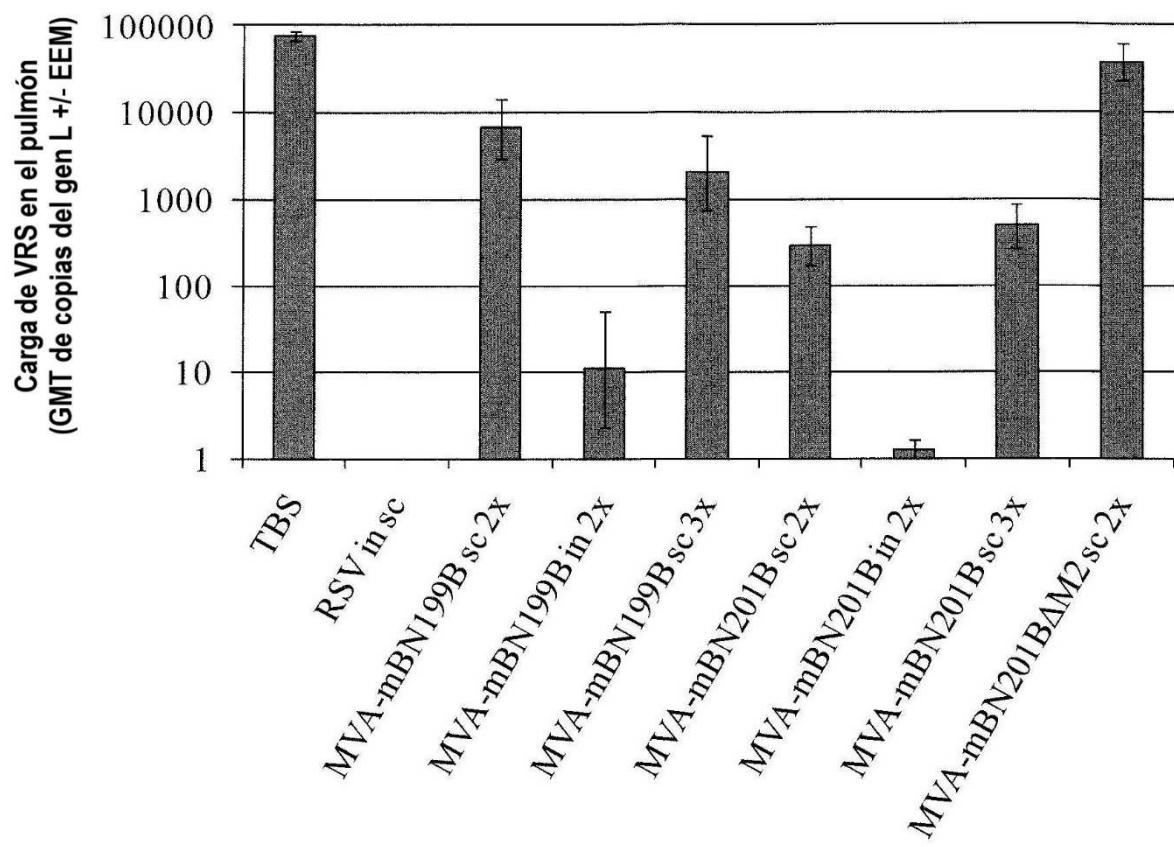


FIGURA 8

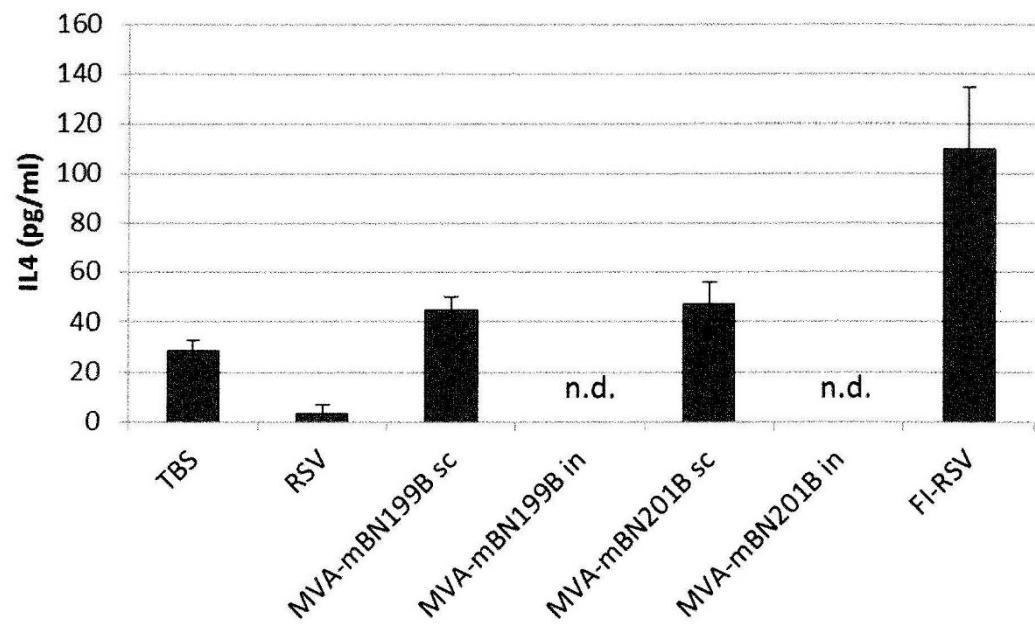


**FIGURA 9**

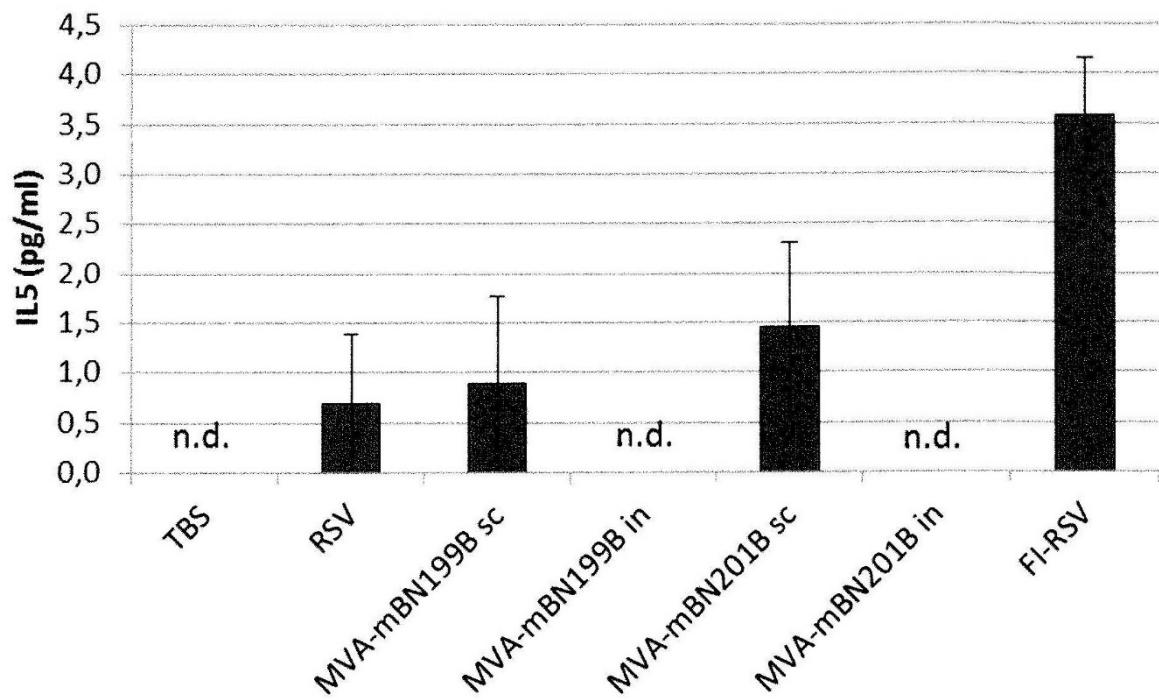


**FIGURA 10**

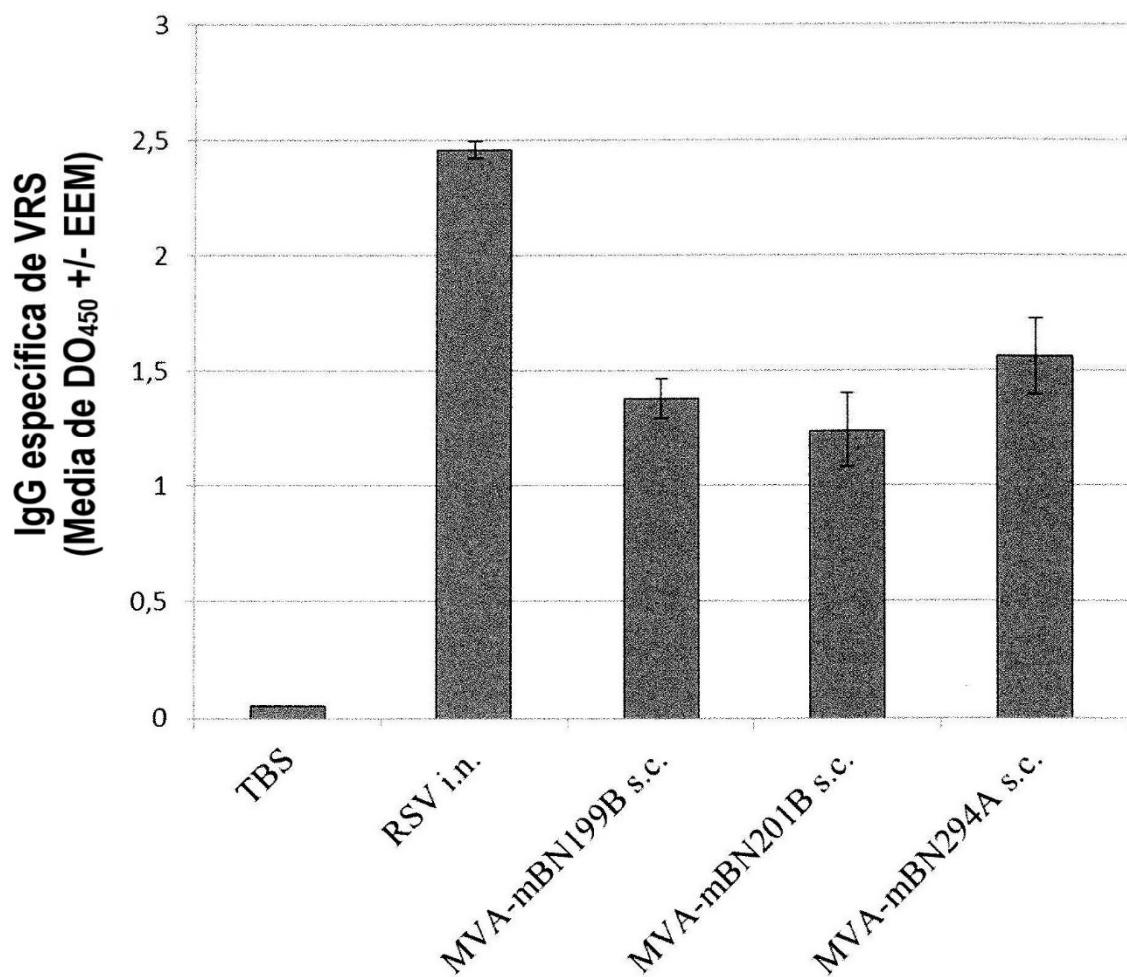
**FIGURA 11**

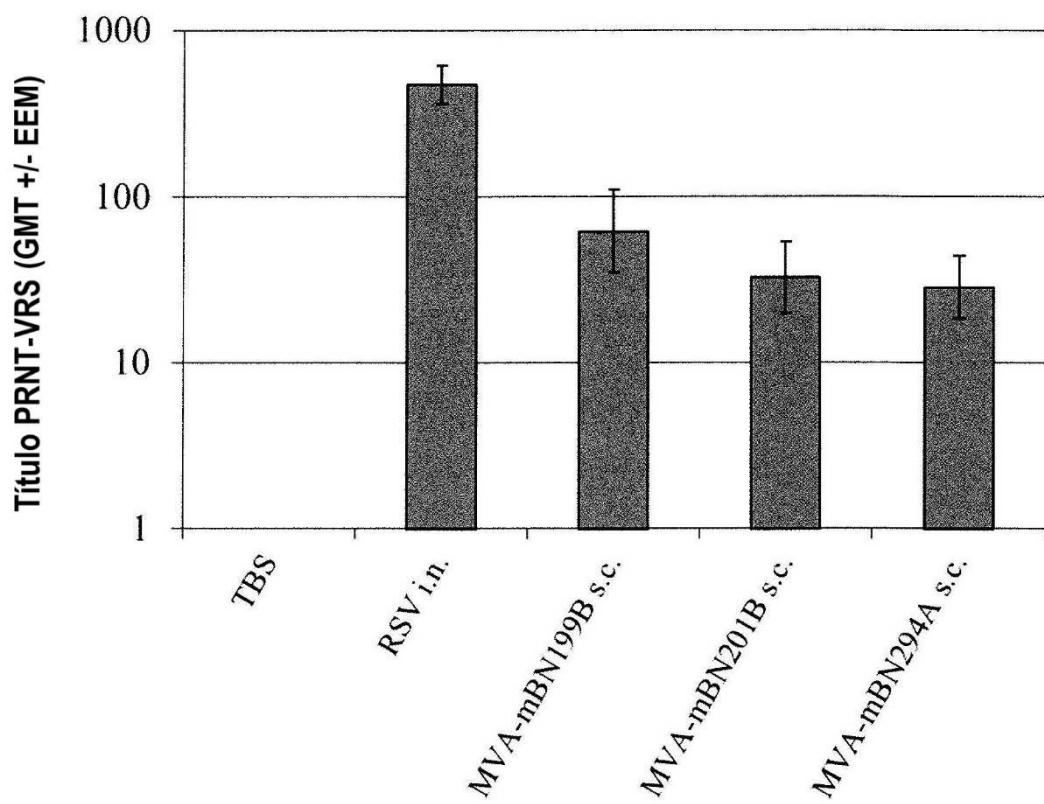


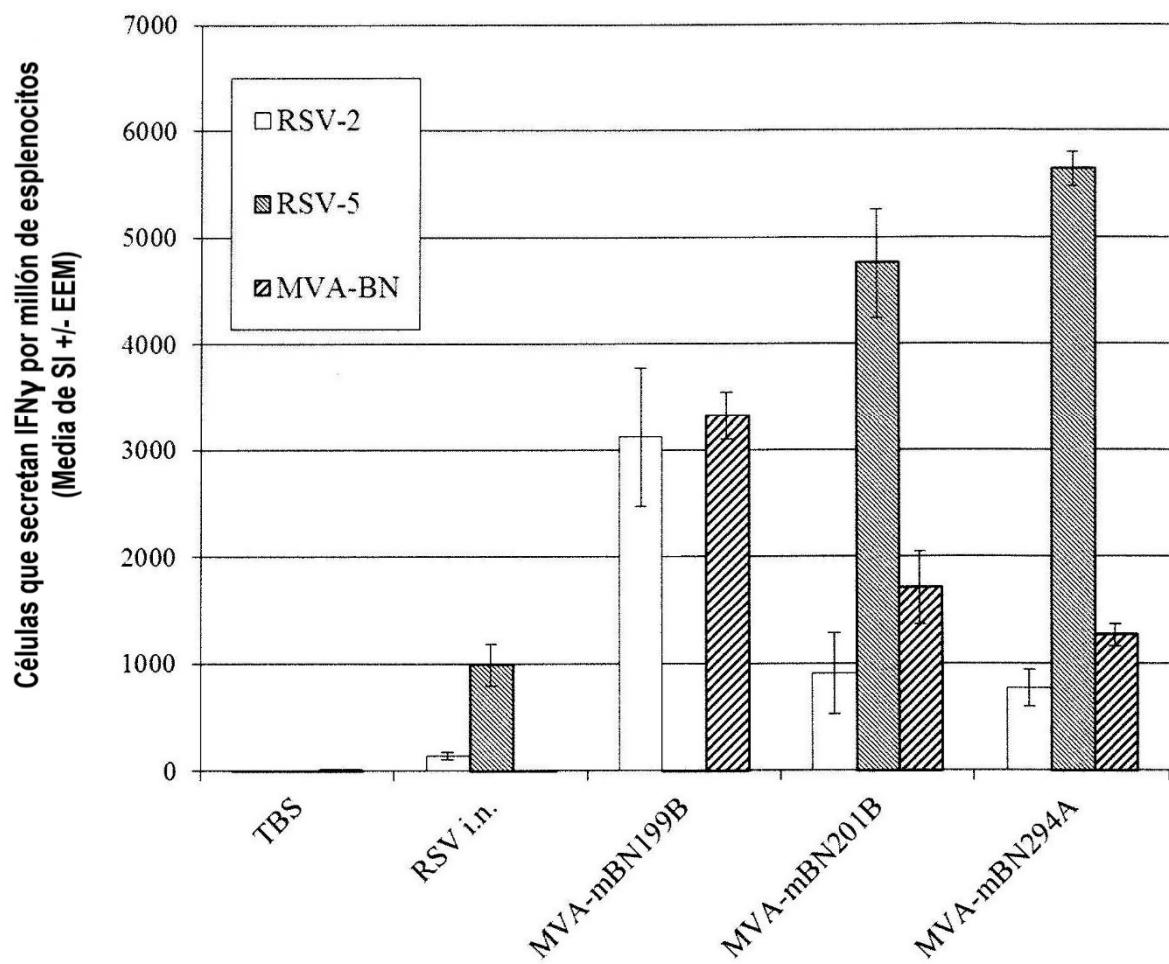
**FIGURA 12**



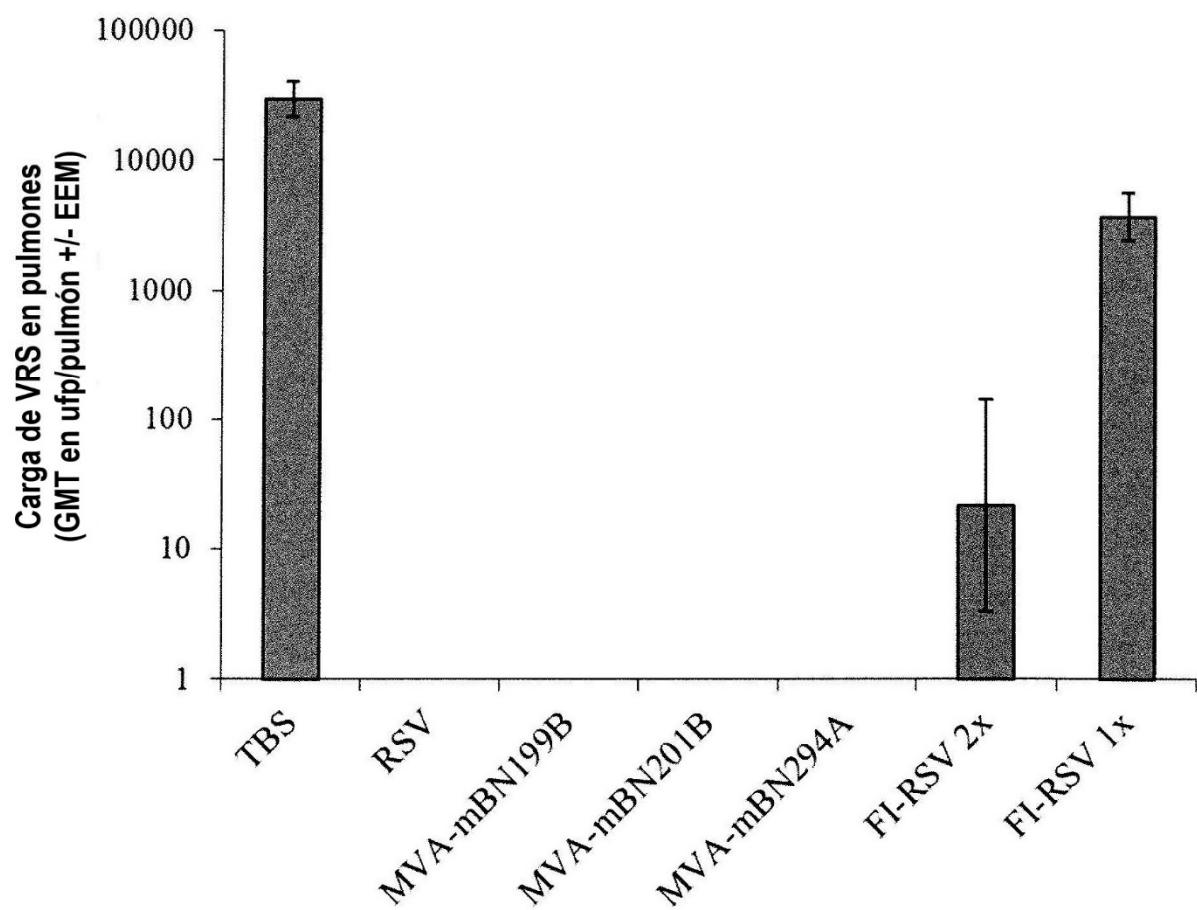
**FIGURA 13**



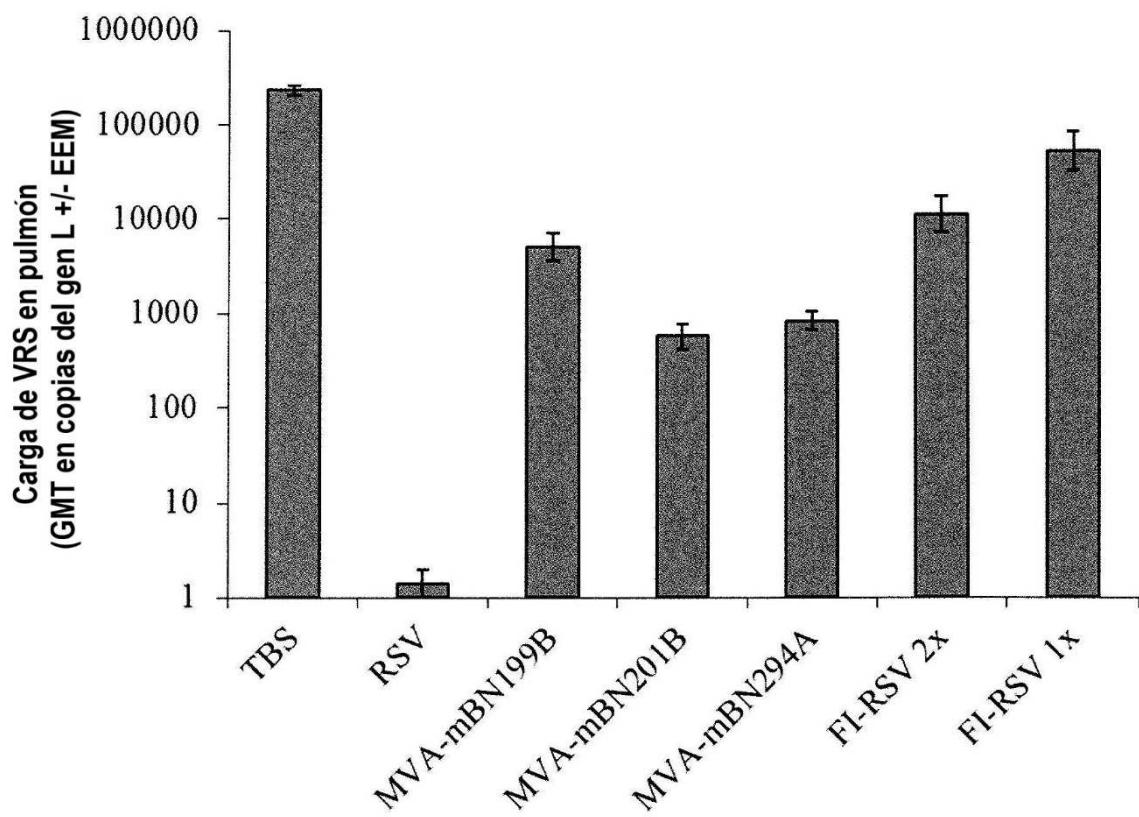
**FIGURA 14**

**FIGURA 15**

**FIGURA 16**



**FIGURA 17**



**FIGURA 18**