

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 703**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2014** **PCT/US2014/020690**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014** **WO14138209**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2014** **E 14759837 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018** **EP 2964769**

54 Título: **Vectores de citomegalovirus que permiten el control del direccionamiento de los linfocitos T**

30 Prioridad:

05.03.2013 US 201361772962 P

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

17.01.2019

73 Titular/es:

**OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY
(100.0%)
0690 SW Bancroft St.
Portland, OR 97239, US**

72 Inventor/es:

**PICKER, LOUIS;
HANSEN, SCOTT;
FRUEH, KLAUS y
MALOULI, DANIEL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 696 703 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

Vectores de citomegalovirus que permiten el control del direccionamiento de los linfocitos T

5 Antecedentes

Los linfocitos T CD8⁺ detectan los patógenos intracelulares mediante el reconocimiento mediado por el receptor de los linfocitos T (TCR) de péptidos cortos derivados del patógeno, seleccionados y transportados a la superficie celular por las proteínas del MHC de la clase I (MHC-I) y un exquisito sistema de muestreo peptídico y trasporte intracelular (Neeffjes ML *et al.*, Nat Rev Immunol 11, 823 (2011)). Aunque los patógenos pueden generar potencialmente muchos miles de péptidos diferentes con la longitud apropiada para su reconocimiento por parte de los linfocitos T CD8⁺, los requisitos para el procesamiento proteolítico, el transporte peptídico, la unión a los alomorfos disponibles del MHC-I y del repertorio de emparejamiento del TCR, así como los mecanismos inmunorreguladores poco conocidos, reducen estos candidatos a un puñado relativo de epítomos peptídicos que realmente sirven como objetivo para los linfocitos T CD8⁺ que comprenden las respuestas antipatógenas efectora y de memoria (Yewdell JW *et al.*, Immunity 25, 533 (2006); Irvine K *et al.*, Expert Rev Clin Immunol 2, 135 (2006); Assarsson E *et al.*, J Immunol 178, 7890 (2007). A pesar de la complejidad del proceso, las respuestas específicas al patógeno de los linfocitos T CD8⁺ creadas por los individuos con alelos compartidos del MHC-I tienden a reconocer un conjunto solapante de los denominados epítomos inmunodominantes (Yewdell *et al.*, 2006, *supra*; Irvine *et al.*, 2006, *supra*. Goulder PJ y Watkins DI, Nat Rev Immunol 8, 619 (2008)). Para la gran mayoría de los patógenos, las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ que se dirigen a dichos epítomos inmunodominantes son capaces tanto de reconocer las células infectadas por un patógeno como de crear eficaces respuestas antipatógenas efectoras y de memoria. Sin embargo, este no es el caso para los agentes con unas eficaces capacidades de evasión inmunitaria, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y su equivalente simio, el VIS. La replicación masiva de estos virus, combinada con su elevado índice de mutación y su plasticidad funcional, les permiten escapar de la mayoría de las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ (Picker U *et al.*, Ann Rev Med 63, 95 (2012)). De hecho, las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ en la mayoría de los sujetos infectados por estos virus no consiguen dirigirse a los epítomos que contienen las secuencias víricas críticas conservadas funcionalmente, y no controlan eficazmente la replicación vírica (McMichael AJ *et al.*, Nat Rev Immunol 10, 11 (2010). Aunque la vacunación contra estos virus puede aumentar en gran medida la magnitud de las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ después de una infección, estas respuestas mayores se dirigen a muchos de los mismos epítomos inmunodominantes que la infección en los sujetos no vacunados, y por lo tanto todavía están sujetos a una huida inmunitaria (Picker. 2012, *supra*; Barouch DH *et al.*, J Virol 77. 7367 (2003); Mudd PA *et al.*, Nature 491, 129 (2012)).

Hanson *et al.*, Science 340, 6135 (2013) desvelan vectores de citomegalovirus que violan los paradigmas de reconocimiento del epítomo de los linfocitos T CD8⁺. Hansen *et al.*, Science 328, 5974 (2012) desvelan un vector de CMV con un antígeno heterólogo y una delección en el gen US11 del CMV.

Aunque el campo de la vacuna contra el SIDA se ha esforzado por desarrollar estrategias capaces de desencadenar respuestas específicas de los linfocitos T CD8⁺ frente al VIH/VIS que se dirigen a epítomos "vulnerables" a través de los diversos haplotipos del MHC-I (bien mediante el aumento de la amplitud de reconocimiento o bien centrándose en las respuestas frente a las secuencias conservadas), este esfuerzo no ha producido, hasta la fecha, unas estrategias capaces de modificar sustancialmente las jerarquías de inmunodominancia de los linfocitos T CD8⁺ ni ha conseguido el objetivo de establecer respuestas protectoras de los linfocitos T CD8⁺ en la mayoría de los individuos.

45 Sumario

Se ha creado una estrategia de vacuna contra el VIH/SIDA usando un citomegalovirus recombinante (CMV) que expresa una proteína del VIH en forma de un vector persistente para generar y mantener unas respuestas de los linfocitos T de memoria efectora específicas contra el VIH que interpretarían la infección del VIH antes de la amplificación vírica necesaria para una eficiente evasión inmunitaria (Picker, 2012, *supra*). Aunque esta metodología no estaba diseñada para prevenir una infección, se demostró que tenía mucho éxito en modelos animales de VIH/SIDA manifestando aproximadamente un 50 % de los macacos rhesus (MR) vacunados con el vector de CMV/VIS expuestos a un VIS muy patógeno, un inmediato, riguroso y duradero control virológico (Hansen, 2011 *infra*).

Durante el transcurso de estos estudios, se observó que los vectores de CMV/VIS no desencadenaban las típicas respuestas inmunodominantes de los linfocitos T CD8⁺ frente a los péptidos del VIS presentados por la bien conocida proteína del MHC-I Mamu-A1*001:01 (A*01), lo que sugiere que los vectores de CMV inducen nuevos epítomos a los que los linfocitos T dirigen estas respuestas eficaces, y estas nuevas respuestas contribuían a la eficacia de la vacuna.

En el presente documento se divulga que los antígenos heterólogos, tales los víricos y los bacterianos expresados por vectores de citomegalovirus, inducen un perfil de inmunodominancia en el linfocito T que es fundamentalmente diferente al inducido por todos los demás vectores conocidos. Mediante el uso de macacos rhesus (MR) infectados por el CMV rhesus (RhCMV) portador de antígenos del VIS como un modelo animal del CMV humano, se demostró

que las respuestas de los CD8⁺ específicas de SIVgag desencadenadas por el vector RhCMV/gag son tres veces más amplias que las respuestas específicas de gag de los linfocitos T CD8⁺ desencadenadas por otras vacunas o tras la infección por el VIS. Adicionalmente se demostró que, en comparación con otras vacunas, los linfocitos T desencadenados por el CMV se dirigen en unos epítomos totalmente diferentes que incluyen un elevado porcentaje de los epítomos presentados por el MHC de la clase II (MHC-II). Dichas respuestas raramente se observan, si es que se observan, en las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ frente a cualquier otro agente infeccioso o vacuna. Además, se divulga que el perfil de inmunodominancia está bajo el control genético del CMV. Específicamente, se ha demostrado que los genes del CMV UL128 y UL130 impiden la inducción de esta respuesta. Cuando están presentes el UL128 y el UL130 en el vector de CMV, las respuestas de los linfocitos T se centran en un conjunto limitado de epítomos, mientras que se inducen linfocitos T CD8⁺ restringidos por el MHC-II por parte de vectores que carecen del UL128 o del UL130. Estos hallazgos permiten, por primera vez, la capacidad de manipular genéticamente un vector de vacuna para conseguir unos patrones característicos de reconocimiento de epítomo de los linfocitos T CD8⁺.

En el presente documento se divulgan vectores de CMV que comprenden: un antígeno proteico heterólogo, una proteína UL131 activa (o un ortólogo de la misma), una proteína UL128 activa (o un ortólogo de la misma), pero en los que el vector de CMV carece de una proteína UL130 activa. En el presente documento también se divulgan vectores de CMV que comprenden: un antígeno proteico heterólogo, una proteína UL131 activa (o un ortólogo de la misma), una proteína UL130 activa (o un ortólogo de la misma), pero en los que el vector de CMV carece de una proteína UL128 activa.

En el presente documento también se divulga una composición para su uso en la inmunización de un sujeto frente a un antígeno específico de un patógeno o de un cáncer, en la que la composición comprende un primer CMV que comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un primer antígeno heterólogo, una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una UL130 activa o un ortólogo de la misma, una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína UL131 activa o un ortólogo de la misma; en los que el primer vector de citomegalovirus no codifica una proteína UL128 activa.

Breve descripción de los dibujos

Algunas de las gráficas y las representaciones incluidas en el presente documento pueden comprenderse mejor mediante el uso del color, que no está disponible en una publicación de solicitud de patente. Los solicitantes consideran todas las imágenes y las gráficas originalmente divulgadas (tanto en color como no) parte de la divulgación original, y se reservan el derecho de presentar las gráficas y las representaciones en color de las figuras descritas en el presente documento en procedimientos posteriores.

La Figura 1A es un mapa de epítomos de las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ a los péptidos de MR tratados según se indica. Se cartografiaron los epítomos de las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ frente a SIVgag usando una tinción de citocina intracelular por citometría de flujo (ICS) para detectar el reconocimiento de 125 péptidos gag consecutivos de 15 mer (con un solapamiento de 11 aminoácidos entre cada péptido consecutivo) en macacos rhesus (MR) vacunados con vectores RhCMV/gag (n = 14). Los vectores RhCMV/gag usados en estos experimentos derivaban de la cepa 68.1 que, debido a delecciones génicas, no expresa los homólogos de RhCMV del UL128 y del UL130. El RhCMV/gag derivado de un cromosoma bacteriano artificial (BAC) (*) carece adicionalmente de un homólogo funcional del UL36, que está intacto en un RhCMV/gag(L) no derivado de un BAC (**). Adicionalmente se analizaron los MR que habían sido vacunados con vectores electroporados de ADN/gag + IL-12 (n = 4), con vectores Ad5/gag (n = 3) y con vectores MVA/gag (n = 3) o infectados por el VIS (n = 5; cargas víricas plasmáticas < 50.000 copias/ml).

Los péptidos que dieron como resultado unas respuestas de los linfocitos T CD8⁺ por encima del fondo están indicados con un recuadro coloreado, con el número total de estas respuestas positivas y el número mínimo de epítomos independientes potencialmente contenidos en estos péptidos reactivos en cada MR indicado a la derecha (el último mediante el uso de un cálculo que tiene en cuenta el hecho de que un único epítomo puede estar representado en 15 mers adyacentes). Tanto el número de péptidos positivos como el número mínimo de epítomos distintos por sujeto son significativamente mayores (p < ,0001) en los MR vacunados con RhCMV/gag que en los MR agrupados con respecto a los otros grupos, pruebas de la suma de rangos bilateral de Wilcoxon.

La Figura 1B es dos conjuntos, cada conjunto consiste en una lista de péptidos y dos gráficos de barras que resumen la determinación de los epítomos centrales CD8⁺ de dos péptidos de 15 mer seleccionados a los que se dirigen los linfocitos T CD8⁺ derivados de los MR vacunados con el RhCMV/gag de la cepa 68.1. Estos epítomos se determinaron mediante una ICS con un análisis citométrico de flujo de la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ a los péptidos truncados indicados en las listas de péptidos. Las figuras muestran algunos ejemplos representativos de los 2 patrones de respuesta observados junto con los conjuntos de péptidos truncados: de tipo 1 (rojo), con una pérdida abrupta del pico del grado de respuesta y un epítomo central de 9 mer, y de tipo 2 (azul), con una pérdida gradual del pico del grado de respuesta y un epítomo central de 12 mer.

La Figura 1C es un conjunto de siete representaciones que representan las frecuencias de respuesta de los linfocitos T CD8⁺ frente a los péptidos parentales de 15 mer con respecto a las de los péptidos centrales derivados de los 15 mers, según se muestra en la Figura 1B. Las respuestas se compararon mediante una ICS citométrica de flujo en 9 MR para cada respuesta.

La Figura 1D es un conjunto de dos gráficos de barras que muestran las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ frente a los epítomos centrales seleccionados de SIVgag (azul y rojo), así como a los de 15 mers de SIVgag seleccionados adicionales (gris). Las respuestas de los CD8⁺ fueron evaluadas mediante una ICS citométrica de flujo en 42 MR vacunados con el vector RhCMV/gag de la cepa 68.1 deficiente en UL128 y en UL130. Los MR vacunados con el CMV se muestran en el panel izquierdo, y los 40 MR infectados con el VIS se muestran en el panel derecho en forma del % de los MR en cada categoría con unas respuestas detectables a estos péptidos.

La Figura 2A es un gráfico de barras que representa los resultados de la estimulación de PBMC de MR vacunados con el RhCMV/gag de la cepa 68.1 con los péptidos indicados ($n = 8$ para Gag₂₁₁₋₂₂₂, Gag₂₇₆₋₂₈₄, Gag₂₉₀₋₃₀₁, Gag₄₈₂₋₄₉₀, Gag₄₉₅₋₅₀₆; $n = 5$ para Gag₄₁₋₅₂, Gag₂₅₉₋₂₆₇). Las células fueron estimuladas con los epítomos centrales de SIVgag indicados (clasificados previamente como de tipo 1 frente al tipo 2 por la longitud del epítomo central, según se muestra en la Figura 1B) en presencia AcMc de control de isotipo irrelevantes (IgG1 - clon X40 + IgG2a - clon X39; 10 μ g de cada uno), un AcMc anti-MHC-I (w6-32; 10 μ g), un AcMc anti-MHC-II (G46-6; 10 μ g) o el péptido CLIP (cadena invariante asociada al MHC-II, aminoácidos 89-100; 2 μ g). Las frecuencias de respuesta se normalizaron a las frecuencias de respuesta en los cultivos tratados con el control de isotipo y se muestra la media + EEM de estas frecuencias de respuesta normalizadas para cada tratamiento. Nótese que las respuestas frente a los 3 epítomos clasificados como de tipo 1 sólo fueron bloqueadas con el AcMc anti-MHC-I y los 4 epítomos clasificados como de tipo 2 sólo fueron bloqueados con el AcMc anti-MHC-II y el péptido CLIP.

La Figura 2B es una representación del número de epítomos de SIVgag por MR de los tipos indicados (bloqueado por el MHC-I, bloqueado por el MHC-II o indeterminado) resultante de los MR inmunizados según se indica en el eje X. Las respuestas frente al péptido de 15 mer del SIVgag descritas en la Fig. 2A se sometieron a un bloqueo por el MHC-I (AcMc w6-32) frente al del MHC-II (AcMc G46-6) y se clasificaron como bloqueadas por el MHC-I, bloqueadas por el MHC-II o indeterminada. Para cada MR se muestra el número medio de respuestas específicas al péptido en cada categoría, clasificadas según el tipo de vacuna.

La Figura 2C es un mapa de epítomos de las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ derivados de MR vacunados con el RhCMV/gag de la cepa 68.1 según si la respuesta era inhibida o no por el bloqueo del MHC-I o del MHC-II. Se muestra la sensibilidad de cada respuesta al péptido SIVgag en 11 MR vacunados con el RhCMV/gag de la cepa 68.1 frente al bloqueo por el MHC-I (recuadros rojos) con respecto al bloqueo por el MHC-II (recuadros azules) (los recuadros blancos indican indeterminado), con el número mínimo de epítomos independientes en las categorías asociadas del MHC-I y del MHC-II indicado a la derecha.

La Figura 3A es un conjunto de representaciones de las FACS de las PBMC procedentes de un MR vacunado con RhCMV/gag (Rh22034). Los vectores de CMV que inducen unos linfocitos T que reconocen el mismo péptido presentado por diferentes alelos del MHC ("supertopos") se incubaron en células de MR3 con el péptido SIVgag pulsado (y se lavaron) (línea celular parental MHC-II *null*) frente a los transfectantes de MR3 que expresan moléculas individuales de Mamu DR, y después se evaluó el reconocimiento específico del péptido por parte de los linfocitos T CD8⁺ usando una ICS citométrica de flujo para detectar la inducción del IFN- γ y/o la producción del TNF- α (las frecuencias de respuesta están indicadas en cada cuadrante). Las moléculas de Mamu DR ensayadas incluían cuatro que son expresadas por Rh22034 (DRB1*0309, DRB1*0406, DRB5*0301 y DRB*w201), y una que no es expresada (DRB*w4:01). Los péptidos de 15 mer del SIVgag ensayados se correspondían con los epítomos conocidos de los linfocitos T CD8⁺ bloqueados por el MHC-II en este MR excepto para el Gag273-287 (15 mer #69), que era bloqueado por el MHC-I y por lo tanto usado como control negativo.

La Figura 3B es un conjunto de representaciones de las FACS de un análisis similar (al de la Figura 3A) de la presentación del Gag141-155 (15 mer #36) de los linfocitos T CD8⁺ de Rh22034 y de Rh21836 mediante células autólogas linfoblastoides B. Las células parentales MHC-II *null* y los transfectantes individuales de MHC-II se corresponden con los alelos de Mamu-DRB que son expresados recíprocamente por estos 2 MR (los alelos expresados están indicados en rojo, los no expresados en negro).

La Figura 4A es una representación que muestra las diluciones sucesivas de log₁₀ de 4 péptidos centrales (óptimos) de SIVgag (2 de cada restringidos por el MHC-I y por el MHC-II) partiendo de la concentración convencional de péptido de 2 μ g por prueba. Los péptidos se usaron para estimular las PBMC procedentes de los MR vacunados con el RhCMV/gag de la cepa 68.1 ($n = 5$) y la respuesta a cada dilución de péptido se determinó mediante una ICS citométrica de flujo. La frecuencia de linfocitos T CD8⁺ respondedores (positivos para TNF- α y/o para IFN- γ) en cada dilución se normalizó a la respuesta de la concentración convencional de péptido. La figura muestra la media + EEM de las respuestas normalizadas para cada epítomo.

La Figura 4B es una representación que muestra las respuestas de los linfocitos sanguíneos periféricos T CD8⁺ frente a mezclas totales de 15 mer de SIVgag y a 4 péptidos centrales (óptimos) del supertopo de SIVgag (2 de cada restringidos por el MHC-I y por el MHC-II). Las respuestas se cuantificaron mediante una ICS citométrica de flujo después de la vacunación con el RhCMV/gag de la cepa 68.1 (media + EEM; $n = 24$) para demostrar la cinética relativa de la inducción de las respuestas al supertopo restringidas por el MHC-I frente al MHC-II.

La Figura 4C es un gráfico de barras que muestra las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ frente a 2 péptidos centrales (óptimos) del supertopo de SIVgag restringidas por el MHC-I. Las respuestas se cuantificaron mediante una ICS citométrica de flujo en preparaciones de células mononucleares procedentes de los tejidos indicados durante la necropsia de los MR vacunados con el vector RhCMV/gag de la cepa 68.1 (media + EEM; $n = 4$).

La Figura 4D es un gráfico de barras que muestra las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ frente a 2 péptidos centrales (óptimos) del supertopo de SIVgag restringidas por el MHC-II. Las respuestas se cuantificaron mediante una ICS citométrica de flujo en preparaciones de células mononucleares procedentes de los tejidos indicados durante la necropsia de los MR vacunados con el vector RhCMV/gag de la cepa 68.1 (media + EEM; $n = 4$).

La Figura 4E es un gráfico de barras de las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ de las PBMC procedentes de MR vacunados con el RhCMV/gag de la cepa 68.1 (n =14). Las células fueron estimuladas con mezclas totales de 15 mer de SIVgag o con los péptidos centrales (óptimos) del supertopo de SIVgag restringidos por el MHC-I con respecto al MHC-II con respecto al mostrado, y se determinó la expresión del CD28 frente al CCR7 en las células respondedoras (positivas TNF- α y/o IFN- γ) mediante una ICS citométrica de flujo que permite el trazado de la proporción media ($\pm$ EEM) de las células respondedoras que manifiestan los fenotipos indicados TCM/TEM1/TEM2.

La Figura 4F es un gráfico de barras de las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ de las PBMC procedentes de MR vacunados con el RhCMV/gag de la cepa 68.1 (n =14). Las células fueron estimuladas con mezclas totales de 15 mer de SIVgag o con los péptidos centrales (óptimos) del supertopo de SIVgag restringidos por el MHC-I frente a MHC-II con respecto al mostrado (frente a ningún péptido) y se determinaron las frecuencias de las células en el compartimento de memoria de los CD8⁺ que producen la citocina indicada o que manifiestan una desgranulación (externalización del CD107). La figura muestra la media ($\pm$ EEM) de estas frecuencias de respuesta después de restar el fondo.

La Figura 5A es un conjunto de perfiles citométricos de flujo representativos de los linfocitos T CD8⁺ en las PBMC procedentes de MR sin vacunar infectados de forma natural con RhCMV (cepa circulante en la colonia) con respecto a MR vacunados con el vector RhCMV/VIS de la cepa 68.1 que responde a los péptidos de 15 mer consecutivos (solapamiento de 11 aminoácidos) que comprende la proteína RhCMV IE1 en presencia de un control de isotipo con respecto a los AcMc anti-MHC-I de bloqueo con respecto al anti-MHC-II de bloqueo. La Figura 5B es un gráfico de barras que compara la sensibilidad de los linfocitos T CD4⁺ específicos de IE1 y los CD8⁺ con respecto a los MR infectados de forma natural por el RhCMV o a los vacunados con el vector RhCMV/VIS de la cepa 68.1 (n = 4 por grupo) con los AcMc anti-MHC-I de bloqueo con respecto al anti-MHC-II de bloqueo.

La Figura 5C es un mapa de epítomos de las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ frente al RhCMV IE1 en MR infectados de forma natural por el RhCMV y vacunados con el vector RhCMV/VIS de la cepa 68.1 (n = 4 cada uno). Se cartografiaron los epítomos de las respuestas para determinar el reconocimiento de 137 péptidos consecutivos de 15 mer de IE1 y después se clasificó la asociación del MHC de cada respuesta mediante el bloqueo del MHC-I con respecto al del MHC-II.

La Figura 5D es un conjunto de gráficos de barras que ilustran las respuestas en el pico de la fase aguda de los linfocitos T CD8⁺ en sangre con una mezcla de SIVgag de 15 mer de cada uno de los 5 supertopos universales asociados al vector RhCMV/gag, y en los 2 MR Mamu A*01+, cada uno de los epítomos SIVgag canónicos indicados restringidos por este alelo. Se muestran las respuestas en 6 MR vacunados con un vector RhCMV/gag de la cepa 68.1 en el que se ha restaurado la expresión de los ortólogos de RhCMV de los genes UL130-128 del HCMV (Rh157.4 y 157.5) (el RhCMV/gag reparado derivaba del RhCMV-68-1.2 según describen Lilja AE y Shenk T. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 19950-19955 (2008)).

La Figura 5E es una comparación de la sensibilidad de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos de VIS-gag procedentes de MR vacunados con el vector RhCMV/VIS de la cepa original 68.1 con respecto al vector RhCMV/gag reparado con Rh157.4-.5 (UL128-130) (n = 6 por grupo) con el bloqueo con los AcMc anti-MHC-I con respecto a los anti-MHC-II.

La Figura 5F es una comparación de las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ a SIVgag en 3 MR vacunados con el vector RhCMV/gag reparado con Rh157.4-.5 (UL130-128). Se cartografiaron los epítomos de las respuestas y después se clasificó la asociación del MHC de cada respuesta mediante el bloqueo del MHC-I frente al del MHC-II. No se detectaron respuestas bloqueadas por el MHC-II.

La Figura 6 es un conjunto de tres representaciones que muestran el porcentaje de respuesta de los linfocitos T CD8⁺ específicos de SIVgag en el subconjunto de linfocitos T de memoria para dos MR vacunados con un vector que carece del UL128 pero con un UL130 y un UL131 activos (izquierda); un vector que carece del UL130 pero con un UL128 y un UL131 activos (centro); y un vector con un UL128 activo y un UL130 activo pero que carece de un UL131 activo (derecha). El vector que carece del UL131, pero con el UL128 y el UL130, no dio como resultado ninguna respuesta inmunitaria de los CD8⁺ (Figura 6 a la derecha).

La Figura 7 es un conjunto de dos mapas de epítomos similares a los de las anteriores Figuras 1A, 2C y 5C que muestra la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ a los péptidos individuales en un conjunto de aproximadamente 25 15 mer solapantes que se corresponden con la porción amino terminal del SIVgag en las PBMC procedentes de dos MR vacunados con un vector RhCMVgag que carece del UL128 (pero con un UL130 y un UL131 activos) o un vector RhCM-Vgag que carece del UL130 (pero con un UL128 y un UL131 activos). Para determinar si los péptidos eran presentados por el MHC de la clase I o por el MHC de la clase II se llevó a cabo una estimulación de los linfocitos T en presencia de anticuerpos específicos del MHC- I o del MHC-II. Las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ que fueron inhibidas por los anticuerpos específicos del MHC-I o del MHC-II se muestran en rojo o en azul, respectivamente. Estos resultados demuestran que los vectores que carecen bien del UL128 o bien del UL130 inducen unos linfocitos T CD8⁺ restringidos por el MHC-II.

La Figura 8 es un conjunto de dos mapas de epítomos que muestra la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ en presencia de anticuerpos de bloqueo del MHC-I o del MHC-II frente a los péptidos individuales en un conjunto de 75 péptidos de 15 mer solapantes que se corresponden con Ag85B y 22 15 mers solapantes que se corresponden con ESAT-6 en las PBMC de tres MR inmunizados con los vectores de RhCMV Δ UL128-UL130 (68-1) que comprenden los antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B y ESAT-6. Los resultados demuestran que los vectores de RhCMV son capaces de inducir unos linfocitos T CD8⁺ restringidos por el MHC-II frente a los antígenos bacterianos.

La Figura 9 muestra que la inoculación secuencial con un vector de RhCMV/gag que carece de UL128 y de UL130 (68-1) y un vector de RhCMV/gag reparado que contiene los UL128 y UL130 activos (68-1.2) aumenta la cobertura de epítipo de un antígeno heterólogo (SIVgag). El panel superior muestra la frecuencia con respecto al tiempo de los linfocitos T CD8⁺ específicos de SIVgag presentes en el conjunto de los linfocitos T de memoria de dos MR vacunados previamente (< 1 año antes) con el RhCMV/SIVgag (68-1) y revacunados con el RhCMV/SIVgag (68-1) el día 1 y vacunados después el día 237 con el RhCMV/SIVgag (68-1.2). Las respuestas específicas al SIVgag se midieron mediante una citometría de flujo de ICS usando un conjunto de péptidos de 15 mer solapantes (línea verde) o los péptidos individuales (líneas rojas). Nótese que la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ totales al SIVgag aumentó después de la revacunación tanto con el vector derivado de 68-1 como con el vector derivado de 68-1.2, mientras que la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ a los péptidos individuales no fue potenciada por el vector derivado de 68-1.2, lo que indica que el aumento en las respuestas totales era debido a los vectores 68-1.2 que desencadenan los linfocitos T frente a nuevos péptidos del SIVgag. Esta conclusión está apoyada por los resultados mostrados en el panel inferior. Se muestra la posición de los péptidos de 15 mer individuales a lo largo de la secuencia del SIVgag que son reconocidos por los linfocitos T de cada uno de los dos MR inoculados con el RhCMV/SIVgag después de la primera vacunación con el RhCMV/VIS-gag (68-1), después de la revacunación con el RhCMV/VIS-gag (68-1) y después de la vacunación con el RhCMV/VIS-gag (68-1.2). Cada vacunación desencadenó linfocitos T adicionales que reconocen nuevos epítipos, mientras que las respuestas inmunitarias previas se mantenían: los nuevos epítipos reconocidos por los linfocitos T después de la revacunación con los vectores derivados de 68-1 se muestran en azul, mientras que los nuevos epítipos reconocidos después de la vacunación con los vectores derivados de 68-1.2 se muestran en verde. Dado que estas respuestas de los linfocitos T son aditivas, se midieron las respuestas de los linfocitos T frente a 52 y a 45 de los 125 péptidos solapantes tras una vacunación secuencial, duplicando por lo tanto prácticamente la cobertura de los péptidos derivados de SIVgag por parte de los linfocitos T en comparación con una única vacunación.

Descripción detallada

En el presente documento se divulgan vectores de citomegalovirus humanos o animales (CMV) capaces de infectar repetidamente a un organismo. Los vectores de CMV comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un antígeno proteico heterólogo y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína UL131 activa. En un ejemplo, el vector de CMV comprende una secuencia de ácidos nucleicos que expresa una proteína UL128 activa, pero no expresa una proteína UL130 activa. En otro ejemplo, el vector de CMV codifica una proteína UL130 activa, pero no expresa una proteína UL128 activa.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un vector de citomegalovirus humano o animal que comprende:

- (a) una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un antígeno proteico heterólogo;
- (b) una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica la UL128 o un ortólogo de la misma; y
- (c) una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica la UL131 o un ortólogo de la misma; en el que el vector no expresa una proteína UL130 activa.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un vector de citomegalovirus humano o animal que comprende:

- (a) una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un antígeno proteico heterólogo;
- (b) una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica la UL130 o un ortólogo de la misma; y
- (c) una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica la UL131 o un ortólogo de la misma; en el que el vector no expresa una proteína UL128 activa.

En algunos ejemplos, el vector no expresa una proteína UL128 o UL130 activa debido a la presencia de una mutación perjudicial en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la UL128 o la UL130 o los genes ortólogos en CMV de animales. La mutación puede ser cualquier mutación perjudicial que dé como resultado una ausencia de la expresión de la proteína UL128 o UL130 activa. Dichas mutaciones pueden incluir mutaciones puntuales, mutaciones del marco de lectura, deleciones de menos de la totalidad de la secuencia que codifica la proteína (mutaciones de truncamiento) o deleciones de la totalidad de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína, o cualquier otra mutación.

En algunos ejemplos adicionales, el vector no expresa una proteína UL128 o UL130 activa debido a la presencia de una cuarta secuencia de ácidos nucleicos en el vector que comprende una secuencia antisentido o de ARNi (ARNip o miARN) que inhibe la expresión de la proteína UL128 o UL130.

Según otro aspecto de la invención se proporciona una composición para su uso en la inmunización de un sujeto frente a un antígeno específico de un patógeno o de un cáncer, en la que la composición comprende un primer vector de citomegalovirus que comprende:

- (a) una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un primer antígeno heterólogo.
- (b) una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una UL130 activa o un ortólogo de la misma, y
- (c) una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína UL131 activa o un ortólogo de la misma;

en la que el primer vector de citomegalovirus no codifica una proteína UL128 activa.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona una composición para su uso en la inmunización de un sujeto frente a un antígeno específico de un patógeno o de un cáncer, en la que la composición comprende un primer vector de citomegalovirus que comprende:

- (a) una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un primer antígeno heterólogo.
- (b) una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una UL128 activa o un ortólogo de la misma, y
- (c) una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína UL131 activa o un ortólogo de la misma;

en la que el primer vector de citomegalovirus no codifica una proteína UL130 activa.

La solicitud también desvela métodos para la generación de respuestas de los linfocitos T CD8⁺ frente a antígenos heterólogos en un sujeto. Los métodos implican la administración de una cantidad eficaz de un vector de CMV al sujeto. El vector de CMV se caracteriza por tener una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un antígeno heterólogo y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína UL131 activa. El vector de CMV se caracteriza adicionalmente porque no codifica una proteína UL128 activa o una proteína UL130 activa, o ni una UL128 activa ni una proteína UL130 activa. La respuesta del linfocito T CD8⁺ se caracteriza adicionalmente por tener al menos un 10 % de los linfocitos T CD8⁺ dirigidos contra los epítomos presentados por el MHC de la clase II. En algunos ejemplos adicionales, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 % o más de un 60 % de los linfocitos T CD8⁺ están dirigidos contra los epítomos presentados por el MHC de la clase II.

En algunos ejemplos adicionales, los métodos implican la administración de una cantidad eficaz de un segundo vector de CMV, comprendiendo el segundo vector de CMV una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un antígeno heterólogo al sujeto. Este segundo vector puede ser cualquier vector de CMV, incluyendo un vector de CMV con una proteína UL128 activa y una UL130 activa. El segundo vector de CMV puede comprender delecciones adicionales conocidas en la materia para proporcionar diferentes respuestas inmunitarias tales como una delección US11 o cualquier otra delección. El segundo antígeno heterólogo puede ser cualquier antígeno heterólogo, incluyendo un antígeno heterólogo idéntico al antígeno heterólogo del primer vector de CMV. El segundo vector de CMV puede ser administrado en cualquier momento relativo a la administración del primer vector de CMV, incluyendo antes, junto con o después de la administración del primer vector de CMV. Esto incluye la administración del segundo vector cualquier número de meses, días, horas, minutos o segundos antes o después que el primer vector.

Cuando se usan vectores de CMV humanos o animales como vectores de expresión son, de forma innata, no patógenos en los sujetos seleccionados, tales como seres humanos, o han sido modificados para hacerlos no patógenos en los sujetos seleccionados. Por ejemplo, son bien conocidos los adenovirus y los alfavirus de replicación defectuosa, y pueden usarse como vectores de administración génica.

El antígeno heterólogo puede ser cualquier proteína o un fragmento de la misma que no derive de un CMV, incluyendo antígenos de un cáncer, antígenos específicos de patógenos, antígenos de modelo (tales como lisozima u ovoalbúmina) o cualquier otro antígeno. En una realización preferida, el antígeno heterólogo comprende un antígeno específico de un patógeno o un antígeno de un cáncer.

Los antígenos específicos de patógenos pueden derivar de cualquier patógeno humano o animal. El patógeno puede ser un patógeno vírico, y el antígeno puede ser una proteína derivada del patógeno vírico. Algunos virus incluyen Adenovirus, coxsackievirus, virus de la hepatitis A, poliovirus, rinovirus, Herpes simplex de tipo 1, Herpes simplex de tipo 2, virus de la varicela zoster, virus de Epstein-Barr, herpesvirus del sarcoma de Kaposi, citomegalovirus humano, herpesvirus humano de tipo 8, virus de la Hepatitis B, virus de la Hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus del Nilo occidental, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la gripe, virus del sarampión, virus de las paperas, virus paragripal, virus respiratorio sincitial, metaneumovirus humano, virus del papiloma humano, virus de la rabia, virus de la rubéola, bocavirus humano y Parvovirus B19.

El patógeno puede ser un patógeno bacteriano y el antígeno puede ser una proteína derivada del patógeno bacteriano. Algunas bacterias patógenas incluyen *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Listeria*

monocytogens, Mycobacterium leprae, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium ulcerans, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Rickettsia rickettsii, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Treponema pallidum, Vibrio cholera y Yersinia pestis.

El patógeno puede ser un parásito y el antígeno puede ser una proteína derivada del patógeno parásito. El parásito puede ser un organismo protozoario o un organismo protozoario que causa una enfermedad, tal como Acanthamoeba, babesiosis, balantidiasis, blastocistosis, coccidios, dientamoebiasis, amoebiasis, Giardia, isosporiasis, leishmaniasis, meningoencefalitis amebiana primaria (PAM), malaria, rinosporidiosis, toxoplasmosis – neumonía parásita, tricomoniasis, enfermedad del sueño y enfermedad de Chagas. El parásito puede ser un organismo helmíntico o un gusano o una enfermedad causada por un organismo helmíntico tal como, anquilostomiasis/anquilostoma, anisakiasis, gusanos redondos - neumonía parásita, gusanos redondos - baillascariasis, tenias – infección por tenias, clonorquiasis, infección por Dioctophyme renalis, difilobotriasis - tenias, lombriz de guinea - dracunculiasis, equinococosis - tenias, lombrices intestinales - enterobiasis, trematodos hepáticos - fasciolosis, fasciolopsiasis – trematodos intestinales, gnatostomiasis, himenolepiasis, filariasis por Loa loa, edema de Calabar, mansonelliasis, filariasis, metagonimiasis - trematodos intestinales, ceguera del río, trematodos hepáticos chinos, paragonimiasis, trematodos pulmonares, esquistosomiasis - bilharzia, bilharziosis o fiebre del caracol (todos los tipos), esquistosomiasis intestinal, esquistosomiasis urinaria, esquistosomiasis por Schistosoma japonicum, esquistosomiasis intestinal asiática, esparganosis, strongiloidiasis - neumonía parásita, tenia de vacuno, tenia de porcino, toxocarías, triquinosis, dermatitis por cercaria, tricuriasis y elefantiasis linfática por filariasis. El parásito puede ser un organismo o una enfermedad causada por un organismo tal como un gusano parásito, síndrome de Halzoun, miasis, nigua, mosca de la muerte y candirú. El parásito puede ser un ectoparásito o una enfermedad causada por un ectoparásito tal como chinches, piojos - pediculosis, piojo del cuerpo - pediculosis, ladillas - pediculosis, Demodex - demodicosis, Scabies, gusano barrenador y Cochliomyia.

El antígeno puede ser una proteína derivada de un cáncer. Algunos cánceres incluyen leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; carcinoma adrenocortical; cánceres relacionados con el SIDA; linfoma relacionado con el SIDA; cáncer de apéndice; astrocitoma, cerebelar infantil o cerebral; carcinoma de células basales; cáncer de los conductos biliares, extrahepático; cáncer de vejiga; cáncer óseo, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno; glioma del tronco encefálico; tumor cerebral; tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso; tumor cerebral, astrocitoma cerebral/glioma maligno; tumor cerebral, ependimoma; tumor cerebral, meduloblastoma; tumor cerebral, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales; tumor cerebral, glioma de la ruta visual e hipotalámico; cáncer de mama; adenomas bronquiales/carcinoides; linfoma de Burkitt; tumor carcinoide, infantil; tumor carcinoide, gastrointestinal; carcinoma primario desconocido; linfoma del sistema nervioso central, primario; astrocitoma cerebeloso, infantil; astrocitoma cerebeloso/glioma maligno, infantil; cáncer de cuello de útero; cánceres infantiles; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; trastornos mieloproliferativos crónicos; cáncer de colon; linfoma cutáneo de los linfocitos T; tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas; cáncer de endometrio; ependimoma; cáncer de esófago; sarcoma de Ewing en la familia de tumores de Ewing; tumor de células germinales extracraneal, infantil; tumor de células germinales extragonadal; cáncer de los conductos biliares extrahepático; cáncer ocular, melanoma intraocular; cáncer ocular, retinoblastoma; cáncer de vesícula; cáncer gástrico (de estómago); tumor carcinoide gastrointestinal; tumor estromal gastrointestinal (GIST); tumor de células germinales: extracraneal, extragonadal u ovárico; tumor trofoblástico gestacional; glioma del tronco encefálico; glioma, astrocitoma cerebral infantil; glioma, infantil de la ruta visual e hipotalámico; carcinoide gástrico; tricoleucemia; cáncer de cabeza y cuello; cáncer de corazón; cáncer hepatocelular (de hígado); linfoma Hodgkin; cáncer hipofaríngeo; glioma hipotalámico y de la ruta visual, infantil; melanoma intraocular; carcinoma de los islotes pancreáticos (páncreas endocrino); sarcoma de Kaposi; cáncer de riñón (cáncer de células renales); cáncer de laringe; leucemias; leucemia, linfoblástica aguda (denominada también leucemia linfática aguda); leucemia, mieloide aguda (denominada también leucemia mielógena aguda); leucemia, linfocítica crónica (denominada también leucemia linfocítica crónica); leucemia, mielógena crónica (denominada también leucemia mieloide crónica); leucemia, tricoleucemia; cáncer de labio y de la cavidad oral; cáncer de hígado (primario); cáncer de pulmón, no microcítico; cáncer de pulmón, microcítico; linfomas; linfoma, relacionado con el SIDA; linfoma, de Burkitt; linfoma, cutáneo de los linfocitos T; linfoma, de Hodgkin; linfomas, no Hodgkin (una vieja clasificación de todos los linfomas excepto el de Hodgkin); linfoma, primario del sistema nervioso central; Marcus Whittle, enfermedad mortal; macroglobulinemia, de Waldenstrom; histiocitoma fibroso maligno óseo/osteosarcoma; meduloblastoma, infantil; melanoma; melanoma, intraocular (ojo); carcinoma de células de Merkel; mesotelioma, maligno del adulto; mesotelioma, infantil; cáncer de cuello escuamoso metastásico con primario oculto; cáncer de boca; síndrome neoplásico endocrino múltiple, infantil; mieloma múltiple/neoplasma de plasmocitos; micosis fungoides; síndromes mielodisplásicos; enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas; leucemia mielógena, crónica; leucemia mieloide, aguda del adulto; leucemia mieloide, aguda infantil; mieloma, múltiple (cáncer de médula ósea); trastornos mieloproliferativos, crónicos; cáncer de la cavidad nasal y de los senos paranasales; carcinoma nasofaríngeo; neuroblastoma; linfoma no Hodgkin; cáncer de pulmón no microcítico; cáncer oral; cáncer orofaríngeo; osteosarcoma/histiocitoma óseo fibroso maligno; cáncer de ovario; cáncer del epitelio ovárico (tumor estromal del epitelio superficial); tumor de las células germinales ováricas; potencial tumor maligno inferior del ovario; cáncer de páncreas; cáncer de páncreas, de los islotes pancreáticos; cáncer de los senos paranasales y de la cavidad nasal; cáncer paratiroideo; cáncer de pene; cáncer de faringe; feocromocitoma; astrocitoma pineal; germinoma pineal;

pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, infantil; adenoma de pituitaria; neoplasia de plasmocitos/mieloma múltiple; blastoma pleuropulmonar; linfoma primario del sistema nervioso central; cáncer de próstata; cáncer del recto; carcinoma de las células renales (cáncer de riñón); cáncer renal de la pelvis y el uréter, células transicionales; retinoblastoma; rhabdomyosarcoma, infantil; cáncer de las glándulas salivares; sarcoma, familia de tumores de Ewing; sarcoma, de Kaposi; sarcoma, de tejidos blandos; sarcoma, uterino; síndrome de Sézary; cáncer de piel (no melanoma); cáncer de piel (melanoma); carcinoma de piel, de las células de Merkel; cáncer de pulmón microcítico; cáncer de intestino delgado; sarcoma de tejidos blandos; carcinoma de células escamosas – véase cáncer de piel (no melanoma); cáncer de cuello escamoso con primario oculto, metastásico; cáncer de estómago; tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial, infantil; linfoma de linfocitos T, cutáneo (micosis fungoides y síndrome de Sézary); cáncer testicular; cáncer de garganta; timoma, infantil; timoma y carcinoma tímico; cáncer de tiroides; cáncer de tiroides, infantil; cáncer de las células transicionales de la pelvis renal y el uréter; tumor trofoblástico, gestacional; carcinoma de sitio primario desconocido, adulto; cáncer de sitio primario desconocido, infantil; uréter y renal pelvis, cáncer de las células transicionales; cáncer de uretra; cáncer de útero, de endometrio; sarcoma de útero; cáncer de vagina; glioma de la ruta visual e hipotalámico, infantil; cáncer de la vulva; macroglobulinemia de Waldenstrom y tumor de Wilms (cáncer de riñón).

Según otro aspecto de la invención, se proporciona una composición para su uso según la invención en la que el sujeto ha sido previamente expuesto a un citomegalovirus y/o en la que el sujeto es un ser humano o un primate no humano.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona una composición para su uso según la invención en la que la composición comprende adicionalmente un segundo vector de citomegalovirus que comprende una cuarta secuencia de ácidos nucleicos que codifica un segundo antígeno heterólogo. El segundo vector de citomegalovirus puede codificar una proteína UL128 activa y una proteína UL130 activa. En otra realización, se proporciona una composición para su uso según la invención en la que el primer antígeno heterólogo y el segundo antígeno heterólogo son el mismo antígeno.

Los vectores de CMV descritos en el presente documento proporcionan un vector para la clonación o la expresión de un ADN heterólogo que comprende un CMV recombinante humano o animal. El ADN heterólogo puede codificar un producto de expresión que comprende: un epítipo de interés, un modulador de la respuesta biológica, un factor de crecimiento, una secuencia de reconocimiento, un gen terapéutico o una proteína de fusión.

Los vectores de CMV divulgados en el presente documento pueden usarse como una composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna que contiene el virus o el vector de CMV recombinante y un portador o un diluyente farmacéuticamente aceptable. Una composición inmunológica que contiene el virus o el vector de CMV recombinante (o un producto de la expresión de los mismos) desencadena una respuesta inmunológica local o sistémica. La respuesta puede ser, aunque no necesariamente, protectora. Una composición inmunogénica que contiene el virus o el vector de CMV recombinante (o un producto de la expresión de los mismos) desencadena asimismo una respuesta inmunológica local o sistémica que puede ser, aunque no necesariamente, protectora. Una composición de vacuna desencadena una respuesta protectora local o sistémica. Consecuentemente, los términos "composición inmunológica" y "composición inmunogénica" incluyen una "composición de vacuna" (dado que los dos primeros términos pueden ser composiciones protectoras).

Los vectores de CMV divulgados en el presente documento proporcionan métodos para la inducción de una respuesta inmunológica en un sujeto que comprende la administración al sujeto de una composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna que comprende el virus o el vector de CMV recombinante y un portador o un diluyente farmacéuticamente aceptable. Para los fines de esta memoria descriptiva, el término "sujeto" incluye todos los animales, incluyendo primates no humanos y seres humanos, mientras que "animal" incluye todas las especies de vertebrados excepto los seres humanos; y "vertebrado" incluye todos los vertebrados, incluyendo los animales (según se usa "animal" en el presente documento) y los seres humanos; por supuesto, un subconjunto de "animal" es "mamífero", que para los fines de esta memoria descriptiva incluye todos los mamíferos excepto los seres humanos.

Los vectores de CMV divulgados en el presente documento pueden usarse en composiciones terapéuticas que contienen el virus o el vector de CMV recombinante y un portador o un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica es útil en las realizaciones de terapia génica y de inmunoterapia de la invención, por ejemplo, en un método para la transferencia de información genética a un animal o a un ser humano en necesidad de la misma que comprende la administración al hospedador de la composición; y la invención incluye consecuentemente los métodos para la transferencia de información genética.

Los vectores de CMV divulgados en el presente documento pueden usarse en un método para la expresión de una proteína o de un producto génico o de un producto de expresión que comprende la infección o la transfección de una célula *in vitro* con un virus o un vector de CMV recombinante de la invención y opcionalmente la extracción, la purificación o el aislamiento de la proteína, del producto génico o del producto de expresión o del ADN, a partir de la célula. Y, la solicitud desvela un método para la clonación o la replicación de una secuencia de ADN heteróloga que comprende la infección o la transfección de una célula *in vitro* o *in vivo* con un virus o un vector de CMV

recombinante de la invención y opcionalmente la extracción, la purificación o el aislamiento del ADN a partir de la célula o de los virus de la progenie.

Los vectores de CMV divulgados en el presente documento pueden prepararse mediante la inserción de un ADN que comprende una secuencia que codifica el antígeno heterólogo en una región no esencial del genoma del CMV. El método puede comprender adicionalmente la delección de una o más regiones del genoma del CMV. El método puede comprender una recombinación *in vivo*. Por lo tanto, el método puede comprender la transfección de una célula con el ADN de un CMV en un medio compatible con la célula en presencia de un ADN donante que comprende el ADN heterólogo flanqueado por las secuencias de ADN homólogas con porciones del genoma del CMV, mediante lo cual el ADN heterólogo es introducido en el genoma del CMV, y opcionalmente después se recupera el CMV modificado mediante la recombinación *in vivo*. El método también puede comprender la escisión del ADN del CMV para obtener el ADN escindido del CMV, la ligación del ADN heterólogo al ADN escindido del CMV para obtener un híbrido de CMV-ADN heterólogo, la transfección de una célula con el híbrido de CMV-ADN heterólogo, y opcionalmente después la recuperación del CMV modificado por la presencia del ADN heterólogo. Dado que la recombinación *in vivo* es comprendida, el método también proporciona consecuentemente un plásmido que comprende un ADN donante que no aparece de forma natural en el CMV que codifica un polipéptido foráneo al CMV, el ADN donante está en un segmento del ADN del CMV que de otro modo sería colineal con una región no esencial del genoma del CMV, de forma que el ADN de una región no esencial del CMV está flanqueando el ADN donante. El ADN heterólogo puede ser insertado en el CMV para generar el CMV recombinante en cualquier orientación que produzca una integración estable de ese ADN, y la expresión del mismo, cuando se desee.

El ADN que codifica el antígeno heterólogo en el vector de CMV recombinante puede incluir también un promotor. El promotor puede proceder de cualquier fuente, tal como un virus herpes, incluyendo un promotor endógeno del citomegalovirus (CMV) tal como un CMV humano (HCMV), un CMV de macaco rhesus (RhCMV), un promotor murino u otro CMV. El promotor también puede ser un promotor no vírico tal como el promotor EF1 α . El promotor puede ser un promotor activo truncado transcripcionalmente que comprende una región transactivada con una proteína de transactivación proporcionada por el virus y la región del promotor mínima del promotor de longitud completa a partir del cual deriva el promotor activo truncado transcripcionalmente. Para los fines de esta memoria descriptiva, un promotor está compuesto por una asociación de secuencias de ADN que se corresponden con el promotor mínimo y las secuencias reguladoras secuencia arriba. Un promotor mínimo está compuesto por el sitio CAP más la caja TATA (las secuencias mínimas para el nivel básico de transcripción; nivel de transcripción no regulado); y las "secuencias reguladoras secuencia arriba" están compuestas por el (los) elemento(s) secuencia arriba y la(s) secuencia(s) potenciadora(s). Además, el término "truncado" indica que no está presente el promotor de longitud completa, es decir, que se ha eliminado alguna porción del promotor de longitud completa. Y, el promotor truncado puede derivar de un herpesvirus tal como un MCMV o un HCMV, por ejemplo, el HCMV-IE o el MCMV-IE.

Al igual que el promotor mencionado anteriormente, el presente promotor puede ser un herpesvirus, por ejemplo, un MCMV o un HCMV tal como el promotor MCMV-IE o el HCMV-IE; y puede haber una reducción de hasta un 40 % e incluso de hasta un 90 % en el tamaño, con respecto al promotor de longitud completa, basada en los pares de bases. El promotor también puede ser un promotor no vírico modificado.

También se divulga un casete de expresión que puede ser insertado en un virus recombinante o en un plásmido que comprende el promotor activo truncado transcripcionalmente. El casete de expresión puede incluir adicionalmente una señal de poliadenilación truncada funcional; por ejemplo, una señal de poliadenilación del SV40 que está truncada, pero es funcional. Considerando que la naturaleza proporciona una señal mayor, es de hecho sorprendente que una señal de poliadenilación truncada sea funcional; y una señal de poliadenilación truncada aborda los problemas del límite del tamaño del inserto de los virus recombinantes tales como el CMV. El casete de expresión también puede incluir un ADN heterólogo con respecto al virus o al sistema en el que es insertado; y ese ADN puede ser un ADN heterólogo según se describe en el presente documento.

En un aspecto más específico, la presente solicitud desvela CMV recombinantes que comprenden promotores víricos o no víricos, y un promotor truncado a partir de los mismos. La solicitud comprende adicionalmente los anticuerpos desencadenados por las composiciones inventivas y/o recombinantes y los usos de dichos anticuerpos. Los anticuerpos, o el producto (los epítomos de interés) que los desencadenan, o los anticuerpos monoclonales procedentes de los anticuerpos, pueden usarse en ensayos de unión, en pruebas o en kits para determinar la presencia o la ausencia de un antígeno o de un anticuerpo.

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

En cuanto a los antígenos para su uso en la vacuna o en las composiciones inmunológicas, véase también el Stedman's Medical Dictionary (24ª edición, 1982, por ejemplo, definición de vacuna (para una lista de los antígenos usados en las formulaciones de vacuna; dichos antígenos o epítomos de interés a partir de esos antígenos pueden usarse en la invención, tanto en forma de un producto de expresión del virus recombinante inventivo, como en forma

de una composición multivalente que contiene un virus recombinante inventivo o un producto de la expresión del mismo).

En cuanto a los antígenos heterólogos, el experto en la materia puede seleccionar un antígeno heterólogo y el ADN que codifica para el mismo a partir del conocimiento de la secuencia de aminoácidos y las correspondientes secuencias de ADN del péptido o del polipéptido, así como a partir de la naturaleza de los aminoácidos en particular (por ejemplo, el tamaño, la carga, etc.) y el diccionario de codones, sin una excesiva experimentación.

Con respecto a la secuencia, la secuencia de ADN codifica preferentemente al menos las regiones del antígeno que generan una respuesta del anticuerpo o la respuesta de un linfocito T, particularmente la respuesta de los linfocitos T CD8⁺. Un método para la determinación de los epítomos de los linfocitos T y B implica un cartografiado de epítomo. Los péptidos solapantes del antígeno heterólogo pueden ser generados mediante una síntesis de oligopéptido. A continuación, se ensaya la capacidad de los péptidos individuales para unirse a un anticuerpo desencadenado por la proteína natural, o para inducir la activación de los linfocitos T o B. Esta metodología ha sido particularmente útil en el cartografiado de los epítomos de los linfocitos T, dado que el linfocito T reconoce péptidos lineales cortos complejados con las moléculas del MHC.

Una respuesta inmunitaria a un antígeno heterólogo se genera, en general, como sigue: los linfocitos T reconocen las proteínas únicamente cuando la proteína ha sido escindida en péptidos más pequeños y es presentada en un complejo denominado "complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)" ubicado en la superficie de otra célula. Hay dos clases de complejos de MHC, de la clase I y de la clase II, y cada clase está formada por muchos alelos diferentes. Las diferentes especies y los sujetos individuales tienen diferentes tipos de alelos del complejo de MHC; se dice que tienen un tipo diferente de HLA.

Se aprecia que el ADN que comprende la secuencia que codifica el antígeno heterólogo puede incluir por sí mismo un promotor para dirigir la expresión en el vector de CMV, o el ADN puede limitarse al ADN que codifica el antígeno heterólogo. Esta construcción puede ser colocada en una orientación relativa con respecto a un promotor de CMV endógeno tal que esté unida operativamente al promotor, y sea por lo tanto expresada. Además, pueden realizarse múltiples copias del ADN que codifica el antígeno heterólogo o usar un promotor fuerte o temprano o un promotor temprano y tardío, o cualquier combinación de los mismos, de forma que se amplifique o se aumente la expresión. Por lo tanto, el ADN que codifica el antígeno heterólogo puede ser posicionado adecuadamente con respecto al promotor de CMV endógeno, o estos promotores pueden ser translocados para ser insertados en otra ubicación junto con el ADN que codifica el antígeno heterólogo. Los ácidos nucleicos que codifican más de un antígeno heterólogo pueden ser empaquetados en el vector de CMV.

Adicionalmente se divulgan composiciones farmacéuticas y otras que contienen los vectores de CMV divulgados. Dichas composiciones farmacéuticas y otras pueden ser formuladas de forma que se usen en cualquier procedimiento de administración conocido en la materia. Dichas composiciones farmacéuticas pueden ser a través de una vía parenteral (intradérmica, intramuscular, subcutánea, intravenosa u otras). La administración también puede ser a través de la vía mucosa, por ejemplo, oral, nasal, genital, etc.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas pueden ser preparadas según las técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en el arte farmacéutico. Dichas composiciones pueden ser administradas en unas dosis y mediante unas técnicas bien conocidas por los expertos en el arte médico teniendo en consideración factores tales como la raza o la especie, la edad, el sexo, el peso y el estado del paciente en particular, y la vía de administración. Las composiciones pueden ser administradas solas o pueden ser administradas conjuntamente o secuencialmente con otros vectores de CMV o con otras composiciones terapéuticas inmunológicas, antigénicas o de vacuna. Dichas otras composiciones pueden incluir antígenos o epítomos naturales purificados o antígenos o epítomos procedentes de la expresión mediante un CMV recombinante u otro sistema de vector; y se administran teniendo en cuenta los factores mencionados anteriormente.

Algunos ejemplos de las composiciones de la presente divulgación incluyen preparaciones líquidas para orificios, por ejemplo, oral, nasal, anal, genital, por ejemplo, vaginal, etc., La administración tal como suspensiones, jarabes o elixires; y, preparaciones para una administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (por ejemplo, una administración inyectable) tales como suspensiones o emulsiones estériles. En dichas composiciones, el recombinante puede estar en una mezcla con un portador, diluyente o excipiente adecuado tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa o similares.

Las composiciones antigénicas, inmunológicas o de vacuna normalmente pueden contener un adyuvante y una cantidad del vector de CMV o del producto de expresión para desencadenar la respuesta deseada. En las aplicaciones en seres humanos, el alumbre (fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio) es un adyuvante típico. La saponina y su componente purificado Quil A, el adyuvante completo de Freund y otros adyuvantes usados en la investigación y en aplicaciones veterinarias, tienen unas toxicidades que limitan su potencial uso en vacunas para seres humanos. También pueden usarse preparaciones definidas químicamente tales como dipéptido de muramilo, monofosforil lipido A, conjugados de fosfolípidos tales como los descritos por Goodman-Snitkoff *et al.*, J. Immunol. 147: 410-415 (1991), la encapsulación de la proteína en un proteoliposoma según describen Miller *et al.*, J. Exp.

Med. 176: 1739-1744 (1992), y la encapsulación de la proteína en vesículas lipídicas tales como las vesículas lipídicas Novasome (Micro Vesicular Systems. Inc., Nashua. N.H.).

La composición puede ser envasada en una forma de dosificación individual para la inmunización mediante una administración parenteral (es decir, intramuscular, intradérmica o subcutánea) o la administración en un orificio, por ejemplo, perlingual (por ejemplo, oral), intragástrica, mucosa incluyendo la administración intraoral, intraanal, intravaginal, y similares. Y de nuevo, la dosis eficaz y la vía de administración están determinadas por la naturaleza de la composición, por la naturaleza del producto de expresión, por el nivel de expresión si se usa directamente el CMV recombinante y por factores conocidos tales como la raza o la especie, la edad, el sexo, el peso, el estado y la naturaleza del hospedador, así como la DL₅₀ y otros procedimientos de cribado que son conocidos y no requieren una excesiva experimentación. Las dosis de producto expresado pueden variar entre unos pocos y unos pocos cientos de microgramos, por ejemplo, entre 5 y 500 µg. El vector de CMV puede ser administrado en cualquier cantidad adecuada para conseguir la expresión a estos niveles de dosis. En algunos ejemplos no limitantes: los vectores de CMV pueden ser administrados en una cantidad de al menos 10² ufp; por lo tanto, los vectores de CMV pueden ser administrados en al menos esta cantidad; o en un intervalo de entre aproximadamente 10² ufp y aproximadamente 10⁷ ufp. Otros portadores o diluyentes adecuados pueden ser agua o una solución salina tamponada, con o sin un conservante. El vector de CMV puede ser liofilizado para ser resuspendido en el momento de su administración, o puede estar en solución.

El portador también puede ser un sistema polimérico de liberación retardada. Los polímeros sintéticos son particularmente útiles en la formulación de una composición que tenga una liberación controlada. Un ejemplo temprano de esto era la polimerización de metacrilato de metilo en esferas que tienen unos diámetros menores de una micra para formar las denominadas nanopartículas, notificado por Kreuter. J., *Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacology*. M. Donbrow (Ed), CRC Press, págs. 125-148.

Se ha aplicado la microencapsulación a la inyección de productos farmacéuticos microencapsulados para proporcionar una liberación controlada. Son diversos los factores que contribuyen a la selección de un polímero en particular para la microencapsulación. La reproducibilidad de la síntesis del polímero y el proceso de microencapsulación, el coste de los materiales y del proceso de la microencapsulación, el perfil toxicológico, los requisitos para una cinética de liberación variable y la compatibilidad fisicoquímica entre el polímero y los antígenos son todos los factores que deben ser considerados. Algunos ejemplos de polímeros útiles son policarbonatos, poliésteres, poliuretanos, poliortoésteres y poliamidas, particularmente aquellos que son biodegradables.

Una elección frecuente de un portador para productos farmacéuticos, y más recientemente para antígenos, es la poli(d,1-lactida-co-glicólido) (PLGA). Este es un poliéster biodegradable que tiene unos amplios antecedentes de uso médico en suturas erosionables, placas óseas y otras prótesis temporales en las que no ha mostrado ninguna toxicidad. Una amplia variedad de productos farmacéuticos, incluyendo péptidos y antígenos, se ha formulado en microcápsulas de PLGA. Se ha acumulado un cuerpo de datos sobre la adaptación de la PLGA para la liberación controlada de un antígeno, por ejemplo, según revisan Eldridge. J. H., *et al.*, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1989, 146:59-66. El atrapamiento de los antígenos en microesferas de PLGA de entre 1 y 10 micrones de diámetro ha demostrado tener un notable efecto adyuvante cuando se administra por vía oral. El proceso de microencapsulación de la PLGA usa una separación de fases de una emulsión de agua en una fase oleosa. El compuesto de interés se prepara en forma de una solución acuosa, y la PLGA se disuelve en un disolvente orgánico adecuado tal como cloruro de metileno y acetato de etilo. Estas dos soluciones inmiscibles se emulsionan conjuntamente mediante una agitación a alta velocidad. Después se añade un no disolvente para el polímero, lo que provoca la precipitación del polímero alrededor de las gotitas acuosas para formar microcápsulas embrionarias. Las microcápsulas se recogen y se estabilizan con uno de una diversidad de agentes (alcohol polivinílico (PVA), gelatina, alginatos, polivinilpirrolidona (PVP), metil celulosa) y el disolvente se elimina bien mediante un secado a vacío o bien mediante una extracción del disolvente.

En cuanto a los promotores de HCMV, se hace referencia a las Patentes de Estados Unidos nº 5.168.062 y 5.385.839. En cuanto a las células transfectantes con el ADN de plásmido para su expresión en las mismas, se hace referencia a Felgner *et al.*, (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 2550-2561. Y en cuanto a la inyección directa del ADN de plásmido como un método de vacunación simple y eficaz frente a una diversidad de enfermedades infecciosas, se hace referencia a Science, 259: 1745-49, 1993. Está por lo tanto en el ámbito de esta divulgación que un vector pueda ser usado mediante la inyección directa del ADN de un vector.

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

Según se usa en el presente documento, los términos "antígeno" o "inmunógeno" se usan de forma intercambiable para referirse a una sustancia, normalmente una proteína, que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto. El término también se refiere a las proteínas que son inmunológicamente activas en el sentido de que una vez administradas a un sujeto (bien directamente o bien mediante la administración al sujeto de una secuencia de nucleótidos o de un vector que codifica la proteína), son capaces de provocar una respuesta inmunitaria de tipo humoral y/o celular dirigida contra esa proteína.

Debería entenderse que las proteínas y los ácidos nucleicos que las codifican pueden diferir de las secuencias exactas ilustradas y descritas en el presente documento. Por lo tanto, la divulgación contempla delecciones, adiciones, truncamientos y sustituciones en las secuencias mostradas, siempre que las secuencias funcionen según los métodos de la divulgación. A este respecto, las sustituciones serán generalmente de naturaleza conservativa, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos - aspartato y glutamato; (2) básicos - lisina, arginina, histidina; (3) no polares - alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga - glicina, asparragina, glutamina, cisteína, serina, treonina y tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican en ocasiones como aminoácidos aromáticos. Es razonablemente predecible que una sustitución aislada de leucina por isoleucina o valina, o viceversa; de un aspartato por un glutamato o viceversa; de una treonina por una serina o viceversa; o una sustitución conservativa similar de un aminoácido por un aminoácido relacionado estructuralmente, no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que las secuencias ilustradas y descritas pero que poseen unas sustituciones de aminoácidos menores que no afectan sustancialmente a la inmunogenicidad de la proteína están, por lo tanto, en el ámbito de la divulgación.

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

Según se usa en el presente documento, el término "transgen" puede usarse para referirse a secuencias de nucleótidos "recombinantes" que pueden derivar de cualquiera de las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la presente invención. El término "recombinante" significa una secuencia de nucleótidos que ha sido manipulada "por el hombre" y que no aparece en la naturaleza, o que está unida a otra secuencia de nucleótidos o que se encuentra en una disposición diferente en la naturaleza. Se entiende que manipulada "por el hombre" significa manipulada mediante algún medio artificial, incluyendo mediante el uso de máquinas, optimización de codones, enzimas de restricción, etc. Un vector de CMV que codifica un antígeno heterólogo es por definición un vector de CMV recombinante.

Las secuencias de nucleótidos pueden tener los codones optimizados, por ejemplo, los codones pueden estar optimizados para su uso en células humanas. Por ejemplo, así puede alterarse cualquier secuencia vírica o bacteriana. Muchos virus, incluyendo el VIH y otros lentivirus, usan un gran número de codones raros y, mediante la alteración de estos codones para que se correspondan con los codones usados habitualmente en el sujeto deseado, puede conseguirse una mejora en la expresión del antígeno heterólogo según se describe en Andre *et al.*, J. Virol. 72: 1497-1503, 1998.

Se contemplan las secuencias de nucleótidos que codifican las variantes y los derivados de los vectores de CMV y de las glicoproteínas funcional y/o antigénicamente equivalentes incluidas en las mismas. Estas variantes, derivados, y fragmentos funcionalmente equivalentes muestran la capacidad de conservar la actividad antigénica. Por ejemplo, los cambios en una secuencia de ADN que no modifica la secuencia de aminoácidos codificada, así como aquellos que dan como resultado sustituciones conservativas de residuos de aminoácidos, una o pocas delecciones o adiciones de aminoácidos, y la sustitución de residuos de aminoácidos por análogos de aminoácidos son aquellas que no afectarán significativamente a las propiedades del polipéptido codificado. Las sustituciones conservativas de aminoácidos son glicina/alanina; valina/isoleucina/leucina; asparragina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutámico; serina/treonina/metionina; lisina/arginina; y fenilalanina/tirosina/triptófano. En una realización, las variantes tienen una identidad u homología de al menos el 50 %, de al menos el 55 %, de al menos el 60 %, de al menos el 65 %, de al menos el 70 %, de al menos el 75 %, de al menos el 80 %, de al menos el 85 %, de al menos el 86 %, de al menos el 87 %, de al menos el 88 %, de al menos el 89 %, de al menos el 90 %, de al menos el 91 %, de al menos el 92 %, de al menos el 93 %, de al menos el 94 %, de al menos el 95 %, de al menos el 96 %, de al menos el 97 %, de al menos el 98 % o de al menos el 99 % con el antígeno, el epítipo, el inmunógeno, el péptido o el polipéptido de interés.

La identidad o la homología en la secuencia se determina mediante la comparación de las secuencias cuando se alinean de forma que se maximicen los solapamientos y la identidad mientras se minimizan los huecos en la secuencia. En particular, la identidad en la secuencia puede ser determinada usando cualquiera de diversos algoritmos matemáticos. Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático usado para la comparación de dos

secuencias que es el algoritmo de Karlin & Altschul. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 1990; 87: 2264-2268, modificado según Karlin & Altschul. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 1993; 90: 5873-5877.

Otro ejemplo de un algoritmo matemático usado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers & Miller, CABIOS 1988; 4: 11-17. Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete informático de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para la comparación de secuencias de aminoácidos, puede usarse una tabla ponderal de residuos PAM120, una penalización por la longitud del hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Otro algoritmo más, útil para la identificación de regiones de similitud local en la secuencia y alineaciones, es el algoritmo FASTA según describen Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 1988; 85: 2444-2448.

Es ventajoso el programa informático WU-BLAST (Washington University BLAST) versión 2.0. Los programas ejecutables WU-BLAST versión 2.0 pueden descargarse para diversas plataformas UNIX. Este programa se basa en la versión WU-BLAST 1.4, que a su vez se basa en la versión de dominio público NCBI-BLAST 1.4 (Altschul & Gish. 1996. Local alignment statistics, Doolittle ed., Methods in Enzymology 266: 460-480; Altschul *et al.*, Journal of Molecular Biology 1990; 215: 403-410; Gish & States, 1993; Nature Genetics 3: 266-272; Karlin & Altschul, 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 5873-5877).

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

Las secuencias de nucleótidos pueden ser insertadas en "vectores." El término "vector" es ampliamente usado y conocido por los expertos en la materia, y según se usa en el presente documento, el término "vector" se usa coherentemente con su significado para los expertos en la materia. Por ejemplo, el término "vector" lo usan habitualmente los expertos en la materia para referirse a un vehículo que permite o facilita la transferencia de moléculas de ácidos nucleicos desde un entorno a otro, o que permite o facilita la manipulación de la molécula de ácido nucleico.

Puede usarse cualquier vector que permita la expresión de los virus de la presente divulgación. En ciertas realizaciones, los virus de la presente invención pueden usarse *in vitro* (tal como usando sistemas de expresión acelulares) y/o en células cultivadas *in vitro* con objeto de producir los antígenos codificados por el VIH y/o los anticuerpos, que después pueden usarse para diversas aplicaciones, tales como en la producción de vacunas proteicas. Para dichas aplicaciones puede usarse cualquier vector que permita la expresión del virus *in vitro* y/o en células cultivadas.

Para la expresión de los antígenos heterólogos, la secuencia codificante de la proteína del antígeno heterólogo debería estar "unida operativamente" a secuencias de control de ácidos nucleicos o reguladoras que dirigen la transcripción y la traducción de la proteína. Según se usa en el presente documento, se dice que una secuencia codificante y una secuencia de control de ácidos nucleicos o promotor están "unidas operativamente" cuando están unidas covalentemente de tal forma que se coloque la expresión o la transcripción y/o la traducción de la secuencia codificante bajo la influencia o el control de la secuencia de control de ácidos nucleicos. La "secuencia de control de ácidos nucleicos" puede ser cualquier elemento ácido nucleico, tal como promotores, potenciadores, IRES, intrones y otros elementos descritos en el presente documento, que dirigen la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos o de la secuencia codificante que está unida operativamente a la misma. El término "promotor" se usará en el presente documento para referirse a un grupo de módulos de control de la transcripción que son agrupados alrededor del sitio de inicio de la polimerasa II de ARN y que, cuando están unidos operativamente a las secuencias de control de la proteína, conducen a la expresión de la proteína codificada. La expresión de los transgenes puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible, que inicia la transcripción únicamente cuando es expuesto a algunos estímulos externos en particular tales como, sin limitación, antibióticos tales como tetraciclina, hormonas tales como ecdisona o metales pesados. El promotor también puede ser específico de un tipo de célula, tejido u órgano en particular. En la materia se conocen muchos promotores y potenciadores adecuados, y puede usarse cualquiera de dichos promotores o potenciadores adecuados para la expresión de los transgenes de la invención. Por ejemplo, los promotores y/o los potenciadores adecuados pueden seleccionarse de la Eukaryotic Promoter Database (EPDB).

La presente invención se refiere a un vector vírico recombinante que expresa un epítipo foráneo. Ventajosamente, el epítipo es un epítipo del VIH. En una realización ventajosa, el epítipo del VIH es un fragmento de una proteína de la presente invención, sin embargo, la presente invención puede englobar antígenos, epítopos o inmunógenos adicionales del VIH. Ventajosamente, el epítipo del VIH es un antígeno del VIH, incluyendo los antígenos del VIH de las Patentes de Estados Unidos nº 7.341.731; 7.335.364; 7.329.807; 7.323.553; 7.320.859; 7.311.920; 7.306.798; 7.285.646; 7.285.289; 7.285.271; 7.282.364; 7.273.695; 7.270.997; 7.262.270; 7.244.819; 7.244.575; 7.232.567; 7.232.566; 7.223.844; 7.223.739; 7.223.534; 7.223.368; 7.220.554; 7.214.530; 7.211.659; 7.211.432; 7.205.159; 7.198.934; 7.195.768; 7.192.555; 7.189.826; 7.189.522; 7.186.507; 7.179.645; 7.175.843; 7.172.761; 7.169.550; 7.157.083; 7.153.509; 7.147.862; 7.141.550; 7.129.219; 7.122.188; 7.118.859; 7.118.855; 7.118.751; 7.118.742;

ES 2 696 703 T3

	7.105.655; 7.101.552; 7.097.971 7.097.842; 7.094.405; 7.091.049; 7.090.648; 7.087.377; 7.083.787; 7.070.787;
	7.070.781; 7.060.273; 7.056.521; 7.056.519; 7.049.136; 7.048.929; 7.033.593; 7.030.094; 7.022.326; 7.009.037;
	7.008.622; 7.001.759; 6.997.863; 6.995.008; 6.979.535; 6.974.574; 6.972.126; 6.969.609; 6.964.769; 6.964.762;
5	6.958.158; 6.956.059; 6.953.689; 6.951.648; 6.946.075; 6.927.031; 6.919.319; 6.919.318; 6.919.077; 6.913.752;
	6.911.315; 6.908.617; 6.908.612; 6.902.743; 6.900.010; 6.893.869; 6.884.785; 6.884.435; 6.875.435; 6.867.005;
	6.861.234; 6.855.539; 6.841.381 6.841.345; 6.838.477; 6.821.955; 6.818.392; 6.818.222; 6.815.217; 6.815.201;
	6.812.026; 6.812.025; 6.812.024; 6.808.923; 6.806.055; 6.803.231; 6.800.613; 6.800.288; 6.797.811; 6.780.967;
	6.780.598; 6.773.920; 6.764.682; 6.761.893; 6.753.015; 6.750.005; 6.737.239; 6.737.067; 6.730.304; 6.720.310;
	6.716.823; 6.713.301; 6.713.070; 6.706.859; 6.699.722; 6.699.656; 6.696.291; 6.692.745; 6.670.181; 6.670.115;
10	6.664.406; 6.657.055; 6.657.050; 6.656.471; 6.653.066; 6.649.409; 6.649.372; 6.645.732; 6.641.816; 6.635.469;
	6.613.530; 6.605.427; 6.602.709 6.602.705; 6.600.023; 6.596.477; 6.596.172; 6.593.103; 6.593.079; 6.579.673;
	6.576.758; 6.573.245; 6.573.040; 6.569.418; 6.569.340; 6.562.800; 6.558.961; 6.551.828; 6.551.824; 6.548.275;
	6.544.780; 6.544.752; 6.544.728; 6.534.482; 6.534.312; 6.534.064; 6.531.572; 6.531.313; 6.525.179; 6.525.028;
	6.524.582; 6.521.449; 6.518.030; 6.518.015; 6.514.691; 6.514.503; 6.511.845; 6.511.812; 6.511.801; 6.509.313;
15	6.506.384; 6.503.882; 6.495.676; 6.495.526; 6.495.347; 6.492.123; 6.489.131; 6.489.129; 6.482.614; 6.479.286;
	6.479.284; 6.465.634; 6.461.615 6.458.560; 6.458.527; 6.458.370; 6.451.601; 6.451.592; 6.451.323; 6.436.407;
	6.432.633; 6.428.970; 6.428.952; 6.428.790; 6.420.139; 6.416.997; 6.410.318; 6.410.028; 6.410.014; 6.407.221;
	6.406.710; 6.403.092; 6.399.295; 6.392.013; 6.391.657; 6.384.198; 6.380.170; 6.376.170; 6.372.426; 6.365.187;
	6.358.739; 6.355.248; 6.355.247; 6.348.450; 6.342.372; 6.342.228; 6.338.952; 6.337.179; 6.335.183; 6.335.017;
20	6.331.404; 6.329.202; 6.329.173; 6.328.976; 6.322.964; 6.319.666; 6.319.665; 6.319.500; 6.319.494; 6.316.205;
	6.316.003; 6.309.633; 6.306.625 6.296.807; 6.294.322; 6.291.239; 6.291.157; 6.287.568; 6.284.456; 6.284.194;
	6.274.337; 6.270.956; 6.270.769; 6.268.484; 6.265.562; 6.265.149; 6.262.029; 6.261.762; 6.261.571; 6.261.569;
	6.258.599; 6.258.358; 6.248.332; 6.245.331; 6.242.461; 6.241.986; 6.235.526; 6.235.466; 6.232.120; 6.228.361;
	6.221.579; 6.214.862; 6.214.804; 6.210.963; 6.210.873; 6.207.185; 6.203.974; 6.197.755; 6.197.531; 6.197.496;
25	6.194.142; 6.190.871; 6.190.666; 6.168.923; 6.156.302; 6.153.408; 6.153.393; 6.153.392; 6.153.378; 6.153.377;
	6.146.635; 6.146.614; 6.143.876 6.140.059; 6.140.043; 6.139.746; 6.132.992; 6.124.306; 6.124.132; 6.121.006;
	6.120.990; 6.114.507; 6.114.143; 6.110.466; 6.107.020; 6.103.521; 6.100.234; 6.099.848; 6.099.847; 6.096.291;
	6.093.405; 6.090.392; 6.087.476; 6.083.903; 6.080.846; 6.080.725; 6.074.650; 6.074.646; 6.070.126; 6.063.905;
	6.063.564; 6.060.256; 6.060.064; 6.048.530; 6.045.788; 6.043.347; 6.043.248; 6.042.831; 6.037.165; 6.033.672;
30	6.030.772; 6.030.770; 6.030.618; 6.025.141; 6.025.125; 6.020.468; 6.019.979; 6.017.543; 6.017.537; 6.015.694;
	6.015.661; 6.013.484; 6.013.432 6.007.838; 6.004.811; 6.004.807; 6.004.763; 5.998.132; 5.993.819; 5.989.806;
	5.985.926; 5.985.641; 5.985.545; 5.981.537; 5.981.505; 5.981.170; 5.976.551; 5.972.339; 5.965.371; 5.962.428;
	5.962.318; 5.961.979; 5.961.970; 5.958.765; 5.958.422; 5.955.647; 5.955.342; 5.951.986; 5.951.975; 5.942.237;
	5.939.277; 5.939.074; 5.935.580; 5.928.930; 5.928.913; 5.928.644; 5.928.642; 5.925.513; 5.922.550; 5.922.325;
35	5.919.458; 5.916.806; 5.916.563; 5.914.395; 5.914.109; 5.912.338; 5.912.176; 5.912.170; 5.906.936; 5.895.650;
	5.891.623; 5.888.726; 5.885.580 5.885.578; 5.879.685; 5.876.731; 5.876.716; 5.874.226; 5.872.012; 5.871.747;
	5.869.058; 5.866.694; 5.866.341; 5.866.320; 5.866.319; 5.866.137; 5.861.290; 5.858.740; 5.858.647; 5.858.646;
	5.858.369; 5.858.368; 5.858.366; 5.856.185; 5.854.400; 5.853.736; 5.853.725; 5.853.724; 5.852.186; 5.851.829;
	5.851.529; 5.849.475; 5.849.288; 5.843.728; 5.843.723; 5.843.640; 5.843.635; 5.840.480; 5.837.510; 5.837.250;
40	5.837.242; 5.834.599; 5.834.441; 5.834.429; 5.834.256; 5.830.876; 5.830.641; 5.830.475; 5.830.458; 5.830.457;
	5.827.749; 5.827.723; 5.824.497 5.824.304; 5.821.047; 5.817.767; 5.817.754; 5.817.637; 5.817.470; 5.817.318;
	5.814.482; 5.807.707; 5.804.604; 5.804.371; 5.800.822; 5.795.955; 5.795.743; 5.795.572; 5.789.388; 5.780.279;
	5.780.038; 5.776.703; 5.773.260; 5.770.572; 5.766.844; 5.766.842; 5.766.625; 5.763.574; 5.763.190; 5.762.965;
	5.759.769; 5.756.666; 5.753.258; 5.750.373; 5.747.641; 5.747.526; 5.747.028; 5.736.320; 5.736.146; 5.733.760;
45	5.731.189; 5.728.385; 5.721.095; 5.716.826; 5.716.637; 5.716.613; 5.714.374; 5.709.879; 5.709.860; 5.709.843;
	5.705.331; 5.703.057; 5.702.707 5.698.178; 5.688.914; 5.686.078; 5.681.831; 5.679.784; 5.674.984; 5.672.472;
	5.667.964; 5.667.783; 5.665.536; 5.665.355; 5.660.990; 5.658.745; 5.658.569; 5.643.756; 5.641.624; 5.639.854;
	5.639.598; 5.637.677; 5.637.455; 5.633.234; 5.629.153; 5.627.025; 5.622.705; 5.614.413; 5.610.035; 5.607.831;
	5.606.026; 5.601.819; 5.597.688; 5.593.972; 5.591.829; 5.591.823; 5.589.466; 5.587.285; 5.585.254; 5.585.250;
50	5.580.773; 5.580.739; 5.580.563; 5.573.916; 5.571.667; 5.569.468; 5.558.865; 5.556.745; 5.550.052; 5.543.328;
	5.541.100; 5.541.057; 5.534.406 5.529.765; 5.523.232; 5.516.895; 5.514.541; 5.510.264; 5.500.161; 5.480.967;
	5.480.966; 5.470.701; 5.468.606; 5.462.852; 5.459.127; 5.449.601; 5.447.838; 5.447.837; 5.439.809; 5.439.792;
	5.418.136; 5.399.501; 5.397.695; 5.391.479; 5.384.240; 5.374.519; 5.374.518; 5.374.516; 5.364.933; 5.359.046;
	5.356.772; 5.354.654; 5.344.755; 5.335.673; 5.332.567; 5.320.940; 5.317.009; 5.312.902; 5.304.466; 5.296.347;
55	5.286.852; 5.268.265; 5.264.356; 5.264.342; 5.260.308; 5.256.767; 5.256.561; 5.252.556; 5.230.998; 5.230.887;
	5.227.159; 5.225.347; 5.221.610 5.217.861; 5.208.321; 5.206.136; 5.198.346; 5.185.147; 5.178.865; 5.173.400;
	5.173.399; 5.166.050; 5.156.951; 5.135.864; 5.122.446; 5.120.662; 5.103.836; 5.100.777; 5.100.662; 5.093.230;
	5.077.284; 5.070.010; 5.068.174; 5.066.782; 5.055.391; 5.043.262; 5.039.604; 5.039.522; 5.030.718; 5.030.555;
	5.030.449; 5.019.387; 5.013.556; 5.008.183; 5.004.697; 4.997.772; 4.983.529; 4.983.387; 4.965.069; 4.945.082;
60	4.921.787; 4.918.166; 4.900.548; 4.888.290; 4.886.742; 4.885.235; 4.870.003; 4.869.903; 4.861.707; 4.853.326;
	4.839.288; 4.833.072 y 4.795.739.

En otra realización, puede utilizarse el VIH o fragmentos inmunogénicos del mismo, como el epítipo del VIH. Por ejemplo, los nucleótidos del VIH de las Patentes de Estados Unidos nº 7.393.949, 7.374.877, 7.306.901, 7.303.754, 7.173.014, 7.122.180, 7.078.516, 7.022.814, 6.974.866, 6.958.211, 6.949.337, 6.946.254, 6.896.900, 6.887.977, 6.870.045, 6.803.187, 6.794.129, 6.773.915, 6.768.004, 6.706.268, 6.696.291, 6.692.955, 6.656.706, 6.649.409,

6.627.442, 6.610.476, 6.602.705, 6.582.920, 6.557.296, 6.531.587, 6.531.137, 6.500.623, 6.448.078, 6.429.306, 6.420.545, 6.410.013, 6.407.077, 6.395.891, 6.355.789, 6.335.158, 6.323.185, 6.316.183, 6.303.293, 6.300.056, 6.277.561, 6.270.975, 6.261.564, 6.225.045, 6.222.024, 6.194.391, 6.194.142, 6.162.631, 6.114.167, 6.114.109, 6.090.392, 6.060.587, 6.057.102, 6.054.565, 6.043.081, 6.037.165, 6.034.233, 6.033.902, 6.030.769, 6.020.123, 6.015.661, 6.010.895, 6.001.555, 5.985.661, 5.980.900, 5.972.596, 5.939.538, 5.912.338, 5.869.339, 5.866.701, 5.866.694, 5.866.320, 5.866.137, 5.864.027, 5.861.242, 5.858.785, 5.858.651, 5.849.475, 5.843.638, 5.840.480, 5.821.046, 5.801.056, 5.786.177, 5.786.145, 5.773.247, 5.770.703, 5.756.674, 5.741.706, 5.705.612, 5.693.752, 5.688.637, 5.688.511, 5.684.147, 5.665.577, 5.585.263, 5.578.715, 5.571.712, 5.567.603, 5.554.528, 5.545.726, 5.527.895, 5.527.894, 5.223.423, 5.204.259, 5.144.019, 5.051.496 y 4.942.122 son útiles para la presente invención.

En la presente invención puede usarse cualquier epítipo reconocido por un anticuerpo contra el VIH. Por ejemplo, los anticuerpos anti-HIV de las Patentes de Estados Unidos nº 6.949.337, 6.900.010, 6.821.744, 6.768.004, 6.613.743, 6.534.312, 6.511.830, 6.489.131.6.242.197, 6.114.143, 6.074.646, 6.063.564, 6.060.254, 5.919.457, 5.916.806, 5.871.732, 5.824.304, 5.773.247, 5.736.320, 5.637.455, 5.587.285, 5.514.541, 5.317.009, 4.983.529, 4.886.742, 4.870.003 y 4.795.739 son útiles para la presente invención. Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales anti-HIV de las Patentes de Estados Unidos nº 7.074.556, 7.074.554, 7.070.787, 7.060.273, 7.045.130, 7.033.593, RE39.057, 7.008.622, 6.984.721, 6.972.126, 6.949.337, 6.946.465, 6.919.077, 6.916.475, 6.911.315, 6.905.680, 6.900.010, 6.825.217, 6.824.975, 6.818.392, 6.815.201, 6.812.026, 6.812.024, 6.797.811, 6.768.004, 6.703.019, 6.689.118, 6.657.050, 6.608.179, 6.600.023, 6.596.497, 6.589.748, 6.569.143, 6.548.275, 6.525.179, 6.524.582, 6.506.384, 6.498.006, 6.489.131, 6.465.173, 6.461.612, 6.458.933, 6.432.633, 6.410.318, 6.406.701, 6.395.275, 6.391.657, 6.391.635, 6.384.198, 6.376.170, 6.372.217, 6.344.545, 6.337.181, 6.329.202, 6.319.665, 6.319.500, 6.316.003, 6.312.931, 6.309.880, 6.296.807, 6.291.239, 6.261.558, 6.248.514, 6.245.331, 6.242.197, 6.241.986, 6.228.361, 6.221.580, 6.190.871, 6.177.253, 6.146.635, 6.146.627, 6.146.614, 6.143.876, 6.132.992, 6.124.132, RE36.866, 6.114.143, 6.103.238, 6.060.254, 6.039.684, 6.030.772, 6.020.468, 6.013.484, 6.008.044, 5.998.132, 5.994.515, 5.993.812, 5.985.545, 5.981.278, 5.958.765, 5.939.277, 5.928.930, 5.922.325, 5.919.457, 5.916.806, 5.914.109, 5.911.989, 5.906.936, 5.889.158, 5.876.716, 5.874.226, 5.872.012, 5.871.732, 5.866.694, 5.854.400, 5.849.583, 5.849.288, 5.840.480, 5.840.305, 5.834.599, 5.831.034, 5.827.723, 5.821.047, 5.817.767, 5.817.458, 5.804.440, 5.795.572, 5.783.670, 5.776.703, 5.773.225, 5.766.944, 5.753.503, 5.750.373, 5.747.641, 5.736.341, 5.731.189, 5.707.814, 5.702.707, 5.698.178, 5.695.927, 5.665.536, 5.658.745, 5.652.138, 5.645.836, 5.635.345, 5.618.922, 5.610.035, 5.607.847, 5.604.092, 5.601.819, 5.597.896, 5.597.688, 5.591.829, 5.558.865, 5.514.541, 5.510.264, 5.478.753, 5.374.518, 5.374.516, 5.344.755, 5.332.567, 5.300.433, 5.296.347, 5.286.852, 5.264.221, 5.260.308, 5.256.561.5.254.457, 5.230.998, 5.227.159, 5.223.408, 5.217.895, 5.180.660, 5.173.399, 5.169.752, 5.166.050, 5.156.951.5.140.105, 5.135.864, 5.120.640, 5.108.904, 5.104.790, 5.049.389, 5.030.718, 5.030.555, 5.004.697, 4.983.529, 4.888.290, 4.886.742 y 4.853.326, también son útiles para la presente invención.

En un ejemplo, el epítipo es un epítipo del VIS. El experto en la materia entiende que cualquier cosa que se refiera al VIH en la memoria descriptiva también se aplica al VIS. En una realización ventajosa, el epítipo del VIS es un fragmento de una proteína de la presente invención, sin embargo, la presente invención puede englobar antígenos, epítipos o inmunógenos adicionales del VIS. Ventajosamente, el epítipo del VIS es un antígeno del VIS, incluyendo los antígenos del VIS de las Patentes de Estados Unidos nº 7.892.729; 7.886.962; 7.879.914; 7.829.287; 7.794.998; 7.767.455; 7.759.477; 7.758.869; 7.754.420; 7.749.973; 7.748.618; 7.732.124; 7.709.606; 7.700.342; 7.700.273; 7.625.917; 7.622.124; 7.611.721; 7.608.422; 7.601.518; 7.585.675; 7.534.603; 7.511.117; 7.508.781; 7.507.417; 7.479.497; 7.464.352; 7.457.973; 7.442.551; 7.439.052; 7.419.829; 7.407.663; 7.378.515; 7.364.760; 7.312.065; 7.261.876; 7.220.554; 7.211.240; 7.198.935; 7.169.394; 7.098.201; 7.078.516; 7.070.993; 7.048.929; 7.034.010; RE39.057; 7.022.814; 7.018.638 6.955.919; 6.933.377; 6.908.617; 6.902.929; 6.846.477; 6.818.442; 6.803.231; 6.800.281; 6.797.811; 6.790.657; 6.712.612; 6.706.729; 6.703.394; 6.682.907; 6.656.706; 6.645.956; 6.635.472; 6.596.539; 6.589.763; 6.562.571; 6.555.523; 6.555.342; 6.541.009; 6.531.574; 6.531.123; 6.503.713; 6.479.281; 6.475.718; 6.469.083; 6.468.539; 6.455.265; 6.448.390; 6.440.730; 6.423.544; 6.365.150; 6.362.000; 6.326.007; 6.322.969; 6.291.664; 6.277.601; 6.261.571; 6.255.312; 6.207.455; 6.194.142; 6.117.656; 6.111.087; 6.107.020; 6.080.846; 6.060.064; 6.046.228; 6.043.081; 6.027.731; 6.020.123; 6.017.536; 6.004.781; 5.994.515; 5.981.259; 5.961.976; 5.950.176; 5.929.222; 5.928.913; 5.912.176; 5.888.726; 5.861.243; 5.861.161; 5.858.366; 5.830.475; 5.817.316; 5.804.196; 5.786.177; 5.759.768; 5.747.324; 5.705.522; 5.705.331; 5.698.446; 5.688.914; 5.688.637; 5.654.195; 5.650.269; 5.631.154; 5.582.967; 5.552.269; 5.512.281; 5.508.166; 5.470.572; 5.312.902; 5.310.651; 5.268.265; 5.254.457; 5.212.084; 5.087.631 y 4.978.687.

Los vectores usados deberían elegirse normalmente de tal forma que contengan una región reguladora del gen adecuada, tal como un promotor o un potenciador, de forma que puedan expresarse los antígenos.

Cuando el objetivo es la expresión de antígenos *in vivo* en un sujeto, por ejemplo, con objeto de generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno del VIH-1 y/o una inmunidad protectora frente al VIH-1, deben elegirse los vectores de expresión que son adecuados para su expresión en ese sujeto y que son seguros para su uso *in vivo*. Por ejemplo, en algunas realizaciones puede ser deseable expresar los anticuerpos y/o los antígenos en un animal de laboratorio, tal como para los ensayos preclínicos de las composiciones inmunogénicas y las vacunas contra el VIH-1 de la invención. En otras realizaciones será deseable expresar los antígenos en sujetos humanos, tal como en ensayos clínicos y para un uso clínico real de las composiciones inmunogénicas y de la vacuna de la invención.

Puede emplearse cualquier vector que sea adecuado para dichos usos, y está ampliamente en las capacidades del artesano experto la selección de un vector adecuado. En algunas realizaciones puede preferirse que los vectores usados para estas aplicaciones *in vivo* estén atenuados al vector para la amplificación en el sujeto. Por ejemplo, si se usan vectores de plásmidos, preferentemente carecen de un origen de replicación que funcione en el sujeto, de forma que se mejore la seguridad para su uso *in vivo* en el sujeto. Si se usan vectores víricos, preferentemente están atenuados o tienen una replicación defectuosa en el sujeto, de nuevo para mejorar la seguridad para su uso *in vivo* en el sujeto.

En los aspectos preferidos se usan vectores víricos. Ventajosamente, el vector es un vector de CMV que carece al menos de la glicoproteína UL128, o un vector de CMV que carece al menos de la glicoproteína UL130. Cada vector de CMV también expresa la glicoproteína UL131.

Los vectores de CMV divulgados pueden ser administrados *in vivo*, por ejemplo, cuando se aspira a producir una respuesta inmunogénica, incluyendo una respuesta inmunitaria CD8⁺, incluyendo una respuesta inmunitaria caracterizada por un alto porcentaje de respuesta de los linfocitos T CD8⁺ contra el antígeno heterólogo dirigida contra los epítomos presentados por el MHC de la clase II en un sujeto. Por ejemplo, en algunas realizaciones puede desearse el uso de los vectores de CMV divulgados en un animal de laboratorio, tal como en macacos rhesus, para los ensayos preclínicos de las composiciones inmunogénicas y de las vacunas que usan el RhCMV. En otras realizaciones será deseable usar los vectores de CMV divulgados en sujetos humanos, tales como en ensayos clínicos o para el uso clínico real de las composiciones inmunogénicas que usan el HCMV.

Para dichas aplicaciones *in vivo*, los vectores de CMV divulgados se administran en forma de un componente de una composición inmunogénica que comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones inmunogénicas de la solicitud son útiles para estimular una respuesta inmunitaria contra el antígeno heterólogo, incluyendo un antígeno específico de un patógeno, y pueden usarse en forma de uno o más componentes de una vacuna profiláctica o terapéutica contra el VIH-1 para la prevención, la mejora o el tratamiento del SIDA. Los ácidos nucleicos y los vectores de la solicitud son particularmente útiles para proporcionar vacunas genéticas, es decir, unas vacunas para la administración de ácidos nucleicos que codifican los antígenos de la invención a un sujeto, tal como un ser humano, de forma que los antígenos sean después expresados en el sujeto para desencadenar una respuesta inmunitaria.

Las composiciones de la invención pueden ser suspensiones inyectables, soluciones, aerosoles, polvos liofilizados, jarabes elixires y similares. Puede usarse cualquier forma de composición adecuada. Para preparar dicha composición, se mezcla un ácido nucleico o un vector de la invención que tenga el grado de pureza deseado con uno o más portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los portadores y los excipientes deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la composición. Algunos portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y las concentraciones empleadas, e incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, o combinaciones de los mismos, tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); un polipéptido de bajo peso molecular (menor de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparragina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN® PLURONICS® o polietilenglicol (PEG).

Una composición inmunogénica o inmunológica también puede ser formulada en forma de una emulsión de aceite en agua. La emulsión de aceite en agua puede basarse, por ejemplo, un aceite de parafina líquida ligera (del tipo de la Farmacopea Europea); aceite de isoprenoides tal como escualano, escualeno, EICOSANE TM o tetraetracontano; el aceite resultante de la oligomerización de alqueno(s), por ejemplo, isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, tales como aceites vegetales, oleato de etilo, di(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos o de alcoholes ramificados, por ejemplo, ésteres del ácido isoesteárico. El aceite se usa ventajosamente junto con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes pueden ser tensioactivos no iónicos, tales como ésteres de sorbitano, manida (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), glicerol, poliglicerol, propilenglicol, y ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico o hidroxisteárico, que opcionalmente están etoxilados, y copolímeros en bloque de polioxipropileno-polioxietileno, tales como los productos Pluronic®, por ejemplo, L121. El adyuvante puede ser una mezcla de emulsionantes, un agente formador de micelas, y un aceite tal como el que está disponible en el mercado con el nombre Provac® (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA).

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

También pueden incluirse adyuvantes. Algunos adyuvantes incluyen sales minerales (por ejemplo, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, $\text{AlNa}(\text{SO}_4)_2$, $\text{Al-NH}(\text{SO}_4)_2$, sílice, alumbre, $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, caolín o carbón), polinucleótidos con o sin complejos inmunoestimulantes (ISCOM) (por ejemplo, oligonucleótidos de CpG, tales como los descritos en Chuang. T. H. *et al.*, (2002) *J. Leuk. Biol.* 71 (3): 538-44; Ahmad-Nejad, P. *et al.*, (2002) *Eur. J. Immunol.* 32 (7): 1958-68; ácidos poli IC o poli AU, poliarginina con o sin CpG (también conocida en la materia como IC31; véase Schellack. C. *et al.*, (2003) *Proceedings of the 34th Annual Meeting of the German Society of Immunology*; Lingnau. K. *et al.*, (2002) *Vaccine* 20 (29-30): 3498-508). JuvaVax® (Patente de Estados Unidos nº 6.693.086), algunas sustancias naturales (por ejemplo, la cera D de *Mycobacterium tuberculosis*, las sustancias que se encuentran en *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis* o los miembros del género *Brucella*), flagelina (ligando del receptor de tipo Toll 5; véase McSorley, S. J. *et al.*, (2002) *J. Immunol.*, 169 (7): 3914-9), saponinas tales como QS21, QS17 y QS7 (Patentes de Estados Unidos nº 5.057.540; 5.650.398; 6.524.584; 6.645.495), monofosforil lípido A, en particular el monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL), imiquimod (también conocido en la materia como IQM y disponible comercialmente como Aldara®; las Patentes de Estados Unidos nº 4.689.338; 5.238.944; Zuber. A. K. *et al.*, (2004) 22 (13-14): 1791-8), y el inhibidor del CCR5 CMPD167 (véase Veazey. R. S. *et al.*, (2003) *J. Exp. Med.* 198: 1551-1562). El hidróxido o los fosfatos de aluminio (alumbre) se usan habitualmente en una solución a entre el 0,05 y el 0,1 % en solución salina tamponada con fosfato. Otros adyuvantes que pueden usarse, especialmente con vacunas de ADN, son la toxina colérica, especialmente CTA1-DD/ISCOM (véase Mowat. A. M. *et al.*, (2001) *J. Immunol.* 167 (6): 3398-405), polifosfazenos (Allcock. H. R. (1998) *App. Organometallic Chem.* 12 (10-11): 659-666; Payne. L.G. *et al.*, (1995) *Pharm. Biotechnol.* 6: 473-93), citocinas tales como la IL-2, la IL-4, el GM-CSF, la IL-12, la IL-15, el IGF-1, el IFN- α , el IFN- β y el IFN- γ (Boyer *et al.*, (2002) *J. Liposome Res.* 121: 137-142; documento WO01/095919), proteínas inmunorreguladoras tales como la CD40L (ADX40; véase, por ejemplo, el documento WO03/063899), y el ligando CD1a de los linfocitos citotóxicos naturales (conocido también como CRONY o α -galactosil ceramida; véase Green. T. D. *et al.*, (2003) *J. Virol.* 77 (3): 2046-2055), proteínas de fusión de inmunoestimulantes tales como la IL-2 fusionada con el fragmento Fc de inmunoglobulinas (Barouch *et al.*, *Science* 290: 486-492, 2000) y las moléculas coestimulantes B7.1 y B7.2 (Boyer), todos los cuales pueden ser administrados tanto en forma de proteínas como en forma de ADN en los mismos sectores víricos que los que codifican los antígenos de la invención, o en vectores de expresión por separado. Alternativamente, las vacunas de la invención pueden ser proporcionadas y administradas sin ningún adyuvante.

Las composiciones inmunogénicas pueden estar diseñadas para introducir los vectores de CMV en un sitio de acción deseado y liberarlo a una velocidad apropiada y controlable. Los métodos para la preparación de formulaciones de liberación controlada son conocidos en la materia. Por ejemplo, las preparaciones de liberación controlada pueden producirse mediante el uso de polímeros para complejar o absorber el inmunógeno y/o la composición inmunogénica. Una formulación de liberación controlada puede ser preparada usando las macromoléculas apropiadas (por ejemplo, poliésteres, poliaminoácidos, polivinilo, pirrolidona, acetato de etilvinilo, metil celulosa, carboximetil celulosa o sulfato de protamina) conocidas por proporcionar las características de liberación controlada o el perfil de liberación deseados. Otro método posible para controlar la duración de la acción mediante una preparación de liberación controlada es la incorporación de los principios activos en partículas de un material polimérico tal como, por ejemplo, poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de estos ácidos o copolímeros de acetato de etilvinilo. Alternativamente, en lugar de incorporar estos principios activos en partículas poliméricas, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante una polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetil celulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, albúmina, microesferas, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en *New Trends and Developments in Vaccines*, Voller *et al.*, (eds.), University Park Press, Baltimore, Md., 1978, y en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición.

Las dosis adecuadas de los vectores de CMV de las composiciones inmunogénicas pueden ser fácilmente determinadas por los expertos en la materia. Por ejemplo, las dosis de los vectores de CMV pueden variar dependiendo de la vía de administración y del tamaño del sujeto. Las dosis adecuadas pueden ser determinadas por los expertos en la materia, por ejemplo, midiendo la respuesta inmunitaria de un sujeto, tal como un animal de laboratorio, usando las técnicas inmunológicas convencionales, y ajustando las dosis según sea apropiado. Dichas técnicas para la medición de la respuesta inmunitaria del sujeto incluyen ensayos de liberación de cromo, ensayos de unión de tetrámero, ensayos ELISPOT del IFN- γ , ensayos ELISPOT de la IL-2, ensayos de citocina intracelular y otros ensayos de detección inmunológicos, por ejemplo, según se detalla en el texto "Antibodies: A Laboratory Manual" de Ed Harlow y David Lane.

Las composiciones inmunogénicas pueden ser administradas usando cualquier método de administración adecuado que incluye una administración intramuscular, intravenosa, intradérmica, mucosa y tópica. Dichas técnicas son bien conocidas por los expertos en la materia. Algunos ejemplos más específicos de los métodos de administración son una inyección intramuscular, una inyección intradérmica y una inyección subcutánea. Sin embargo, la administración no tiene por qué estar limitada a los métodos de inyección.

Los programas (o regímenes) de inmunización son bien conocidos para animales (incluyendo seres humanos) y pueden ser fácilmente determinados para el sujeto y la composición inmunogénica en particular. Por lo tanto, los

inmunógenos pueden ser administrados una o más veces al sujeto. Preferiblemente, hay un intervalo de tiempo establecido entre las administraciones separadas de la composición inmunogénica. Aunque este intervalo varía para cada sujeto, normalmente varía entre 10 días y varias semanas, y a menudo es de 2, 4, 6 u 8 semanas. En los seres humanos, el intervalo es normalmente de entre 2 y 6 semanas. En una realización particularmente ventajosa de la presente invención, el intervalo es más largo, ventajosamente de aproximadamente 10 semanas, 12 semanas, 14 semanas, 16 semanas, 18 semanas, 20 semanas, 22 semanas, 24 semanas, 26 semanas, 28 semanas, 30 semanas, 32 semanas, 34 semanas, 36 semanas, 38 semanas, 40 semanas, 42 semanas, 44 semanas, 46 semanas, 48 semanas, 50 semanas, 52 semanas, 54 semanas, 56 semanas, 58 semanas, 60 semanas, 62 semanas, 64 semanas, 66 semanas, 68 semanas o 70 semanas.

Los regímenes de inmunización normalmente tienen entre 1 y 6 administraciones de la composición inmunogénica, pero pueden tener tan pocas como una, o dos o cuatro. Los métodos de inducción de una respuesta inmunitaria también pueden incluir la administración de un adyuvante con los inmunógenos. En algunos casos, una inmunización de recuerdo anual, bianual u otro intervalo más largo (5-10 años) puede complementar el protocolo de inmunización inicial.

Los presentes métodos también incluyen una diversidad de regímenes de sensibilización, por ejemplo, regímenes de sensibilización con ADN de adenovirus. En estos métodos, una o más inmunizaciones de sensibilización están seguidas por una o más inmunizaciones de refuerzo. La composición inmunogénica real puede ser igual o diferente para cada inmunización, y el tipo de composición inmunogénica (por ejemplo, que contiene una proteína o un vector de expresión), la vía y la formulación de los inmunógenos también puede variar. Por ejemplo, si se usa un vector de expresión para las etapas de sensibilización y de refuerzo, puede ser del mismo tipo o de uno diferente (por ejemplo, ADN o un vector de expresión bacteriano o vírico). Un régimen de sensibilización útil proporciona dos inmunizaciones de sensibilización con cuatro semanas de diferencia, seguidas de dos inmunizaciones de refuerzo a las 4 y 8 semanas después de la inmunización de sensibilización. También puede ser fácilmente evidente para el experto en la materia que hay numerosas permutaciones y combinaciones que están englobadas mediante el uso del ADN, los vectores de expresión bacterianos y víricos de la invención, para proporcionar unos regímenes de sensibilización y de refuerzo. En el caso de que los vectores víricos expresen la US2-11 o alguno de los genes codificados en la región US2-11, puede ser usados repetidamente al expresar antígenos diferentes derivados de diferentes patógenos.

La solicitud desvela métodos para la inducción de una respuesta inmunitaria frente a un patógeno en un sujeto mediante la administración de una composición inmunogénica una o más veces a un sujeto, en la que los epítomos son expresados a un nivel suficiente para inducir una respuesta inmunitaria específica en el sujeto. Dichas inmunizaciones pueden repetirse múltiples veces en unos intervalos de tiempo de al menos 2, 4 o 6 semanas (o más) según el régimen de inmunización deseado.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden ser administradas solas, o pueden ser administradas conjuntamente o secuencialmente con otros antígenos, por ejemplo, con "otras" composiciones inmunológicas, antigénicas o de vacuna o terapéuticas, proporcionando así unas composiciones multivalentes o de "cóctel" o de combinación de la invención y los métodos que las emplean. De nuevo, los ingredientes y la forma de la administración (administración secuencial o conjunta), así como las dosis, pueden ser determinados teniendo en consideración factores tales como la edad, el sexo, el peso, la especie y el estado del sujeto en particular, y la vía de administración.

Cuando se usan en combinación, los otros antígenos pueden ser administrados al mismo tiempo o en momentos diferentes como parte de un régimen de inmunización global, por ejemplo, como parte de un régimen de sensibilización o de otros protocolos de inmunización.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de los métodos divulgados. A la luz de esta divulgación, los expertos en la materia reconocerán que serían posibles variaciones de estos ejemplos y de otros ejemplos del método divulgado sin una excesiva experimentación.

Ejemplo 1 – La inmunización con los vectores del RhCMV con la delección de UL128 y de UL130 da como resultado una respuesta inmunitaria caracterizada por una gran diversidad de epítomos de los linfocitos T CD8⁺ contra un antígeno del VIS.

Se compararon los perfiles de direccionamiento al epítipo de las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ específicas del SIVgag desencadenadas por los vectores RhCMV/gag derivados de la cepa del RhCMV 68-1, que carece de las UL128 y UL130 activas (Δ UL128-130), pero que comprende una UL131 activa (Hansen. SG *et al.*, J Virol 77, 6620 (2003)) con las desencadenadas por vectores más convencionales, así como por el propio VIS. Se usó una tinción de citocina intracelular citométrica de flujo para cuantificar individualmente las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ a cada uno de los 125 péptidos consecutivos de 15 mer (con un solapamiento de 11 aminoácidos) que cubren la totalidad de la proteína SIVgag. Se usó un total de veintinueve macacos rhesus (MR): catorce fueron vacunados con

el vector Δ UL128-130 RhCMV/gag. Cuatro fueron vacunados con ADN/gag electroporado + interleucina (IL)-12. Tres fueron vacunados con el adenovirus (Ad)5/gag y otros tres con el virus de la variolovacuna (MVA)/gag. Otros cinco animales fueron infectados previamente con el VIS (SIVmac239) con un control vírico espontáneo.

Los linfocitos T CD8⁺ de la sangre periférica de los MR vacunados con el vector Δ UL128-130 RhCMV/gag respondieron a una media de 46 de los 125 péptidos del SIVgag de 15 mer ensayados. Esto se corresponde con una media de aproximadamente 35 epítomos distintos (Figura 1A). Por el contrario, los controles infectados con el VIS y los MR vacunados con ADN/gag electroporado + IL-12, Ad5/gag y MVA/gag respondieron a una media de 10-19 péptidos, lo que se corresponde con una media de 9-15 epítomos distintos. La amplitud de las respuestas en los MR vacunados con el vector Δ UL128-130 RhCMV/gag era tan grande que muchos de los péptidos del SIVgag de 15 mer fueron el objetivo de los linfocitos T CD8⁺ en casi todos o incluso en todos los 14 animales exogámicos estudiados (Figura 1A).

Para determinar si este hallazgo refleja un reconocimiento promiscuo de un único epítomo común ("supertopo") o simplemente un reconocimiento de "puntos críticos" de los linfocitos T (epítomos múltiples solapantes pero diferentes), se analizó la respuesta a una serie de péptidos truncados. Estos péptidos truncados se correspondían con 7 de los 15 mers reconocidos en 3 MR por respuesta. Después se usaron para la identificación de los epítomos centrales en cada MR (Figura 1B).

Se observaron dos patrones de respuesta distintos mediante el uso de los péptidos truncados: un primer tipo de patrón de respuesta, denominado en el presente documento de tipo 1, se define como un patrón en el que las frecuencias de la respuesta cayeron abruptamente con la pérdida de un aminoácido crítico. Estos truncamientos normalmente dieron como resultado un epítomo central de 9 mer (por ejemplo, Gag₂₅₉₋₂₆₇, Gag₂₇₆₋₂₈₄, y Gag₄₈₂₋₄₉₀). Un segundo tipo de respuesta, denominada de tipo 2, se define en el presente documento como un patrón en el que las frecuencias de respuesta decaen gradualmente según se trunca la secuencia óptima. Estos truncamientos normalmente dieron como resultado un epítomo central de 12mer (Gag₄₁₋₅₂, Gag₂₁₁₋₂₂₂, Gag₂₉₀₋₃₀₁, Gag₄₉₅₋₅₀₆). Estos patrones de respuesta al truncamiento y los péptidos centrales eran los mismos en todos los MR estudiados para cada respuesta, y en todos los casos, los péptidos centrales manifestaron una estimulación superior (unas mayores frecuencias de respuesta) que el 15 mer parental (Figura 1C).

Tomados en conjunto, estos datos sugieren fuertemente que muchos de los epítomos del SIVgag a los que se dirigen los linfocitos T CD8⁺ en los MR vacunados con el vector Δ UL128-130 RhCMV/gag son determinantes específicos que son habitualmente o incluso universalmente reconocidos a lo largo de haplotipos dispares del MHC. De hecho, se encontró una respuesta detectable de los linfocitos T CD8⁺ al péptido central (óptimo) para 5 de estos 15 mers truncados (incluyendo los patrones de truncamiento tanto de tipo 1 como 2) en el 100 % de los 42 MR exogámicos vacunados con el RhCMV/gag, y respuestas a otros 6 péptidos (dos péptidos óptimos y cuatro de 15 mers) en > 60 % de los MR, respectivamente (Figura 1D). Notablemente, estos epítomos eran raramente reconocidos por los linfocitos T CD8⁺ en los MR infectados de forma convencional por el VIS. Por lo tanto, las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ desencadenadas por el vector Δ UL128-130 RhCMV/gag frente al SIVgag son ~ 3 veces tan amplias con respecto a las respuestas específicas al SIVgag de los linfocitos T CD8⁺ infectados convencionalmente, y se caracterizan únicamente por un frecuente direccionamiento de los ampliamente reconocidos "supertopos".

Ejemplo 2 – Las respuestas de tipo 1 de los CD8⁺ están restringidas al MHC-I. Las respuestas de tipo 2 de los CD8⁺ están restringidas al MHC-II

Los epítomos restringidos por el MHC-I tienen normalmente 8-10 aminoácidos de longitud y tienen unos aminoácidos específicos de la posición que se acoplan en bolsillos de unión (residuos de anclaje) de forma que encajen en un surco de unión de "extremo cerrado" del MHC-1 (Rammensee HG *et al.*, Ann Rev Immunol 11, 213 (1993)) característicos coherentes con el patrón de truncamiento de tipo 1 descrito anteriormente. Por el contrario, el patrón de truncamiento de tipo 2 es más típico de los epítomos restringidos por el MHC II (que normalmente son más largos, habitualmente un > 12 mer central, carecen de residuos de anclaje específicos y son más tolerantes a una heterogeneidad en la longitud (Southwood S *et al.*, J Immunol 160, 3363 (1998) y Chelvanayagam G. Hum Immunol 58, 61 (1997)). Esto sugirió que los linfocitos T CD8⁺ que reconocían los epítomos del VISgag de tipo 2 en los MR vacunados con el vector RhCMV/gag podrían estar restringidos por el MHC-II. A este respecto, mientras que las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ restringidas a la clase II son claramente inusuales, dichas respuestas han sido notificadas previamente tanto en ratones (Mizuochi T *et al.*, J Exp Med 168, 437 (1988); Suzuki H *et al.*, J Immunol 153, 4496 (1994); Matechak EO *et al.*, Immunity 4, 337 (1996); Shimizu T y Takeda S. Eur J Immunol 27, 500 (1997); Tyznik AJ *et al.*, J Exp Med 199, 559 (2004); Pearce EL *et al.*, J Immunol 173, 2494 (2004)) como en seres humanos (Heemskerk M H *et al.*, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 98, 6806 (2001); Rist M *et al.*, Blood 114, 2244 (2009); Hirose T *et al.*, Cancer Sci 102, 1281 (2011)) y se ha establecido que una señalización TCR productiva no requiere un acoplamiento específico co-receptor de los CD4 o los CD8 con el MHC-II o el MHC-I, respectivamente (Viola A *et al.*, J Exp Med 186, 1775 (1997) y Lustgarten J *et al.*, Eur J Immunol 21, 2507 (1991)).

Para investigar la posibilidad de que el Δ UL128-130 RhCMVgag estuviera desencadenando una respuesta de los linfocitos T CD8⁺ restringida al MHC-II frente al gag, se evaluó la capacidad de los anticuerpos monoclonales "de bloqueo" (AcMc) específicos para el MHC-I y el MHC-II, así como del péptido CLIP derivado de la cadena invariante

de unión específica al MHC-II (Sette A. J Exp Med 181, 677 (1995)), para bloquear las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ específicas del epítipo de tipo 1 y de tipo 2 en MR inmunizados con el ΔUL128-130 RhCMV-gag (Figura 2A). La inhibición de las 5 respuestas universales de los linfocitos T CD8⁺ específicas del supertopo por parte de estos reactivos se correspondía de forma precisa con el patrón de truncamiento de tipo 1 frente al 2, con el reconocimiento del linfocito T de los tres epítipos de tipo 2 (Gag₂₁₁₋₂₂₂, Gag₂₉₀₋₃₀₁, Gag₄₉₅₋₅₀₆) bloqueados por los anti-MHC-II y el CLIP, pero no por los anti-MHC-I, y al contrario para el reconocimiento del linfocito T de los 2 epítipos de tipo 1 (Gag₂₇₆₋₂₈₄, Gag₄₈₂₋₄₉₀).

Respuestas específicas al epítipo cartografiadas en la Figura 2A con respecto al bloqueo del MHC-I frente al del MHC-II (Figura 2B, Figura 2C). Como se esperaba, todas las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ en los MR infectados con el VIS y en los MR vacunados con las vacunas convencionales solo fueron bloqueadas con los reactivos dirigidos al MHC-I, mientras que en los MR vacunados con el ΔUL128-130 RhC-MV/VIS, la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ frente a la mayoría de los 15 mers a los que se dirigía (61 %) fue bloqueada específicamente por los inhibidores del MHC-II, dejando una minoría (36 %) bloqueada únicamente por los AcMc contra el MHC-I (con un ~ 3 % de las respuestas indeterminadas).

Para confirmar que las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ bloqueadas por el MHC-II están restringidas al MHC-II – definidas como el reconocimiento del epítipo en cuestión en el contexto del MHC-II –, y para investigar la base de la promiscuidad de estas respuestas a lo largo de MR con MHC dispares, se construyeron líneas celulares que expresan alomorfos rhesus individuales del MHC-II. Los alelos del MHC-II seleccionados fueron expresados por 4 MR vacunados con el RhCMV/gag con unos perfiles de reconocimiento característicos del epítipo del VISgag. Los ensayos de ICS citométrica de flujo demostraron que los pulsos de los transfectantes alomorfos del MHC-II, pero no la línea celular parental negativa para el MHC-II, con péptidos individuales, dieron como resultado una robusta estimulación de los linfocitos T CD8⁺ únicamente de aquellas respuestas clasificadas como asociadas al MHC-II mediante experimentos de bloqueo (Figura 3A), y estas respuestas pudieron ser bloqueadas con los AcMc anti-MHC-II y el péptido CLIP, pero no con los AcMc anti-MHC-I. De forma importante, los alomorfos individuales del MHC-II presentaban múltiples péptidos, y los péptidos individuales eran presentados frecuentemente por múltiples alomorfos del MHC-II (Figura 3A). La capacidad de los alomorfos individuales para presentar múltiples péptidos gag ayuda a explicar la amplitud de estas respuestas restringidas al MHC-II. La capacidad de múltiples alomorfos del MHC-II para presentar muchos de los péptidos individuales sugiere que el reconocimiento común de estos péptidos por parte de los linfocitos T CD8⁺ desencadenados por el vector RhCMV/gag a través de los MR con el MHC dispar (por ejemplo, su carácter de supertopo) es explicada probablemente porque todos los MR expresan al menos un alomorfo eficaz del MHC-II para cada respuesta.

Como se ha notificado previamente para las respuestas de los linfocitos T CD4⁺ restringidas al MHC-II (Corradin C y Lanzaveccia A, Int Rev Immunol 7, 139 (1991)), los linfocitos T CD8⁺ restringidos por el MHC-II específicos del VISgag desencadenados por los vectores RhCMV/gag pueden responder a su epítipo peptídico específico en el contexto de alomorfos del MHC-II de unión al péptido que no son expresados por el linfocito T donante (Figuras 3A y 3B), lo que indica que el TCR de estos linfocitos T reconoce el péptido unido solo o junto con estructuras no polimórfas de la molécula del MHC-II.

Ejemplo 3 - Fenotipo y función de las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ desencadenadas por el vector ΔUL128-130 RhCMV/VIS

La inusual especificidad de epítipo de los linfocitos T CD8⁺ específicos del VIS generados y mantenidos por la vacunación con el vector RhCMV/VIS hace surgir la cuestión de su potencial funcional, especialmente la población no convencional restringida al MHC-II que domina estas respuestas. En primer lugar, a este respecto, estas respuestas específicas de supertopo de los linfocitos T CD8⁺ no son un artefacto de las altas concentraciones de péptido usadas en los ensayos convencionales de ICS, ya que las respuestas a los péptidos óptimos, tanto de tipo 1 como de tipo 2, pueden ser demostradas a unas diluciones del péptido de 1:10⁵ y mayores (Figura 4A). En segundo lugar, las respuestas específicas de supertopo de tipo 1 y de tipo 2 aparecen inmediatamente después de la vacunación (Figura 4B) y están distribuidas de forma coordinada por todo el cuerpo con el patrón notificado previamente para los MR vacunados con el vector RhCMV/VIS (Hansen SG *et al.*, Nature 473, 523 (2011); incorporado como referencia en el presente documento (Figuras 4C y 4D). En tercer lugar, como se ha notificado previamente para los linfocitos T CD8⁺ específicos del RhCMV y los linfocitos T específicos del VIS desencadenados por el vector RhCMV/VIS (Hansen SG *et al.*, Nat Med 15, 293 (2009)), los linfocitos T tanto de tipo 1 como de tipo 2 específicos de supertopo manifiestan un fenotipo idéntico indicativo de la diferenciación efectora de memoria del linfocito T (CCR7⁻, CD28⁻) y un perfil polifuncional idéntico coherente con este fenotipo de memoria efectora – una elevada producción de TNF, de IFN-γ y de MIP-1α, una elevada externalización del CD107 (desgranulación) y una baja producción de IL-2 (Figuras 4E y 4F). Dado que se cree que la diferenciación de la memoria efectora está dirigida por el Ag, estos datos sugieren que en los MR vacunados, estos linfocitos T CD8⁺ reciben una exposición equivalente *in vivo* a los epítipos de tipo 1 y de tipo 2.

Ejemplo 4 - Control del direccionamiento a UL128 y a UL130 de las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ desencadenadas por el CMV

Para identificar los genes candidatos del CMV asociados con, y potencialmente responsables de, esta respuesta inmunitaria inusual de los CD8⁺, en primer lugar nos preguntamos si las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ frente a una proteína inmediatamente temprana (IE) endógena del CMV también se dirigían a los epítomos no convencionales (en particular, a los supertopos restringidos por el MHC-II). Esto se determina mediante la valoración de los MR infectados de forma natural con el RhCMV natural (cepas circulantes en las colonias) y de los MR vacunados con el ejemplo de vector RhCMV/VIS de la cepa deficiente ΔUL128-130 68.1. Como era de esperar, los MR vacunados con el vector ΔUL128-130 mostraron algunas respuestas de los linfocitos T CD8⁺ específicas de la IE con unas características de direccionamiento idénticas a las de las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ específicas del VISgag en el mismo MR: > 30 epítomos distintos de la IE/MR, incluyendo una mayoría de respuestas específicas de epítomo, que fueron bloqueadas con anti-MHC-II, y una minoría bloqueadas con anti-MHC-I.

Sin embargo, en sorprendente contraste, las respuestas específicas de los linfocitos T CD8⁺ específicos de la IE en MR infectados de forma natural por el RhCMV estaban dirigidas de una forma mucho más estrecha (~ 8 epítomos/MR), y no mostraron ningún signo de restricción del MHC-II ni de promiscuidad del epítomo (Figuras 5A, 5B y 5C), lo que es coherente con las jerarquías de inmunodominancia convencionales. Estos hallazgos probablemente justifican por qué no se han notificado respuestas de los linfocitos T CD8⁺ específicas del CMV no dirigidas de forma convencional en MR expuestos de forma natural al CMV⁺ y en seres humanos (a pesar del considerable análisis de estas respuestas) y lo más importante, implican diferencias genéticas entre los vectores de RhCMV basados en la cepa deficiente ΔUL128-130 68.1 y los RhCMV que contienen el ΔUL128-130 natural en el (los) mecanismo(s) responsable(s) de la generación de las respuestas dirigidas no convencionales de los linfocitos T CD8⁺.

Para evaluar el papel de estos genes en el direccionamiento de los linfocitos T CD8⁺ durante la sensibilización, se generó un vector RhCMV/gag en el que se restableció la expresión de los ortólogos UL128 y UL130 (Lilja AE *et al.*, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 105, 19950 (2008). Después nos preguntamos si esta "reparación" de la expresión de los ortólogos UL128 y UL130 cambiaba los perfiles de direccionamiento al epítomo de las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ específicas de gag desencadenadas por el vector. De hecho, las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ específicas de VISgag desencadenadas por el vector RhCMV/gag con los UL128 y UL130 reparados, que no incluían el reconocimiento de ninguno de los supertopos definidos previamente del MHC-I o del MHC-II, estaban dirigidas de una forma mucho más estrecha que la respuesta desencadenada por el vector no reparado de la cepa 68.1 (que carece de la expresión ortóloga de UL128-UL130), y están totalmente asociadas al MHC-I (Figuras 5D, 5E y 5F).

Ejemplo 5 - Los vectores de CMV con deleciones individuales de UL128 o de UL130 muestran unas respuestas de los CD8 caracterizadas por una restricción de la clase II, los vectores de CMV con una única delección de UL131 es incapaz de una superinfección

La cepa del RhCMV 68.1 se pasó múltiples veces en un cultivo de fibroblastos antes de su uso en la construcción del vector RhCMV/VIS y difiere de la cepa de campo original porque carece de parte del gen UL130 y de la totalidad del gen UL128 (Gill *et al.*, Virology 447, 208 (2013)). Los genes de UL128 y de UL130 están codificados en un único ARNm junto con el UL131 en el orden 5'-UL131-UL130-UL128-3' (Lilja AE *et al.*, 2008, *supra*). Dado que estos tres genes están codificados por este único ARNm "poli-cistrónico", y dado que la totalidad del extremo 3' de este ARNm está ausente en 68-1, previamente se pensó en Hansen SG *et al.*, Science 340, 1237874 doi, 24 de mayo de 2013, que 68.1 podría carecer de la expresión de los tres ortólogos activos del RhCMV de los genes del HCMV UL128, 130 y 131 (Rh157.6, 157.4 y 157.5). Para determinar la función individual de UL128, UL130 y UL131 en la modulación de la sensibilización de los linfocitos T CD8⁺ restringidos por el MHC-II, generamos unos vectores RhCMV/VISgag que carecen de cada uno de estos genes individualmente. Usando el virus RhCMV-68-1.2 con el UL128-130 "reparado" (Lilja *et al.*, 2008, *supra*) como nuestro punto de partida, generamos ΔUL128RhCMV/gag, ΔUL130/RhCMVgag y ΔUL131/RhCMVgag e inoculamos cada una de estas construcciones en dos MR que ya estaban infectados de forma natural por el RhCMV. Según se muestra en la Figura 6, el RhCMV que carece del UL128 pero que contiene el UL130 y el UL131 indujo una respuesta del linfocito T frente al VISgag en ambos animales. De forma análoga, el RhCMV que carece del UL130 pero que contiene el UL131 y el UL128 indujo una respuesta del linfocito T frente al VISgag en ambos animales. Por el contrario, el RhCMV que carece del UL131 pero que contiene los genes UL130 y UL128 intactos fue incapaz de inducir una respuesta inmunitaria en animales positivos para el CMV. Estos datos sugieren que es necesario un gen UL131 funcional para la superinfección de animales positivos para el CMV. Dado que el RhCMV 68-1 es capaz de una superinfección, este resultado también demuestra que el RhCMV 68-1 contiene un UL131 funcional a pesar de la delección de parte del ARNm policistrónico coherente con que el RhCMV 68-1 sea un vector ΔUL128-130. Para determinar adicionalmente si los vectores portadores de deleciones individuales de UL130 o de UL128 desencadenarían los linfocitos T CD8⁺ dirigidos al MHC-II, monitorizamos la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ a los 25 péptidos solapantes de 15 mer que se corresponden con la parte amino terminal de VISgag en presencia de anticuerpos de bloqueo del MHC-I o del MHC-II. Según se muestra en la Figura 7, se observaron unas respuestas de los linfocitos T CD8⁺ restringidas tanto al MHC-I como al MHC-II frente a los péptidos individuales. Estos resultados demuestran que los vectores con una

única delección que carecen del UL128 o del UL130 pero que contienen el UL131 son capaces de inducir unas respuestas no convencionales del linfocito T.

Ejemplo 6 - Los vectores de CMV con una delección Δ UL128-130 que comprenden antígenos de Mycobacterium tuberculosis muestran unas respuestas de los CD8⁺ caracterizadas por una restricción de la clase II

En los ejemplos anteriores hemos demostrado que los vectores que carecen de UL128 y/o de UL130 inducen unos linfocitos T CD8⁺ no convencionales restringidos por el MHC-II en lugar de lo observado más habitualmente MHC-I frente a los antígenos víricos, tales como la proteína CMV-IE o la proteína VISgag. Para determinar si los vectores Δ UL128-130 también son capaces de inducir los linfocitos T CD8⁺ restringidos por el MHC-II frente a antígenos bacterianos, insertamos una proteína de fusión de dos antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* en los vectores Δ UL128-130. El vector resultante RhCMV/TB codifica la proteína de fusión de 50 kDa de *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 y el antígeno 85B (Derrick SC *et al.*, Vaccine 23, 780-788 (2004)). La ESAT6 es una proteína secretora temprana, mientras que el antígeno 85B se une y es la proteína más abundante expresada por *Mycobacterium tuberculosis* (Brandt. J Immunol 157, 3527 (1996)). A tres MR se les inoculó el vector RhCMV/TB derivado de RhCMV68-1 y se monitorizó la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ frente a los péptidos individuales en presencia de anticuerpos de bloqueo del MHC-I o del MHC-II. Según se muestra en la Figura 8, cada uno de los animales vacunados desarrolló respuestas de los linfocitos T CD8⁺ frente a ambos antígenos, estando algunos de los linfocitos T CD8⁺ restringidos por el MHC-I, mientras que otros estaban restringidos por el MHC-II. Estos datos demuestran por lo tanto que la capacidad de inducir linfocitos T CD8⁺ restringidos por el MHC-II por parte de los vectores de CMV que carecen de UL128 y de UL130 no está confinada a los antígenos víricos, sino que puede ser expandida a otros antígenos heterólogos, incluyendo antígenos bacterianos.

Ejemplo 7 – La inoculación secuencial de vectores con la delección UL128-130 y que contienen UL128-130 aumenta la cobertura de epítipo de los antígenos heterólogos

En los ejemplos anteriores hemos demostrado que los vectores que carecen de UL128-130 inducen unos linfocitos T CD8⁺ restringidos tanto al MHC-I como al MHC-II, mientras que los vectores con el UL128-130 intacto únicamente inducen unos linfocitos T CD8⁺ restringidos por el MHC-I. Para determinar si la inoculación secuencial con vectores portadores del mismo antígeno pero que difieren con respecto a la presencia de UL128 y de UL130, inoculamos secuencialmente dos MR vacunados previamente con el Δ UL128-130 (68-1) con otra ronda de vectores RhCMV Δ UL128-130 (68-1) seguidos por el UL128-130 "reparado" (68-1.2). Todos los vectores expresaban el VISgag. Mientras que la respuesta global de los linfocitos T CD8⁺ frente al VISgag era potenciada por la revacunación con los vectores tanto con el Δ UL128-130 (derivado de 68-1) como con el UL128-130 reparado (derivado de 68-1.2), las respuestas frente a los péptidos individuales presentes en cada animal debidas a la vacunación previa con los vectores 68-1/VISgag fueron potenciadas por los vectores 68-1/VISgag, pero no por los vectores 68-1.2/VISgag (Figura 9, panel superior). Dado que los péptidos individuales eran reconocidos por los linfocitos T CD8⁺ restringidos tanto por el MHC-I como por el MHC-II, estos datos demuestran que el espectro de epítipo inducido por los vectores que carecen del UL128 y del UL130 no se superpone con el de los vectores que contienen el UL128 y el UL130 intactos, incluso para los linfocitos T restringidos al MHC-I. Este resultado sugirió adicionalmente que la vacunación secuencial del mismo individuo con vectores con el UL128/130 deleccionado y el UL128-130 intacto, portadores del mismo antígeno, inducirá una respuesta mucho más amplia del linfocito T en comparación con la inoculación de los vectores individuales. Esta conclusión se apoyó cuando se monitorizaron las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ frente a epítipos individuales del VISgag en estos dos MR después de una única vacunación con 68-1/gag, de una revacunación con 68-1/gag y de una vacunación con 68-1.2/gag. Según se muestra en el panel inferior de la Figura 9, tanto la revacunación con el mismo tipo de vector como la vacunación con un vector que difiere en su composición de UL128-130 endógena indujeron nuevos linfocitos T que reconocen epítipos adicionales del VISgag mientras mantienen las respuestas del linfocito T de las vacunaciones previas. Teniendo en consideración que cada uno de los epítipos centrales tiene 9-12 aminoácidos de longitud y que el VISgag codifica 510 aminoácidos, los 45-52 epítipos inducidos con la estrategia de vacunación secuencial en estos animales representan una cobertura de aproximadamente el 90 % de la totalidad de la secuencia polipeptídica del VISgag. Hasta donde sabemos, este nivel de cobertura de epítipo no ha sido observado previamente con ningún otro sistema de vector.

Ejemplo 8 - Materiales y métodos

Animales:

En este estudio se usó un total de 165 macacos rhesus (*Macaca mulatta*) juveniles machos o hembras criados para este fin con ancestros genéticos indios, incluyendo 110 macacos vacunados con los vectores RhCMV/VIS de la cepa 68-1 (natural o modificada genéticamente, sola o después de una sensibilización heteróloga con vacunas convencionales o una infección por el VIS suprimida víricamente), 47 macacos sólo con una infección por el VIS (SIVmac239 o SIVmac251), y 8 macacos no vacunados que fueron infectados de forma natural con cepas del RhCMV que circulan en la colonia. Todos los macacos fueron usados con la aprobación del Oregon National Primate Research Center Institutional Animal Care and Use Committee, bajo las directrices de la NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Los macacos usados en estos experimentos estaban exentos del herpesvirus cercopithicine 1, del retrovirus simio de tipo D y del virus simio linfotrópico T de tipo 1. El genotipado del MHC-I para

los alelos Mamu-A*01, Mamu-A*02, Mamu-B*08 y Mamu-B*17 se llevó a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un cebado específico de la secuencia, según se describe en Loffredo JT *et al.*, J Virol 81, 8827 (2007). Los macacos seleccionados fueron genotipados en DRB mediante una secuenciación profunda. En resumen, se crearon los amplicones de la región Mamu-DRB a través de la amplificación del ADNc mediante una PCR con la polimerasa de alta fidelidad Phusion® (NEBiolabs) y un par de cebadores universales específicos para MHC-DRB (5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG (SEQ ID NO: 1)-MID-CTGGTCCTGTCTGTTCTCC (SEQ ID NO: 2); 5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAG (SEQ ID NO: 3)-MID-TGGAAGGTCCAGTCTCCATT (SEQ ID NO: 4)) usando las siguientes condiciones de termociclado: a 98 °C durante 3 min (a 98 °C durante 5 s, a 60 °C durante 10 s, a 72 °C durante 20 s) durante 25 ciclos, y a 72 °C durante 5 min. Los productos primarios de la PCR del ADNc se purificaron usando microesferas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter Genomics). La PCR en emulsión usando un kit Lib-A (Roche/454 Life Sciences), la purificación con microesferas y los procedimientos de pirosecuenciación con el instrumento Roche/454 GS Junior, se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante. El análisis de los datos se llevó a cabo usando una base de datos Labkey junto con el programa bioinformático Geneious-Pro® (Biomatters Ltd.) para el ensamblaje de la secuencia. Las preparaciones de células mononucleares para los ensayos inmunológicos se obtuvieron a partir de sangre, médula ósea, lavado broncoalveolar (LBA), nódulos linfáticos, bazo, hígado, médula ósea y mucosa intestinal, según se describe (Pitcher CJ *et al.*, J Immunol 168, 29 (2002) y Veazey RS *et al.*, Science 280, 427 (1998)). Los linfocitos T CD8⁺ purificados (pureza > 90 %) se obtuvieron a partir de PBMC usando micromicroesferas CD8 y columnas de LS (Miltenyi Biotec). Las cargas físicas plasmáticas de los macacos VIS+ se determinaron mediante una PCR cuantitativa de transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) (60). Los macacos VIS+ fueron considerados controles de VIS si las cargas víricas plasmáticas eran < 2,0 x 10⁴ copias/ml, y controles de élite si las cargas víricas plasmáticas eran < 3,0 x 10³ copias/ml.

Vectores RhCMV/VIS:

La construcción, la caracterización y la administración del RhCMV/VIS derivado de la cepa 68-1 se han descrito con detalle en Hansen SG *et al.*, Nature 473, 523 (2011); Hansen SG *et al.*, Nat Med 15, 293 (2009) y en Hansen SG *et al.*, Science 328, 102 (2010). Todos los virus recombinantes usados en este estudio derivaban de la cepa RhCMV 68-1 BAC excepto el RhCMV (gagL), que fue generado sustituyendo la proteína fluorescente verde (GFP) del RhCMV-EGFP por el casete de expresión VISgag mediante una recombinación *in vivo* en un cultivo tisular. Al contrario que las construcciones derivadas de BAC, el RhCMV gagL contiene un marco abierto de lectura (ORF) intacto, Rh61/Rh60 (UL36), según se describe para el RhCMV68-1 (Malouli D *et al.*, J Virol 86, 8959 (2012) y Hansen SG *et al.*, J Virol 77, 6620 (2003)). Como resultado de la adaptación al cultivo tisular, ambas construcciones Rh-CMV 68-1 BAC y no BAC contienen una delección del ORF 157.5 y de la mayor parte del ORF Rh157.4 que codifican los homólogos del HCMV UL128 y UL130, respectivamente (Oxford KL *et al.*, Virology 373, 181 (2008)). En un RhCMV de bajo pase, estos dos ORF son traducidos a partir del mismo ARNm policistrónico que engloba el Rh157.6 (UL131) (Lilja AE *et al.*, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 105, 19950 (2008)).

Para generar un vector con la expresión reparada UL128-UL130 se insertó el casete de expresión VISgag en Rh211 del RhCMV68-1.2, un virus recombinante en el que se han reparado Rh61/Rh60 (UL36), Rh157.4 (UL130) y Rh157.5 (UL128). El ΔRh182-189 RhCMV/gag ha sido descrito en Hansen *et al.*, 2010, *supra*. De forma análoga ΔRh182-189 RhCMV/rtn y /env mediante la sustitución de la región genómica que codifica el Rh182-189 [pares de bases 193.161 hasta 199.823, usando la anotación del genoma de BAC de Malouli *et al.*, 2012, *supra*] por los casetes de expresión EF1α VISrev/tat/nef o gH VIS/env. Los mutantes de delección parcial ΔRh182-185 RhCMV/gag y /rtn fueron generados mediante la sustitución de los pares de bases 193.161 y 196.305 por un casete de expresión para VISgag o VISrev/tat/nef. Los mutantes de delección parcial ΔRh186-189 RhCMV/gag y rtn fueron construidos mediante la sustitución de los pares de bases 196.593 hasta 199.823 con el casete de expresión VISgag o VISrev/tat/nef. Para generar un RhCMV recombinante que carezca únicamente del Rh189 (US11), sustituimos la región codificante Rh189 por la VISgag del RhCMVrtn. Este rector expresa por lo tanto el VISgag bajo el control del promotor Rh189, y el VISrtn (insertado en Rh211) bajo el control del promotor EF1α (fig. S10). Todos los virus recombinantes fueron caracterizados y confirmados mediante una digestión de restricción, y se verificó la secuencia de los insertos del antígeno que incluía sus regiones flanqueantes. La expresión de los antígenos del VIS fue verificada mediante una inmunotransferencia. Adicionalmente, la expresión del gen adyacente fue verificada mediante una RT-PCR.

Otras vacunas:

Se ha descrito la construcción, la caracterización y la administración de los vectores Ad5/gag usados en este estudio (Hansen *et al.* 2011, *supra*). El MVA/gag fue construido mediante la inserción del gen SIVmac239 gag de longitud completa con los codones optimizados en el vector lanzadera de MVA, pLW44, bajo el control de MH5, un promotor de la variolovacuna temprano/tardío, para generar un plásmido recombinante, el pJV7. Las secuencias flanqueantes del pLW44 dirigían la inserción de la construcción recombinante en el *locus* de la cinasa de timidina mediante una recombinación homóloga. Se transfectaron células de fibroblastos embrionarios de pollo con el pJV7, seguido de la infección con la cepa del MVA 1974 para generar la expresión del virus recombinante SIVmac239 gag (la expresión del VISgag se confirmó mediante una inmunotransferencia Western). El virus recombinante se purificó en placa y se amplificó en un cultivo a gran escala. Las soluciones de los virus se purificaron en un gradiente de sacarosa del 24 al

40 %, seguido de una sedimentación a través de un cojín de sacarosa al 36 %, suspendiéndose después el sedimento en Tris-Cl 1 mM a un pH de 9,0. Para la vacunación con el MVA/gag, a los macacos se les administraron 10⁸ unidades formadoras de placa de este vector a través de una inyección intramuscular. Las vacunas de ADN/gag + IL-12 fueron proporcionadas por Inovio Pharmaceuticals. En resumen, se clonaron las mitades con los codones optimizados de 5' y 3' del SIVmac239 gag de longitud completa en el esqueleto pVAX® (Invitrogen) de forma que la expresión del inserto VISgag era controlada por el promotor/potenciador del CMV humano (HCMV) y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. El adyuvante de IL-12 optimizado para el macaco rhesus se construye a través de la modificación de una versión no optimizada usada previamente de la IL-12 del macaco (63). La modificación incluía la optimización de codones y del ARN únicamente de las secuencias insertadas p35 y p40, lo que se llevó a cabo mediante GeneArt® (Invitrogen). A los macacos se les administró 1 mg de las dos construcciones del VISgag y 0,5 mg de la construcción de la IL-12, siendo el ADN administrado en el músculo cuádriceps seguido de una electroporación *in vivo* usando un dispositivo de corriente constante Celectra® (Inovio Pharmaceuticals Inc.) según se describe (Laddy DL *et al.*, J Virol 83, 4264 (2009)).

15 Antígenos y células presentadoras del antígeno:

La síntesis de los péptidos secuenciales de 15 mer (solapamiento de 11 aminoácidos) que comprende las proteínas VISgag, rev, nef, tat, env y pol, y la proteína RhCMV IE-1, así como los péptidos específicos de entre 9 y 14 mer de estas proteínas, se llevó a cabo mediante Intavis AG® usando la secuencia del SIVmac239 (número de acceso de GenBank M33262) (Kestler H *et al.*, Science 248, 1109 (1990)) o la secuencia del RhCMV IE-1 de la cepa 68-1 (número de acceso del GenBank AY186194) (Hansen SG *et al.*, J Virol 77, 6620 (2003)). Todos los péptidos fueron identificados por la posición de sus aminoácidos incluidos a partir del N terminal (por ejemplo, Gag_{xx-yy}). También se diseñaron 15 mers consecutivos según su posición 15 mer partiendo del 15 mer N terminal (por ejemplo, el Gag₁₋₁₅ es el 15 mer #1; el Gag₄₋₁₉ es el 15 mer #2, etc.). Salvo que se especifique de otro modo, estos péptidos se usaron en ensayos con linfocitos T a 2 µg/ml (tanto solos como en mezclas de pan-proteína). El VIS inactivador con aldritol-2 (AT-2-VIS; lote P4146, AIDS and Cancer Virus Program, Frederick National Laboratory, Frederick, MD) fue producido según se describe (Buseyne F *et al.*, Nat Med 7, 344 (2001)). Las líneas celulares autólogas linfoblastoides B (BLCL) fueron generadas mediante la infección de PBMC de rhesus con el Herpesvirus papio (Voss G *et al.*, J Virol Methods 39, 185 (1992)). Las células autólogas objetivo infectadas por el VIS fueron producidas mediante la espinoculación de linfocitos T CD4⁺ activados con el SIVmac239 purificado con sacarosa, seguido de 4 días de cultivo, y después una purificación con micromicroesferas CD4 y columnas LS (Miltenyi Biotec), según se describe (Sacha JB *et al.*, J Immunol 178, 2746 (2007)). Las preparaciones de células infectadas tenían > 95 % de linfocitos T CD4⁺ y > 50 % de infectados por el VIS después del enriquecimiento, y se usaron en una proporción efector:objetivo de 80:1. La construcción de los transfectantes alomorfos individuales de Mamu-DR se llevó a cabo según se describe (Giraldo-Vela JP *et al.*, J Virol 82, 859 (2008)), excepto porque los alelos del Mamu-DR fueron insertados en el plásmido pCEP4 (Invitrogen) en lugar de en el pcDNC3.1. El Mamu-DRA*01:05 fue emparejado con DRB1*10:07, con DRB1*04:06, DRB1*03:09, con DRB5*03:01, con DRB*w2:01 y con DRB*w26:03; el Mamu-DRA*01:021 fue emparejado con DRB*w4:01. Antes de los ensayos de restricción del MHC-II se extrajo el ARNm de estos transfectantes usando el Mini Kit de ADN/ARN AllPrep® (Qiagen), se amplificó mediante una RT-PCR usando un par de cebadores universales (5'-GACACTGATGGTGCTGAGC-3' - SEQ ID NO: 5 y 5'-GCTGCACTGTGAAGCTCTC-3' - SEQ ID NO: 6) que abarcaban la región altamente polimórfica β1 del Mamu-DRB, y se confirmó su secuencia. A los transfectantes de MHC-II y de BLCL se les pulsó con el péptido Gag de interés a una concentración final de 5 µg/ml durante 90 min (37 °C), después se lavaron dos veces con PBS tibio y una vez con R10 tibio para retirar el péptido no unido antes de ser usados para estimular PBMC recién aisladas en una proporción efector:objetivo de 10:1.

45 Ensayos con linfocitos T:

Las respuestas de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicas para el VIS y el RhCMV se midieron en preparaciones de células mononucleares procedentes de sangre y de tejidos mediante una ICS citométrica de flujo, según se describe con detalle (en Hansen SG *et al.*, 2011, *supra*; en Hansen SG *et al.*, 2009, *supra*, y en Hansen SG *et al.*, 2010, *supra*). En resumen, se incubaron las células mononucleares o los linfocitos T CD8⁺ aislados con el antígeno (péptido, VIS AT-2, BLCL pulsadas con péptido o transfectantes del MHC-II, o linfocitos T CD4⁺ infectados por el VIS) y las moléculas coestimulantes CD28 y CD49d (BD Biosciences) durante 1 hora, seguido de la adición de brefeldina A (Sigma-Aldrich) durante 8 horas adicionales. La coestimulación sin antígeno sirvió como un control de fondo. La asociación con el MHC (MHC-I con respecto al MHC-II) de una respuesta fue determinada mediante la preincubación de células mononucleares aisladas o de APC durante 1 hora a la temperatura ambiente en presencia de AcMc contra el MHC-I (10 µg/ml; clon W6-32) frente a AcMc contra el MHC-II (HLA-DR; clon G46-6) o el péptido CLIP (cadena invariante asociada al MHC-II, aminoácidos 89 hasta 100; 2 µg/ml) antes de añadir los péptidos o de combinar el efector y las células objetivo y de incubar según el ensayo ICS estándar. Las células estimuladas se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron según se describe en Hansen SG *et al.*, 2011, *supra*; en Hansen SG *et al.*, 2009, *supra*, y en Hansen SG *et al.*, 2010, *supra*, y se llevó a cabo un análisis citométrico de flujo con un instrumento LSR-II (BD Biosciences). El análisis se llevó a cabo usando el programa informático FlowJo® (Tree Star). En todos los análisis, la clasificación según la firma de dispersión de luz de los linfocitos pequeños estuvo seguida por la clasificación progresiva de la población CD3⁺ y después por los subconjuntos de linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ frente a los CD4⁺/CD8⁺. Las frecuencias de respuesta específica al antígeno para las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺

fueron determinadas de forma rutinaria a partir de la expresión intracelular del CD69 y uno o ambos del IFN- γ y el TNF- α [en algunos experimentos seleccionados, las respuestas también fueron caracterizadas por la producción intracelular del CD69 y de la IL-2 o de la MIP-1 β , o por la externalización del CD107 (11)]. En otros experimentos seleccionados se generaron las clasificaciones booleanas de (CD69⁺/TNF- α ⁺ y/o CD69⁺/IFN- γ ⁺) y se determinó la expresión del CD28 y del CCR7 en la población de linfocitos T CD8⁺ clasificados (respondedores). Las frecuencias de respuesta se notificaron después de restar el fondo y la corrección de memoria, según se describe (Pitcher CJ *et al.*, J Immunol 168, 29 (2002)). Para los experimentos de deconvolución del epítipo se usaron unos criterios de respuesta más estrictos para prevenir falsos positivos. En estos estudios, una respuesta a un péptido de 15 mer dado se consideraba positiva si la frecuencia de los acontecimientos agrupados como CD69⁺, TNF- α ⁺ y IFN- γ ⁺ era > 0,05 % con un fondo < 0,01 % en al menos dos ensayos independientes. La clasificación de las respuestas al péptido individual como asociadas al MHC-I frente al MHC-II se basaba en una inhibición > 90 % de la respuesta por parte de cualquiera del bloqueo relativo del MHC-I o del MHC-II del control de isotipo. Las respuestas que no cumplían estos criterios se consideraban indeterminadas. Las cifras de los epítipos independientes mínimos fueron estimadas a partir de las respuestas positivas identificadas mediante la prueba de péptidos de 15 mer consecutivos mediante los siguientes criterios: péptido positivo individual = 1 epítipo independiente; 2 péptidos positivos adyacentes = 1 epítipo independiente; 3 péptidos positivos adyacentes = 2 epítipos independientes; 4 péptidos positivos adyacentes = 2 epítipos independientes; y 5 péptidos positivos adyacentes = 3 epítipos independientes. Estas estimaciones del número mínimo de epítipos independientes se llevaron a cabo inicialmente sin el beneficio de los datos de la asociación con el MHC, pero después se revisaron usando los mismos criterios, aplicados independientemente para las respuestas bloqueadas por el MHC-I frente al MHC-II.

Estadística: para las comparaciones de las muestras independientes aplicamos las pruebas de la U de Mann-Whitney bifactorial, conocidas también como las pruebas de la suma de rangos de Wilcoxon. Para comparaciones de una muestra con un valor de hipótesis nulo fijo (tal como los porcentajes comparados con el 100 %), aplicamos las pruebas de la suma de rangos de Wilcoxon de una muestra (Wolfe DA y Hollander M Nonparametric Statistical Methods (Wiley, Nueva York, 1973)). Todas las pruebas se llevaron a cabo como pruebas bilaterales con una tasa de error de tipo I del 5 %. Usamos el lenguaje de computación estadístico R (Rproject (2011)) para todos los análisis estadísticos.

REIVINDICACIONES

1. Un vector de citomegalovirus humano o animal que comprende:

- (a) una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un antígeno proteico heterólogo;
- (b) una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica la UL128 o un ortólogo de la misma; y
- (c) una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica la UL131 o un ortólogo de la misma; en el que el vector no expresa una proteína UL130 activa.

2. Un vector de citomegalovirus humano o animal que comprende:

- (a) una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un antígeno proteico heterólogo;
- (b) una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica la UL130 o un ortólogo de la misma; y
- (c) una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica la UL131 o un ortólogo de la misma; en el que el vector no expresa una proteína UL128 activa.

3. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el vector comprende una mutación en la UL128 o en la UL130 seleccionada entre una mutación puntual, una mutación del marco de lectura o una delección de la totalidad o de menos de la totalidad de la UL128 o de la UL130; y/o que comprende adicionalmente una cuarta secuencia de ácidos nucleicos, en la que la cuarta secuencia de ácidos nucleicos comprende una secuencia antisentido o una secuencia de un ARNi que inhibe la expresión de la UL128 o de la UL130.

4. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el antígeno heterólogo comprende un antígeno específico de un patógeno.

5. El vector de la reivindicación 4 en el que el antígeno específico de un patógeno deriva del virus de la inmunodeficiencia humana, del virus de la inmunodeficiencia de simios o de *Mycobacterium tuberculosis*.

6. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el antígeno heterólogo comprende un antígeno de un cáncer.

7. Una composición para su uso en la inmunización de un sujeto frente a un antígeno específico de un patógeno o de un cáncer, en la que la composición comprende un primer vector de citomegalovirus que comprende:

- (a) una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un primer antígeno heterólogo.
- (b) una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una UL130 activa o un ortólogo de la misma, y
- (c) una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína UL131 activa o un ortólogo de la misma;

en la que el primer vector de citomegalovirus no codifica una proteína UL128 activa.

8. Una composición para su uso en la inmunización de un sujeto frente a un antígeno específico de un patógeno o de un cáncer, en la que la composición comprende un primer vector de citomegalovirus que comprende:

- (a) una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un primer antígeno heterólogo.
- (b) una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína UL128 activa o un ortólogo de la misma, y
- (c) una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína UL131 activa o un ortólogo de la misma.

en la que el primer vector de citomegalovirus no codifica una proteína UL130 activa.

9. La composición para el uso de la reivindicación 7 u 8, en la que el primer antígeno heterólogo comprende un antígeno específico de un patógeno.

10. La composición para el uso de la reivindicación 9, en la que el antígeno específico de un patógeno deriva del virus de la inmunodeficiencia humana, del virus de la inmunodeficiencia de simios o de *Mycobacterium tuberculosis*.

11. La composición para el uso de la reivindicación 7 u 8, en la que el primer antígeno heterólogo comprende un antígeno de un cáncer.

12. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en la que el sujeto ha sido previamente expuesto a un citomegalovirus y/o en la que el sujeto es un ser humano o un primate no humano.

13. La composición para el uso de la reivindicación 7 u 8, en la que la composición comprende adicionalmente un segundo vector de citomegalovirus que comprende una cuarta secuencia de ácidos nucleicos que codifica un segundo antígeno heterólogo.

14. La composición para el uso de la reivindicación 13, en la que el segundo vector de citomegalovirus codifica una proteína UL128 activa y una proteína UL130 activa.

5 15. La composición para el uso de la reivindicación 13 o 14, en la que el primer antígeno heterólogo y el segundo antígeno heterólogo son el mismo antígeno.

Figura 1A

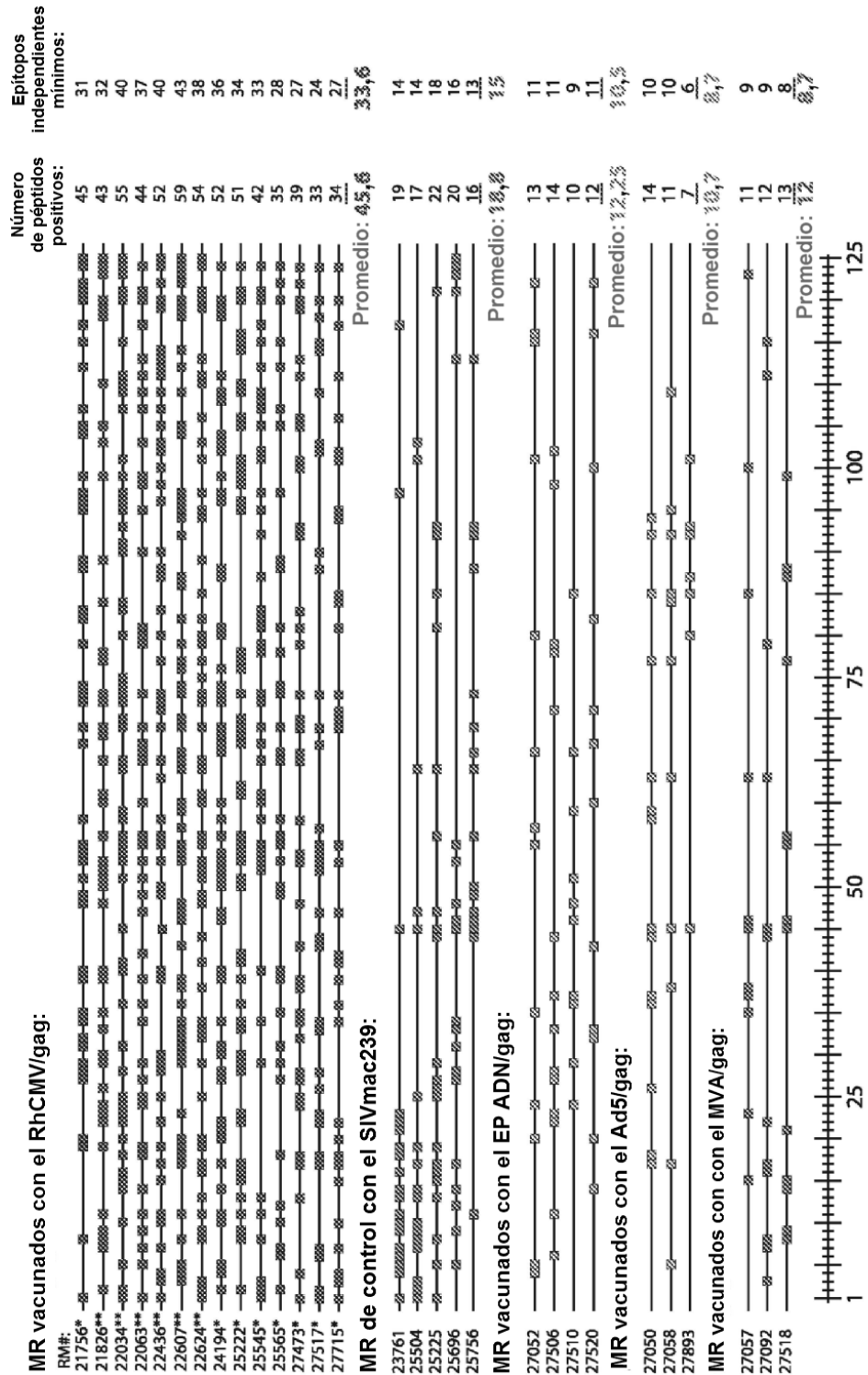


Figura 1B

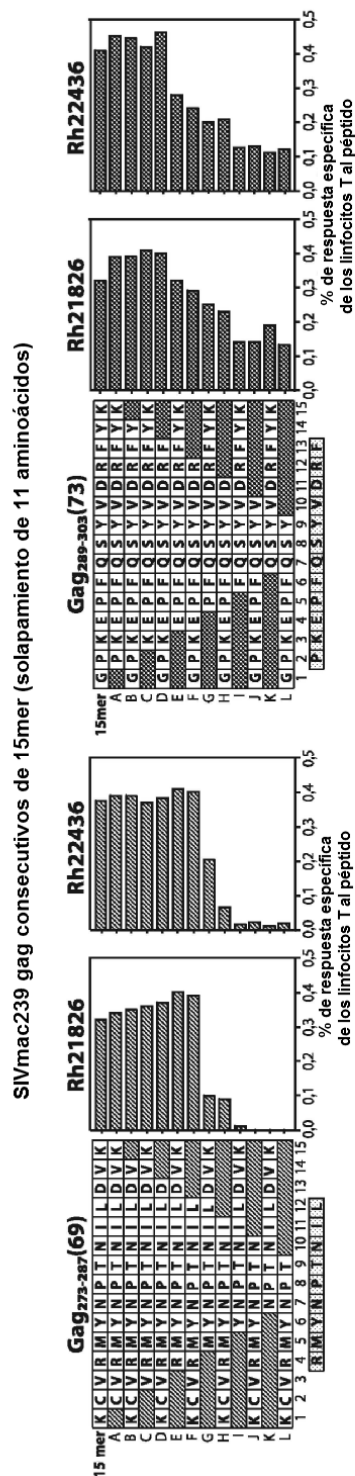


Figura 1C

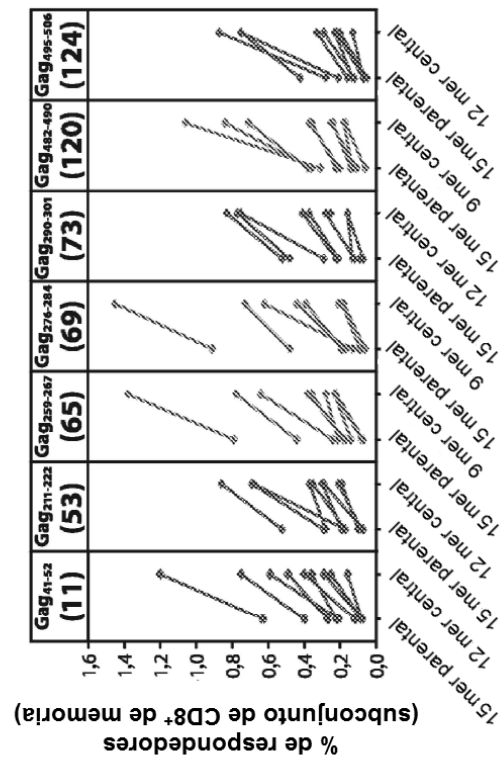


Figura 1D

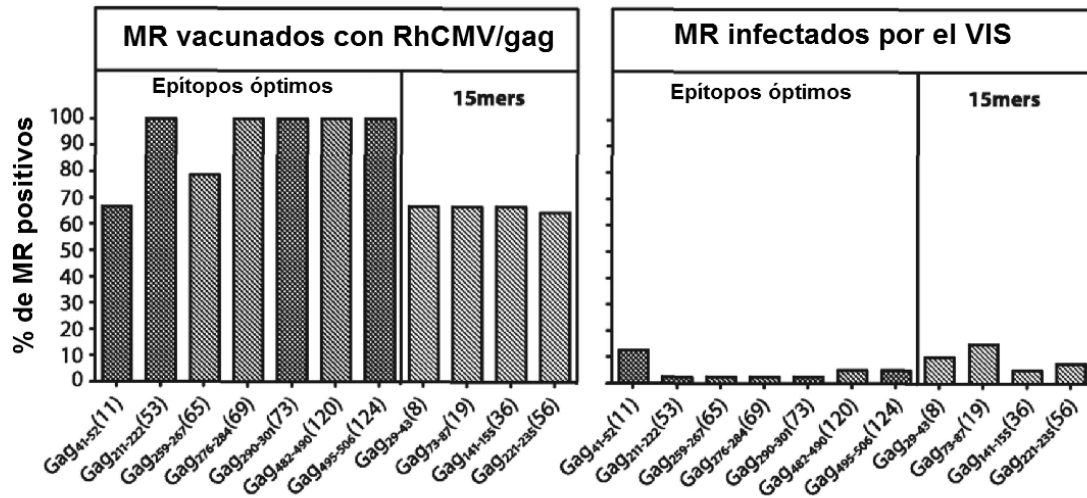


Figura 2A

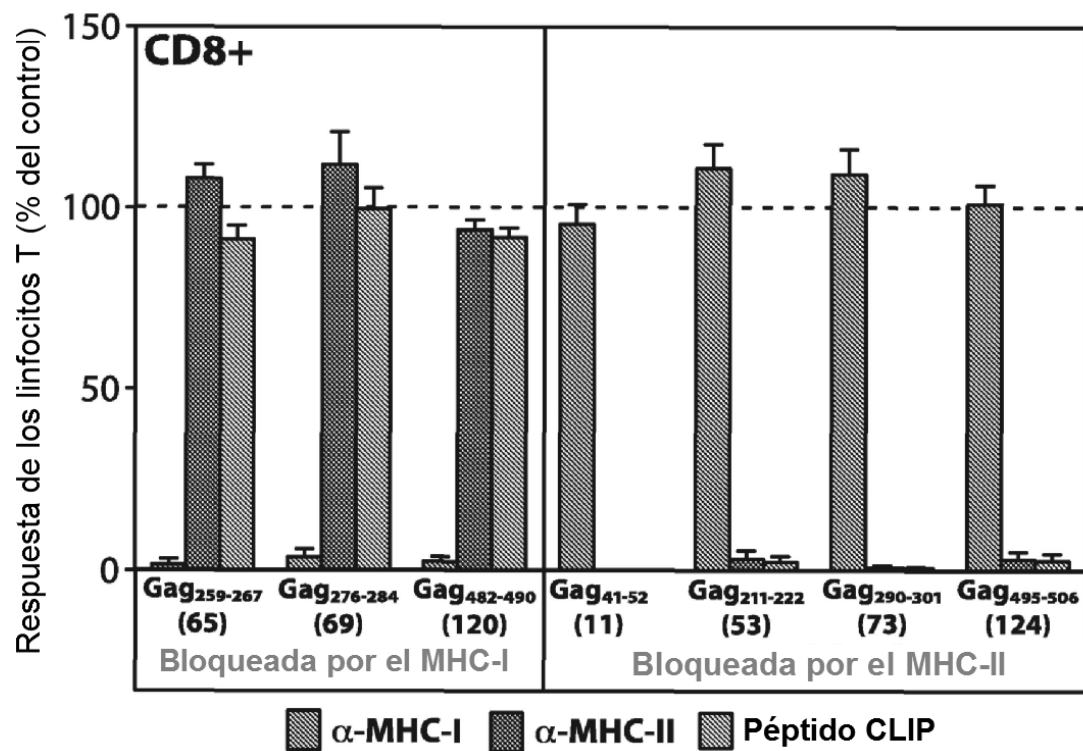


Figura 2B

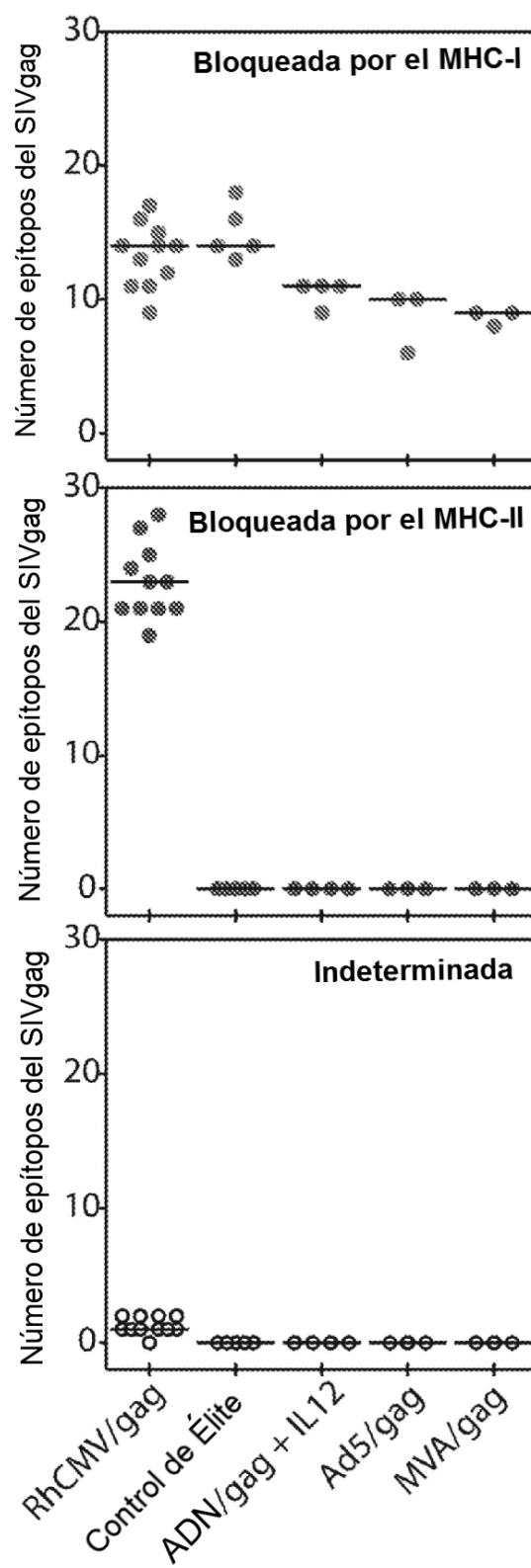


Figura 2C

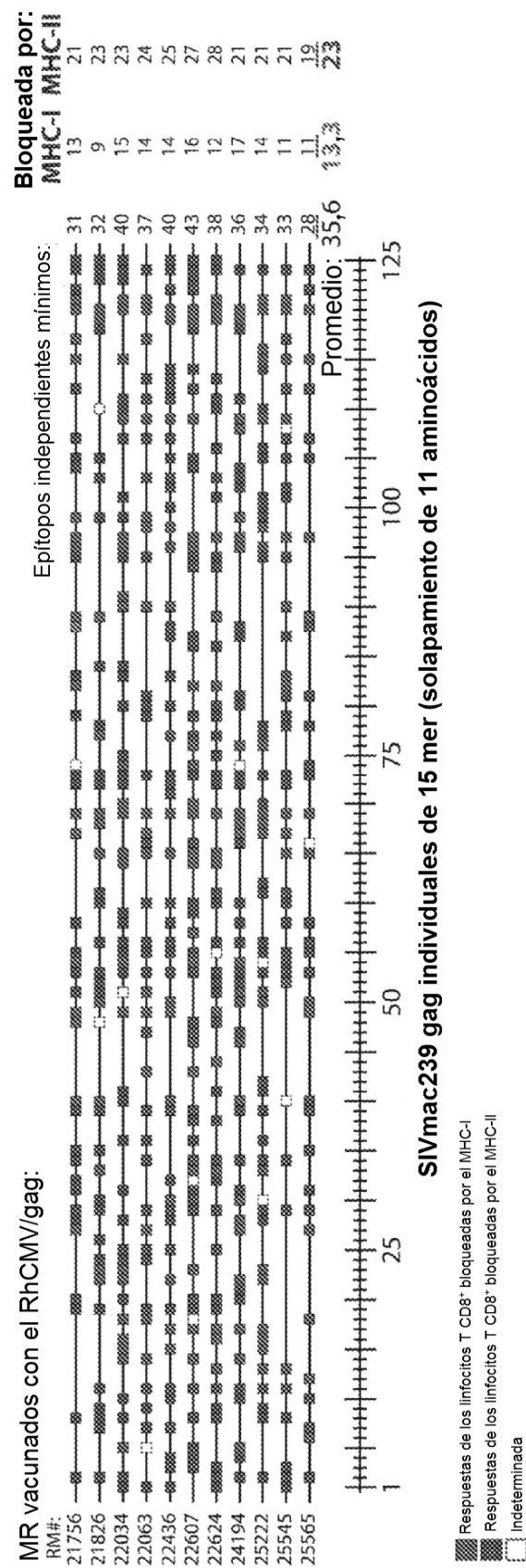


Figura 3A

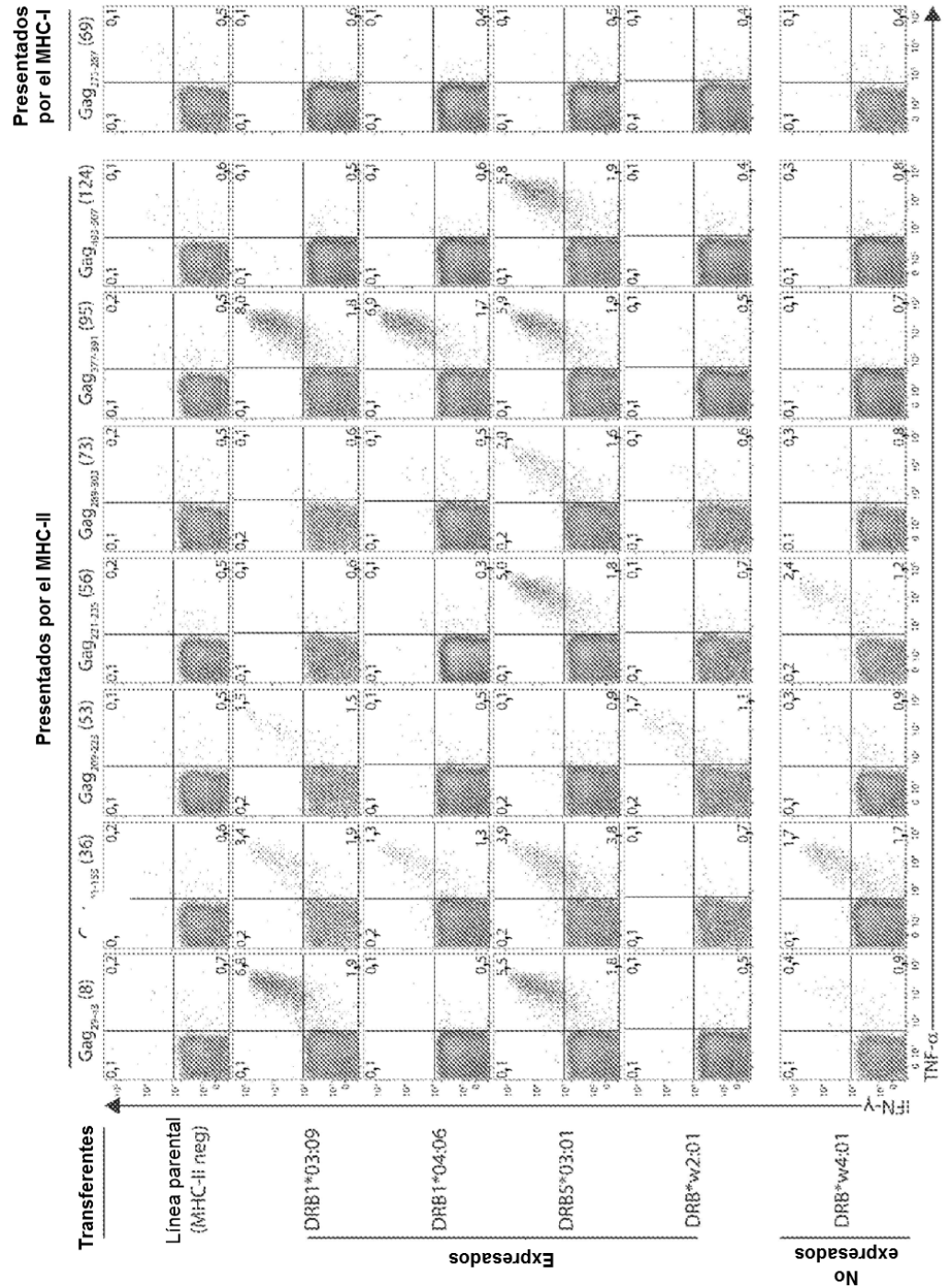


Figura 3B

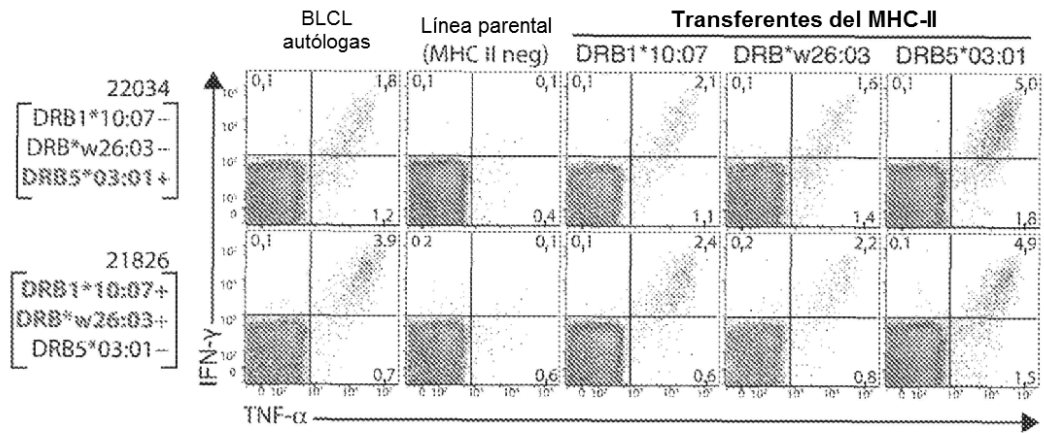


Figura 4A

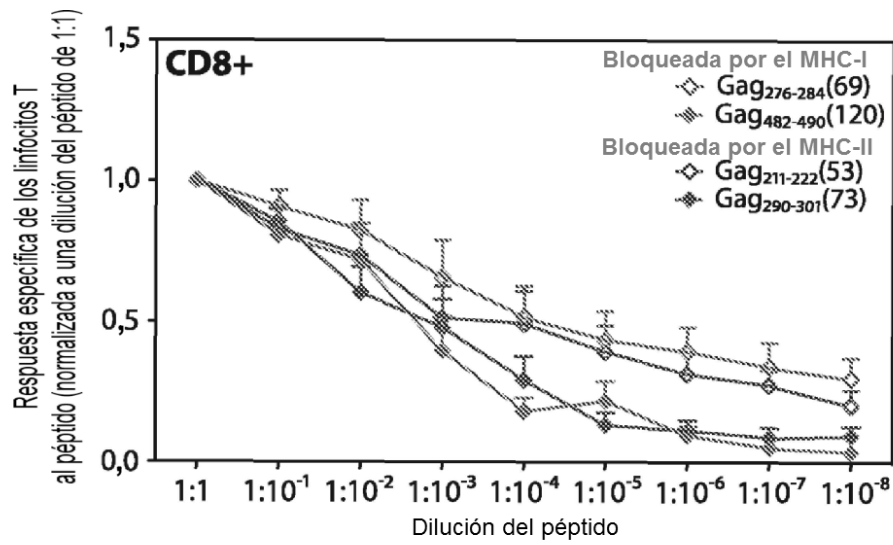


Figura 4B

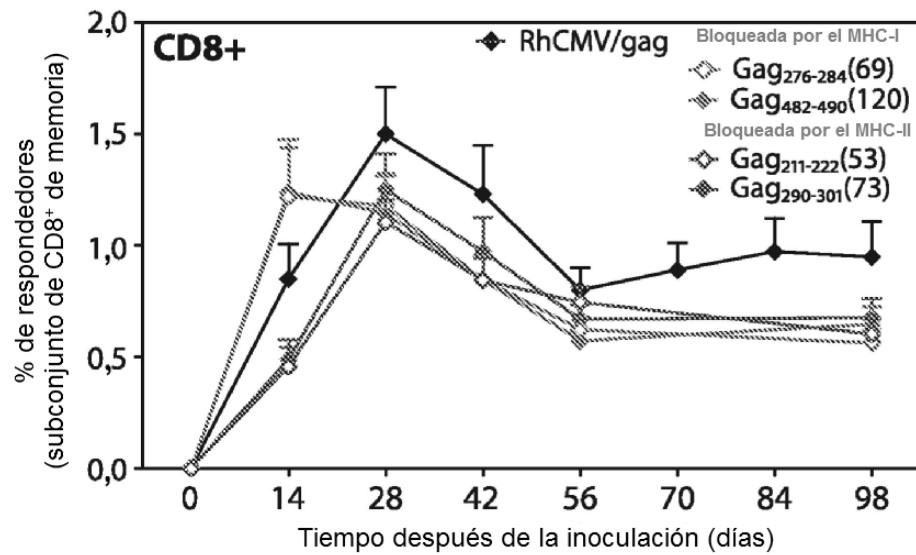


Figura 4C

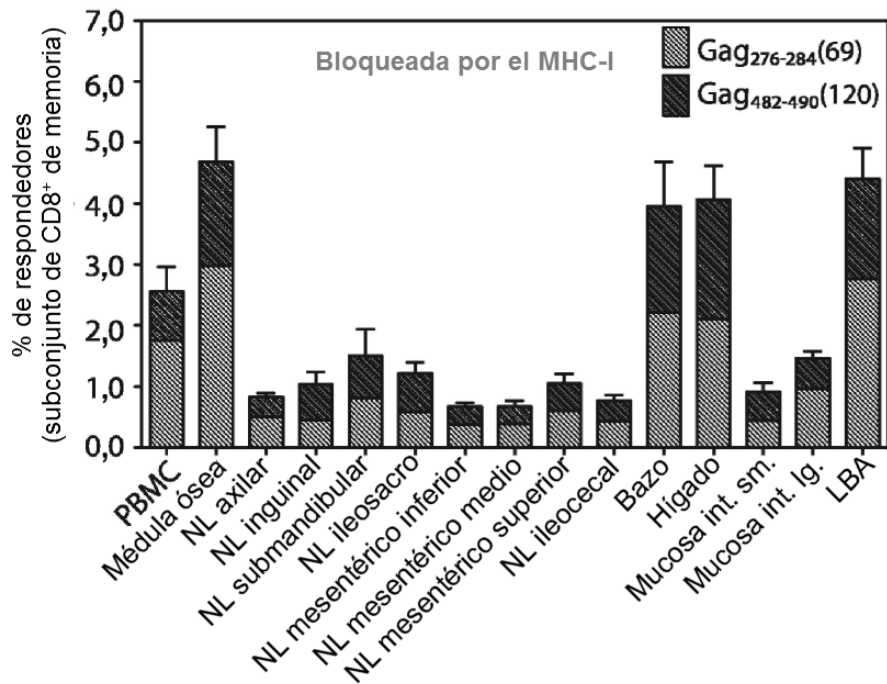


Figura 4D

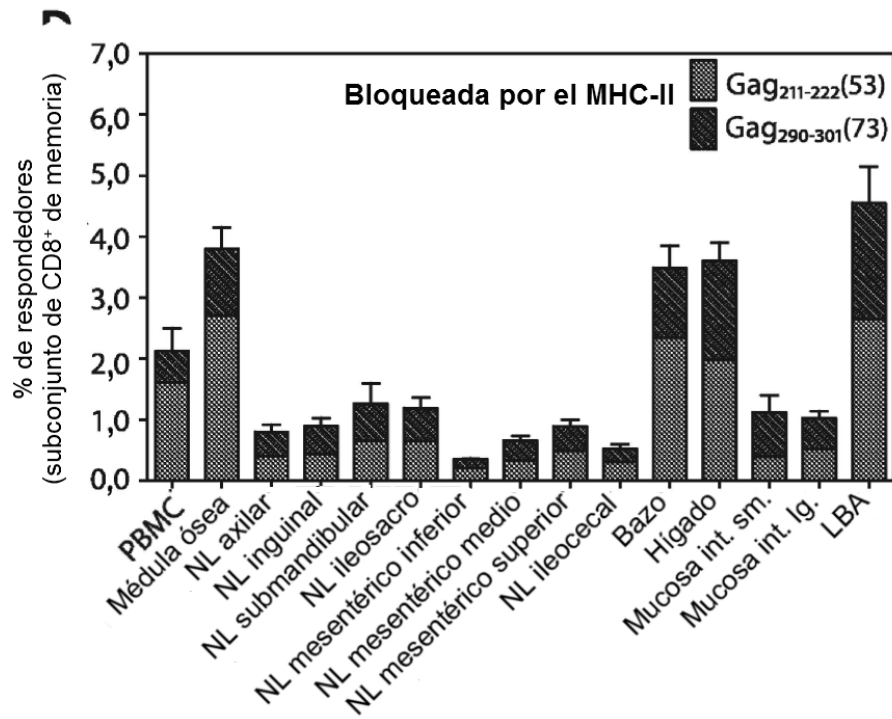


Figura 4E

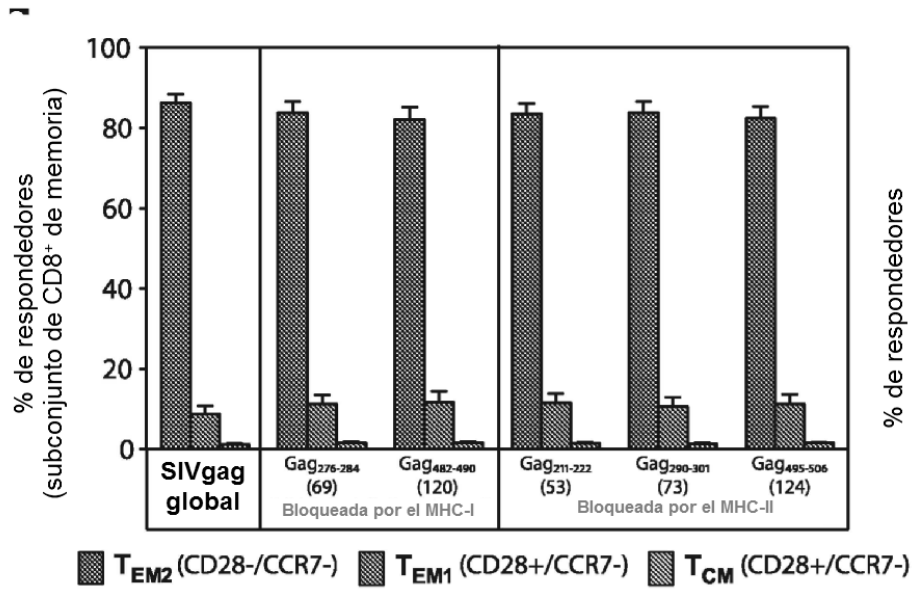


Figura 4F

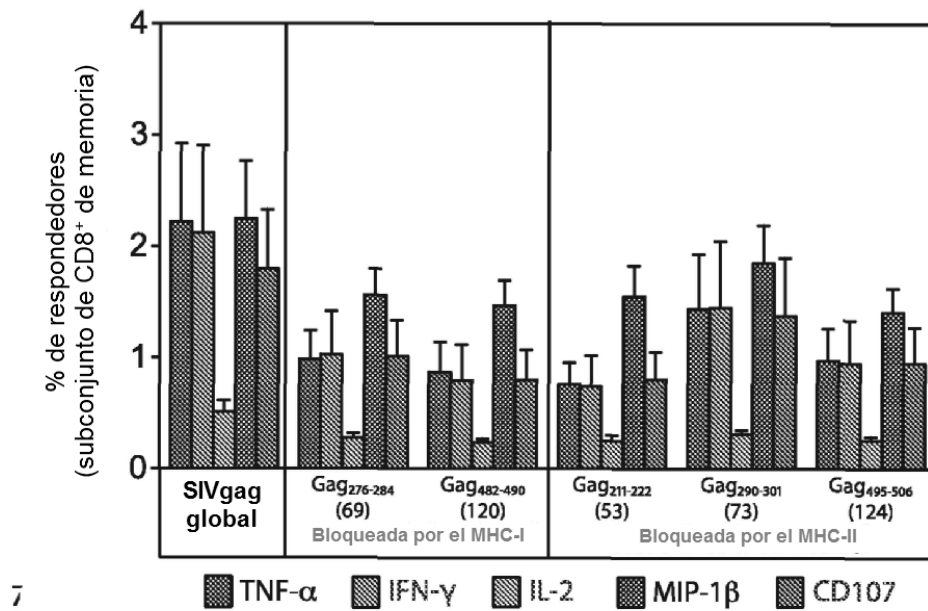


Figura 5A

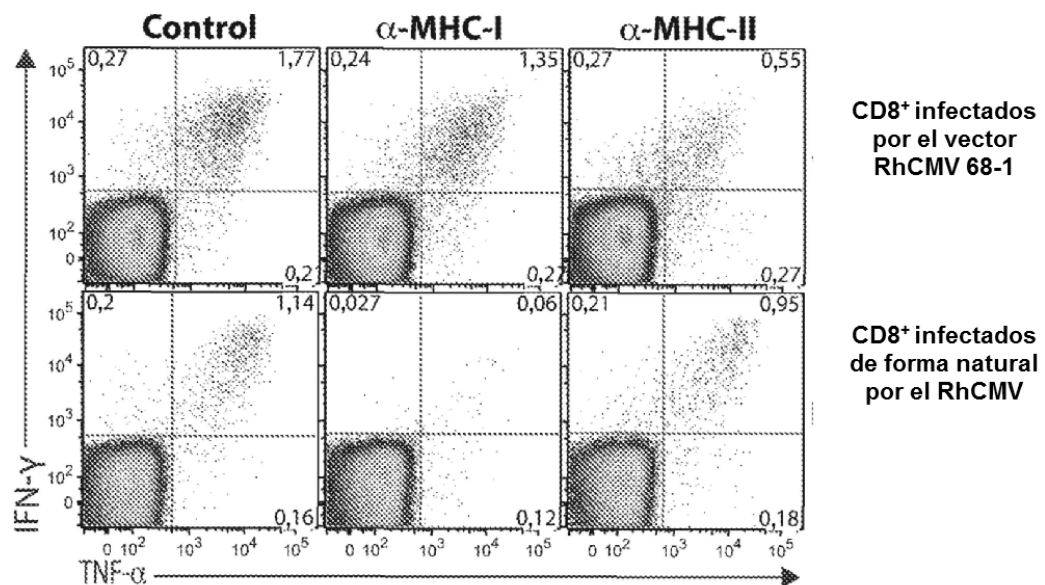


Figura 5B

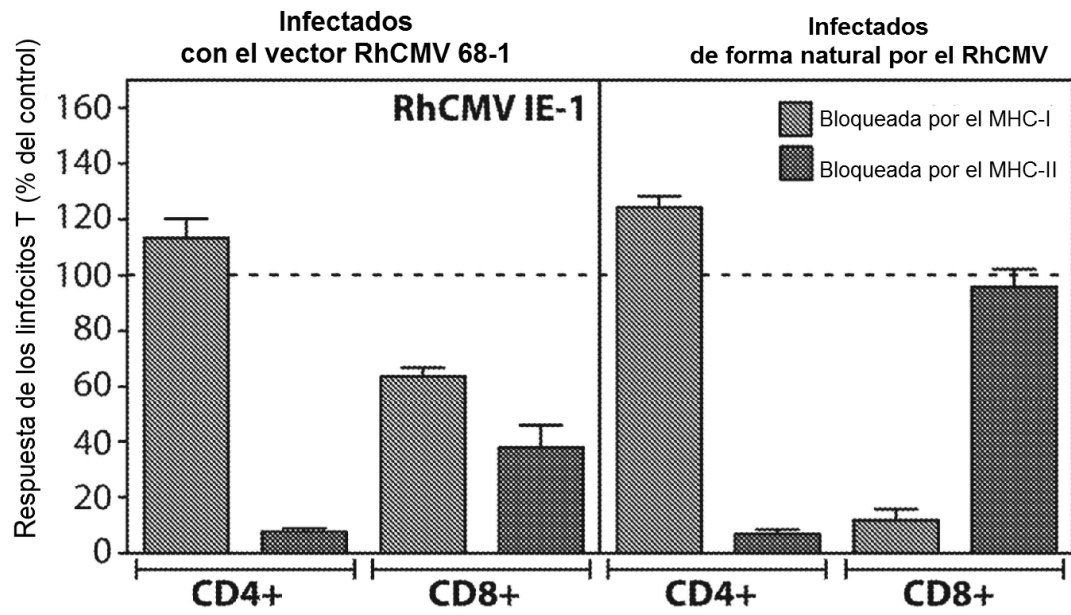


Figura 5C

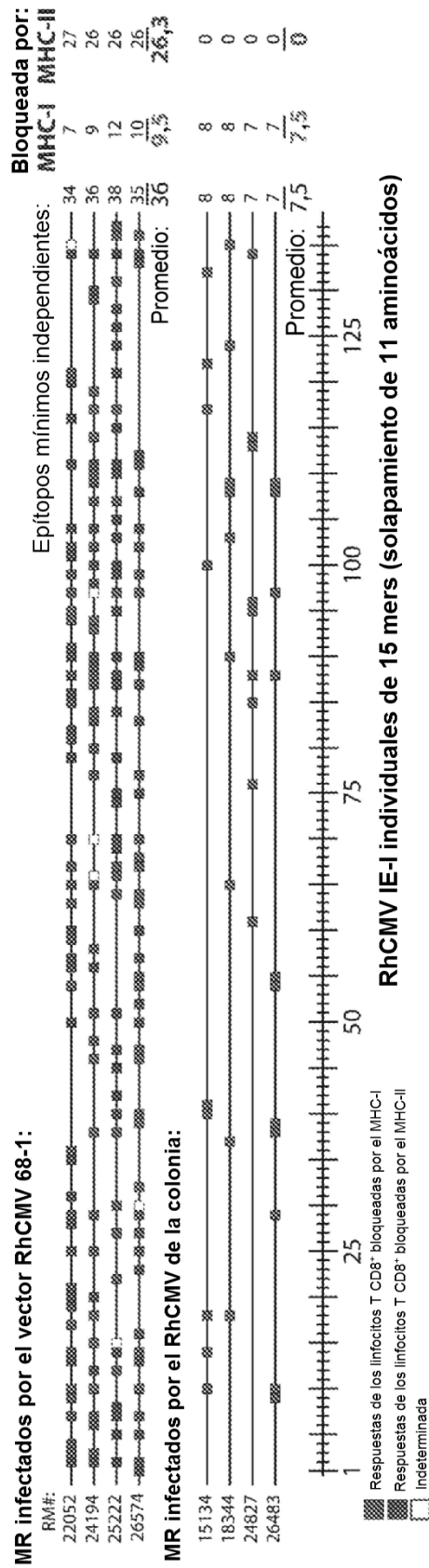


Figura 5D

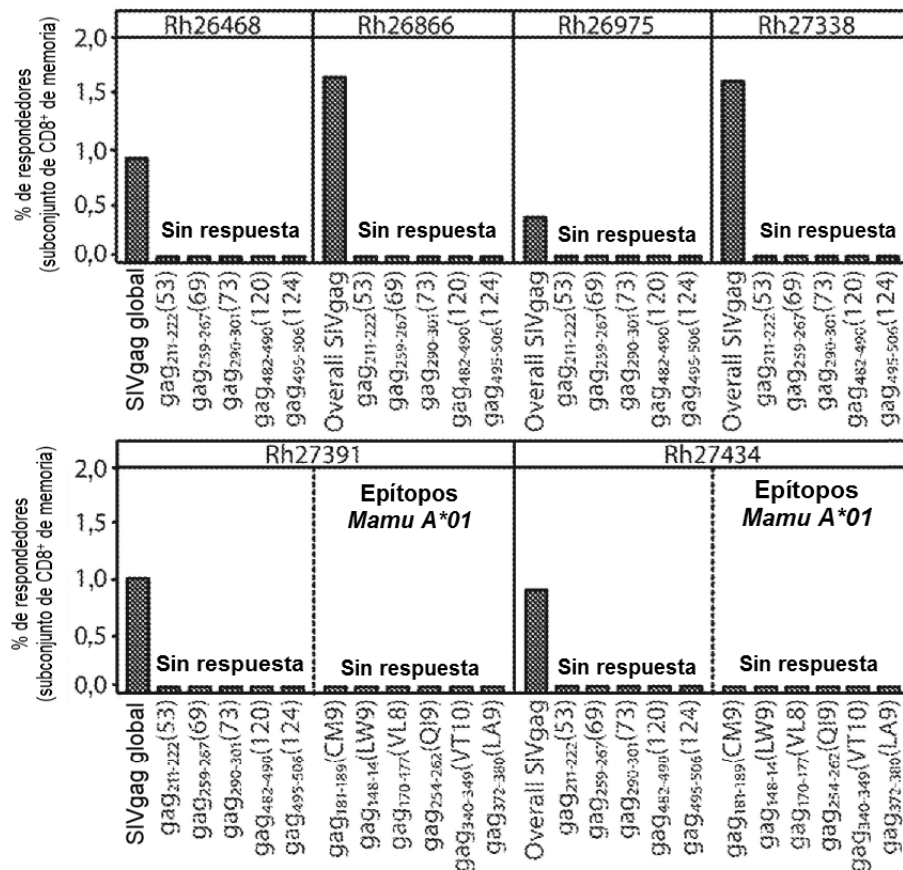


Figura 5E

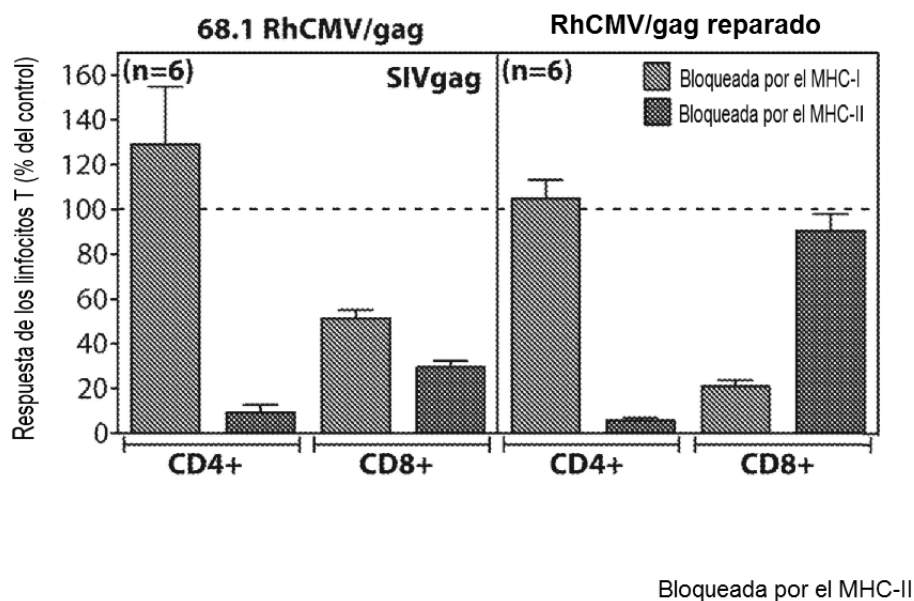


Figura 5F

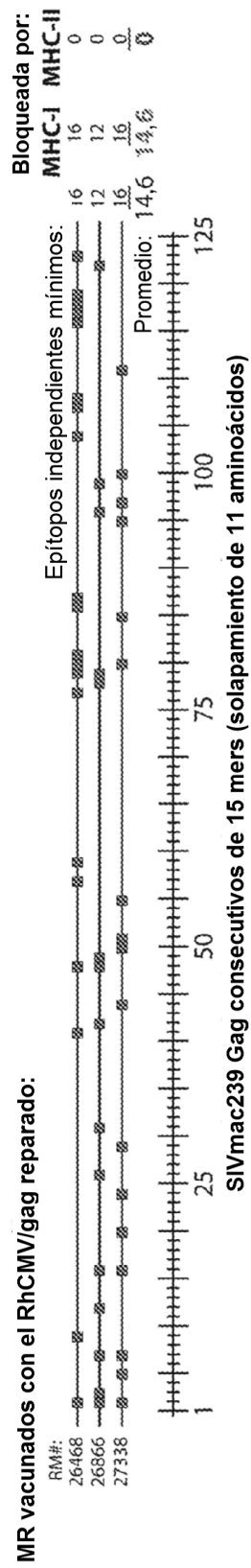


Figura 6

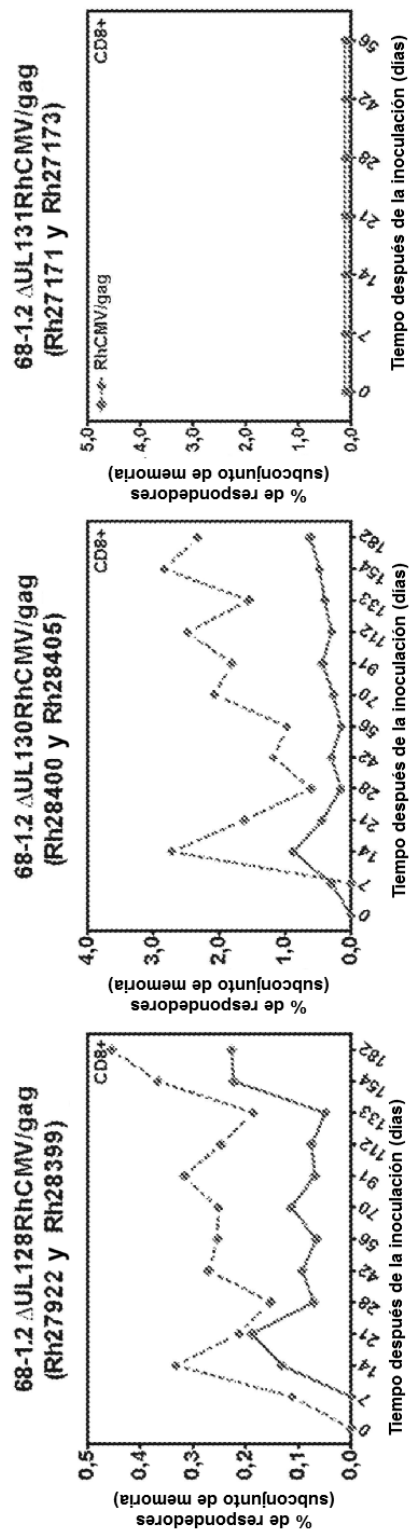
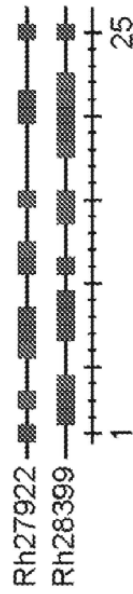
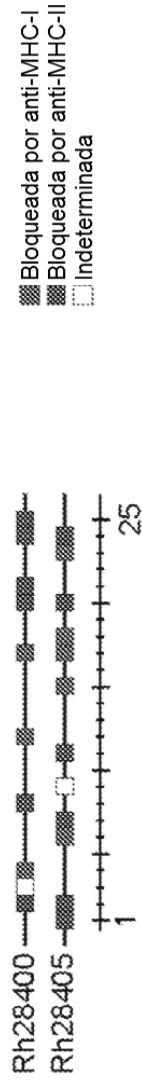


Figura 7

Macacos vacunados con el vector ΔUL128 RhCMV/gag de 68-1.2:



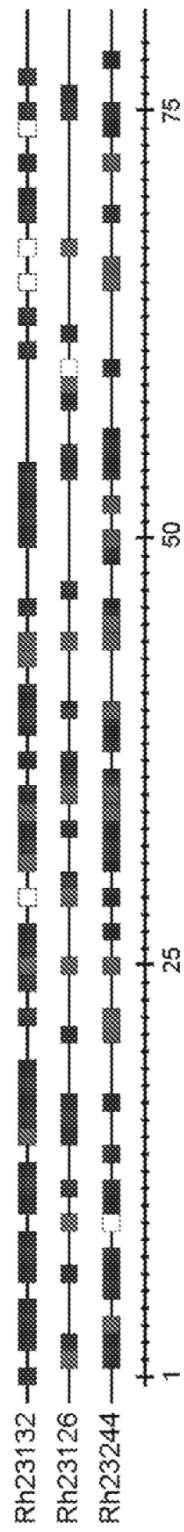
Macacos vacunados con el vector ΔUL130RhCMV/gag de 68-1.2:



■ Bloqueada por anti-MHC-I
■ Bloqueada por anti-MHC-II
□ Indeterminada

Figura 8

Macacos vacunados con el vector RhCMV/Ag85B:



Macacos vacunados con el vector RhCMV/ESAT-6:

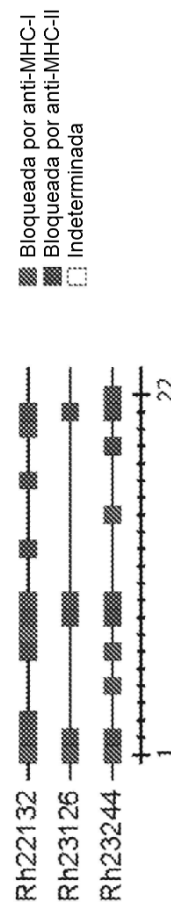


Figura 9

