

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad

Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
1 de Febrero de 2007 (01.02.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2007/012691 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C12N 15/49 (2006.01) A61K 39/21 (2006.01)  
C12N 15/863 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2006/070114

(22) Fecha de presentación internacional:

25 de Julio de 2006 (25.07.2006)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P200501841 27 de Julio de 2005 (27.07.2005) ES  
P200600762 23 de Marzo de 2006 (23.03.2006) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006  
Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): HEENEY,

Jonathan [NL/NL]; Department of Virology, Primate  
Research Centre, Lange Kleiweg 139, P.O.Box 3306,  
NL-2280 Rijswijk (NL). MOOLIJ, Petra [NL/NL]; De-  
partment of Virology, Primate Research Centre, Lange  
Kleiweg 139, P.O.Box 3306, NL-2280 Rijswijk (NL).  
GÓMEZ RODRÍGUEZ, Carmen Elena [ES/ES]; Centro  
Nacional de Biotecnología, Departamento de Proyectos,  
Campus De la Universidad Autónoma de Madrid, Can-  
toblanco, E-28049 Madrid (ES). NÁJERA GARCÍA,  
José Luis [ES/ES]; Centro Nacional de Biotecnología,

Departamento de Proyectos, Campus de la Universidad  
Autónoma de Madrid, Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES).

JIMÉNEZ TENTOR, Victoria [ES/ES]; Centro Nacional  
de Biotecnología, Departamento de Proyectos, Campus  
de la Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco,  
E-28049 Madrid (ES). ESTEBAN RODRÍGUEZ,  
Mariano [ES/ES]; Centro Nacional de Biotecnología,  
Departamento de Proyectos, Campus de la Universidad  
Autónoma de Madrid, Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES).

(74) Mandatario: ELZABURU, Alberto de; ELZABURU,  
S.A., Miguel Angel, 21, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,  
para toda clase de protección nacional admisible): AE,  
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ,  
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE,  
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL,  
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,  
RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,  
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO  
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,  
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,  
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,  
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: RECOMBINANT VECTORS BASED ON THE MODIFIED ANKARA VIRUS (MAV) AS PREVENTIVE AND THERAPEUTIC VACCINES AGAINST AIDS

(54) Título: VECTORES RECOMBINANTES BASADOS EN EL VIRUS MODIFICADO DE ANKARA (MVA) COMO VACUNAS PREVENTIVAS Y TERAPÉUTICAS CONTRA EL SIDA

(57) Abstract: The invention relates to recombinant vectors which are based on the modified Ankara virus (MVA) as preventive and therapeutic vaccines against AIDS. The inventive recombinant viruses contain sequences which are inserted in the same MVA insertion site and which enable the simultaneous expression of various antigens, a HIV-1 Env protein consisting of a gp120 protein lacking sequences corresponding to protein gp41 and a chimeric fusion protein of Gag, Pol and Nef. The aforementioned viruses are stable and can trigger immune responses against a large variety of antigens. Those viruses having a chimeric protein that derives from sequences of HIV-1 are suitable for the preparation of preventive or therapeutic vaccines against AIDS, particularly for use as vaccination protocols comprising various doses and different vectors, as demonstrated by assays performed using other vectors from the invention, having the same genome organisation, but a chimeric protein that derives from sequences of pathogenic SHIV.

(57) Resumen: Vectores Recombinantes basados en el Virus Modificado de Ankara (MVA) como Vacunas Preventivas y Terapéuticas contra el SIDA. Los virus recombinantes de la invención contienen secuencias que se encuentran insertadas en el mismo sitio de inserción del MVA y permiten la expresión simultánea de varios antígenos, una proteína Env del VIH-I consistente en una proteína gp120 carente de secuencias correspondientes a la proteína gp41, y una proteína quimérica de fusión de Gag, Pol y Nef. Son virus estables, que permiten el desencadenamiento de respuestas inmunes contra gran variedad de antígenos. Aquellos cuya proteína quimérica deriva de secuencias propias del VIH-I son adecuados para preparar vacunas preventivas o terapéuticas contra el SIDA, especialmente para usarse protocolos de vacunación que comprenden varias dosis y distintos vectores, como indican ensayos realizados gracias a otros vectores de la invención, con igual organización del genoma, pero cuya proteína quimérica deriva de secuencias de SHIV patógenos.

WO 2007/012691 A1



**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones
- con la parte de lista de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible por medio de la Oficina Internacional previa petición

*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

**“VECTORES RECOMBINANTES BASADOS EN EL VIRUS MODIFICADO DE ANKARA (MVA) COMO VACUNAS PREVENTIVAS Y TERAPÉUTICAS CONTRA EL SIDA”**

**5 ÁMBITO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a virus recombinantes que expresan antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), diseñados para utilizarse como vacunas preventivas y terapéuticas contra el SIDA. Más concretamente, la invención se refiere a virus recombinantes basados en el virus modificado de Ankara (MVA) que expresan simultáneamente la proteína de la envuelta gp120 y una proteína quimérica resultante de una fusión de Gag, Pol y Nef. La invención se refiere también a virus recombinantes basados en el virus Vaccinia Modificado de Ankara (MVA) que expresan antígenos del virus quimérico de la inmunodeficiencia de simio y humano (SHIV), válidos para ser utilizados para la inmunización de simios y poder comprobar el grado de protección que los mismos adquieren al ser infectados con el virus híbrido de VIH y SIV, SHIV. De esta manera se confirma en animales evolutivamente muy próximos a los seres humanos, susceptibles de ser infectados de forma natural por un virus similar al virus de la inmunodeficiencia humana, la eficacia como vacunas de dichos vectores derivados de MVA, lo que es un indicativo de la potencialidad de los vectores homólogos primeramente mencionados, los virus derivados de MVA que expresan antígenos del VIH-1, como vacunas eficaces para proteger a seres humanos contra el virus de la inmunodeficiencia humana.

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

Los datos de la OMS indican que en el año 2004 la enfermedad del SIDA ha causado más de 23 millones de fallecimientos, con más de 40 millones de personas infectadas y con unas predicciones de sobrepasar los 60 millones de infectados para el año 2012. Las diferencias geográficas y económicas de esta enfermedad son evidentes, pues más del 95% de los casos y el 95% de las muertes por SIDA ocurren en el tercer mundo, la mayoría de ellas en el África subsahariana y el sudeste asiático, sobre todo entre jóvenes adultos, con un incremento progresivo entre las mujeres. De entre los países desarrollados, España continúa siendo el país con mayor número de personas

infectadas de la Unión Europea, con unos 150.000 casos. Si bien es cierto que una mejora en los servicios sanitarios en muchas regiones contribuiría a disminuir la velocidad de transmisión del virus, existe consenso en la comunidad internacional de la urgente necesidad en desarrollar vacunas profilácticas y terapéuticas contra el SIDA que  
5 ayuden a solucionar el problema.

El desarrollo del SIDA representa los últimos estadios de la infección por el retrovirus conocido como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El VIH es un retrovirus que pertenece al género Lentivirus, con un genoma de 9,8 kb. El virión contiene dos copias de ARN de banda sencilla y de polaridad positiva. En los primeros  
10 estadios de la infección, el ARN genómico, por medio de la transcriptasa en reverso o retrotranscriptasa (RT) que llega a la célula asociada al ARN viral, se convierte en ADN lineal de doble banda. Este ADN se transporta al núcleo, donde se integra en la célula hospedadora en forma de provirus, a partir del cual se transcriben los genes estructurales gag, pol y env, los genes reguladores, tat, rev, nef, y los genes accesorios vif, vpr y vpu.  
15 Los productos de la traducción de dichos genes son los siguientes:

- El producto de la traducción del gen Gag es la poliproteína precursora gag-p55 que se procesa dando lugar a la proteína matriz p17, la proteína de la cápsida p24 y las proteínas de la nucleocápsida p6 y p7.
- El procesamiento del precursor Pol da lugar a las tres enzimas víricas: la  
20 proteasa (p11), la retrotranscriptasa (p6S/S1) (RT) y la integrasa (p32), de las que la RT posee actividad de ADN polimerasa (dependiente tanto de ARN como de ADN) y actividad endonucleasa (RNasa H), ambas requeridas durante la síntesis del ADN, mientras que la integrasa está involucrada en el proceso del integración del provirus, actuando como endonucleasa.
- El producto del gen Env es una proteína de 88 kDa que está fuertemente  
25 glicosilada (gp160). Esta proteína es procesada por proteasas celulares, dando lugar a las proteínas gp120 y gp41, que permanecen unidas por uniones no covalentes en la superficie del virión. En la glicoproteína gp120 se localizan los sitios de unión a los receptores celulares, el receptor CD4 y los correceptores  
30 CXCR4 (llamado X4) y CCR5 (llamado C5). Es a esta proteína a la que se debe mayoritariamente la variabilidad genética del VIH y su capacidad para escapar a la respuesta inmune tanto humoral como celular, por ser la que está más



expuesta en la superficie del virus. Por su parte, la glicoproteína gp41 o transmembrana actúa como anclaje a la membrana lipídica, localizándose en su extremo amino terminal una zona hidrófoba altamente conservada requerida para la fusión de la membrana vírica y la membrana plasmática celular durante el proceso de entrada del virus en la célula hospedadora.

5

- Los genes reguladores y auxiliares son codificados por seis fragmentos de lectura abierta solapante. Los genes Tat y Rev son necesarios para la replicación vírica en todas las células infectadas. El gen Tat codifica una proteína de 14 kDa que aumenta la expresión de los genes del VIH. El gen Rev codifica una proteína de 19 kDa que facilita el transporte al citoplasma de los ARNm. La proteína Nef, de 210 aminoácidos, se asocia con estructuras de membrana e induce la internalización y degradación de moléculas de CD4 en los lisosomas. El gen Vif codifica una proteína necesaria para la propagación del virus en linfocitos de sangre periférica, macrófagos primarios y algunas líneas celulares establecidas. El gen Vpr codifica una proteína de 15 kDa que se asocia con la proteína de la nucleocápsida p6. La proteína Vpu es una fosfoproteína que facilita la disociación dentro de la célula infectada de la gp160 y CD4 por degradación de la molécula CD4 en el retículo endoplásmico.

10

15

20

En los extremos 5' y 3' del DNA viral se encuentran las secuencias LTR (*long - terminal repeats*), en las que se localizan importantes regiones reguladoras y que juegan un papel primordial durante el proceso de retrotranscripción.

25

30

Se han identificado dos clases del virus: VIH-1 y VIH-2, de las que la segunda, VIH-2, parece ser menos patógena que la primera y se localiza sobre todo en la zona occidental de África. Es la forma que genera la enfermedad con mayor rapidez, VIH-1, la que se encuentra más extendida por el planeta y la que más se ha diversificado. Existen tres subtipos del VIH-1, denominados M, N y O, aunque más del 95% de todos los aislados del VIH a nivel global en la población pertenecen al subtipo M. En función de las diferencias en la secuencia de nucleótidos, en especial en la parte correspondiente a las proteínas de la envuelta (Env), este subtipo se subdivide a su vez en ocho estirpes principales, a las que se alude generalmente como clades y que se denominan con las letras A, B, C, D, F, G, H y J. Los clades B y C representan aproximadamente el 80% de las infecciones a nivel mundial, siendo el clade B el más representativo en Europa y

América del Norte, mientras que el clade C es prevalente en África y Asia. Son abundantes las zonas en las que las dos clases están presentes en la población (China, India, África subsahariana), por lo que se piensa que las vacunas que contuvieran antígenos correspondientes a los dos clades, B y C, serían mucho más eficaces en dichas zonas.

Una posibilidad para el diseño de tales vacunas consiste en la generación de moléculas de ADN recombinante que contengan secuencias capaces de expresar proteínas del VIH, o fragmentos o formas de fusión de las mismas de forma que, al ser administradas a un individuo, se sintetizan dichas proteínas, fragmentos o formas de fusión de las mismas y se genera una respuesta inmune contra ella. Dichas moléculas de ADN recombinante pueden generarse a partir de genomas de virus en los que se han eliminado o inactivado regiones cuya expresión es necesaria para la replicación del virus en las células diana y/o en los que se han sustituido regiones que codifican proteínas no imprescindibles para que el virus desarrolle la parte de su ciclo vital que se desea que tenga lugar en la célula diana. En esos casos, el ADN recombinante puede administrarse en forma de partículas virales completas que facilitan la transfección del ADN recombinante a la célula diana. De entre los virus que se están utilizando como vectores, las formas modificadas del virus Vaccinia están entre los vectores virales más tentativos para ser aplicados como vacuna recombinante. Algunas de ellas, como el virus NYVAC, (cuyo genoma se representa en la parte inferior de la Figura 1), han sido generadas por mutagénesis dirigida con el resultado de la eliminación de 18 genes del virus Vaccinia (estirpe Copenhagen), aproximadamente 10 kb. Otras, como el virus Vaccinia modificado de Ankara (MVA), han sido generadas de forma menos controlada; concretamente, el MVA se ha generado al haber pasado el virus por más de 570 pases seriados en cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (CEF), lográndose una pérdida del 15% del genoma viral parental (1, 2) que supone deleciones en genes de los que algunos de ellos están intactos en el genoma del virus NYVAC (genes que se indican subrayando su nombre en la Figura 1) y otros han sido deleccionados en ambos vectores (genes que aparecen con el nombre en negrita en la Figura 1), existiendo también genes que permanecen intactos en el genoma del virus MVA y que presentan deleciones en el genoma de NYVAC (los genes cuyo nombre aparece en cursiva en la Figura 1). En el virus MVA, los genes estructurales del virus

- 5 -

han permanecido inalterados, mientras que genes involucrados en la evasión del sistema inmune (3), y genes relacionados con el rango de hospedador (2, 4, 5), han sido deletados o fragmentados. MVA produce su ciclo infeccioso completo en células CEF y en células de riñón de Hámster (BHK), mientras que en líneas celulares humanas, incluyendo las células HeLa, tiene un ciclo abortivo (6, 7). Aunque la replicación viral depende del tipo celular, el bloqueo del programa de morfogénesis en las células no permisivas ocurre en los pasos posteriores a la formación de formas virales inmaduras (IV), sin haber alteraciones de la expresión de genes virales tempranos y tardíos (8, 9). En células en cultivo, los recombinantes de MVA producen niveles similares o mayores de proteína heteróloga que los vectores derivados de la cepa silvestre del virus Vaccinia WR (Western Reserve) (9-11), lo que le hace interesante como sistema de expresión. En mamíferos, recombinantes de MVA han demostrado inducir una inmunidad protectora frente a un amplio espectro de patógenos (6, 12-16), mostrando las siguientes ventajas como vector de expresión de antígenos heterólogos:

- 15 - Alta seguridad, demostrada cuando se usó en más de 120000 individuos durante la campaña de erradicación de la viruela en Alemania.
- Avirulento en una amplia variedad de animales en condiciones inmunosupresoras.
- Poca o nula reacción sistémica o local tras su inoculación en humanos, 20 incluyendo individuos de alto riesgo.
- Alta plasticidad y estabilidad de su genoma, lo que permite introducir grandes cantidades de material génico exógeno.
- Potente inductor de una respuesta inmune eficaz frente a una gran variedad de antígenos.

25 Dada su seguridad y capacidad de producir protección, puede ser de gran utilidad en la generación de vacunas vivas frente a enfermedades infecciosas y en la terapia del cáncer. Como cualquier otra vacuna dirigida a seres humanos, para llevar a cabo ensayos clínicos de la posible eficacia como vacunas de vectores derivados del MVA, es necesario obtener información previa sobre su comportamiento inmunogénico 30 y su capacidad de conferir protección en modelos animales. En el caso del SIDA, sin embargo, no es sencillo encontrar un modelo animal adecuado. Los modelos habituales para el estudio de otros diversos trastornos, como pueden ser los ratones, no sirven

como modelo de infección, al no replicarse en ellos ni el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ni el equivalente de simio, el virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV), por lo que no son modelos válidos para evaluar la capacidad protectora de la vacunación. Sí es posible, sin embargo, obtener de los ratones información previa sobre el comportamiento inmunológico de los vectores en estudio que permita una evaluación previa de su posible eficacia y ayude a descartar o considerar interesante continuar con los ensayos. Además, el modelo de ratón transgénico que expresa el antígeno de histocompatibilidad humano MHC de clase I (HLA-A2) permite demostrar si la vacunación confiere presentación antigénica similar a la humana por parte del HLA-A2, que es prevalente en la población, algo que no se puede hacer, de momento, en primates, por no disponerse de primates transgénicos para dicho antígeno humano. Los estudios sobre la capacidad protectora conferida por la vacunación, sin embargo, requieren el uso de otros modelos distintos del modelo de ratón.

En esa línea, los modelos de primates no humanos se han convertido en una herramienta fundamental para evaluar en ensayos clínicos las vacunas candidatas contra el SIDA. La infección de chimpancés por el VIH-1 ha presentado grandes limitaciones como su elevado costo, su poca disponibilidad y la ausencia de síntomas clínicos. Se ha encontrado que el virus de la inmunodeficiencia de simios (abreviado frecuentemente como SIV a partir de su nombre en inglés, *simian immunodeficiency virus*) es un modelo mucho más útil. Se trata de un lentivirus que infecta de forma natural diversos tipos de primates. Se han descrito cinco subgrupos del mismo. La forma aislada de macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), a la que se denomina SIVmac, pertenece al primero. Al igual que sucede con el VIH, su genoma se caracteriza por presentar dos secuencias LTR en sus extremos 3' y 5', en las cuales se encuentra el promotor y las secuencias reguladoras o de unión a factores transcripcionales. Presenta tres marcos de lectura abierta para proteínas estructurales: gag, pol y env; marcos de lectura abierta para genes reguladores: nef, tat y rev, y los llamados genes accesorios: vif, vpr y vpx. Los miembros del subgrupo SIVmac comparten un alto grado de homología genética con el VIH-2.

Existen puntos comunes entre los virus SIV y VIH, entre los que se encuentran el tropismo celular, la organización genómica, las características ultraestructurales, el modo de transmisión, la respuesta del hospedador a la infección y los síntomas clínicos

de la enfermedad, con la salvedad de las infecciones asintomáticas. Estas características han propiciado que los modelos basados en el virus SIV sean atractivos para la evaluación de la eficacia de candidatos a vacunas y el diseño de nuevas vacunas para ensayos en humanos.

5 La infección por SIV se caracteriza por un máximo de viremia en las dos primeras semanas, con una disminución de los niveles virales hasta un punto que es variable y del cual dependerá la progresión de la enfermedad. El período de incubación viral es menor que en la infección por VIH. La variabilidad en la progresión de la enfermedad depende de la heterogeneidad genética de los macacos usados en los  
10 estudios, así como del virus empleado en el desafío y la ruta de exposición (intravenosa, mucosa o perinatal). Ante la infección por SIV, la respuesta del hospedador es parecida a la generada contra el VIH, pero difiere en la especificidad de los anticuerpos neutralizantes contra los antígenos de la envoltura.

El SIV presenta varias desventajas como modelo. En primer lugar, es un virus  
15 diferente al VIH; por tanto, las proteínas de la envuelta, que son el blanco fundamental de los anticuerpos neutralizantes, son muy divergentes en ambos modelos. Otro dato a añadir es que el SIV usa sólo el correceptor CCR5 para entrar en la célula, mientras que el VIH usa, además, otros correceptores como CXCR4, CCR2 o CCR3. Por esta y otras razones, la calidad y la eficacia de un candidato probado en este modelo no se considera  
20 necesariamente extrapolable a seres humanos.

Para soslayar estas desventajas, en 1991 se obtuvo por primera vez un virus híbrido entre el VIH y el SIV, al que se denominó SHIV (del inglés *Simian-Human Immunodeficiency Virus*) (25). Este híbrido contenía los genes env y tat del VIH y el resto del material genético del SIV. El SHIV fue capaz de infectar macacos Rhesus,  
25 aunque no era capaz de reproducir los síntomas característicos del SIDA en los animales inoculados.

Con este primer híbrido, se dispuso de un modelo de infección en macacos útil para estudios de protección contra la infección, si bien este modelo aún no permitía concluir si los candidatos a vacunas eran capaces de proteger contra la enfermedad.  
30 Unos años más tarde, a través de pasos sucesivos por macacos y en cultivo, se lograron aislar variantes agresivas del SHIV capaces no sólo de infectar macacos, sino de producir un síndrome similar al SIDA. Estas cepas, adaptadas a multiplicarse en los

animales, provocan depleción en los linfocitos CD4+ y la muerte de los macacos en menos de un año tras la inoculación. De entre estas variantes del SHIV, una de las más comúnmente utilizadas es la denominada SHIV89.6P, obtenida mediante pases seriados en macacos Rhesus del virus parental SHIV89.6, que contiene los genes gag, pol, vif, 5 vpx, vpr y nef del virus de simio SIVmac239, mientras que los genes auxiliares tat, rev y vpu y el gen de las proteínas de la envuelta env proceden de un aislado citopático del HIV-1, el HIV89.6 (26,27). Gracias al virus SHIV89.6P y otros similares se cuenta con un modelo para evaluar la protección contra la enfermedad y la muerte conferida por posibles vacunas en desarrollo.

10 Gracias a este modelo, varios estudios realizados en macacos han demostrado la relevancia de recombinantes de MVA como vacuna potencial frente al VIH, especialmente cuando se utilizan en sistemas combinados de inmunización en los que se emplean dos o más dosis de vacunación separadas en el tiempo, suministrándose al menos en la primera dosis un vector diferente al de las siguientes dosis, aunque los 15 antígenos expresados a partir de cada uno de los vectores pueden ser los mismos. Para hacer referencia a estos protocolos de vacunación en los que se suministra una primera dosis de desencadenamiento de la respuesta inmune con un vector que da lugar a la expresión de un antígeno y una o más dosis de potenciación o refuerzo de la respuesta inmune generada que contienen un vector diferente, pero que da lugar generalmente a la 20 expresión del mismo antígeno, se emplea a menudo su denominación en inglés *prime/boost*. Estos protocolos se consideran especialmente adecuados para ser aplicados para la prevención o el tratamiento de las infecciones por el virus VIH pues, por una parte, evitan la administración de formas vivas atenuadas del virus, recurriéndose sólo a la utilización de componentes del mismo; por otra parte, el uso de vectores de expresión 25 capaces de introducirse en las células en lugar de recurrir a la administración directa de las proteínas que expresan posibilita que las proteínas que deben actuar como antígenos se encuentren presentes en el citoplasma de las células hospedadoras para que se produzca su procesamiento mediante la ruta de presentación de antígenos del MHC de clase I, lo que es necesario para desencadenar una respuesta inmune de células T, 30 particularmente respuestas citotóxicas inmunes asociadas con linfocitos T CD8<sup>+</sup>; por último, el uso de vectores diferentes en cada una de las dosis disminuye la probabilidad de que el vector de vacunación como tal sea eliminado rápidamente por el sistema

inmune del hospedador, evitándose la potenciación de la respuesta inmune dirigida contra las partes constituyentes del vector que no proceden del microorganismo contra el que se busca protección.

En los estudios con macacos (12), los vectores recombinantes derivados del MVA están demostrando ser particularmente útiles para ser utilizados en protocolos combinados de inducción y potenciación de la respuesta inmune con vectores diferentes, en especial cuando el recombinante derivado del MVA se administra en la segunda y/o en alguna dosis posterior a esta y expresa, al igual que el vector utilizado en la primera dosis, múltiples antígenos de VIH y SIV (Virus de la Inmunodeficiencia de Simio). La respuesta de células T citotóxicas y de memoria generada demuestra el potencial de los recombinantes de MVA como vacunas frente al VIH (17).

Por ello, se han diseñado distintos vectores recombinantes, basados en el MVA, capaces de expresar diversos antígenos del VIH. Intentando buscar formas más eficaces para generar una respuesta protectora, se han construido vectores capaces de expresar más de una proteína de dicho virus, en ocasiones formando proteínas de fusión. Así, por ejemplo, las solicitudes de patente WO 02/072754 y WO 2004/087201 describen en general vectores derivados del MVA que expresan las proteínas Env, Gag y Pol (rMVA), considerando como una opción adicional la posibilidad de que el antígeno inmunizante incluya también secuencias de vif, vpr, tat, rev, vpu o nef, aunque sin discutir que la expresión de alguna de esas secuencias tenga gran importancia de cara a la posible respuesta de protección generada ni utilizando esa opción en las realizaciones de la invención. Aunque en dichas solicitudes internacionales se menciona que las secuencias de vif, vpr, tat, rev, vpu o nef, así como las correspondientes a env, gag y pol, pueden en general codificar sólo fragmentos de la correspondiente proteína, y/o presentar mutaciones, es una característica definitoria de la invención que se intenta proteger en dichas solicitudes internacionales que el gen env carezca de parte o de la totalidad de los nucleótidos que codifican el dominio citoplasmático de gp41. El estado de la técnica no describe específicamente la posibilidad de que la parte codificante correspondiente a la proteína gp41 se elimine en su totalidad ni discute las consecuencias que esto tendría. Sí se menciona en cambio en los ejemplos de ambas solicitudes que dichas proteínas de la envuelta, gracias al truncamiento de gp41, ven facilitada su acumulación en la membrana de las células que la expresan, lo que se trata

como un efecto positivo buscado. También se trata como tal la formación de partículas similares a virus VIH en las que están presentes proteínas Gag y Env y que se pueden detectar, entre otras localizaciones, en el exterior de las células en las que las correspondientes proteínas se han expresado. Respecto al lugar de inserción de las  
5 secuencias expresadas, no se menciona que éste tenga una importancia especial salvo para manifestar como positivo el hecho de que la elección del sitio de la deleción III como uno de los lugares en los que se insertan secuencias permite que el recombinante MVA siga siendo TK<sup>+</sup>. Ello implica que el vector recombinante MVA descrito en dicho estado de la técnica exprese timidina quinasa y, por consiguiente, mantenga una cierta  
10 virulencia. Tampoco se discute que tenga relevancia alguna que se utilice más de un lugar de inserción para incluir en el vector las secuencias que codifican los antígenos que se desean expresar, no describiéndose pruebas para demostrar la estabilidad de dichos vectores.

La solicitud de patente WO 2004/035006 describe también vectores derivados  
15 de MVA que contienen secuencias codificantes de varias proteínas de VIH que se expresan en forma de proteínas de fusión, concretamente una fusión Gag-Pol y una fusión nef-tat, pero el enfoque es aquí diferente al de las solicitudes internacionales anteriormente comentadas: se busca que no haya empaquetamiento en proteínas virales, para lo cual la solución propuesta es que al menos una de las secuencias codificantes de  
20 proteínas del VIH esté unida a una secuencia líder heteróloga, siendo la del tPA la que se elige para las realizaciones correspondientes a vectores derivados del MVA y promoviéndose de esta manera la secreción de las proteínas sintetizadas. Para la inserción de las secuencias, además, se muestra preferencia por el sitio de la deleción III, utilizándose de nuevo en un mismo vector un segundo lugar de inserción de  
25 secuencias adicionales, el de la deleción II, para una proteína de fusión tPA-nef-tat, sin considerar que esto pueda tener consecuencias para la estabilidad del vector ni realizar experimentos para verificar que realmente sea estable. Además, la única forma considerada para la secuencia env, delta V2 env, donde posee deleciones es en la parte correspondiente a la proteína gp120, no considerándose de nuevo la posibilidad de  
30 eliminar la proteína gp41 ni las posibles consecuencias derivadas de ello.

La presente invención, por su parte, proporciona distintos vectores recombinantes, basados en el MVA, capaces de expresar diversos antígenos del VIH,



- 11 -

que responden a un enfoque diferente a los descritos en solicitudes anteriores. Estos vectores recombinantes derivados del MVA poseen secuencias que permiten la expresión simultánea de la proteína gp120 y de una proteína de fusión Gag-Pol-Nef. Tanto la secuencia que expresa la proteína gp120 como la secuencia correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef se encuentran insertadas en un mismo lugar, el correspondiente al gen de la timidina quinasa, con lo que se aumenta la estabilidad de los vectores al utilizar un único sitio de inserción con respecto a otros vectores derivados también del MVA que contienen varias secuencias codificantes de proteínas del VIH, dado que estos últimos, al llevar insertas cada una de las secuencias en un lugar diferente del MVA, pierden con facilidad los insertos presentes en ellos. Además, la utilización específica del *locus* de la timidina quinasa como lugar de inserción da lugar a que los vectores de la invención sean virus recombinantes derivados del MVA que presentan una mayor seguridad para ser utilizados como vacunas, por carecer de un gen, el de la timidina quinasa, involucrado en virulencia. A diferencia de lo descrito en solicitudes como WO 02/072754 y WO 2004/087201, la expresión de la proteína gp120 en ausencia de secuencias correspondientes a la proteína gp41, permite su liberación al medio extracelular pocas horas después de su síntesis en el citoplasma de la célula infectada, facilitándose con ello la inducción tanto de respuesta humoral como celular frente a esta proteína, la que mayor variabilidad presenta en su secuencia entre los distintos clades. Los virus recombinantes de la presente invención expresan al menos cuatro antígenos: Env, Gag, Pol y Nef, por considerarse que un vector que exprese esos cuatro antígenos es mucho más eficaz que vectores recombinantes capaces de expresar sólo alguno de dichos antígenos o incluso otros, por la capacidad de los antígenos elegidos para inducir respuestas celulares específicas y por la menor diversidad genética entre aislados del VIH en lo que a las secuencias de Gag, Pol y Nef se refiere. Además, se considera una característica particularmente importante de la invención la presencia de secuencias correspondientes al gen regulador nef, junto con las correspondientes a los genes estructurales gag, pol y env, pues se expresa en etapas tempranas del ciclo del VIH y la generación de una respuesta celular frente a sus productos se considera necesaria para aumentar el repertorio de defensa inmunológica contra el VIH y conseguir una respuesta protectora adecuada que permita el control inmunológico de la infección por el VIH-1. La asociación de las secuencias codificantes de gag, pol y nef se

ha realizado en los vectores de la invención de forma que se generara una proteína de fusión que mantuviera todos los epítomos con capacidad para generar respuesta celular, posibilitando una mayor presentación antigénica que otros vectores que expresan fusiones que corresponden sólo a las proteínas Gag y Pol, pero generándose una

5 proteína de fusión que no se proteoliza por acción de la proteasa viral, no da lugar a la formación de partículas virales y que, al contrario de lo que sucedía con las proteínas expresadas en otros vectores de la técnica anterior, se acumula en el citoplasma en forma de una poliproteína estable. El uso de un promotor sintético idéntico para dirigir la expresión tanto de la proteína gp120 como de la fusión Gag-Pol-Nef, promotor que se

10 elige para que permita la expresión de las correspondientes proteínas tanto a tiempos tempranos como a tiempos tardíos durante la replicación del MVA, permite la expresión simultánea de las secuencias de la gp120 y de la proteína quimérica Gag-Pol-Nef, su acumulación a lo largo del ciclo de infección del MVA y el procesamiento antigénico de las mismas a tiempos tempranos y tardíos.

15 Un grupo de los vectores de la invención han sido diseñados específicamente para la vacunación de seres humanos. En estos vectores, tanto la secuencia de la proteína gp120 como la secuencia de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef se han generado a partir de secuencias del virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1. La utilización para la generación de los vectores recombinantes de secuencias obtenidas

20 específicamente de aislados naturales y que preferentemente pertenecen a los clades del VIH-1 más representados en la naturaleza, B y C, posibilita además una vacunación mundial más representativa de la población infectada o en riesgo. Por todo ello, el uso de estos vectores para vacunación, de forma aislada o como parte de protocolos de inmunización en los que se suministran vectores codificantes de antígenos en varias

25 dosis espaciadas en el tiempo, se ha considerado que puede ser de especial utilidad para ayudar a contener la expansión del virus VIH. Además, estos vectores derivados del virus MVA representan tanto una alternativa a construcciones similares derivadas del virus NYVAC como un complemento útil para la utilización de cada uno de los mencionados vectores recombinantes en fases diferentes de protocolos de inmunización

30 en los que se suministra una o dos dosis para desencadenar la respuesta inmune y una o más dosis sucesivas para potenciarla, pues las pruebas realizadas hasta ahora por el grupo de los inventores muestran que, además de diferir en su genoma y en la respuesta

inmune que generan en ratones frente a los antígenos del VIH gp120 y Gag-Pol-Nef, ambos vectores manifiestan un comportamiento diferencial en cultivos celulares y modelos animales (inducción de diferentes patrones de expresión de genes humanos en células HeLa, menor inducción por parte del MVA de apoptosis que el vector NYVAC, induciendo éste último mayor destrucción celular y respuesta humoral contra sí mismo (28)) que hace predecible que su comportamiento sea diferente también tras la administración a seres humanos como vacunas de vectores recombinantes generados a partir de cada uno de ellos.

Tal como se describe más adelante en Ejemplos de la presente memoria, los ensayos realizados en ratones demuestran la capacidad inmunogénica de estos vectores de la invención diseñados para la vacunación de seres humanos y, en particular, de las dos realizaciones de vectores de la invención con las que se llevaron a cabo los ensayos, los vectores MVA-B y MVA-C. Sin embargo, para poder evaluar su capacidad para conferir protección para controlar la infección por el VIH, es necesario acudir a un modelo de primates no humanos, como puede ser el de los macacos Rhesus anteriormente descritos, que sean sometidos a un protocolo de desencadenamiento/potenciación de la respuesta inmune y en los que se evalúe posteriormente la capacidad para controlar la infección que la respuesta inmune generada sea capaz de conferir tras “desafiar” la misma mediante la inoculación de un virus capaz de infectar a los macacos y de dar lugar en ellos a síntomas similares a los del SIDA, desafío para el cual sería adecuada una de las variantes patogénicas del SHIV cuya existencia se mencionó anteriormente. Este tipo de ensayos, sin embargo, no pueden realizarse con los vectores de la invención diseñados para la vacunación de seres humanos, vectores cuyos insertos codifican proteínas exógenas al virus MVA que derivan todas ellas de secuencias de proteínas propias del VIH-1, sino que requieren la generación de vectores especiales que cumplan varias condiciones:

- a) contener secuencias codificantes retrovirales del mismo origen que las contenidas en el virus que vaya a utilizarse en el desafío, virus que puede ser el SHIV, de manera que la secuencia correspondiente al gen env procederá del VIH-1 mientras que las posibles secuencias correspondientes a otros genes, como puedan ser gag, pol o nef, procederán del SIV);

- 14 -

- b) presentar la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que los vectores diseñados para uso en humanos con los que se quieren comparar.

El cumplimiento de estas condiciones permite que el estudio sea factible y que se puedan extrapolar de sus resultados el comportamiento esperable al utilizar en seres humanos los vectores con los que se los quiere comparar. La presente invención proporciona también vectores que permiten valorar la capacidad protectora que podría generarse en seres humanos que fueran vacunados con virus recombinantes de la invención, derivados de MVA y con secuencias exógenas derivadas todas ellas de secuencias de proteínas del VIH-1. Adicionalmente, se proporcionan también vectores recombinantes análogos construidos a partir de otro derivado de poxvirus, el NYVAC, para poder comparar el efecto de ambos.

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona nuevos vectores recombinantes derivados del virus MVA capaces de expresar simultáneamente una forma de la proteína Env del VIH-1 que carece de la parte correspondiente a la proteína gp41 y una proteína de fusión correspondiente a las proteínas Gag, Pol y Nef del VIH-1 que no se proteoliza por acción de la proteasa del VIH, estando la secuencia correspondiente a la proteína Env y la secuencia correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef bajo el control de promotores idénticos e insertadas ambas en el mismo lugar de inserción del vector. Estos vectores de la invención, en los que las secuencias codificantes de antígenos exógenos al MVA se derivan todas ellas de secuencias propias del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), han sido diseñados para poder fabricar con ellos medicamentos que sirvan como vacunas preventivas o terapéuticas contra el SIDA en seres humanos a los que se les administre; por ello, para diferenciarlos de los vectores de la invención que se describirán más adelante, que comprenden secuencias derivadas del SIVmac y han sido diseñados para ser administrados a macacos, en la presente memoria se alude en ocasiones a estos primeros vectores de la invención con expresiones del tipo “los vectores de la invención diseñados para la vacunación de seres humanos”, “los vectores derivados del virus MVA diseñados para la vacunación de seres humanos”, “los vectores de la invención diseñados para ser utilizados en seres

humanos". Por claridad de la descripción, en ocasiones se alude a ellos también describiendo la composición de su genoma, con expresiones del tipo "los vectores en los que las secuencias codificantes de antígenos exógenos al MVA se derivan todas ellas de secuencias propias del VIH-1".

5 Así, la invención se refiere también tanto a composiciones que contienen dichos vectores recombinantes como al uso de dichos vectores para la fabricación de un medicamento destinado a ser utilizado como vacuna para ayudar a prevenir o tratar una infección provocada por el virus VIH.

La expresión de la proteína Env sintetizada a partir de los vectores de la  
10 invención da lugar a proteínas gp120 no asociadas a proteínas gp41 o fragmentos de la misma, facilitándose con ello su salida de la célula y su liberación al medio, lo que hace más probable la activación de las células B y la producción de anticuerpos neutralizantes frente al VIH. En las realizaciones preferidas de los vectores de la invención, la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env que forma  
15 parte de los vectores de la invención codifica una proteína gp120 completa, habiéndose delecionado toda la secuencia del gen env que en la secuencia natural de dicho gen aparece tras el último triplete correspondiente a la proteína gp120, eliminando con ello, la totalidad de la secuencia codificante correspondiente a la proteína gp41.

En cuanto a la proteína de fusión de Gag, Pol y Nef, está diseñada de manera  
20 que no dé lugar a la formación de partículas similares a partículas virales. La forma utilizada para la construcción de las realizaciones de la invención que se describen con detalle en la presente memoria se acumula en el citoplasma de las células infectadas con los vectores recombinantes de la invención en forma de poliproteína, sin experimentar el procesamiento característico del virus VIH provocado por la proteasa viral que daría  
25 lugar a su escisión en proteínas más pequeñas, aunque posteriormente sí va a experimentar el procesamiento celular que permite la presentación de péptidos antigénicos de la proteína de fusión y la generación de una respuesta inmune contra los mismos.

Se prefiere especialmente que el lugar del vector en el que se encuentran  
30 insertadas la secuencia correspondiente a la proteína Env y la secuencia correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef sea el gen de la timidina quinasa, gen que queda inactivado por la presencia de las secuencias en él insertadas, aumentándose con ello la

seguridad de los vectores de la invención para ser suministrados a individuos con el propósito de generar en ellos una respuesta inmune frente al VIH.

En las realizaciones preferidas de estos vectores de la invención, diseñados para la vacunación de seres humanos, la secuencia codificante de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef se genera a partir de secuencias de proteínas Gag, Pol y Nef para las que se deduce una secuencia de ADNc utilizando codones de lectura frecuentes en mamíferos, buscando con ello aumentar los niveles de expresión de la proteína de fusión. Además, en la secuencia codificante de la proteína de fusión se provocan modificaciones respecto a las secuencias naturales, para aumentar su inmunogenicidad y su seguridad. Las modificaciones por las que se tiene mayor preferencia incluyen la inactivación por mutagénesis del lugar activo de la proteasa y la eliminación mediante delección del lugar activo de la integrasa, la realización de delecciones en el gen nef y su inserción en la región codificante de la RT, la traslocación del lugar activo de la RT al extremo C-terminal de la proteína de fusión y la fusión de la secuencia del gen gag en fase de lectura con pol-nef, creando una desviación de una fase de lectura e introduciendo un cambio de glicina a alanina para prevenir la formación de partículas semejantes a virus. De entre ellas, se prefiere específicamente las modificaciones realizadas para generar la secuencia correspondiente a la proteína de fusión descritas por Didierlaurent A. *et al.* (18). Un esquema de los elementos que conforman una proteína de fusión Gag-Pol-Nef que cumple todas estas características se muestra en la zona inferior de la Figura 40, marcada como GagPolNef (gpn).

En las realizaciones preferidas de los vectores de la invención diseñados para la vacunación de seres humanos, el promotor se escoge de manera que permitan la expresión de la proteína Env y de la proteína de fusión Gag-Pol-Env tanto en etapas tempranas como tardías del ciclo infectivo del virus MVA. El promotor sintético temprano/tardío de poxvirus pE/L (19) es la opción elegida para las realizaciones más preferidas de la invención, aunque cualquier otro promotor de poxvirus podría utilizarse igualmente para la construcción de vectores de la invención.

En una realización particularmente preferida de los vectores de la invención diseñados para la vacunación de seres humanos, en los que las secuencias codificantes de antígenos exógenos al MVA se derivan todas ellas de secuencias propias del VIH-1, tanto la secuencia correspondiente a la proteína Env como las secuencias utilizadas para

generar la secuencia que da lugar a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef proceden de aislados naturales pertenecientes al clade B y/o al clade C. En realizaciones aún más preferidas de la invención, la secuencia correspondiente a la proteína Env y las secuencias utilizadas para generar la secuencia que da lugar a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef proceden de aislados naturales pertenecientes a un mismo clade, preferentemente el clade B o el clade C, pero también se consideran realizaciones de la invención aquellas en las que la secuencia correspondiente a la proteína Env procede de un aislado correspondiente a un clade y las secuencias utilizadas para generar la secuencia que da lugar a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef proceden de un aislado correspondiente a un clade diferente. Están incluidas también dentro del alcance de la invención aquellas realizaciones en las que al menos una de las secuencias utilizadas para generar la secuencia correspondiente a la proteína de fusión, es decir, la secuencia de gag, la secuencia de pol o la secuencia de nef, procede de un aislado diferente, pudiendo ser diferentes los tres aislados de los que se obtiene cada una de las correspondientes secuencias codificantes e, incluso, no pertenecer al mismo clade. Las composiciones de la invención que contienen vectores recombinantes de la invención, destinadas a ser utilizadas en la vacunación contra el virus VIH, pueden contener vectores recombinantes generados únicamente a partir de aislados de un clade concreto, preferentemente el B o el C, mezclas de vectores recombinantes de distintos clades en las que cada uno de los vectores se ha construido con secuencias procedentes de aislados de un único clade, vectores idénticos entre sí que se han construido a partir de secuencias procedentes de aislados de clades diferentes o mezclas de cualquiera de los vectores incluidos dentro del alcance de la invención. Se prefieren aquellas composiciones que contengan vectores de la invención generados a partir de un único clade, preferentemente el B o el C, o mezclas de vectores generados a partir de aislados del clade B y vectores generados a partir de aislados del clade C. Las composiciones que contengan tanto vectores generados a partir de aislados del clade B y vectores generados a partir de aislados del clade C deberían ser de especial utilidad para ser utilizadas para la prevención y/o el tratamiento de la infección por el VIH en aquellas zonas en las que ambos clades están representados de forma significativa.

En las realizaciones de la invención cuya construcción se describe en los ejemplos de la presente memoria, la secuencia correspondiente a la proteína Env se

encuentra insertada en sentido opuesto con respecto al sentido de la transcripción de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef, encontrándose los promotores correspondientes a cada una de las secuencias correspondientes a proteínas del VIH insertados en orientaciones opuestas y en la zona más interna del inserto. Cada uno de los vectores de la invención  
5 diseñados para la vacunación de seres humanos cuya construcción se describe se generaron a partir de aislados naturales correspondientes a clades diferentes. El primero de ellos, MVA-B, permite la expresión de una forma del gen env obtenida a partir del aislamiento del VIH BX08, procedente de Europa, y una proteína de fusión Gag-Pol-Nef que resulta de la traducción de una secuencia polinucleotídica generada a partir de  
10 secuencias correspondientes a gag, pol y nef del aislamiento IIIB, que forma parte, como el aislamiento BX08, del clade B. El segundo de los vectores, MVA-C, permite la expresión una forma del gen env obtenida a partir del aislamiento del VIH CN54, procedente de China, y una proteína de fusión Gag-Pol-Nef que resulta de la traducción de una secuencia polinucleotídica generada a partir de secuencias correspondientes a  
15 gag, pol y nef del mismo aislamiento CN54, que forma parte del clade C. Las secuencias de aminoácidos expresadas a partir de cada uno de los genes env contenidos en los vectores derivados de MVA reproducen la secuencia completa de las proteínas gp120 correspondientes a los virus del aislamiento BX08, en el caso del MVA-B, y a los virus del aislamiento CN54 en el caso del MVA-C. La construcción de estos  
20 vectores y la evaluación de su capacidad inmunogénica en ratones se describen con más detalle con ayuda de las Figuras 1 a 38 y los Ejemplos 1 a 32 que aparecen más adelante en la presente memoria.

Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, los ratones no son un modelo adecuado para evaluar la capacidad para controlar la infección del VIH que los  
25 vectores de la invención sean capaces de conferir a seres humanos inmunizados con ellos. Para ello es más adecuado recurrir a animales evolutivamente más próximos a los seres humanos, como pueden ser primates no humanos tales como los macacos Rhesus, a los que se les inocule un virus capaz de infectar a dichos animales y de producir en ellos un síndrome similar al SIDA, características que cumplen algunas variantes  
30 patogénicas del virus SHIV como puede ser la denominada SHIV89.6P. Desafiar la respuesta inmunogénica producida por uno o más vectores de vacunación con una variante del virus SHIV implica que la inmunización no puede realizarse con los



vectores de la invención anteriormente descritos, que están diseñados para expresar proteínas derivadas de secuencias propias del virus contra cuya infección se busca protección, el VIH-1, pues no se reproducirían en el ensayo las condiciones del proceso que sucedería en un ser humano. Por ello, la evaluación de la capacidad de control de la  
5 infección que puedan conferir los vectores de la invención diseñados para la vacunación de seres humanos requiere la generación de vectores especiales que cumplan varias condiciones:

- 10 a) contener secuencias codificantes retrovirales del mismo origen que las contenidas en el virus que vaya a utilizarse en el desafío, virus que puede ser el SHIV, de manera que la secuencia correspondiente al gen env procederá del VIH-1 mientras que las posibles secuencias correspondientes a otros genes, como puedan ser gag, pol o nef, procederán del SIV);
- 15 b) presentar la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que los vectores diseñados para uso en humanos con los que se quieren comparar.

La invención proporciona también vectores que cumplen estas características, que son también un objeto de la presente invención. Así, la invención se refiere también a nuevos vectores recombinantes derivados del virus MVA capaces de expresar simultáneamente una forma de la proteína Env del VIH-1 que carece de la parte  
20 correspondiente a la proteína gp41 y una proteína de fusión que contiene secuencias de las proteínas Gag, Pol y Nef del virus de la inmunodeficiencia de simio SIV, estando la secuencia correspondiente a la proteína Env y la secuencia correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef bajo el control de promotores idénticos e insertadas ambas en el mismo lugar de inserción del vector. En estos vectores, por tanto, a diferencia de los  
25 vectores de la invención diseñados para la vacunación de seres humanos la proteína de fusión correspondiente a las proteínas Gag, Pol y Nef no se sintetiza a partir de secuencias procedentes de VIH-1, sino de secuencias procedentes del SIVmac (virus de la inmunodeficiencia de simio aislado de macacos). Ello permite su utilización en protocolos de inmunización de macacos y el posterior desafío de la inmunidad creada  
30 con un virus SHIV patógeno en el que la secuencia del gen env deriva de la correspondiente secuencia de un aislado del VIH-1, mientras que las secuencias correspondientes a los genes gag, pol y nef correspondan al virus de simio que infecta a

macacos. De esta manera, al cumplirse la condición de que las secuencias codificantes retrovirales contenidas en los vectores de la invención diseñados para realizar ensayos en macacos tengan su origen en el mismo tipo de virus que las presentes en el retrovirus que vaya a utilizarse en el desafío, la inmunidad generada frente a las proteínas sintetizadas a partir de dichos vectores podrá servir para controlar la infección desencadenada por el retrovirus que se inocule en el desafío.

Para que tenga sentido el establecimiento de paralelismos entre los resultados observados en macacos y los que podrían esperarse en seres humanos, los vectores de la invención diseñados para realizar ensayos en macacos cumplen la condición de presentar la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que los vectores de la invención diseñados para la vacunación de seres humanos con los que se quieren comparar. De acuerdo con ello, de forma análoga a los vectores en los que las secuencias codificantes de antígenos exógenos al MVA se derivan todas ellas de secuencias propias del VIH-1, la expresión de la proteína Env sintetizada a partir de los vectores de la invención diseñados para ser utilizados en macacos da lugar a proteínas gp120 no asociadas a proteínas gp41 o a fragmentos de la misma, facilitándose con ello su salida de la célula y su liberación al medio, lo que hace más probable la activación de las células B y la producción de anticuerpos neutralizantes frente al VIH. En las realizaciones preferidas de la invención, la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env que forma parte de los vectores de la invención codifica una proteína gp120 completa, habiéndose delecionado toda la secuencia del gen env que en la secuencia natural de dicho gen aparece tras el último triplete correspondiente a la proteína gp120, eliminando con ello, la totalidad de la secuencia codificante correspondiente a la proteína gp41. Un esquema referente a la secuencia de la proteína Env que forma parte de los vectores de la invención se muestra en la parte superior de la Figura 40. Es el último gráfico el que corresponde a la secuencia de una proteína gp120 expresada a partir de vectores de la invención, en la que se ha eliminado la totalidad de la secuencia codificante correspondiente a la proteína gp41, mientras los gráficos previos representan proteínas de la envuelta con secuencias correspondientes a la proteína gp41.

En cuanto a la proteína de fusión de Gag, Pol y Nef, también de forma análoga a la proteína homóloga sintetizada a partir de los vectores en los que la correspondiente

secuencia codificante deriva de secuencias propias del VIH-1, está diseñada de manera que no dé lugar a la formación de partículas similares a partículas virales. La forma utilizada para la construcción de las realizaciones de los vectores de la invención que se describen con detalle en la presente memoria se acumula en el citoplasma de las células infectadas con los vectores recombinantes de la invención en forma de poliproteína, sin experimentar el procesamiento característico del virus VIH provocado por la proteasa viral que daría lugar a su escisión en proteínas más pequeñas, aunque posteriormente sí va a experimentar el procesamiento celular que permite la presentación de péptidos antigénicos de la proteína de fusión y la generación de una respuesta inmune contra los mismos.

Tal como se ha comentado anteriormente, la utilidad principal de los vectores de la invención que comprenden secuencias derivadas del SIVmac es la de ser utilizados en protocolos de inmunización para extraer datos sobre la posible utilidad como vacunas de vectores diseñados para ser administrados a seres humanos, que deben tener la misma estructura de organización génica, promotores y sitio de inserción. Es por ello que las realizaciones equivalentes a las realizaciones preferidas de los vectores de la invención diseñados para la vacunación de seres humanos (exceptuando las que se refieren a aislados del VIH-1 como origen preferido de las secuencias codificantes de las proteínas Env y Gag-Pol-Nef) son también realizaciones preferidas de los vectores diseñados para realizar ensayos en macacos. Así, se prefiere especialmente que el lugar del vector en el que se encuentran insertadas la secuencia correspondiente a la proteína Env y la secuencia correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef sea el gen de la timidina quinasa, gen relacionado con la virulencia que queda inactivado por la presencia de las secuencias en él insertadas, aumentándose con ello la seguridad de los vectores.

En las realizaciones preferidas, la secuencia codificante de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef se genera a partir de secuencias de proteínas Gag, Pol y Nef para las que se deduce una secuencia de ADNc utilizando codones de lectura frecuentes en mamíferos, buscando con ello aumentar los niveles de expresión de la proteína de fusión. Además, en la secuencia codificante de la proteína de fusión se han provocado modificaciones respecto a las secuencias naturales, para aumentar su inmunogenicidad y su seguridad. Las modificaciones por las que se tiene mayor preferencia incluyen la inactivación por mutagénesis del lugar activo de la proteasa y la eliminación mediante

delección del lugar activo de la integrasa, la realización de deleciones en el gen nef y su inserción en la región codificante de la RT, la traslocación del lugar activo de la RT al extremo C-terminal de la proteína de fusión y la fusión de la secuencia del gen gag en fase de lectura con pol-nef, creando una desviación de una fase de lectura e introduciendo un cambio de glicina a alanina para prevenir la formación de partículas semejantes a virus. De entre ellas, se prefiere específicamente las modificaciones realizadas para generar la secuencia correspondiente a la proteína de fusión descritas por Didierlaurent A. *et al.* (18). Tal como sucedía en el caso de las proteínas Gag-Pol-Nef derivadas de secuencias propias del VIH-1, las proteínas de fusión Gag-Pol-Nef que cumplen todas estas características, aunque derivadas en este caso de secuencias propias del SIVmac, están representadas por el esquema que se muestra en la zona inferior de la Figura 40, marcada como GagPolNef (gpn).

En las realizaciones preferidas de la invención, el promotor se escoge de manera que permitan la expresión de la proteína Env y de la proteína de fusión Gag-Pol-Env tanto en etapas tempranas como tardías del ciclo infeccioso del virus MVA. El promotor sintético temprano/tardío de poxvirus pE/L (19) es la opción elegida para las realizaciones más preferidas de la invención, aunque cualquier otro promotor de poxvirus podría utilizarse igualmente para la construcción de vectores de la invención.

En los Ejemplos 1 y 19 se describe, respectivamente, la construcción de los vectores denominados MVA-B y MVA-C, que suponen sendas realizaciones de vectores de la invención, diseñados para la vacunación de seres humanos, que cumplen todas las características preferidas para estos vectores de la invención. En ellos, la secuencia correspondiente a la proteína Env se encuentra insertada en sentido opuesto con respecto al sentido de la transcripción de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef, encontrándose los promotores correspondientes a cada una de las secuencias correspondientes a proteínas del VIH insertados en orientaciones opuestas y en la zona más interna del inserto. Para poder extraer datos sobre la posible protección que estos vectores conferirían a seres humanos vacunados con ellos, en la presente memoria se describe la construcción de un vector, obtenido igualmente a partir del MVA, que posee, igualmente insertado en el locus de timidina quinasa, un inserto que comprende la secuencia codificante de una proteína de fusión Gag-Pol-Nef generada a partir de secuencias del virus SIVmac en la que se han realizado todas las modificaciones antes

mencionadas, detalladas en la publicación de Didierlaurent *et al.* (18) y bajo el control de un promotor sintético temprano/tardío pE/L, así como la secuencia codificante de una proteína gp120, procedente de un virus VIH-1, que carece totalmente de parte codificante correspondiente a la proteína gp41, igualmente bajo el control de un  
5 promotor sintético temprano/tardío pE/L, estando los promotores correspondientes a cada una de las secuencias correspondientes a proteínas del VIH insertados en orientaciones opuestas y en la zona más interna del inserto. A los vectores que cumplen estas características se les ha denominado, de forma general MVA-SHIV.

Para realizar el desafío posterior a la administración del vector MVA-SHIV cuya  
10 construcción se describe en la presente memoria, se ha elegido el virus quimérico de simio y humano SHIV89.6P. Por ello, para poder realizar los experimentos de valoración de la protección conferida por la inmunización con el vector en condiciones óptimas, se ha construido un vector MVA-SHIV cuyo genoma contiene un inserto del que forman parte tanto la secuencia codificante de la proteína 89.6P-gp120, es decir,  
15 una secuencia correspondiente a la proteína Env del virus SHIV89.6P (originariamente procedente del aislado 89.6 de VIH-1), modificada para que carezca totalmente de la parte correspondiente a la proteína gp41, como secuencias codificantes de los antígenos Gag, Pol y Nef de dicho virus SHIV89.6P (originariamente procedentes del virus de la inmunodeficiencia de simio, aislado de macacos, SIVmac239), a partir de las cuales se  
20 ha generado la secuencia correspondiente a la proteína de fusión SIVgpn realizando en ellas las modificaciones preferidas de la invención. Es por ello que al vector construido de esta manera se le denomina específicamente MVA-89.6P-SIVgpn o, de forma más detallada, MVA-gp120-HIV89.6p-SIVmac239-gag-pol-nef.

Tanto en los Ejemplos que describen los ensayos de inmunogenicidad realizados  
25 con los vectores MVA-B y MVA-C, como en los Ejemplos encaminados a valorar la capacidad inmunogénica de los vectores de la invención diseñados para realizar ensayos en macacos y, por añadidura, su capacidad para conferir protección frente a infecciones causadas por el SHIV, se ha considerado adecuado disponer también de un control positivo con el que evaluar los resultados obtenidos con los vectores derivados de  
30 MVA. Para tal finalidad se han utilizado vectores recombinantes derivados de NYVAC con la misma estructura de organización génica, sitio de inserción en el genoma viral (el locus de timidina quinasa, TK) y los mismos promotores sintéticos tempranos/tardíos,

situados en igual disposición que en el vector derivado de MVA con los que se desean comparar: los vectores NYVAC-B (utilizado en los ensayos realizados con MVA-B), NYVAC-C (utilizado en los ensayos realizados con MVA-C) y un vector adicional, previsto para realizar ensayos comparativos con los realizados con los vectores denominados MVA-SHIV, que se ha diseñado específicamente para realizar los ensayos de evaluación de la capacidad protectora descritos en la presente memoria, al que se ha denominado, de forma abreviada, NYVAC-SHIV. Teniendo en cuenta el origen de las secuencias presentes en su inserto, idéntico al origen de las secuencias presentes en el inserto del vector denominado MVA-89.6P-SIVgpn o MVA-gp120-HIV89.6p-SIVmac239-gag-pol-nef con el que se desea comparar, al vector NYVAC-SHIV concreto cuya construcción se describe en la presente memoria se le ha denominado NYVAC-89.6P-SIVgpn o, de forma más detallada, NYVAC-gp120-HIV89.6-SIVmac239-gag-pol-nef. Dada su utilidad como control positivo en los ensayos que constituyen la utilidad principal de los vectores MVA-SHIV de la presente invención, los vectores del tipo NYVAV-SHIV están también comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

La presente invención se refiere también a composiciones que contienen vectores recombinantes de la invención que comprenden una secuencia codificante de una forma de la proteína Env del VIH-1 que carece de la parte correspondiente a la proteína gp41 en su totalidad y una secuencia codificante de una proteína de fusión Gag-Pol-Nef derivada de secuencias del virus SIVmac, así como a su uso para valorar la respuesta inmunológica y la capacidad protectora frente a la infección por el VIH desencadenada por vectores con la misma estructura de organización de genes, promotores y sitio de inserción que se pretendan utilizar para la vacunación de seres humanos. La realización preferida de esa forma de utilización de los vectores de la invención consiste en administrárselos a simios, preferiblemente a macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), en los que se evaluará la respuesta inmunológica producida y la capacidad protectora generada tras dicha administración, sometiénolos posteriormente a un desafío con un SHIV patógeno. Así se obtiene información relevante para valorar si los resultados indican que merece la pena llevar a cabo la siguiente fase de ensayos clínicos en seres humanos con los vectores homólogos previstos para la vacunación de seres humanos, así como sobre el procedimiento adecuado para realizar dichos ensayos.

Preferiblemente, el protocolo que se siga para la administración de los vectores de la invención a macacos responderá al esquema que se tenga previsto seguir para la vacunación de seres humanos o a un esquema del cual se desee evaluar su grado de adecuación.

5            Los ensayos de inmunogenicidad realizados con los vectores MVA-B y MVA-C, descritos posteriormente en Ejemplos de la presente memoria, así como los ensayos de protección frente a la infección de SHIV89.6P realizados en macacos con el vector MVA-89.6P-SIVgpn, son un indicativo tanto de la utilidad como vacunas de los  
10            vectores de la invención diseñados para la vacunación de seres humanos como de la validez de los protocolos de inmunización utilizados. Por todo ello, son también un objeto de la presente invención los métodos de vacunación para prevenir o tratar una  
15            infección provocada por el VIH en los que se administra al menos un vector recombinante de la invención, derivado del virus MVA, capaz de expresar simultáneamente una forma de la proteína Env del VIH-1 que carece de la parte  
20            correspondiente a la proteína gp41 en su totalidad y una proteína de fusión que contiene secuencias de las proteínas Gag, Pol y Nef del VIH-1, es decir, uno de los vectores de la invención diseñados para la fabricación de medicamentos útiles como vacunas preventivas o terapéuticas contra el SIDA. Los métodos de vacunación incluidos dentro del alcance de la invención pueden comprender una o más dosis de vacunación, siempre  
25            y cuando en una de ellas se administre al menos un vector de la invención. Se prefieren los métodos en los que se administra más de una dosis de vacunación para desencadenar o potenciar la respuesta inmune. De entre ellos, se prefieren especialmente los protocolos combinados en los que se usan vectores diferentes en la primera dosis de desencadenamiento de la respuesta inmune y en las dosis sucesivas destinadas a reforzar  
30            la respuesta desencadenada (potenciación o refuerzo). Dado que los vectores derivados de MVA parecen ser de mayor utilidad para conseguir una respuesta de protección frente al VIH cuando se suministran en la segunda o en dosis sucesivas destinadas al refuerzo de la respuesta inmune previamente desencadenada, lo que más se prefiere es que al menos un vector recombinante derivado del MVA de la invención esté presente  
35            en la segunda dosis o en una dosis posterior, pudiendo estar ausente o presente de la primera dosis de vacunación. En los casos en los que al menos un vector derivado de MVA está presente en la segunda dosis y/o en una dosis posterior de vacunación, se

- 26 -

prefiere que al menos un vector administrado en la primera dosis de vacunación sea capaz de expresar las mismas proteínas derivadas del VIH que el vector de la invención presente en otra dosis diferente. De ellos, los vectores derivados del virus NYVAC, NYVAC-B y NYVAC-C y las combinaciones que comprendan ambos vectores son una opción adecuada para ser utilizados en la primera dosis de vacunación como parte de un método de vacunación de la invención cuando el vector de la invención administrado en la segunda y/o en una dosis sucesiva de vacunación es, respectivamente, el vector de la invención que posteriormente se denomina MVA-B o el vector que posteriormente se denomina MVA-C o bien una composición que comprenda tanto MVA-B como MVA-C. También son realizaciones preferidas del método de vacunación de la invención aquellas en las que la primera dosis de vacunación contiene el vector de ADN desnudo DNA-B cuando en la segunda dosis y/o en dosis posteriores de vacunación está presente el vector MVA-B de la invención, así como aquellas en las que la primera dosis de vacunación contiene el vector de ADN desnudo DNA-C cuando en la segunda dosis y/o en dosis posteriores de vacunación está presente el vector MVA-C de la invención.

La construcción de vectores de la presente invención y los ensayos en los que se evalúa tanto su capacidad inmunogénica y como su capacidad protectora se describe con más detalle con ayuda de las Figuras y los Ejemplos que aparecen más adelante en la presente memoria.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un esquema de los mapas de los genomas de los virus MVA (parte superior) y NYVAC (parte inferior), en los que la localización de los genes fragmentados se indica mediante un sombreado oscuro, indicándose su denominación inmediatamente debajo. Los nombres subrayados corresponden a denominaciones de genes deletados en MVA e intactos en NYVAC, los nombres en negrita corresponden a denominaciones de genes deletados tanto en MVA como en NYVAC y los nombres en cursiva corresponden a denominaciones de genes intactos en MVA y que presentan deletaciones en NYVAC. Las letras A a Q situadas sobre cada una de las representaciones de los genomas se refieren a la denominación de los distintos



fragmentos de restricción generados por la enzima HindIII al digerir con ella el ADN genómico de MVA y NYVAC. RTI: región terminal izquierda; RCC: región central conservada; RTD: región terminal derecha.

La Figura 2 muestra un esquema de la construcción del vector plasmídico de transferencia pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1 y los plásmidos a partir de los cuales se genera.

La Figura 3 muestra los fragmentos generados en el análisis por PCR del locus TK del virus MVA-B. La parte superior de la figura muestra un esquema en el que se representan las posiciones de los oligonucleótidos utilizados como cebadores, los tamaños estimados de los fragmentos que se generan en la PCR con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos, así como su localización con respecto a los insertos y las secuencias flanqueantes de los mismos. La parte inferior muestra fotografías de los geles obtenidos al someter a electroforesis los productos de las PCR realizadas con diferentes parejas de cebadores. A: PCR cebada con los oligonucleótidos TK-L y GPN7649; B: PCR cebada con los oligonucleótidos GPN8170 y E/L; C: PCR cebada con los oligonucleótidos BX08556/TK-R. Las muestras correspondientes a cada calle son: 1: pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1; 2: MVA-B; 3: MVA-WT; 4: NYVAC-WT.

La Figura 4 muestra una fotografía de un gel obtenido al someter a electroforesis los productos resultantes de una reacción de PCR en la que se utilizaron como cebadores oligonucleótidos que hibridaban con las secuencias flanqueantes del gen TK. Las muestras correspondientes a cada calle son: 1: NYVAC-WT; 2: MVA-B; 3: MVA-WT.

La Figura 5 muestra los resultados del análisis por transferencia tipo Western de la expresión de los genes heterólogos gp120-BX08 (parte superior de la figura) y gagpolnef-IIIB (parte inferior de la figura, en la que la proteína gagpolnef-IIIB se abrevia como GPN) desde un vector NYVAC-B (primera calle), desde los stocks P1, P2 y P3 (calles 2-4: P1, P2 y P3) y desde células en las que se había simulado la infección (calle 5).

La Figura 6 muestra los resultados correspondientes a las pruebas de estabilidad del vector MVA-B. La parte A muestra los resultados de las inmunotinciones de células CEF infectadas con el vector MVA-B y tratadas con los anticuerpos anti-WR (fotografía de la izquierda), anti-p24 (fotografía central) y anti-gp120 (fotografía de la derecha),

junto con un gráfico en el que se representa el total de células teñidas con cada anticuerpo. La parte B muestra la detección de la expresión de las proteínas gagpolnef-III B (fotografía de la izquierda) y gp120-BX08 (fotografía de la derecha) mediante transferencia tipo Western y detección con anticuerpos dirigidos contra dichas proteínas en células infectadas con el virus recombinante NYVAC-B (NYVACB), células en las que se había simulado la infección (M) y stocks de virus correspondientes a los pases 7 a 10 (P7, P8, P9 y P10).

La Figura 7 muestra la cinética de expresión de la proteína gp120-BX08 obtenida mediante el análisis con un anticuerpo anti-gp120 del clade B de transferencias tipo Western correspondientes a muestras tomadas pasadas 4, 8, 16 y 24 horas de una infección con un virus recombinante. La parte superior corresponde a la infección con el virus MVA-B y la inferior a la infección con el virus NYVAC-B. Para cada una de las muestras aparece inmediatamente debajo la intensidad de la señal lograda al incubar las muestras con un anticuerpo anti- $\beta$ -actina ( $\beta$ -act.) P: precipitado; S: sobrenadante; M: simulación de infección..

La Figura 8 muestra la cinética de expresión de la proteína gagpolnef-III B obtenida mediante el análisis con un anticuerpo anti-p24 del clade B de transferencias tipo Western correspondiente a muestras tomadas pasadas 6, 18 y 24 horas de una infección con un virus recombinante. Las calles marcadas como "1" corresponden a muestras infectadas con el virus NYVAC-B, las calles marcadas como "2" a muestras infectadas con el virus MVA-B y la calle marcada como M a una muestra en la que se simuló la infección. La flecha indica la posición de la proteína gagpolnef-III B (abreviada como GPN).

La Figura 9 muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT expandido de células T secretoras de IFN- $\gamma$  generadas por la inmunización de ratones BALB/c con virus recombinantes a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-BX08 y gagpolnef-III B. En ordenadas se indica el número de células T secretoras de IFN- $\gamma$  detectadas por cada  $10^6$  esplenocitos, específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade B que se indican en abscisas. Para cada uno de esos grupos de péptidos, la primera barra corresponde al valor detectado en animales inmunizados con MVA-B y la segunda a animales inmunizados con NYVAC-B.

La Figura 10 muestra la producción de citoquinas detectada en ratones BALB/c inmunizados con virus recombinantes a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-BX08 y gagpolnef-IIIB. La parte izquierda corresponde a los niveles de IFN- $\gamma$  y la derecha a los niveles de IL-10, ambos en pg/ml, detectados en los sobrenadantes de esplenocitos de animales inoculados con MVA-B (primera barra de cada uno de los grupos de péptidos) o NYVAC-B (segunda barra de cada uno de los grupos de péptidos) frente a grupos específicos de péptidos representativos del clade B.

La Figura 11 muestra gráficos correspondientes a los niveles de distintos tipos de células T secretoras de IFN- $\gamma$  y presentes en los esplenocitos de ratones BALB/c inoculados con MVA-B (primera barra de cada grupo de péptidos) o NYVAC-B (segunda barra de cada grupo de péptidos) reestimulados por los grupos de péptidos representativos del clade B indicados en abscisas. El gráfico superior muestra el porcentaje de células T CD8+ que secretan IFN- $\gamma$ , el gráfico intermedio el porcentaje de células T CD4+ que secretan IFN- $\gamma$  y el gráfico inferior el porcentaje total de células T CD8+ y T CD4+ que secretan IFN- $\gamma$ , todos ellos detectados por cada  $3 \times 10^5$  esplenocitos.

La Figura 12 muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IFN- $\gamma$  generadas por la inmunización de ratones BALB/c con distintas combinaciones de vectores a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-BX08 y gagpolnef-IIIB, así como los resultados correspondientes a los controles, en todos los casos administrando los vectores siguiendo protocolos de inducción/potenciación. En ordenadas se indica el número de células T secretoras de IFN- $\gamma$  detectadas por cada  $10^6$  esplenocitos, específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade B que se indican en abscisas. Para cada uno de esos péptidos, la primera barra corresponde al valor detectado en animales inmunizados con DNA-B+MVA-B, la segunda a animales inmunizados con DNA-B+NYVAC-B, la tercera a animales inmunizados con DNA-B+DNA-B, la cuarta a animales inmunizados con DNA  $\emptyset$  +MVA-WT y la última a animales inmunizados con DNA  $\emptyset$  + NYVAC-WT. Los círculos (●) bajo las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo; la presencia de asteriscos (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos grupos.

La Figura 13 muestra la producción de IFN- $\gamma$ , en pg/ml, generada tras la reestimulación, con los grupos de péptidos indicados en abscisas, de esplenocitos extraídos de ratones BALB/c inmunizados mediante protocolos de combinación de inducción/potenciación en los que se incluye el DNA-B en la primera dosis de iniciación de la respuesta excepto en la última muestra, que se inocula con ADN sin inserto (DNA- $\phi$ ), inoculándose en la segunda dosis de potenciación de la respuesta MVA-B (primera barra de cada grupo), NYVAC-B (segunda barra), el DNA-B de nuevo (tercera barra), MVA-WT (cuarta barra) y NYVAC-WT (quinta barra, correspondiente a la muestra a la que se le inoculó primeramente DNA- $\phi$ ).

La Figura 14 muestra la producción de quimioquinas, en pg/ml, generada tras la reestimulación, con los grupos de péptidos del clade B indicados en abscisas, de esplenocitos extraídos de ratones BALB/c inmunizados mediante protocolos de combinación de inducción/potenciación en los que se incluye el DNA-B en la primera dosis de iniciación de la respuesta salvo en el control, que se inoculó con ADN sin inserto (DNA- $\phi$ ), inoculándose en la segunda dosis de potenciación de la respuesta MVA-B (primera barra de cada grupo), NYVAC-B (segunda barra), el DNA-B de nuevo (tercera barra), y NYVAC-WT (cuarta barra, correspondiente al control inoculado primeramente con DNA- $\phi$ ). El gráfico de la izquierda corresponde a la concentración detectada de MIP-1  $\beta$  y el de la derecha a la concentración detectada de RANTES.

La Figura 15 muestra gráficos correspondientes a los niveles de distintos tipos de células T secretoras de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  presentes en esplenocitos reestimulados por los grupos de péptidos representativos del clade B indicados en abscisas tras haber sido extraídos de ratones BALB/c inmunizados mediante protocolos combinados de inducción/potenciación en los que se incluye el DNA-B en la primera dosis de iniciación de la respuesta salvo en los controles, que fueron inoculados con ADN sin inserto (DNA- $\phi$ ), inoculándose en la segunda dosis de potenciación de la respuesta MVA-B (primera barra de cada grupo), NYVAC-B (segunda barra) y el DNA-B de nuevo (tercera barra), mientras que los controles inoculados con DNA- $\phi$  recibieron en la segunda dosis MVA-WT (cuarta barra) o NYVAC-WT (quinta barra). La parte superior corresponde a células productoras de IFN- $\gamma$  y la inferior a células productoras de TNF- $\alpha$ . Los gráficos de la izquierda corresponden a las células CD8<sup>+</sup>, los gráficos

intermedios a las células CD4<sup>+</sup> y los gráficos de la derecha al total de células. En cada caso, el valor dado se refiere a número de células secretoras del tipo correspondiente (CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, total) detectadas por cada 3 x 10<sup>5</sup> esplenocitos.

La Figura 16 muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante  
5 ELISPOT de células T secretoras de IFN- $\gamma$  específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade B indicados en abscisas, generadas por la inmunización de ratones BALB/c mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se combinan vectores derivados de Vaccinia a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-BX08 y gagpolnef-IIIB. En ordenadas se indica el número de células T  
10 secretoras de IFN- $\gamma$ , específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade B que se indican en abscisas, detectadas por cada 10<sup>6</sup> esplenocitos. Para cada uno de esos péptidos, la primera barra corresponde al valor detectado en animales inmunizados con NYVAC-B+MVA-B, la segunda a animales inmunizados con MVA-B+NYVAC-B y la tercera a animales inmunizados con MVA-WT+NYVAC-WT.

15 La Figura 17 muestra la producción de IFN- $\gamma$ , en pg/ml, generada tras la reestimulación, con los grupos de péptidos del clade B indicados en abscisas, de esplenocitos extraídos de ratones BALB/c inmunizados mediante protocolos de combinación de inducción/potenciación en los que se combinan vectores derivados de Vaccinia a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-BX08 y  
20 gagpolnef-IIIB: NYVAC-B+MVA-B (primera barra), MVA-B+NYVAC-B (segunda barra) y MVA-WT+NYVAC-WT (tercera barra).

La Figura 18 muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante  
25 ELISPOT de células T secretoras de IFN- $\gamma$  específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade B indicados en abscisas, generadas por la inmunización de ratones humanizados HHDII mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se incluye el DNA-B en la primera dosis de inducción de la respuesta, inoculándose en la segunda dosis de potenciación de la respuesta MVA-B (primera barra de cada grupo) o NYVAC-B (segunda barra). La tercera barra corresponde al control de inoculación de un DNA sin inserto (DNA  $\emptyset$ ) en la primera dosis y MVA-WT en la segunda. Los  
30 círculos (•) bajo las barras indican diferencias significativas (p<0,005) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo; la presencia de asteriscos (\*) indica diferencias significativas (p<0,05) entre los distintos grupos

La Figura 19 muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IL-2 específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade B indicados en abscisas, generadas por la inmunización de ratones HHDII mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se incluye el DNA-B en la primera dosis de inducción de la respuesta, inoculándose en la segunda dosis de potenciación de la respuesta MVA-B (primera barra de cada grupo) o NYVAC-B (segunda barra). La tercera barra corresponde al control de inoculación de un DNA sin inserto (DNA  $\emptyset$ ) en la primera dosis y MVA-WT en la segunda. Los círculos (•) bajo las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo; la presencia de asteriscos (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos grupos

La Figura 20 muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IFN- $\gamma$  específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade B indicados en abscisas, generadas por la inmunización de ratones humanizados HHDII mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se combinan vectores derivados de Vaccinia a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-BX08 y gagpolnef-IIIB. En ordenadas se indica el número de células T secretoras de IFN- $\gamma$ , específicas para cada uno de los grupos de péptidos, detectadas por cada  $10^6$  esplenocitos,. Para cada uno de esos grupos de péptidos, la primera barra corresponde al valor detectado en animales inmunizados con MVA+NYVAC-B, la segunda a animales inmunizados con NYVAC-B+MVA-B, la tercera a animales inmunizados con MVA-B+MVA-B. la cuarta a animales inmunizados con NYVAC-B+NYVAC-B y la quinta a animales inmunizados con NYVAC-WT+MVA-WT. Los círculos (•) bajo las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo.

La Figura 21 muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IL-2 específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade B indicados en abscisas, presentes por cada  $10^6$  esplenocitos de ratones HHDII inmunizados mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se combinan vectores derivados de Vaccinia a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-BX08 y gagpolnef-IIIB. Para cada uno de esos grupos de péptidos, la primera barra corresponde al valor detectado en animales inmunizados con

MVA+NYVAC-B, la segunda a animales inmunizados con NYVAC-B+MVA-B, la tercera a animales inmunizados con MVA-B+MVA-B. la cuarta a animales inmunizados con NYVAC-B+NYVAC-B y la quinta a animales inmunizados con NYVAC-WT+MVA-WT. Los círculos (●) bajo las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo.

La Figura 22 muestra un esquema de la construcción del vector plasmídico de transferencia pLZAW1gp120B/gagpolnef-C-14 y los plásmidos a partir de los cuales se genera.

La Figura 23 muestra los fragmentos generados en el análisis por PCR del locus TK del virus MVA-C. La parte superior de la figura muestra un esquema de los tamaños de los fragmentos que se generan con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos, así como su localización con respecto a los insertos y las secuencias flanqueantes de los mismos. La parte inferior muestra fotografías de los geles obtenidos al someter a electroforesis los productos de las PCR realizadas con diferentes parejas de cebadores.

A: PCR cebada con los oligonucleótidos TK-L y gp120-1213; B: PCR cebada con los oligonucleótidos gp120-1050 y gp120-10; C: PCR cebada con los oligonucleótidos GPN-2018 y GPN-3820; D: PCR cebada con los oligonucleótidos GPN-4000 y TK-R; E: PCR cebada con los oligonucleótidos GPN-802 y GPN-2198. Las muestras correspondientes a cada calle son: 1:NYVAC-C; 2: MVA-C (P2); 3: MVA-WT; 4: NYVAC-WT.

La Figura 24 muestra, en su parte superior, un esquema de los fragmentos obtenidos al amplificar mediante PCR el locus TK a partir de muestras que contienen o carecen de insertos en dicho locus, mientras que la parte inferior es una fotografía de un gel obtenido al someter a electroforesis los productos resultantes de una reacción de PCR en la que se utilizaron como cebadores oligonucleótidos que hibridaban con las secuencias flanqueantes del gen TK. Las muestras fueron: NYVAC-C (calle 1), MVA-C correspondiente a los stocks P1 (calle 2) y P2 (calle 3) y MVA-WT (calle 4).

La Figura 25 muestra los resultados del análisis por transferencia tipo Western de la expresión de los genes heterólogos gp120-C (parte superior) y gagpolnef-C (parte inferior, en la que la proteína gagpolnef-C se abrevia como GPN) desde un vector NYVAC-C (última calle), desde los stocks P2 y P3 (calles primera y segunda, marcadas

como P2-M y P3, respectivamente) y desde células en las que se había simulado la infección (M).

La Figura 26 muestra los resultados correspondientes a las pruebas de estabilidad del vector MVA-C. La parte A muestra los resultados de las  
5 inmunotinciones de células CEF infectadas con el vector MVA-C y tratadas con los anticuerpos anti-WR (fotografía de la izquierda), anti-gp120 específico del clade C (fotografía central) y anti-p24 específico del clade C (fotografía de la derecha), así como un gráfico en el que se representan los porcentajes de las placas teñidas con cada uno de los anticuerpos calculados con respecto al total de placas teñidas con el anticuerpo anti-  
10 WR. La parte B muestra la detección de la expresión de las proteínas gagpolnef-C (fotografía de la izquierda) y gp120-C (fotografía de la derecha) mediante transferencias tipo Western y detección con anticuerpos dirigidos contra dichas proteínas en células infectadas con el virus recombinante NYVAC-C (calles marcadas como "NYVAC-C", células en las que se había simulado la infección (calles marcadas como "CEF" y stocks  
15 de virus correspondientes a los países y a 10 (calles marcadas como P7, P8, P9 y P10).

La Figura 27 muestra la cinética de expresión de la proteína gp120-C obtenida mediante el análisis con un anticuerpo anti-gp120 del clade C de transferencias tipo Western correspondientes a muestras tomadas pasadas 6, 18, y 24 horas de una  
20 infección con un virus recombinante. La parte superior corresponde a la infección con el virus MVA-C y la inferior a la infección con el virus NYVAC-C. Para cada una de las muestras aparece inmediatamente debajo la intensidad de la señal lograda al incubar las muestras con un anticuerpo anti- $\beta$ -actina ( $\beta$ -act.). P: precipitado; S: sobrenadante; M: simulación de infección.. P: precipitado; S: sobrenadante; M: simulación de infección.

La Figura 28 muestra la cinética de expresión de la proteína gagpolnef-C  
25 obtenida mediante el análisis con un anticuerpo anti-p24 del clade C de transferencias tipo Western correspondientes a precipitados celulares de muestras tomadas pasadas 6, 18 y 24 horas de una infección con un virus recombinante. Las calles marcadas como "1" corresponden a muestras infectadas con el virus MVA-C, las calles marcadas como "2" a muestras infectadas con el virus NYVAC-C y las calles marcadas como M a  
30 muestras en las que se simuló la infección. La flecha indica la posición de la proteína gagpolnef-C (abreviada como GPN).



La Figura 29 muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IFN- $\gamma$  generadas por la inmunización de ratones humanizados HHDII con virus recombinantes a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-C y gagpolnef-C. La parte A corresponde a las células T secretoras de IFN- $\gamma$ , detectadas por cada  $10^6$  esplenocitos, específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade C que se indican en abscisas. La parte B corresponde a las células T secretoras de IFN- $\gamma$  generadas contra la parte de los virus recombinantes que deriva de Vaccinia. Tanto en el caso de los péptidos (parte A) como en el de la respuesta anti-Vaccinia, la primera barra corresponde al valor detectado en animales inmunizados con MVA-C y la segunda a animales inmunizados con NYVAC-C.

La Figura 30 muestra la producción de citoquinas detectada en ratones HHDII inmunizados con virus recombinantes a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-C y gagpolnef-C. La parte superior corresponde a los niveles de IFN- $\gamma$  y la inferior a los niveles de IL-10, ambos en pg/ml, detectados en los sobrenadantes de esplenocitos de animales inoculados con MVA-C (primera barra de cada uno de los grupos de péptidos) o NYVAC-C (segunda barra de cada uno de los grupos de péptidos) frente a grupos específicos de péptidos representativos del clade C.

La Figura 31 muestra gráficos correspondientes a los porcentajes de distintos tipos de células T productoras de IFN- $\gamma$  generadas frente a grupos de péptidos específicos representativos del clade C por la inoculación de MVA-C (primera barra de cada grupo de péptidos) o NYVAC-C (segunda barra de cada grupo de péptidos) a ratones HHDII. El gráfico superior representa el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> respecto al total de células secretoras de IFN- $\gamma$ , el gráfico intermedio el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> y el gráfico inferior al porcentaje que la suma de las células CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> anteriores supone sobre el total de células secretoras de IFN- $\gamma$ .

La Figura 32 muestra la respuesta humoral generada por inoculación de MVA-C o NYVAC-C a ratones HHDII o C57/BL6 mediante los valores de densidad óptica a 492 nm obtenidos al detectar por ELISA anticuerpos IgG frente a: (A) extractos celulares de una infección con Vaccinia; (B) proteína Gag o (C) la proteína gp160. Los grupos de inmunización fueron: 1: MVA-C en HHDII; 2: MVA-C en C57/BL6; 3: NYVAC-C en HHDII; 4: NYVAC-C en C57/BL6; 5: control. En cada grupo, la situación de los símbolos marca el valor obtenido para cada uno de los ratones del

grupo: ◆: ratón 1; ■: ratón 2; ▲: ratón 3; ●: ratón 4; la posición de la barra horizontal — indica el valor medio correspondiente a los cuatro ratones de cada grupo.

La Figura 33 muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IFN- $\gamma$  específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade C indicados en abscisas, presentes por cada  $10^6$  esplenocitos de ratones HHDII inmunizados mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se incluye el DNA-C en la primera dosis de inducción de la respuesta, inoculándose en la segunda dosis de potenciación de la respuesta MVA-C (primera barra de cada grupo) o NYVAC-C (segunda barra). La tercera barra corresponde al control de inoculación de un DNA sin inserto (DNA  $\emptyset$ ) en la primera dosis y NYVAC-WT en la segunda. Los círculos (●) bajo las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo; la presencia de asteriscos indica diferencias significativas entre los distintos grupos: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$ .

La Figura 34 muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IL-2 específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade C indicados en abscisas, presentes por cada  $10^6$  esplenocitos de ratones HHDII inmunizados mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se incluye el DNA-C en la primera dosis de inducción de la respuesta, inoculándose en la segunda dosis de potenciación de la respuesta MVA-C (primera barra de cada grupo) o NYVAC-C (segunda barra). La tercera barra corresponde al control de inoculación de un DNA sin inserto (DNA  $\emptyset$ ) en la primera dosis y NYVAC-WT en la segunda. Los círculos (●) bajo las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo; la presencia de asteriscos indica diferencias significativas entre los distintos grupos: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$ .

La Figura 35 muestra un gráfico que corresponde a la detección mediante ELISPOT de células T secretoras de IFN- $\gamma$  específicas para cada uno de los grupos de péptidos del clade C indicados en abscisas, presentes por cada  $10^6$  esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se combinan vectores derivados de Vaccinia a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-C y gagpolnef-C. Para cada uno de esos grupos de péptidos, la primera barra corresponde al valor detectado en animales inmunizados con NYVAC-C+MVA-C, la segunda a animales inmunizados con MVA-C+MVA-C, la tercera a animales

inmunizados con MVA-C+NYVAC-C, la cuarta a animales inmunizados con NYVAC-C+NYVAC-C y la quinta a animales inmunizados con NYVAC-WT+MVA-WT. Los círculos (●) bajo las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo; la presencia de asteriscos indica diferencias significativas entre los distintos grupos: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$ .

La Figura 36 muestra la producción de citoquinas detectada tras la inmunización de ratones BALB/c mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se combinan vectores derivados de Vaccinia a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-C y gagpolnef-C. La parte izquierda corresponde a los niveles de IFN- $\gamma$  (en ng/ml) y la derecha a los niveles de IL-10 (en pg/ml), detectados en los sobrenadantes de esplenocitos, reestimulados con cada uno de los grupos de péptidos del clade C indicados junto a cada grupo de barras, extraídos de animales inoculados con: MVA-C+NYVAC-C (primera barra de cada grupo), MVA-C+MVA-C (segunda barra), NYVAC-C+MVA-C (tercera barra), NYVAC-C+NYVAC-C (cuarta barra), NYVAC-WT+MVA-WT (quinta barra) o MVA-WT+NYVAC-WT (sexta barra).

La Figura 37 muestra gráficos correspondientes a los niveles de distintos tipos de células T secretoras de IFN- $\gamma$  y presentes en los esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados mediante protocolos de inducción/potenciación en los que se combinan vectores derivados de Vaccinia a partir de los cuales pueden expresarse las proteínas gp120-C y gagpolnef-C, tras ser reestimulados por los grupos de péptidos representativos del clade C indicados en abscisas. El gráfico superior corresponde a las células CD8<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  presentes por cada  $3 \times 10^5$  células CD8<sup>+</sup>, el gráfico intermedio a las células CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  presentes por cada  $3 \times 10^5$  células CD4<sup>+</sup> y el gráfico inferior al conjunto de células CD8<sup>+</sup> más CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  presentes por cada  $3 \times 10^5$  células CD8<sup>+</sup>+CD4<sup>+</sup>. Las barras que se aparecen en cada grupo de péptidos corresponden a animales inoculados con: NYVAC-C+MVA-C (primera barra de cada grupo), MVA-C+MVA-C (segunda barra), MVA-C+NYVAC-C (tercera barra), NYVAC-C+NYVAC-C (cuarta barra), NYVAC-WT+MVA-WT (quinta barra).

La Figura 38a muestra los resultados obtenidos al tratar con anticuerpos dirigidos contra la proteína PARP lisados de células HeLa recogidos transcurrido los distintos tiempos, en horas, que se indican sobre las calles tras la infección con MVA-

WT (calles encabezadas por "MVA") o con NYVAC (calles encabezadas por "NYVAC"). PARPc indica la posición de la proteína PARP completa; PARPf indica la posición de la proteína PARP que ha sufrido una rotura específica. La parte inferior muestra la intensidad de las señales logradas al incubar las muestras con un anticuerpo anti- $\beta$ -actina ( $\beta$ -act.).

La Figura 38b muestra las señales de inmunofluorescencia detectadas a partir de células infectadas con MVA-WT (fotografía superior) o NYVAC-WT (fotografía inferior) cuyos núcleos habían sido teñidos con DAPI.

La Figura 38c muestra una fotografía de un gel obtenido al someter a electroforesis muestras de ARN ribosómico obtenidas de células HeLa transcurridos los tiempos en horas (18 y 24) que se indican sobre las calles tras infectar dichas células con: muestras carentes de virus (pocillos marcados como "HeLa"), virus Vaccinia silvestre de la cepa Western Reserve (pocillos marcados como "WR"), MVA-WT (pocillos marcados como "MVA"), o NYVAC-WT (pocillos marcados como "NYVAC"). Se indican las posiciones en las que se detectan los ARN ribosómicos 28S (28S rRNA) y 18S (18S rRNA) y la de las bandas resultantes de su degradación.

La Figura 38d muestra un gráfico en el que se indica en ordenadas el factor de incremento del número de células apoptóticas detectado mediante citometría de flujo en células HeLa infectadas según se indica en abscisas: M: simulación de infección; WR: infección con virus Vaccinia silvestre de la cepa Western Reserve; MVA: infección con MVA-WR; NYVAC: infección con NYVAC-WT. Los signos "-" y "+" indican, respectivamente, la ausencia o la presencia del inhibidor de caspasas zVAD en las muestras utilizadas para provocar la infección.

La Figura 39 muestra un esquema de la organización del genoma del virus quimérico de la inmunodeficiencia de simio y humano SHIV89.6P. Las secuencias representadas por rectángulos rellenos provienen del genoma del virus de simio SIVmac239, mientras que las secuencias representadas por rectángulos sin relleno provienen del genoma del aislado 89.6 del virus VIH-1.

La Figura 40 muestra la estructura de las secuencias codificantes de antígenos de retrovirus presentes en los vectores de la presente invención. La parte superior, encabezada por la abreviatura "Env" corresponde a distintas formas de la secuencia correspondiente a la proteína de la envuelta, de las que la última, la marcada como "C-

env-120", representa la presente en los vectores de la invención, carente por completo de la parte correspondiente a la proteína gp41. La parte inferior muestra el esquema correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef sintetizada a partir de los vectores cuya construcción se describe en los Ejemplos, indicándose las modificaciones  
5 realizadas sobre las secuencias deducidas a partir de las proteínas del SHIV89.P, generadas deduciendo la secuencia de tripletes correspondientes a las secuencias de aminoácidos de las proteínas utilizando para ello los codones más frecuentes en mamíferos, secuencias sobre las cuales se realizaron como modificaciones principales las siguientes: la secuencia correspondiente al antígeno Gag que incluye las proteínas de  
10 la matriz (MA), la cápsida (CA), p2 y p7 se ligó respetando el marco de lectura (en el punto marcado como FS-1) con la secuencia correspondiente al antígeno Pol que carecía de dominio integrasa; además, el sitio activo de la transcriptasa en reverso (RT) fue reemplazado por un gen nef en el que se había alterado el orden de los aminoácidos (sc-  
15 nef), de manera que la zona que de forma natural contiene el extremo carboxilo (RT-C) fuera la parte inicial, mientras la zona que de forma natural contiene el extremo amino (RT-A) pasó a ser la zona final; la secuencia de RT que solapa con el sitio activo (sitio activo, RT) se traslocó respetando el marco de lectura al extremo 3' de la secuencia codificante de la proteína de fusión; adicionalmente, la glicina del extremo amino se  
20 sustituyó por alanina ( $\Delta$ Myr (G $\rightarrow$ A)) para impedir su miristilación, mientras se anulaba la actividad enzimática de la proteasa (XPR) introduciendo una mutación puntual en su sitio activo ( $\Delta$ PRr (D $\rightarrow$ N)).

La Figura 41 muestra un esquema de la construcción del vector plasmídico de transferencia pLZAW-1-89.6P-SIVgpn-18 y de los plásmidos a partir de los cuales se genera. La Figura 41a muestra los pasos que conducen a la obtención del vector  
25 pLZAW1-89.6P-9; la Figura 41b muestra los pasos que conducen a la obtención del vector pLZAW-1-89.6P-SIVgpn-18 a partir del vector pLZAW-1-89.6P-9. En ambos casos la parte correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef, denominada posteriormente "SIVgpn" se indica en la Figura como "SIVsyngagpolnef", mientras la parte correspondiente a la proteína de la envuelta, denominada posteriormente  
30 89.6gp120, aparece indicada como "89.6Psynenv120".

La Figura 42 muestra los fragmentos generados en el análisis por PCR del locus de timidina quinasa (TK) del virus MVA-89.6P-SIVgpn. La parte superior de la figura,

marcada como "A" muestra un esquema en el que se representan las posiciones de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados como cebadores respecto a los brazos izquierdo (TK-L) y derecho (TK-D) del locus TK, así como los tamaños estimados de los fragmentos que se generan en la PCR realizada utilizando como molde el virus MVA-89.6P-SIVgpn (primera línea del gráfico) o el virus MVA sin inserto (línea inferior del gráfico, situada en la zona marcada como "WT"). La parte inferior, marcada como "B", muestra la fotografía del gel obtenido al someter a electroforesis los productos de las PCR realizadas con los cebadores TK-L y TK-R2 sobre ADN extraído de células infectadas con MVA-WT (calle 3), el stock P2 del MVA-89.6P-SIVgpn (calle 4), el stock P3 del MVA-89.6P-SIVgpn (calle 5) o transfectadas con el plásmido pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18 (control positivo, C+) (calle 2). La calle 1 corresponde a un marcador de tamaño.

La Figura 43 muestra los resultados del análisis por transferencia tipo Western de la expresión de los genes heterólogos 89.6p-gp120 (parte superior de la figura, marcada como "anti-gp120", en la que la posición de la proteína se indica mediante la flecha etiquetada como "89.6P") y SIVgpn (parte inferior de la figura, marcada como "anti-SIVp27", en la que la posición de la proteína SIVgpn se indica mediante la flecha etiquetada como "GPN") detectada en extractos de células transfectadas de forma transitoria con el plásmido pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18 (segunda calle, marcada como "C+") o en extractos de células infectadas con los stocks P1 (tercera calle, marcada como "P1"), P2 (cuarta calle, marcada como "P2") y P3 (quinta calle, marcada como "P3") del virus MVA-89.6P.SIV-gpn, o desde células tratadas en las mismas condiciones pero que no habían entrado en contacto ni con el plásmido pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18 ni con ningún stock de virus (cultivos de células en las que se simuló la infección, analizadas en la primera calle, marcada como "M").

La Figura 44 muestra, en la parte superior, los resultados de las inmunotinciones de células CEF infectadas con el vector MVA-89.6P-SIVgpn y tratadas con anticuerpos anti-WR (que reconoce la parte del vector derivada de MVA) (fotografía de la izquierda), anti-gp120 (fotografía central) y anti-SIVp27 (que reconoce la parte de la proteína SIVgpn correspondiente a la proteína p27) (fotografía de la derecha), mientras en la parte inferior aparece un gráfico en el que se representan los porcentajes de las

placas teñidas con cada uno de los anticuerpos calculados con respecto al total de placas teñidas con el anticuerpo anti-WR.

La Figura 45 muestra los fragmentos generados en el análisis por PCR del locus TK del virus NYVAC-89.6P-SIVgpn. La parte superior de la figura, marcada como "A", muestra un esquema en el que se representan las posiciones de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados como cebadores respecto a los brazos izquierdo (TK-L) y derecho (TK-R) del locus TK, así como los tamaños estimados de los fragmentos que se generan en la PCR realizada utilizando como molde el virus NYVAC-89.6P-SIVgpn (primera línea del gráfico) o el virus NYVAC sin inserto, (línea inferior de la parte del gráfico marcada como "NYVAC-WT"). La parte inferior, marcada como "B", muestra la fotografía del gel obtenido al someter a electroforesis los productos de las PCR realizadas con los cebadores TK-L y TK-R2 sobre ADN extraído de células infectadas con NYVAC-WT (calle 2), el stock P3 del NYVAC-89.6P-SIVgpn (calle 3), el stock P3 del MVA-89.6P-SIVgpn (calle 4) o el virus MVA-WT, que carece de inserto (calle 5). La calle 1 corresponde a un marcador de tamaño

La Figura 46 muestra los resultados del análisis por transferencia tipo Western de la expresión de los genes heterólogos 89.6p-gp120 (parte superior de la figura, marcada como "anti-gp120", en la que la posición de la proteína se indica mediante la flecha etiquetada como "89.6P") y SIVgpn (parte inferior de la figura, marcada como "anti-SIVp27", en la que la posición de la proteína SIVgpn se indica mediante la flecha etiquetada como "GPN") detectada en extractos de células infectadas con los stocks P1 (calle 3), P2 (calle 4) y P3 (calle 5) del vector NYVAC-89.6P-SIVgpn, con el stock P3 del vector MVA-89.6P-SIVgpn (calle 2) o en extractos de células tratadas en las mismas condiciones pero que no habían entrado en contacto con ningún stock de virus (cultivos de células en las que se simuló la infección, analizadas en la calle 1).

La Figura 47 muestra, en la parte superior, los resultados de las inmunotinciones de células CEF infectadas con el vector NYVAC-89.6P-SIVgpn y tratadas con los anticuerpos anti-WR (fotografía de la izquierda), anti-gp120 (fotografía central) y anti-SIVp27 (fotografía de la derecha), mientras en la parte inferior aparece un gráfico en el que se representan los porcentajes de las placas teñidas con cada uno de los anticuerpos calculados con respecto al total de placas teñidas con el anticuerpo anti-WR.

La Figura 48 muestra fotografías de transferencias tipo Western de geles de poliacrilamida en los que se había sometido a electroforesis extractos de células infectadas con diferentes stocks P3 de los virus NYVAC-89.6P-SIVgpn (calles 1 y 2, correspondientes, respectivamente a los stocks P3.1 (29/01/04) y P3.2 (25/02/04)) y MVA-89.6P-SIVgpn (stocks P3 del 20/06/03 (calle 3), P3 del 20/09/04 (calle 4), P3.1 del 20/09/04 (calle 5) y P3.2, del 1/10/04 (calle 6). La calle 7 corresponde a un extracto de células en las que se había simulado la infección. La fotografía de la izquierda corresponde a la incubación con un anticuerpo policlonal de conejo anti-gp120; la posición de la proteína 89.6P-gp120 se indica mediante una flecha marcada como "89.6P". La fotografía de la derecha corresponde a la incubación con un anticuerpo monoclonal anti-SIV-gag-p27, que reconoce la proteína SIVgpn, cuya posición en el gen se indica mediante una flecha marcada como "SIVgpn".

La Figura 49 muestra un esquema del estudio realizado en macacos para evaluar la inmunogenicidad y eficacia como vacunas frente el SHIV de los vectores derivados de poxvirus de la presente invención, en el que están marcados los distintos eventos. Los números situados debajo de la segunda línea horizontal indican el tiempo transcurrido, en semanas, desde el comienzo del estudio. El punto 0 corresponde al de inoculación del primer vector de vacunación. Las flechas gruesas indican los momentos en los que se inoculó a los macacos bien un vector de vacunación, bien un virus capaz de producir infección, según se indica en la línea inferior: ADN: inoculación de DNA-SHIV, es decir, dos plásmidos desnudos con insertos correspondiente a secuencias codificantes de proteínas del SHIV89.6P, Env (pcDNA-gp120 89.6p) y SIVgpn (pcDNA-gag-pol-nef) (grupos 1 y 2), o del plásmido desnudo carente de inserto DNA-emp (grupo 3), NYVAC vs MVA: inoculación de los vectores derivados de poxvirus NYVAC-89.6P-SIVgpn (grupo 2), MVA-89.6P-SIVgpn (grupo 1) o del vector NYVAC tipo silvestre, carente de inserto con secuencias codificantes de proteínas del SHIV89.6P (grupo 3); DESAFÍO: inoculación del virus patógeno quimérico SHIV89.6P. Las flechas delgadas, marcadas como "CMI", indican los momentos en los que se extrajeron de los macacos muestras de sangre periférica.

La Figura 50 muestra, en escala logarítmica, el número de células SFC (*spot forming cells*) que expresaban IFN- $\gamma$  obtenido por cada  $10^6$  células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en muestras procedentes de cada uno de los macacos



- 43 -

incluidos en el estudio de eficacia de la vacunación. Los números que aparecen en el eje de abscisas indican, en semanas, el momento en el tiempo en el que fueron tomadas cada una de las muestras, tomando como tiempo 0 el momento de la administración de la primera dosis de vacunación. Para cada valor de tiempo, aparecen tres grupos de valores, que presentan el comportamiento de cada uno de los 7 animales utilizados en el estudio con un procedimiento de inmunización concreto: la primera vertical de puntos, marcados mediante cuadrados con un vértice apuntando hacia arriba (◆) corresponde a muestras tomadas de cada uno de los macacos del grupo 1 (inmunizados con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + MVA-89.6P-SIVgpn); la segunda vertical de puntos, marcados mediante cuadrados cuyos vértices determinan dos líneas paralelas (▣), corresponde a muestras tomadas de cada uno de los macacos del grupo 2 (inmunizados con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + NYVAC-89.6P-SIVgpn); la tercera vertical de puntos, marcados mediante círculos (⊙), corresponde a muestras tomadas de cada uno de los macacos del grupo 3 (inmunizados con un plásmido a partir del cual no se expresaba ningún antígeno correspondiente al SHIV89.6P + NYVAC-WT). Cada punto representa el valor obtenido para un macaco concreto, mientras los rectángulos situados en cada una de las verticales indican el valor medio correspondiente a todos los macacos de ese grupo para las muestras tomadas en un mismo momento en el tiempo. La presencia de un número de puntos inferior a 7 en algunas verticales indica que el punto situado sobre el eje de abscisas representa a más de un macaco, en cada uno de los cuales el valor de las SFC detectadas por cada  $10^6$  PBMC analizadas no fue superior a 1. La línea punteada indica el valor por debajo del cual los valores no se consideran significativos (20 SFC). Las flechas blancas indican la inoculación de un vector de vacunación; la flecha negra indica el momento en el que se produjo el desafío mediante la inoculación del SHIV89.6P.

La Figura 51 muestra, en escala logarítmica, los valores medios de SPF que expresaban IFN- $\gamma$  obtenidos, por cada  $10^6$  PBMC analizadas, para cada grupo de macacos a lo largo del tiempo de estudio, tiempo que se expresa en semanas en el eje de abscisas, correspondiendo el tiempo 0 al momento de la administración de la primera dosis de vacunación. Las flechas con relleno punteado indican los momentos en los que

se administraron dosis de vacunación. La flecha con relleno oscuro continuo indica el momento en el que se produjo el desafío mediante la inoculación del virus SHIV89.6P. Los datos indicados mediante cuadrados con un vértice apuntando hacia arriba (◆) corresponden al grupo 1 (inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + MVA-89.6P-SIVgpn); los datos indicados mediante cuadrados cuyos vértices determinan dos líneas paralelas (▣) corresponden al grupo 2 (inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + NYVAC-89.6P-SIVgpn). Los datos indicados mediante triángulos (▲) corresponden al grupo 3 (inmunizado con un plásmido a partir del cual no se expresaba ningún antígeno correspondiente al SHIV89.6P + NYVAC-WT).

La Figura 52 muestra, en escala logarítmica, los valores medios de SPF que expresaban IL-2 obtenidos, por cada  $10^6$  PBMC analizadas, para cada grupo de macacos a lo largo del tiempo de estudio, tiempo que se expresa en semanas en el eje de abscisas, correspondiendo el tiempo 0 al momento de la administración de la primera dosis de vacunación. Las flechas con relleno punteado indican los momentos en los que se administraron dosis de vacunación. La flecha con relleno oscuro continuo indica el momento en el que se produjo el desafío mediante la inoculación del virus SHIV89.6P. Los datos indicados mediante cuadrados con un vértice apuntando hacia arriba (◆) corresponden al grupo 1 (inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + MVA-89.6P-SIVgpn); los datos indicados mediante cuadrados cuyos vértices determinan dos líneas paralelas (▣) corresponden al grupo 2 (inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + NYVAC-89.6P-SIVgpn). Los datos indicados mediante triángulos (▲) corresponden al grupo 3 (inmunizado con un plásmido a partir del cual no se expresaba ningún antígeno correspondiente al SHIV89.6P + NYVAC-WT).

La Figura 53 muestra, en escala logarítmica, los valores medios de SPF que expresaban IL-4 obtenidos, por cada  $10^6$  PBMC analizadas, para cada grupo de macacos a lo largo del tiempo de estudio, tiempo que se expresa en semanas en el eje de abscisas,

correspondiendo el tiempo 0 al momento de la administración de la primera dosis de vacunación. Las flechas con relleno punteado indican los momentos en los que se administraron dosis de vacunación. La flecha con relleno oscuro continuo indica el momento en el que se produjo el desafío mediante la inoculación del virus SHIV89.6P.

5 Los datos indicados mediante cuadrados con un vértice apuntando hacia arriba (◄) corresponden al grupo 1 (inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + MVA-89.6P-SIVgpn); los datos indicados mediante cuadrados cuyos vértices determinan dos líneas paralelas (▣) corresponden al grupo 2 (inmunizado con

10 sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + NYVAC-89.6P-SIVgpn). Los datos indicados mediante triángulos (◄) corresponden al grupo 3 (inmunizado con un plásmido a partir del cual no se expresaba ningún antígeno correspondiente al SHIV89.6P + NYVAC-WT).

15 La Figura 54 corresponde a la valoración de la viremia en los tres grupos en estudio. El gráfico superior corresponde al grupo 3, inmunizado con un plásmido a partir del cual no se expresaba ningún antígeno correspondiente al SHIV89.6P + NYVAC-WT. Los gráficos inferiores corresponden a los grupos que recibieron vectores derivados de poxvirus: el gráfico de la parte inferior izquierda corresponde al grupo 1,

20 inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + MVA-89.6P-SIVgpn; el gráfico de la parte inferior derecha corresponde al grupo 2, inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + NYVAC-89.6P-SIVgpn. Cada línea que

25 conecta puntos representa un macaco. Cada punto marcado con un símbolo representa las copias de ARN del SHIV89.6P, detectadas mediante QC RNA-PCR, en la muestra de plasma de ese macaco tomada en la semana que se indica en el eje de abscisas. El tiempo 0 corresponde al momento de inoculación del virus SHIV89.6P.

La Figura 55 muestra la concentración, por microlitro de sangre, de células

30 CD4+ (puntos marcados mediante círculos sin relleno, ○) y de células CD8+ (puntos marcados mediante triángulos sin relleno, △), detectadas por FACS mediante el uso de anticuerpos específicos dirigidos contra cada uno de estos tipos de células. Cada grupo

de puntos corresponde a los valores obtenidos en las muestras de un macaco diferente, extraídas en el momento en el tiempo que se indica, expresado en semanas, en la parte superior de los gráficos. El tiempo 0 corresponde al momento de inoculación del virus SHIV89.6P, indicado mediante la abreviatura “desf.”. Los gráficos superiores  
5 corresponden a macacos del grupo 1, inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + MVA-89.6P-SIVgpn. Los gráficos intermedios corresponden a macacos del grupo 2, inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P +  
10 NYVAC-89.6P-SIVgpn. Los gráficos inferiores corresponden a macacos de grupo 3, inmunizado con un plásmido a partir del cual no se expresaba ningún antígeno correspondiente al SHIV89.6P + NYVAC-WT. El último gráfico, carente de puntos indicativos de valores, marcado como “D7 98028 (euth)”, corresponde a un macaco que hubo de ser sacrificado debido al avanzado estado de la enfermedad que el virus  
15 SHIV89.6P inoculado desencadenó en él.

La Figura 56 muestra, en ordenadas, el porcentaje de supervivencia de los macacos que componían cada uno de los grupos según las semanas transcurridas desde el momento de la infección con el virus SHIV89.6P, que se indican en abscisas, correspondiendo el tiempo 0 al de inoculación de dicho virus. Los datos indicados  
20 mediante cuadrados con un vértice apuntando hacia arriba (◆) corresponden al grupo 1 (inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del SHIV89.6P + MVA-89.6P-SIVgpn); los datos indicados mediante cuadrados cuyos vértices determinan dos líneas paralelas (▣) corresponden al grupo 2 (inmunizado con sendos plásmidos con insertos correspondientes a la proteína gp120 del SHIV89.6P y la proteína de fusión SIVgpn del  
25 SHIV89.6P + NYVAC-89.6P-SIVgpn). Los datos indicados mediante triángulos (▲) corresponden al grupo 3 (inmunizado con un plásmido a partir del cual no se expresaba ningún antígeno correspondiente al SHIV89.6P + NYVAC-WT).

**EJEMPLOS*****Construcción y ensayos de inmunogenicidad de vectores diseñados para la vacunación de seres humanos*****5           - Ejemplo 1.- Generación del MVA-B****Construcción del vector plasmídico pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1**

El vector plasmídico pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1 fue construido por los inventores para la generación del virus recombinante de MVA que expresa los genes Env de VIH-1 (aislamiento BX08) y la quimera de Gag, Pol y Nef (aislamiento IIIB),  
10           ambos pertenecientes al clade B. El ADN de la quimera Gag-Pol-Nef fue generado por GeneArt (Regensburg, Alemania) y el ADN de gp120 fue generado por el grupo Aventis; los plásmidos que los contienen utilizados para la construcción de pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1 y del MVA-B a partir de éste último, fueron cedidos al grupo de los inventores en el marco del programa de colaboración EuroVacI.

15           El plásmido pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1 es un derivativo de pUC diseñado para la selección de placas azules/blancas. Contiene las secuencias flanqueantes derecha (TK-R) e izquierda (TK-L) del gen viral de la timidina quinasa (TK), el promotor E3L dirigiendo la expresión del marcador de selección  $\beta$ -galactosidasa, y el gen de resistencia a ampicilina (AP). Entre las dos secuencias flanqueantes se encuentran las  
20           dos secuencias que se desean expresar, gp120-BX08 (SEQ ID NO:15) y gagpolnef-IIIB (SEQ ID NO:16), que han sido modificadas para optimizar el uso de codones de mamífero. Para dirigir la expresión de cada una de las secuencias hay sendos promotores sintéticos temprano/tardío (pE/L), situados en orientación opuesta en la zona del inserto más alejada de las secuencias flanqueantes. La posición de cada uno de  
25           los componentes incluidos en el plásmido se describe a continuación en la Tabla 1.

**Tabla 1.- Posición de los componentes del plásmido pLZAW1gp120B/gagpolnefB-1**

Secuencia flanqueante izquierda de TK	90-410	Complementaria
T5NT para $\beta$ -gal	929-935	Complementaria
$\beta$ -gal	ATG-TAA (936-4079)	Complementaria
Promotor E3L para $\beta$ -gal	4080-4140	Complementaria
Parte 1 de la secuencia flanqueante izquierda de TK	4151-4498	Complementaria
gagpolnef-IIIB	ATG-TAA (4533-8513)	Complementaria
Promotor E/L para gagpolnef-IIIB	8523-8561	Complementaria
Promotor E/L para gp120-BX08	8576-8614	
BX08gp120	ATG-TAA (8624-10105)	
T5NT para BX08gp120	10144-10150	
Secuencia flanqueante derecha de TK	10212-10903	Complementaria
AP	ATG-TAA (12074-12934)	Complementaria

Para la construcción de este plásmido se utilizaron otros dos plásmidos diferentes:

- 5           - pMA60gp120B/gagpolnefB-12,17 (proporcionado por el grupo Aventis, Canadá). El plásmido es un derivativo de pUC que contiene las secuencias flanqueantes derecha (TK-R) e izquierda (TK-L) del gen viral de la timidina quinasa (TK), el promotor E3L dirigiendo la expresión del marcador de selección  $\beta$ -galactosidasa, y el gen de resistencia a ampicilina (AP). Entre las dos secuencias flanqueantes se
- 10           encuentras las dos secuencias que se desean expresar, gp120-BX08 y gagpolnef-IIIB, que han sido modificadas para optimizar el uso de codones de mamífero. Para dirigir la expresión de cada una de las secuencias hay sendos promotores sintéticos temprano/tardío (pE/L), situados en orientación opuesta en la zona del inserto más alejada de las secuencias flanqueantes.
- 15           - pLZAW1: El plásmido fue proporcionado por Linong Zhang, del grupo Aventis, Canadá. Es un plásmido basado en pUC que contiene un brazo izquierdo del gen de TK, sitios de clonación para insertar genes exógeno, una repetición corta del brazo izquierdo el gen de TK, un promotor E3L dirigiendo la expresión de un casete con  $\beta$ -gal y un brazo derecho del gen de TK.

- 49 -

La construcción del plásmido pLZAW1gp120B/gagpolnefB-1 a partir de estos otros dos plásmidos se representa en la Figura 2. Brevemente, un fragmento de ADN de 5,6 Kb que contenía los genes de interés fue sacado por digestión con BamHI del plásmido pMA60gp120/gagpolnefB-12,17 modificado por incubación con la ADN polimerasa Klenow para generar extremos romos, y clonado en el vector pLZAW1  
5 previamente digerido con la endonucleasa de restricción AscI, modificado por incubación con Klenow, y desfosforilado por incubación con la enzima fosfatasa alcalina, generándose de esta forma el vector plasmídico de transferencia pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1. El plásmido generado dirige la inserción de los genes  
10 de interés en el locus TK del genoma del virus atenuado MVA.

#### Construcción del virus recombinante MVA-B

Cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) fueron infectados con virus atenuado MVA en pase 586 (habiendo sido el MVA-F6, pase 585, proporcionado por Gerd Sutter) a una multiplicidad de 0,05 ufp/célula, y posteriormente  
15 transfectados con 10 µg del vector plasmídico de transferencia pLZAW1gp120B/gagpolnefB-1, usando para ello lipofectina comercial suministrada por Invitrogen y siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 72 horas post-infección las células fueron recogidas, sonicadas y usadas para la selección de los virus  
20 recombinantes. Los virus MVA recombinantes que contenían los genes gp120B/gagpolnef-B y coexpresaban de forma transitoria el gen marcador β-Gal (MVA-B (X-Gal<sup>+</sup>)), fueron seleccionados por pases consecutivos de purificación de placas en células CEF teñidas con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactósido (XGal) (300 µg/ml). Los MVA recombinantes que contenían los genes gp120B/gagpolnef-B y que  
25 habían perdido el gen marcador (MVA-B (X-Gal<sup>-</sup>)), fueron seleccionados como focos virales no teñidos en células CEF en presencia de XGal. En cada paso de purificación las placas aisladas fueron expandidas en CEF durante 3 días, y el extracto viral crudo obtenido fue usado para el paso de purificación de placas consecutivo.

Tras 4 pases consecutivos de purificación fueron aisladas 12 placas  
30 recombinantes que expresaban eficientemente ambos antígenos y que habían perdido el gen marcador. Se hizo crecer el recombinante designado como MVA-B-4.1.5.2 (P1) para generar un stock crudo (P2) que se envió a producción en condiciones GMP para

estudios clínicos. La secuencia del inserto situada en el locus de la timidina quinasa de este recombinante está representada por SEQ ID NO:19. La localización en dicha secuencia de cada uno de los elementos que componen el inserto se indica a continuación en la Tabla 2:

5 **Tabla 2.- Posición de los componentes principales del inserto del vector MVA-B**

Parte 1 de la secuencia flanqueante izquierda de TK	1-502	Complementaria
gagpolnef-IIIB	ATG-TAA (537-4517)	Complementaria
Promotor E/L para gagpolnef-IIIB	4527-4565	Complementaria
Promotor E/L para gp120-BX08	4580-4618	
gp120-BX08	ATG-TAA (4628-6109)	
Secuencia flanqueante derecha de TK	6216-6907	Complementaria

A partir del P2, se preparó un stock P3 de virus purificado de células CEF infectadas a una multiplicidad de infección de 0,05 ufp/célula a través de dos colchones de sacarosa al 45%. Este stock P3, con un título de  $2,4 \times 10^9$  ufp/ml, fue el que se utilizó en los protocolos de inmunización.

Caracterización del MVA-B

Para confirmar la homogeneidad genética del virus MVA-B generado y la integridad de los genes insertados, se realizó un análisis por PCR del ADN viral extraído de células CEF infectadas a una multiplicidad de 5 ufp/célula, empleando para ello oligonucleótidos que hibridan o con las regiones TK flanqueantes del inserto de interés o con regiones internas de los genes insertados. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados como cebadores y la posición en que aparecen sobre el vector plasmídico de transferencia pLZAW1gp120B/gagpolnefB-1 se muestran en la Tabla 3. Las posiciones en las que hibridan dichos oligonucleótidos, así como los tamaños estimados de los fragmentos generados en las distintas PCR y la localización de los mismos con respecto a los insertos y las secuencias flanqueantes, aparecen representados en la parte superior de la Figura 3.



**Tabla 3.- Oligonucleótidos utilizados como cebadores de las PCR de caracterización del vector MVA-B**

Oligo nucleótido	SECUENCIA	Posición
TK-L	5' TGATTAGTTTGATGCGATTC 3' (SEQ ID NO:1)	4338-4357
TK-R	5' TGTCCTTGATACGGCAG 3' (SEQ ID NO:2)	10379-10395
BX08556	5' TGCCCATCGACAACG 3' (SEQ ID NO:3)	9129-9143
GPN7649	5' AGCCCCATCGAGACCG 3' (SEQ ID NO:4)	6698-6713
GPN8170	5' ATTAGCCTGCCTCTCGG 3' (SEQ ID NO:5)	7218-7234
E/L	5' TATTTTTTTTTTTTGGGAATATAAATAG 3' (SEQ ID NO:6)	8522-8548

La parte inferior de la Figura 3 muestra fotografías de los geles obtenidos al someter a electroforesis los productos de las PCR realizadas con las diferentes parejas de cebadores para efectuar el análisis de los fragmentos del VIH-1 incluidos en el virus MVA-B. Para ello, 100 ng de ADN viral extraído de células de embrión de pollo (CEF) infectadas a una multiplicidad de 5 ufp/célula con los virus MVA-B del stock P3 (calle 2), MVA-WT (calle 3) y NYVAC-WT (calle 4) o bien con 10 ng del plásmido pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1 (calle 1), fueron usados como molde para hacer una amplificación mediante PCR de los diferentes fragmentos del VIH-1 incluidos en MVA-B. Las condiciones de cada PCR se estandarizaron de forma individualizada para cada pareja de oligonucleótidos cebadores empleada. Como se observa en las fotografía mostradas en la parte inferior de la Figura 3, las muestras correspondientes al control positivo, el plásmido pLZAW1gp120B/gagpolnef-B-1, dan lugar en todos los casos a bandas de igual tamaño que las correspondientes muestras MVA-B, mientras que en las calles 3 y 4, correspondientes a muestras que carecen de inserto (MVA-WT y NYVAC-WT, respectivamente), no se observan bandas.

El virus NYVAC de tipo silvestre utilizado en este ejemplo, así como las formas recombinantes NYVAC-B y NYVAC-C utilizadas posteriormente y que se han generado insertando sobre el NYVAC de tipo silvestre las mismas secuencias utilizadas para generar, respectivamente, los vectores de la invención MVA-B y MVA-C, fueron donados por el grupo Aventis, en el marco de colaboración del proyecto EuroVac I, en viales conteniendo aproximadamente  $7 \times 10^7$  unidades infecciosas por vial. Previamente

a su utilización, el vector NYVAC-B fue crecido en células CEF y purificado en colchón de sacarosa en las mismas condiciones que MVA-B.

La Figura 4, por su parte, muestra una fotografía de un gel correspondiente al análisis de productos de PCR correspondientes al locus TK. Para su obtención, 100 ng del ADN viral extraído de células CEF infectadas a una multiplicidad de 5 ufp/célula con los virus NYVAC-WT (calle 1), MVA-B (calle 2) o MVA-WT (calle 3), fueron usados como molde para hacer un análisis por PCR del locus TK empleando como cebadores 100 ng de los oligonucleótidos que hibridan con las secuencias flanqueantes del gen TK, TK-L (SEQ ID NO:1) y TK-R (SEQ ID NO:2) en una mezcla de reacción que contenía 0,3 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 2,5 U de la enzima polimerasa Platinum Taq. El programa incluye un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 min, 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 60°C durante 1 min y extensión a 68°C durante 2 min, y finalmente un ciclo de extensión a 68°C durante 10 min. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 0,7%, obteniéndose el resultado que se muestra en la Figura 4. En la calle 2, la correspondiente al vector MVA-B, se observa una banda de aproximadamente 6 Kb compatible con la presencia del inserto completo, mientras que en las calles correspondientes a los virus de tipo silvestre MVA-WT (3) y NYVAC-WT (1) aparecen bandas mucho menores, que corresponderían al locus de TK sin inserto. Las diferencias observadas en los tamaños de las bandas correspondientes a los virus sin inserto MVA-WT y NYVAC-WT se debe a que el gen TK es uno de los que ha sufrido una inactivación selectiva en el virus NYVAC (véase la Figura 1), siendo el tamaño del gen TK menor en esta forma atenuada de Vaccinia.

## 25 **Ejemplo 2.- Análisis de la expresión de proteínas del VIH a partir del MVA-B**

La expresión de las proteínas gp120-BX08 y gagpolnef-B por el virus MVA-B fue analizada mediante transferencia tipo Western. Monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con 5 ufp/célula de los diferentes stocks de virus recombinante MVA-B: P1, P2 y P3. Los extractos celulares fueron recogidos a las 30 24 horas post-infección, fraccionados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa, y sometidos a la reacción

frente a un anticuerpo policlonal de conejo anti-gp120 (generado en el laboratorio) que reconoce la proteína gp120 del aislamiento BX08; y frente a un anticuerpo policlonal de conejo anti-p24 (cedido por el programa EVA, ARP432) que reconoce la quimera gagpolnef-B del aislamiento IIIB. Como controles positivos se utilizaron extractos  
5 procedentes de células infectadas con el vector NYVAC-B.

Como se observa en la Figura 5, ambos antígenos son expresados eficientemente por los diferentes stocks del recombinante MVA-B generado.

### **Ejemplo 3.- Comprobación de la estabilidad del MVA-B**

10 Para verificar que el recombinante MVA-B podía ser pasado sucesivamente sin perder la expresión de los genes insertados, se realizó un ensayo de estabilidad efectuando varios pases sucesivos del virus recombinante MVA-B en células CEF. Monocapas de células CEF crecidas en placas P100 fueron infectadas de forma sucesiva, a una multiplicidad de 0,05 ufp/célula, partiendo del stock P2 del MVA-B  
15 (pase 6) hasta generar el pase 10 (P10). A continuación, monocapas de células CEF crecidas en placas de 6 pocillos fueron infectadas con una dilución  $10^{-5}$  del extracto viral obtenido del último pase (P10). A las 48 horas post-infección, las placas de lisis generadas fueron analizadas por inmunotinción, empleando anticuerpos policlonales anti-WR (que reconoce proteínas del virus MVA); anti-gp120 (que reconoce la gp120  
20 del aislamiento BX08); y anti-p24 (que reconoce la quimera gagpolnef-B del aislamiento IIIB); estos dos últimos anticuerpos fueron los mismos que se utilizaron en el Ejemplo 2. Los resultados de estas inmunotinciones se muestran en la parte A de la Figura 6. Los recuentos de placas efectuados mostraron que un 100% de las placas resultaban teñidas con los anticuerpos anti-WR, anti-p24 y anti-gp120. Por ello, se  
25 puede considerar que, tras 10 pases sucesivos del virus en células CEF, ambos antígenos se expresan eficientemente (100% de las placas reconocidas por los tres anticuerpos), corroborándose la estabilidad del producto generado.

Los extractos de células CEF infectadas con los pases 7, 8, 9 y 10 también fueron analizados por inmunotransferencia tipo Western, pruebas a las cuales  
30 corresponden las tinciones mostradas en la parte B de la Figura 6. Para realizar estos ensayos, monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con 5 ufp/célula de los extractos virales obtenidos en los pases 7 (P7), 8 (P8), 9 (P9) y

10 (P10) del virus recombinante MVA-B. Los extractos celulares fueron recogidos a las 24 horas post-infección, fraccionados en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDA-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa y hechos reaccionar con los mismos anticuerpos policlonales anti-gp120 (parte derecha de la figura) o anti-p24 5 (parte izquierda de la figura) utilizados en la prueba correspondiente a la parte A de la Figura 6. Ambos anticuerpos se utilizaron a una dilución 1/500. Como control positivo se empleó un extracto de células CEF infectadas con el virus NYVAC-B (cedido por el grupo Aventis). Los resultados confirman la correcta expresión de las proteínas gp120-BX08 y gagpolnef-B en todos los extractos obtenidos por la infección con virus 10 procedentes de distintos países.

**- Ejemplo 4.- Liberación de gp120-BX08 y cinética de expresión a partir del MVA-B en el transcurso del tiempo**

Para definir si la proteína gp120-BX08 era eficientemente secretada, monocapas 15 de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con MVA-B a 5 ufp/célula. A las 4, 8, 16 y 24 horas post-infección las células se recogieron separando el precipitado (P) del sobrenadante (S) celular. Los sobrenadantes de cada tiempo analizado fueron concentrados y fraccionados junto a los precipitados celulares en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidos a membranas de 20 nitrocelulosa, y sometidos a reacción frente al anticuerpo policlonal anti-gp120 (diluidos 1/500) anteriormente utilizado en los Ejemplos 2 y 3. De igual forma fueron tratadas células CEF infectadas con el NYVAC-B (proporcionado por el grupo Aventis), usado como control positivo en el ensayo. Como control interno para verificar que había sido aplicado en el gel la misma cantidad de proteína, las membranas fueron 25 incubadas también frente a un anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -actina. Los resultados se muestran en la Figura 7. En su parte superior, correspondiente a la muestra del MVA-B, puede apreciarse que la proteína gp120-BX08 es expresada eficientemente por el MVA-B desde las 4 horas post-infección, detectándose en el sobrenadante celular a partir de las 8 horas post-infección, y con un comportamiento similar al que se observa en células 30 infectadas con el NYVAC-B, para el cual se muestran los resultados obtenidos en la parte inferior de la Figura 7.

La expresión de la proteína de fusión gagpolnef-B fue analizada siguiendo un procedimiento similar: monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con MVA-B a 5 ufp/célula aunque, en este caso, la presencia de la proteína se ensayó en el precipitado celular obtenido a las 6, 18 y 24 horas post-infección, igualmente mediante transferencia tipo Western y poniendo de manifiesto la presencia de la proteína mediante reacción con el anticuerpo policlonal anti-p24 utilizado en los Ejemplos 2 y 3. Los resultados se muestran en la Figura 8. En ella puede observarse la correcta expresión de esta proteína de fusión a lo largo del tiempo de infección tanto desde MVA-B (calle 2 de cada tiempo de infección) como desde NYVAC-B (calle 1), aunque se produce una mayor acumulación de la proteína de fusión en células infectadas con MVA-B.

**- Ejemplo 5.- Inmunogenicidad del MVA-B: Respuesta inmune específica de células T productoras de IFN- $\gamma$**

Una vez generado y caracterizado el recombinante MVA-B, el siguiente objetivo fue analizar su capacidad de inducir una respuesta inmune específica en el modelo murino frente a los antígenos que expresa. Para ello, ratones BALB/c (n=4) de 6-8 semanas de edad se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.) con una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-B (stock P3) o de NYVAC-B. 10 días después de la inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, y se les extrajo el bazo para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT que detecta las células T específicas frente al antígeno en función de su cualidad para producir IFN- $\gamma$ , que es un indicador positivo de que un inmunógeno es capaz de activar selectivamente una respuesta celular del tipo CD4<sup>+</sup> Th1, característica esta última que se considera indicadora de la eficacia de un proceso de vacunación.

Para ello, placas de 96 pocillos con fondos de nitrocelulosa se cubrieron con 75  $\mu$ l/pocillo a una concentración de 6  $\mu$ g/ml de un anticuerpo monoclonal de rata anti-IFN- $\gamma$  murino (R4-6A2, Pharmingen, San Diego, CA) resuspendido en PBS, incubándose toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron los pocillos tres veces con medio RPMI y finalmente se incubó con medio complementado con 10% FCS, al menos una hora a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Por otro lado, los bazos de los ratones inmunizados, que una vez extraídos se mantuvieron en RPMI +

- 10% FCS, se dispusieron en una rejilla estéril sobre una placa de 60 mm, y se homogeneizaron, disgregando el extracto mediante su paso por agujas de diferente calibre (21G->25G). Las células así disgregadas se centrifugaron 5 min a 1.500 rpm a 4°C, y se lavaron dos veces con RPMI + 10% FCS. Para lisar los eritrocitos de las muestras, se añadió NH<sub>4</sub>Cl 0,1 M estéril (2 ml/bazo) y se mantuvo a 4°C durante 3-5 min, se añadió RPMI + 10% FCS y se centrifugó. Después se lavaron 2 veces, y finalmente se resuspendieron en 1-2 ml de RPMI + 10% FCS. El recuento de la viabilidad de los esplenocitos se realizó mediante tinción con azul tripan (4% en agua, Sigma).
- 10 Para evaluar la respuesta inmune específica, se utilizaron diferentes grupos de 40-50 péptidos de 15 aminoácidos cada uno, solapantes en 11 aminoácidos, que cubrían todas las regiones antigénicas incluidas en el recombinante MVA-B de la invención. Cada grupo de péptidos se diluyó a una concentración de 10 µg/ml en RPMI + 10% FCS a los que se les añadió 30 U/ml de IL-2. Una vez preparado, se añadió a cada pocillo 100 µl de mezcla del grupo de péptidos, sobre lo cual se añadió 100 µl/pocillo de esplenocitos de los animales inmunizados, a una concentración de 10<sup>7</sup> esplenocitos/ml y diluciones 1/4 y 1/16 de la misma. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub>, se lavaron 5 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (PBST), y se incubaron con 2 µg/ml del anticuerpo monoclonal de rata anti-IFN-γ biotinilado XMG1.2 (Pharmingen) diluido en PBST, durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se lavaron las placas 5 veces con PBST y se añadió una dilución 1/800 de avidina-peroxidasa (0,5 mg/ml) (Sigma). Tras 1 hora a temperatura ambiente se lavó 3 veces con PBST y 2 con PBS, añadiéndose finalmente la mezcla reveladora con 1 µg/ml del sustrato DAB (Sigma), resuspendido en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, que contenía 0,015% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción se detuvo lavando la placa con abundante agua y, una vez seca, se llevó a cabo el recuento de las manchas generadas con la ayuda de un estereomicroscopio de Leica MZ122 APO y el software Imaging System QWIN (Leica, Cambridge, Reino Unido). El número de células productoras de IFN-γ obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos.

Los resultados, que se muestran en la Figura 9, demuestran que el MVA-B es capaz de potenciar una respuesta inmune específica frente a casi todos los grupos de péptidos ensayados, en distinta proporción que su homólogo NYVAC-B.

5           **- Ejemplo 6.- Inmunogenicidad del MVA-B: Producción de citoquinas por esplenocitos reestimulados**

A continuación, se procedió a evaluar la producción de citoquinas estimulada en los esplenocitos de los ratones inmunizados al ser mezclados con los diferentes grupos de péptidos solapantes. Para ello, los esplenocitos aislados en el Ejemplo 5 fueron  
10 cultivados ( $5 \times 10^6$  células/pocillo) en una placa de 24 pocillos y estimulados con 1 µg/ml de cada grupo de péptidos. La placa se incubó durante 5 días a 37°C en atmósfera del 5% CO<sub>2</sub>. Después de este período, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y se centrifugaron a 1.500 rpm, 5 min, a 4°C, almacenándose a -70°C hasta su utilización.

Tal como se ha comentado anteriormente, los niveles de la citoquina interferón-  
15 gamma (IFN-γ) son un indicador positivo de la activación de una respuesta celular del tipo CD4<sup>+</sup> Th1, mientras que la citoquina IL-10, por su parte, es un indicador de activación de la respuesta celular tipo CD4<sup>+</sup> Th2. La relación entre los niveles de IFN-γ e IL-10 indica si la vacunación es más o menos eficaz. Para conocer los niveles de una y otra citoquina, IL-10 e IFN-γ, presentes en los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos  
20 reestimulados “*in vitro*”, se procedió a la determinación de estos niveles mediante kits de ELISA comerciales de Pharmingen. Siguiendo las instrucciones del fabricante, placas de 96 pocillos de fondo plano se cubrieron con el anticuerpo anti-citoquina, diluido en su correspondiente tampón, y se incubó toda la noche a 4°C. Después, los pocillos se lavaron con PBST, y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente  
25 con PBST + 10% FCS (PBSTB). Posteriormente, se añadieron diluciones seriadas en PBSTB de las muestras y de las citoquinas estándar, incubándose la placa a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, se lavó con PBST y se incubó a temperatura ambiente, durante 1 hora, con el anticuerpo específico anti-citoquina biotinilado, junto a  
30 la estreptavidina conjugada con peroxidasa, todo ello diluido en PBSTB. Finalmente, la reacción se detectó con TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, Sigma), a temperatura ambiente y en oscuridad, y se detuvo, tras 30 min de incubación, con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. La

absorbancia se leyó a 450 nm y los valores obtenidos fueron extrapolados en la curva estándar (pg/ml).

Los resultados, mostrados en la Figura 10, indican que existe una polarización de la respuesta celular específica hacia un subtipo Th1, caracterizado por la secreción de altos niveles de IFN- $\gamma$ , tanto para MVA-B como para NYVAC-B, frente a los diferentes grupos de péptidos ensayados. Existen claras diferencias entre las respuestas generadas por cada uno de los recombinantes.

10 **- Ejemplo 7.- Inmunogenicidad del MVA-B: Identificación de los tipos de células T específicas secretoras de IFN- $\gamma$**

Como las células presentadoras que se estaban empleando hasta el momento en la caracterización de la respuesta celular eran las propias del bazo que expresan las moléculas de histocompatibilidad tanto de clase I (MHC-I) como de clase II (MHC-II), el siguiente paso fue dilucidar si la respuesta celular que se estaba obteniendo en ELISPOT era debida a la secreción de IFN- $\gamma$  por las células T CD8<sup>+</sup> o por las células T CD4<sup>+</sup>. Para ello, los esplenocitos obtenidos en el Ejemplo 5 fueron reestimulados *in vitro* durante 1 hora a 37°C con 5  $\mu$ g/ml de cada grupo de péptidos solapantes pertenecientes al clade B, tras lo cual se añadió Brefeldina a una concentración de 10  $\mu$ g/ml, incubándose durante toda la noche a 37°C. Siete días después se procedió a un marcaje de superficie empleando anticuerpos específicos anti-CD4 o anti-CD8 conjugados a FITC, seguido de un marcaje intracelular empleando anti-IFN- $\gamma$  conjugado a PE. Una vez fijadas las células fueron analizadas en el citómetro de flujo.

Los resultados, mostrados en la Figura 11, permiten apreciar que, tanto para el grupo de animales inmunizado con el MVA-B, como para el grupo inmunizado con NYVAC-B, la respuesta productora de IFN- $\gamma$  es mayoritariamente debida a la población de células T CD8<sup>+</sup> específicas activadas frente a los diferentes grupos de péptidos. Al determinar los niveles totales de IFN- $\gamma$  secretados por ambos tipos de células, se corroboró el resultado obtenido en el ensayo de ELISPOT descrito en el Ejemplo 5, donde se observaba una respuesta específica frente a la mayoría de los grupos de péptidos en los animales inmunizados con ambos recombinantes. De nuevo, existen diferencias claras entre las respuestas generadas por cada uno de los recombinantes.



**- Ejemplo 8.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación: Respuesta inmune específica de células T productoras de IFN- $\gamma$**

Una vez establecido que la administración de una primera dosis de inmunización  
5 que contenía el MVA-B era capaz de inducir una respuesta inmune específica en el  
modelo murino, se evaluó a continuación si la utilización de este vector de la invención  
como parte de protocolos de inducción/potenciación (*priming/boosting*) daba lugar a un  
incremento en la magnitud y en la amplitud de la respuesta inmune. Para ello, grupos de  
4 ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad se inocularon por vía intramuscular (i.m.)  
10 con 100  $\mu$ g del vector de ADN DNA-B (cedido por GeneArt, Alemania), que contiene  
las mismas secuencias codificantes de proteínas del VIH-1 que lleva insertadas el  
MVA-B, pero bajo el control de sendos promotores de citomegalovirus e insertadas en  
vectores plasmídicos (uno para gp120 y otro para la proteína de fusión Gag-Pol-Nef).  
Los grupos control fueron inoculados (i.m.) con 100  $\mu$ g de ADN sin inserto (DNA  $\emptyset$ ).  
15 15 días después se les inmunizó por vía intraperitoneal (i.p.) con  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de  
MVA-B (stock P3) o de NYVAC-B (grupo Aventis, Francia), que expresa los mismos  
antígenos de VIH que MVA-B. Un tercer grupo recibió una segunda dosis de DNA-B  
(100  $\mu$ g, i.m.). Los grupos control recibieron una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-  
WT o NYVAC-WT. 10 días después de la última inmunización los ratones fueron  
20 sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo  
de ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, mezclas de esplenocitos de  
los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con  
diferentes mezclas (*pools*) de péptidos solapantes pertenecientes al clade B (5  $\mu$ g/ml)  
que comprenden todas las regiones antigénicas incluidas en los virus recombinantes  
25 MVA-B y NYVAC-B. El número de células productoras de IFN- $\gamma$  obtenido frente a una  
mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en  
todos los casos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12, en la que aparece el  
número de células secretoras de IFN- $\gamma$  específicas detectadas por cada  $10^6$  esplenocitos  
30 en los ratones inmunizados con las diferentes combinaciones de vectores. Se observa  
para casi todos los grupos de péptidos analizados que la inclusión de vectores derivados  
de poxvirus que codifican antígenos del VIH-1 en la segunda dosis de refuerzo de la

respuesta inmune da lugar en casi todos los casos a un incremento significativo de la respuesta inmune con respecto a la utilización únicamente de vectores de ADN, siendo la respuesta generada diferente según se utilice MVA-B o NYVAC-B.

5           - **Ejemplo 9.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación: Producción de citoquinas por esplenocitos reestimulados**

Cinco grupos de ratones BALB/c (n=4) fueron inoculados en régimen combinado de inducción de la respuesta inmune mediante la administración de una primera dosis de vector y de potenciación de la misma mediante la inoculación de otro  
10 vector en una segunda dosis, de manera análoga a como se describió en el Ejemplo 8 y utilizando las mismas combinaciones de vectores. Los esplenocitos extraídos fueron estimulados *in vitro* con las diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade B (1 µg/mL) e incubados durante 5 días a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -70°C. Los niveles de IFN-γ se  
15 determinaron por ELISA usando un Kit comercial (Pharmigen). Los resultados se muestran en la Figura 13, donde se observa que la producción de IFN-γ difiere según se utilice MVA-B o NYVAC-B como segundo vector de inmunización.

20           - **Ejemplo 10.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación: Producción de β-quimioquinas por esplenocitos reestimulados**

Cinco grupos de ratones BALB/c (n=4) fueron inoculados en régimen combinado de inducción de la respuesta inmune mediante la administración de una primera dosis de vector y de potenciación de la misma mediante la inoculación de otro  
25 vector en una segunda dosis, de manera análoga a como se describió en el Ejemplo 8 y utilizando las mismas combinaciones de vectores. Los esplenocitos extraídos fueron estimulados *in vitro* con las diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade B (1 µg/ml) e incubados durante 5 días a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -70°C. Los niveles de MIP-1 β y  
30 RANTES se determinaron por ELISA usando kits comerciales (Pharmigen)

Los resultados se muestran en la Figura 14, donde se observa que la producción de quimioquinas MIP-1  $\beta$  y RANTES difieren según se utilice MVA-B o NYVAC-B como segundo vector de inmunización.

5           - **Ejemplo 11.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación: Identificación de los tipos de células T específicas productoras de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$**

Cinco grupos de ratones BALB/c (n=4) fueron inoculados en régimen combinado de inducción de la respuesta inmune mediante la administración de una  
10 primera dosis de vector y de potenciación de la misma mediante la inoculación de otro vector en una segunda dosis, de manera análoga a como se describió en el Ejemplo 8 y utilizando las mismas combinaciones de vectores. Los esplenocitos extraídos fueron estimulados *in vitro* con el péptido de la envuelta del aislado Bx08 (5  $\mu$ g/ml) e incubados durante 1 hora a 37 °C. Transcurrido ese tiempo se le añadió Brefeldina A  
15 (10  $\mu$ g/mL) y se dejó incubando a 37 °C. Siete días después, se procedió a un marcaje de superficie empleando anticuerpos específicos anti-CD4 o anti-CD8 conjugados a FITC (diluidos 1/100), seguido de un marcaje intracelular empleando anti-IFN- $\gamma$  o anti-TNF- $\alpha$  conjugado a PE (diluido 1/100). Una vez fijadas las células fueron analizadas en el citómetro de flujo

20           Los resultados se muestran en la Figura 15. En ellos se observan diferencias en los niveles de células CD8<sup>+</sup> entre los grupos, con un mayor incremento de células secretoras de TNF- $\alpha$  en el grupo que había recibido DNA-B+MVA-B.

25           - **Ejemplo 12.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores derivados de Vaccinia: Respuesta inmune específica de células T productoras de IFN- $\gamma$**

Grupos de 4 ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.) con una dosis de con  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-B (stock P3), NYVAC B (grupo Aventi) o MVA WT. 15 días después los ratones recibieron una  
30 segunda dosis por vía intraperitoneal (i.p.) de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de vector, de manera que se inoculó NYVAC-B a los ratones que habían recibido MVA-B en la primera dosis, MVA-B a los ratones que habían recibido NYVAC-B en la primera dosis y NYVAC-

WT (grupo Aventis) a los ratones que habían recibido MVA-WT en la primera dosis. Se generaron así grupos que habían sido inoculados con las siguientes combinaciones de vectores: NYVAC-B+MVA-B, MVA-B+NYVAC-B y MVA-WT+NYVAC-WT.

10 días después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, grupos de mezcla de esplenocitos de los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade B (5 µg/ml) que comprenden todas las regiones antigénicas incluidas en los virus recombinantes MVA-B y NYVAC-B. El número de células productoras de IFN-γ obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16. En ella puede observarse como las dos combinaciones de vectores que contienen secuencias derivadas de VIH-1 incrementan tanto la magnitud como la amplitud de la respuesta inmune específica generada, según se observa con los diferentes grupos de péptidos. La combinación en la que el NYVAC-B se inocula en la primera dosis y el MVA-B en la segunda fue la que dio lugar al número más elevado de células secretoras de IFN-γ frente a los diferentes grupos de péptidos.

20

**- Ejemplo 13.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores derivados de Vaccinia: Producción de IFN-γ por esplenocitos estimulados**

Tres grupos de ratones BALB/c (n=4) de 6-8 semanas de edad fueron inoculados en régimen combinado de inducción de la respuesta inmune mediante la administración de una primera dosis de vector y de potenciación de la misma mediante la inoculación de otro vector en una segunda dosis, de manera análoga a como se describió en el Ejemplo 12 y utilizando las mismas combinaciones de vectores. Los esplenocitos extraídos fueron estimulados *in vitro* con las diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade B (1 µg/ml) utilizadas en los Ejemplos anteriores e incubados durante 5 días a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se recogieron los sobrenadantes y se

30

almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Los niveles de IFN- $\gamma$  se determinaron por ELISA usando un kit comercial (Pharmigen).

Los resultados se muestran en la Figura 17, donde se observa que la producción de IFN- $\gamma$  más amplia se obtiene con la combinación NYVAC-B+MVA-B, al igual que  
5 en el Ejemplo 12.

**- Ejemplo 14.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores de ADN y vectores virales derivados de Vaccinia: Respuesta inmune específica de células T productoras de IFN- $\gamma$  en ratones humanizados HHDII**

10

Se procedió también a realizar experimentos con ratones humanizados HHDII. Estos ratones, generados por F. Lemonier en Francia y cedidos por él para la realización de los experimentos descritos en la presente memoria, sólo permiten la presentación de antígenos en el contexto del MHC de clase I humano, al tener reemplazados los genes murinos del MHC clase I y  $\beta$ -microglobulina por los correspondientes genes humanos.  
15

Grupos de 4 ratones HHDII de 6-10 semanas de edad se inocularon por vía intramuscular (i.m.) con 100  $\mu\text{g}$  del vector de ADN DNA-B (cedido por GeneArt, Alemania) utilizado también en el Ejemplo 8. Los grupos control fueron inoculados (i.m.) con 100  $\mu\text{g}$  de ADN sin inserto (DNA  $\emptyset$ ). 15 días después se les inmunizó por  
20 vía intraperitoneal (i.p.) con  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-B (stock P3) o de NYVAC-B (grupo Aventis, Francia), que expresa los mismos antígenos de VIH que MVA-B. Un tercer grupo recibió una segunda dosis de DNA-B (100  $\mu\text{g}$ , i.m.). El grupo control recibió una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-WT. 10 días después de la última  
25 inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, mezclas de esplenocitos de los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade B (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) que comprenden todas las regiones antigénicas incluidas en los virus recombinantes MVA-B y NYVAC-B. El número de células  
30 productoras de IFN- $\gamma$  obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos. • denota diferencias

significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo respecto al control negativo. \* denota diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos grupos

La Figura 18 muestra los resultados obtenidos. Se observa que las combinaciones DNA-B+MVA-B y DNA-B+NYVAC-B inducen una amplia respuesta  
5 frente a los grupos de péptidos, con inmunodominancia frente a Env.

**- Ejemplo 15.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores de ADN y vectores virales derivados de Vaccinia: Respuesta inmune específica de células T productoras de IL-2 en ratones humanizados HHDII**

Grupos de 4 ratones HHDII de 6-10 semanas de edad se inocularon por vía intramuscular (i.m.) con 100  $\mu\text{g}$  del vector de ADN DNA-B (cedido por GenArt, Alemania). El grupo control fue inoculado (i.m.) con 100  $\mu\text{g}$  de ADN sin inserto (DNA  $\emptyset$ ). 15 días después se les inmunizó por vía intraperitoneal (i.p.) con  $2 \times 10^7$  ufp/ratón  
15 de MVA-B (stock P3) o de NYVAC-B (grupo Aventis, Francia), que expresa los mismos antígenos de VIH que MVA-B. Un tercer grupo recibió una segunda dosis de DNA-B (100  $\mu\text{g}$ , i.m.). El grupo control recibió una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-WT. 10 días después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo de  
20 ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, mezclas de esplenocitos de los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade B (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) que comprenden todas las regiones antigénicas incluidas en los virus recombinantes MVA-B y NYVAC-B. El número de células productoras de IL-2 obtenido frente a una mezcla  
25 de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos. La Figura 19 muestra los resultados obtenidos, en la que: • denota diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada pool respecto al control negativo. \* denota diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos grupos. Se observa inmunodominancia de antígenos de Env, con amplia respuesta frente a los distintos grupos de péptidos y  
30 diferencias significativas entre los grupos DNA-B+MVA-B y DNA-B+NYVAC-B.

**- Ejemplo 16.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores derivados de Vaccinia: Respuesta inmune específica de células T productoras de IFN- $\gamma$  en ratones humanizados HDDII**

5           Cinco grupos de 4 ratones HDDII de 6-10 semanas de edad se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.) con una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-B (stock P3) (2 grupos), NYVAC B (grupo Aventis) (2 grupos) o NYVAC WT (grupo control). 15 días después los ratones recibieron una segunda dosis por vía intraperitoneal (i.p.) de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de vector, de manera que a uno de los grupos que había recibido MVA-B en la  
10 primera dosis se le inoculó NYVAC-B y a otro de nuevo MVA-B, a uno de los grupos que habían recibido NYVAC-B en la primera dosis se le inoculó NYVAC-B de nuevo y a otro MVA-B y, finalmente, el grupo control recibió en la segunda dosis MVA-WT (Aventis-Pasterur). Se generaron así grupos que habían sido inoculados con las siguientes combinaciones de vectores: MVA-B+NYVAC-B, NYVAC-B+MVA-B,  
15 MVA-B+MVA-B, NYVAC-B+NYVAC-B y NYVAC-WT+MVA-WT.

          10 días después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, grupos de mezcla de esplenocitos de los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con  
20 diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade B ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) que comprenden todas las regiones antigénicas incluidas en los virus recombinantes MVA-B y NYVAC-B. El número de células productoras de IFN- $\gamma$  obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en  
25 todos los casos. La Figura 20 muestra los resultados obtenidos, en la que: • denota diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo. Se observa que la inmunización combinada de vectores virales, MVA-B y NYVAC-B, induce una amplia respuesta inmune contra distintos antígenos del VIH.

**- Ejemplo 17.- Utilización del MVA-B en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores derivados de Vaccinia: Respuesta inmune específica de células T productoras de IL-2 en ratones humanizados HHDI**

5           Cinco grupos de 4 ratones HHDI de 6-10 semanas de edad se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.) con una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-B (stock P3) (2 grupos), NYVAC B (grupo Aventis) (2 grupos) o NYVAC WT (grupo control). 15 días después los ratones recibieron una segunda dosis por vía intraperitoneal (i.p.) de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de vector, de manera que a uno de los grupos que había recibido MVA-B en la  
10 primera dosis se le inoculó NYVAC-B y a otro de nuevo MVA-B, a uno de los grupos que habían recibido NYVAC-B en la primera dosis se le inoculó NYVAC-B de nuevo y a otro MVA-B y, finalmente, el grupo control recibió en la segunda dosis MVA-WT (grupo Aventis). Se generaron así grupos que habían sido inoculados con las siguientes combinaciones de vectores: MVA-B+NYVAC-B, NYVAC-B+MVA-B, MVA-  
15 B+MVA-B, NYVAC-B+NYVAC-B y NYVAC-WT+MVA-WT.

10 días después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, grupos de mezcla de esplenocitos de los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con  
20 diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade B ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) que comprenden todas las regiones antigénicas incluidas en los virus recombinantes MVA-B y NYVAC-B. El número de células productoras de IL-2 obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos. La Figura 21 muestra los resultados obtenidos, en la que: • denota diferencias  
25 significativas ( $p < 0,005$ ) de cada grupo de péptidos respecto al control negativo. Como en el Ejemplo 16, se observa que la combinación de vectores induce una amplia respuesta inmune (producción de IL-2) frente a distintos antígenos del VIH.

**- Ejemplo 18.- Generación del MVA-C**

30           Construcción del vector plasmídico pLZAW1gp120C/gagpolnef-C-14

El vector plasmídico pLZAW1gp120C/gagpolnef-C-14 fue construido por los inventores para la generación del virus recombinante de MVA que expresa secuencias



- 67 -

génicas correspondientes a la proteína gp120 (gp120-C) y a la quimera de Gag, Pol y Nef (gagpolnef-C) del aislamiento CN54, que pertenece al clade C. El vector pMA60gp120C/gagpolnefC-14,15 utilizado para su construcción, contiene las secuencias codificantes de ambas proteínas; se construyó utilizando la secuencia

5 codificante de la proteína de fusión gagpolnef-C generada por GeneArt (Regensburg, Alemania) y fue cedido a los inventores para la construcción del vector MVA-C en el marco del programa de colaboración EuroVacl.

El plásmido pLZAW1gp120C/gagpolnef-C-14 es un derivativo de pUC diseñado para la selección de placas azules/blancas. Contiene las secuencias flanqueantes derecha

10 (TK-R) e izquierda (TK-L) del gen viral de la timidina quinasa (TK), el promotor E3L dirigiendo la expresión del marcador de selección  $\beta$ -galactosidasa, y el gen de resistencia a ampicilina (AP). Entre las dos secuencias flanqueantes se encuentran las dos secuencias que se desean expresar, gp120-C (SEQ ID NO:17) y gagpolnef-C (SEQ ID NO:18), que han sido modificadas para optimizar el uso de codones de mamífero.

15 Para dirigir la expresión de cada una de las secuencias hay sendos promotores sintéticos temprano/tardío (pE/L), situados en orientación opuesta en la zona del inserto más alejada de las secuencias flanqueantes. La posición de cada uno de los componentes incluidos en el plásmido se describe a continuación en la Tabla 4.

**Tabla 4.- Componentes del plásmido pLZAW1gp120C/gagpolnef-C-14**

Secuencia flanqueante izquierda de TK	410-908	Complementaria
T5NT para $\beta$ -gal	929-935	Complementaria
$\beta$ -gal	ATG-TAA (936-4079)	Complementaria
Promotor E3L para $\beta$ -gal	4080-4140	Complementaria
Parte 1 de la secuencia flanqueante izquierda de TK	4151-4498	Complementaria
T5NT para gp120	4607-4614	Complementaria
gp120	ATG-TAA (4643-6139)	Complementaria
Promotor E/L para gp120	6149-6187	Complementaria
Promotor E/L para gagpolnef	6202-6240	
gagpolnef	ATG-TAA (6250-10503)	
T5NT para gagpolnef	10584-10590	
Secuencia flanqueante derecha de TK	10652-11343	Complementaria
AP	ATG-TAA (12514-13374)	Complementaria

Para la construcción de este plásmido se utilizaron otros dos plásmidos diferentes:

- pMA60gp120C/gagpolnef-C-14,15 (proporcionado por el grupo Aventis, Canadá). El plásmido es un derivativo de pUC que contiene las secuencias flanqueantes derecha (TK-R) e izquierda (TK-L) del gen viral de la timidina quinasa (TK) en sitios de clonación del pUC.. Entre las dos secuencias flanqueantes se encuentran las dos secuencias que se desean expresar, gp120-C y gagpolnef-C, que han sido modificadas para optimizar el uso de codones de mamífero. Para dirigir la expresión de cada una de las secuencias hay sendos promotores sintéticos temprano/tardío (pE/L), situados en orientación opuesta en la zona del inserto más alejada de las secuencias flanqueantes.

- pLZAW1: El plásmido fue proporcionado por Linong Zhang, del grupo Aventis, Canadá. Es un plásmido basado en pUC que contiene un brazo izquierdo del gen de TK, sitios de clonación para insertar genes exógenos, una repetición corta del brazo izquierdo del gen de TK, un promotor E3L dirigiendo la expresión de un casete con  $\beta$ -gal y un brazo derecho del gen de TK.

La construcción del plásmido pLZAW1gp120C/gagpolnefC-14 a partir de estos otros dos plásmidos se representa en la Figura 22. Brevemente, un fragmento de ADN de 6047 kpb que contenía los genes de interés fue sacado por digestión con EcoRV del plásmido pMA60gp120C/gagpolnefC-14,15, modificado por incubación con la ADN polimerasa de Klenow para generar extremos romos, y clonado en el vector pLZAW1 previamente digerido con la endonucleasa de restricción AscI, modificado por incubación con Klenow, y desfosforilado por incubación con fosfatasa alcalina de intestino de ternera, generándose de esta forma el vector plasmídico de transferencia pLZAW1gp120C/gagpolnef-C-14. El plásmido generado dirige la inserción de los genes de interés en el locus de la TK del genoma del virus atenuado MVA. Después de aislar el virus recombinante deseado mediante el análisis de la expresión de actividad  $\beta$ -galactosidasa la posterior propagación del virus recombinante conduce a la autodelección de  $\beta$ -gal por recombinación homóloga entre el brazo izquierdo de TK y la repetición corta del brazo izquierdo de TK que flanquean el marcador.

Construcción del virus recombinante MVA-C

Cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) fueron infectados con virus atenuado MVA en pase 586 (MVA-F6, pase 586, proporcionado por Gerd Sutter) a una multiplicidad de 0,05 ufp/célula, y posteriormente transfectados con 10 µg de ADN del plásmido de transferencia pLZAW1gp120C/gagpolnefC-14, usando para ello lipofectina comercial suministrada por Invitrogen y siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 72 horas post-infección las células fueron recogidas, sonicadas y usadas para la selección de los virus recombinantes. Los virus MVA recombinantes que contenían los genes gp120C/gagpolnef-C y coexpresaban de forma transitoria el gen marcador β-Gal (MVA-B (X-Gal<sup>+</sup>)), fueron seleccionados por pases consecutivos de purificación de placas en células CEF teñidas con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactósido (XGal) (300 µg/ml). En lo sucesivo, los MVA recombinantes que contenían los genes gp120C/gagpolnef-C y que habían perdido el gen marcador (MVA-B (X-Gal<sup>-</sup>)), fueron seleccionados como focos virales no teñidos en células CEF en presencia de XGal. En cada paso de purificación las placas aisladas fueron expandidas en CEF durante 3 días, y el extracto viral crudo obtenido fue usado para el paso de purificación de placas consecutivo.

Tras 4 pases consecutivos de purificación fueron aisladas 24 placas recombinantes que expresaban eficientemente ambos antígenos y que habían perdido el gen marcador. Se hizo crecer el recombinante designado como MVA-C-1.7.1.2 (P1) (SEQ ID NO:16) para generar un stock crudo (P2) que se envió a producción en condiciones de buenas prácticas de fabricación para estudios clínicos. La secuencia del inserto que este recombinante lleva incluido en el sitio de la timidina quinasa viene representada por SEQ ID NO:20. La localización en dicha secuencia de cada uno de los elementos que componen el inserto se indica a continuación en la Tabla 5

**Tabla 5.- Posición de los componentes principales del inserto del vector MVA-C**

Parte 1 de la secuencia flanqueante izquierda de TK	1-502	Complementaria
gp120-C	ATG-TAA (647-2143)	Complementaria
Promotor E/L para gp120-C	2153-2191	Complementaria
Promotor E/L para gagpolnef	2206-2244	
gagpolnef-C	ATG-TAA (2254-6507)	
Secuencia flanqueante derecha de TK	6656-7347	Complementaria

A partir del P2, se preparó un stock P3 de virus, purificándolo a partir de células CEF infectadas a una multiplicidad de infección de 0,05 por pase a través de dos colchones de sacarosa al 36%. Este stock P3, con un título de  $4,25 \times 10^8$  ufp/ml, fue el que se utilizó en los protocolos de inmunización en el modelo murino.

#### Caracterización del virus recombinante MVA-C

Para confirmar la homogeneidad genética del virus MVA-C generado y la integridad de los genes insertados, se realizó un análisis por PCR del ADN viral extraído de células CEF infectadas a una multiplicidad de 5 ufp/célula, empleando para ello oligonucleótidos que hibridan o con las regiones TK flanqueantes del inserto o con regiones internas de los genes insertados. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados como cebadores y la posición en que aparecen sobre el vector plasmídico de transferencia pLZAW1gp120C/gagpolnefC-14 se muestran en la Tabla 6. Las posiciones en las que hibridan dichos oligonucleótidos, así como los tamaños estimados de los fragmentos generados en las distintas PCR y la localización de los mismos con respecto a los insertos y las secuencias flanqueantes, aparecen representadas en la parte superior de la Figura 23.

**Tabla 6.- Oligonucleótidos utilizados como cebadores de las PCR de caracterización del vector MVA-C**

Oligo nucleótido	SECUENCIA	Posición
TK-L	5' TGATTAGTTTGTGCGATTTC 3' (SEQ ID NO:1)	4338-4357
TK-R	5' TGTCCTTGATACGGCAG 3' (SEQ ID NO:2)	10819-10835
gp120-10	5' TCGAGCATGGACAGGGCC 3' (SEQ ID NO:7)	6128-6145
gp120-1050	5' GTCTTGTTCTGGAAGTGC 3' (SEQ ID NO:8)	5088-5105
gp120-1213	5' ATCATCACCATCCCCTGC 3' (SEQ ID NO:9)	4925-4942
GPN-802	5' TGGGTTTAAACAAGATCG 3' (SEQ ID NO:10)	7043-7060
GPN-2018	5' CAAGGTGAAGCAGTGGCC 3' (SEQ ID NO:11)	8260-8276
GPN-2198	5' TGGGTCCTCTTGTTTCAGC 3' (SEQ ID NO:12)	8439-8456
GPN-3820	5' CGGCCTTGCCGATCTTGG 3' (SEQ ID NO:13)	10061-10078
GPN-4000	5' CCGACAAGAGCGAGAGCG 3' (SEQ ID NO:14)	10241-10258

La parte inferior de la Figura 23 muestra fotografías de los geles obtenidos al someter a electroforesis los productos de las PCR realizadas con las diferentes parejas de cebadores para efectuar el análisis de los fragmentos del VIH-1 incluidos en el virus MVA-C. Para ello, 100 ng del ADN viral extraído de células CEF infectadas a una multiplicidad de 5 ufp/célula con los virus NYVAC-C (calle 1), MVA-C (calle 2), MVA-WT (calle 3) o NYVAC-WT (calle 4), fueron usados como molde para hacer una amplificación mediante PCR de diferentes fragmentos de VIH-1 incluidos en MVA-C. Las condiciones de cada PCR se estandarizaron de forma individualizada para cada pareja de oligonucleótidos cebadores empleada. Como se observa en las fotografías mostradas en la parte inferior de la Figura 23, en las calles 3 y 4, correspondientes a muestras que carecen de inserto, no se observan bandas en ninguno de los casos, mientras que el control positivo NYVAC-C expresa los mismos genes incluidos en MVA-C.

La Figura 24, por su parte, muestra una fotografía de un gel obtenido al someter a electroforesis los productos resultantes de una reacción de PCR en la que se utilizaron como cebadores oligonucleótidos (TK-L y TK-R) que hibridan con las secuencias flanqueantes del gen TK. En las calles 2 y 3, correspondiente a los stocks P1 y P2 del vector MVA-C se observa una banda de algo más de 6 Kb compatible con la presencia del inserto completo; mientras que en la calle 4, correspondiente a ADN extraído de células CEF infectadas con la cepa silvestre MVA-WT del virus MVA aparece una banda mucho menor, que correspondería al locus de TK sin inserto.

#### **Ejemplo 19.- Análisis de la expresión de proteínas del VIH a partir del MVA-C**

La expresión de las proteínas gp120-C y gagpolnef-C por el virus MVA-C fue analizada mediante transferencia tipo Western. Monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con 5 ufp/célula de los diferentes stocks de virus recombinante MVA-B. Los extractos celulares fueron recogidos a las 24 horas post-infección, fraccionados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa, y sometidos a la reacción frente a un anticuerpo policlonal de conejo anti-gp120 (generado en el laboratorio) que reconoce la

proteína gp120 del aislamiento CN54; y frente a un anticuerpo policlonal de conejo anti-p24 (cedido por el programa EVA, ARP432) que reconoce la quimera gagpolnef-C del mismo aislamiento. Como controles positivos se utilizaron extractos procedentes de células infectadas con el vector NYVAC-C.

- 5           Como se observa en la Figura 25, ambos antígenos son expresados eficientemente por diferentes stocks (P2, P3) del recombinante MVA-C generado.

#### **Ejemplo 20.- Comprobación de la estabilidad del MVA-C**

- 10           Para verificar que el recombinante MVA-C podía ser pasado sucesivamente sin perder la expresión de los genes insertados, se realizó un ensayo de estabilidad análogo al descrito en el Ejemplo 3, efectuando varios pases sucesivos del virus recombinante MVA-C en células CEF. Monocapas de células CEF crecidas en placas P100 fueron infectadas de forma sucesiva, a una multiplicidad de 0,05 ufp/célula, partiendo del stock
- 15           P2 del MVA-C (pase 6) hasta generar el pase 10 (P10). A continuación, monocapas de células CEF crecidas en placas de 6 pocillos fueron infectadas con una dilución  $10^{-5}$  del extracto viral obtenido del último pase (P10). A las 48 horas post-infección, las placas de lisis generadas fueron analizadas por inmunotinción, empleando anticuerpos policlonales anti-WR (que reconoce proteínas del virus MVA); anti-gp120 (que
- 20           reconoce la gp120 del aislamiento CN54); y anti-p24 (que reconoce la quimera gagpolnef-C del mismo aislamiento); estos dos últimos anticuerpos fueron los mismos que se utilizaron en el Ejemplo 19. Los resultados de estas inmunotinciones se muestran en la parte A de la Figura 26. Los recuentos de placas demostraron que, tras 10 pases sucesivos del virus en células CEF, ambos antígenos se expresan eficientemente (100%
- 25           de las placas reconocidas por el anticuerpo anti-WR fueron reconocidas por los anticuerpos anti-gp120 y anti-p24), corroborándose la estabilidad del producto generado.

- Los extractos de células CEF infectadas con los pases 7, 8, 9 y 10 también fueron analizados por inmunotransferencia tipo Western, pruebas a las cuales
- 30           corresponden las tinciones mostradas en la parte B de la Figura 26. Para realizar estos ensayos, monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con 5 ufp/célula de los extractos virales obtenidos en los pases 7 (P7), 8 (P8), 9 (P9) y

- 73 -

10 (P10) del virus recombinante MVA-C. Los extractos celulares fueron recogidos a las 24 horas post-infección, fraccionados en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDA-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa y hechos reaccionar con los mismos anticuerpos policlonales anti-gp120 (parte derecha de la figura) o anti-p24 (parte izquierda de la figura) utilizados en la prueba correspondiente a la parte A de la Figura 26. Ambos anticuerpos se utilizaron a una dilución 1/500. Como control positivo se empleó un extracto de células CEF infectadas con el virus NYVAC-C (cedido por el grupo Aventis). Los resultados confirman la correcta expresión de las proteínas gp120-C y gagpolnef-C en todos los extractos obtenidos por la infección con virus procedentes de distintos países.

**Ejemplo 21.- Liberación de gp120-C y cinética de expresión a partir del MVA-C en el transcurso del tiempo**

Para definir si la proteína gp120-C era eficientemente secretada, monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con el virus recombinante MVA-C a 5 ufp/célula. A las 6, 18 y 24 horas post-infección las células se recogieron separando el precipitado (P) del sobrenadante (S) celular. Los sobrenadantes de cada tiempo analizado fueron concentrados y fraccionados junto a los precipitados celulares en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa, y sometidos a reacción frente al anticuerpo policlonal anti-gp120 específico para el aislamiento CN54 anteriormente utilizado en los Ejemplos 19 y 20. De igual forma fueron tratadas células CEF infectadas con el NYVAC-C (proporcionado por el grupo Aventis), usado como control positivo en el ensayo. Como control interno para verificar que había sido aplicado en el gel la misma cantidad de proteína, las membranas fueron incubadas también frente a un anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -actina. Los resultados se muestran en la Figura 27. En su parte superior, correspondiente a la muestra del MVA-C, puede apreciarse que la proteína gp120-C es expresada eficientemente por el MVA-C desde las 6 horas post-infección, detectándose en el sobrenadante celular a partir de las 18 horas post-infección, y con un comportamiento similar al que se observa en células infectadas con el NYVAC-C, para el cual se muestran los resultados obtenidos en la parte inferior de la Figura 27.

La expresión de la proteína de fusión gagpolnef-C fue analizada en el precipitado celular igualmente a las 6, 18 y 24 horas post-infección siguiendo un procedimiento análogo al utilizado para la proteína gp120-C, aunque utilizando en este caso el anticuerpo anti-p24 específico para el aislamiento CN54. Los resultados se muestran en la Figura 28. En ella puede observarse que esta proteína de fusión se expresa eficientemente a lo largo del tiempo de infección tanto desde MVA-C (calle 1 de cada tiempo de infección) como desde NYVAC-C (calle 2).

**Ejemplo 22.- Inmunogenicidad del MVA-C: Respuesta inmune específica de células T productoras de IFN- $\gamma$**

Una vez generado y caracterizado el recombinante MVA-C, el siguiente objetivo fue analizar su capacidad de inducir una respuesta inmune específica en el modelo murino frente a los antígenos que expresa. Para ello, ratones transgénicos HHDII (n=4) de 10 semanas de edad se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.) con una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-C o de NYVAC-C. 8 días después de la inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, y se les extrajo el bazo para llevar a cabo un ensayo de ELISPOT análogo al descrito en el Ejemplo 5, siguiendo la misma metodología descrita en dicho Ejemplo con la excepción de que, en este caso, para evaluar la respuesta inmune específica, se utilizaron diferentes grupos que contenían 40-50 péptidos solapantes de 15 aminoácidos cada uno, pertenecientes al clade C, que cubrían todas las regiones antigénicas incluidas en el recombinante MVA-C de la invención.

Los resultados, que se muestran en la Figura 29, demuestran que el MVA-C es capaz de potenciar una respuesta inmune específica frente a casi todos los grupos de péptidos ensayados, evidenciándose la mejor respuesta frente a los grupos de péptidos representativos de los genes de la envuelta (Env1 y Env2).

Adicionalmente, se evaluó también la respuesta generada contra las proteínas expresadas a partir de las partes del vector derivadas de las formas atenuadas de Vaccinia utilizadas para la construcción de los recombinantes, MVA y NYVAC. Para ello, los esplenocitos de los animales inmunizados se pusieron en contacto durante 48 horas con células RMAS-HDD previamente infectadas durante 5 horas con 5 ufp/célula de las cepas silvestres de MVA y NYVAC, MVA-WT y NYVAC-WT. El número de



células productoras de IFN- $\gamma$  obtenido frente a las células RMA5-HHDII sin infectar (control negativo) fue sustraído en todos los casos. Los resultados, que se muestran en la parte B de la Figura 29, demuestran que la respuesta anti-Vaccinia fue superior en el grupo de ratones inmunizados con NYVAC-C.

5

**- Ejemplo 23.- Inmunogenicidad del MVA-C: Producción de citoquinas por esplenocitos reestimulados**

Los esplenocitos aislados de los animales inmunizados con MVA-C y NYVAC-C aislados en el Ejemplo 22 fueron cultivados ( $5 \times 10^6$  células/pocillo) en una placa de 10 24 pocillos y estimulados con 1  $\mu\text{g/ml}$  de cada grupo de péptidos pertenecientes al clade C. La placa se incubó durante 5 días a 37°C en atmósfera del 5% CO<sub>2</sub>. Después de este período, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y se centrifugaron a 1.500 rpm, 5 min, a 4°C, almacenándose a -70°C hasta su utilización.

Para conocer los niveles de IL-10 e IFN- $\gamma$  presentes en los sobrenadantes de 15 cultivos de esplenocitos reestimulados *in vitro*, se procedió a la determinación de estos niveles mediante kits de ELISA comerciales de Pharmigen, siguiendo las instrucciones del fabricante de forma análoga a la descrita en el Ejemplo 6.

Los resultados, mostrados en la Figura 30, indican que MVA-C induce la secreción de las citoquinas IL-10 e IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de cultivo de los 20 esplenocitos reestimulados. Los niveles de IFN- $\gamma$  fueron significativamente superiores frente a los grupos de péptidos GPN2, Env-1 y Env-2, evidenciando una clara polarización de la respuesta celular antígeno-específica hacia un subtipo Th1.

**- Ejemplo 24.- Inmunogenicidad del MVA-C: Identificación de los tipos de 25 células T específicas productoras de IFN- $\gamma$**

Para dilucidar si la respuesta celular que se estaba obteniendo en ELISPOT era debida a la secreción de IFN- $\gamma$  por las células T CD8<sup>+</sup> o por las células T CD4<sup>+</sup>, los esplenocitos obtenidos en el Ejemplo 22 fueron reestimulados durante 1 hora con 5  $\mu\text{g/ml}$  de cada grupo de péptidos, tras lo cual se añadió Brefeldina a una concentración 30 de 10  $\mu\text{g/ml}$ , incubándose durante toda la noche. Posteriormente se procedió a un marcaje de superficie empleando anticuerpos específicos anti-CD4 o anti-CD8

- 76 -

conjugados a FITC, seguido de un marcaje intracelular empleando anti-IFN- $\gamma$  conjugado a PE. Una vez fijadas las células fueron analizadas en el citómetro de flujo.

Los resultados, mostrados en la Figura 31, permiten apreciar que, tanto para el grupo de animales inmunizado con el MVA-C, como para el grupo inmunizado con NYVAC-C, la respuesta productora de IFN- $\gamma$  es mayoritariamente debida a la población de células T CD8<sup>+</sup> específicas activadas frente a los diferentes grupos de péptidos. Al determinar los niveles totales de IFN- $\gamma$  secretados por ambos tipos de células, se corroboró el resultado obtenido en el ensayo de ELISPOT, donde se observaba una respuesta específica frente a la mayoría de los grupos de péptidos en los animales inmunizados con ambos recombinantes. De nuevo, existen diferencias claras entre las respuestas generadas por cada uno de los recombinantes.

#### **- Ejemplo 25.- Inmunogenicidad del MVA-C: Respuesta humoral generada**

Para evaluar la respuesta humoral generada por la inoculación de MVA-C y NYVAC-C, grupos de 4 ratones HHDII o C57BL/6 de 6-10 semanas de edad fueron inoculados por vía intraperitoneal (i.p.) con una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-C (stock P3) o de NYVAC-C (grupo Aventis, Francia). 14 días después, se extrajo sangre del plexo suborbital de los ratones inmunizados y, tras dejarlo toda la noche a 4 °C se centrifugó obteniéndose el suero. La cantidad total de anticuerpos IgG presentes en los sueros frente a la proteína Gag (2  $\mu$ g/ml), la proteína de la envuelta gp-160 (2  $\mu$ g/mL) o frente a extractos celulares de una infección con vaccinia fue determinada por ELISA, diluyendo para ello los sueros 1/500 para la detección de los anticuerpos frente a Vaccinia y 1/50 para la detección de los anticuerpos frente a la proteína Gag y frente a la proteína gp160.

Los resultados, que se muestran en la Figura 32, muestran un aumento de la respuesta humoral generada frente a la proteína de la envuelta en los ratones inmunizados con el vector recombinante MVA-C con respecto a los controles y los ratones inmunizados con NYVAC-C, siendo inferior la respuesta humoral generada frente a los antígenos del propio vector Vaccinia en los ratones inmunizados con MVA-C que en los ratones del mismo tipo inmunizados con NYVAC-C.

- 77 -

- **Ejemplo 26.- Utilización del MVA-C en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores de ADN y vectores virales derivados de Vaccinia: Respuesta inmune específica de células T productoras de IFN- $\gamma$  generada en ratones humanizados HHDII**

5 Grupos de 4 ratones HHDII de 6-10 semanas de edad se inocularon por vía intramuscular (i.m.) con 100  $\mu$ g del vector de ADN DNA-C (cedido por GeneArt, Alemania), formado por dos plásmidos recombinantes derivados de pcDNA que contienen cada uno de ellos una de las secuencias codificantes de proteínas del VIH-1 (gp120-C y gagpolnef-C) que lleva insertadas el MVA-C, bajo el control de sendos  
10 promotores de citomegalovirus. El grupo control fue inoculado (i.m.) con 100  $\mu$ g de ADN sin inserto (DNA  $\emptyset$ ). 15 días después se les inmunizó por vía intraperitoneal (i.p.) con  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-C (stock P3) o de NYVAC-C (grupo Aventis, Francia), que expresa los mismos antígenos de VIH que MVA-C. El grupo control recibió una  
15 inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, mezclas de esplenocitos de los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade C (5  $\mu$ g/ml) que comprenden todas las regiones antigénicas  
20 incluidas en los virus recombinantes MVA-C y NYVAC-C. El número de células productoras de IFN- $\gamma$  obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos.

Los resultados se muestran en la Figura 33. Se observa que la inmunización combinada de vectores genera una respuesta inmune amplia, con producción de IFN- $\gamma$   
25 frente a distintos antígenos del VIH, con diferencias significativas entre los vectores. La combinación DNA-C+NYVAC-C produjo inmunodominancia frente a Env.

- **Ejemplo 27.- Utilización del MVA-C en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores de ADN y vectores virales derivados de Vaccinia: Respuesta inmune específica de células T productoras de IL-2 generada en ratones humanizados HHDII**

- 78 -

Grupos de 4 ratones HHDII de 6-10 semanas de edad se inocularon por vía intramuscular (i.m.) con 100 µg del vector de ADN DNA-C (cedido por GeneArt, Alemania) utilizado en el Ejemplo 26. El grupo control fue inoculado (i.m.) con 100 µg de ADN sin inserto (DNA Ø). 15 días después se les inmunizó por vía intraperitoneal (i.p.) con  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de MVA-C (stock P3) o de NYVAC-C (grupo Aventis, Francia), que expresa los mismos antígenos de VIH que MVA-C. El grupo control recibió una dosis de  $2 \times 10^7$  ufp/ratón de NYVAC-WT. 10 días después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, mezclas de esplenocitos de los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con las mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade C (5 µg/ml), que comprenden todas las regiones antigénicas incluidas en los virus recombinantes MVA-C y NYVAC-C, utilizadas en los Ejemplos anteriores referentes al MVA-C. El número de células productoras de IL-2 obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 34. Se observa que la inmunización combinada de vectores genera una respuesta inmune amplia, con producción de IL-2 frente a los distintos antígenos del VIH, con diferencias significativas entre los vectores. La combinación DNA-C +NYVAC-C produjo inmunodominancia frente a Env.

**Ejemplo 28.- Utilización del MVA-C en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores derivados de Vaccinia: Respuesta inmune específica de células T productoras de IFN-γ en ratones BALB/c**

Habiendo establecido que la administración de una primera dosis de inmunización que contenía el MVA-C era capaz de inducir una respuesta inmune específica en el modelo murino, se evaluó a continuación si la utilización de este vector de la invención como parte de un protocolo de inducción/potenciación, con diferentes combinaciones de MVA-C y NYVAC-C, daba lugar a un incremento en la magnitud y la amplitud de la respuesta inmune. Por ello, se suministró una primera dosis de inmunización a 4 grupos de ratones BALB/c (n=4) de 6-8 semanas de edad que contenía

- 79 -

2 x 10<sup>7</sup> ufp/ratón de MVA-C (P3), NYVAC-C (grupo Aventis), MVA-WT o NYVAC-WT por la ruta intraperitoneal. 15 días después los ratones recibieron una segunda dosis por vía intraperitoneal (i.p.) de 2 x 10<sup>7</sup> ufp/ratón, de manera que a uno de los grupos que había recibido MVA-B en la primera dosis se le inoculó NYVAC-C y a otro de nuevo MVA-C, a uno de los grupos que habían recibido NYVAC-C en la primera dosis se le inoculó NYVAC-C de nuevo y a otro MVA-B y, el grupo control que había recibido MVA-WT recibió en la segunda dosis NYVAC-C y el grupo control que había recibido NYVAC-WT recibió en la segunda dosis MVA-WT (grupo Aventis). Se generaron así grupos que habían sido inoculados con las siguientes combinaciones de vectores: MVA-C+NYVAC-C, NYVAC-C+MVA-C, MVA-C+MVA-C, NYVAC-C+NYVAC-C, NYVAC-WT+MVA-WT y MVA-WT+NYVAC-WT.

10 días después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo fue extraído para llevar a cabo el ensayo de ELISPOT. Para detectar la respuesta inmune específica, grupos de mezcla de esplenocitos de los animales inmunizados en cada grupo se pusieron en contacto durante 48 horas con diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade C (5 µg/ml) que comprenden todas las regiones antigénicas incluidas en los virus recombinantes MVA-C y NYVAC-C. El número de células productoras de IFN-γ obtenido frente a una mezcla de péptidos antigénicos no relacionados (control negativo) fue sustraído en todos los casos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 35. De ellos se deduce que las diferentes combinaciones de vectores derivados de poxvirus (MVA-C+NYVAC-C, MVA-C+MVA-C, NYVAC-C+MVA-C, NYVAC-C+NYVAC-C, NYVAC-WT+MVA-WT, MVA-WT+NYVAC-WT) incrementan tanto la magnitud como la amplitud de la respuesta inmune específica generada, según se observa con los diferentes grupos de péptidos. Los grupos de péptidos mejor reconocidos fueron los correspondientes a Env1, GPN1 y GPN2, seguidos de GPN3 y Gag1.

Las combinaciones de MVA-C y NYVAC-C dieron lugar a mayores respuestas que la administración de dos dosis de virus homólogos, MVA-C+MVA-C o NYVAC-C+NYVAC-C. El grupo de ratones al que se le administró en la primera dosis NYVAC-C y en la dosis de potenciación MVA-C fue el que mostró el número más elevado de células secretoras de IFN-γ frente a los diferentes grupos de péptidos.

- **Ejemplo 29.- Utilización del MVA-C en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores derivados de Vaccinia: Producción de citoquinas por esplenocitos reestimulados procedentes de ratones BALB/c**

5 Seis grupos de ratones BALB/c (n=4) fueron inoculados en régimen combinado de inducción de la respuesta inmune mediante la administración de una primera dosis de vector y la potenciación de la misma mediante la inoculación de un segundo vector en una segunda dosis, de manera análoga a la descrita en el Ejemplo 28 y utilizando las mismas combinaciones de vectores. Los esplenocitos extraídos fueron estimulados *in*  
10 *vitro* con las diferentes mezclas de péptidos solapantes pertenecientes al clade C (1 µg/ml) e incubados durante 5 días a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -70°C. Los niveles de IFN-γ e IL-10 se determinaron por ELISA usando kits comerciales (Pharmigen).

Los resultados se muestran en la Figura 36. Se observa que la combinación de  
15 vectores virales induce una respuesta celular tipo Th2, con polarización hacia los antígenos Env y gp1.

- **Ejemplo 30.- Utilización del MVA-C en protocolos de inducción/potenciación que combinan vectores derivados de Vaccinia: Identificación de los tipos de células T específicas secretoras de IFN-γ generadas en ratones BALB/c**

20 Cinco grupos de ratones BALB/c (n=4) fueron inoculados en régimen combinado de inducción de la respuesta inmune mediante la administración de una primera dosis de vector y la potenciación de la misma mediante la inoculación de un  
25 segundo vector en una segunda dosis, de manera análoga a la descrita en el Ejemplo 28 y utilizando las mismas combinaciones de vectores salvo en el caso de los controles, en el que se prescindió de inocular la combinación MVA-WT+NYVAC-WT en este orden. Los esplenocitos extraídos fueron reestimulados *in vitro* durante 1 hora a 37°C con 5  
30 µg/ml de cada grupo de péptidos solapantes pertenecientes al clade C, tras lo cual se añadió Brefeldina a una concentración de 10 µg/ml, incubándose durante toda la noche a 37°C. Siete días después se procedió a un marcaje de superficie empleando anticuerpos específicos anti-CD4 o anti-CD8 conjugados a FITC, seguido de un marcaje

intracelular empleando anti-IFN- $\gamma$  conjugado a PE. Una vez fijadas las células fueron analizadas en el citómetro de flujo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 37. Se observa que la combinación de vectores virales induce un menor aumento de células CD8<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  que de células CD4<sup>+</sup>, con la combinación NYVAC-C+MVA-C induciendo el mayor incremento frente a los péptidos de Gag1, Env1, Gpn1 y Gpn2.

**- Ejemplo 31.- Perfil diferencial de cambios en los niveles de expresión de genes humanos inducidos durante la infección con los vectores MVA y NYVAC**

Para evaluar si las diferencias en las respuestas inmunes inducidas por la inoculación de vectores recombinantes derivados de MVA y NYVAC iban acompañadas también de perfiles diferentes de inducción de variaciones en los niveles de expresión de genes en las células infectadas, se realizó un experimento de infección de células HeLa con MVA y NYVAC y se evaluaron los cambios experimentados en los niveles de expresión de 15000 genes humanos utilizando microarrays con ADNc humano.

Para ello, se generaron microarrays de ADNc tal como se ha descrito previamente (20), utilizando la genoteca de ADNc humano 40K de Research Genetics (<http://www.resgen.com/products/SVHcDNA.php3>), que contenían 15.360 secuencias de ADNc, (de las cuales 13295 corresponden a genes conocidos y 2.257 corresponden a genes de control), utilizando portaobjetos CMT-GAPS II (Corning) sobre los que se fijaron las secuencias de ADNc mediante el Microgrid II (BioRobotics) a 22°C y una humedad relativa de 40-45%. Por otro lado, se cultivaron células HeLa (de la American Type Culture Collection) en placas de 10 cm de diámetro, en medio de Dulbecco al que le había añadido suero bovino de recién nacido al 10% y antibióticos y se llevaron a cabo infecciones con el MVA-WT y el NYVAC-WT a una multiplicidad de infección de 5 ufp/célula. El ARN total se aisló de las células infectadas utilizando Ultraespect-II RNA (Biotecx), siguiendo las instrucciones del fabricante, a partir de muestras tomadas por duplicado de las células infectadas con cada uno de los virus transcurridas 2, 6 y 16 horas del momento de la infección. Cada muestra de ARN se utilizó en dos hibridaciones diferentes: en una hibridación, la muestra infectada con MVA-WT se marcó con dUTP-Cy3 y la muestra infectada con NYVAC-WT se marcó con dUTP-

Cy5, mientras que en la otra la muestra infectada con MVA-WT se marcó con dUTP-Cy5 y la muestra infectada con NYVAC-WT se marcó con dUTP-Cy3. El doble marcaje se utilizó para suprimir diferencias en el marcaje y la hibridación debidas a características específicas del Cy-dUTP. Una mezcla que contenía 40 µg de ARN, 150 pmoles de oligo(dT)<sub>20</sub>, dATP 0,5 mM, dGTP 0,5 mM, dCTP 0,5 mM, dTTP 0,1 mM dUTP Cy3/Cy5 0,05 mM (Amersham), tampón de reacción para la primera hebra 1X (Invitrogen) y ditiotreititol 10 mM en un volumen de 38 µl se calentó (65°C, 5 min) y se preincubó (42°C, 5 min), tras lo cual se añadieron 400 U de SuperScript II (Invitrogen) y 40 U de inhibidor de RNasa (Roche) y se incubó la mezcla a 42°C durante 2,5 horas.

10 La reacción se terminó añadiendo EDTA y el molde de ARN de partida se retiró añadiendo 2 µl de NaOH 10 N, seguido de incubación (20 min, 65°C). La reacción se neutralizó añadiendo 4 µl de ácido acético 5 M. Se mezclaron las sondas de Cy5 y Cy3 y los colorantes no incorporados se retiraron mediante precipitación con isopropanol. Las sondas se resuspendieron en agua desionizada; los agentes bloqueantes añadidos

15 para incrementar la especificidad fueron poli(A) (20 µg, Sigma), ARNt (20 µg, Sigma) y ADN humano Cot-1 (20 µg, Invitrogen). Mientras las sondas se secaban en una Speed-Vac, los microarrays se prehibridaron con una mezcla que contenía SSC 6x (SSC 1X está formado por NaCl 0,15 M y citrato sódico 0,015 M), dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,5% y albúmina de suero bovino al 1% (42°C, 1 hora), se lavaron cinco veces

20 con agua, y se secaron mediante centrifugación (563 x g, 1 min). Las sondas se resuspendieron en 40 µl de tampón de hibridación (formamida al 50%, SSC 6x, SDS al 0,5%, solución de Denhardt 5x) y se incubaron con los portaobjetos que contenían los microarrays (42°C, 16 horas) en cámaras de hibridación (Array-It) en un baño de agua en la oscuridad. Después de la incubación, los portaobjetos se lavaron dos veces en SSC

25 0,1X-SDS 0,1% durante 5 minutos cada vez y tres veces en SSC 0,1x durante 5 minutos cada vez. Finalmente, los portaobjetos se secaron mediante centrifugación como se describió anteriormente y se escanearon en un ScanArray 4000 (Packard Biosciences) utilizando el software ScanArray 3.1. A partir de las imágenes de Cy5 y Cy3 se obtuvieron datos preliminares utilizando el software QuantArray 3.0 (Packard

30 Biosciences), que se procesaron utilizando el software SOLAR (BioALMA, Madrid, España. La señal de fondo se resta de la señal, se representa  $\log_{10}(\text{señal})$  frente  $\log_2(\text{relación})$  y se realiza una normalización mínima. Este valor se calcula para las



cuatro réplicas y se obtiene una tabla con la señal media, el factor de cambio, log (relación), la desviación estándar del logaritmo de la relación y el valor z (una medida de la proximidad de un valor [log relación] a otros valores con señales similares) (21). Una vez obtenidos estos datos, el juego de datos se redujo eliminando los genes con una  
5 desviación estándar entre las réplicas  $>1$  y aquellos que mostraban valores de  $z \leq 2$ , después de lo se reprocesaron los datos, se agrupó los genes utilizando el mapa clásico de autoorganización de Kohonen (22,23,24) y se analizó el mapa resultante utilizando el software Engene, disponible en <http://www.engene.cnb.uam.es>.

Las diferencias más representativas detectadas en las células infectadas con uno  
10 y otro virus se resumen en la Tabla 7, en la que se indican el factor de aumento de la expresión de varios genes representativos observado transcurridos distintos intervalos de tiempo (horas post-infección: h.p.i.) tras el momento de la infección. En ella puede observarse que el perfil de inducción de variaciones en los niveles de expresión de genes en las células infectadas es diferente según el virus utilizado para la infección. Por  
15 ejemplo, el incremento por MVA y no por NYVAC de genes coestimuladores de la respuesta inmune, como IL-7, proteína B7, NFATC3 y MAP2K5, puede condicionar el menor grado de respuesta inmune de un vector frente al otro.

Tabla 7.-Perfiles de expresión de genes representativos modificados por la infección de células humanas HeLa con cepas de MVA y NYVAC

Función y nombre del gen	Símbolo gen	Factor de cambio con MVA			Factor de cambio con NYVAC		
		2 hpi	6 hpi	16 hpi	2 hpi	6 hpi	16 hpi
<b>Genes incrementados con MVA y NYVAC</b>							
Respuesta de crecimiento temprano 1	EGR1	4,17	4,60	1,94	4,74	10,38	6,83
Factor nuclear similar al factor 2 derivado de células eritroides 3	NFE2L3	2,36	2,36	2,52	1,19	2,13	1,32
Factor nuclear del polipéptido ligero kappa 2	NFKB2	2,03	2,22	2,34	1,53	2,02	1,79
Interleuquina 6	IL6	2,65	2,14	1,56	2,02	5,85	2,68
Proteína estimulada por el interferón, 15 kDa	ISG15	2,57	2,25	1,61	1,21	1,14	3,39
Antígeno CD80	CD80	1,75	2,58	2,06	1,25	2,02	2,7
Fosfatasa de especificidad dual 5	DUSP5	3,01	2,91	1,87	1,98	4,16	2,18
Protooncogén JUN B	JUNB	2,93	3,92	1,06	2,16	2,14	1,32
Homólogo del oncogén V-jun del virus del sarcoma de aves 17	JUN	2,17	2,02	1,31	2,14	13,75	8,01
Homólogo del oncogén V-MYC del virus de mielocitomatosis de aves	MYC	2,22	1,53	1,05	1,05	2,93	1,65
Miembro de la familia de la quinesina 5A	KIF5A	2,05	1,88	1,73	1,89	5,45	4,64
<b>Genes incrementados con MVA</b>							
Interleuquina 7	IL7	6,10	5,3	3,2	0,80	0,55	0,88
Proteína B7	B7	1,97	1,75	3,53	1,58	1,58	1,78
Antígeno CD47	CD47	5,35	4,08	3,16	1,02	0,76	1,03
Proteína quinasa activada por mitógenos 5	MAP2K5	2,37	2,74	1,69	1,02	0,76	1,03
Factor nuclear del polipéptido ligero kappa epsilon	NFKBIE	2,41	1,61	1,12	1,18	1,27	1,42
Factor nuclear citoplásmico de células T activadas	NFATC3	3,46	2,97	1,30	1,01	1,34	1,34
<b>Genes incrementados con NYVAC</b>							
Factor activador de la transcripción 3	ATF3	1,78	1,98	0,99	2,42	8,36	6,10
Caspasa 9, proteasa de cisteína relacionada con la apoptosis	CASP9	1,1	0,82	0,32	2,59	2,37	1,98
Fosfatasa de especificidad dual 2	DUSP2	3,93	3,59	1,85	2,43	5,25	1,56
Nucleoporina de 88kD	NUP88	0,87	0,93	0,92	3,52	6,49	4,23
Factor de crecimiento de tejido conectivo	CTGF	5,77	4,51	1,12	4,24	11,45	5,14
Dominio similar a los de homología con pleckstrina, familia A, miembro 1	PHLDA1	1,01	0,95	0,99	4,19	8,24	5,28

**- Ejemplo 32.- Perfil diferencial de cambios en los niveles de inducción de apoptosis inducidos durante la infección de células en cultivo por los vectores MVA y NYVAC**

Para evaluar si las diferencias observadas en la respuesta inmune inducida por la inoculación de vectores derivados de MVA y NYVAC iban acompañadas de variaciones en los niveles de inducción de muerte celular por apoptosis, se llevaron a cabo distintos experimentos para evaluar el grado de apoptosis, evaluando distintos parámetros indicativos del mismo.

Una de las características de la apoptosis es la rotura específica por proteasas de la proteína PARP. Para evaluarla, se procedió a la infección de células HeLa con 5 ufp/célula de MVA o NYVAC y se recogieron a 4, 8 y 16 horas postinfección en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 0,5 M, NP-40 10%, SDS 1%). Se separaron cantidades iguales de lisados de proteínas (10 µg) mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con un anticuerpo anti-PARP humano (1:500 dilución) de Cell Signalling, obteniéndose los resultados que se muestran en la parte superior de la Figura 38a, en la que se indica la posición de la banda correspondiente a la proteína PARP completa (PARPc) y la correspondiente a un fragmento de la proteína PARP escindido de la proteína completa (PARPf). Como control interno para verificar que había sido aplicado en el gel la misma cantidad de proteína, las membranas fueron incubadas también frente a un anticuerpo monoclonal anti-β-actina (SIGMA), obteniéndose la señal que se muestra en la parte inferior de dicha Figura.

Los resultados muestran que la infección de células HeLa con NYVAC induce con el tiempo de infección la degradación de PARP. Esta degradación es mucho menor en células infectadas con MVA.

La inducción de apoptosis por NYVAC también se confirmó mediante pruebas de inmunofluorescencia de células HeLa infectadas con 5 ufp/célula cuyos núcleos fueron teñidos a las 24 horas postinfección con DAPI durante 30 min a temperatura ambiente y las células fotografiadas. Los resultados se muestran en la Figura 38b, en cuya parte inferior, correspondiente a células HeLa infectadas con NYVAC, se observa que NYVAC favorece condensación de la cromatina y formación de cuerpos

apoptóticos, algo que no se observa en la infección con MVA (parte superior de la Figura).

Otro indicador de apoptosis es la activación de la enzima RNasa L, que favorece la ruptura del ARN ribosómico. Para evaluar esta activación, se aisló el total de ARN usando el sistema de purificación por resina de ARN Ultraspec-II (Bioteck), a partir de muestras de células HeLa infectadas con 5 ufp/célula obtenidas transcurridas 18 ó 24 de la infección con la cepa Western Reserve (WR) de Vaccinia, con MVA o con NYVAC, añadiendo un control en el que se simuló la infección. Se sometieron los ARNs (2 microgramos) a electroforesis en geles de agarosa-formaldehído al 1% que contenían bromuro de etidio y se fotografió bajo luz ultravioleta el patrón de bandas obtenido. Los resultados, mostrados en la Figura 38c muestran que la infección de células HeLa con NYVAC induce a las 18 horas degradación del ARN ribosómico en fragmentos característicos de la activación de la enzima RNasa L, lo que no se observa en la infección con MVA.

Finalmente, otro indicador de apoptosis es la cuantificación del número de células apoptóticas por citometría de flujo. Este ensayo se realizó de nuevo en células HeLa infectadas (5 ufp/célula) con Vaccinia WR, MVA y NYVAC, así como en controles en los que se simuló la infección. Los diferentes estadios del ciclo celular y el porcentaje de células en la fase subGo fueron analizadas por tinción con yoduro de propidio (IP). Para cada uno de ellos se realizó el ensayo en muestras que habían sido incubadas en ausencia o en presencia del inhibidor general de caspasas zVAD (4 micromolar, Calbiochem). A las 24 horas se recogieron las células, se lavaron con PBS frío, se permeabilizaron con etanol al 70% en PBS a 4°C durante 30 min. Después de tres lavados con PBS, las células se incubaron durante 45 min a 37°C con RNasa A y se tiñeron con IP (10 microgramos/ml). El porcentaje de células que presentaban DNA hipodiploide se determinó por citometría de flujo. Los datos fueron adquiridos en 15000 células por muestra y los resultados se representan como veces de incremento en células apoptóticas respecto a las células sin infectar. El gráfico de la Figura 38d muestra el factor de incremento de células apoptóticas observado en cada uno de los casos. En él puede observarse que la infección con NYVAC provoca apoptosis en una gran parte de la población celular (más del 40%) y que este fenómeno se previene con la adición del

inhibidor general de caspasas zVAD. La inducción de apoptosis por MVA fue mucho más reducida.

Los resultados de estos ensayos demuestran que NYVAC induce apoptosis durante la infección, mientras que MVA no parece activar apoptosis o da muestras de activar en menor medida.

Estas diferencias bioquímicas, junto a las diferencias genéticas definidas en el Ejemplo 31, indican que es de esperar que los vectores recombinantes generados a partir de MVA y NYVAC, a pesar de contener las mismas secuencias codificantes del VIH-1 bajo el control de promotores idénticos, den lugar a comportamientos diferentes al ser inoculados en seres humanos con la intención de provocar una respuesta inmune contra el VIH. Los vectores recombinantes derivados de MVA, por tanto, representan una interesante alternativa para sustituir o complementar de forma ventajosa a los vectores recombinantes derivados de NYVAC en protocolos de inmunización frente al VIH-1.

15

*Construcción y ensayos realizados con los vectores diseñados para uso en macacos*

**- Ejemplo 33.- Generación del MVA-89.6P-SIVgpn**

Construcción del vector plasmídico pLZAW1-89.6p-SIVgpn-18

El vector plasmídico de transferencia pLZAW1-89.6p-SIVgpn-18 fue construido por los inventores para la generación de los virus recombinantes derivados de MVA y de NYVAC que expresan la parte correspondiente a la proteína gp120 del gen Env del SHIV 89.6P (89.6Psynenv120, a la que en lo sucesivo se aludirá de forma abreviada como 89.6P-gp120) y la quimera de los genes Gag, Pol y Nef del mismo virus (SIVmac239-gagpolnef, a la que en lo sucesivo se aludirá de forma abreviada como SIVgpn), esta última a partir de una secuencia de nucleótidos obtenida a partir de las secuencias de los genes Gag, Pol y Nef del virus SHIV89.6P en las que se habían practicado las mismas modificaciones que se realizaron para obtener las quimeras de los genes Gag, Pol y Nef presentes en los vectores MVA-B y MVA-C.

El plásmido pLZAW1-89.6p-SIVgpn-18 es un derivativo de pUC diseñado para la selección de placas azules/blancas y la generación, como medida de seguridad, de un vector viral carente del marcador  $\beta$ -Gal, al igual que se hizo en el caso de los vectores MVA-B y MVA-C, como medida de seguridad. Contiene las secuencias flanqueantes

30

derecha (TK-R) e izquierda (TK-L) del gen de la timidina quinasa (TK) del MVA, una repetición corta de la secuencia flanqueante izquierda (“brazo izquierdo”) del gen TK, el promotor E3L dirigiendo la expresión del marcador de selección  $\beta$ -galactosidasa, y el gen de resistencia a ampicilina (AP). Entre las dos secuencias flanqueantes se encuentran las dos secuencias que se desea expresar, 89.6P-gp120 (SEQ ID NO: 22) y SIVgpn (SEQ ID NO: 23), que han sido modificadas para optimizar el uso de codones de mamífero. Para dirigir la expresión de cada una de las secuencias hay sendos promotores sintéticos temprano/tardío (pE/L), situados en orientación opuesta en la zona del inserto más alejada de las secuencias flanqueantes. La posición de cada uno de los componentes incluidos en el plásmido se describe a continuación en la Tabla 8.

**Tabla 8.- Posición de los componentes del plásmido pLZAW1gp120B/gagpolnefB-1**

Secuencia flanqueante izquierda de TK	410-908	Complementaria
T5NT para $\beta$ -gal	929-935	Complementaria
$\beta$ -gal	ATG-TAA (936-4079)	Complementaria
Promotor E3L para $\beta$ -gal	4080-4140	Complementaria
Parte 1 de la secuencia flanqueante izquierda de TK	4151-4498	Complementaria
89.6p-gp120	ATG-TAA (4518-6032)	Complementaria
Promotor E/L para 89.6P-gp120	6080-6118	Complementaria
Promotor E/L para SIVgpn	6143-6181	
SIVgpn	ATG-TAG (6226-10443)	
T5NT para SIVgpn	10499-10505	
Secuencia flanqueante derecha de TK	10488-11179	Complementaria
AP	ATG-TAA (12350-13210)	Complementaria

Para la construcción de este plásmido se utilizaron otros dos plásmidos diferentes:

- 15 - pcDNA89.6P-syn-CD5-GP120REKR: (proporcionado por Ralf Wagner, Regensburg, Alemania).
- pCR-ScriptSIV-syn-gagpolnef: (proporcionado por Ralf Wagner, Regensburg, Alemania).
- pLZAW1: El plásmido fue proporcionado por Linong Zhang, del grupo  
20 Aventis, Canadá. Es un plásmido basado en pUC que contiene un brazo izquierdo del

gen de TK, sitios de clonación para insertar genes exógenos, una repetición corta del brazo izquierdo del gen de TK, un promotor E3L dirigiendo la expresión de un casete con  $\beta$ -gal y un brazo derecho del gen de TK.

5 - pJR101: El plásmido fue generado por los inventores. Es un derivado de pUC que contiene las secuencias flanqueantes derecha e izquierda del *locus* HA del virus MVA, sitios de clonación para insertar genes exógenos bajo el control de la transcripción del promotor sintético temprano/tardío (E/L), y el promotor 7.5 del virus MVA (P7.5) dirigiendo la expresión del gen  $\beta$ -gus.

10 La construcción del plásmido pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18 a partir de estos otros dos plásmidos se representa en las Figuras 41a y 41b. Brevemente, un fragmento de ADN de 1,518 Kb que contenía el gen 89.6P-gp120 (indicado en la figura como 89.6synenv120) se escindió del plásmido pcDNA89.6P-syn-CD5-GP120REKR mediante digestión con EcoRI, tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa para generar extremos romos, y digestión con BamHI. El fragmento de  
15 ADN se subclonó en el vector pJR101 (previamente digerido con las endonucleasas de restricción SmaI y BamHI), generando el plásmido pJR-89.6P-18 (7918 pb). Un fragmento de ADN de 1,612 kb que contenía el promotor sintético temprano/tardío (E/L) dirigiendo al gen 89.6-gp120 se escindió del plásmido pJR-89.6P-18 mediante digestión con HindIII y BamHI, seguida de la modificación con el fragmento Klenow  
20 de la ADN polimerasa, y se clonó en el vector pLZAW1 (previamente digerido con la endonucleasa de restricción AscI, modificado mediante la incubación con el fragmento Klenow, y desfosforilado mediante incubación con la fosfatasa alcalina intestinal de ternera (CIP)), generando el vector plasmídico pLZAW1-89.6P-9 (9131 pb) (Figura 41a).

25 Por otra parte, un fragmento de ADN de 4,230 kb que contenía el gen SIVgpn (indicado en las Figuras como SIVsyngagpolnef) se escindió del plásmido pCR-Script SIV-syn-gagpolnef mediante digestión con EcoRI y XhoI seguida de la modificación con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa, y se subclonó en el vector pJR101 (previamente digerido con la endonucleasa de restricción SmaI y desfosforilado  
30 mediante incubación con la fosfatasa alcalina intestinal de ternera (CIP)), generando el plásmido pJR-SIVgpn-9 (10630 pb). Un fragmento de ADN de 4,3 kb que contenía el promotor sintético temprano/tardío (E/L) dirigiendo al gen SIVgpn se escindió del

plásmido pJR-SIVgpn-9 mediante digestión con HindIII, tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y digestión con NotI, y se clonó en el vector pLZAW1-89.6P-9 (previamente digerido con las endonucleasas de restricción SwaI y NotI, generando el vector plasmídico de transferencia pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18 (13399 pb)  
5 (Figura 41b).

El plásmido pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18 generado dirige la inserción de los genes de interés en el locus TK del genoma de MVA y NYVAC. Después de que los virus recombinantes deseados fueron aislados mediante la evaluación de la expresión de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, la propagación posterior de los virus recombinantes  
10 conduce a la autodelección del gen  $\beta$ -gal mediante recombinación homóloga entre el brazo izquierdo de TK y la repetición corta del brazo izquierdo de TK que están flanqueando el marcador.

#### Construcción del virus recombinante MVA-89.6P-SIVgpn

15 Cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) procedentes de huevos SPF (libres de patógenos específicos, por sus siglas en inglés "Specific Pathogen Free") fueron infectados con un virus atenuado MVA en pase 586 (habiendo sido el MVA-F6 del pase anterior, 585, proporcionado por Gerd Sutter) a una multiplicidad de 0,05 ufp/célula, y posteriormente transfectados con 10  $\mu$ g del vector plasmídico de  
20 transferencia pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18, usando para ello el reactivo de transfección lipofectamina (Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000, Cat. 18324-012, lote 1198865, suministrada por Invitrogen S.A., El Prat de Llobregat, Barcelona, España) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 72 horas post-infección las células fueron recogidas, sonicadas y usadas para la selección de los virus recombinantes.

25 Los virus MVA recombinantes que contenían los genes 89.6P-gp120/SIVgpn y que coexpresaban de forma transitoria el gen marcador  $\beta$ -Gal (MVA-SHIV (X-Gal<sup>+</sup>)), fueron seleccionados realizando pases consecutivos de purificación de placas en células CEF teñidas con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactósido (XGal) (300  $\mu$ g/ml). Los virus MVA recombinantes que contenían los genes 89.6P-gp120/SIVgpn y que habían  
30 perdido el gen marcador (MVA-SHIV (X-Gal<sup>-</sup>)), fueron seleccionados como focos virales no teñidos en células CEF en presencia de XGal. En cada paso de purificación



las placas aisladas fueron expandidas en células CEF durante 3 días, y el extracto viral crudo obtenido fue usado para el siguiente paso de purificación de placas.

En el primer paso de la selección por cribado se aislaron 3 placas X-Gal<sup>+</sup> a las que se denominó MVA-89.6P-SIVgpn-(1 a 3). La placa denominada MVA-89.6P-SIVgpn-1, que expresaba de forma eficiente los antígenos 89.6P-gp120 y SIVgpn, se amplió y utilizó para el siguiente paso de purificación. En el segundo pase, se aislaron 22 placas X-Gal<sup>+</sup>, todas las cuales expresaban de forma eficiente ambas proteínas. Se amplificaron tres placas, denominadas MVA-89.6P-SIVgpn-1.4, MVA-89.6P-SIVgpn-1.6 y MVA-89.6P-SIVgpn-1.18, que se utilizaron para el siguiente paso de purificación. En el tercer pase, se aislaron 20 placas X-Gal<sup>+</sup> y 4 placas X-Gal<sup>-</sup>, todas las cuales expresaban de forma eficiente ambos antígenos. Una de las placas X-Gal<sup>-</sup> (MVA-89.6P-SIVgpn-1.6.8) y una de las placas X-Gal<sup>+</sup> (MVA-89.6P-SIVgpn-1.18.2) se amplificaron y utilizaron en el siguiente paso de purificación; la primera de ellas, MVA-89.6P-SIVgpn-1.6.8, se utilizó para preparar el stock P1 por infección a partir de una placa p150 en células CEF). En el cuarto pase se aislaron 6 placas X-Gal<sup>-</sup> y 6 placas X-Gal<sup>+</sup>. El recombinante denominado MVA-89.6P-SIVgpn-1.6.8.5 (X-Gal<sup>-</sup>) se utilizó para preparar los stocks P2 por infección a una multiplicidad de 0,01 ufp/célula de cinco placas p150. Los stocks P3 (generados en células CEF infectadas en 40-100 placas p150 a una multiplicidad de infección de 0,05 ufp/célula, recogidos transcurridos 3-4 días después de la infección y purificados a través de dos colchones de sacarosa al 45%) se prepararon solamente a partir del MVA-89.6P-SIVgpn-1.6.8.5 (X-Gal<sup>-</sup>) para los estudios de inmunización en simios; las características de los diferentes stocks P3 obtenidos se especifican más adelante en el Ejemplo 38.

#### 25 Caracterización del MVA-89.6P-SIVgpn

Para confirmar la homogeneidad genética del virus MVA-89.6P-SIVgpn-1.6.8.5 (X-Gal<sup>-</sup>) generado y la integridad de los genes insertados, se amplificaron los stocks P2 (MVA-89.6P-SIVgpn-1.6.8.5) y P3 mediante infección de células CEF a una multiplicidad de infección de 5 ufp/célula, recuperando los extractos celulares a las 24 horas post-infección. Se purificó el ADN del virus y se sometió a análisis mediante PCR empleando para ello oligonucleótidos cebadores que hibridan con las regiones TK

flanqueantes del inserto de interés izquierda (oligonucleótido TK-L) o derecha (oligonucleótido TK-R2), con las siguientes secuencias:

TK-L: 5' TGATTAGTTTGATGCGATTC 3' (SEQ ID NO:1)

TK-R2: 5' CTGCCGTATCAAGGACA 3' (SEQ ID NO:21)

5 Las posiciones en las que hibridan dichos oligonucleótidos con respecto al inserto presente en MVA-89.6P-SIVgpn, así como los tamaños estimados de los fragmentos generados en las PCR que utilizan como molde el ADN de dicho virus y el ADN correspondiente al virus MVA de tipo silvestre (WT), carente de inserto, aparecen representados en la parte superior de la Figura 42.

10 La parte inferior de la Figura 42, por su parte, muestra una fotografía de un gel correspondiente al análisis de productos de PCR situados entre los brazos izquierdo (TK-L) y derecho (TK-R) del locus TK en los virus MVA-SHIV de los stocks P2 (MVA-89.6P-SIVgpn (P2)) y P3 (MVA-89.6P-SIVgpn (P3)), el virus MVA tipo silvestre (MVA-WT) y el plásmido de transferencia pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18. Para  
15 su obtención, 100 ng del ADN viral extraído de células CEF infectadas a una multiplicidad de 5 ufp/célula con los virus MVA-WT (calle 3), MVA-89.6P-SIVgpn (P2) (calle 4) o MVA-89.6P-SIVgpn (P3) (calle 5) o 10 ng del plásmido pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18 fueron usados como molde para hacer un análisis por PCR de la  
20 secuencia ubicada entre ambos brazos del locus TK empleando como cebadores 100 ng de los oligonucleótidos que hibridan con las secuencias flanqueantes del gen TK, TK-L (SEQ ID NO:1) y TK-R2 (SEQ ID NO:21) en una mezcla de reacción que contenía 0,3 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 2,5 U de la enzima polimerasa Platinum Taq. El programa incluye un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 min, 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 60°C durante 1 min y extensión a  
25 68°C durante 2 min, y finalmente un ciclo de extensión a 68°C durante 10 min. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 0,7%, obteniéndose el resultado que se muestra en la parte inferior de la Fig. 3. En las calles 4 y 5, las correspondientes a los dos stocks de vector MVA-SHIV, se observa una banda situada ligeramente por encima de la banda de 6 Kb del marcador (calle 1), compatible con la  
30 presencia del inserto completo, banda que también aparece en la calle correspondiente al control positivo, el plásmido pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18, mientras que en la calle

correspondiente al virus de tipo silvestre MVA-WT (3) aparece una banda mucho menor, que corresponderían al locus de TK sin inserto.

Adicionalmente, se procedió a secuenciar el ADN del virus MVA-89.6P-SIVgpn del stock P2, utilizando como cebadores los oligonucleótidos TK-L (SEQ ID NO:1),  
 5 TK-R2 (SEQ ID NO:21) y E/L (SEQ ID NO:25) obteniéndose la secuencia representada por SEQ ID NO:24.

Los elementos que forman parte del inserto presente en el genoma del virus MVA-89.6-SIVgpn se especifican a continuación en la Tabla 9.

10 **Tabla 9.- Posición de los componentes principales del inserto del vector MVA-89.6P-SIVgpn**

Parte 1 de la secuencia flanqueante izquierda de TK	1-499	Complementaria
89.6P-gp120	ATG-TAA (519 - 2033)	Complementaria
Promotor E/L para 89.6P-gp120	2081 - 2119	Complementaria
Promotor E/L para SIVgpn	2144 - 2183	
SIVgpn	ATG-TAG (2227 - 6444 )	
Secuencia flanqueante derecha de TK	6488 - 7179	Complementaria

**Ejemplo 34.- Análisis de la expresión de proteínas del SHIV a partir del MVA-89.6P-SIVgpn**

15 34.1.- Transferencias tipo Western.-

La expresión de las proteínas 89.6P-gp120 y SIVgpn por los stocks P2 y P3 del virus MVA-89.6P-SIVgpn fue analizada mediante transferencia tipo Western. Monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con 5 ufp/célula del stock P2 o del stock P3. Los extractos celulares fueron recogidos a las 24  
 20 horas post-infección, fraccionados mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa, y sometidos a la reacción frente a un anticuerpo policlonal de conejo anti-gp120 (generado en el laboratorio de los inventores) que reconoce la proteína gp120 del SHIV89.6P; y frente a un anticuerpo monoclonal anti-SIV-gag-p27 (cedido por el  
 25 programa EVA, ARP392) que reconoce la parte correspondiente a la proteína p27 del antígeno Gag del SIV y, por ello, la proteína de fusión SIVgpn. Como controles

positivos se utilizaron extractos procedentes de células transfectadas de forma transitoria con el vector plasmídico de transferencia pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18.

Como se muestra en la Figura 43, tanto la proteína 89.6-gp120 (fotografía superior, marcada como “anti-gp120”) como la proteína de fusión SIVgpn (fotografía inferior, marcada como “anti-SIVp27”) se detectaron en los extractos de células infectadas con virus de los stocks P1, P2 y P3 del MVA-89.6P-SIVgpn, así como en el extracto de células transfectadas de forma transitoria con el plásmido utilizado como control positivo (calles marcadas como “C+”), indicando la correcta expresión de ambos antígenos por los virus recombinantes derivados de MVA generados.

10

#### 34.2. Inmunotinción de placas.-

La expresión de las proteínas 89.6P-gp120 y SIVgpn por parte del recombinante MVA-89.6P-SIVgpn se analizó también en células CEF infectadas con una dilución  $10^{-5}$  del stock P3, mediante la inmunotinción de las mismas utilizando bien un anticuerpo policlonal dirigido contra las proteínas propias del vector MVA tipo silvestre (anti-WR), bien un anticuerpo policlonal anti-gp120 del clade B (anti-gp120) o bien el anticuerpo monoclonal anti-SIVgag-p27 proporcionado por el programa EVA (ARP392). Los resultados, mostrados en la Figura 44, muestran que más del 97% de las placas virales que resultaban teñidas con el anticuerpo anti-WR eran también positivas para los anticuerpos anti-gp120 (fotografías y barras marcadas como “antigp120”) y anti-SIVgag-p27 (fotografías y barras marcadas como “anti-SIVp27”).

20

#### **- Ejemplo 35.- Construcción y caracterización del virus recombinante NYVAC-89.6P-SIVgagpolnef**

Se infectaron con la cepa de tipo silvestre de NYVAC (donada por el grupo Aventis, en el marco de colaboración del proyecto financiado por el V Programa Marco de la Unión Europea (*European Vaccine Effort Against HIV*, conocido por su acrónimo EuroVac I), a una multiplicidad de infección de 0,025 ufp/célula, células BSC40 (una línea celular derivada de riñón de mono, que carece de potencial miogénico), que luego se transfectaron con 10  $\mu$ g de ADN del vector plasmídico de transferencia pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18 (cuyas características se describieron en el Ejemplo 33), utilizando como reactivo lipofectamina (Invitrogen, Cat. 18324-012, lote 1198865) siguiendo las

30

instrucciones del fabricante. 72 horas después de la infección se recogieron las células, se sonicaron y se utilizaron para realizar un cribado en busca de virus recombinantes.

Los virus NYVAC recombinantes que contenían los genes 89.6P-gp120/SIVgpn y que coexpresaban de forma transitoria el gen marcador  $\beta$ -Gal (NYVAC-89.6P-SIVgpn (X-Gal<sup>+</sup>)), fueron seleccionados realizando pases consecutivos de purificación de placas en células BSC40 teñidas con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactósido (XGal) (300  $\mu$ g/ml). Los virus NYVAC recombinantes que contenían los genes 89.6P-gp120/SIVgpn y que habían perdido el gen indicador  $\beta$ -Gal (NYVAC-89.6P-SIVgpn (X-Gal<sup>-</sup>)), fueron seleccionados como focos virales no teñidos en células BSC40 en presencia de XGal. En cada paso de purificación las placas aisladas fueron expandidas en células BSC40 durante 2 días, y el extracto viral crudo obtenido fue usado para el siguiente paso de purificación de placas.

En el primer paso de la selección por cribado se aislaron 3 placas X-Gal<sup>+</sup> a las que se denominó NYVAC-89.6P-SIVgpn-(1 a 3). Las tres placas, que expresaban eficientemente los antígenos 89.6P-gp120 y SIVgpn, se amplificaron y utilizaron para el siguiente paso de purificación de placas. En el segundo pase, se aislaron 18 placas X-Gal<sup>+</sup>; 8/18 expresaban ambas proteínas. Se amplificó la placa denominada NYVAC-89.6P-SIVgpn-2.1, que se utilizó para el siguiente paso de purificación. En el tercer pase, se aislaron 12 placas X-Gal<sup>+</sup>, todas las cuales expresaban de forma eficiente la proteína 89.6P-gp120 y 11/12 expresaban la proteína SIVgpn. Las placas denominadas NYVAC-89.6P-SIVgpn-2.1.1 y NYVAC-89.6P-SIVgpn-2.1.2 se amplificaron y utilizaron en el siguiente paso de purificación. En el cuarto pase se aislaron 12 placas X-Gal<sup>-</sup> y 12 placas X-Gal<sup>+</sup>; todas ellas expresaban de forma eficiente la proteína 89.6P-gp120 y 22 de 24 expresaban la proteína SIVgpn. Los recombinantes denominados NYVAC-89.6P-SIVgpn-2.1.1.1 (X-Gal<sup>-</sup>) y NYVAC-89.6P-SIVgpn-2.1.2.3 (X-Gal<sup>-</sup>) se amplificaron y utilizaron en el siguiente paso de purificación. En el quinto pase se aislaron 12 placas X-Gal<sup>-</sup>; todas ellas expresaban de forma eficiente ambos antígenos. El recombinante denominado NYVAC-89.6P-SIVgpn-2.1.1.1.4 (X-Gal<sup>-</sup>) se amplificó en células CEF (una placa de p150 para generar el stock P1) y se utilizó para preparar los stocks P2 (por infección de cinco placas p150 a 0,01 ufp/célula). Los stocks P3 (crecidos en 40-100 placas p150 de células CEF infectadas a una multiplicidad de infección de 0,05, recogidos transcurridos 3-4 días después de la infección y purificados

a través de dos colchones de sacarosa al 45%) se prepararon para los estudios de inmunización en simios; las características de cada uno de los stocks P3 generados se mencionan en el Ejemplo 37.

5            Caracterización del NYVAC-89.6P-SIVgpn

Para confirmar la homogeneidad genética y pureza del virus NYVAC-89.6P-SIVgpn generado y la integridad de los genes insertados, se amplificó el stock P3 mediante infección de células CEF a una multiplicidad de infección de 5 ufp/célula, recuperando los extractos celulares a las 24 horas post-infección. Se purificó el ADN del virus y se sometió a análisis mediante PCR empleando para ello oligonucleótidos cebadores que hibridan con las regiones TK flanqueantes del inserto de interés izquierda (TK-L) (SEQ ID NO:1) y derecha (TK-R2) (SEQ ID NO:21), de forma análoga a la descrita en el Ejemplo 33.

Las posiciones en las que hibridan dichos oligonucleótidos con respecto al inserto presente en NYVAC-SHIV, así como los tamaños estimados de los fragmentos generados en las PCR que utilizan como molde el ADN de dicho virus y el ADN correspondiente al virus NYVAC de tipo silvestre (WT) carente de inserto, aparecen representados en la parte superior de la Figura 45. La parte inferior de dicha Figura 45 muestra la fotografía de los geles obtenidos al someter a electroforesis los productos de las PCR realizadas con la pareja de cebadores TK-L/TK-R2 para efectuar el análisis del inserto incluido en el virus NYVAC-SHIV presente en el stock P3 (NYVAC-89.6P-SIVgpn (P3)) (calle3), que se comparó con los productos de PCR generados a partir del control positivo MVA-SHIV (MVA-89.6P-SIVgpn (P3)) (calle 4) y con los vectores tipo silvestre, sin insertos, como controles positivos, es decir, NYVAC-WT (calle 2) y MVA-WT (calle 5). Para ello, 100 ng de ADN viral extraído de células de embrión de pollo (CEF) infectadas a una multiplicidad de 5 ufp/célula con los virus NYVAC-WT, NYVAC-89.6P-SIVgpn (P3) (MVA-SHIV), MVA-89.6P-SIVgpn (P3) (MVA-SHIV) y MVA-WT fueron usados como molde para hacer una amplificación mediante PCR del fragmento de secuencia comprendido entre los brazos TK-L y TK-R en cada uno de ellos. Como se observa en las fotografía mostradas en la parte inferior de la Figura 45, la muestra correspondiente al control positivo, el virus recombinante MVA-89.6P-SIVgpn (P3) (calle 4), da lugar a una banda de igual tamaño que las correspondientes a

las muestras del virus recombinante cuya descripción se describe en este ejemplo NYVAC-SHIV (NYVAC-89.6P-SIVgpn (P3), calle 3), mientras que en la calle 2, correspondientes al virus NYVAC que carece de inserto (NYVAC-WT), se observa una banda de aproximadamente 400 pb compatible con la ausencia de inserto en el *locus* de TK propio de NYVAC, más corto que el del MVA-WT que, por su parte, da lugar a la banda de casi 900 pb que habría de esperarse según las características del *locus* de TK en este último virus.

**Ejemplo 36 .- Análisis de la expresión de proteínas del SHIV a partir del NYVAC-89.6P-SIVgpn**

**36.1.- Transferencias tipo Western.-**

La expresión de las proteínas 89.6P-gp120 y SIVgpn por el virus recombinante NYVAC-89.6P-SIVgpn fue analizada mediante transferencia tipo Western. Monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con 5 ufp/célula de los stocks P1, P2 o P3. Los extractos celulares fueron recogidos a las 24 horas post-infección, fraccionados mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa, y sometidos a la reacción frente a un anticuerpo policlonal de conejo anti-gp120 (generado en el laboratorio de los inventores inmunizando conejos con la proteína gp120 del aislado IIIB), que es capaz de reconocer la proteína gp120 del SHIV89.6P; y frente a un anticuerpo monoclonal anti-SIV-gag-p27 (cedido por el programa EVA, ARP392) que reconoce la proteína gag del SIV y, por ello, la proteína de fusión SIVgpn. Como controles positivos se utilizaron extractos procedentes de células infectadas con el virus MVA-SHIV (MVA.89.6P-SIVgpn(P3)).

Como se muestra en la Figura 46, tanto la proteína 89.6-gp120 (fotografía de superior, marcada como “anti-gp120”) como la proteína de fusión SIVgpn (fotografía inferior, marcada como “anti-SIVp27”) se detectaron en los extractos de células infectadas con virus de los stocks P1, P2 y P3 del NYVAC-89.6P-SIVgpn (NYVAC-SHIV), así como en el extracto de células infectadas con el control positivo MVA-SHIV, indicando la correcta expresión de ambos antígenos por los virus recombinantes derivados de NYVAC generados.

36.2. Inmunotinción de placas.-

La expresión de las proteínas 89.6P-gp120 y SIVgpn por parte del recombinante NYVAC-89.6P-SIVgpn se analizó también en células DF-1 infectadas con una dilución  $10^{-5}$  del stock P3 del NYVAC-SHIV (NYVAC-89.6P-SIVgpn (P3)), mediante la

5 inmunotinción de las mismas utilizando bien un anticuerpo policlonal dirigido contra las proteínas propias del vector MVA tipo silvestre (anti-WR), bien un anticuerpo policlonal anti-gp120 del clade B (anti-gp120) o bien el anticuerpo monoclonal anti-SIVgag-p27 proporcionado por el programa EVA (ARP392). Los resultados, mostrados

10 en la Figura 47, muestran que más del 98% de las placas virales que resultaban teñidas con el anticuerpo anti-WR eran también positivas para los anticuerpos anti-gp120 (fotografías y barras marcadas como "antigp120") y anti-SIVgag-p27 (fotografías y barras marcadas como "anti-SIVp27").

15 **- Ejemplo 37.- Control de los stocks virales enviados para los estudios de inmunización de macacos**

De los stocks de virus recombinantes MVA-SHIV y NYVAC-SHIV obtenidos, se seleccionaron para ser utilizados en estudios de inmunización de macacos los que se muestran a continuación en la Tabla 10:

20 **Tabla 10.- Stocks de virus recombinantes seleccionados para estudios de inmunización en macacos**

<b>MVA-89.6P-SIVgpn</b>			
<b>Stock</b>	<b>Título (UFP/ml)</b>	<b>UFP totales enviadas</b>	<b>Fecha de envío</b>
P3 (20/06/03)	$1,6 \times 10^9$	$7,5 \times 10^9$	10/03/04
P3 (20/09/04)	$8,75 \times 10^8$	$5 \times 10^9$	6/10/04
P3.1 (20/09/04)	$1,1 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	6/10/04
P3.2 (01/10/04)	$2 \times 10^9$	$0,5 \times 10^9$	13/10/04
<b>NYVAC-89.6P-SIVgpn</b>			
<b>Stock</b>	<b>Título (UFP/ml)</b>	<b>UFP totales enviadas</b>	<b>Fecha de envío</b>
P3.1 (29/01/04)	$1,2 \times 10^9$	$7,2 \times 10^9$	10/03/04
P3.2 (25/02/04)	$5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$	6/10/04



La expresión de las proteínas 89.6P-gp120 y SIVgpn por los diferentes stocks de virus recombinantes MVA-89.6P-SIVgpn y NYVAC-89.6P-SIVgpn fue analizada mediante transferencia tipo Western. Monocapas de células CEF crecidas en placas de 12 pocillos fueron infectadas con 5 ufp/célula de uno de los stocks mencionados en la

5 Tabla 10. Los extractos celulares fueron recogidos a las 24 horas post-infección, fraccionados mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), transferidos a membranas de nitrocelulosa, y sometidos a la reacción frente a un anticuerpo policlonal de conejo anti-gp120 (generado en el laboratorio de los inventores inmunizando conejos con la proteína gp120 del aislado

10 IIIB), que es capaz de reconocer la proteína gp120 del SHIV89.6P; y frente a un anticuerpo monoclonal anti-SIV-gag-p27 (cedido por el programa EVA, ARP392) que reconoce la proteína gag del SIV y, por ello, la proteína de fusión SIVgpn. Como control negativo se utilizó un extracto de células en las que se había simulado la infección, es decir, que habían sido sometidas a los mismos pasos que las células

15 infectadas, pero que no habían recibido virus en la solución con las que deberían haber sido infectadas (extracto M). La Figura 48 muestra los resultados de las inmunotinciones con cada uno de los anticuerpos, correspondiendo la parte izquierda a la tinción con el anticuerpo anti-gp120 y la derecha a la tinción con el anticuerpo anti-SIV-gag-p27.

20 Comprobada la expresión eficiente de ambas proteínas en los extractos procedentes de cada uno de los stocks, se enviaron alícuotas de los mismos a los Drs. Jonathan Heeney y Petra Mooij, del Biomedical Primate Research Centre de Rijswijk, Holanda, donde se llevaron a cabo los ensayos con macacos que se describen en los siguientes Ejemplos.

25

### **Estudio preclínico de la eficacia como vacuna**

#### Protocolo de inmunización y desafío posterior

Los ensayos que se describen a continuación en los Ejemplos 38 y 39 se llevaron

30 a cabo para evaluar la inmunogenicidad y la eficacia de los vectores cuya construcción se describe en los Ejemplos 33 y 35 para proteger a simios inmunizados con ellos frente al desarrollo de la enfermedad del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, con el

fin de valorar a partir de los resultados obtenidos el grado de eficacia esperable de los vectores descritos en la patente principal al inmunizar con ellos seres humanos. Dichos ensayos se llevaron a cabo en el Biomedical Primate Research Centre de Rijswijk (Países Bajos). Para su realización, se utilizaron macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) adultos jóvenes, que habían demostrado ser negativos a la infección por SIV, retrovirus de simio y virus de leucemia de simio. Las condiciones de estabulación y manejo de los animales siguieron las normas éticas establecidas por el mencionado centro de experimentación.

El estudio no sólo pretendió establecer correlaciones con la inmunogenicidad y eficacia que serían esperables al utilizar los vectores de la patente principal como vacunas en seres humanos, sino que también intentó obtener datos para compararlos con los resultados obtenidos al utilizar un vector, también derivado de poxvirus, que contiene el mismo inserto de secuencias codificantes de antígenos del SHIV89.6P que el vector derivado de MVA cuya construcción y caracterización se ha descrito en los Ejemplos 33 y 34, MVA-89.6P-SIVgpn, al que también se hará referencia en los Ejemplos siguientes mediante la denominación general abreviada MVA-SHIV. El vector alternativo utilizado cuya construcción está también descrita en la presente memoria es el vector derivado de NYVAC, denominado NYVAC-89.6P-SIVgpn, al que también se hará referencia en los Ejemplos siguientes mediante la denominación general abreviada NYVAC-SHIV. Tanto el MVA-SHIV como el NYVAC-SHIV, que contienen el mismo inserto, fueron administrados en dosis de refuerzo o potenciación de la respuesta inmune (a las que se alude con frecuencia mediante el término inglés *boost*) con posterioridad a la administración de dosis de iniciación o desencadenamiento de la respuesta inmune (*priming*) en las que los animales recibieron ADN desnudo que contenía un inserto idéntico al presente en el ADN de los vectores MVA-SHIV y NYVAC-SHIV, el vector DNA-SHIV, que consta de dos plásmidos de expresión, pcDNA-gp120.89.6p, que expresa la proteína gp120 del SHIV89.6P, y pcDNA-SIVgag-pol-nef, que expresa la proteína SIVgpn generada a partir de secuencias correspondientes al virus SHIV89.6P, plásmidos que fueron generados por el Dr. Ralf Wagner, Regensburg, Alemania, y cedidos por el mismo para la realización del estudio. Los detalles sobre el estudio y los resultados obtenidos se describen con mayor detalle a continuación en los Ejemplos 38 y 39.

**Ejemplo 38.- Inmunización de los macacos y valoración de la inmunidad generada**

Los 21 macacos utilizados en el estudio fueron divididos en tres grupos (grupos 1, 2, y 3), cada uno compuesto de 7 individuos. Cada uno de los grupos fue sometido a un protocolo de inmunización diferente, según se muestra a continuación en la Tabla 11:

**Tabla 11.- Grupos de inmunización y tratamiento recibido**

Grupo	Nº de macacos	INMUNIZACIONES				DESAFÍO:
		Semana 0	Semana 4	Semana 20	Semana 24	Semana 32
1	7	DNA-SHIV	DNA-SHIV	MVA-SHIV	MVA-SHIV	SHIV89.6P
2	7	DNA-SHIV	DNA-SHIV	NYVAC-SHIV	NYVAC-SHIV	SHIV89.6P
3	7	DNA-emp	DNA-emp	NYVAC-WT	NYVAC-WT	SHIV89.6P

El grupo 3, de control, recibió en las dos primeras dosis ADN desnudo que carecía del inserto con las secuencias propias del SHIV89.6P (DNA-emp), mientras que en las dos últimas recibió el vector NYVAC-WT, que carece igualmente del inserto. Para la realización del estudio, el vector NYVAC-WT fue crecido en células CEF y purificado en dos colchones de sacarosa de forma análoga a la utilizada con los recombinantes MVA-SHIV y NYVAC-SHIV; del stock generado se enviaron al centro de primates de Holanda, el día 20 de abril de 2004, un total de  $8 \times 10^9$  ufp, con un título de  $1 \times 10^9$  ufp/ml.

Las inmunizaciones con ADN desnudo se produjeron con un total de 4 mg de plásmido, utilizando en el caso del vector DNA-SHIV 2 mg de cada uno de los plásmidos que lo componen, pcDNA-gp12089.6p y pcDNA-SIV-gag-pol-nef, y empleando 4 mg del vector DNA-emp para los controles. En cada una de las dos inoculaciones de ADN desnudo que recibió cada macaco se suministraron 2 mg de plásmido, disueltos en 1,5 ml de PBS, que se suministraron por vía intramuscular en la parte superior de cada pata.

Las inmunizaciones con los vectores NYVAC-SHIV, MVA-SHIV y NYVAC-WT se llevaron a cabo inoculando en la parte superior del brazo derecho, por vía intramuscular, 0,5 ml que contenían  $5 \times 10^8$  ufp, de manera que en cada dosis se inocularon  $5 \times 10^8$  ufp/macaco. Para ello se utilizaron los siguientes stocks:

- en el caso del MVA-SHIV, P3 (20/06/03), con un título de  $1,6 \times 10^9$  ufp/ml,;

- 102 -

- en el caso del NYVAC-SHIV, P3.1 (29/01/04), con un título de  $1,2 \times 10^9$  ufp/ml,;

- en el caso del NYVAC-WT, el stock con un título de  $1 \times 10^9$  ufp/ml mencionado anteriormente.

5 En todos los casos, transcurridas 32 semanas después de recibir la primera dosis de inmunización, los macacos fueron sometidos a lo que se conoce como un “desafío” o “reto” viral (traducción del término inglés “*challenge*”), es decir, se inoculó a los animales por vía intravenosa una dosis de 50-100 MID50 de SHIV89.6P, dilución 1:1000 del stock de Letvin (entendiendo como MID50 o “*Monkey Infectious Dose*” la  
10 cantidad de virus que es capaz de producir infección en el 50% de los animales) y se observó la evolución de cada animal.

2 semanas antes de comenzar con el protocolo de inmunización, en distintos momentos a lo largo del mismo y con posterioridad al desafío se extrajeron muestras de sangre periférica, mediante punción intravenosa, de cada uno de los animales. De la  
15 sangre heparinizada se obtuvieron las células PBMC (“*peripheral blood mononuclear cells*”, células mononucleares de sangre periférica), que se utilizaron para los ensayos de respuesta celular: En la Figura 49 se muestra un esquema del transcurso del estudio, en el que están marcados los momentos de las tomas de muestras (CMI, abreviatura de “*cell mediated immunity*” o inmunidad mediada por células), los momentos en los que  
20 se administraron las distintas dosis de inmunización (ADN y vectores derivados de poxvirus: NYVAC ó MVA) y el momento en el que se procedió al desafío con el virus SHIV89.6P.

Con el fin de valorar la inmunidad generada, se realizaron ensayos para detectar por la técnica de ELISPOT la respuesta de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-4 en los animales de cada  
25 uno de los grupos y su evolución en el tiempo, según se describe a continuación.

La respuesta de citoquinas se evaluó en las fracciones de células PBMC extraídas de cada uno de los macacos. Para ello, muestras de dichas células de cada uno de los macacos se incubaron durante 48 horas con grupos de péptidos. Para el ELISPOT de gp120 se utilizó un grupo de 48 péptidos, concretamente los péptidos 4702 a 4749  
30 del N° Cat. 4827 del NIH AIDS Research and Reference Reagents Program, cada uno de los cuales consta de 20 aminoácidos de los que 10 aminoácidos son solapantes con el siguiente péptido, con los cuales queda representada la secuencia de la proteína 89.6P-

gp120. Para el ELISPOT de SIVgpn, los péptidos fueron sintetizados por SynPep Dublín (California, Estados Unidos) y son grupos de 15 aminoácidos con 11 aminoácidos solapantes, que se pueden agrupar en los grupos (*pools*): Gag-pool 11, 1-54; Gag-pool 12, 55-108; Pol-pool 11, 109-168; Pol pool 12, 169-173 + 236-290; Pol pool 13, 291-349; Nef pool 11, 174-235; la respuesta de los 7 grupos de péptidos fue analizada utilizando 2 microgramos/ml de cada péptido en el ensayo. Tras la incubación, en cada una de las muestras se midieron las SPF (*Spot forming cells*), que son las células PBMC que expresan una determinada citoquina, después de su estimulación con péptidos específicos incluidos en las proteínas 89.6P-gp120 y SIVgpn. Esto es una medida de las células que fueron estimuladas específicamente por la inoculación de los vectores que expresaban dichas proteínas. Se realizaron medidas por ELISPOT para detectar las SPF que expresaban IFN- $\gamma$ , IL-2 ó IL-4 (29).

En el caso de las SPF que expresaban IFN- $\gamma$ , los resultados obtenidos con cada uno de los animales, expresados como SPF totales (las estimuladas por 89.6P-gp120 y la estimuladas por SIVgpn) detectadas por cada  $10^6$  PBMC analizadas, se representan en la Figura 50, en la que se ha utilizado una escala logarítmica en el eje de ordenadas. Los números que aparecen en el eje de abscisas indican el momento en el tiempo en el que fueron tomadas cada una de las muestras. Para cada valor de tiempo, aparecen tres grupos de valores, que presentan el comportamiento de cada uno de los 7 animales utilizados en el estudio con un procedimiento de inmunización concreto: la primera vertical de puntos corresponde a muestras tomadas de macacos del grupo 1 (DNA-SHIV/MVA-SHIV); la segunda vertical de puntos corresponde a muestras tomadas de macacos del grupo 2 (DNA-SHIV/NYVAC-SHIV); la tercera vertical de puntos corresponde a muestras tomadas de ratones del grupo 3 (DNA-emp/NYVAC-WT). Cada punto representa el valor obtenido para un macaco concreto, mientras los rectángulos situados en cada una de las verticales indican el valor medio correspondiente a todos los macacos de ese grupo para las muestras tomadas en un mismo momento en el tiempo. La presencia de un número de puntos inferior a 7 en algunas verticales indica que el punto situado sobre el eje de abscisas representa a más de un macaco, en cada uno de los cuales el valor de las SFC detectadas por cada  $10^6$  PBMC analizadas no fue superior a 1. La línea punteada indica el valor por debajo del cual los valores se consideran insignificantes (20 SFC). Las flechas blancas indican la

inoculación de un vector de vacunación; la flecha negra indica el momento en el que se produjo el desafío con el SHIV89.6P. Se aprecia como antes del desafío, los puntos correspondientes a los dos primeros grupos, y en especial el valor medio de los mismos, son superiores a los obtenidos en el grupo control, inmunizado con DNA/NYVAC sin insertos. Una vez producida la infección con el patógeno SHIV89.6P, los valores quedan bastante igualados en todos los grupos al producirse inmunidad frente al SHIV.

Para simplificar la interpretación de los datos, en la Figura 51 se representan los valores medios del número total de células que expresan IFN- $\gamma$  obtenidos para cada uno de los grupos, de nuevo en escala logarítmica, en función del tiempo en el que se tomaron las muestras, partiendo en este caso del momento en el que los macacos recibieron la primera dosis de ADN desnudo. Las Figuras 52 y 53, por su parte, representan los valores medios obtenidos para cada uno de los grupos, igualmente en escala logarítmica, en función del tiempo, de SFC que expresaban IL-4 (Figura 53) o IL-2 (Figura 52).

Se observa que, tanto en el grupo 1 (el que recibió el vector MVA-SHIV, el MVA-89.6P-SIVgpn, en las dosis de potenciación de la respuesta) (datos indicados mediante cuadrados con un vértice apuntando hacia arriba,  $\blacktriangle$ ) como en el grupo 2 (el que recibió el vector NYVAC-SHIV, el NYVAC-89.6P-SIVgpn, en las dosis de potenciación de la respuesta) (datos mediante cuadrados cuyos vértices conforman dos líneas paralelas,  $\blacksquare$ ), la magnitud de la respuesta inmune es semejante y claramente superior a la que se detecta en el grupo 3, el de los macacos que recibieron vectores que no expresaban antígenos del SHIV (cuyos datos se indican mediante triángulos,  $\blacktriangle$ ). En este último grupo, se aprecia como la respuesta inmune aumenta claramente después del desafío con el virus SHIV89.6P, debido a la replicación del virus, lo que hace que, a partir de ese momento, los valores sean semejantes en los tres grupos.

Estos datos indican que la media total de la respuesta inmune (producción de IFN- $\gamma$ ) resulta claramente potenciada al serles administrados a los macacos los vectores MVA-89.6P-SIVgpn y NYVAC-89.6P-SIVgpn. La respuesta inmune inducida por estos dos vectores es semejante. Ambos inducen una buena respuesta celular frente a los antígenos 89.6P-gp120 y SIVgpn.

**Ejemplo 39.- Eficacia de la respuesta inmune generada para proteger frente al desarrollo del virus SHIV**

Para valorar la eficacia de protección frente al desarrollo de una infección generada por el virus SHIV89.6 en relación a la respuesta inmune evaluada en los  
5 ensayos descritos en el Ejemplo 38, se procedió a extraer datos sobre dos magnitudes significativas: el número de partículas virales detectables en el plasma de las muestras sanguíneas que habían sido extraídas de los macacos una vez que se les habían  
inoculado el virus patógeno SHIV89.6P, así como el porcentaje que las células CD4+ y CD8+ suponían respecto al total de células mononucleares de sangre periférica  
10 (PBMC).

**39.1.- ARN viral detectable en plasma**

Los valores referentes al número de partículas virales detectables en plasma constituyen un buen valor indicativo de la capacidad de la respuesta inmune generada para controlar la posible infección producida por el virus SHIV89.6P inoculado. Valores  
15 por encima de 100.000 copias/ml se consideran que conducen al desarrollo en los macacos de SIDA y a la muerte del animal, mientras que valores próximos a 10.000 copias/ml o inferiores mantienen al animal sin aparentes efectos patógenos. La detección de una concentración de copias virales inferior a ese valor puede considerarse indicativo de que la respuesta inmune generada es capaz de conferir protección en los  
20 modelos animales utilizados.

Por ello, se procedió a detectar el ARN del virus SHIV89.6P presente en el plasma de las muestras sanguíneas extraídas de los macacos justo antes (tiempo 0) y con posterioridad a la inoculación de dicho virus. Para ello se utilizó la técnica cuantitativa en tiempo real QC RNA-PCR, que mide el número de copias virales por mililitro de  
25 plasma y es capaz de detectar 50 copias por ml. Los valores obtenidos para cada uno de los macacos se muestran en la Figura 54, en la que aparecen tres gráficos. El gráfico superior corresponde al grupo 3, el de los macacos control que habían sido inmunizados con ADN y NYVAC que carecían de inserto desde el que poder expresar antígenos del SHIV. El gráfico de la parte inferior izquierda corresponde al grupo 1, inmunizado con  
30 DNA-SHIV/MVA-SHIV, mientras el gráfico de la parte inferior derecha corresponde al grupo 2, inmunizado con DNA-SHIV/NYVAC-SHIV.

En dicha Figura puede apreciarse como, de los 7 macacos que recibieron la inmunización control, 32 semanas después del desafío, 6 presentan valores continuados de viremia que oscilan entre 10.000-100.000 copias/ml, mientras que uno de los animales no respondió a la infección.

5 De los animales vacunados, todos los animales del grupo DNA-SHIV/MVA-SHIV redujeron los niveles de viremia con respecto al grupo control. 3 eliminaron completamente el virus antes de las 20 semanas, concretamente transcurridas 7, 14 ó 18 semanas. En cuanto al resto, al cabo de las 32 semanas, tres macacos redujeron la viremia por debajo de 1000 copias/ml y uno mantenía alrededor de 2000 copias/ml.

10 En cuanto al grupo vacunado con DNA-SHIV/NYVAC-SHIV, 4 animales eliminaron completamente el virus antes de las 20 semanas, concretamente transcurridas 4, 14 ó 17 semanas. En cuanto al resto, al cabo de las 32 semanas, dos macacos mantenían niveles por debajo de 1000 copias/ml y uno de ellos por debajo de 10000 copias/ml.

15 Estos resultados demuestran claramente que los dos vectores derivados de poxvirus utilizados, MVA-SHIV (MVA-89.6P-SIVgpn) y NYVAC-SHIV (MVA-89.6P-SIVgpn), inducen un alto grado de protección en macacos frente al virus patógeno SHIV89.6P al ser utilizados en protocolos de tipo *prime/boost* (desencadenamiento/potenciación de la respuesta) al ser utilizados en las dosis de  
20 refuerzo o potenciación de la respuesta inmune generada.

### 39.2.- Porcentaje de células CD4+ y CD8+.-

Los valores referentes a los porcentajes de células T de sangre periférica CD4+ y CD8+ detectables son también datos significativos, pues las células CD4+ son utilizadas  
25 tanto por el VIH como por el SIV como células diana para la infección. La reducción en el número de estas células por debajo de 200 células por ml se considera un síntoma de la enfermedad, el SIDA. La proporción de células T CD4+ y CD8+ es por tanto un buen indicador del estado de la infección.

Por ello, se procedió a su detección en la fracción de células PBMC de las  
30 muestras sanguíneas extraídas a los macacos 12 semanas antes de que se produjera el desafío con el SHIV89.6P, justo antes de inocularlo (tiempo 0) y con posterioridad a la inoculación de dicho virus. Para llevar a cabo los ensayos, se utilizaron anticuerpos



específicos para cada una de las poblaciones, determinándose por FACS la proporción de células CD4+ y CD8+ presentes. Los resultados se muestran en la Figura 55.

En la parte superior de dicha Figura, la correspondiente al grupo inmunizado con DNA-SHIV/MVA-SHIV, se observa que 6 de los macacos mantenían niveles normales de células CD4+, similares a los de células CD8+, y sólo en uno de ellos dichos niveles se redujeron por debajo de 100. En la parte intermedia de la Figura, la correspondiente al grupo inmunizado con DNA-SHIV/NYVAC-SHIV, se obtuvieron resultados similares: 6 animales mantenían niveles normales de células CD4+ y sólo en uno dichos niveles se redujeron por debajo de 100. En el grupo control, en cambio, tal como se observa en la parte inferior de la Figura 55, en 5 de los macacos los niveles de células CD4+ se redujeron por debajo de 100, habiendo sido necesario sacrificar uno de los otros dos macacos (D7 98928, junto a cuyo nombre figura la abreviatura "euth") debido al avanzado estado de la enfermedad. Uno de los macacos control, sin embargo, se mantuvo protegido.

15

### 39.3.- Porcentaje de supervivencia de los macacos infectados.-

Adicionalmente, se realizó un cálculo del porcentaje de supervivencia de los macacos en cada uno de los tres grupos, computando el número de macacos que permanecían vivos tras la inoculación del virus SHIV89.6P. En la Figura 56 se representan los datos obtenidos transcurridos los intervalos de tiempo desde la infección, en semanas, que se representan en el eje abscisas. En dicha Figura puede observarse como, transcurridas más de 50 semanas desde la infección con el SHIV89.6P, tanto los macacos del grupo inmunizado con DNA-SHIV/MVA-SHIV (datos indicados mediante cuadrados con un vértice apuntando hacia arriba, ◊) como los del grupo inmunizado con DNA-SHIV/NYVAC-SHIV (datos indicados mediante cuadrados cuyos vértices conforman dos líneas paralelas, ▣), la supervivencia de los macacos era del 100%, mientras que en el grupo control (datos indicados mediante triángulos, ▲) a las 27 semanas desde la inoculación del virus SHIV89.6P comienza a observarse un descenso de los macacos vivos, siendo su porcentaje de supervivencia inferior al 40% transcurridas más de 50 semanas desde la inoculación de dicho virus.

30

Tomando estos datos en conjunto, puede concluirse que tanto el recombinante generado a partir de MVA, MVA-89.6P-SIVgpn, como el generado a partir de NYVAC, NYVAC-89.6P-SIVgpn, que tienen la misma organización genética en sus insertos y son capaces de expresar simultáneamente los antígenos 89.6P-gp120 y SIVgpn, han demostrado en el modelo de primates no humanos, los macacos Rhesus, que son unos excelentes vectores para ser utilizados para la vacunación contra el SIDA de simio. Estos resultados refuerzan los obtenidos en los ensayos descritos en los Ejemplos de la patente principal y suponen un apoyo respecto a la posible utilidad de estos vectores en la vacunación frente al SIDA humano.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Antonic, G., F., Scheiflinger, F. Dorner, y F. G. Falkner. 1998. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 244:365-396.  
5
2. Meyer, H., G. Sutter, and A. Mayr. 1991. Mapping of deletions in the genome of highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J. Gen. Virol.* 72:1031-1038.
3. Blanchard, T. J., Alcamí, P. Andrea, and G. L. Smith. 1998. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implication for use as a human vaccine. *J. Gen. Virol.* 79:1159-1167.  
10
4. Altenburger, W., C-P. Sütter, and J. Altenburger. 1989. Partial deletion of the human host range in the attenuated vaccinia virus MV A. *Arch. Viro l.* 105: 15-27.
5. Wyatt, L. S., M. W. Carroll, C-P. Czerny, M. Merchlinsky, J. R. Sisler, and B. Moss. 1998. Marker rescue of the host range restrictions defects of modified vaccinia virus Ankara. *Virology* 251:334-342.  
15
6. Carroll, M. W. and B. Moss. 1997. Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MV A strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a non human mammalian cell line. *Virology* 238: 198-211.  
20
7. Drexler, I., K. Heller, B. Wahren, V. Erfle and G. Sütter. 1998. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary. *J. Gen. Virol.* 79:347-52.
8. Sancho, M. C., S. Schleich, G. Griffiths, and J. Krijnse-Locker. 2002. The block in assembly of modified vaccinia virus Ankara in HeLa cells reveals new insights into vaccinia virus morphogenesis. *J. Virol.* 76: 8318-8334.  
25
9. Sütter, G., and B. Moss. 1992. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:10847-10851.
10. Carroll, M. W., W. W. Overwijk, R. S. Chamberlain, S. A. Rosenberg, B. Moss, and N. P. Restifo. 1997. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara (MV A) as an effective recombinant vector: a murine tumor model. *Vaccine* 15:387-394.  
30
11. Ramirez, J. C., M. M. Gherardi, and M. Esteban. 2000. Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of

B- and T -cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. *J Virol.* 74:923-933.

12. Hirsch, V. M., T. R. Fuerst, G. Sutter, M. W. Carrol, L. C. Yang, S. Goldstein, M. Piatak, Jr., W. R. Elkins, W. G. Alvord, D. C. Montefiori, B. Moss, and J. D. Lifston. 1996. Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus Ankara. *J. Virol.* 70:3741-3552.

13. Mahnel, H. and A. Mayr. 2002. Experiences with immunization against orthopox virus es of humans and animals using vaccine strain MV A. *Berl. Muench. Tierazetl. Wochnschr.* 107:253-256.

14. Mayr, A., H. Stickl, H. K. Muller, K. Danner, and H. Singer. 1978. The smallpox vaccination strain MV A: marker, genetic structure, experience gained with parenteral vaccination and behaviour in organism with a debilitated defense mechanism. *Zentbl. Bakteriol. B.* 167:375-390.

15. Schneider, J., S. C. Gilbert, T. J. Blanchard, T. Hanke, K. J. Robson, C. M. Hannan, M. Becker, R. Sinden, g. L. Smith and A. V.S. Hill. 1998. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat. Med.* 4:397-402.

20. Sutter, G., L. S. Wyatt, P. L. Foley, J. R. Benninnk, and B. Moss. 1994. A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine* 12:1032-1040.

25. Sutter, G. 2003. Vaccinia vectors as candidate vaccines: The development of Modified Vaccinia Virus Ankara for antigen delivery. *Current Targets-Infectious Disorders* 3, 263-271.

30. Didierlaurent A., Ramirez JC, Gherardi Mi, Zimmerli SC, Graf M, Orbea HA, Pantaleo G, Wagner R, Esteban M, Kraehenbuhl JP, Sirard JC. 2004. Attenuated poxviruses expressing a synthetic HIV protein stimulate HLA-A2-restricted cytotoxic T-cell responses. *Vaccine* 22:3395-3403.

19. Chakrabarti, S , Sisler, R.J., Moss, B. Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression. 1997. *BioTechniques* 23, 1094-1097.

20. Guerra, S., L.A. López-Fernández, A. Pascual-Montano, M. Muñoz, K. Harshman y M. Esteban. Cellular gene expression survey of vaccinia virus infection of human HeLa cells. 2003. *J. Virol.* 77:6493-6506.
21. Quackenbush, J. Microarray data normalization and transformation. 2002. *Nat. Genet.* 32:496-501.
22. Kohonen, T. Self-organization maps, 2ª edición. 1997. Springer-Verlag, Heidelberg, Alemania.
23. Jones, J.O. y A.M. Arvin. Microarray analysis of host cell gene transcription in response to Varicella-Zoster virus infection of human T cells and fibroblasts in vitro and SCIDhu skin xenografts in vivo. 2003. *J. Virol.* 77:1268-1280.
24. Eisen, M. B., P.T. Spellman, P.O. Brown, y D. Botstein. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14863-14868.
25. Li, J., Lord, C.I., Haseltine, W., Letvin, N.L., Sodroski, J. Infection of cynomolgus monkeys with a chimeric HIV-1/SIVmac virus that expresses the HIV-1 envelope glycoproteins. 1992. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr* 5:639-646.
26. Reimann, K. A., J. T. Li, G. Voss, C. Lekutis, K. Tenner-Racz, P. Racz, W. Lin, D. C. Montefiori, D. E. Lee-Parritz, Y. Lu, et al. An env gene derived from a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate confers high in vivo replicative capacity to a chimeric simian/human immunodeficiency virus in rhesus monkeys. 1996. *J. Virol.* 70:3198.
27. Reimann, K. A., J. T. Li, R. Veazey, M. Halloran, I. W. Park, G. B. Karlsson, J. Sodroski, N. L. Letvin. A chimeric simian/human immunodeficiency virus expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate env causes an AIDS-like disease after in vivo passage in rhesus monkeys. 1996. *J. Virol.* 70:6922.
28. Guerra, S., López-Fernández, L.A., Pascual-Montano, A., Nájera, J.L., Zavallos, A., Esteban, M. Host response to the attenuated poxvirus vector NYVAC: upregulation of apoptotic genes and NF- $\kappa$ B responsive genes in infected HeLa cells. 2006. *J. Virol* 80:985-998.
29. Mooij, P., Nieuwenhuis I.G., Knoop C.J., Doms R.W., Bogers W.M.J.M., ten Haaf P.J.F., Niphuis H., Koornstra W., Bieler K., Köstler J., Morein B., Cafaro A., Ensoli B., Wagner R., Heeney J.L. Qualitative T-Helper Responses to Multiple Viral Antigens Correlate with Vaccine-Induced Immunity to Simian/Human Immunodeficiency Virus Infection. 2004. *J. Virol.* 78:3333-3342.

### REIVINDICACIONES

1. Un vector recombinante derivado del virus MVA capaz de expresar simultáneamente una forma de la proteína Env del VIH-1 que carece de la parte correspondiente a la proteína gp41 en su totalidad y una proteína de fusión que contiene 5 secuencias de las proteínas Gag, Pol y Nef del VIH-1, estando la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env y la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef bajo el control de promotores idénticos e insertadas ambas secuencias en el mismo lugar de inserción del vector.
- 10 2. Un vector recombinante derivado del virus MVA según la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env y la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef se encuentran insertadas en el *locus* de la timidina quinasa de forma que se inactiva dicho gen.
- 15 3. Un vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que tanto la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env como las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef se generan a partir de las secuencias de proteínas Env, 20 Gag, Pol y Nef de aislados naturales.
4. Un vector recombinante derivado del virus MVA según la reivindicación 3, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env se ha generado realizando en ella modificaciones en la secuencia correspondiente destinada a eliminar 25 la expresión de la proteína gp41 de manera que se ha eliminado toda la secuencia del gen *env* que en la secuencia natural de dicho gen aparece tras el último triplete correspondiente a la proteína gp120.
5. Un vector recombinante derivado del virus MVA según cualquiera de las 30 reivindicaciones 3 y 4, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión Gag-Pol-Nef no se proteoliza por acción de la proteasa del VIH.

6. Un vector recombinante derivado del virus MVA según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los promotores bajo cuyo control están la secuencia correspondiente a la proteína Env y la secuencia correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef son promotores idénticos que permiten la expresión de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef y de la proteína Env carente de la parte correspondiente a la proteína gp41 en su totalidad tanto en etapas tempranas como tardías del ciclo infeccioso del virus MVA.

7. Un vector recombinante derivado del virus MVA según la reivindicación 6, en el que los promotores bajo cuyo control están la secuencia correspondiente a la proteína Env y la secuencia correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef son promotores sintéticos pE/L.

8. Un vector recombinante según las reivindicaciones 1 a 7, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env y la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef se encuentran insertadas en el *locus* de la timidina quinasa de forma que se inactiva dicho gen, la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env se ha generado eliminando toda la secuencia del gen *env* que en la secuencia natural de dicho gen aparece tras el último triplete correspondiente a la proteína gp120, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión Gag-Pol-Nef da lugar a una poliproteína que no se proteoliza por acción de la proteasa del VIH y los promotores bajo cuyo control están la secuencia correspondiente a la proteína Env y la secuencia correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef son promotores sintéticos pE/L.

9. Un vector recombinante según la reivindicación 8, en el que tanto la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env como las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef proceden de aislados naturales pertenecientes al clade B.

10. Un vector recombinante según la reivindicación 9, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env da lugar a una proteína que reproduce la secuencia de la proteína gp120 del aislado BX08, representada por SEQ ID NO:15.

5           11. Un vector recombinante según la reivindicación 9, en el que las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef proceden del aislado IIIB, estando la secuencia de nucleótidos de la proteína de fusión representada por SEQ ID NO:16.

10           12. Un vector recombinante según las reivindicaciones 10 y 11, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env da lugar a una proteína que reproduce la secuencia de la proteína gp120 del aislado BX08 y las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef proceden del aislado IIIB, estando representadas dichas secuencias,  
15           respectivamente, por SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16.

13. Un vector recombinante según la reivindicación 8, en el que tanto la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env como las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef proceden de aislados naturales pertenecientes al clade C.  
20

14. Un vector recombinante según la reivindicación 13, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env da lugar a una proteína que reproduce la secuencia de la proteína gp120 del aislado CN54, representada por SEQ ID NO:17.  
25

15. Un vector recombinante según la reivindicación 13, en el que las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef proceden del aislado CN54, estando la secuencia de nucleótidos de la proteína de fusión representada por SEQ ID NO:18.  
30

16. Un vector recombinante según las reivindicaciones 14 y 15, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env da lugar a una proteína que



- 115 -

reproduce la secuencia de la proteína gp120 del aislado CN54 y las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef proceden también del aislado CN54, estando representadas dichas secuencias, respectivamente, por SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:18.

5

17. Una composición que contiene al menos un vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

18. Una composición que contiene al menos un vector recombinante según la  
10 reivindicación 17 destinada a ser administrada a un individuo con el propósito de provocar o reforzar una respuesta inmune que ayude a prevenir o a tratar una infección provocada por el virus VIH.

19. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 y 18 que  
15 contiene al menos un vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12.

20. Una composición según la reivindicación 19, que contiene al menos un  
vector recombinante según la reivindicación 12.

20

21. Una composición según la reivindicación 20, destinada a ser administrada a un individuo con el propósito de provocar o reforzar una respuesta inmune que ayuda a prevenir o tratar una infección provocada por el virus VIH como parte de un protocolo de inmunización en el que se administra una primera dosis de vacunación para  
25 desencadenar la respuesta inmune y una o más dosis posteriores para reforzar la respuesta inmune inicial.

22. Una composición según la reivindicación 21, destinada a ser administrada como la primera dosis de vacunación con la que se desencadena la respuesta inmune.

30

23. Una composición según la reivindicación 21, destinada a ser administrada tras la primera dosis de vacunación como una o más de las dosis posteriores de vacunación que tienen el propósito de reforzar la respuesta inmune inicial.

5           24. Una composición según la reivindicación 21, destinada a ser administrada tanto en la primera dosis de vacunación con la que se desencadena la respuesta inmune como en una o más de las dosis posteriores de vacunación que tienen el propósito de reforzar la respuesta inmune inicial.

10           25. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 y 18 que contiene al menos un vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16.

15           26. Una composición según la reivindicación 25, que contiene al menos un vector recombinante según la reivindicación 16.

20           27. Una composición según la reivindicación 26, destinada a ser administrada a un individuo con el propósito de provocar o reforzar una respuesta inmune que ayuda a prevenir o tratar una infección provocada por el virus VIH como parte de un protocolo de inmunización en el que se administra una primera dosis de vacunación para desencadenar la respuesta inmune y una o más dosis posteriores para reforzar la respuesta inmune inicial.

25           28. Una composición según la reivindicación 27, destinada a ser administrada como la primera dosis de vacunación con la que se desencadena la respuesta inmune.

            29. Una composición según la reivindicación 27, destinada a ser administrada como una o más de las dosis posteriores de vacunación que tienen el propósito de reforzar la respuesta inmune inicial.

30

            30. Una composición según la reivindicación 27, destinada a ser administrada tanto como primera dosis de vacunación con la que se desencadena la respuesta inmune

como en una o más de las dosis posteriores de vacunación que tienen el propósito de reforzar la respuesta inmune inicial.

31. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 y 18 que  
5 contiene al menos un vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 y al menos un vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16.

32. Una composición según la reivindicación 31, que contiene al menos un  
vector recombinante según la reivindicación 12 y al menos un vector recombinante  
10 según la reivindicación 16.

33. Una composición según la reivindicación 32, destinada a ser administrada a  
un individuo con el propósito de provocar o reforzar una respuesta inmune que ayuda a  
prevenir o tratar una infección provocada por el virus VIH como parte de un protocolo  
15 de inmunización en el que se administra una primera dosis de vacunación para desencadenar la respuesta inmune y una o más dosis posteriores para reforzar la respuesta inmune inicial.

34. Una composición según la reivindicación 33, destinada a ser administrada  
20 como la primera dosis de vacunación con la que se desencadena la respuesta inmune

35. Una composición según la reivindicación 33, destinada a ser administrada  
tras la primera dosis de vacunación como una o más de las dosis posteriores de  
vacunación que tienen el propósito de reforzar la respuesta inmune inicial.

25

36. Una composición según la reivindicación 33, destinada a ser administrada  
tanto en la primera dosis de vacunación con la que se desencadena la respuesta inmune  
como en una o más de las dosis posteriores de vacunación que tienen el propósito de  
reforzar la respuesta inmune inicial.

30

37. Uso de un vector recombinante derivado del virus MVA según cualquiera de  
las reivindicaciones 1 a 16 para la fabricación de un medicamento destinado a ser

utilizado como vacuna para ayudar a prevenir o a tratar una infección provocada por el virus VIH.

38. Uso según la reivindicación 37 en el que medicamento está diseñado para ser  
5 la única vacuna que se suministre a un individuo para ayudar a prevenir o a tratar una  
infección provocada por el virus VIH.

39. Uso según la reivindicación 38 en el que el medicamento contiene al menos  
un vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 y/o al menos un vector según  
10 cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16.

40. Uso según la reivindicación 37 en el que el medicamento está diseñado para  
ser administrado como al menos una de las dosis que forman parte de un protocolo de  
inmunización en el que se administra una primera dosis de vacunación para  
15 desencadenar la respuesta inmune y una segunda o más dosis posteriores para reforzar  
la respuesta inmune inicial.

41. Uso según la reivindicación 40 en el que el medicamento está diseñado para  
ser administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación que  
20 desencadena la respuesta inmune inicial.

42. Uso según la reivindicación 41 en el que el medicamento diseñado para ser  
administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación que  
desencadena la respuesta inmune inicial contiene al menos un vector según cualquiera  
25 de las reivindicaciones 9 a 12 y/o al menos un vector según cualquiera de las  
reivindicaciones 13 a 16.

43. Uso según la reivindicación 42 en el que el medicamento diseñado para ser  
administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación que  
30 desencadena la respuesta inmune inicial contiene al menos un vector según la  
reivindicación 12 y/o al menos un vector según la reivindicación 16 y en el que el  
medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la segunda

y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial previamente desencadenada contiene al menos un vector recombinante derivado del virus NYVAC.

5 44. Uso según la reivindicación 43 en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación que desencadena la respuesta inmune inicial contiene al menos un vector según la reivindicación 12 y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial previamente desencadenada contiene al menos el vector  
10 recombinante NYVAC-B.

15 45. Uso según la reivindicación 43 en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación que desencadena la respuesta inmune inicial contiene al menos un vector según la reivindicación 16 y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial previamente desencadenada contiene al menos el vector recombinante NYVAC-C.

20 46. Uso según la reivindicación 42 en el que tanto el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación que desencadena la respuesta inmune inicial como el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial previamente desencadenada contienen al menos  
25 un vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 y/o al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16.

30 47. Uso según la reivindicación 46 en el que tanto el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación que desencadena la respuesta inmune inicial como el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas

- 120 -

a reforzar la respuesta inmune inicial previamente desencadenada contienen al menos un vector según la reivindicación 12.

5 48. Uso según la reivindicación 46 en el que tanto el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación que desencadena la respuesta inmune inicial como el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial previamente desencadenada contienen al menos un vector según la reivindicación 16.

10

49. Uso según la reivindicación 40, en el que el medicamento está diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial previamente desencadenada.

15

50. Uso según la reivindicación 49 en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial previamente desencadenada contiene al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 y/o al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16.

20

51. Uso según la reivindicación 50 en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial previamente desencadenada contiene al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 y/o al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación que desencadena la respuesta inmune inicial contiene al menos un vector recombinante derivado del virus NYVAC.

25

30

52. Uso según la reivindicación 51 en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial previamente desencadenada contiene al menos un

vector según la reivindicación 12 y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación que desencadena la respuesta inmune inicial contiene al menos el vector recombinante NYVAC-B.

5

53. Uso según la reivindicación 51 en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial previamente desencadenada contiene al menos un vector según la reivindicación 16 y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación que desencadena la respuesta inmune inicial contiene al menos el vector recombinante NYVAC-C.

54. Uso según la reivindicación 50 en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial previamente desencadenada contiene al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 y/o al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación que desencadena la respuesta inmune inicial contiene al menos un plásmido recombinante que contiene secuencias codificantes de antígenos del VIH-1.

55. Uso según la reivindicación 54 en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial previamente desencadenada contiene al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 y/o al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación que desencadena la respuesta inmune inicial contiene al menos un plásmido recombinante que contiene secuencias codificantes de antígenos del VIH-1 que están presentes también en al menos uno de los vectores según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12

o según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 que forman parte o constituyen la segunda dosis y/o dosis posteriores de vacunación.

56. Uso según la reivindicación 55 en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial previamente desencadenada contiene al menos un vector según la reivindicación 12 y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación que desencadena la respuesta inmune inicial contiene al menos el plásmido recombinante DNA-B.

57. Uso según la reivindicación 55 en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la segunda y/o dosis posteriores destinadas a reforzar la respuesta inmune inicial previamente desencadenada contiene al menos un vector según la reivindicación 16 y en el que el medicamento diseñado para ser administrado como parte de o constituyendo la primera dosis de vacunación que desencadena la respuesta inmune inicial contiene al menos el plásmido recombinante DNA-C.

58. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH-1 que comprende administrar al sujeto al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 36 para desencadenar y/o potenciar una respuesta inmune contra el VIH.

59. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH-1 según la reivindicación 58, que comprende administrar al sujeto una única dosis de vacunación, comprendiendo la dosis al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 36, para desencadenar una respuesta inmune contra el VIH.



60. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH según la reivindicación 58, que comprende administrar al sujeto más de una dosis de vacunación, comprendiendo al menos una de las dosis al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 36, para desencadenar y/o potenciar una respuesta inmune contra el VIH.

61. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH-1 según la reivindicación 60, que comprende administrar al sujeto más de una dosis de vacunación, comprendiendo tanto la primera como la segunda dosis de vacunación al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 36.

62. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH según la reivindicación 61 que comprende administrar al sujeto más de una dosis de vacunación, comprendiendo tanto la primera como la segunda dosis de vacunación al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12.

63. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH-1 según la reivindicación 61, que comprende administrar al sujeto más de una dosis de vacunación, comprendiendo tanto la primera como la segunda dosis de vacunación al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16.

64. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH-1 según la reivindicación 60 que comprende administrar al sujeto más de una dosis de vacunación, comprendiendo la primera dosis de vacunación al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 36 y estando ausente de las sucesivas dosis de vacunación cualquier vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

30

65. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH según la reivindicación 64 que comprende administrar al sujeto más de una

dosis de vacunación, comprendiendo la primera dosis de vacunación al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 y estando ausente de las sucesivas dosis de vacunación cualquier vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

5           66. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH según la reivindicación 64 que comprende administrar a un sujeto más de una dosis de vacunación, comprendiendo la primera dosis de vacunación al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16 y estando ausente de las sucesivas dosis de vacunación cualquier vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

10

67. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH-1 según la reivindicación 60 que comprende administrar a un sujeto más de una dosis de vacunación, comprendiendo una dosis distinta de la primera al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y estando ausente de las sucesivas  
15 dosis de vacunación cualquier vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

68. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH-1 según la reivindicación 67 que comprende administrar a un sujeto más de una dosis de vacunación, comprendiendo una dosis distinta de la primera al menos un  
20 vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 y estando ausente de las sucesivas dosis de vacunación cualquier vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

69. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH según la reivindicación 68 que comprende administrar a un sujeto más de una  
25 dosis de vacunación, comprendiendo una dosis distinta de la primera al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, estando ausente de las sucesivas dosis de vacunación cualquier vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y estando presente en la primera dosis de vacunación un vector que expresa las mismas proteínas que el vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12.

30

70. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH-1 según la reivindicación 69 que comprende administrar a un sujeto más de

una dosis de vacunación, comprendiendo una dosis distinta de la primera al menos un vector según la reivindicación 12, estando ausente de las sucesivas dosis de vacunación cualquier vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y estando presente en la primera dosis de vacunación el vector NYVAC-B.

5

71. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH-1 según la reivindicación 69 que comprende administrar a un sujeto más de una dosis de vacunación, comprendiendo una dosis distinta de la primera al menos un vector según la reivindicación 12, estando ausente de las sucesivas dosis de vacunación cualquier vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y estando presente en la primera dosis de vacunación el plásmido DNA-B.

72. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH-1 según la reivindicación 67 que comprende administrar a un sujeto más de una dosis de vacunación, comprendiendo una dosis distinta de la primera al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, estando ausente de las sucesivas dosis de vacunación cualquier vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

73. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH según la reivindicación 72, que comprende administrar a un sujeto más de una dosis de vacunación, comprendiendo una dosis distinta de la primera al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, estando ausente de las sucesivas dosis de vacunación cualquier vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y estando presente en la primera dosis de vacunación un vector que expresa las mismas proteínas que el vector según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 presente en al menos una dosis de vacunación distinta de la primera.

74. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH según la reivindicación 73, que comprende administrar a un sujeto más de una dosis de vacunación, comprendiendo una dosis distinta de la primera un vector según la reivindicación 16, estando ausente de las sucesivas dosis de vacunación

cualquier vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y estando presente en la primera dosis de vacunación el vector NYVAC-C.

75. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH según la reivindicación 73, que comprende administrar a un sujeto más de una dosis de vacunación, comprendiendo una dosis distinta de la primera un vector según la reivindicación 16, estando ausente de las sucesivas dosis de vacunación cualquier vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y estando presente en la primera dosis de vacunación el plásmido DNA-C.

10

76. Un vector recombinante derivado del virus MVA capaz de expresar simultáneamente una forma de la proteína Env del VIH-1 que carece de la parte correspondiente a la proteína gp41 en su totalidad y una proteína de fusión que contiene secuencias de las proteínas Gag, Pol y Nef del virus de la inmunodeficiencia de simio, SIV, estando la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env y la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef bajo el control de promotores idénticos e insertadas ambas secuencias en el mismo lugar de inserción del vector.

20

77. Un vector recombinante derivado del virus MVA según la reivindicación 76, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env y la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef se encuentran insertadas en el *locus* de la timidina quinasa de forma que se inactiva dicho gen.

25

78. Un vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 76 y 77, en el que tanto la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env como las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef se generan a partir de las secuencias de proteínas Env, Gag, Pol y Nef de virus quiméricos de la inmunodeficiencia de simio y humano, SHIV.

30

79. Un vector recombinante derivado del virus MVA según la reivindicación 78, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env se ha generado

realizando en ella modificaciones en la secuencia correspondiente destinada a eliminar la expresión de la proteína gp41 de manera que se ha eliminado toda la secuencia del gen env que en la secuencia natural de dicho gen aparece tras el último triplete correspondiente a la proteína gp120.

5

80. Un vector recombinante derivado del virus MVA según cualquiera de las reivindicaciones 78 y 79, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión Gag-Pol-Nef no se proteoliza por acción de la proteasa retroviral.

10

81. Un vector recombinante derivado del virus MVA según cualquiera de las reivindicaciones 76 a 80, en el que los promotores bajo cuyo control están la secuencia correspondiente a la proteína Env y la secuencia correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef son promotores idénticos que permiten la expresión de la proteína de fusión Gag-Pol-Nef y de la proteína Env carente de la parte correspondiente a la proteína gp41 en su totalidad tanto en etapas tempranas como tardías del ciclo infectivo del virus MVA.

15

82. Un vector recombinante derivado del virus MVA según la reivindicación 81, en el que los promotores bajo cuyo control están la secuencia correspondiente a la proteína Env y la secuencia correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef son promotores sintéticos pE/L.

20

83. Un vector recombinante según las reivindicaciones 76 a 82, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env y la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef se encuentran insertadas en el *locus* de la timidina quinasa de forma que se inactiva dicho gen, la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env se ha generado eliminando toda la secuencia del gen env que en la secuencia natural de dicho gen aparece tras el último triplete correspondiente a la proteína gp120, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión Gag-Pol-Nef da lugar a una poliproteína que no se proteoliza por acción de la proteasa retroviral y los promotores bajo cuyo control están

25

30

la secuencia correspondiente a la proteína Env y la secuencia correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef son promotores sintéticos pE/L.

5 84. Un vector recombinante según la reivindicación 83, en el que tanto la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env como las secuencias utilizadas para generar la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef proceden del virus quimérico SHIV89.6P.

10 85. Un vector recombinante según la reivindicación 84, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env está representada por SEQ ID NO:22.

15 86. Un vector recombinante según la reivindicación 84, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef está representada por SEQ ID NO:23

87. Un vector recombinante según las reivindicaciones 85 y 86 que comprende un inserto cuya secuencia está representada por SEQ ID NO:24

20 88. Una composición que comprende al menos un vector recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 76 a 87.

89. Una composición según la reivindicación 88 que comprende adicionalmente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 90. Uso de un vector recombinante derivado del virus MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 76 a 87 o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 88 u 89 para evaluar la eficacia como vacuna de un vector derivado del virus MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que presenta la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores  
30 que el vector según una cualquiera de las reivindicaciones 76 a 87.

91. Uso según la reivindicación 90, en el que la eficacia como vacuna del vector derivado de MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 se evalúa tras administrar a macacos un vector recombinante derivado del virus MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 76 a 87 o una composición que lo comprende, en el que dicho vector derivado de MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 76 a 87 presenta la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que el vector según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

92. Uso según la reivindicación 91, en el que la eficacia como vacuna de un vector derivado de MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 se evalúa a partir de la capacidad para controlar el desarrollo de síndrome de inmunodeficiencia de simio que muestra la respuesta inmune generada en los macacos a los que se les ha administrado el vector recombinante derivado del virus MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 76 a 87 o una composición que lo comprende, en el que dicho vector derivado de MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 76 a 87 presenta la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que el vector según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

93. Uso según la reivindicación 92, en el que la capacidad para controlar el desarrollo de síndrome de inmunodeficiencia de simio de la respuesta inmune generada en los macacos a los que se les ha administrado el vector recombinante derivado del virus MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 76 a 87 o la composición que lo comprende se evalúa tras inocular a los macacos una forma patógena de un virus quimérico de la inmunodeficiencia de simio y humana, SHIV, con posterioridad a la administración del vector recombinante derivado del virus MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 76 a 87 o de la composición que lo comprende.

94. Uso según la reivindicación 93, en el que la capacidad para controlar el desarrollo de síndrome de inmunodeficiencia de simio de la respuesta inmune generada en los macacos a los que se les ha administrado o el vector recombinante derivado del virus MVA o la composición que lo comprende se evalúa mediante la valoración del número de copias de ARN del virus SHIV inoculado presentes en el plasma de los

macacos transcurridos al menos 10 días desde el momento de la inoculación del virus SHIV.

5 95. Uso según la reivindicación 94, en el que la forma patógena de virus quimérico de la inmunodeficiencia de simio y humana inoculada es el SHIV89.6P.

96. Uso según la reivindicación 95, en el que el SHIV89.6P se inoculara por vía intravenosa.

10 97. Uso según la reivindicación 96, en el que el vector recombinante derivado del virus MVA que se ha administrado a los macacos previamente a la inoculación del SHIV89.6P es un vector de la reivindicación 87.

15 98. Uso según la reivindicación 97, en el que el vector según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que presenta la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que el vector de la reivindicación 87 es el vector MVA-B y/o el vector MVA-C.

20 99. Uso según la reivindicación 98, en el que el vector de la reivindicación 87 se administra a los macacos en una o más dosis de vacunación de potenciación de la respuesta inmune.

100. Uso según la reivindicación 99, en el que el vector de la reivindicación 87 se administra a los macacos en la tercera dosis de vacunación.

25 101. Uso según la reivindicación 100, en el que el vector de la reivindicación 87 se administra a los macacos adicionalmente en una cuarta dosis de vacunación.

30 102. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 100 ó 101, en el que el vector de la reivindicación 87 está ausente de la primera y/o de la segunda dosis de vacunación administradas a los macacos.



103. Uso según la reivindicación 102, en el que el vector de la reivindicación 87 está ausente de la primera y de la segunda dosis de vacunación administradas a los macacos.

5           104. Uso según la reivindicación 103, en el que la primera y la segunda dosis de vacunación comprenden un vector de ADN desnudo a partir del cual pueden expresarse en los macacos antígenos del SHIV89.6P

10           105. Uso según la reivindicación 99, en el que el vector de la reivindicación 87 se administra por vía intramuscular.

15           106. Un vector recombinante derivado del virus NYVAC que presenta la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que un vector de una cualquiera de las reivindicaciones 76 a 87.

20           107. Un vector recombinante derivado del virus NYVAC según la reivindicación 106 que comprende un inserto cuya secuencia está representada por SEQ ID NO:24

25           108. Uso de un vector recombinante derivado del virus NYVAC según una cualquiera de las reivindicaciones 106 ó 107 que presenta la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que el vector derivado de MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 76 a 87 como control en un procedimiento en el que se evalúa la eficacia como vacuna de un vector derivado del virus MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 mediante el uso del vector según una cualquiera de las reivindicaciones 76 a 87 que presenta la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que el vector derivado de MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

30           109. Uso según la reivindicación 108 en el que el vector recombinante derivado del virus NYVAC es el vector de la reivindicación 107 y el vector recombinante derivado de MVA que se utiliza en el procedimiento en el que se evalúa la eficacia

- 132 -

como vacuna de otro vector recombinante derivado del virus MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 es un vector recombinante de la reivindicación 12.

5           110. Uso según la reivindicación 109, en el que se evalúa la eficacia como vacuna del vector MVA-B y/o del vector MVA-C.

10           111. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH-1 según la reivindicación 60, en el que el vector según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 se administra como parte de un protocolo de vacunación en una o más dosis de potenciación de la respuesta inmune.

15           112. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH-1 según la reivindicación 111, en el que el vector según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 está comprendido en la tercera dosis de vacunación.

20           113. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH-1 según la reivindicación 111, en el que el vector según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 está comprendido en la cuarta dosis de vacunación

25           114. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH-1 según la reivindicación 111, en el que el vector según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 está comprendido en la tercera y en la cuarta dosis de vacunación.

30           115. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH-1 según la reivindicación 114, en el que la primera y la segunda dosis de vacunación comprenden un vector de ADN desnudo que expresa antígenos del VIH-1 en células humanas.

116. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH-1 según la reivindicación 115, en el que el vector derivado de MVA comprendido en las dosis de vacunación es MVA-B.

5 117. Un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por el virus VIH-1 según la reivindicación 115, en el que el vector derivado de MVA comprendido en las dosis de vacunación es MVA-C.

10 118. Un plásmido útil como intermedio en la obtención de un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 76 a 87 y/o en su caracterización que posee un inserto con las mismas secuencias codificantes que el vector recombinante derivado de MVA en cuya obtención se pueda utilizar, secuencias que se encuentran bajo el control de promotores idénticos situados en la misma disposición relativa uno con respecto al otro que deba presentar el correspondiente inserto en el genoma del vector recombinante  
15 derivado de MVA, y en el que el inserto esté flanqueado, en uno de sus extremos, por una secuencia correspondiente a uno de los extremos del locus que suponga el lugar de inserción en el genoma del vector recombinante y, en el otro extremo, por una secuencia más corta correspondiente al extremo contrario de dicho locus, presentando el plásmido adicionalmente un gen marcador situado entre la secuencia corta flanqueante del inserto  
20 y una secuencia más larga correspondiente al mismo extremo del locus del vector recombinante derivado de MVA en el que deba insertarse el inserto, todo ello en una disposición análoga a la del último plásmido representado en la Fig. 41b.

25 119. Plásmido según la reivindicación 118, en el que las secuencias flanqueantes corresponden al locus de timidina quinasa, las secuencias codificantes presentes en el inserto corresponden a las de las proteínas 89.6P-gp120 y SIVgpn, los promotores idénticos bajo cuyo control se encuentran dichas secuencias codificantes son promotores sintéticos pE/L y el gen marcador es LAC-Z.

30 120. Plásmido según la reivindicación 119, que es el plásmido pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18.

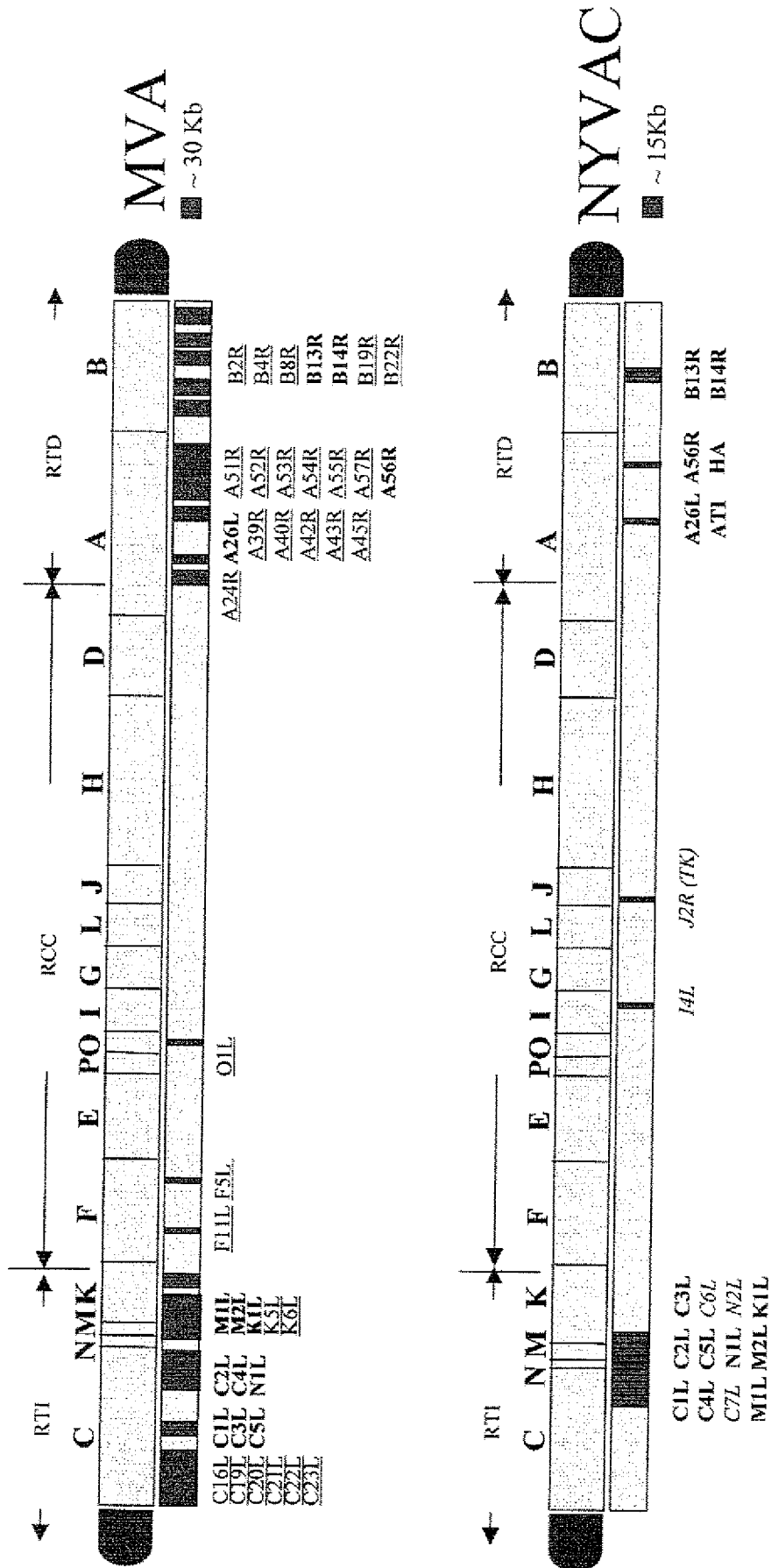


Figure 1

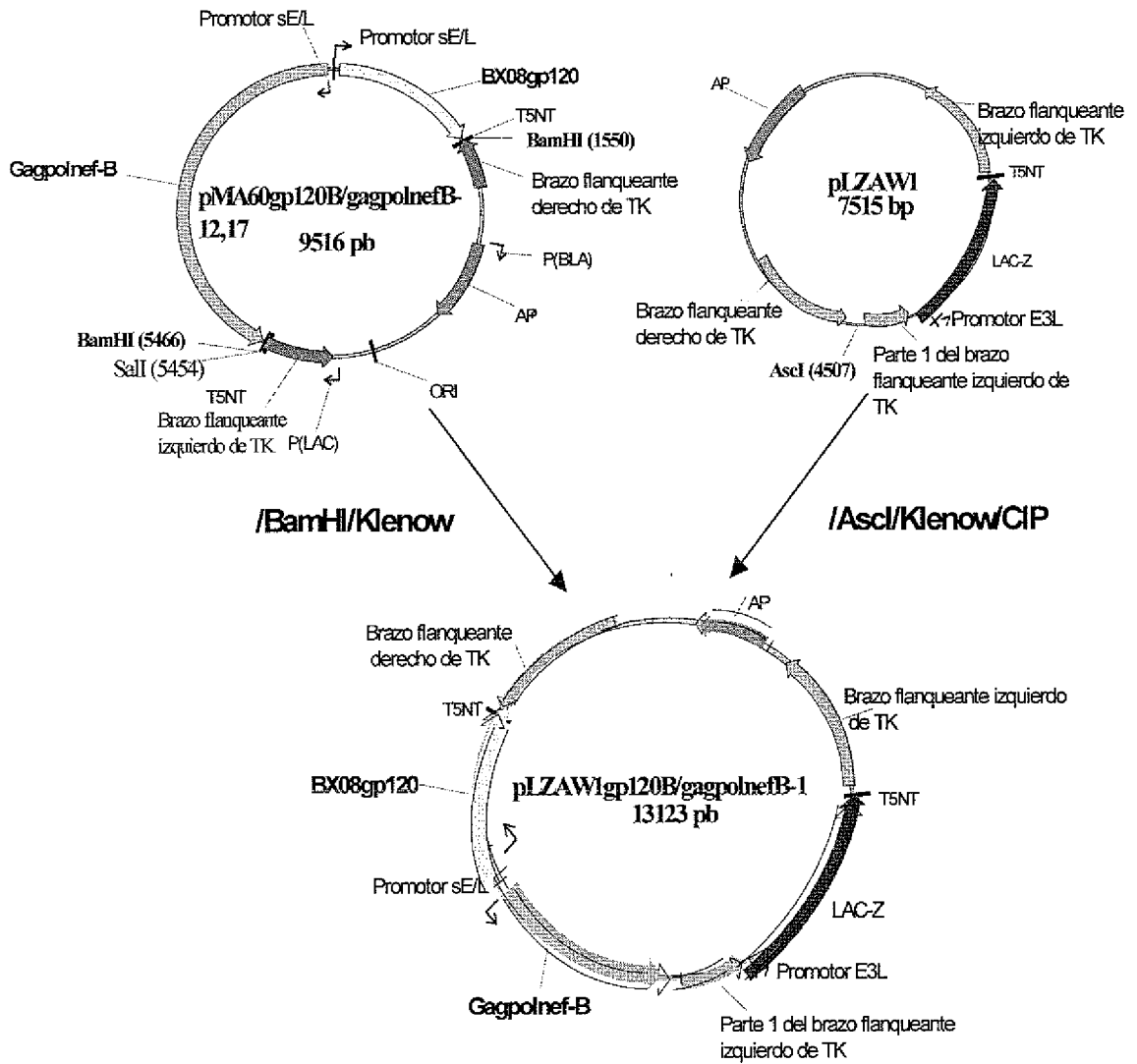


Figura 2

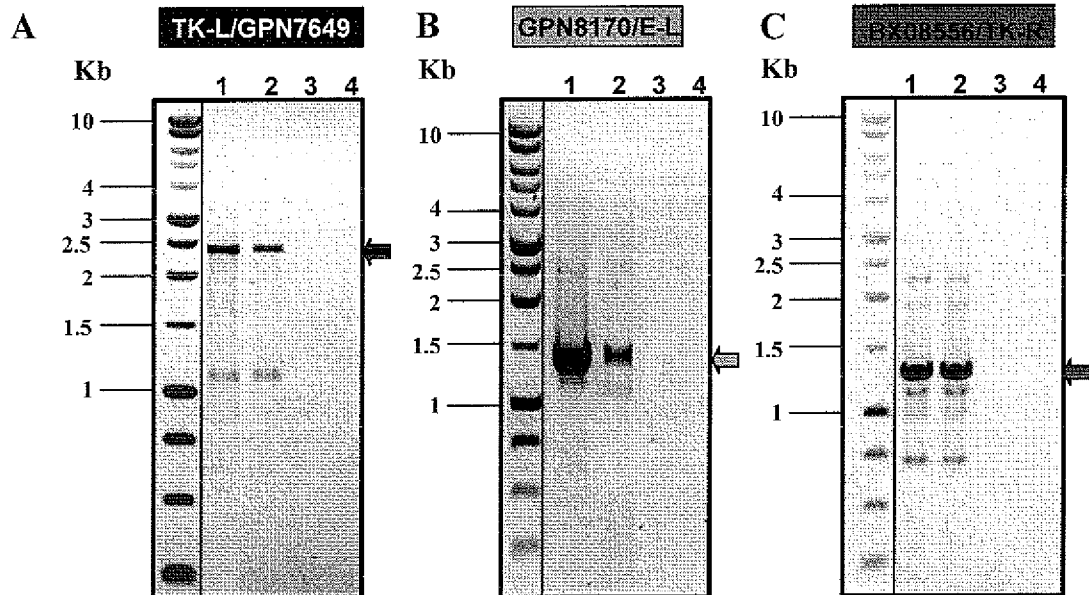
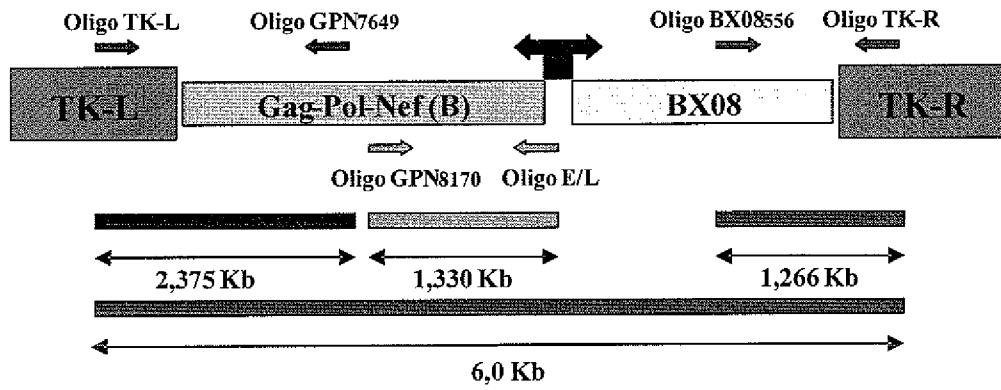


Figura 3

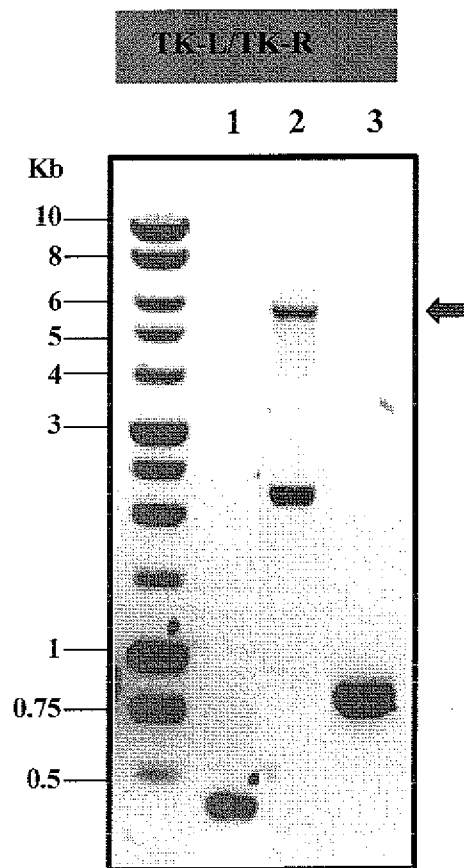


Figura 4

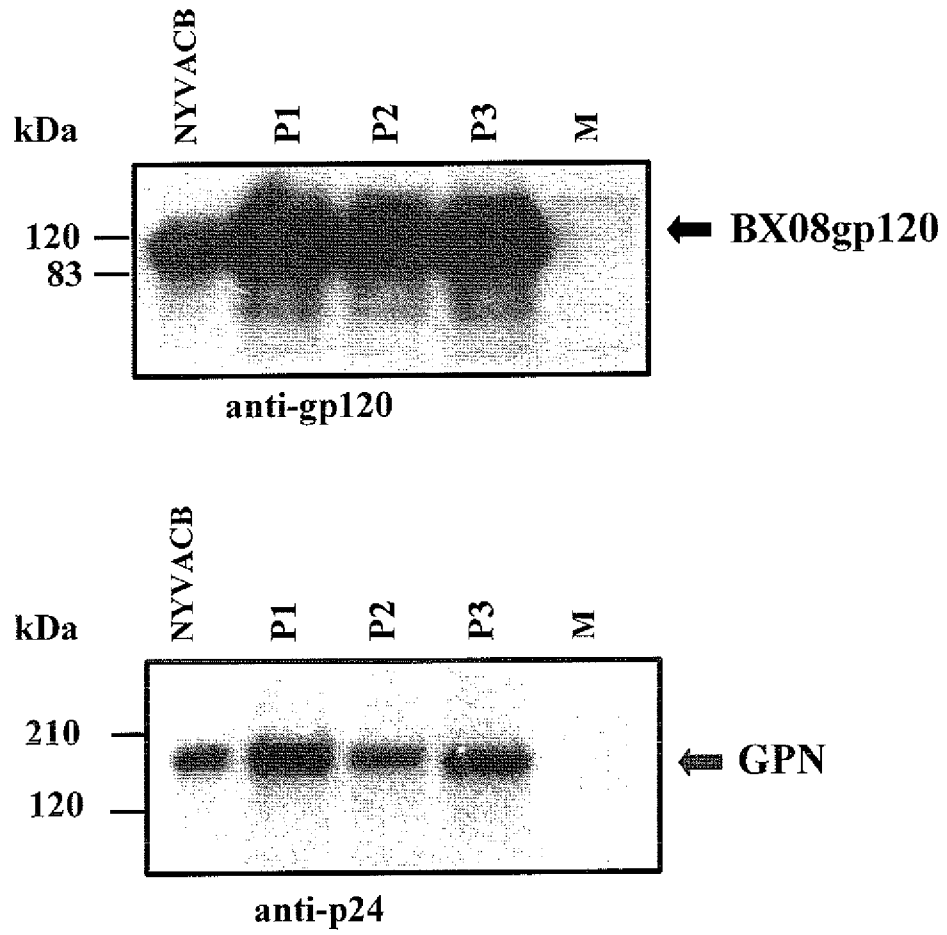
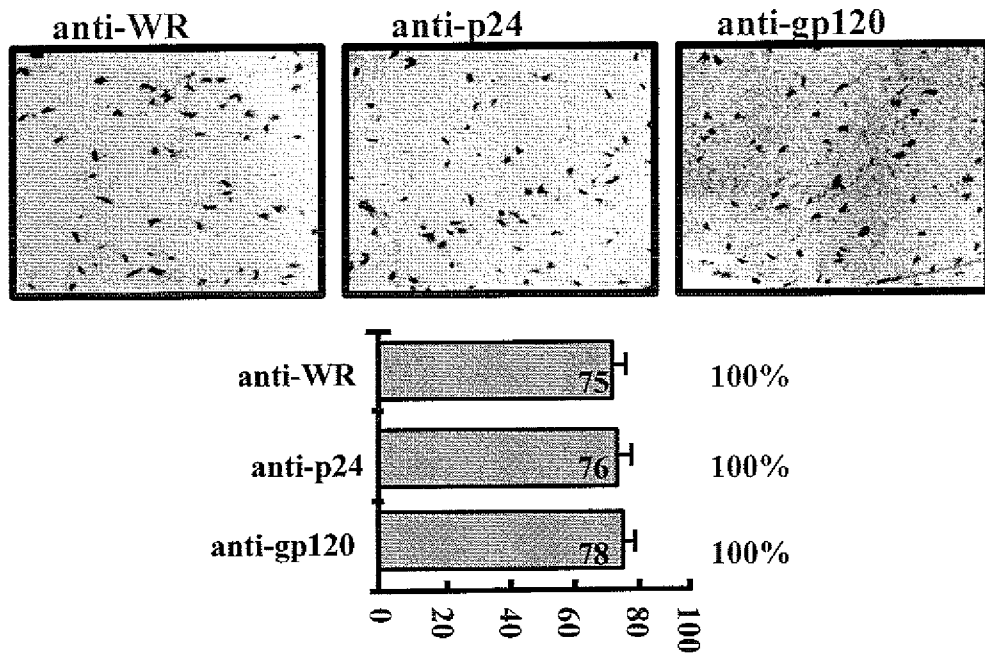


Figura 5



A



B

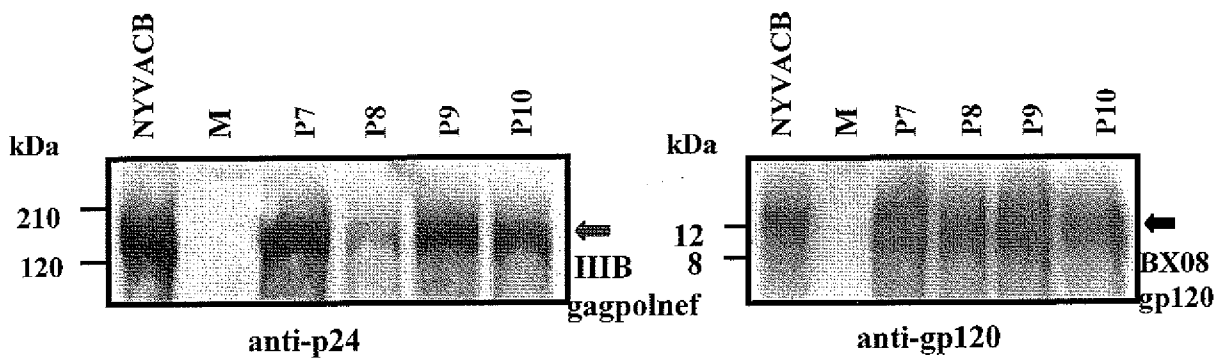
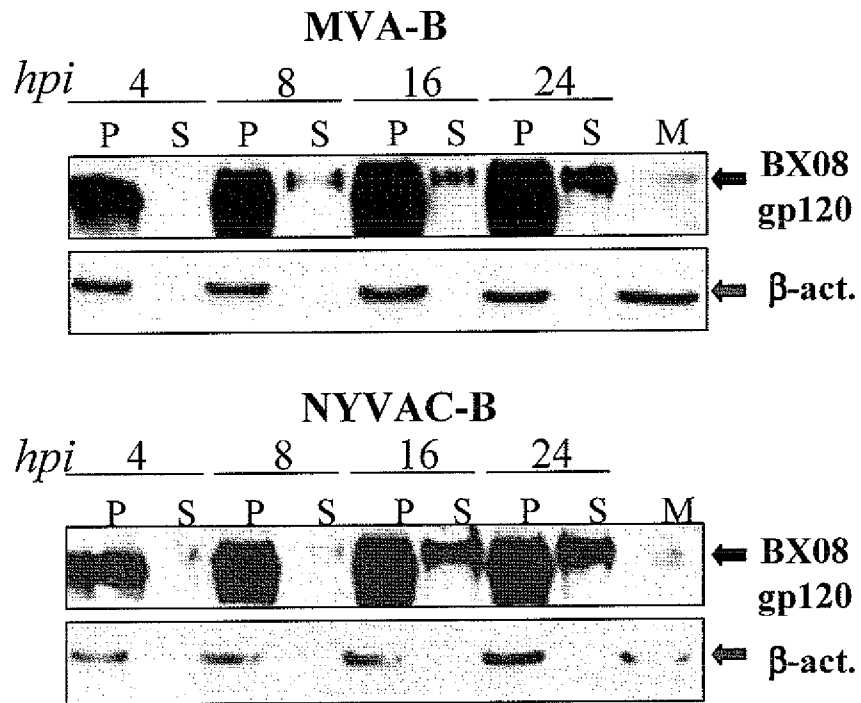
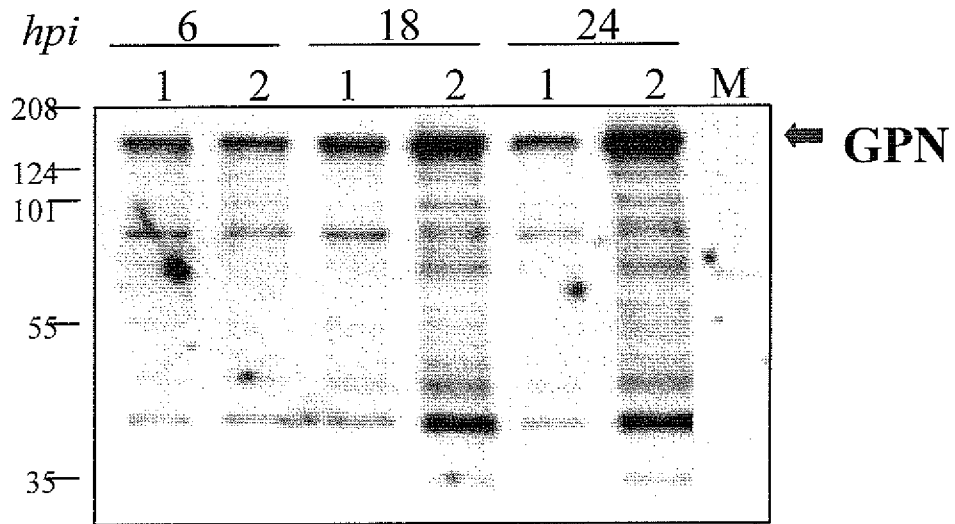


Figura 6



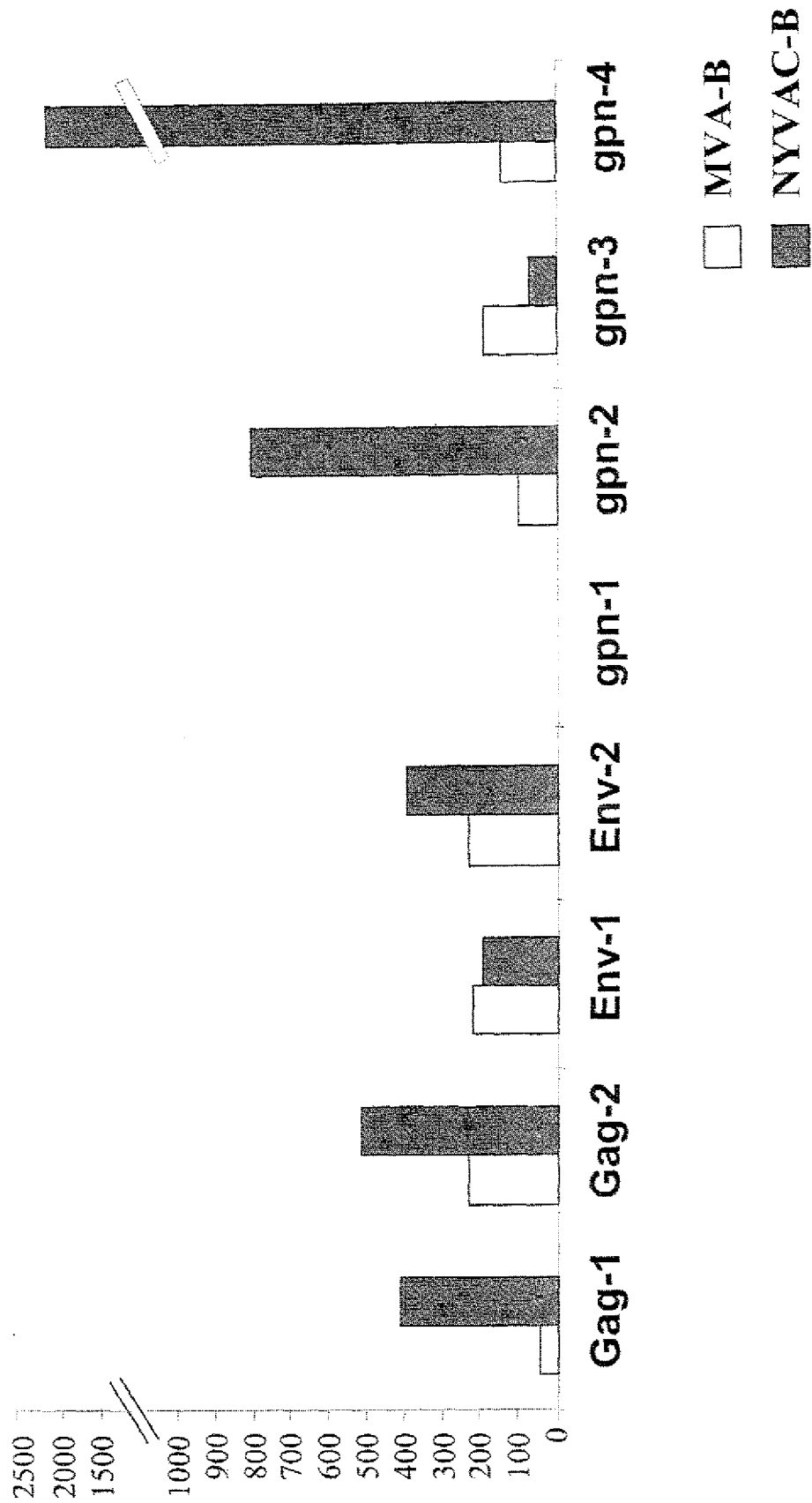
**Figura 7**

### Gag-Pol-Nef (B)



1: NYVAC-B 2: MVA-B

Figura 8



**Figura 9**

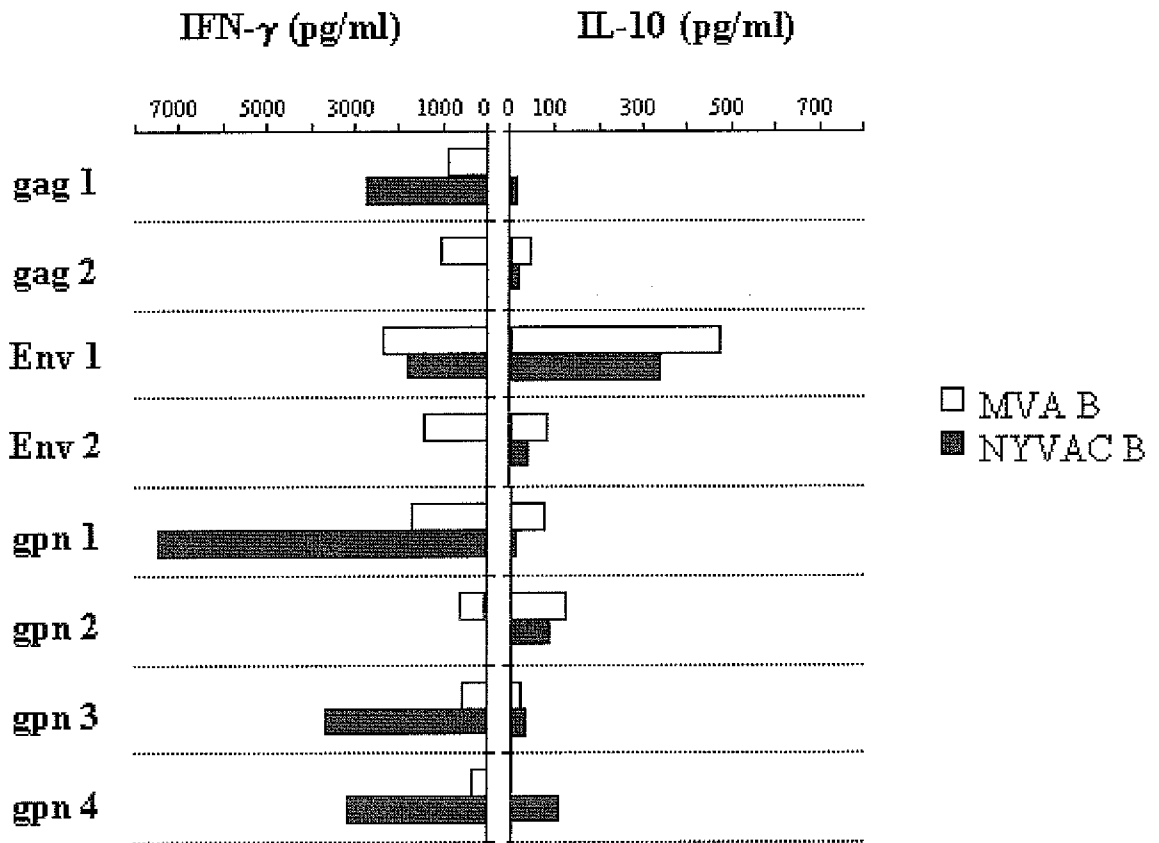


Figura 10

11/60

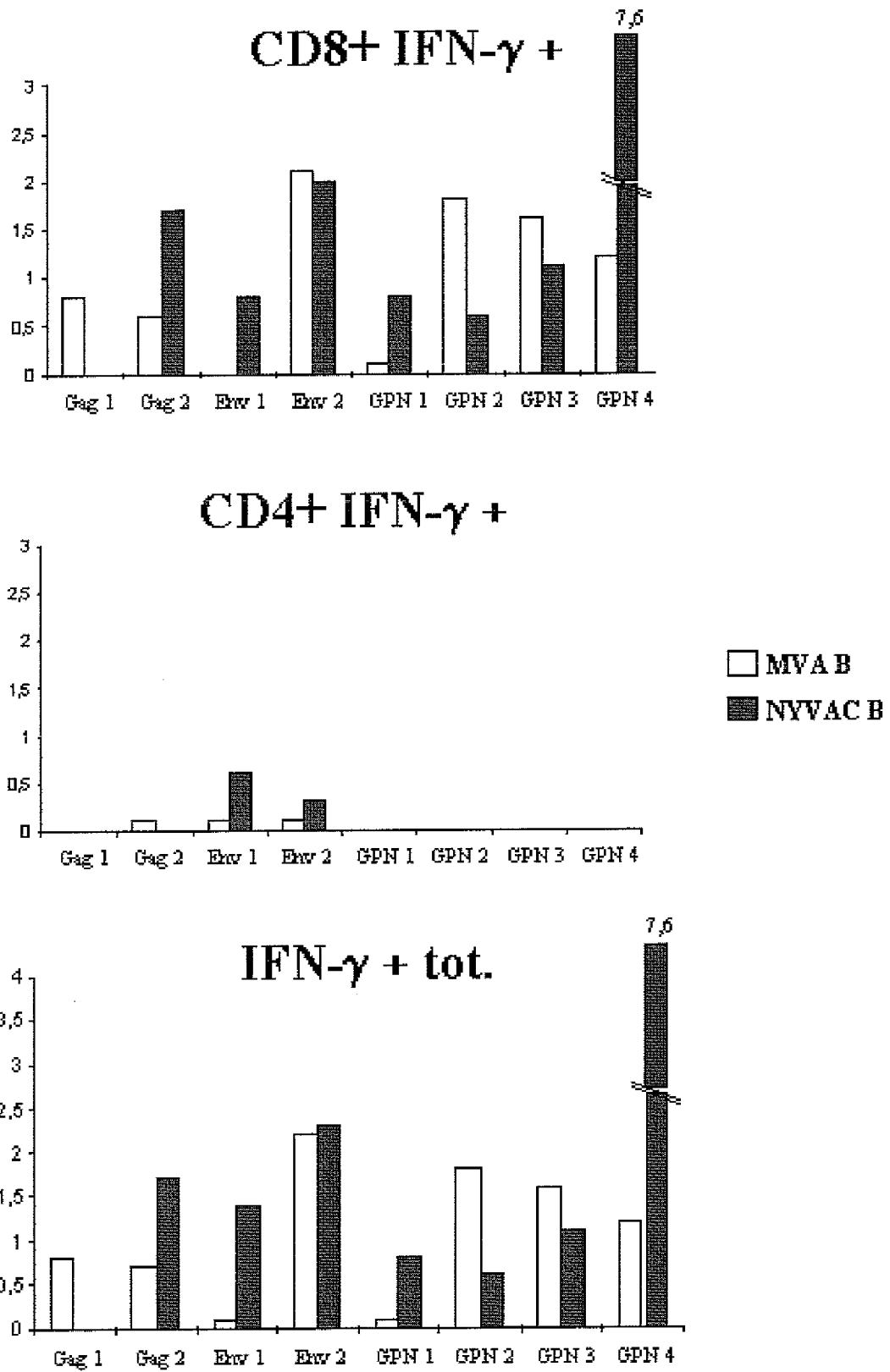


Figura 11

12/60

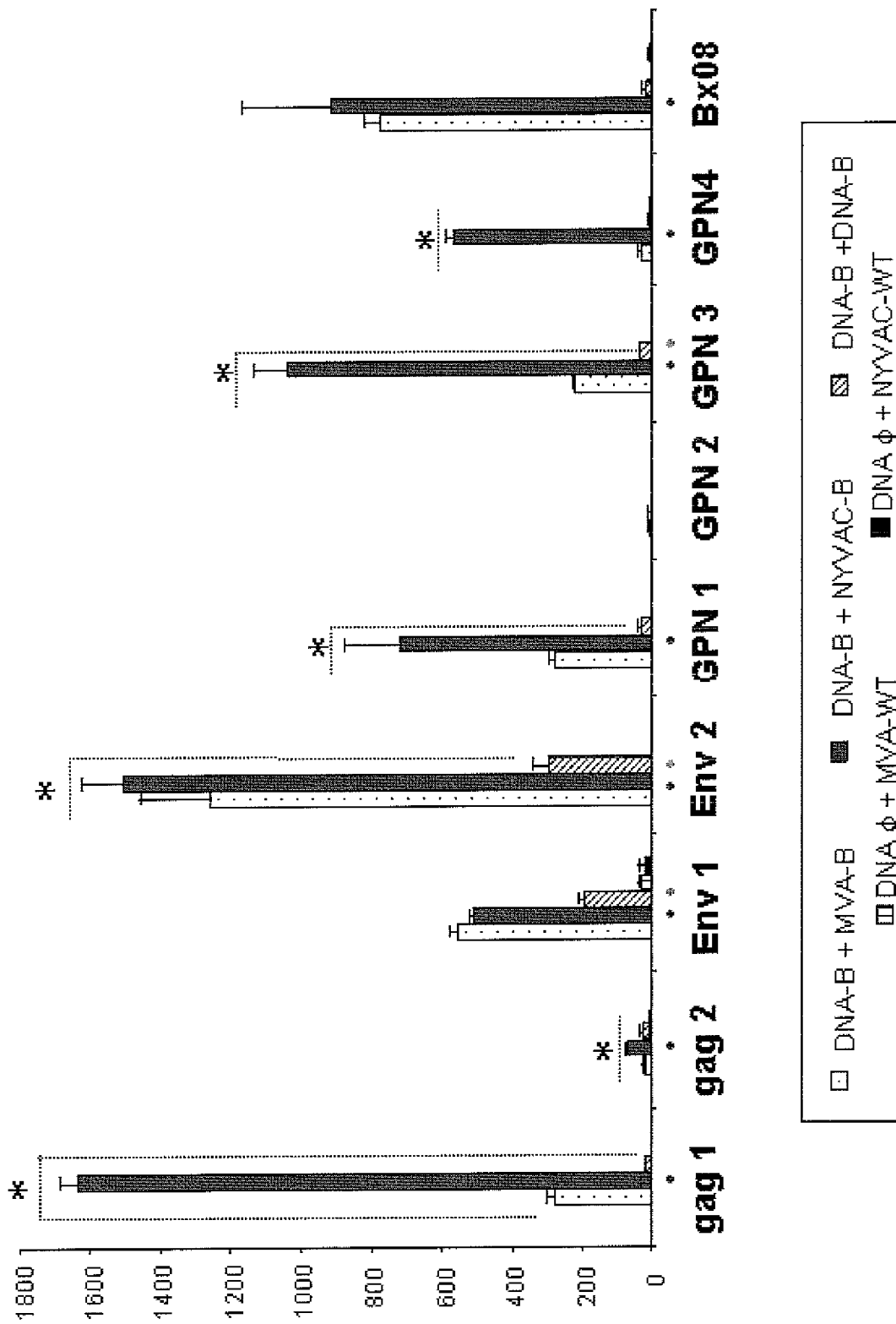
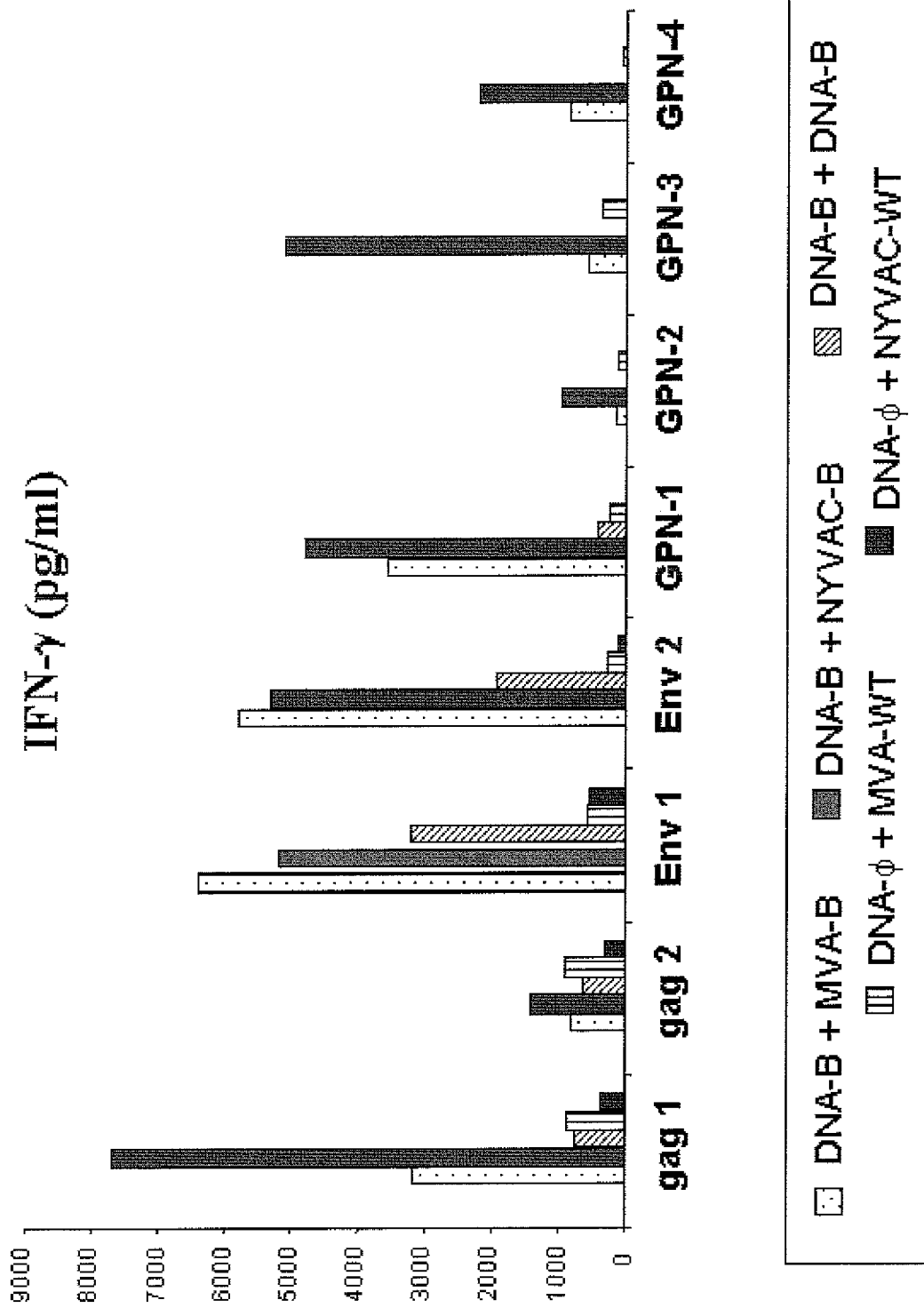


Figure 12



**Figura 13**



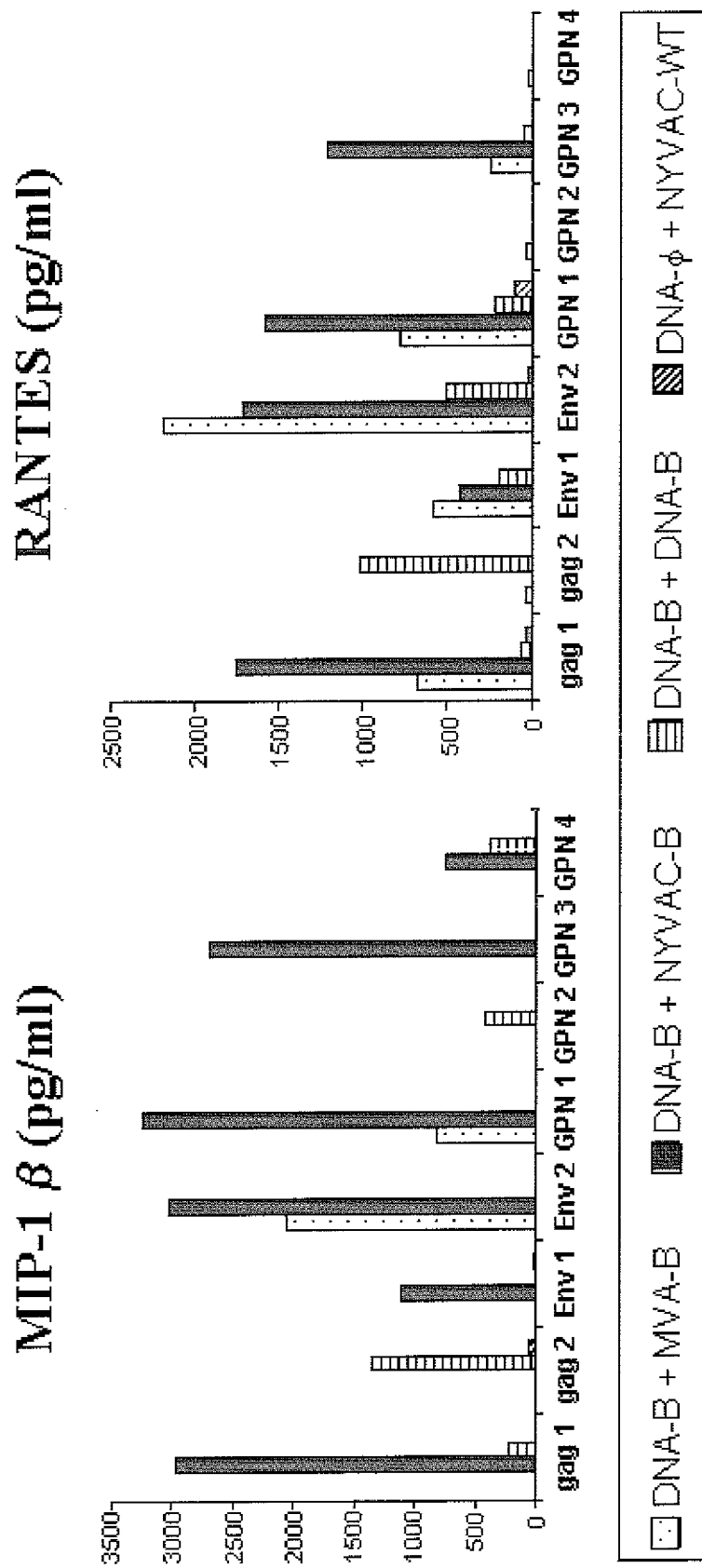


Figura 14

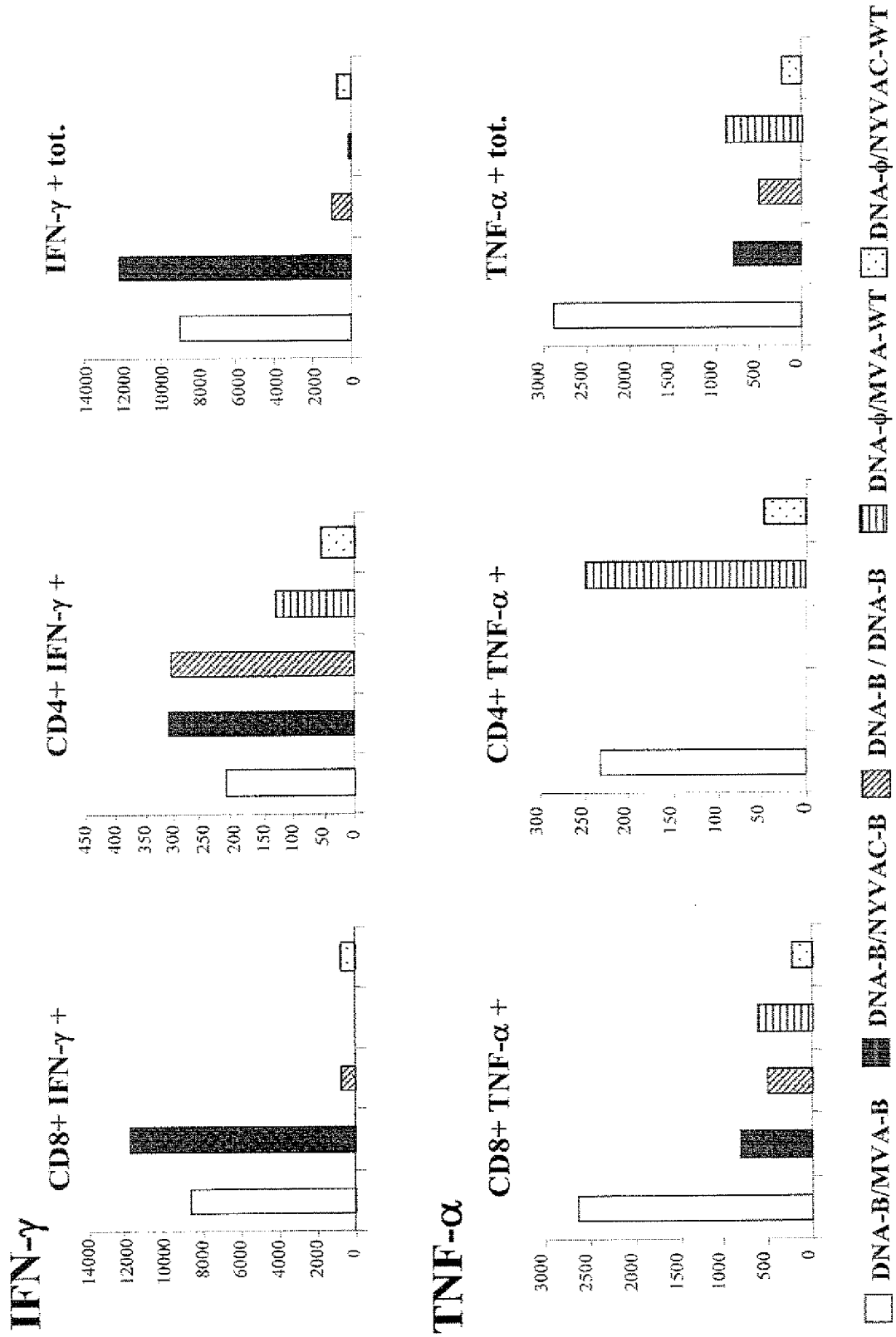


Figura 15

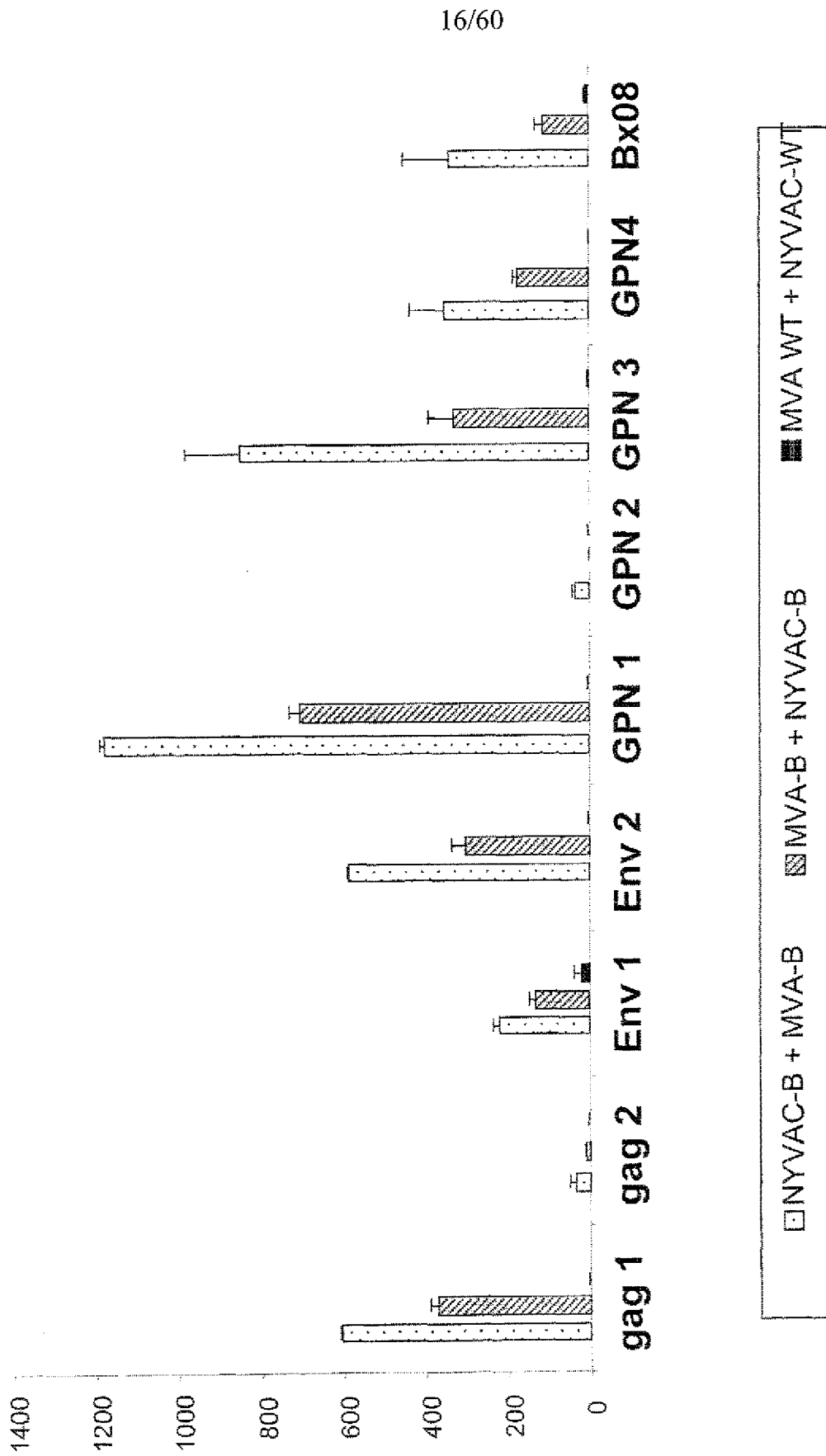
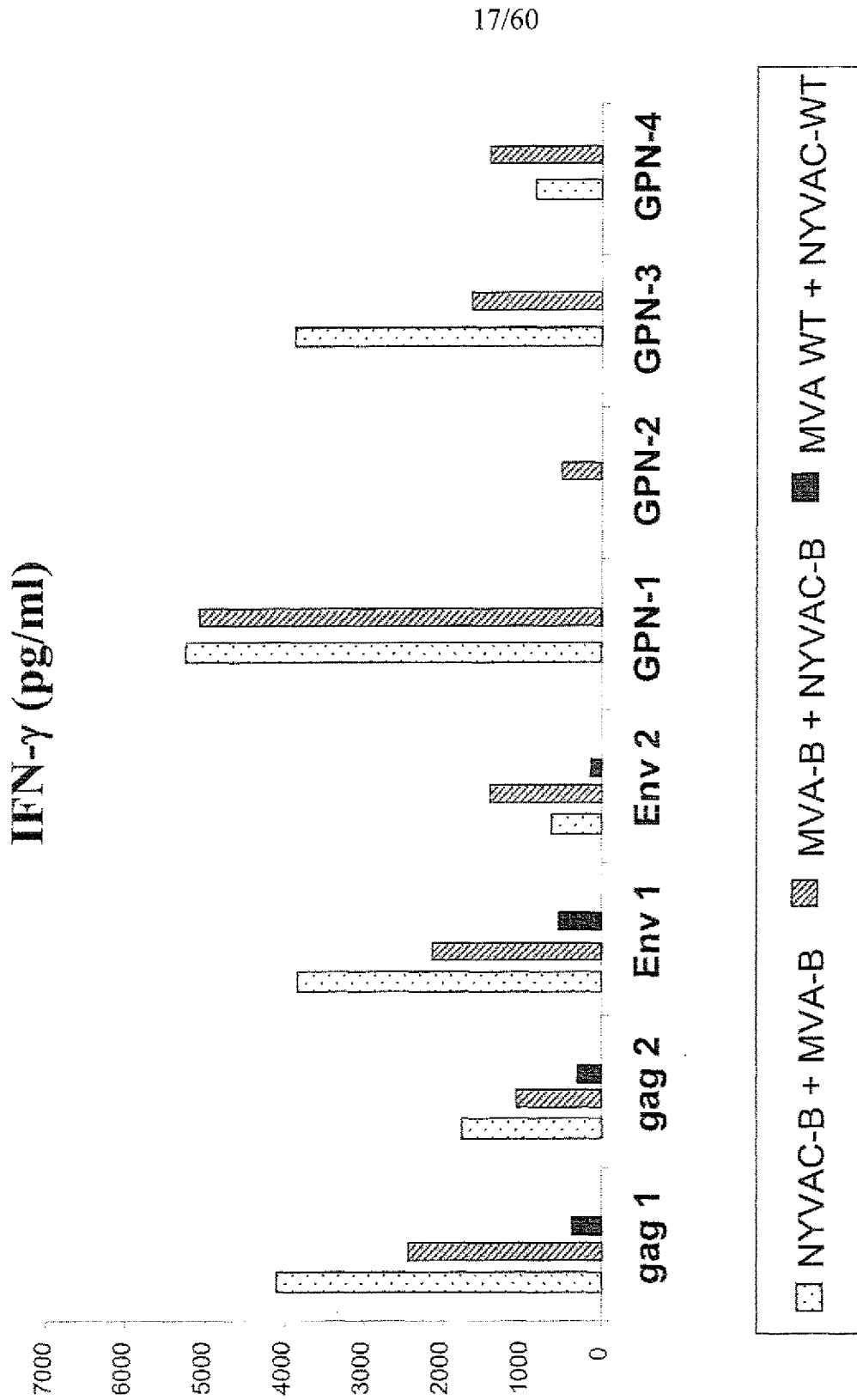


Figure 16



**Figura 17**

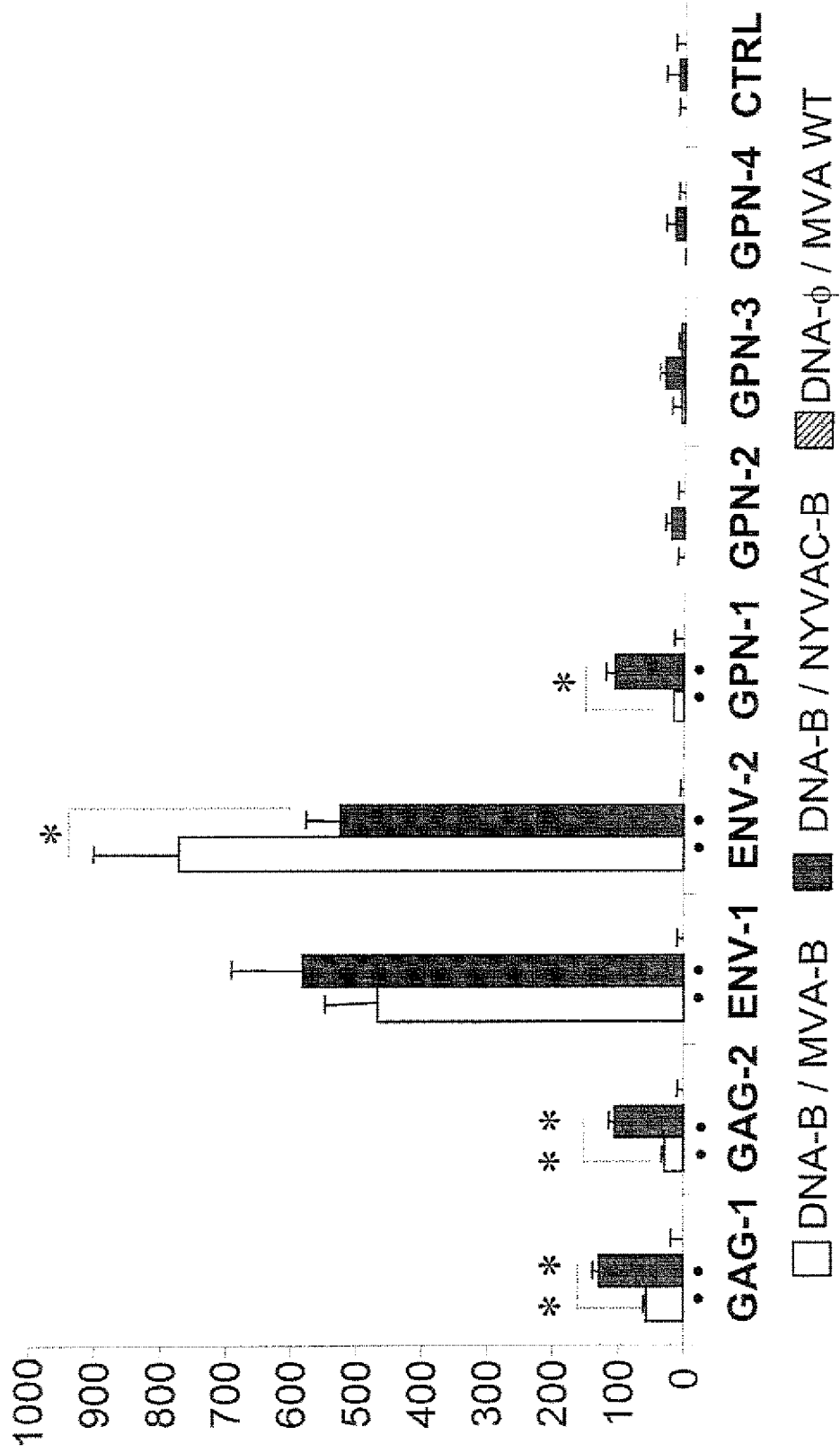


Figura 18

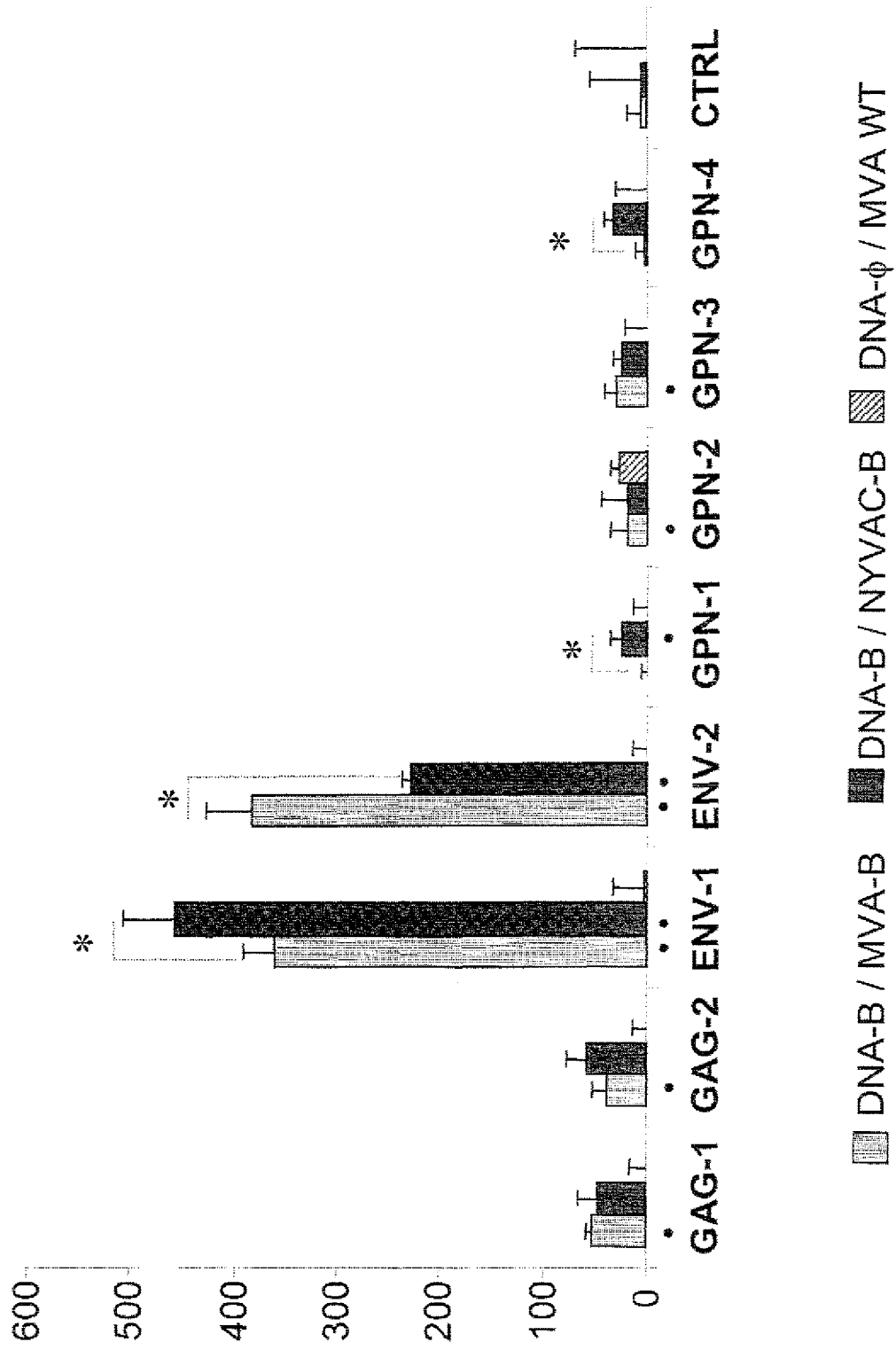


Figura 19

20/60

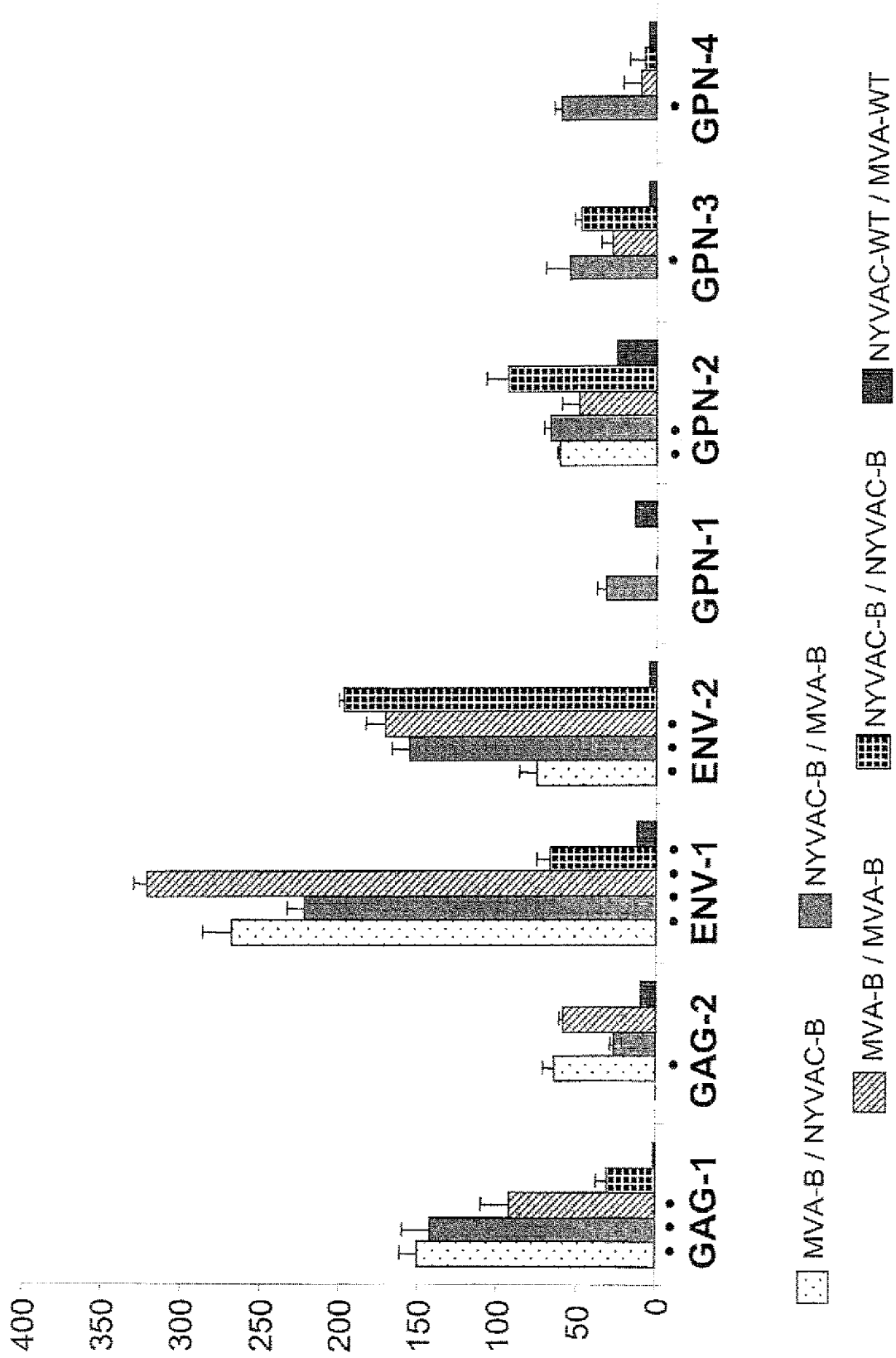


Figura 20

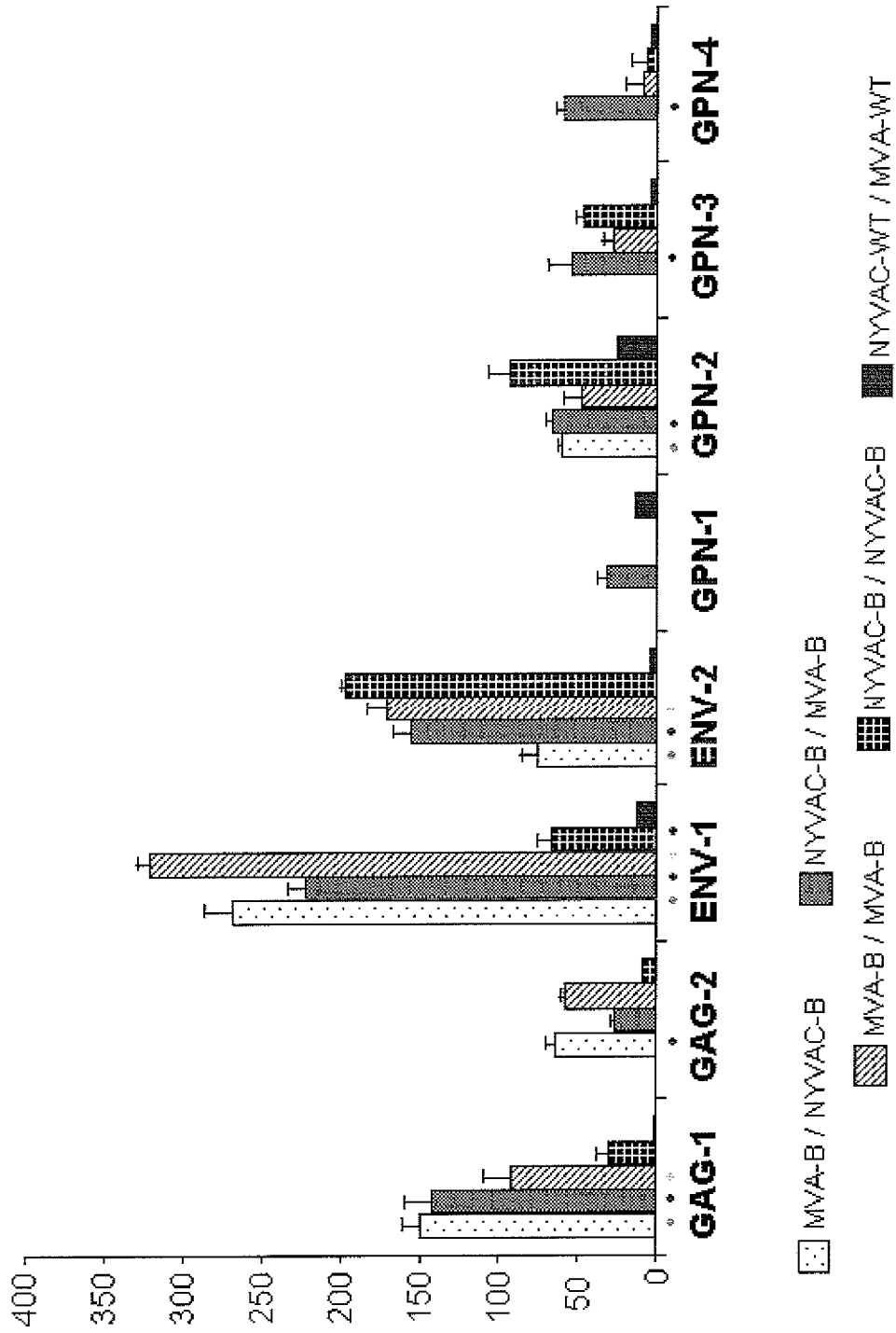


Figure 21



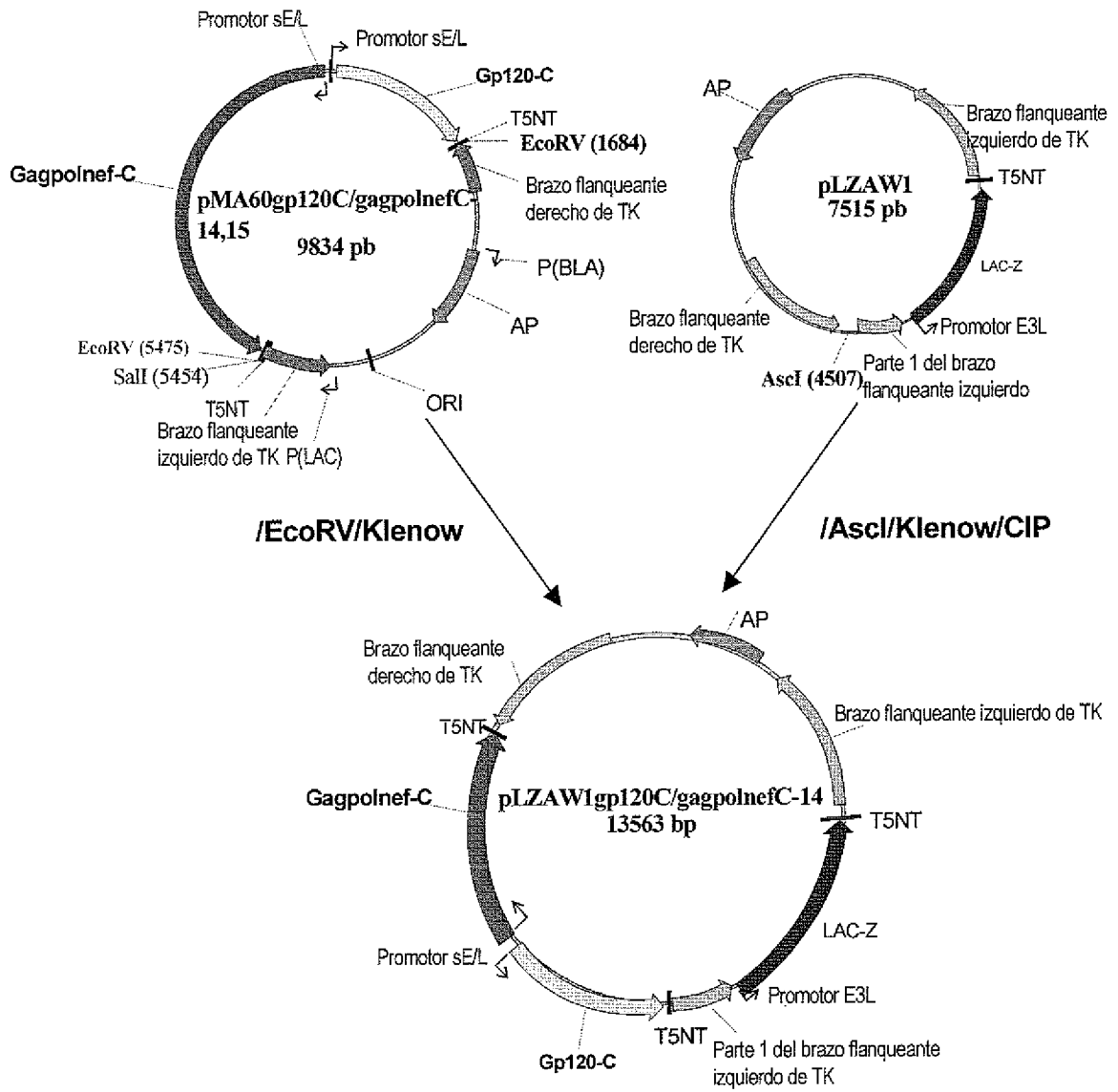


Figura 22

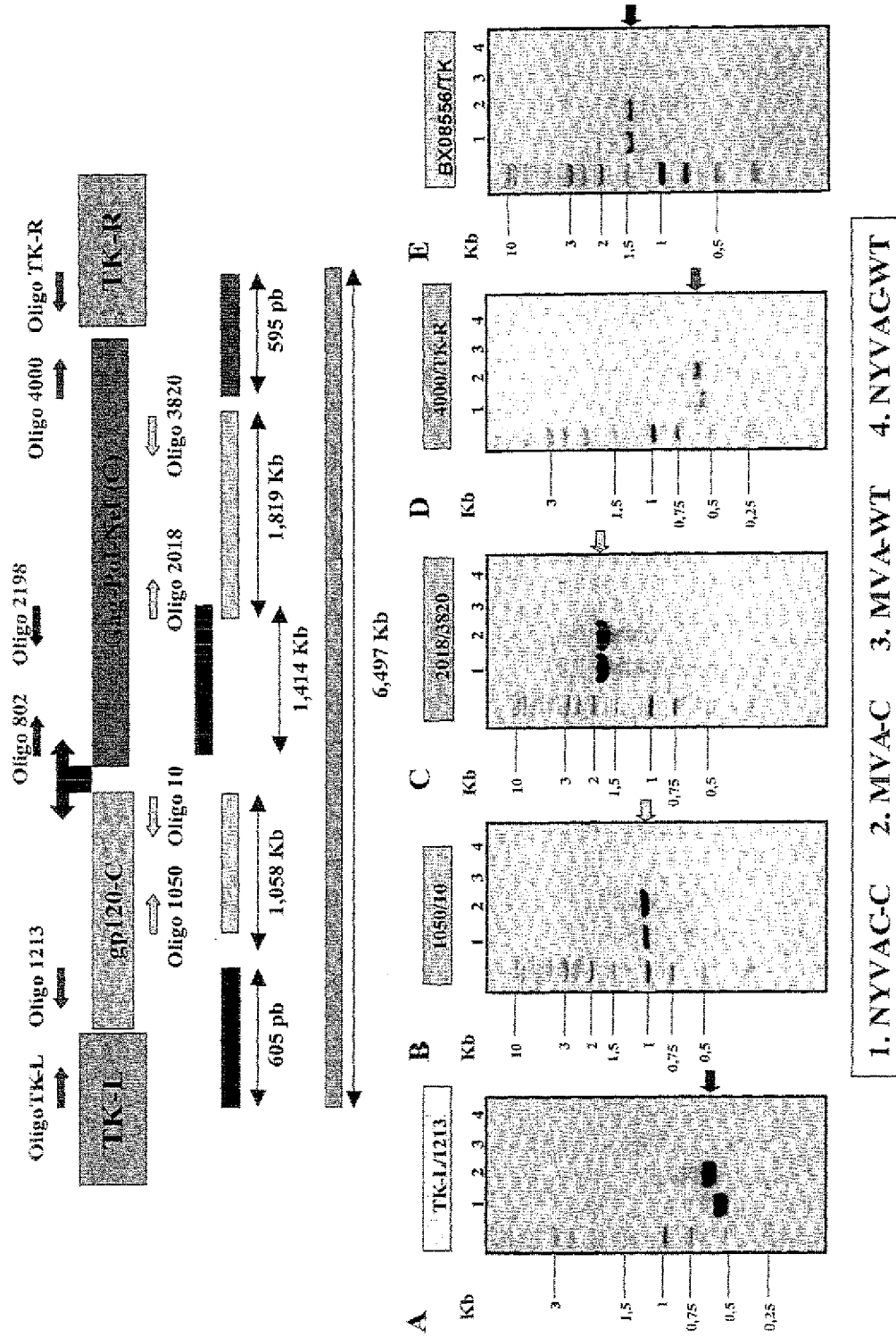


Figura 23

24/60

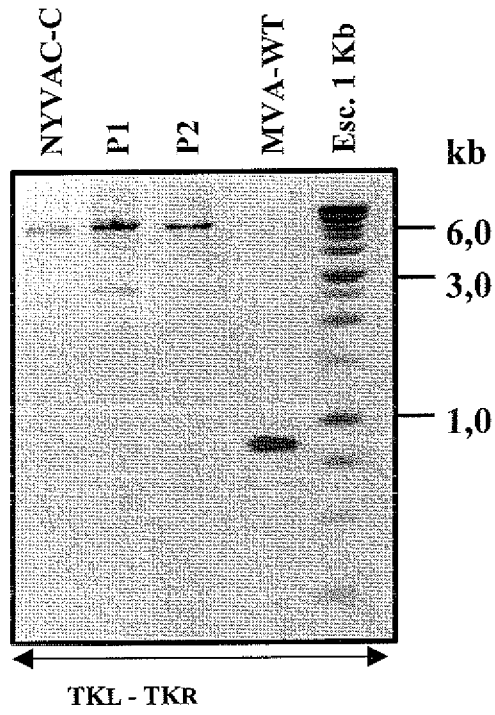
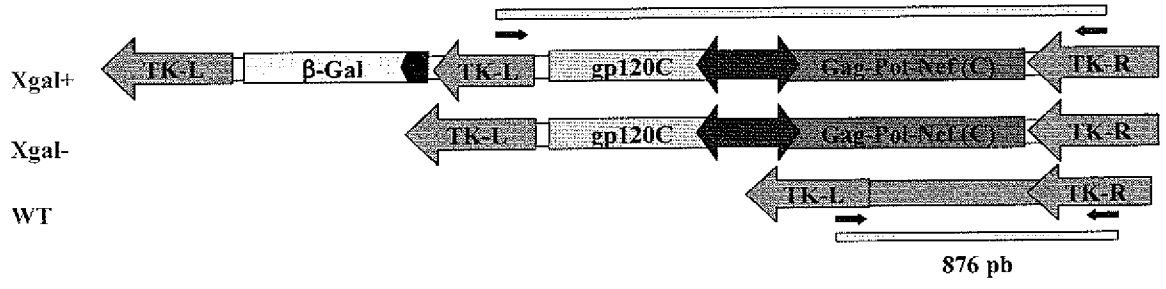


Figura 24

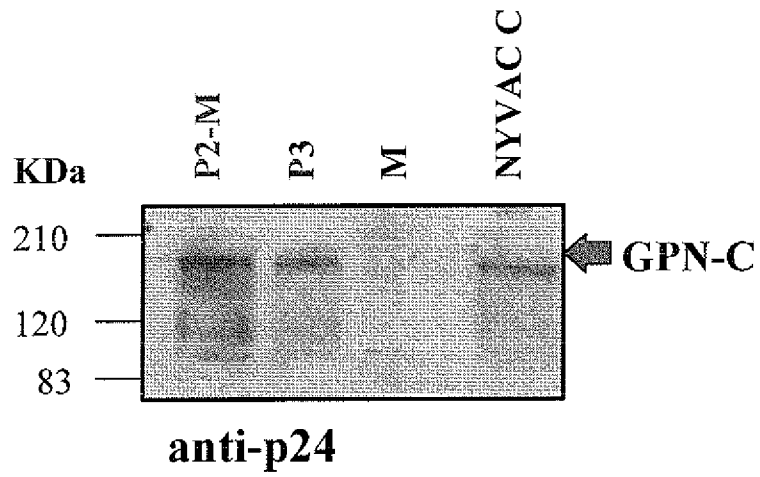
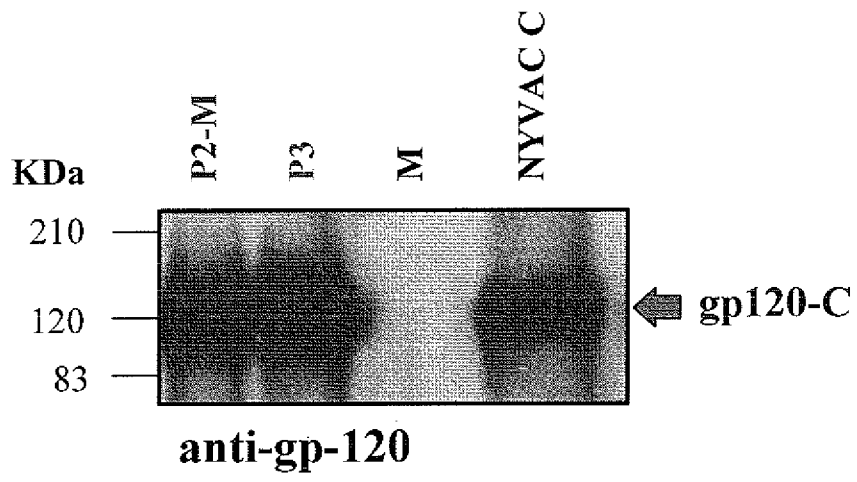
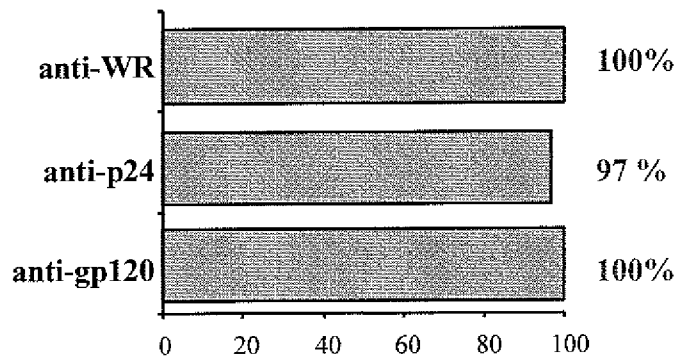
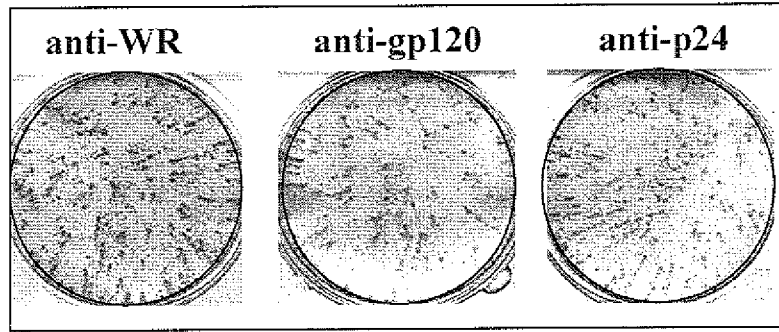


Figura 25

A



B

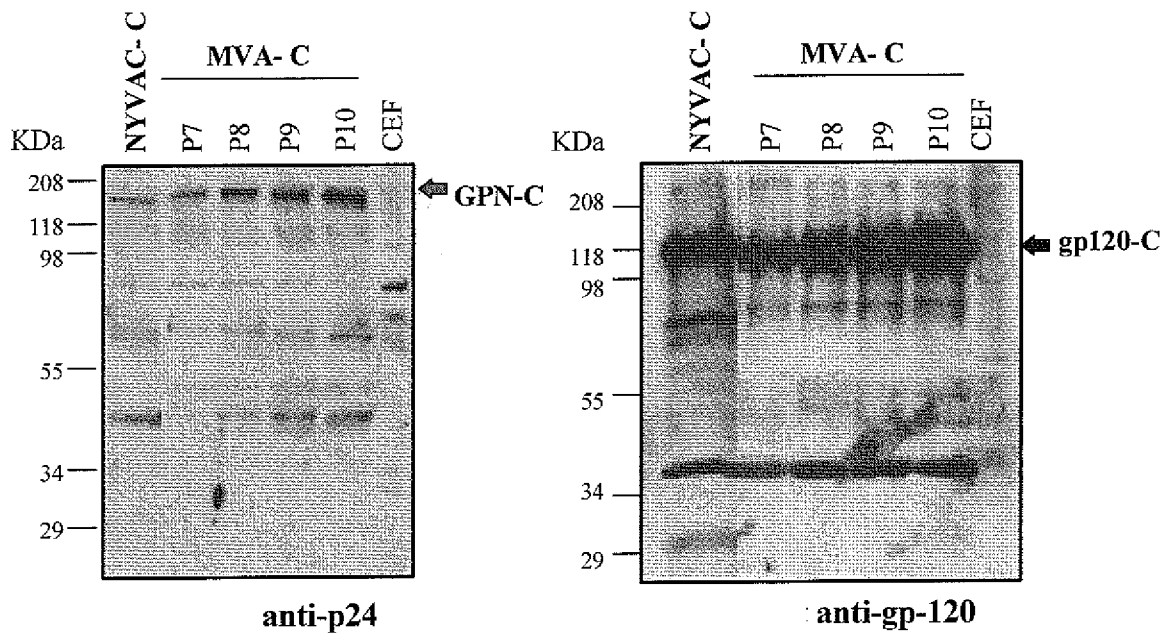
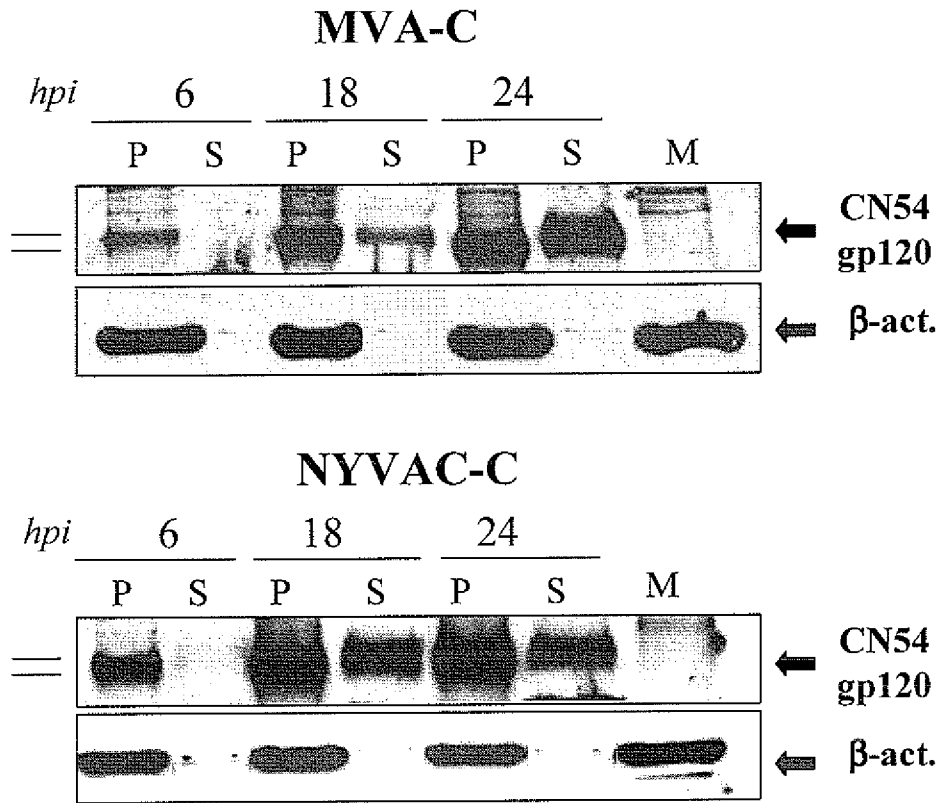


Figura 26

27/60



**Figura 27**

### Gag-Pol-Nef (C)

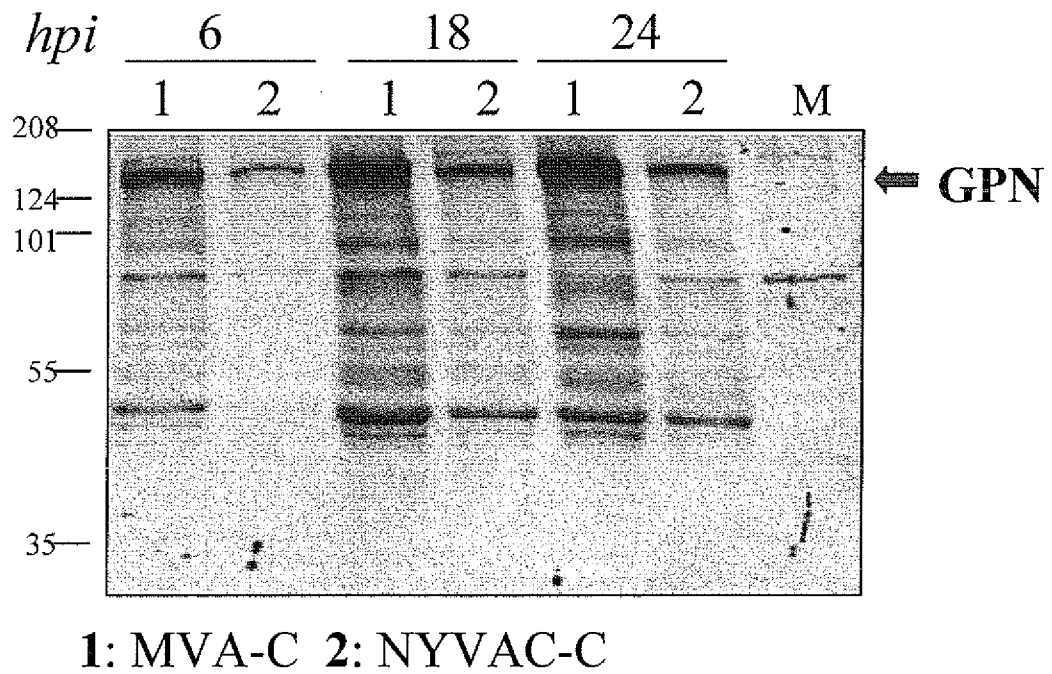
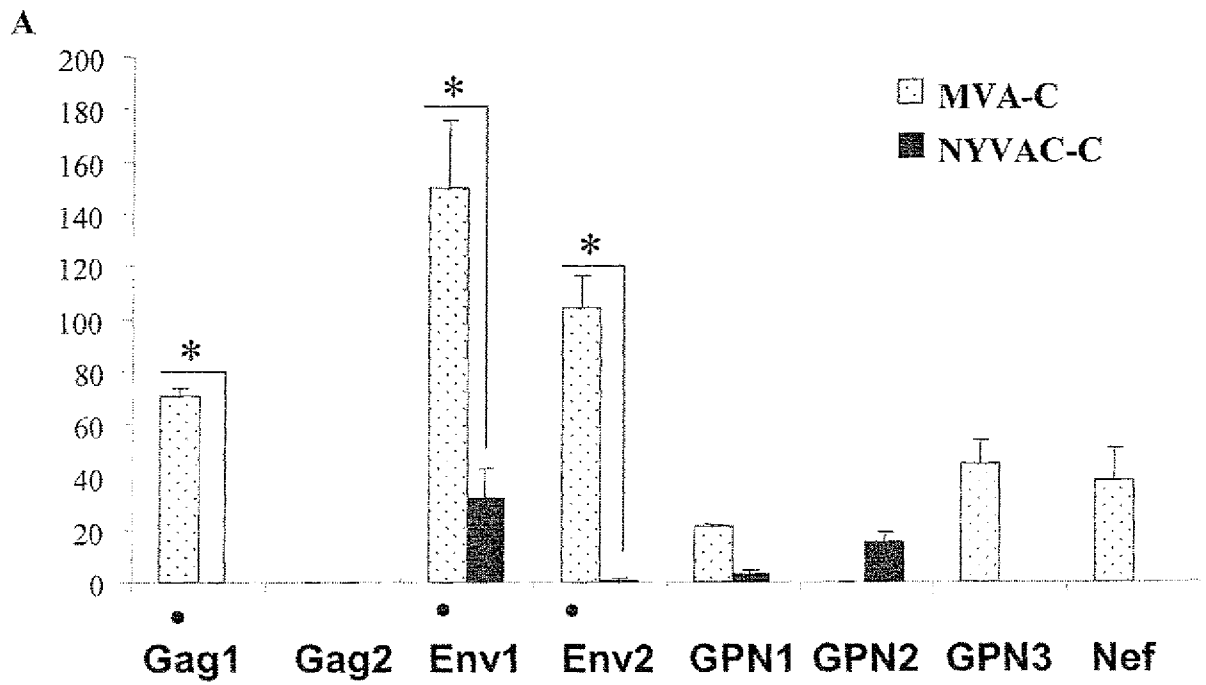


Figura 28



**B**

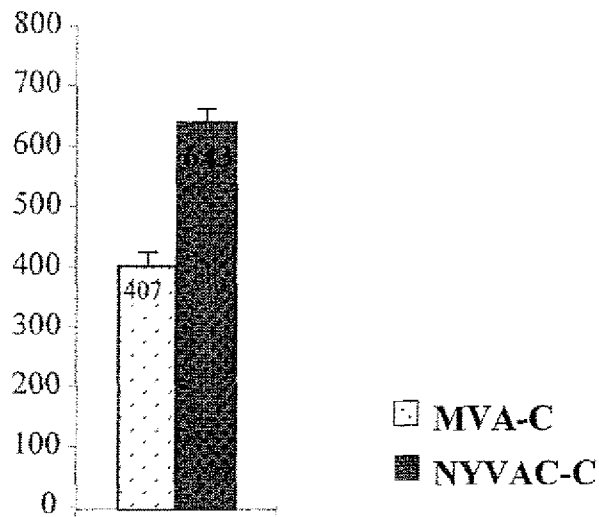
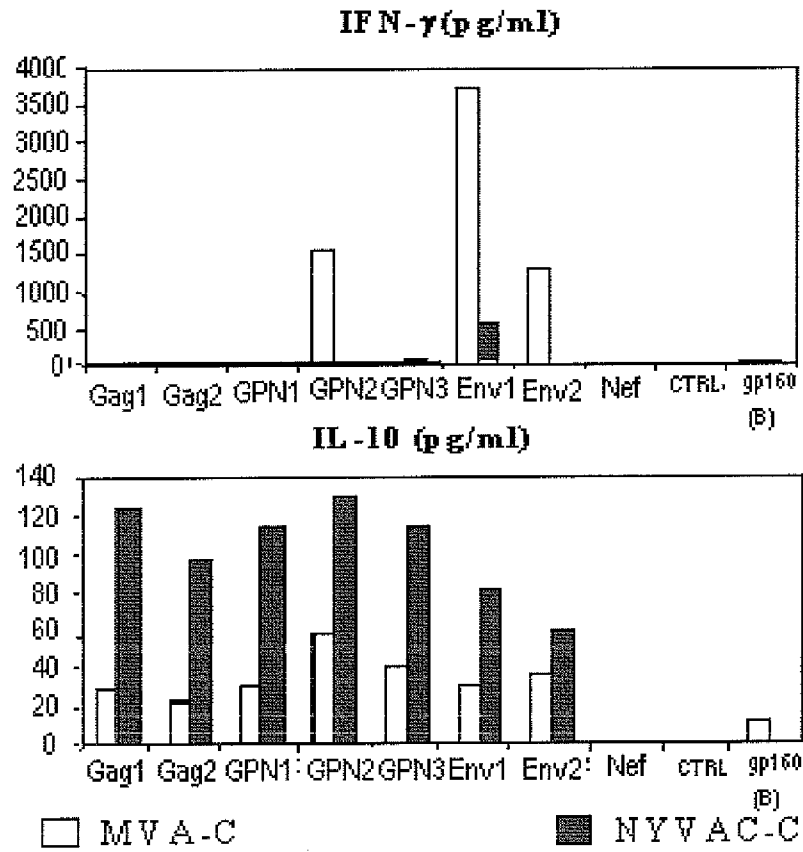
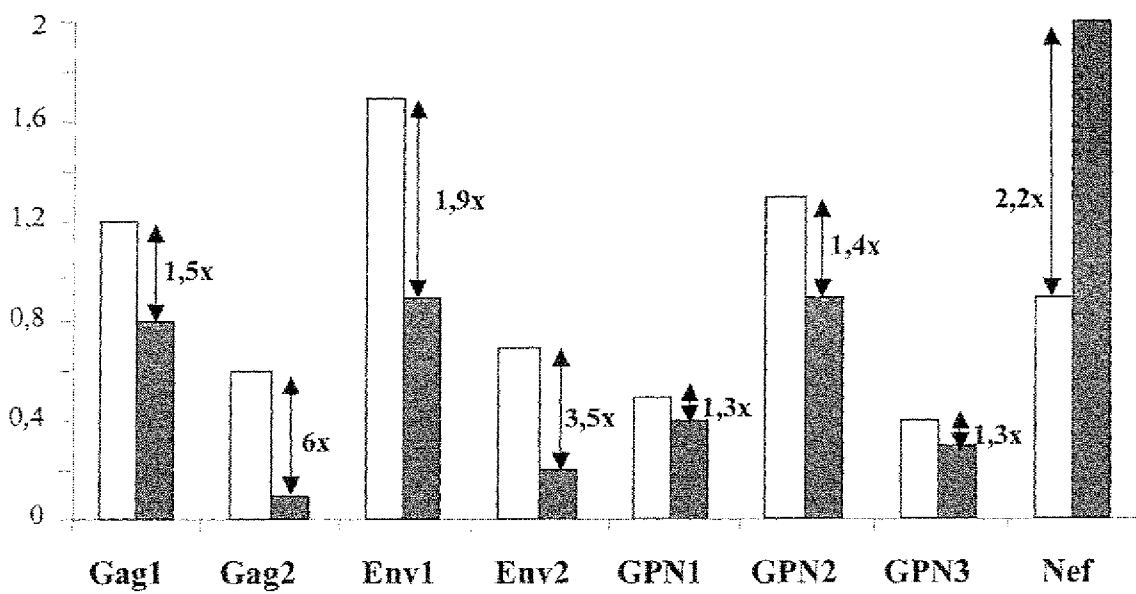
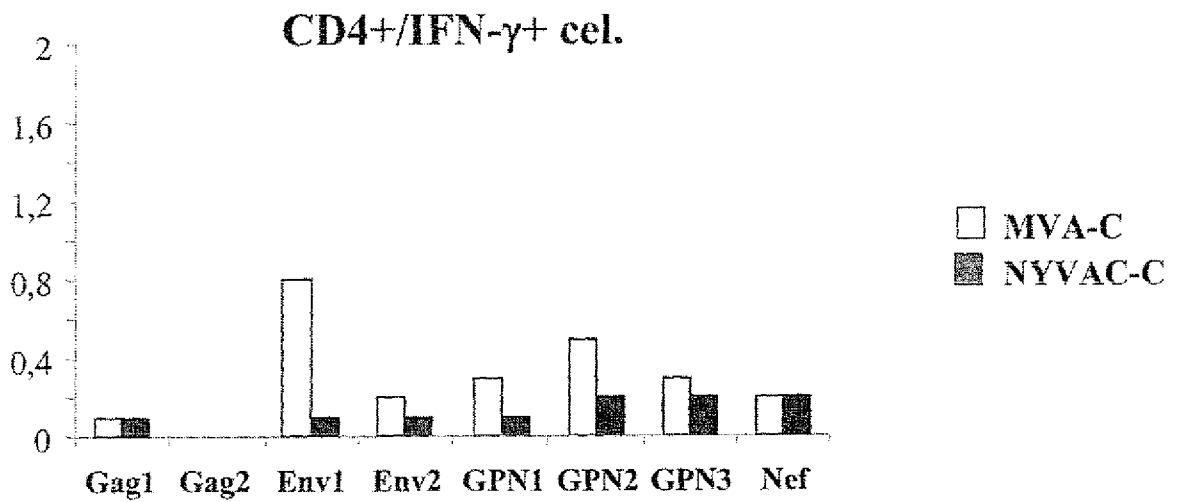
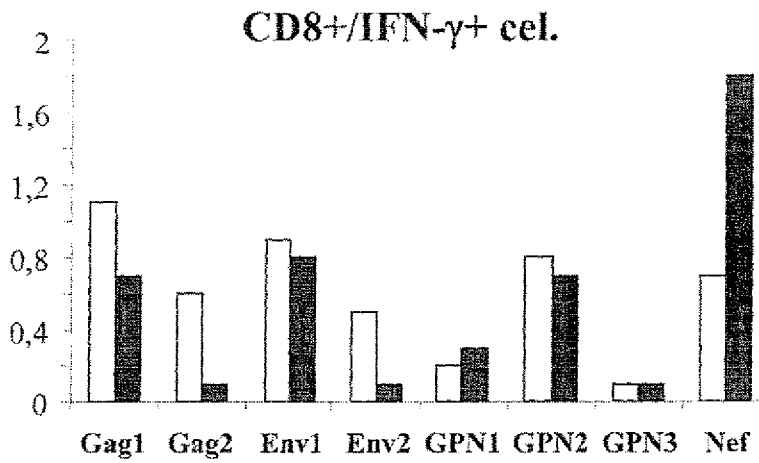


Figura 29





**Figura 30**



**Figura 31**

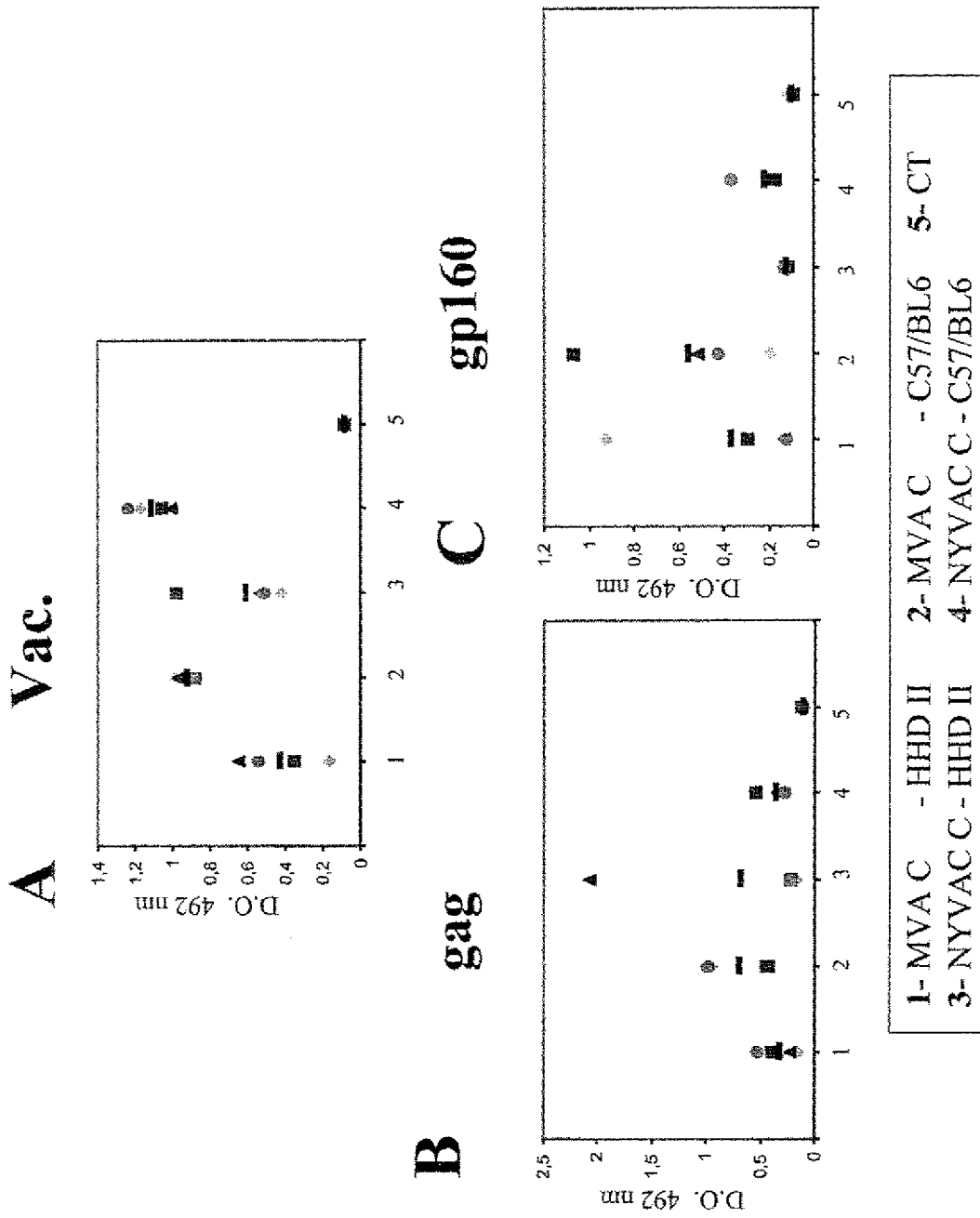


Figura 32

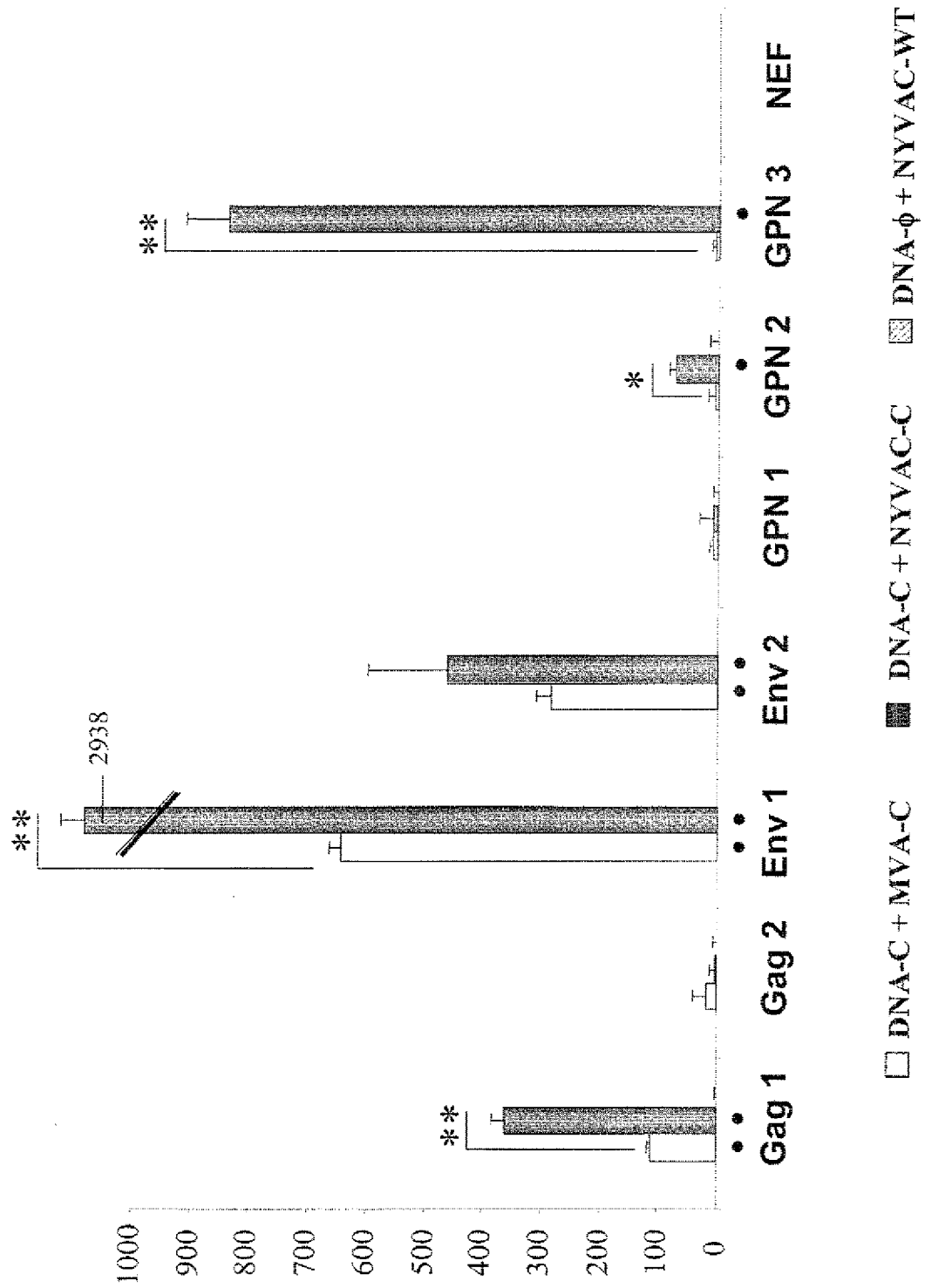


Figura 33

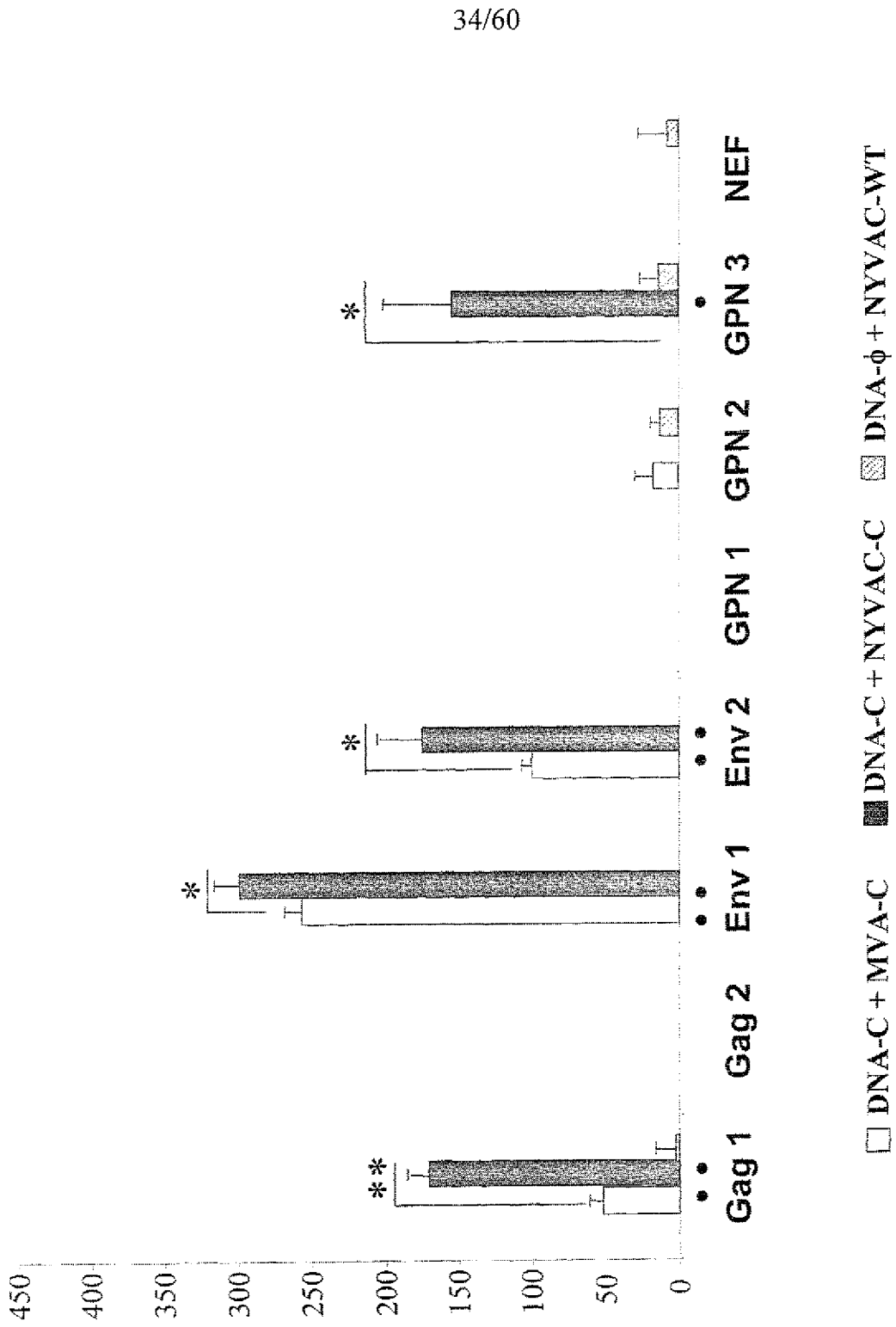


Figura 34

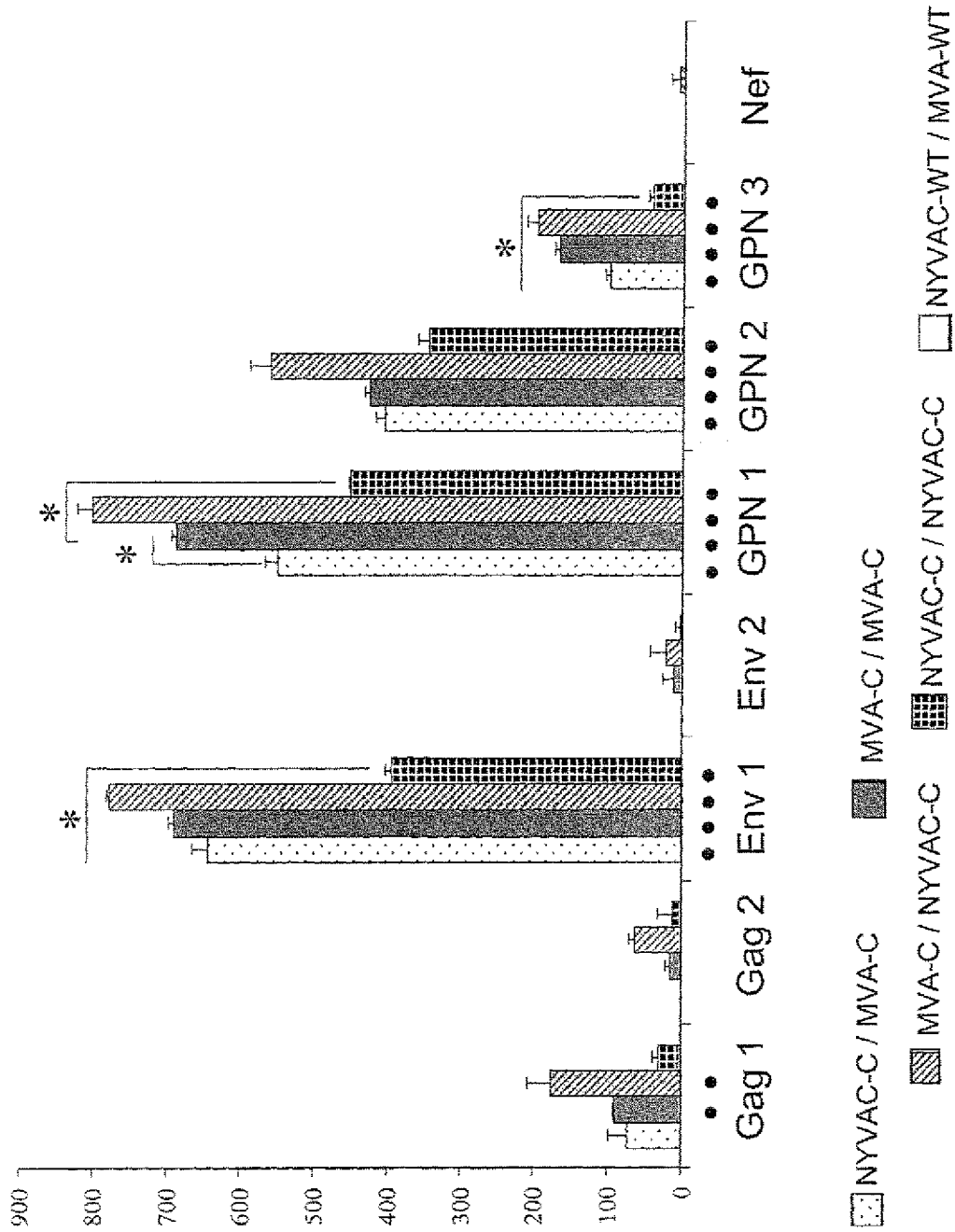


Figure 35

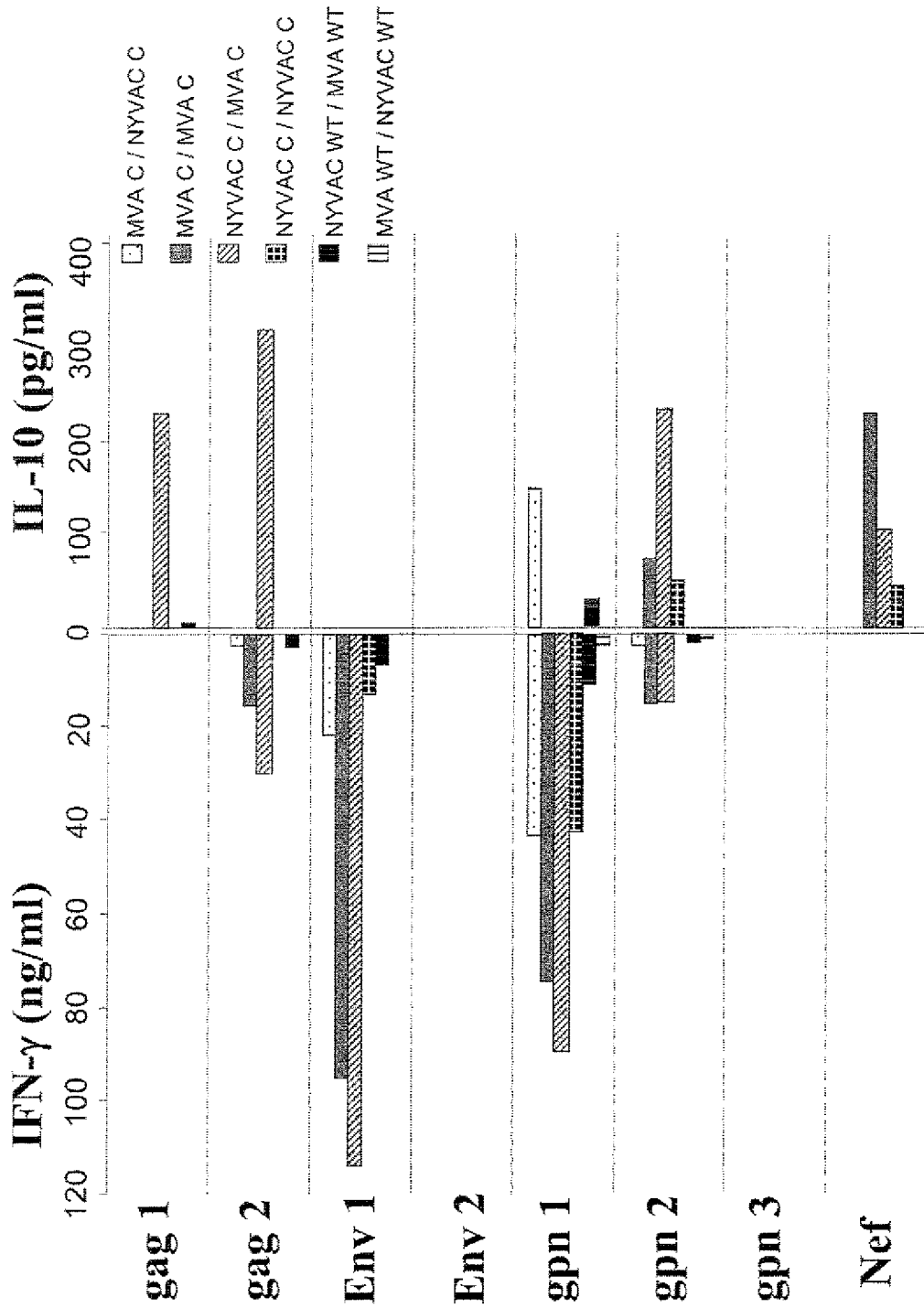


Figura 36

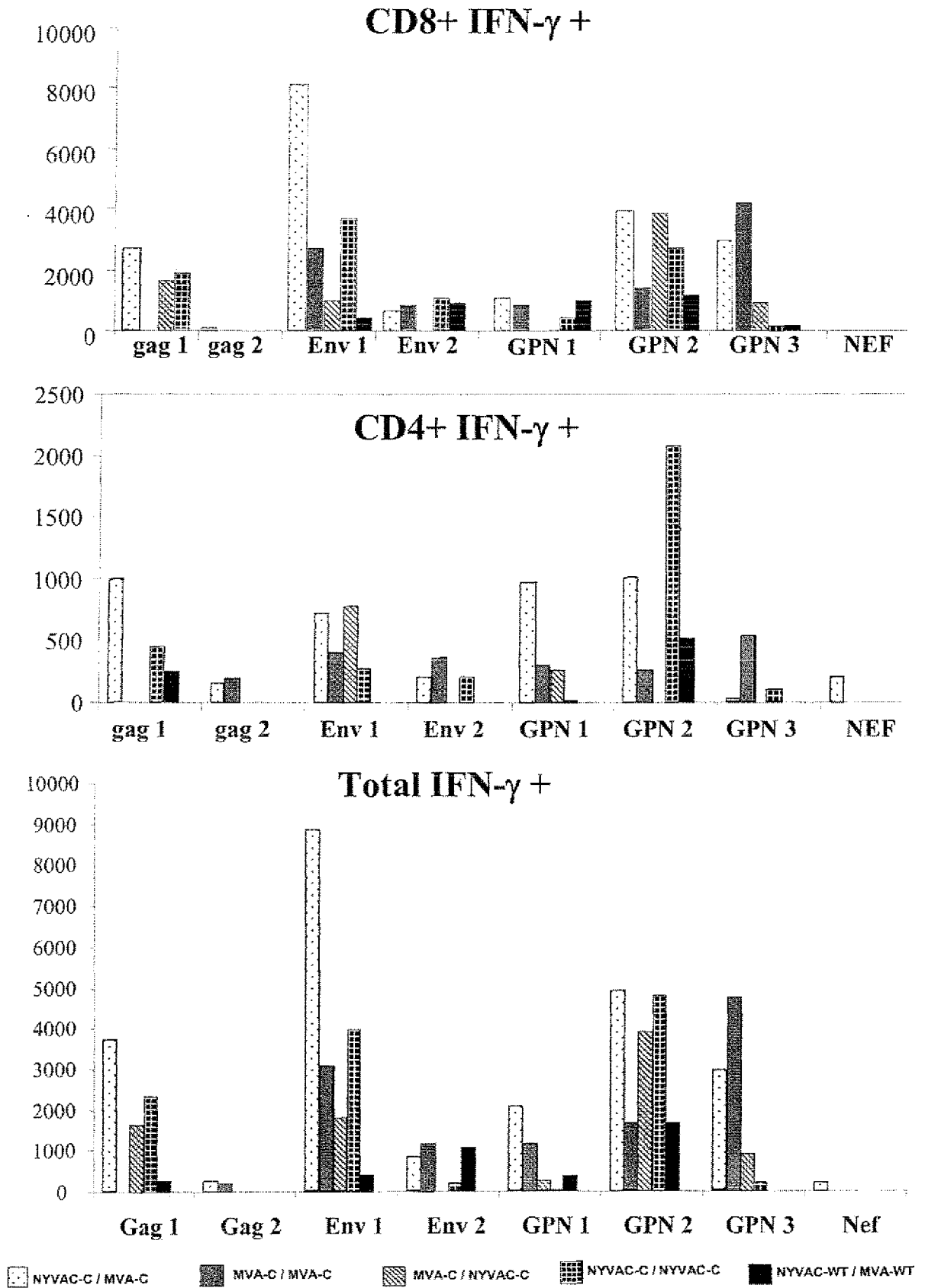


Figura 37



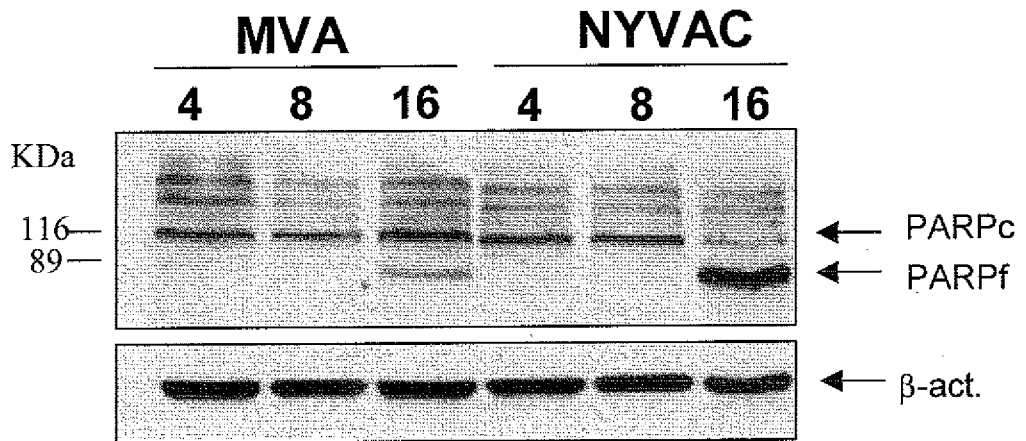
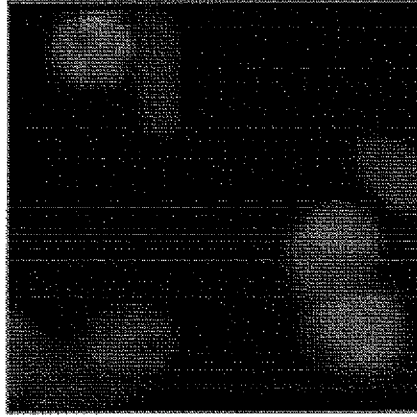


Figura 38a

MVA



NYVAC

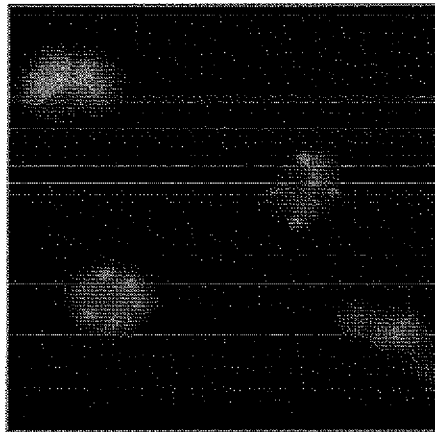


Figura 38b

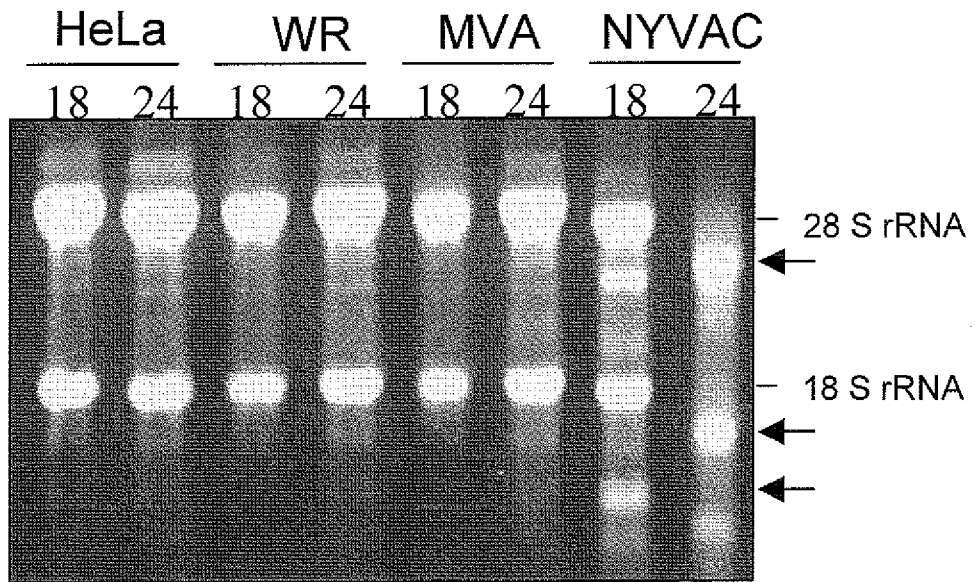


Figura 38c

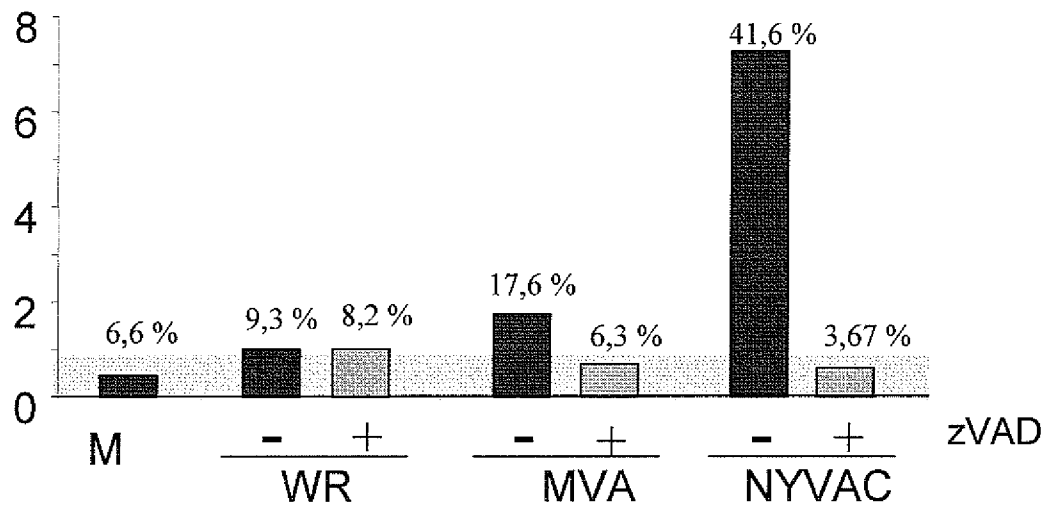


Figura 38d

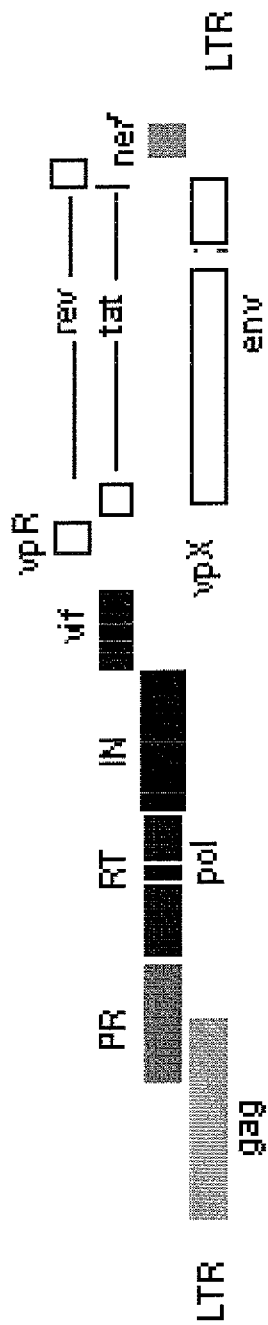
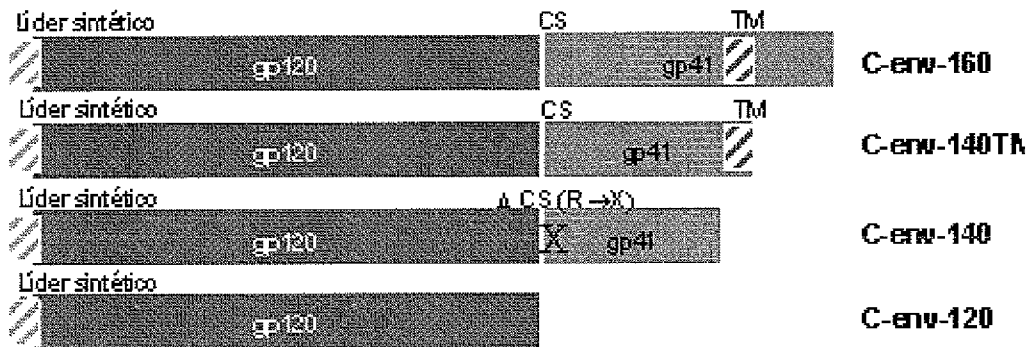


Figura 39

**ENV**



**GagPolNef (gpn)**



Figura 40

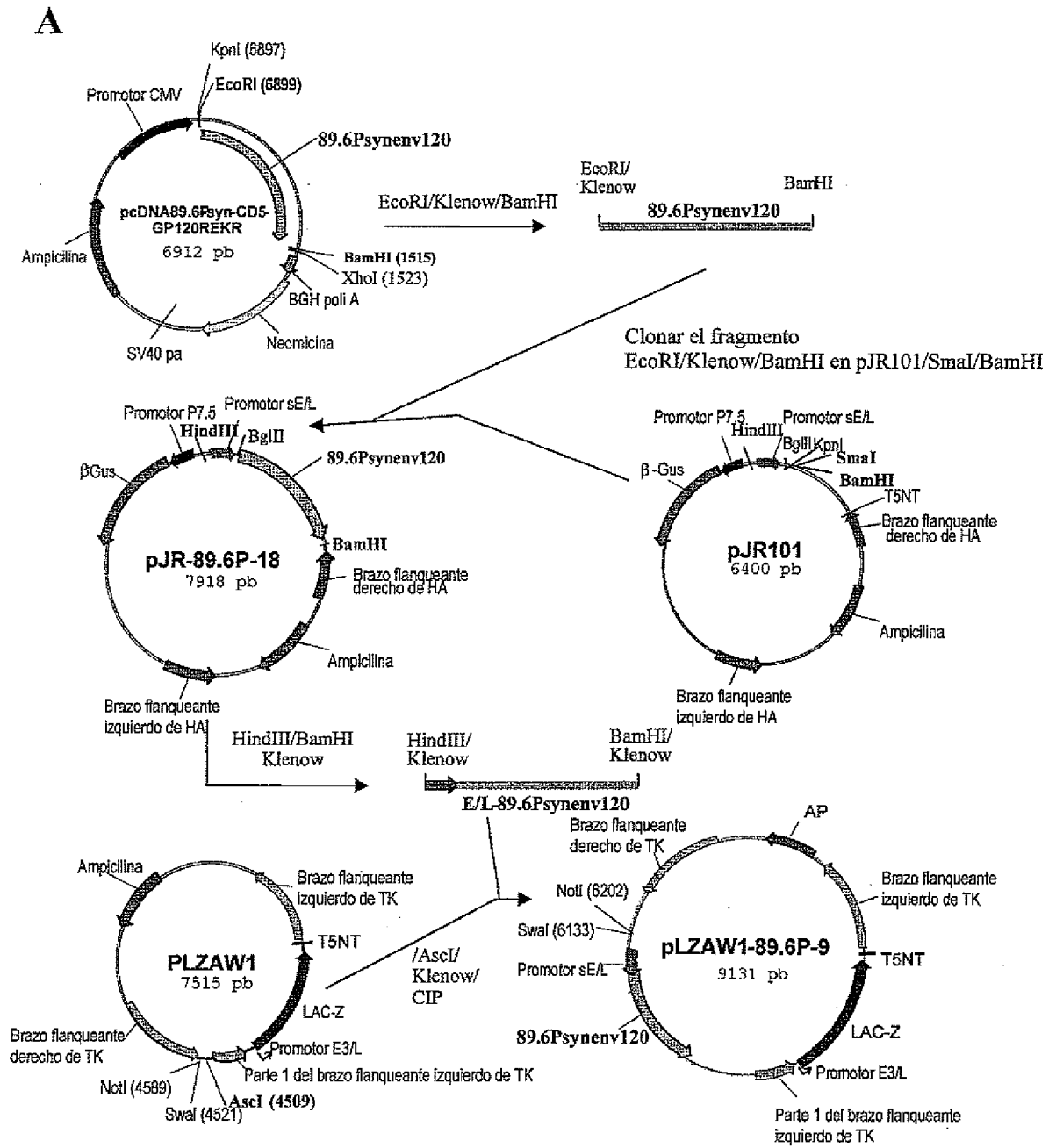


Fig. 41a

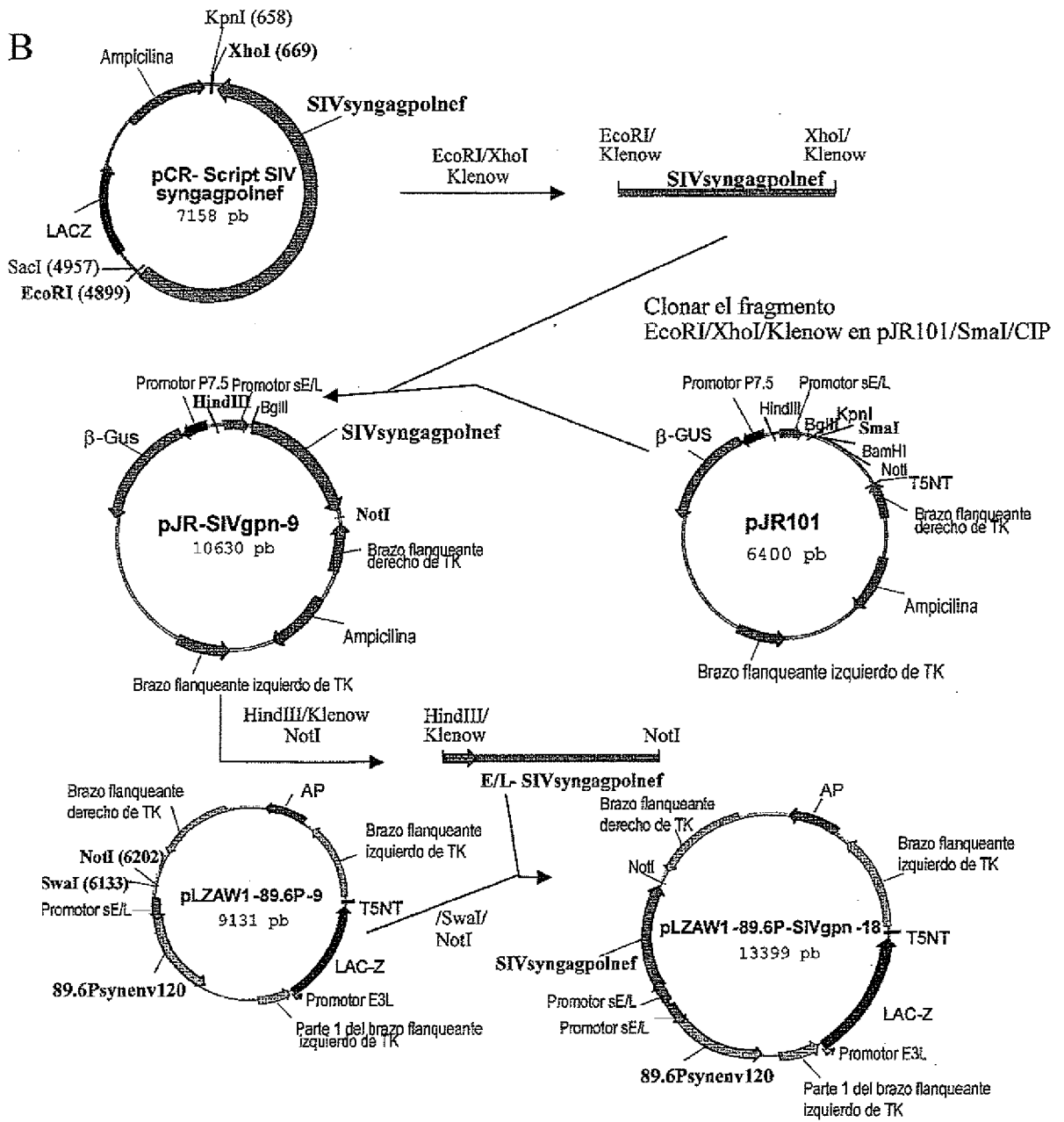


Fig. 41b



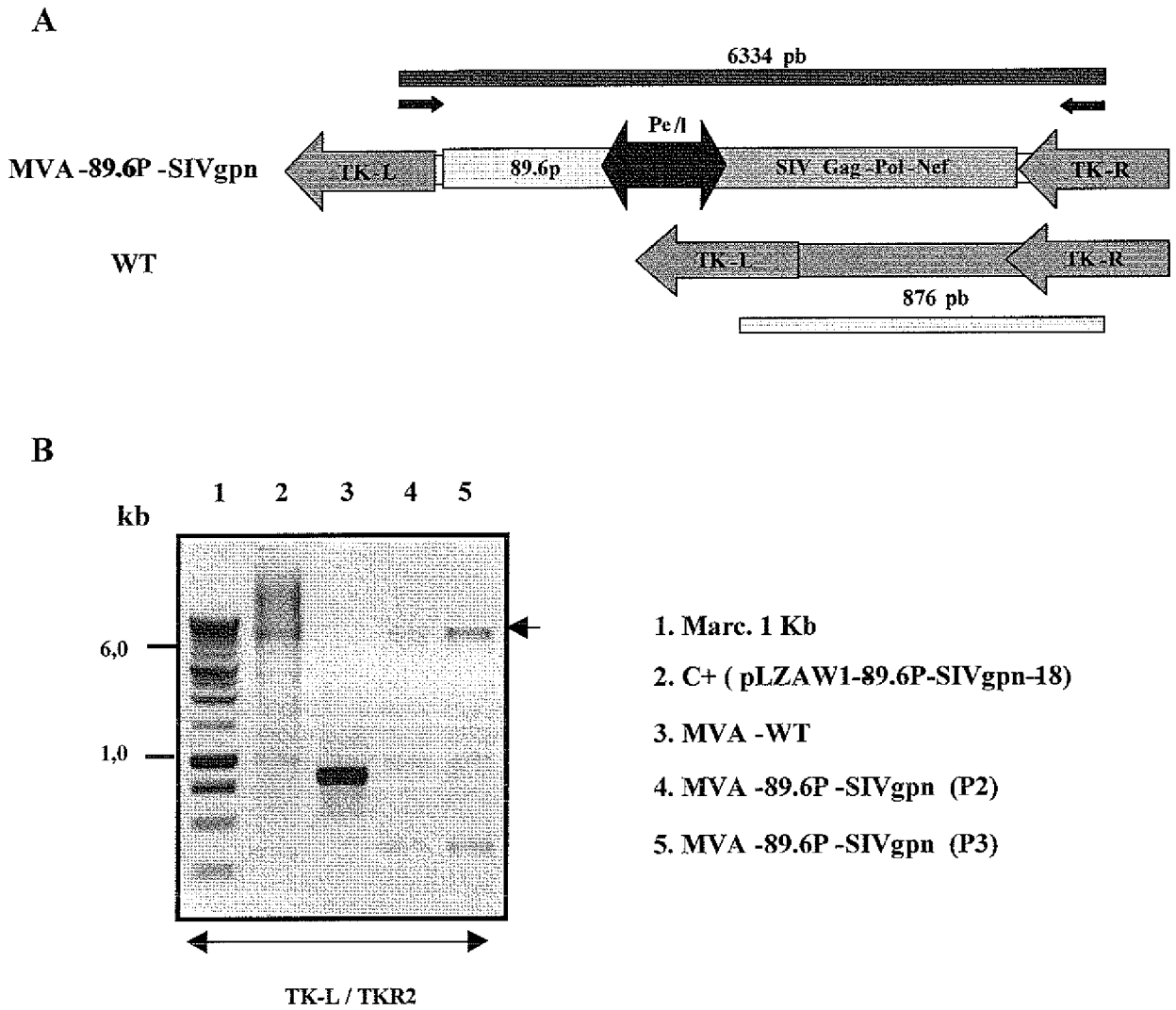


Figura 42

47/60

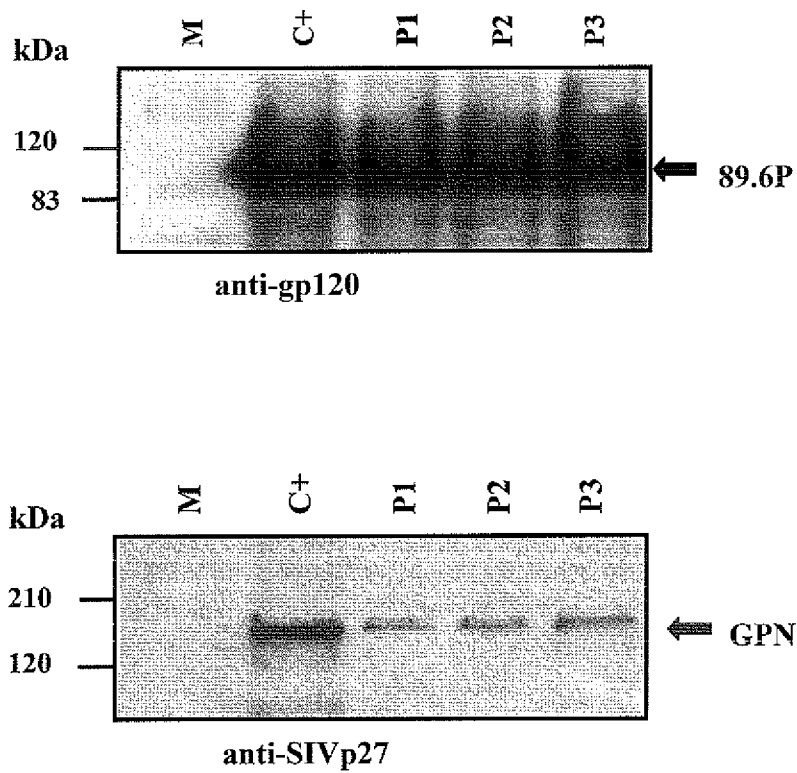
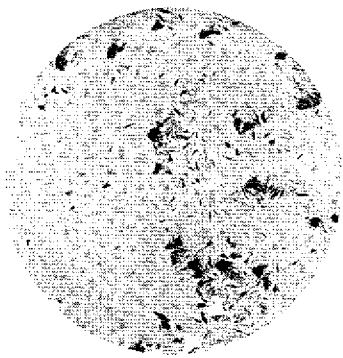
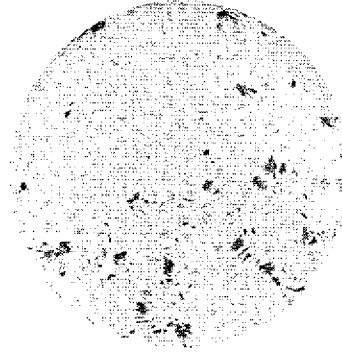


Figura 43

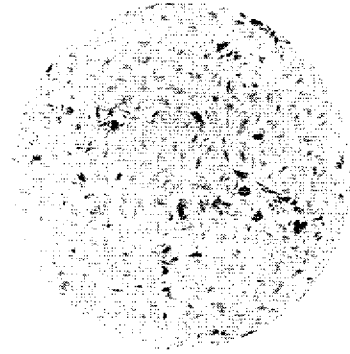
48/60



**Anti-WR**

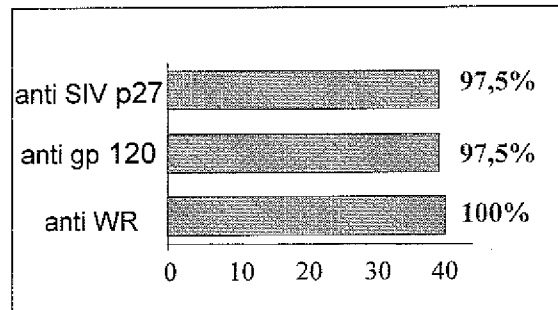


**Anti-gp120**

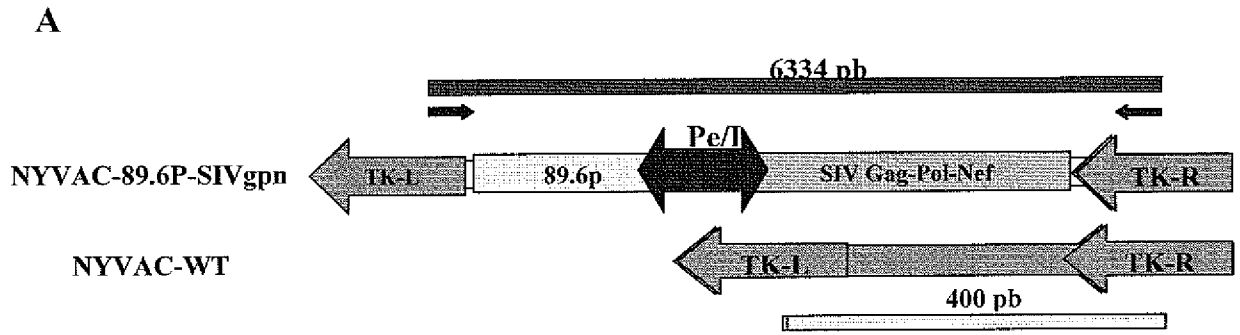


**Anti-SIVp27**

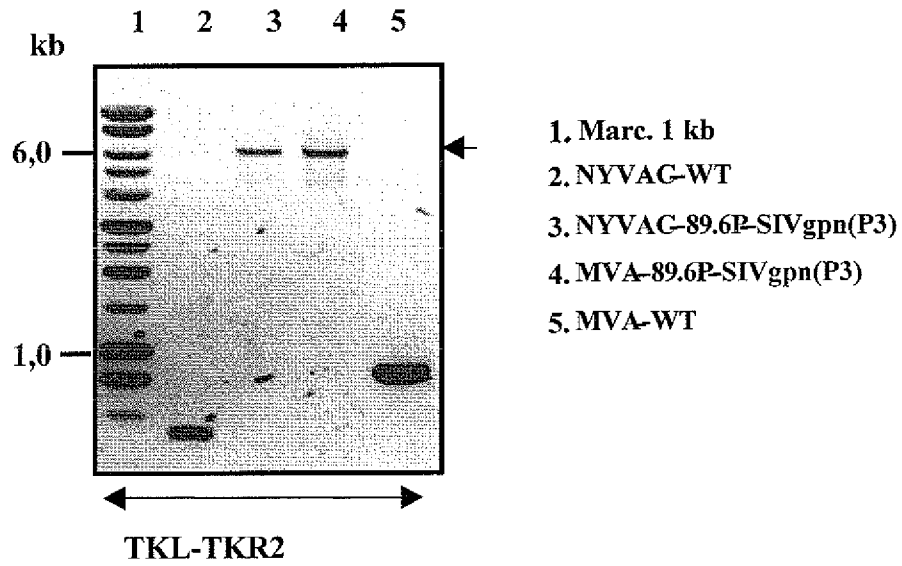
**MVA-89.6P-SIVgpn**



**Figura 44**



**B**



**Figura 45**

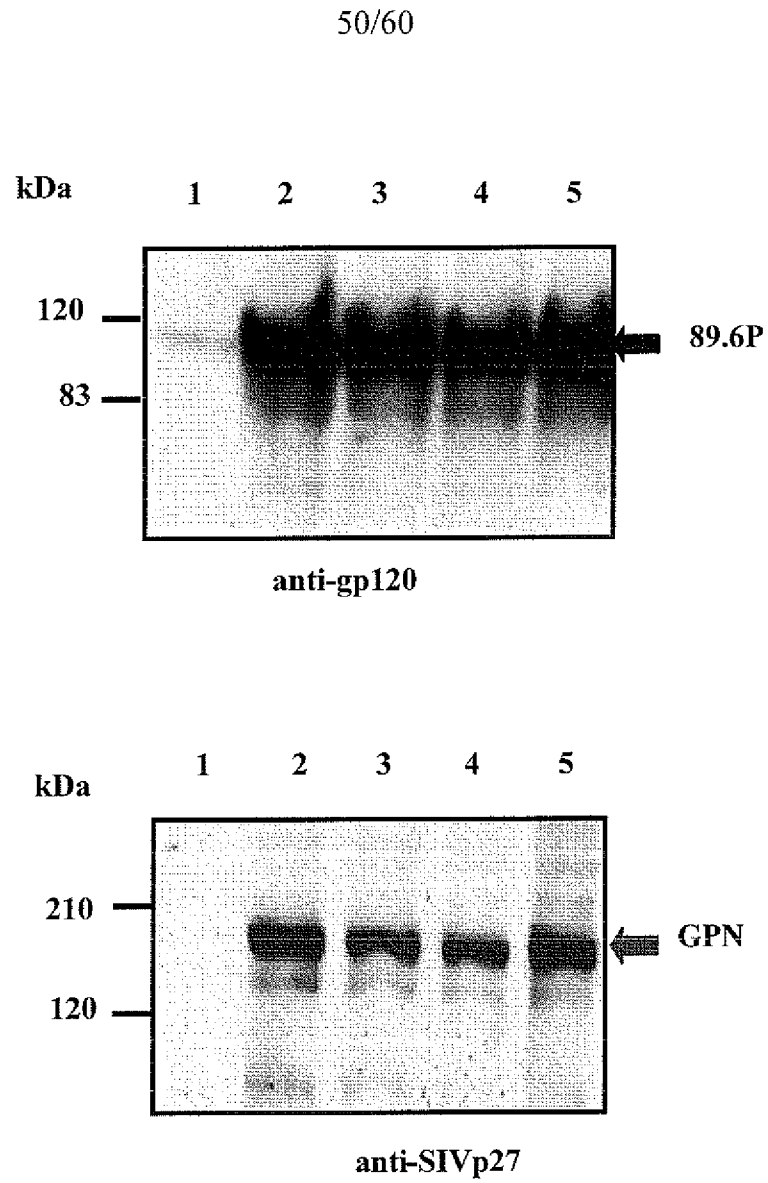
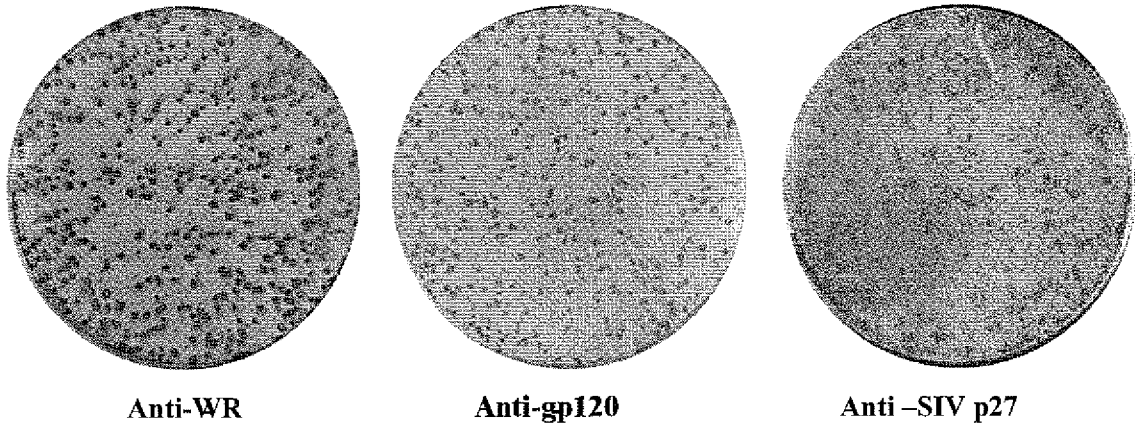
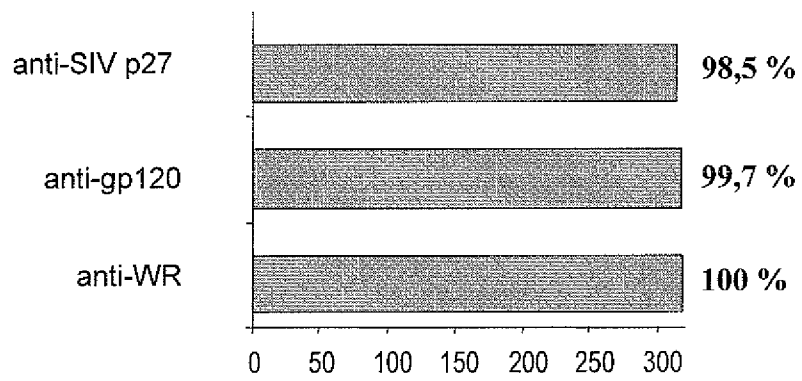


Figura 46

51/60



**NYVAC-89.6P-SIVgpn**



**Figura 47**

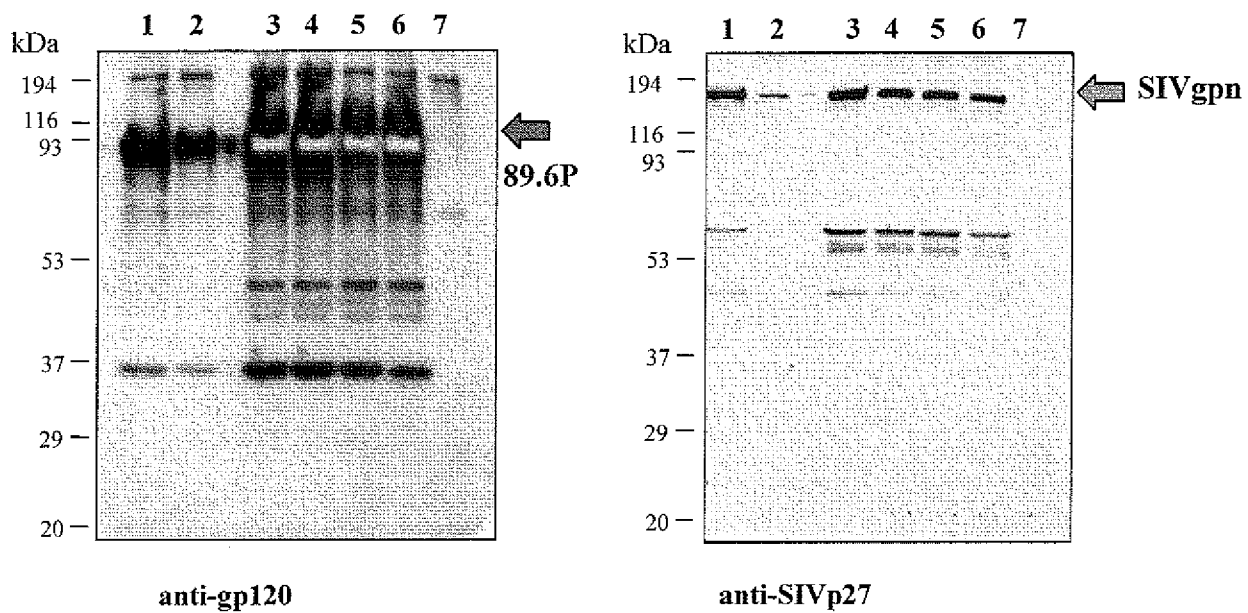


Figura 48

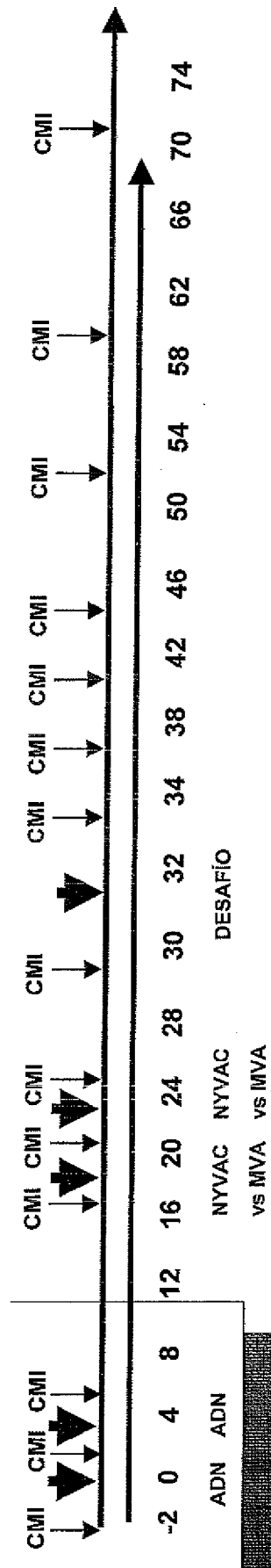


Figura 49



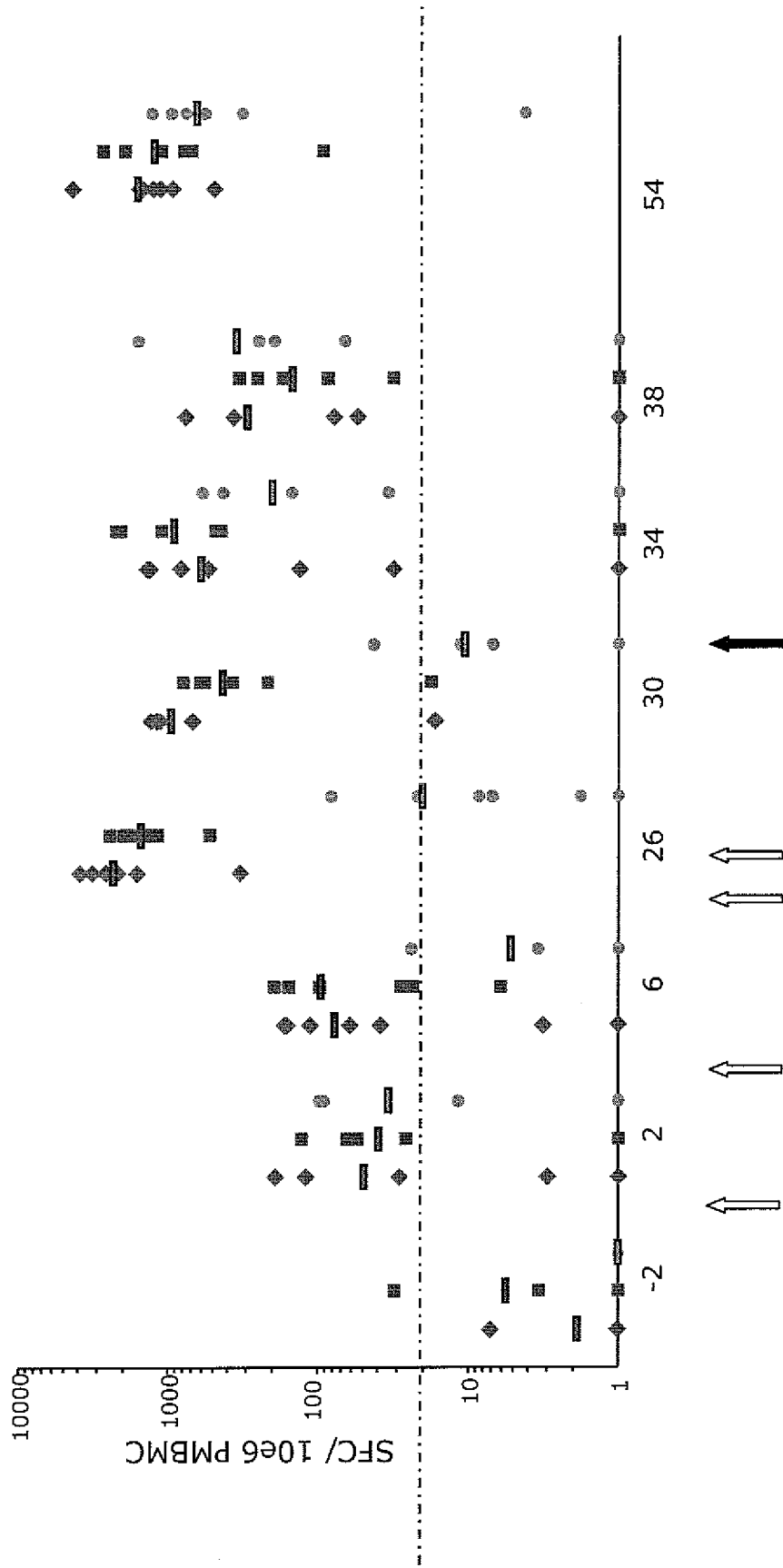


Figura 50

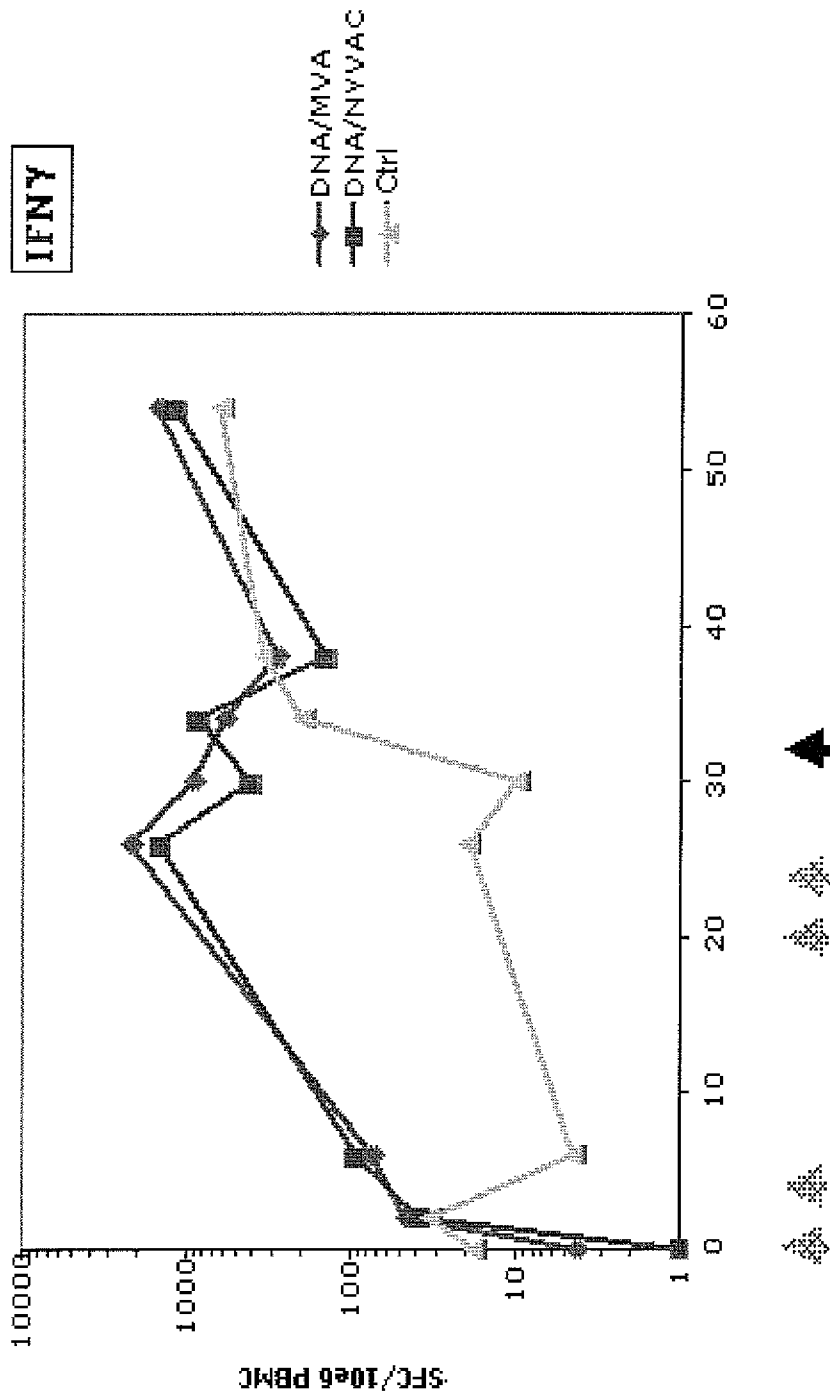


Figure 51

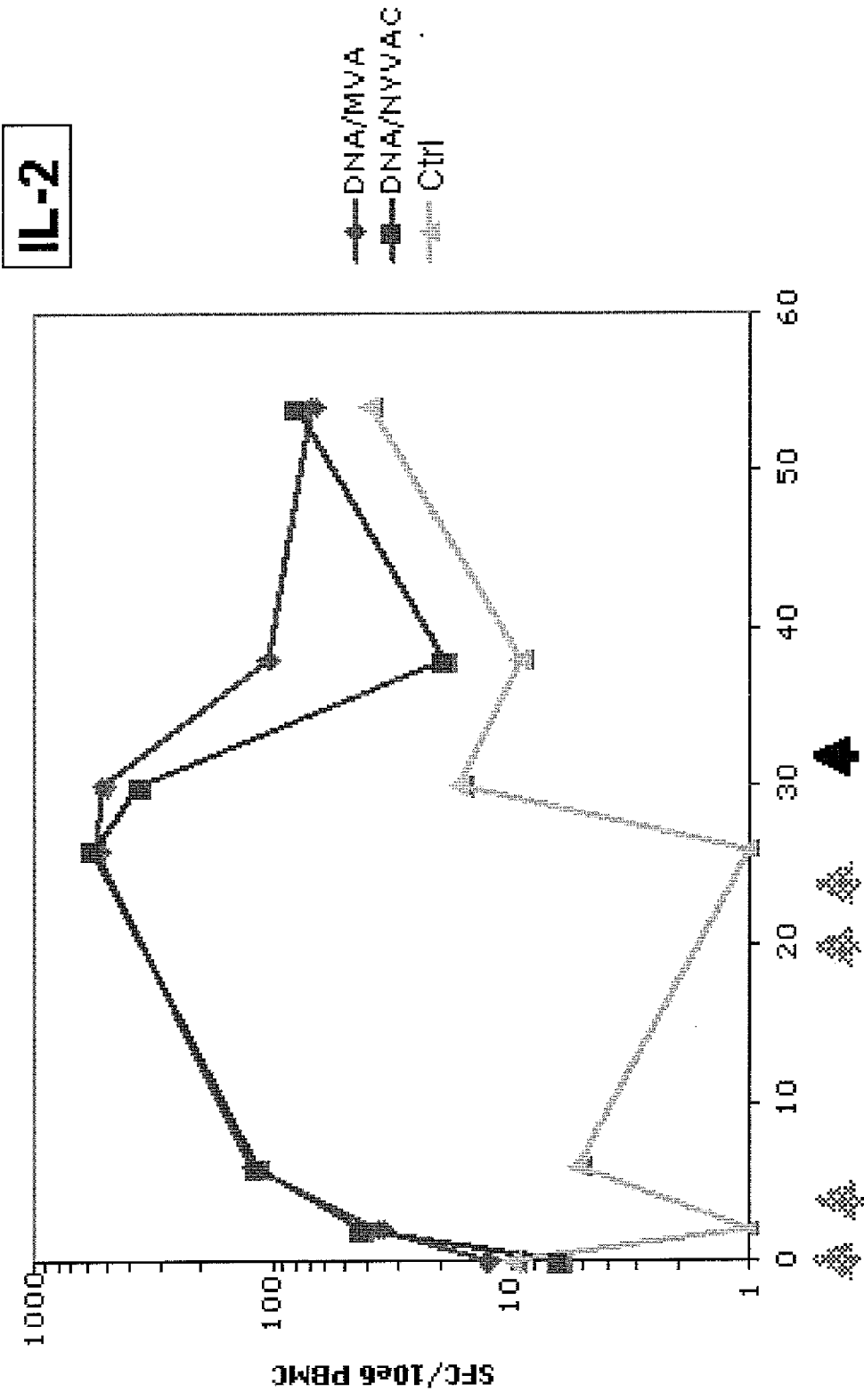


Figure 52

57/60

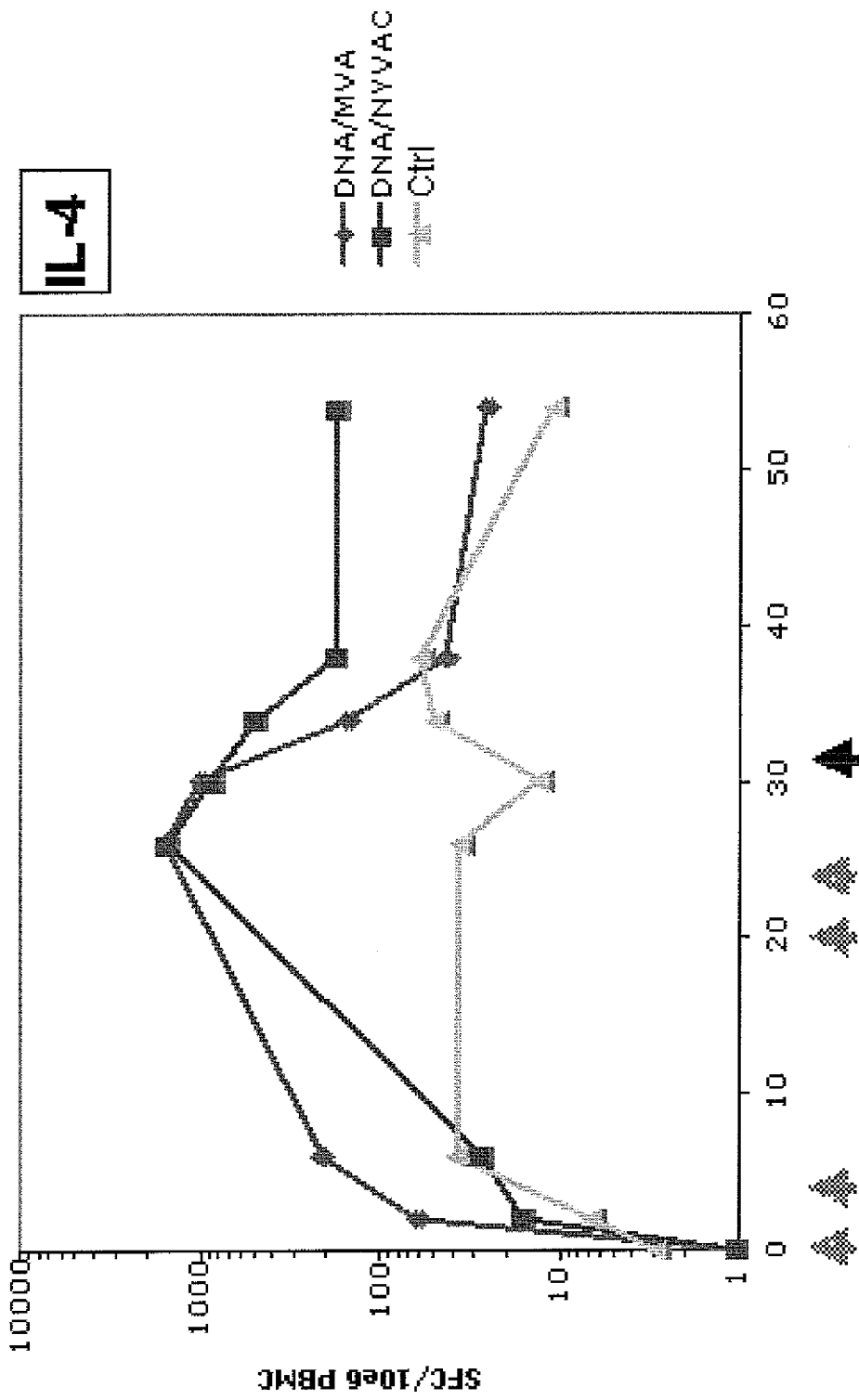


Figure 53

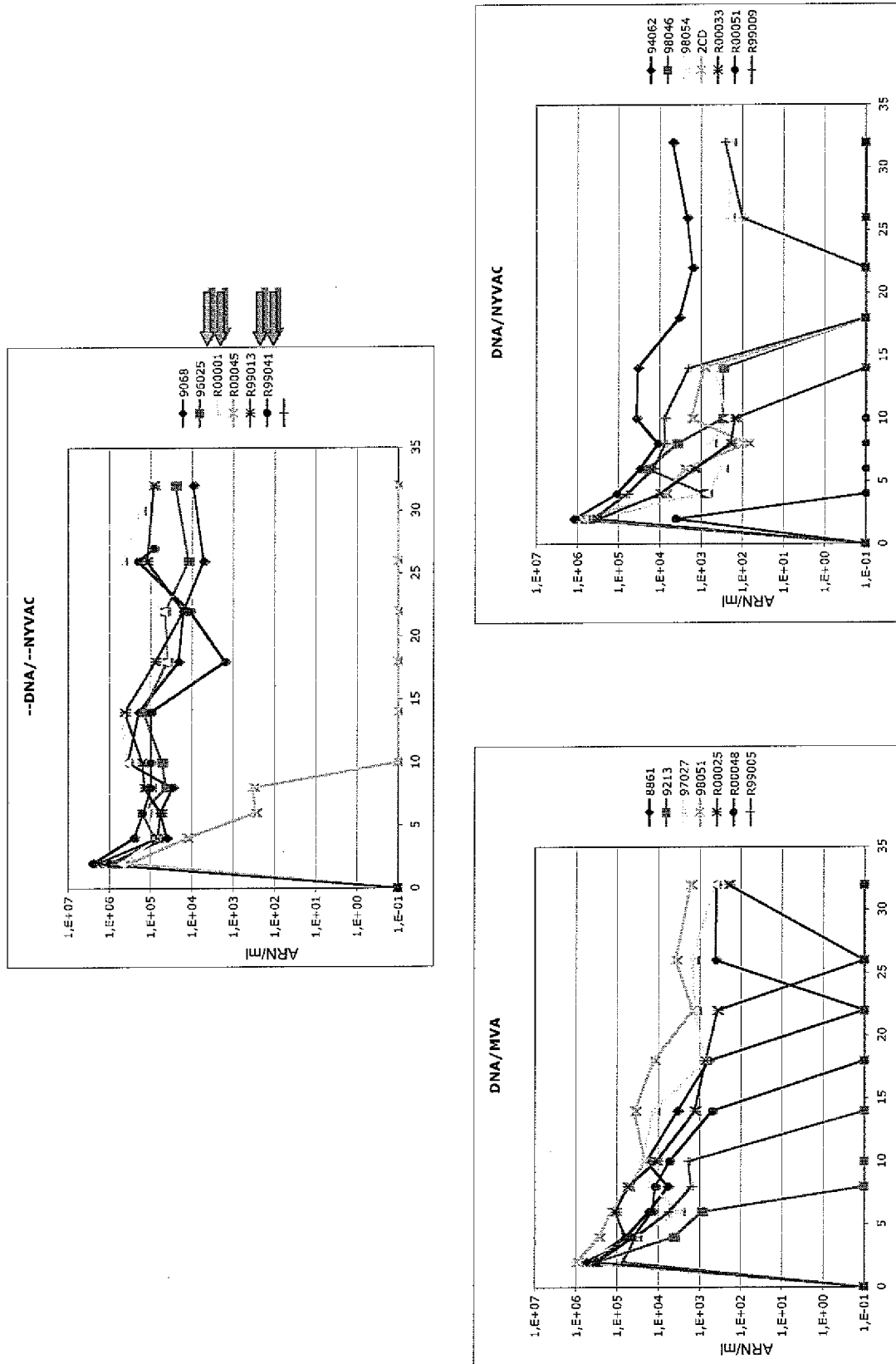
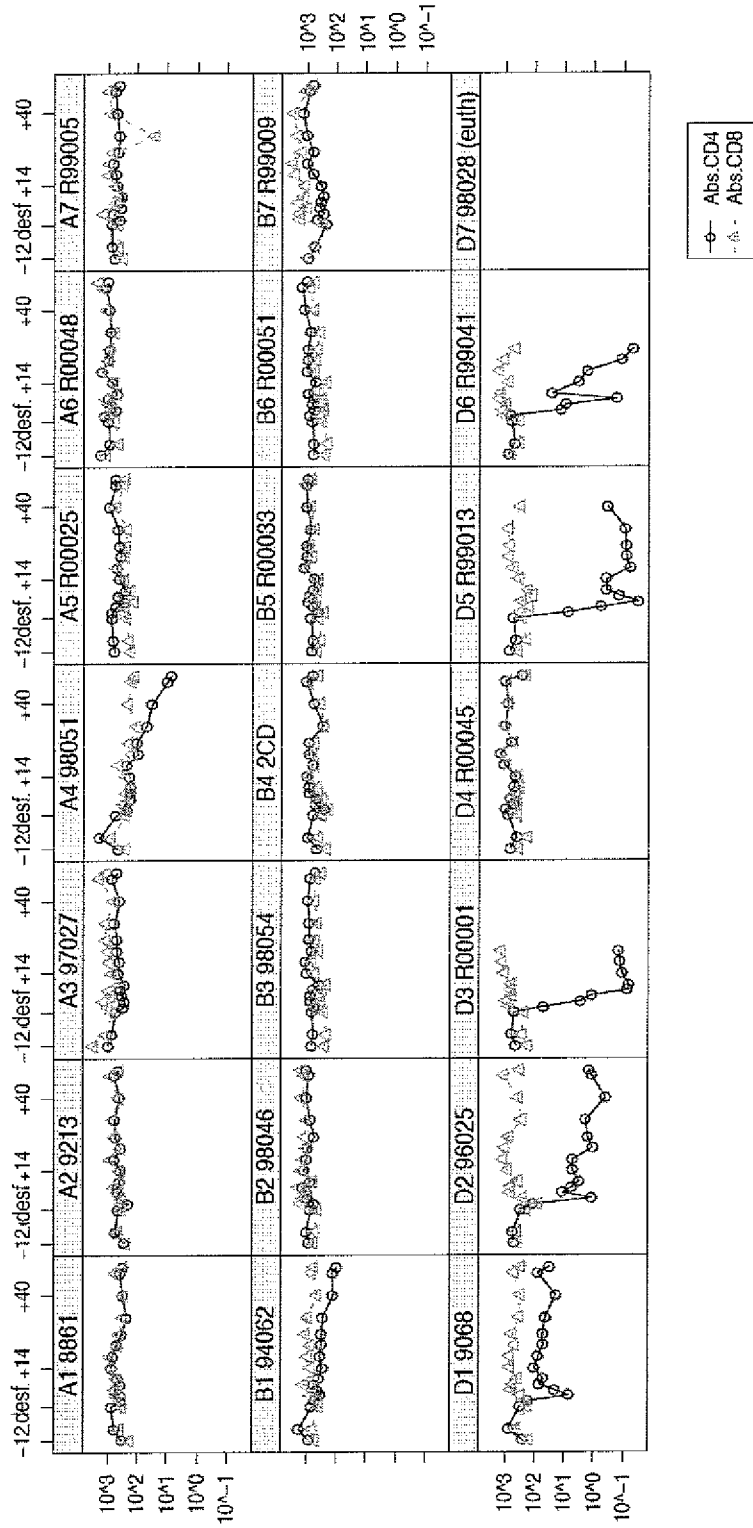


Figure 54

**Cel. CD4 , CD8 /  $\mu$ l**



**Figura 55**

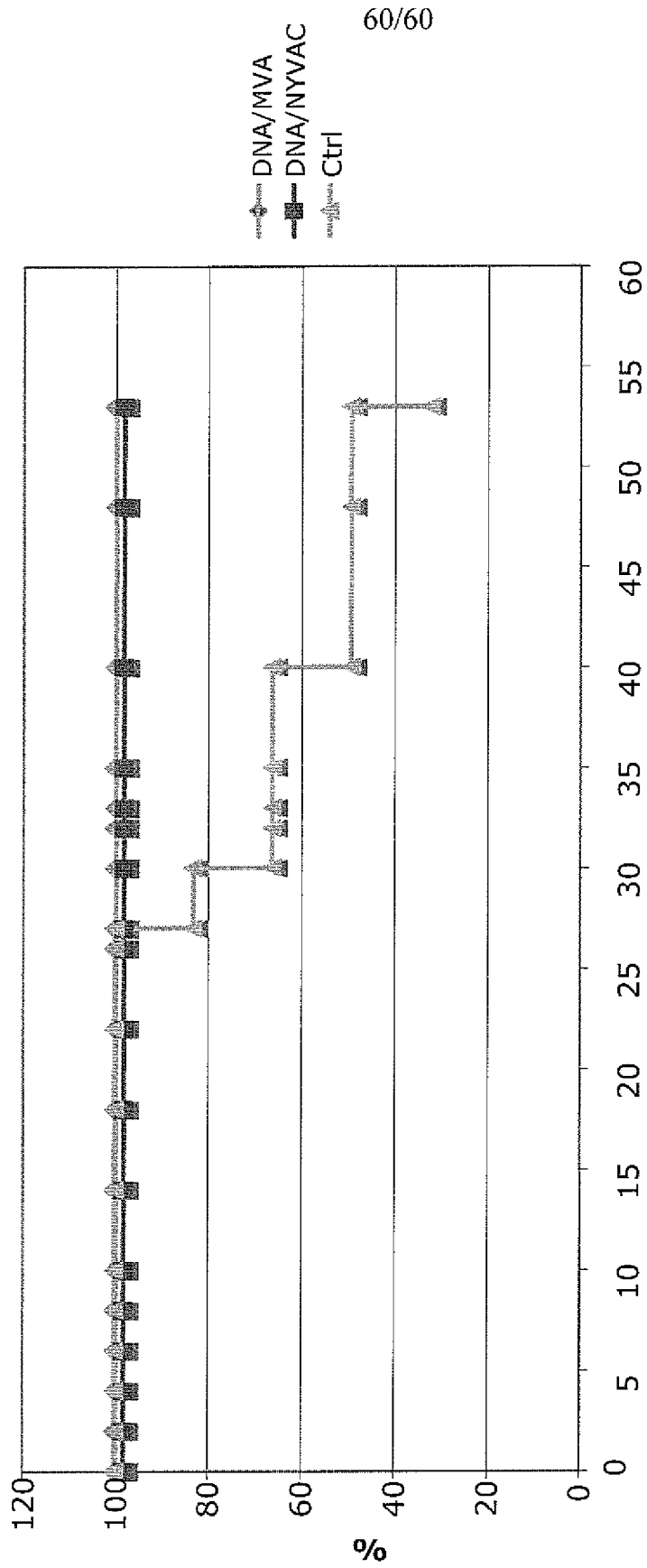


Figure 56

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ ES 2006/070114

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, WPI, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE, XPESP, NPL

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02072754 A1 (US GOV.(DEP. OF HEALTH AND HUMAN SERVICES)) 01.03.2002, page 15-19; page 23; page 24, lines 6-22; page 27, lines 19-21; page 28, lines 1-10; page 33, 13-19; claims 1, 4, 5, 12, 14, 17, 22, 26	1, 3-7, 17-18, 37-38, 40-57, 76, 78-82, 88-108, 118
A	the whole document.	2, 8, 9-16, 19-36, 39, 77, 83-87, 109-110, 119-120

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T”	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.		
“E” earlier document but published on or after the international filing date		
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“X”	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“O” document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	“Y”	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	“&”	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15.December.2006 (15.12.2006)

Date of mailing of the international search report

(15-12-2006)

Name and mailing address of the ISA/  
O.E.P.M.Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.  
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

L. Serriñá Ramírez

Telephone No. +34 91 349 55 94



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2006/070114

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2005058657 A (ERTL, P.F. et al) 17.03.2005, page 1, paragraphs [8-9]; page 2, paragraph [17]; page 5, paragraphs [69-70]; page 7, paragraph [95]; example 14, claim 1, claims 8-9;	1, 3-7, 17-18, 37-38, 40-57, 76, 78-82, 88-108, 118
A	the whole document	2, 8, 9-16, 19-36, 39, 77, 83-87, 109-110, 119-120
Y	US 20030220276 A (NARAYAN OPENDRA) 27.11.2003, figure 1, page 1, paragraph [15]; page 3, paragraphs [26-37]; page 11, paragraph [80]; claim 42, claim 46,	1, 3-7, 17-18, 37-38, 40-57, 76, 78-82, 88-108, 118
A	the whole document.	2, 8, 9-16, 19-36, 39, 77, 83-87, 109-110, 119-120
A	US 6649409 A (STATENS SERUM INSTITUT) 18.11.2003, SEQ ID N°67, 69, 71, 73	10, 12
A	WO 0188141 A1 (GENEART GMBH) 22.11.2001, SEQ ID N° 4	11, 12
A	WO 2006020071 (US GOV.) 23.02.2006, SEQ ID N°1	11, 12
A	WO 2005034992 (US GOV.) 21.04.2005, SEQ ID N°24	11, 12
A	WO 0136614 (GENEART GMBH) 25.05.2001, SEQ ID N°:3, 2	14, 16
	WO 0232943 (US GOV.) 25.04.2002, SEQ ID N°:84-87, 158	85-87

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 58-75 and 111-117  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**The present Authority considers that the subject matter of claims 58 to 75 and 111 to 117 is covered by the provisions of PCT Rule 67.1(iv), relating to methods of treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic means. For this reason, no opinion will be given on the novelty, inventive step and industrial applicability of the subject matter of these claims (PCT Article 34(4)(a)(i)).**
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ES 2006/070114

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02072754 A	19.09.2002	CA 2454959 A EP 1372710 A US 2004146528 A JP 2004537974 T CN 1638795 A	19.09.2002 02.01.2004 29.07.2004 24.12.2004 13.07.2005
US 2005058657 A	17.03.2005	WO 03011334 A CA 2455329 A EP 1411979 A JP 2005507377 T	13.02.2003 13.02.2003 28.04.2004 17.03.2005 17.03.2005 17.03.2005
US 2003220276 A	27.11.2003	WO 9850070 A AU 7276198 A US 5849994 A	12.11.1998 27.11.1998 15.12.1998
US 6649409 B	18.11.2003	WO 0029561 A CA 2369119 A AU 3275300 A EP 1165798 A ZA 200108772 A AU 778809 B	25.05.2000 25.05.2000 05.06.2000 02.01.2002 24.01.2003 23.12.2004
WO 0188141 A	22.11.2001	EP 1156112 A CA 2408433 A AU 8178101 A BR 0110706 A EP 1282712 A CN 1429270 A US 2004152069 A AT 318908 T DE 60026199 D AT 333503 T DE 60121572 D HK 1042319 A DE 60026199 T	21.11.2001 22.11.2001 26.11.2001 28.01.2003 12.02.2003 09.07.2003 05.08.2004 15.03.2006 27.04.2006 15.08.2006 31.08.2006 20.10.2006 23.11.2006
WO 2006020071 A	23.02.2006	CA 2539068 A AU 2004279362 A AU 2005243730 A EP 1675613 A	21.04.2005 21.04.2005 24.11.2005 05.07.2006
WO 2005034992 A	21.04.2005	CA 2539068 A AU 2004279362 A	21.04.2005 21.04.2005
WO 0136614 A	25.05.2001	CA 2391560 A AU 2350401 A DE 10056747 A EP 1240333 A	25.05.2001 30.05.2001 31.05.2001 18.09.2002

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ES 2006/070114

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02072754 A	19.09.2002	CA 2454959 A EP 1372710 A US 2004146528 A JP 2004537974 T CN 1638795 A	19.09.2002 02.01.2004 29.07.2004 24.12.2004 13.07.2005
US 2005058657 A	17.03.2005	WO 03011334 A CA 2455329 A EP 1411979 A JP 2005507377 T	13.02.2003 13.02.2003 28.04.2004 17.03.2005 17.03.2005 17.03.2005
US 2003220276 A	27.11.2003	WO 9850070 A AU 7276198 A US 5849994 A	12.11.1998 27.11.1998 15.12.1998
US 6649409 B	18.11.2003	WO 0029561 A CA 2369119 A AU 3275300 A EP 1165798 A ZA 200108772 A AU 778809 B	25.05.2000 25.05.2000 05.06.2000 02.01.2002 24.01.2003 23.12.2004
WO 0188141 A	22.11.2001	EP 1156112 A CA 2408433 A AU 8178101 A BR 0110706 A EP 1282712 A CN 1429270 A US 2004152069 A AT 318908 T DE 60026199 D AT 333503 T DE 60121572 D HK 1042319 A DE 60026199 T	21.11.2001 22.11.2001 26.11.2001 28.01.2003 12.02.2003 09.07.2003 05.08.2004 15.03.2006 27.04.2006 15.08.2006 31.08.2006 20.10.2006 23.11.2006
WO 2006020071 A	23.02.2006	CA 2539068 A AU 2004279362 A AU 2005243730 A EP 1675613 A	21.04.2005 21.04.2005 24.11.2005 05.07.2006
WO 2005034992 A	21.04.2005	CA 2539068 A AU 2004279362 A	21.04.2005 21.04.2005
WO 0136614 A	25.05.2001	CA 2391560 A AU 2350401 A DE 10056747 A EP 1240333 A	25.05.2001 30.05.2001 31.05.2001 18.09.2002

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12N 15/49* (2006.01)

*C12N 15/863* (2006.01)

*A61K 39/21* (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ ES 2006/070114

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, WPI, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE, XPESP, NPL

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	WO 02072754 A1 (US GOV.(DEP. OF HEALTH AND HUMAN SERVICES)) 01.03.2002, página 15-19; página 23; página 24, líneas 6-22; página 27, líneas 19-21; página 28, líneas 1-10; página 33, 13-19; reivindicaciones 1, 4, 5, 12, 14, 17, 22, 26	1, 3-7, 17-18, 37-38, 40-57, 76, 78-82, 88-108, 118
A	todo el documento.	2, 8, 9-16, 19-36, 39, 77, 83-87, 109-110, 119-120

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&amp;” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. <b>15.Diciembre.2006 (15.12.2006)</b>	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional <b>15 diciembre 2006 (15-12-2006)</b>
--	--

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado <b>L. Serriñá Ramírez</b>
--	---

Nº de teléfono +34 91 349 55 94

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2006/070114

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	US 2005058657 A (ERTL, P.F. et al) 17.03.2005, página 1, párrafos [8-9]; página 2, párrafo [17]; página 5, párrafos [69-70]; página 7, párrafo [95]; ejemplo 14, reivindicación 1, reivindicaciones 8-9;	1, 3-7, 17-18, 37-38, 40-57, 76, 78-82, 88-108, 118
A	todo el documento	2, 8, 9-16, 19-36, 39, 77, 83-87, 109-110, 119-120
Y	US 20030220276 A (NARAYAN OPENDRA) 27.11.2003, figura 1, página 1, párrafo [15]; página 3, párrafos [26-37]; página 11, párrafo [80]; reivindicación 42, reivindicación 46,	1, 3-7, 17-18, 37-38, 40-57, 76, 78-82, 88-108, 118
A	todo el documento.	2, 8, 9-16, 19-36, 39, 77, 83-87, 109-110, 119-120
A	US 6649409 A (STATENS SERUM INSTITUT) 18.11.2003, SEQ ID N°67, 69, 71, 73	10, 12
A	WO 0188141 A1 (GENEART GMBH) 22.11.2001, SEQ ID N° 4	11, 12
A	WO 2006020071 (US GOV.) 23.02.2006, SEQ ID N°1	11, 12
A	WO 2005034992 (US GOV.) 21.04.2005, SEQ ID N°24	11, 12
A	WO 0136614 (GENEART GMBH) 25.05.2001, SEQ ID N°:3, 2	14, 16
	WO 0232943 (US GOV.) 25.04.2002, SEQ ID N°:84-87, 158	85-87

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones por los siguientes motivos:

1.  Las reivindicaciones n°s: 58-75 y 111-117 se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber: Las reivindicaciones 58-75 y 111-117 se refieren a una materia que esta Administración considera que está afectada por las disposiciones de la Regla 67.1 (iv) PCT, sobre métodos de tratamiento quirúrgico o terapéutico del cuerpo humano o animal, así como medios de diagnóstico. Consecuentemente, no se formulará ninguna opinión con respecto a la novedad, actividad inventiva y aplicación industrial de la materia de esas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(i) PCT)
2.  Las reivindicaciones n°s: se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3.  Las reivindicaciones n°s: son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1.  Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2.  Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3.  Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4.  Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

- Indicación en cuanto a la protesta
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
  - Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
  - El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.



# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2006/070114

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 02072754 A	19.09.2002	CA 2454959 A EP 1372710 A US 2004146528 A JP 2004537974 T CN 1638795 A	19.09.2002 02.01.2004 29.07.2004 24.12.2004 13.07.2005
US 2005058657 A	17.03.2005	WO 03011334 A CA 2455329 A EP 1411979 A JP 2005507377 T	13.02.2003 13.02.2003 28.04.2004 17.03.2005 17.03.2005 17.03.2005
US 2003220276 A	27.11.2003	WO 9850070 A AU 7276198 A US 5849994 A	12.11.1998 27.11.1998 15.12.1998
US 6649409 B	18.11.2003	WO 0029561 A CA 2369119 A AU 3275300 A EP 1165798 A ZA 200108772 A AU 778809 B	25.05.2000 25.05.2000 05.06.2000 02.01.2002 24.01.2003 23.12.2004
WO 0188141 A	22.11.2001	EP 1156112 A CA 2408433 A AU 8178101 A BR 0110706 A EP 1282712 A CN 1429270 A US 2004152069 A AT 318908 T DE 60026199 D AT 333503 T DE 60121572 D HK 1042319 A DE 60026199 T	21.11.2001 22.11.2001 26.11.2001 28.01.2003 12.02.2003 09.07.2003 05.08.2004 15.03.2006 27.04.2006 15.08.2006 31.08.2006 20.10.2006 23.11.2006
WO 2006020071 A	23.02.2006	CA 2539068 A AU 2004279362 A AU 2005243730 A EP 1675613 A	21.04.2005 21.04.2005 24.11.2005 05.07.2006
WO 2005034992 A	21.04.2005	CA 2539068 A AU 2004279362 A	21.04.2005 21.04.2005
WO 0136614 A	25.05.2001	CA 2391560 A AU 2350401 A DE 10056747 A EP 1240333 A	25.05.2001 30.05.2001 31.05.2001 18.09.2002

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2006/070114

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
		ZA 200204047 A	20.12.2002
		CN 1423698 A	11.06.2003
		OA 12156 A	08.05.2006
		AU 784635 B	18.05.2006
<hr/>			
WO 0232943 A	25.04.2002	CA 2419822 A	25.04.2002
		AU 8499901 A	29.04.2002
		EP 1311686 A	21.05.2003
		US 2004033487 A	19.02.2004
		JP 2004533208 T	04.11.2004
<hr/>			

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

*C12N 15/49* (2006.01)

*C12N 15/863* (2006.01)

*A61K 39/21* (2006.01)