(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 282 041**

(21) Número de solicitud: 200600762

(51) Int. Cl.:
***C12N 15/49*** (2006.01)
***C12N 15/863*** (2006.01)
***A61K 39/21*** (2006.01)

(12) ADICIÓN A LA PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación: **24.03.2006**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2007**

Fecha de la concesión: **23.02.2009**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **16.03.2009**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **16.03.2009**

(61) Número de solicitud de la patente principal: **P 200501841**

(73) Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**
**Serrano, 113**
**28006 Madrid, ES**

(72) Inventor/es: **Gómez Rodríguez, Carmen Elena;**
**Nájera García, José Luis;**
**Jiménez Tentor, Victoria;**
**Esteban Rodríguez, Mariano;**
**Heeney, Jonathan L. y**
**Mooij, Petra**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

(54) Título: **Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº P 200501841 para: "Vectores Recombinantes basados en el Virus Modificado de Ankara (MVA) como Vacunas Preventivas y Terapéuticas contra el SIDA".**

(57) Resumen:
Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº P 200501841 para: "Vectores Recombinantes basados en el Virus Modificado de Ankara (MVA) como Vacunas Preventivas y Terapéuticas contra el SIDA". Consisten en la obtención de vectores recombinantes derivados de MVA que presentan la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que los vectores diseñados para uso en humanos descritos en la patente principal, pero cuyas secuencias codificantes retrovirales son del mismo origen que las contenidas en un virus SHIV capaz de infectar a simios y de dar lugar en ellos a síntomas similares a los del SIDA. Permiten realizar una estimación del potencial como vacunas de los vectores de la patente principal inmunizando con ellos simios y evaluando la capacidad para controlar la infección que la respuesta inmune generada es capaz de conferir tras desafiar la misma mediante la inoculación del correspondiente virus SHIV patógeno.

ES 2 282 041 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

## DESCRIPCIÓN

Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº P 200501841 para: "Vectores Recombinantes basados en el Virus Modificado de Ankara (MVA) como Vacunas Preventivas y Terapéuticas contra el SIDA".

### Ámbito de la invención

El objeto de la presente patente de adición es la mejora de la patente principal mediante la construcción de 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 los vectores derivados de MVA de la presente patente de adición, lo que es un indicativo de la potencialidad de los vectores homólogos, derivados de MVA, de la patente principal, 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 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 genero 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 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. 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 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 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 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.

- 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.

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

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, serian 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 Copenhague), 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 perdida 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 y otros han sido delecionados en ambos vectores, 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 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 delecionados 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:

- Alta seguridad, demostrada cuando se usó en más de 120000 individuos durante la campana 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, 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.

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 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. Si 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.

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 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 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 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, 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. 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 ano 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, 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.

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 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 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 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, particularmente respuestas citotóxicas inmunes asociadas con linfocitos T $CD8^+$; 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. Si 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 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 $TK^+$. Ello implica que el vector recombinante MVA descrito en dicho estado de la técnica exprese timidina quinasa y, por consiguiente, mantenga una cierta 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 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 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 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 eliminar la proteína gp41 ni las posibles consecuencias derivadas de ello.

En la patente principal, por su parte, está descrita la invención de distintos vectores recombinantes, basados en el MVA, capaces de expresar diversos antígenos del VIH, 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 recombinantes de la patente principal y de la presente patente de adición 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 realizó en los vectores de la patente principal de forma que se generara una proteína de fusión que mantuviera todos los epítopos 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 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 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. La utilización para la generación de los vectores recombinantes de secuencias obtenidas específicamente de aislados naturales y que preferentemente pertenecen a los clades 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 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 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.

Los resultados de los ensayos descritos en los Ejemplos de la patente principal demuestran la capacidad inmunogénica de los vectores de la invención descritos en ella 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 patente principal, que expresan proteínas propias del VIH-1 y están diseñados para ser utilizados en seres humanos, 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 HIV-1 mientras que las posibles secuencias correspondientes a otros genes, como puedan ser gag, pol o nef, procederán del SIV);

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 patente de adición cubre la necesidad de disponer de vectores para poder valorar la capacidad protectora que podría generarse en seres humanos al ser vacunados con vectores del tipo de los descritos en la patente principal. Adicionalmente, proporciona también vectores recombinantes análogos construidos a partir de otro derivado de poxvirus, el NYVAC, para poder comparar el efecto de ambos.

**Descripción de las mejoras de la invención**

La presente patente de adición proporciona nuevos vectores recombinantes derivados del virus MVA capaces de expresar simultáneamente, de forma análoga a los vectores descritos en la patente principal Nº ES200501841, una forma de la proteína Env que carece de la parte correspondiente a la proteína gp41 y una proteína de fusión correspondiente a las proteínas Gag, Pol y Nef que no se proteoliza por acción de la proteasa del retrovirus, 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. A diferencia de los vectores descritos en dicha patente principal, sin embargo, la proteína de fusión correspondiente a las proteínas Gag, Pol y Nef no se sintetiza a partir de secuencias procedentes del 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 con un virus SHIV patógeno en el que la secuencia del gen env deriva de la de un aislado del VIH-1, mientras 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 presente patente de adición 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 descritos en la presente patente de adición cumplen la condición de 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, es decir, los vectores descritos en la patente principal Nº ES200501841. De acuerdo con ello, de forma análoga a los vectores de dicha patente principal, la expresión de la proteína Env sintetizada a partir de los vectores de la presente patente de adición 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 presente patente de adición se muestra en la parte superior de la Figura 3. 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 de la patente principal, 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 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 presente patente de adición 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 patente principal (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 de la presente patente de adición. 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 deleción del lugar activo de

la integrara, 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). 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 3, 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 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.

La patente principal describe la construcción de dos vectores que suponen sendas realizaciones de vectores de la invención descrita en dicha patente que cumplen todas las características preferidas mencionadas, los vectores denominados MVA-B y MVA-C. 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 patente de adición 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 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 de la presente patente de adición cuya construcción se describe, 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, 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 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.

De forma análoga a los Ejemplos descritos en la patente principal, para la realización de los Ejemplos encaminados a valorar la capacidad inmunogénica de los vectores de la presente patente de adición 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 el vector MVA-SHIV. Al igual que en la patente principal se utilizaron para tal finalidad vectores recombinantes derivados de NYVAC, NYVAC-B y NYVAC-C, que contenían los mismos insertos que los correspondientes vectores MVA-B y MVA-C, se ha generado también un vector derivado 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 MVA-SHIV y en los correspondientes vectores homólogos para uso en humanos, NYVAC-B y NYVAC-C. A los vectores que cumplen estas características se les ha denominado, de forma abreviada, NYVAC-SHIV. De nuevo, teniendo en cuenta el origen de las secuencias presentes en su inserto, al vector concreto cuya construcción se describe 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 patente de invención, los vectores del tipo NYVAV-SHIV están también comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

La presente patente de adición se refiere también a composiciones que contienen dichos vectores recombinantes y 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, sometiéndolos 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 presente patente de adición responderá al esquema que se tenga previsto seguir para la vacunación de seres humanos o un esquema del cual se desee evaluar su grado de adecuación. Según esto, la generación de la respuesta protectora se puede conseguir mediante la administración únicamente de vectores de la presente patente de invención, en una única dosis o en dosis separadas en el tiempo, o como parte de un protocolo de inmunización en el que, en distintas dosis, se administran vectores diferentes que expresan todos ellos antígenos del SHIV. Cuando se utilizan protocolos en el que el desencadenamiento de la respuesta inmune (*priming*) se produce mediante la administración de una o más dosis de un primer vector de inmunización y la potenciación o reforzamiento de la respuesta (*boosting*) se produce mediante la administración de una o más dosis de un vector diferente, los vectores de la presente patente de adición pueden formar parte de la(s) dosis inicial(es) que desencadena(n) la respuesta o de una o más dosis posteriores destinadas a potenciar la respuesta previamente generada. 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, se prefiere que los vectores recombinantes derivados del MVA de la presente patente de adición estén presentes al menos en una dosis de vacunación posterior a la primera o posterior a la segunda, pudiendo estar ausente o presente de la(s) primera(s) 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 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 presente patente de adición que sea administrado en otra(s) dosis diferente(s). Son realizaciones preferidas del uso de los vectores de la invención para evaluar la eficacia de candidatos a vectores de vacunación diseñados para su uso en seres humanos y/o la de protocolos de vacunación para seres humanos aquellas en las que la primera y, opcionalmente, la segunda dosis de vacunación, contienen un vector de ADN desnudo que expresa los mismos antígenos del SHIV que los vectores de la presente patente de adición, mientras que en las dosis posteriores de vacunación (que, preferiblemente, no serán más de dos) está presente al menos un vector de la presente patente de adición.

La construcción de vectores de la presente patente de invención y el uso de los mismos para la evaluación de su capacidad inmunogénica y protectora se describe con más detalle con ayuda de las Figuras y los Ejemplos que aparecen más adelante en la presente memoria de patente de adición.

**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 delecionados en MVA e intactos en NYVAC, los nombres en negrita corresponden a denominaciones de genes delecionados tanto en MVA como en NYVAC y los nombres en cursiva corresponden a denominaciones de genes intactos en MVA y que presentan deleciones 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 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 3 muestra la estructura de las secuencias codificantes de antígenos de retrovirus presentes en los vectores de la presente patente de adición. 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 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 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-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 trasloco respetando el marco de lectura al extremo 3' de la secuencia codificante de la proteína de fusión; adicionalmente, la glicina del extremo amino se sustituyó por alanina (ΔMyr (G → A)) para impedir su miristilación, mientras se anulaba la actividad enzimática de la proteasa ($X_{PR}$) introduciendo una mutación puntual en su sitio activo (ΔPRr (D → N)).

La Figura 4 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 4a muestra los pasos que conducen a la ob-

tención del vector pLZAW-1-89.6P-9; la Figura 4b 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 89.6gp120, aparece indicada como "89.6Psynenv120".

La Figura 5 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 6 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 7 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 8 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 9 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 10 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 11 muestras 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 12 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 patente de adición, 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 13 muestra, en escala logarítmica, el número de células SFC (*spot forming cells*) que expresaban IFN-y obtenido por cada $10^6$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en muestras procedentes de cada uno de los macacos 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 14 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 15 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 16 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. 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 17 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, 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 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 18 muestra la concentración, por microlitro de sangre, de células 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 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 + 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 SHIV89.6P inoculado desencadenó en él.

La Figura 19 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 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).

**Ejemplos**

*Construcción de los vectores*

Ejemplo 1

*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 gp 120 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 descritos en la patente principal y utilizados en los ensayos comentados en los Ejemplos de dicha patente principal.

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 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: 3) y SIVgpn (SEQ ID NO: 4), 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 1.

TABLA 1

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

| | | |
|---|---|---|
| Secuencia flanqueante izquierda de TK | 410-908 | Complementaria |
| T5NT para β-gal | 929-935 | Complementaria |
| β-gal | ATG-TAA (936-4079) | Complementaria |
| Promotor E3L para β-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:

- 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 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 el gen de TK, un promotor E3L dirigiendo la expresión de un casete con $\beta$-gal y un brazo derecho del gen de TK.

- 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.

La construcción del plásmido pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18 a partir de estos otros dos plásmidos se representa en las Figuras 4a y 4b. 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 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 de la ADN polimerasa, y se clon 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 pLZAW 1-89.6P-9 (9131 pb) (Figura 4a).

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 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) (Figura 4b).

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 conduce a la autodeleción 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*

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 transferencia pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18, usando para ello el reactivo de transfección lipofectamina (Lipofectamine™ 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.

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$^+$)), 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 perdido el gen marcador (MVA-SHIV (X-Gal$^-$)), 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$^+$ 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 amplificó y utilizó para el siguiente paso de purificación. En el segundo pase, se aislaron 22 placas X-Gal$^+$, 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$^+$ y 4 placas X-Gal$^-$, todas las cuales expresaban de forma eficiente ambos antígenos. Una de las placas X-Gal$^-$ (MVA-89.6P-SIVgpn-1.6.8) y una de las placas X-Gal$^+$ (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$^-$ y 6 placas X-Gal$^+$. El recombinante denominados MVA-89.6P-SIVgpn-1.6.8.5 (X-Gal$^-$) 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$^-$) para los estudios de inmunización en simios; las características de los diferentes stocks P3 obtenidos se especifican más adelante en el Ejemplo 5.

*Caracterización del MVA-89.6P-SIVgpn*

Para confirmar la homogeneidad genética del virus MVA-89.6P-SIVgpn-1.6.8.5 (X-Gal$^-$) 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 oligonucléotidos 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: 2)

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 5.

La parte inferior de la Figura 5, 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 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 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: 2) en una mezcla de reacción que contenía 0,3 mM de dNTPs, 2,5 mM de $MgCl_2$ y 2,5 U de la enzima polimerasa Platinum Taq. El programa incluye un ciclo de desnaturalización a 94ºC durante 5 min, 25 ciclos de desnaturalización a 94ºC durante 1 min, hibridación a 60ºC durante 1 min y extensión 68ºC durante 2 min, y finalmente un ciclo de extensión a 68ºC 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 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), TK-R2 (SEQ ID NO: 2) y E/L (SEQ ID NO: 6) obteniéndose la secuencia representada por SEQ ID NO: 5.

Los elementos que forman parte del inserto presente en el genoma del virus MVA-89.6-SIVgpn se especifican a continuación en la Tabla 2.

TABLA 2

*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 2

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

2.1. - *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 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) que reconoce 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 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 6, tanto la proteína 89.6-gp 120 (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.

2.2. *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-gp 120 del clade B (anti-gp 120) o bien el anticuerpo monoclonal anti-SIVgag-p27 proporcionado por el programa EVA (ARP392). Los resultados, mostrados en la Figura 7, 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").

Ejemplo 3

*Construcción v 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 EuroVacI), 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 1), utilizando como reactivo lipofectamina (Invitrogen, Cat. 18324-012, lote 1198865) siguiendo las 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$^+$)), 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$^-$)), 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$^+$ 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$^+$; 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$^+$, 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$^-$ y 12 placas X-Gal$^+$; 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$^-$) y NYVAC-89.6P-SIVgpn-2.1.2.3 (X-Gal$^-$) se amplificaron y utilizaron en el siguiente paso de purificación. En el quinto pase se aislaron 12 placas X-Gal$^-$; todas ellas expresaban de forma eficiente ambos antígenos. El recombinante denominado NYVAC-89.6P-SIVgpn-2.1.1.1.4 (X-Gal$^-$) 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 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 oligonucléotidos 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: 2), de forma análoga a la descrita en el Ejemplo 1.

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 8. La parte inferior de dicha Figura 86 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 8, 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 4

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

4.1.- *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 9, 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.

4.2. *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 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 10, 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").

Ejemplo 5

*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 3:

TABLA 3

*Stocks de virus recombinantes seleccionados para estudios de inmunización en macacos*

| **MVA-89.6P-SIVgpn** | | | |
|---|---|---|---|
| **Stock** | **Título (UFP/ml)** | **UFP totales enviadas** | **Fecha de envío** |
| 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 |
| **NYVAC-89.6P-SIVgpn** | | | |
| **Stock** | **Título (UFP/ml)** | **UFP totales enviadas** | **Fecha de envío** |
| 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 Tabla 3. 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 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 infectadas, pero que no habían recibido virus en la solución con las que deberían haber sido infectadas (extracto M). La Figura 11 muestra los resultados de las inmunotinciones con cada uno de los anticuerpos, correspondiendo la parte superior a la tinción con el anticuerpo anti-gp120 y la inferior a la tinción con el anticuerpo anti-SIV-gag-p27.

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.

*Estudio preclínico de la eficacia como vacuna*

*Protocolo de inmunización y desafío posterior*

Los ensayos que se describen a continuación en los Ejemplos 5 y 6 se llevaron a cabo para evaluar la inmunogenicidad y la eficacia de los vectores descritos en la presente patente de adición 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 Rijswisjk (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 de la presente patente de adición cuya construcción y caracterización se ha descrito en los Ejemplos 1 y 2, 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-polnef, 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 6 y 7.

Ejemplo 6

*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 4:

TABLA 4

*Grupos de inmunización y tratamiento recibido*

| **Grupo** | **Nº de macacos** | **INMUNIZACIONES** | | | | **DESAFÍO: Semana 32** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Semana 0** | **Semana 4** | **Semana 20** | **Semana 24** | |
| 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-polnef, 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,;
- 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.

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 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 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 12 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 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 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 del Nº 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 13, 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 lo grupos al producirse inmunidad frente al SHIV.

Para simplificar la interpretación de los datos, en la Figura 14 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 15 y 16, 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 15) o IL-2 (Figura 16).

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, ◆) 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, -■-), 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, (▲)). 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 7

*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 ensayos descritos en el Ejemplo 6, 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 (PBMC).

7.1. - *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 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 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 plasma y es capaz de detectar 50 copias por ml. Los valores obtenidos para cada uno de los macacos se muestran en la Figura 17, 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 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.

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.

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 6 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.

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 refuerzo o potenciación de la respuesta inmune generada.

7.2. - *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 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 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 18.

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 18, 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.

7.3. - *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 19 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.

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. **Antonie**, G., F., **Scheiflinger**, F. **Dorner**, y F. G. **Falkner**. 1998. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparision with other orthopoxviruses. *Virology* 244:365-396.

2. **Meyer**, H., G. **Sutter**, and A. **Mayr**. 1991. Mapping ofdeletions in the genome of highly attenuated vaccinia virus MV A 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.

4. **Altenburger**, W., C-P. **Sütter**, and J. **Altenburger**. 1989. Partial deletion of the human host range inthe attenuated vaccinia virus MV A. *Arch. Virol*. 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.

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.

7. **Drexler**, l., 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.

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.

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.

16. **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.

17. **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.

18. **Didierlaurent** A., **Ramírez** 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. Acuir. 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-kB 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 **Haaft** 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 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.

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.

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, Gag, Pol y Nef de virus quiméricos de la inmunodeficiencia de simio y humano, SHIV.

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 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 gp 120.

5. Un vector recombinante derivado del virus MVA según cualquiera de las 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 retroviral.

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 infectivo 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 gp 120, 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 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 del virus quimérico SHIV89.6P.

10. Un vector recombinante según la reivindicación 9, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína Env está representada por SEQ ID NO: 3.

11. Un vector recombinante según la reivindicación 9, en el que la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de fusión Gag-Pol-Nef está representada por SEQ ID NO: 4.

12. Un vector recombinante según las reivindicaciones 10 y 11 que comprende un inserto cuya secuencia está representada por SEQ ID NO: 5.

13. Una composición que comprende al menos un vector recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

14. Una composición según la reivindicación 13 que comprende adicionalmente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. Uso de un vector recombinante derivado del virus MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14 para evaluar la eficacia como vacuna de

un vector derivado del virus MVA, diseñado para ser utilizado en seres humanos, que presenta la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que el primer vector.

16. Uso según la reivindicación 15, en el que la eficacia como vacuna de un vector derivado de MVA, diseñado para ser utilizado en seres humanos, se evalúa tras administrar a macacos un vector recombinante derivado del virus MVA con la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que el vector diseñado para ser utilizado en seres humanos, o una composición que lo comprende.

17. Uso según la reivindicación 16, en el que la eficacia como vacuna de un vector derivado de MVA, diseñado para ser utilizado en seres humanos, 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 con la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que el vector diseñado para ser utilizado en seres humanos, o una composición que lo comprende.

18. Uso según la reivindicación 17, 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 con la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que el vector diseñado para ser utilizado en seres humanos, o una 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 o de la composición que lo comprende.

19. Uso según la reivindicación 18, 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.

20. Uso según la reivindicación 19, en el que la forma patógena de virus quimérico de la inmunodeficiencia de simio y humana inoculada es el SHIV89.6P.

21. Uso según la reivindicación 20, en el que el SHIV89.6P se inocula por vía intravenosa.

22. Uso según la reivindicación 21, 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 12.

23. Uso según la reivindicación 22, en el que el vector diseñado para ser utilizado como vacuna en seres humanos MVA que presenta la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que el vector de la reivindicación 12 es el vector MVA-B y/o el vector MVA-C.

24. Uso según la reivindicación 23, en el que el vector de la reivindicación 12 se administra a los macacos en una o más dosis de vacunación de potenciación de la respuesta inmune.

25. Uso según la reivindicación 24, en el que el vector de la reivindicación 12 se administra a los macacos en la tercera dosis de vacunación.

26. Uso según la reivindicación 25, en el que el vector de la reivindicación 12 se administra a los macacos adicionalmente en una cuarta dosis de vacunación.

27. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 ó 26, en el que el vector de la reivindicación 12 está ausente de la primera y/o de la segunda dosis de vacunación administradas a los macacos.

28. Uso según la reivindicación 27, en el que el vector de la reivindicación 12 está ausente de la primera y de la segunda dosis de vacunación administradas a los macacos.

29. Uso según la reivindicación 28, 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.

30. Uso según la reivindicación 24, en el que el vector de la reivindicación 12 se administra por vía intramuscular.

31. 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 1 a 12.

32. Un vector recombinante derivado del virus NYVAC según la reivindicación 31 que comprende un inserto cuya secuencia está representada por SEQ ID NO: 5.

33. Uso de un vector recombinante derivado del virus NYVAC según una cualquiera de las reivindicaciones 31 ó 32 que presenta la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que el vector derivado de

MVA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 como control en un procedimiento en el que se evalúa la eficacia como vacuna de un vector derivado del virus MVA, diseñado para ser utilizado en seres humanos, mediante el uso del vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que presenta la misma estructura de organización génica, sitio de inserción y promotores que el vector derivado de MVA diseñado para ser utilizado en seres humanos.

34. Uso de un vector recombinante derivado del virus NYVAC según la reivindicación 33 en el que el vector recombinante derivado del virus NYVAC es el vector de la reivindicación 32 y el vector recombinante derivado de MVA que se utiliza en el procedimiento en el que se evalúa la eficacia como vacuna de otro vector recombinante derivado del virus MVA, diseñado para ser utilizado en seres humanos, es un vector recombinante de la reivindicación 12.

35. Uso según la reivindicación 34, en el que se evalúa la eficacia como vacuna del vector MVA-B y/o del vector MVA-C.

36. Un plásmido útil como intermedio en la obtención de un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 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 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 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. 4b.

37. Plásmido según la reivindicación 36, 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.

38. Plásmido según la reivindicación 37, que es el plásmido pLZAW 1-89.6P-SIVgpn-18.

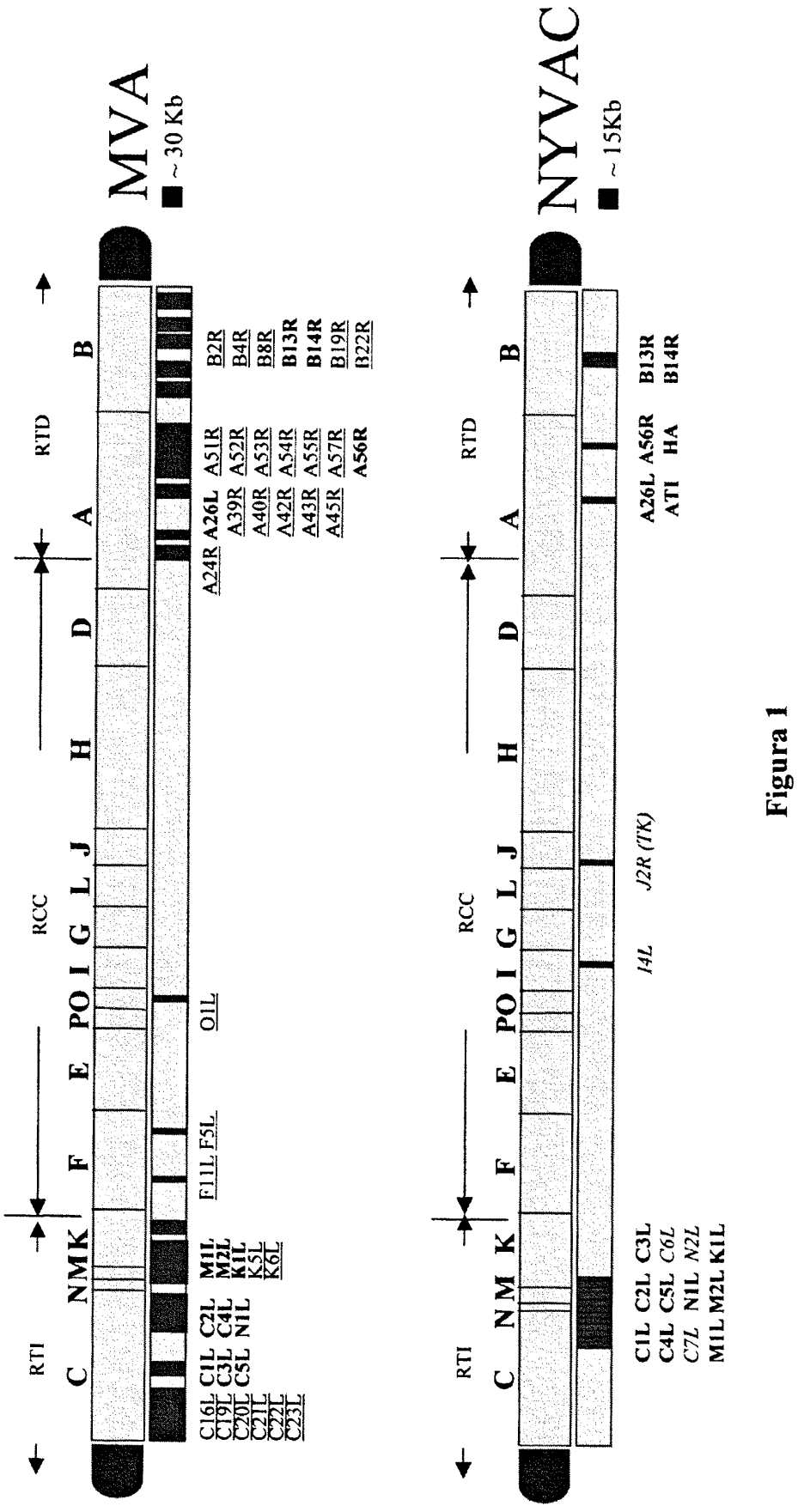

MVA
~ 30 Kb
RTI
RCC
RTD
C N M K F E P O I G L J H D A B
C16L C1L C2L M1L F11L F5L O1L
C19L C3L C4L M2L
C20L C5L N1L K1L
C21L K5L
C22L K6L
C23L
A24R A26L A51R B2R
A39R A52R B4R
A40R A53R B8R
A42R A54R B13R
A43R A55R B14R
A45R A57R B19R
A56R B22R
NYVAC
~ 15Kb
RTI
RCC
RTD
C N M K F E P O I G L J H D A B
C1L C2L C3L
C4L C5L C6L
C7L N1L N2L
M1L M2L K1L
I4L J2R (TK)
A26L A56R B13R
ATI HA B14R

**Figura 1**

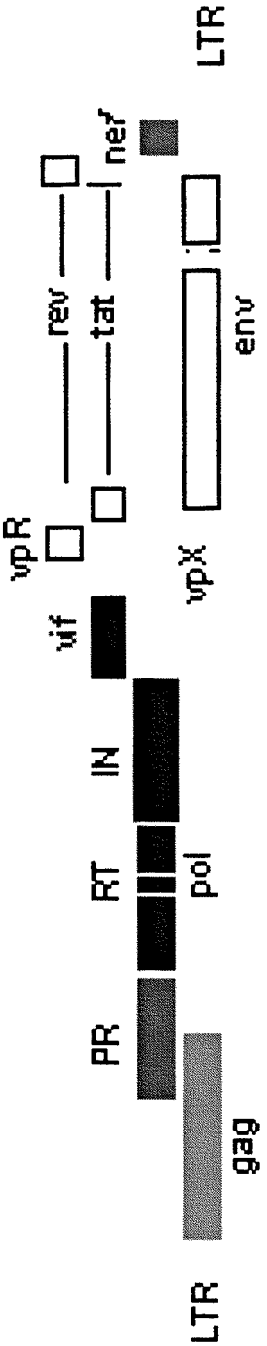
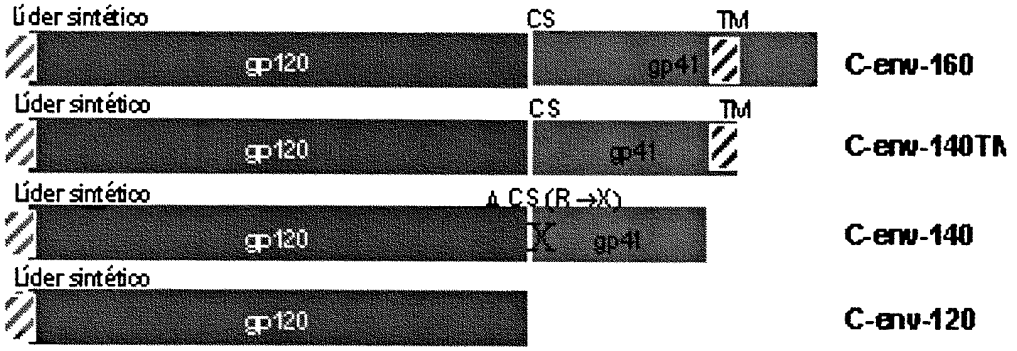



**Figura 2**

**ENV**




**GagPolNef (gpn)**




**Figura 3**

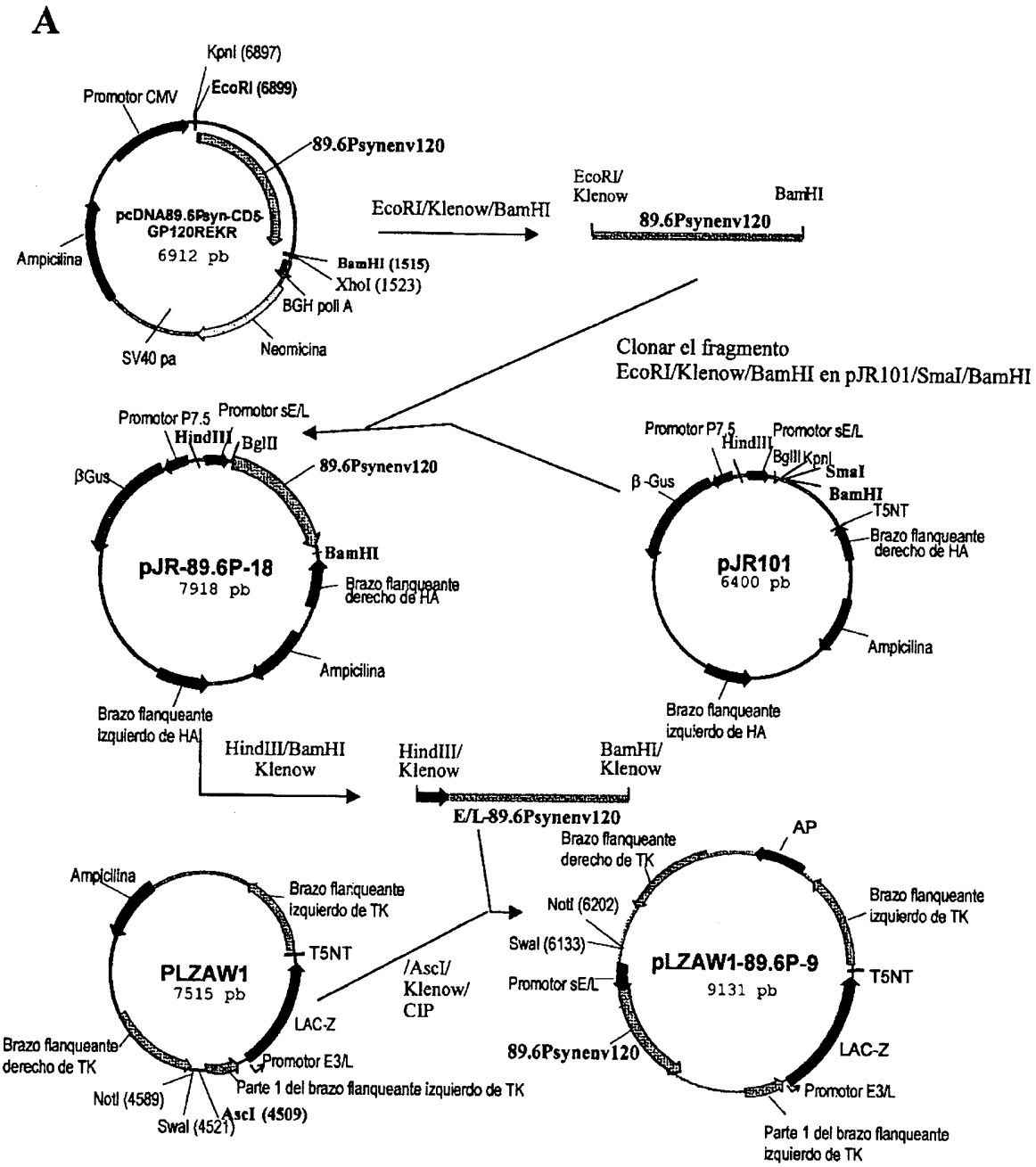

A
KpnI (6897)
EcoRI (6899)
Promotor CMV
89.6Psynenv120
pcDNA89.6Psyn-CD5-GP120REKR
6912 pb
Ampicilina
BamHI (1515)
XhoI (1523)
BGH poli A
Neomicina
SV40 pa
EcoRI/Klenow/BamHI
EcoRI/ Klenow
BamHI
89.6Psynenv120
Clonar el fragmento EcoRI/Klenow/BamHI en pJR101/SmaI/BamHI
Promotor P7.5
Promotor sE/L
HindIII
BglII
βGus
89.6Psynenv120
pJR-89.6P-18
7918 pb
BamHI
Brazo flanqueante derecho de HA
Ampicilina
Brazo flanqueante izquierdo de HA
β -Gus
KpnI
SmaI
T5NT
pJR101
6400 pb
HindIII/BamHI Klenow
HindIII/ Klenow
BamHI/ Klenow
E/L-89.6Psynenv120
PLZAW1
7515 pb
Brazo flanqueante izquierdo de TK
T5NT
LAC-Z
Promotor E3/L
Parte 1 del brazo flanqueante izquierdo de TK
NotI (4589)
SwaI (4521)
AscI (4509)
/AscI/ Klenow/ CIP
Brazo flanqueante derecho de TK
AP
NotI (6202)
SwaI (6133)
pLZAW1-89.6P-9
9131 pb
Promotor sE/L
89.6Psynenv120
Parte 1 del brazo flanqueante izquierdo de TK

**Fig. 4a**

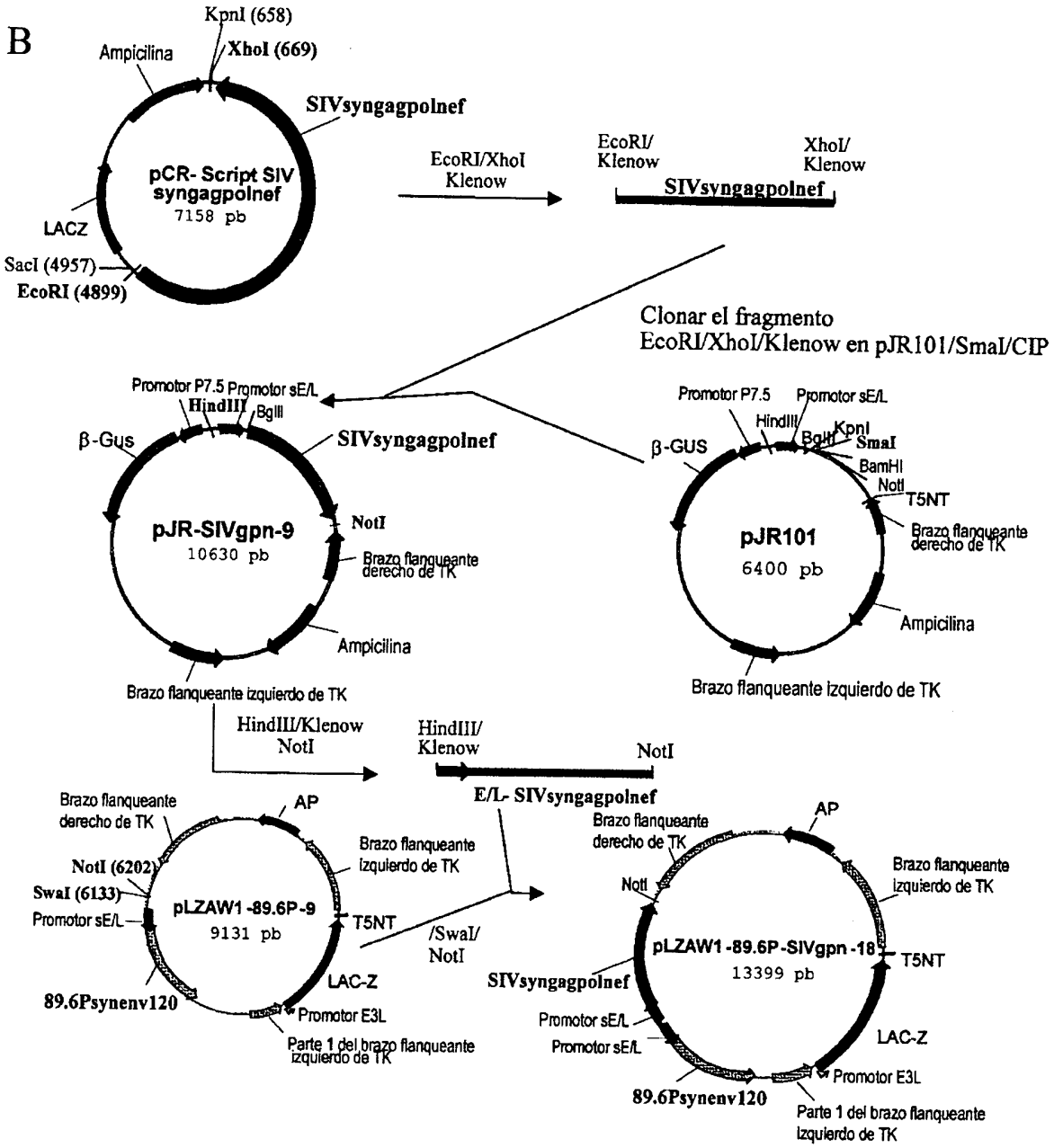

B
KpnI (658)
XhoI (669)
Ampicilina
SIVsyngagpolnef
pCR- Script SIV syngagpolnef
7158 pb
LACZ
SacI (4957)
EcoRI (4899)
EcoRI/XhoI Klenow
EcoRI/ Klenow
XhoI/ Klenow
SIVsyngagpolnef
Clonar el fragmento EcoRI/XhoI/Klenow en pJR101/SmaI/CIP
Promotor P7.5
Promotor sE/L
HindIII
BglII
β-Gus
SIVsyngagpolnef
pJR-SIVgpn-9
10630 pb
NotI
Brazo flanqueante derecho de TK
Ampicilina
Brazo flanqueante izquierdo de TK
Promotor P7.5
Promotor sE/L
HindIII
KpnI
BglII
SmaI
β-GUS
BamHI
NotI
T5NT
pJR101
6400 pb
Brazo flanqueante derecho de TK
Ampicilina
Brazo flanqueante izquierdo de TK
HindIII/Klenow NotI
HindIII/ Klenow
NotI
E/L- SIVsyngagpolnef
Brazo flanqueante derecho de TK
AP
Brazo flanqueante izquierdo de TK
NotI (6202)
SwaI (6133)
Promotor sE/L
pLZAW1 -89.6P -9
9131 pb
T5NT
LAC-Z
89.6Psynenv120
Promotor E3L
Parte 1 del brazo flanqueante izquierdo de TK
/SwaI/ NotI
Brazo flanqueante derecho de TK
AP
Brazo flanqueante izquierdo de TK
NotI
pLZAW1 -89.6P -SIVgpn -18
13399 pb
T5NT
SIVsyngagpolnef
Promotor sE/L
Promotor sE/L
LAC-Z
Promotor E3L
89.6Psynenv120
Parte 1 del brazo flanqueante izquierdo de TK

**Fig. 4b**

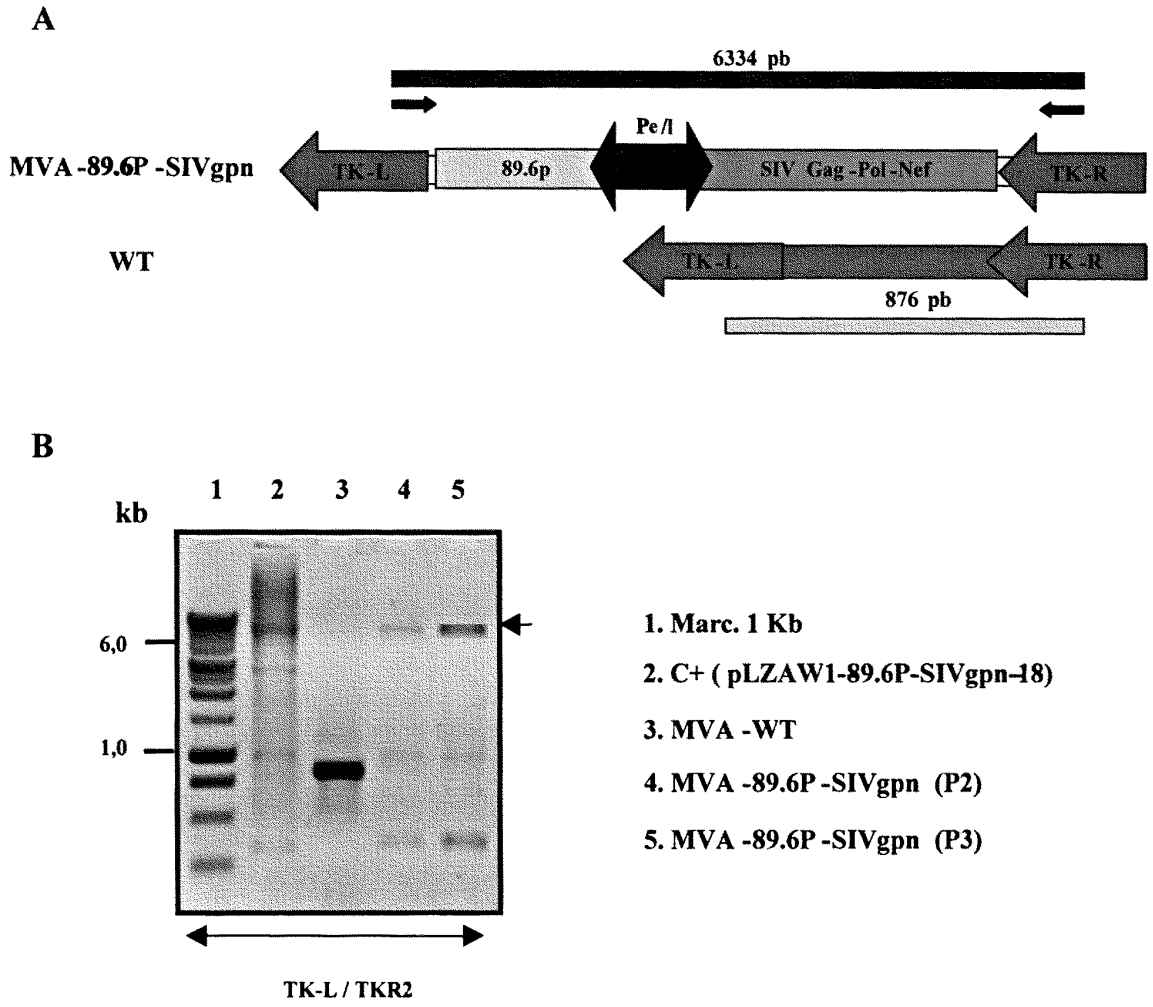

A
6334 pb
Pe/l
MVA-89.6P-SIVgpn
TK-L
89.6p
SIV Gag-Pol-Nef
TK-R
WT
TK-L
TK-R
876 pb
B
kb
1 2 3 4 5
6,0
1,0
TK-L / TKR2
1. Marc. 1 Kb
2. C+ ( pLZAW1-89.6P-SIVgpn-18)
3. MVA -WT
4. MVA -89.6P -SIVgpn (P2)
5. MVA -89.6P -SIVgpn (P3)

**Figura 5**

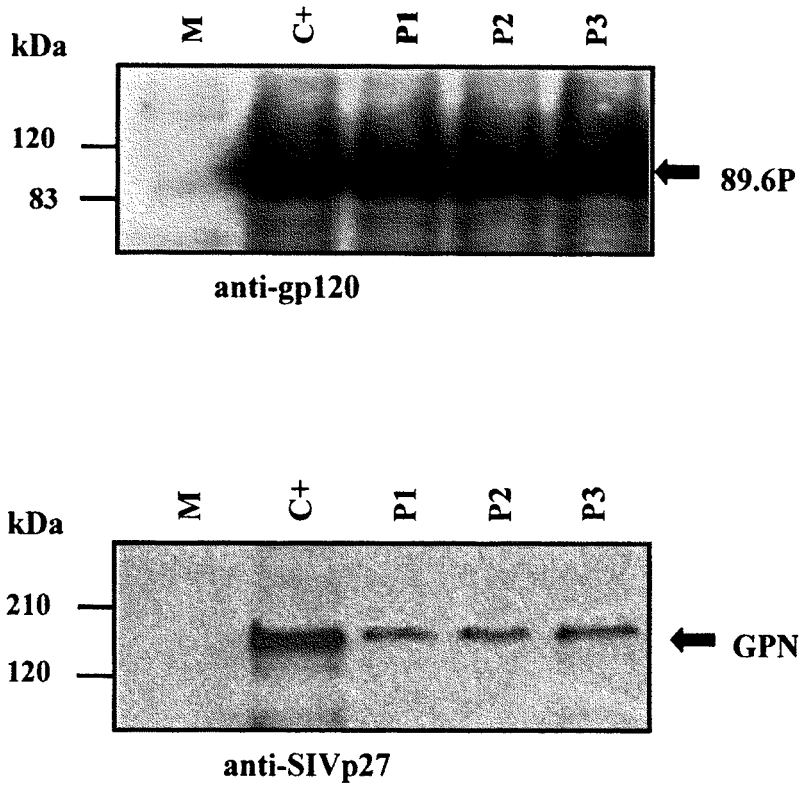
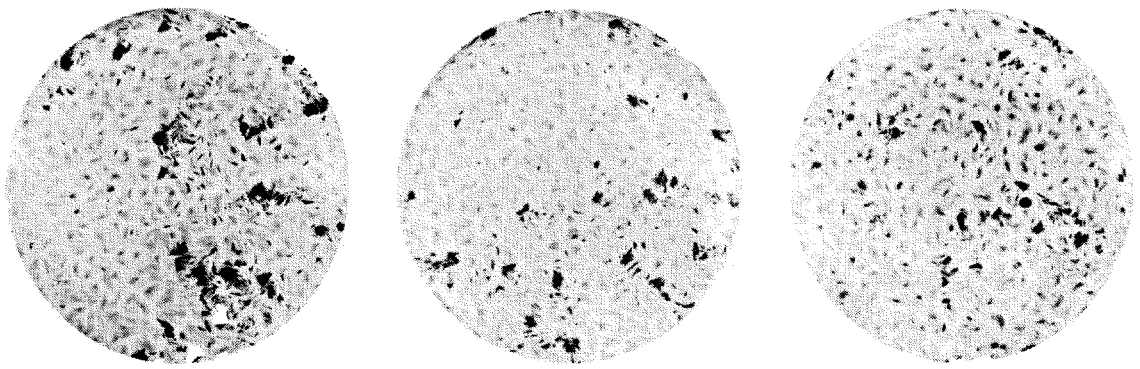

kDa
M
C+
P1
P2
P3
120
83
89.6P
anti-gp120
kDa
M
C+
P1
P2
P3
210
120
GPN
anti-SIVp27

**Figura 6**


Anti-WR
Anti-gp120
Anti-SIVp27

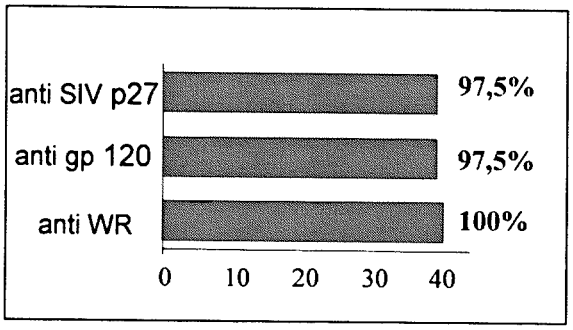
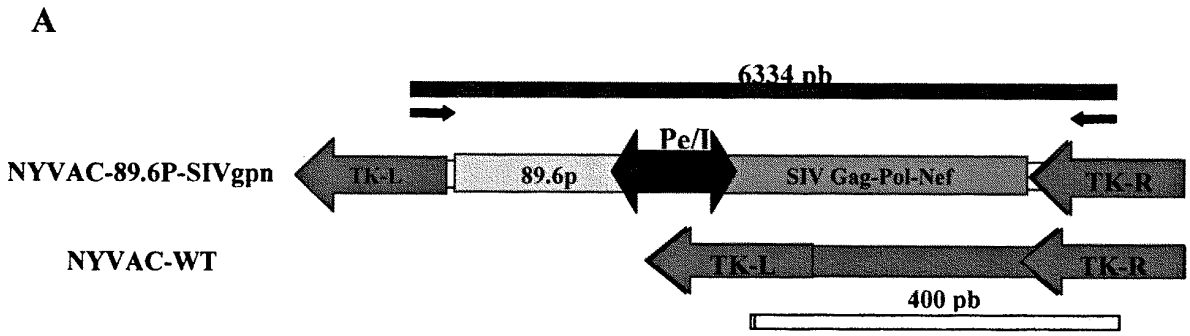

MVA-89.6P-SIVgpn
anti SIV p27
anti gp 120
anti WR
97,5%
97,5%
100%
0
10
20
30
40

**Figura 7**


A
6334 pb
Pe/I
NYVAC-89.6P-SIVgpn
TK-L
89.6p
SIV Gag-Pol-Nef
TK-R
NYVAC-WT
TK-L
TK-R
400 pb

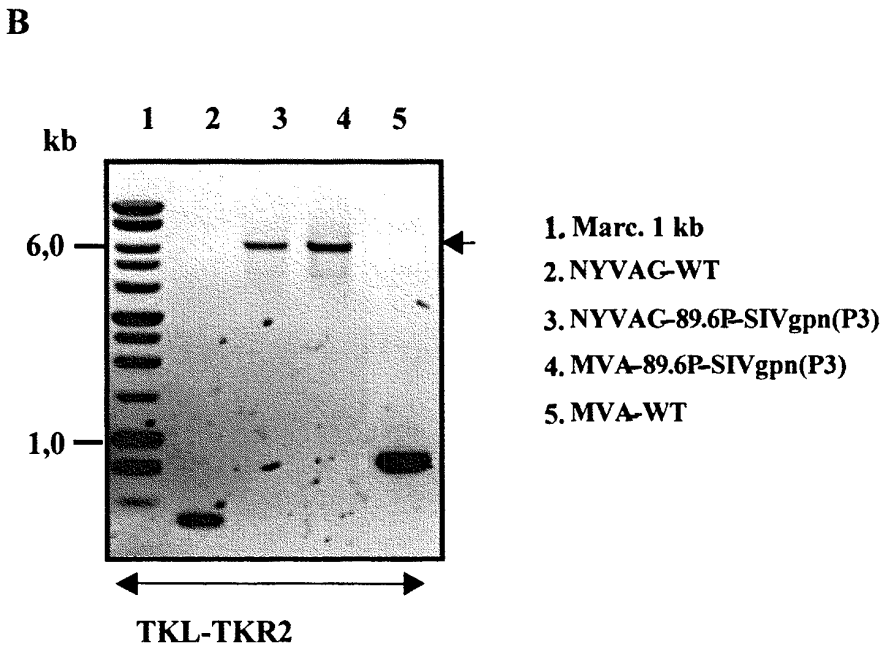
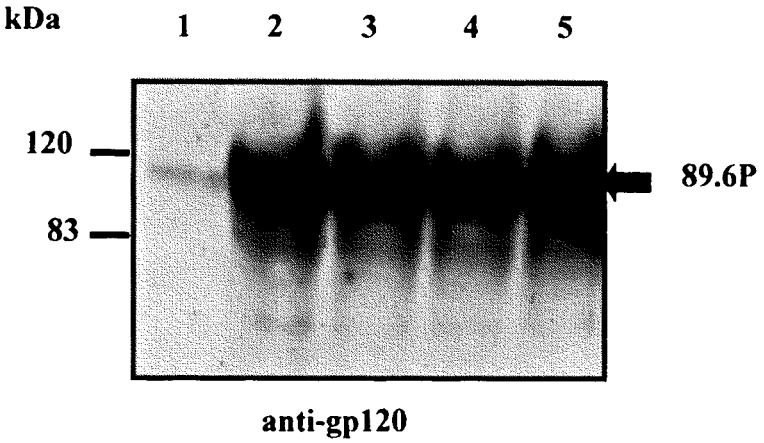

B
kb
1 2 3 4 5
6,0
1,0
TKL-TKR2
1. Marc. 1 kb
2. NYVAG-WT
3. NYVAG-89.6P-SIVgpn(P3)
4. MVA-89.6P-SIVgpn(P3)
5. MVA-WT

**Figura 8**


kDa
1
2
3
4
5
120
83
89.6P
anti-gp120

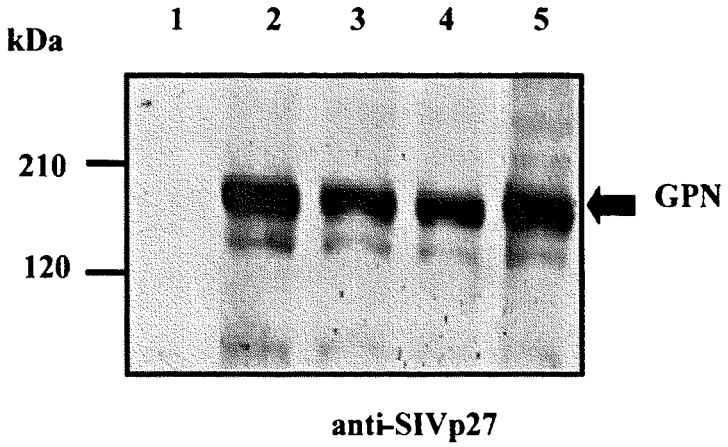
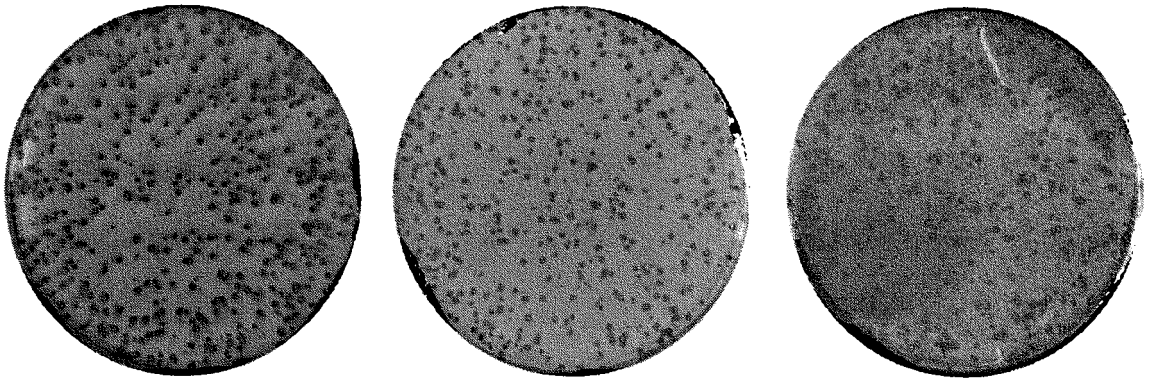

kDa
1
2
3
4
5
210
120
GPN
anti-SIVp27

**Figura 9**



Anti-WR Anti-gp120 Anti –SIV p27

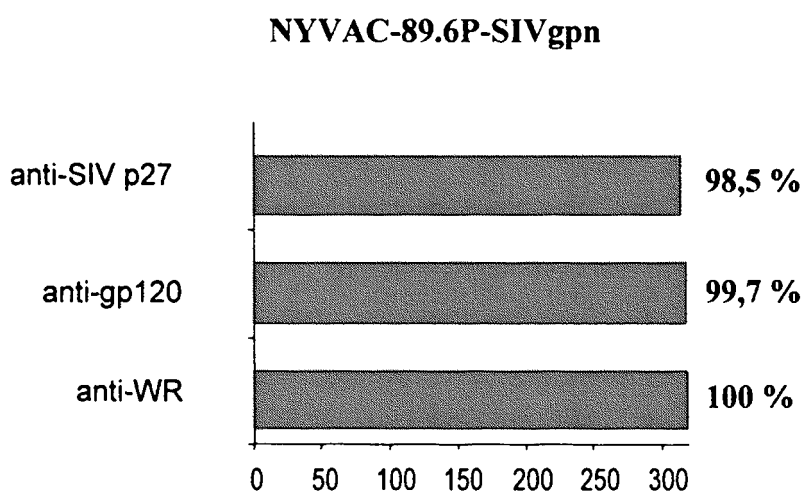



**Figura 10**

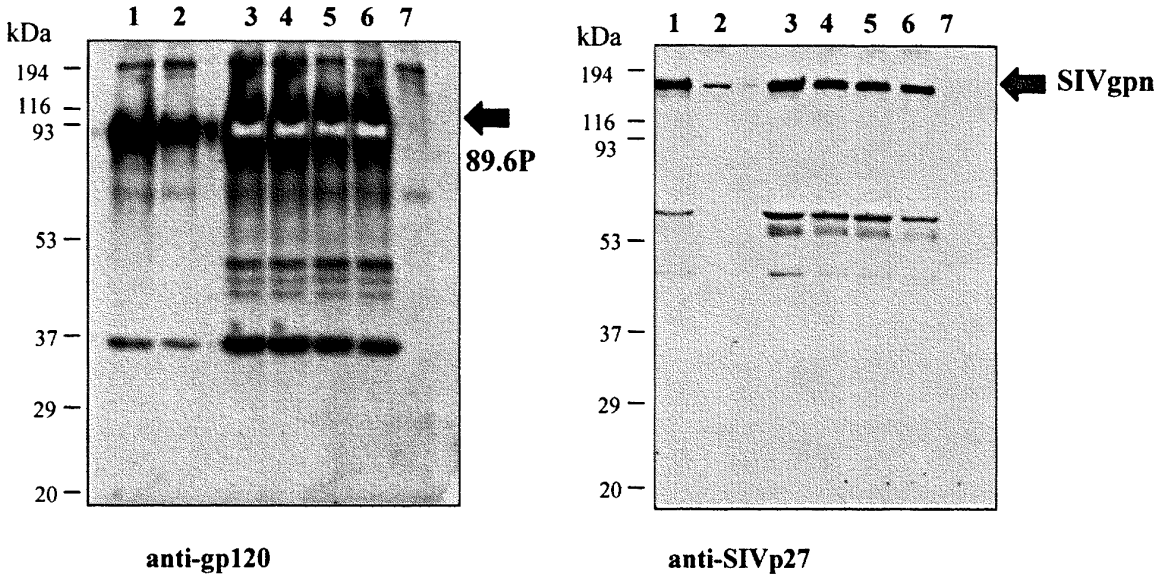

kDa
1 2 3 4 5 6 7
194
116
93
53
37
29
20
89.6P
anti-gp120
kDa
1 2 3 4 5 6 7
194
116
93
53
37
29
20
SIVgpn
anti-SIVp27

**Figura 11**

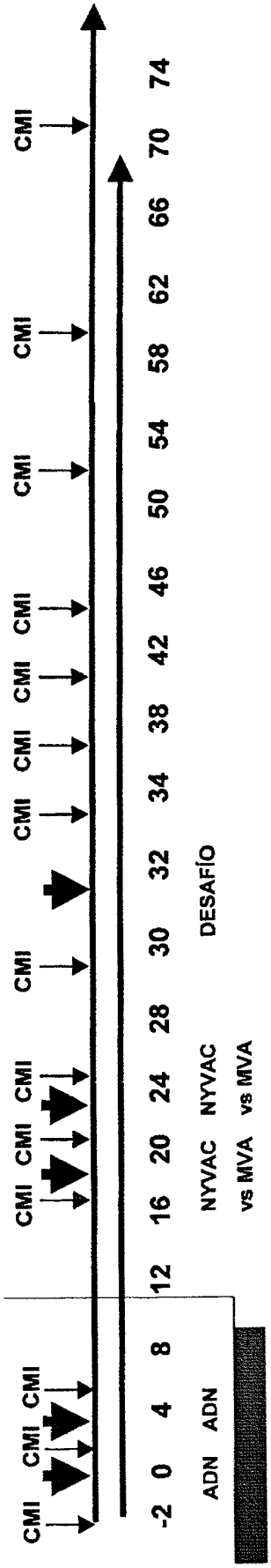

-2
0
4
8
12
16
20
24
28
30
32
34
38
42
46
50
54
58
62
66
70
74
ADN
ADN
NYVAC vs MVA
NYVAC vs MVA
DESAFÍO
CMI

Figura 12

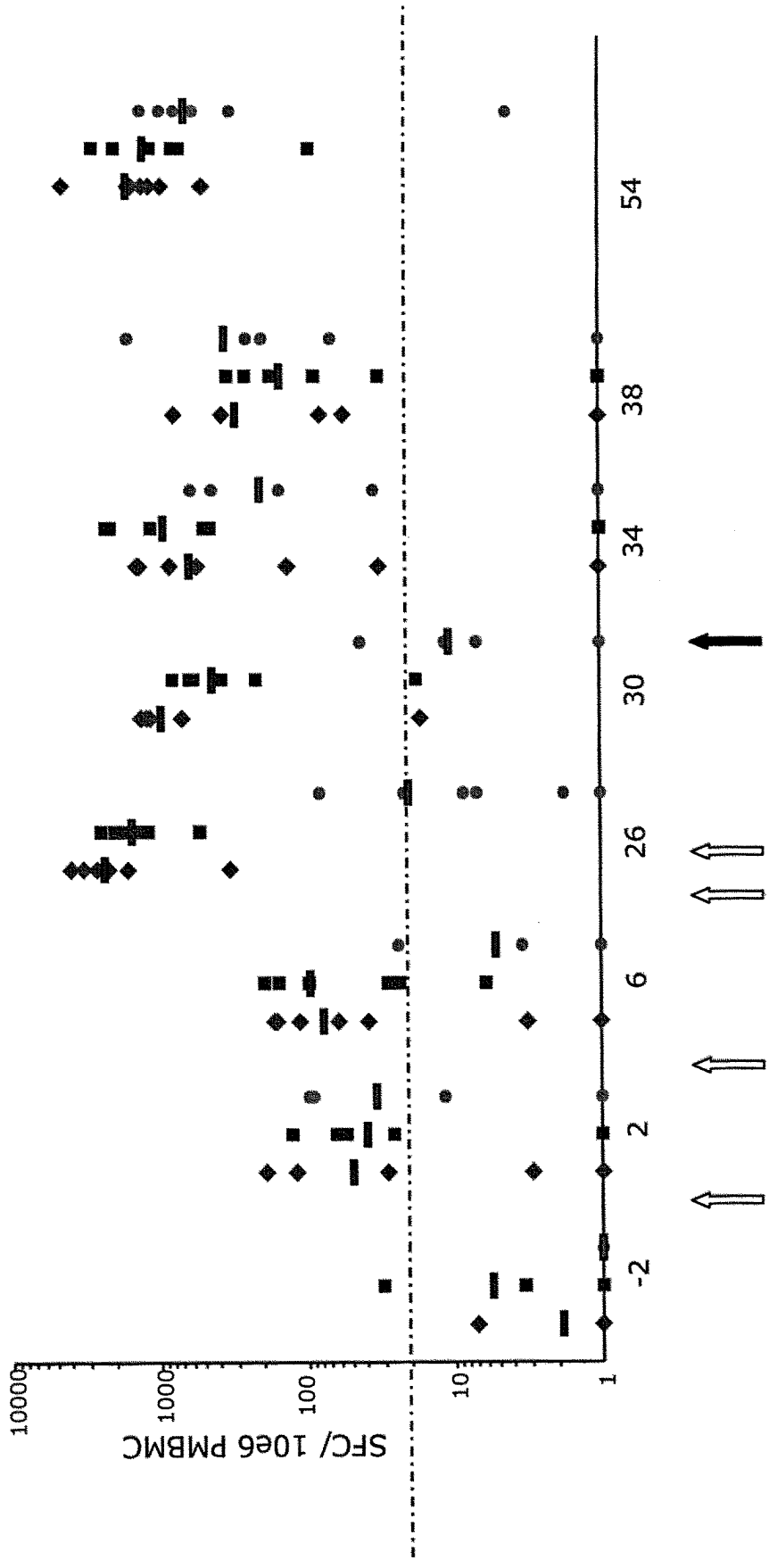



**Figura 13**

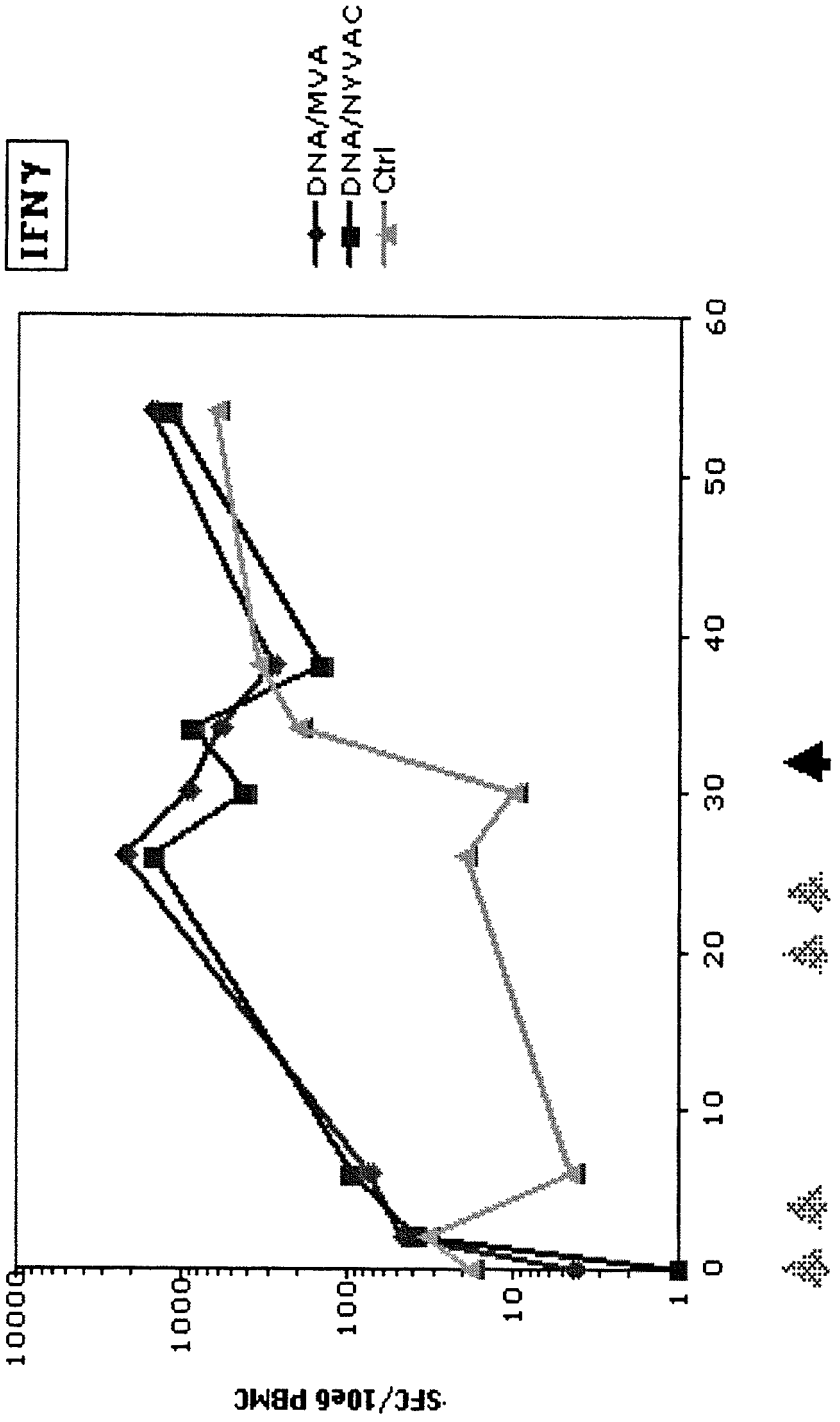

IFNγ
DNA/MVA
DNA/NYVAC
Ctrl
SFC/10e6 PBMC
10000
1000
100
10
1
0
10
20
30
40
50
60

**Figura 14**

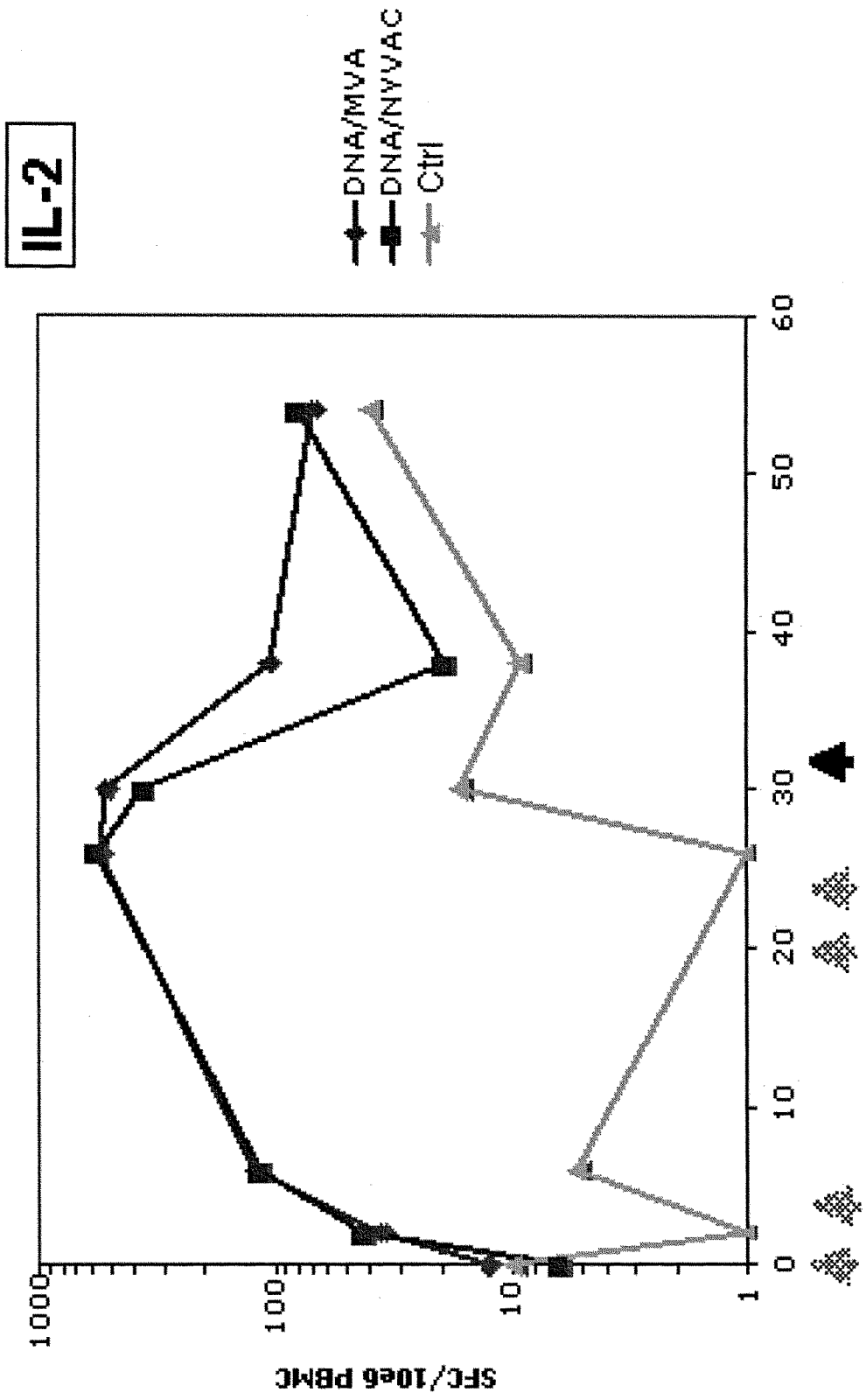

IL-2
DNA/MVA
DNA/NYVAC
Ctrl
SFC/10e6 PBMC
1000
100
10
1
0
10
20
30
40
50
60

Figura 15

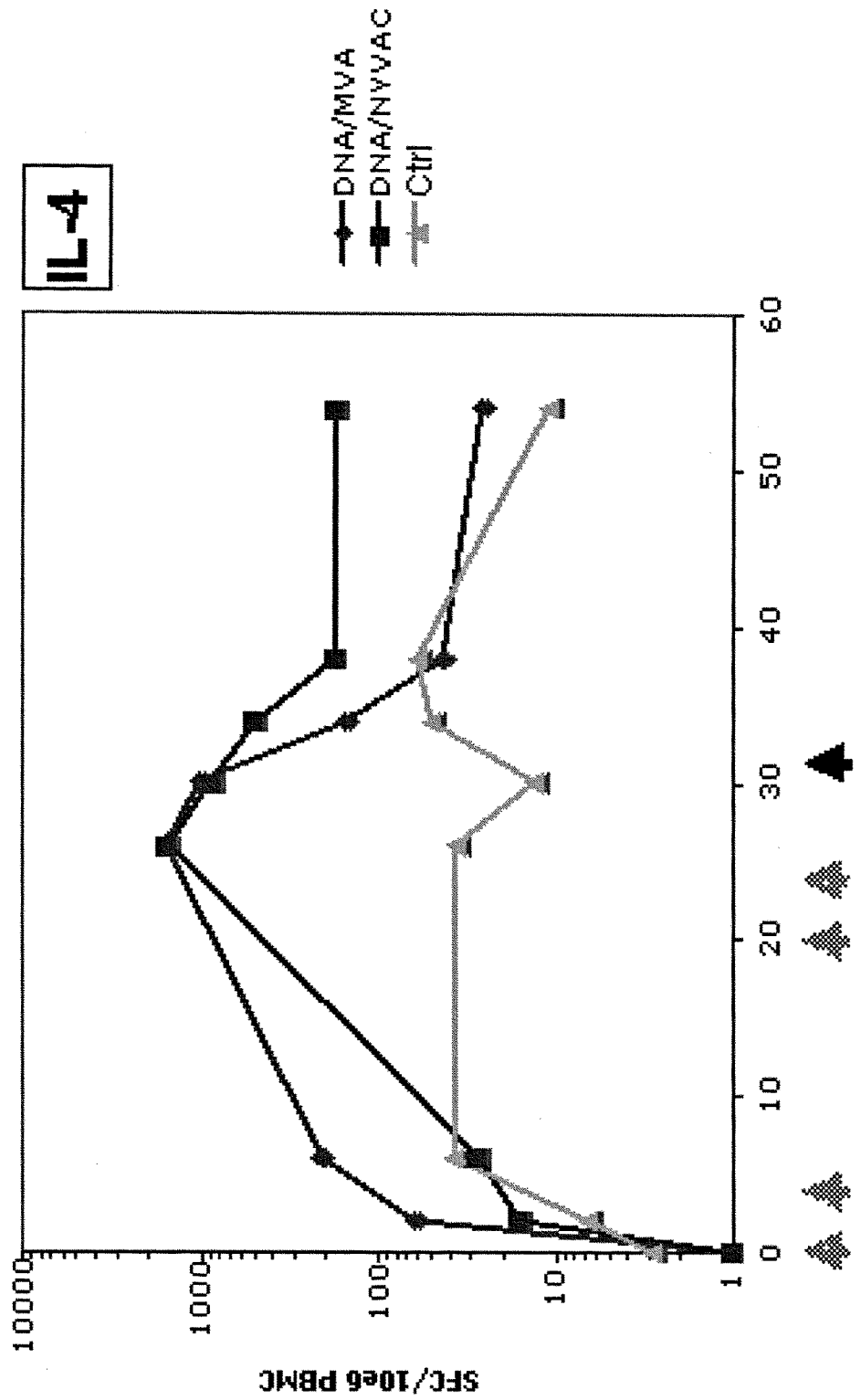

IL-4
DNA/MVA
DNA/NYVAC
Ctrl
SFC/10e6 PBMC
10000
1000
100
10
1
0
10
20
30
40
50
60

**Figura 16**

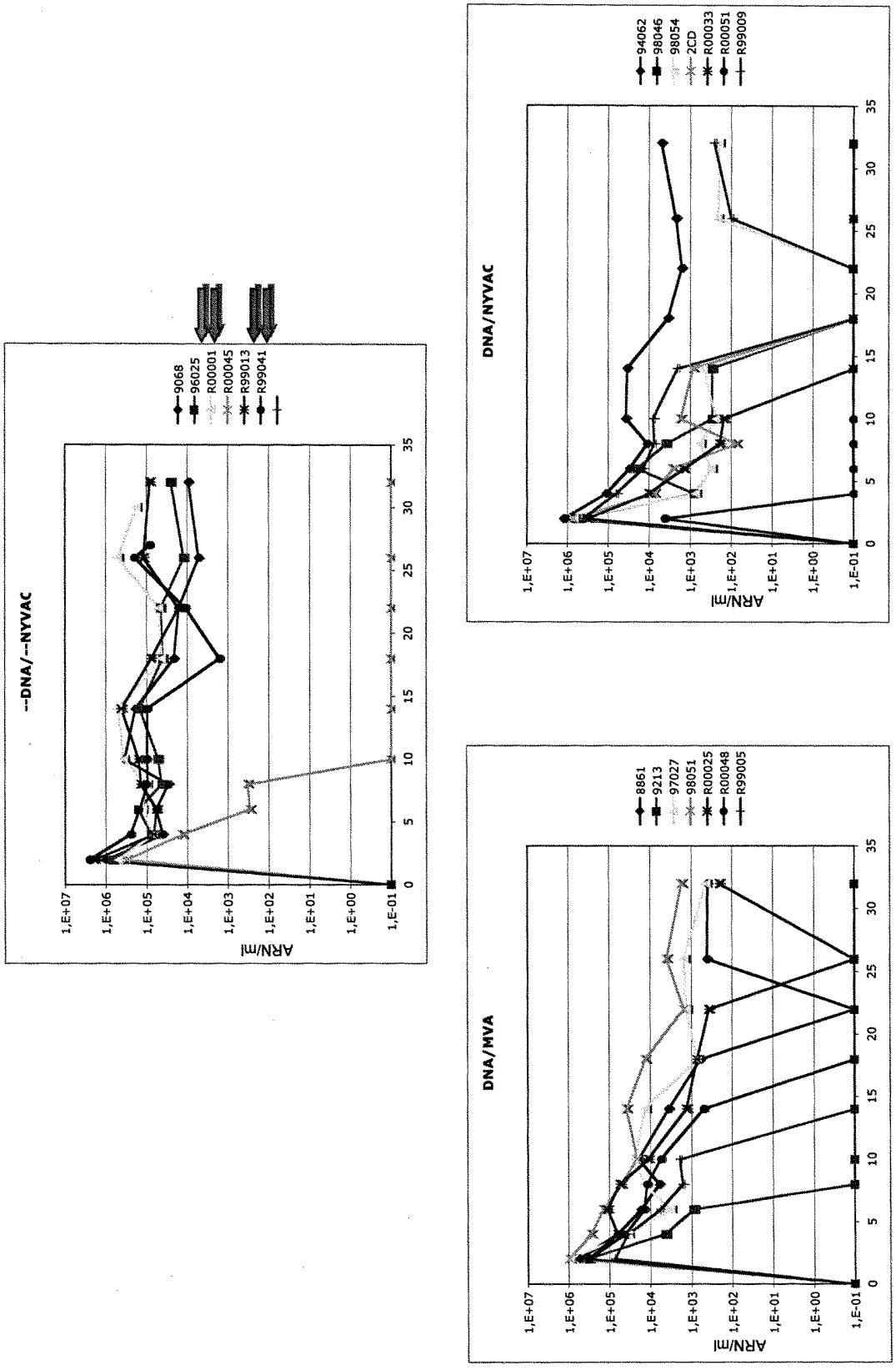

--DNA/--NYVAC
9068
96025
R00001
R00045
R99013
R99041
DNA/NYVAC
94062
98046
98054
2CD
R00033
R00051
R99009
DNA/MVA
8861
9213
97027
98051
R00025
R00048
R99005
ARN/ml
1,E+07
1,E+06
1,E+05
1,E+04
1,E+03
1,E+02
1,E+01
1,E+00
1,E-01
0
5
10
15
20
25
30
35

**Figura 17**

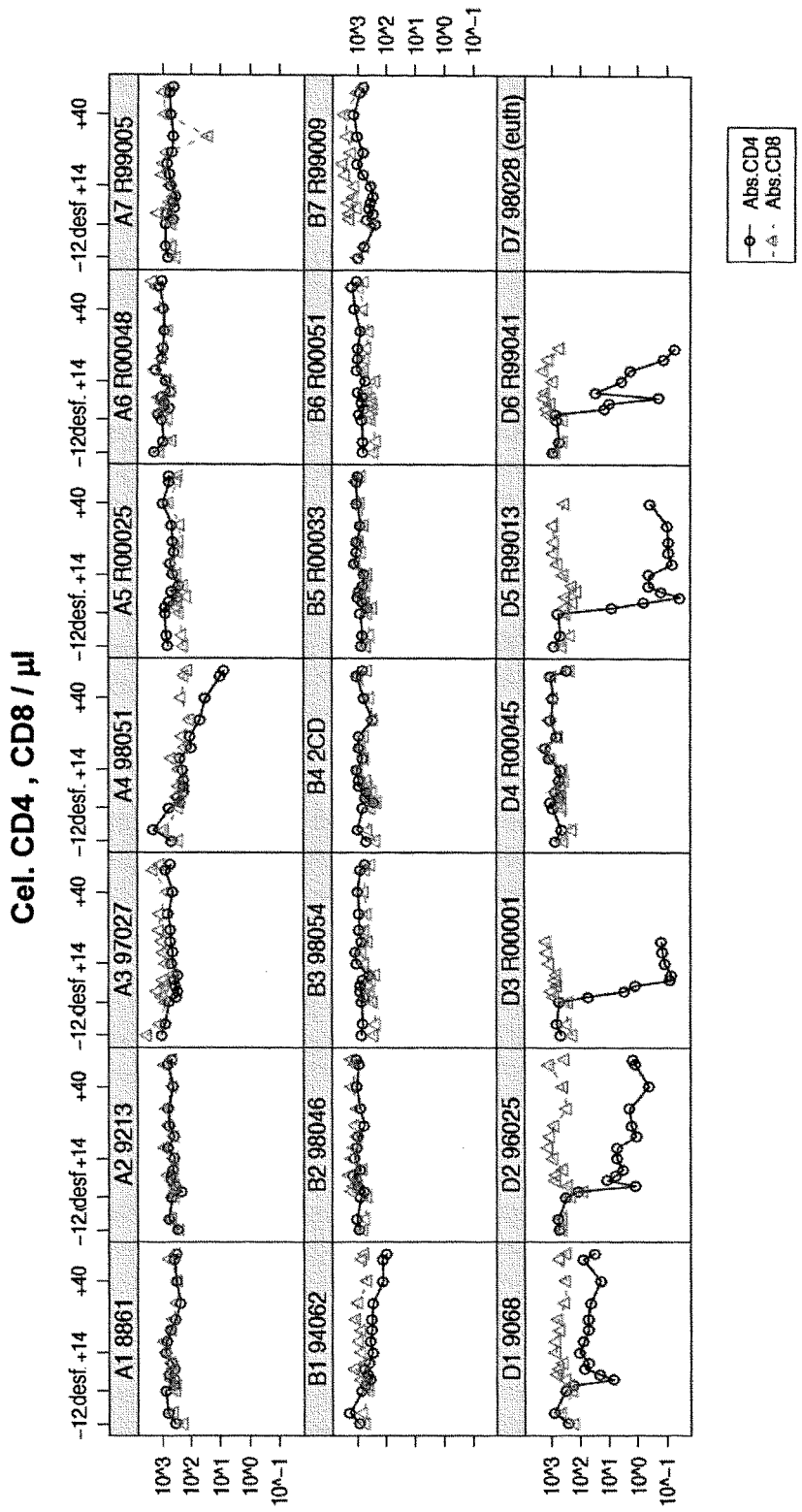

Cel. CD4 , CD8 / µl
A1 8861
A2 9213
A3 97027
A4 98051
A5 R00025
A6 R00048
A7 R99005
B1 94062
B2 98046
B3 98054
B4 2CD
B5 R00033
B6 R00051
B7 R99009
D1 9068
D2 96025
D3 R00001
D4 R00045
D5 R99013
D6 R99041
D7 98028 (euth)
-12desf.+14
+40
10^3
10^2
10^1
10^0
10^-1
Abs.CD4
Abs.CD8

**Figura 18**

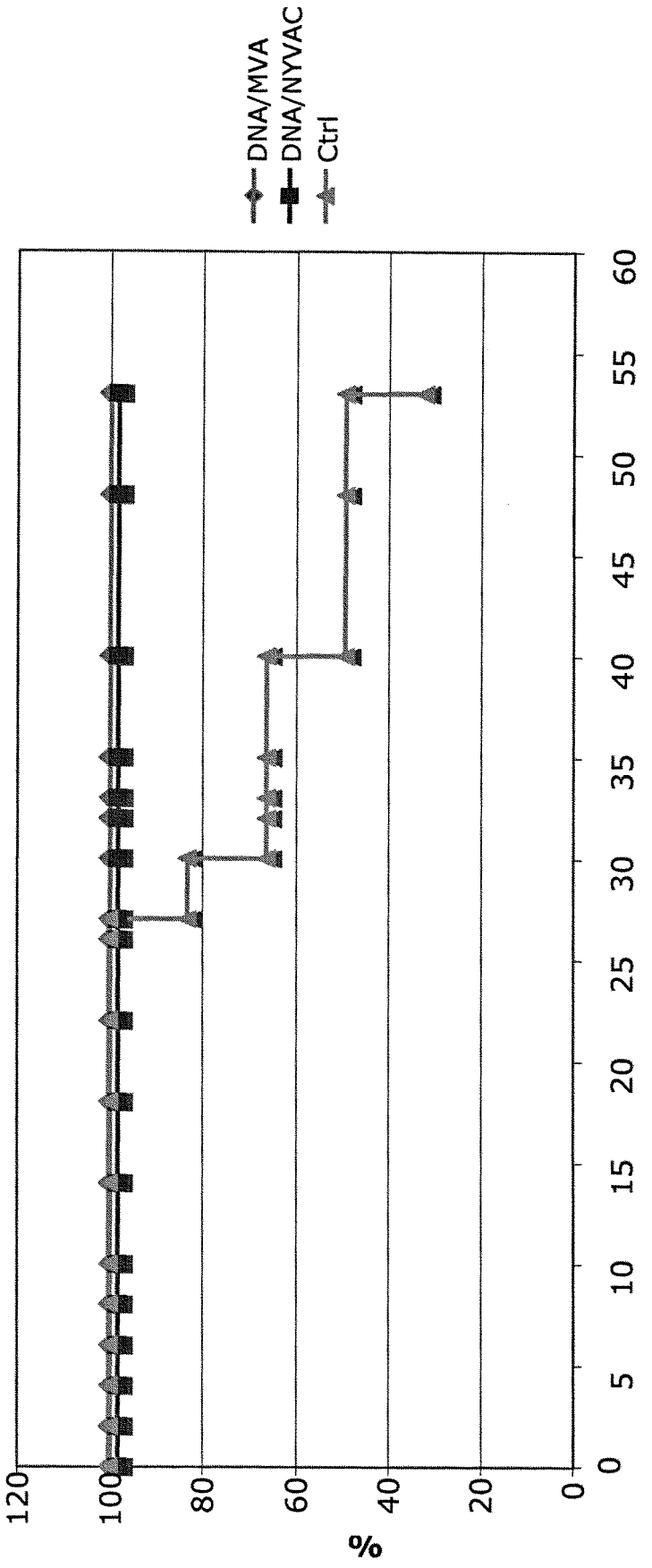

DNA/MVA
DNA/NYVAC
Ctrl
120
100
80
60
40
20
0
%
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

**Figura 19**

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

<120> MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRINCIPAL Nº ES200501841 PARA "VECTORES RECOMBINANTES BASADOS EN EL VIRUS MODIFICADO DE ANKARA (MVA) COMO VACUNAS PREVENTIVAS Y TERAPÉUTICAS CONTRA EL SIDA"

<130> P-100403

<160> 20

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Cebador

<223> TK-L

<400>

tgattagttt gatgcgattc 20

<210> 2

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Cebador

<223> TK-R2

<400>

ctgccgtatc aaggaca 17

<210> 3

<211> 1515

<212> ADN

<213> Secuencia artificial derivada del gen Env del virus SHIV89.6P, carente de nucleótidos correspondientes a la proteína gp41

<220>

<221> Secuencia codificante

<223> 89.6P-gp120

<400>

```
atg ccc atg ggg tct ctg caa ccg ctg gcc acc ttg tac ctg ctg ggg atg ctg gtc gct   60
Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly Met Leu Val Ala
  5                  10                  15                  20

tcc gtg cta gcg acc gag aag ctg tgg gtg acc gtg tac tac ggc gtg ccc gtg tgg agg  120
Ser Val Leu Ala Thr Glu Lys Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Arg
                 25                  30                  35                  40

gag gcc acc acc acc ctg ttc tgc gcc agc gac gcc aaa gcc tac gac acc gag gtg cac  180
Glu Ala Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val His
                 45                  50                  55                  60

aac gtg tgg gcc acc cac gcc tgc gtg ccc acc gac ccc aac ccc cag gag gtg gtg ctg  240
Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln Glu Val Val Leu
                 65                  70                  75                  80

ggc aac gtg acc gag aac ttc aat atg tgg aag aac aac atg gtg gac cag atg cac gag  300
Gly Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn Asn Met Val Asp Gln Met His Glu
                 85                  90                  95                 100

gac atc atc agc ctg tgg gac gag agc ctg aag ccc tgc gtg aag ctg acc ccc ctg tgc  360
Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Glu Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys
                105                 110                 115                 120

gtg acc ctg aac tgc acc aac ctg aac atc acc aag aac acc acc aac ctg acc agc agc  420
Val Thr Leu Asn Cys Thr Asn Leu Asn Ile Thr Lys Asn Thr Thr Asn Leu Thr Ser Ser
                125                 130                 135                 140

agc tgg ggc atg atg gag gag ggc gag atc aag aac tgc agc ttc tac atc acc acc tcc  480
Ser Trp Gly Met Met Glu Glu Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Tyr Ile Thr Thr Ser
                145                 150                 155                 160

atc agg aac aag gtg aag aag gag tac gcc ctg ttc aac agg ctg gac gtg gtg ccc gtg  540
Ile Arg Asn Lys Val Lys Lys Glu Tyr Ala Leu Phe Asn Arg Leu Asp Val Val Pro Val
                165                 170                 175                 180

aag aac acc agc aac acc aag tac agg ctg att agc tgc aac acc agc gtg att acc cag  600
Lys Asn Thr Ser Asn Thr Lys Tyr Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln
                185                 190                 195                 200

gcc tgc cct aaa gtg agc ttc cag ccc atc ccc atc cac tac tgc gtg ccc gcc ggc ttc  660
Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Gln Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Val Pro Ala Gly Phe
                205                 210                 215                 220

gcc atc ctg aag tgc aac aac aag acc ttc aac ggc agc ggc ccc tgc acc aac gtg agc  720
Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe Asn Gly Ser Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser
                225                 230                 235                 240

acc gtg cag tgc acc cac ggc atc agg ccc gtg gtg tct acc cag ctg ctg ctg aac ggc  780
Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly
                245                 250                 255                 260
```

```
agc ctg gcc gaa gag gac atc gtg atc agg agc gag gac ttc acc gac aac gtg aag acc  840
Ser Leu Ala Glu Glu Asp Ile Val Ile Arg Ser Glu Asp Phe Thr Asp Asn Val Lys Thr
                265                 270                 275                 280

atc atc gtg cag ctg aac gag agc gtg gtg att aac tgc acc agg ccc aac aac aac acc  900
Ile Ile Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Val Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr
                285                 290                 295                 300

agg gag agg ctg agc atc ggc ccc ggc agg gcc ttc tac gcc agg agg aac atc atc ggc 960
Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg Asn Ile Ile Gly
                305                 310                 315                 320

gac atc agg cag gcc cac tgc aac atc agc agg gcc aag tgg aac aac acc ctg cag cag 1020
Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Arg Ala Lys Trp Asn Asn Thr Leu Gln Gln
                325                 330                 335                 340

atc gtc atc aag ctg agg gag aag ttc agg aac aag acc atc gcc ttc aac cag agc agc 1080
Ile Val Ile Lys Leu Arg Glu Lys Phe Arg Asn Lys Thr Ile Ala Phe Asn Gln Ser Ser
                345                 350                 355                 360

ggc ggc gac ccc gag atc gtg atg cac agc ttc aac tgc ggc ggc gag ttc ttc tac tgc 1140
Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys
                365                 370                 375                 380

aac acc gcc cag ctg ttc aac agc acc tgg aac gtg gcc ggc ggc acc aac ggc acc gag 1200
Asn Thr Ala Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Glu
                385                 390                 395                 400

ggc aac gac atc atc acc ctg cag tgc agg atc aag cag atc atc aac atg tgg cag aag 1260
Gly Asn Asp Ile Ile Thr Leu Gln Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Lys
                405                 410                 415                 420

gtg ggc aag gcc atg tac gcc cct ccc atc acc ggc cag atc agg tgc agc agc aac atc 1320
Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Thr Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile
                425                 430                 435                 440

acc ggc ctg ctg ctg act cgc gac ggc ggc aac agc acc gag acc gag acc gag atc ttc 1380
Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Ser Thr Glu Thr Glu Thr Glu Ile Phe
                445                 450                 455                 460

agg ccc ggc ggc ggc gac atg agg gac aac tgg agg agc gag ctg tac aag tac aag gtg 1440
Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val
                465                 470                 475                 480

gtg agg atc gag ccc atc ggc gtg gcc ccc acc agg gcc aag agg agg acc gtg cag agg 1500
Val Arg Ile Glu Pro Ile Gly Val Ala Pro Thr Arg Ala Lys Arg Arg Thr Val Gln Arg
                485                 490                 495                 500

gag aag agg tag taa                                                         1515
Glu Lys Arg  .   .
                505
```

<210> 4

<211> 4218

<212> ADN

<213> Secuencia artificial derivada del virus SHIV89.6P mediante modificaciones en las partes correspondientes a los antígenos Gag, Pol y Nef

<220>

<221> Secuencia codificante

<223> SIVgpn

<400>

```
atg cgc gtg agg aac agc gtg ctg agc ggc aag aag gcc gac gag ctg gag aag atc agg  60
Met Arg Val Arg Asn Ser Val Leu Ser Gly Lys Lys Ala Asp Glu Leu Glu Lys Ile Arg
  1               5                  10                  15                  20

ctg agg ccc aac ggc aag aag aag tat atg ctg aag cac gtg gtg tgg gcc gcc aac gag  120
Leu Arg Pro Asn Gly Lys Lys Lys Tyr Met Leu Lys His Val Val Trp Ala Ala Asn Glu
                 25                  30                  35                  40

ctg gac agg ttc ggc ctg gcc gag agc ctg ctg gag aac aag gag ggc tgc cag aag atc  180
Leu Asp Arg Phe Gly Leu Ala Glu Ser Leu Leu Glu Asn Lys Glu Gly Cys Gln Lys Ile
                 45                  50                  55                  60

ctg agc gtg ctg gcc ccc ctg gtg ccc acc ggc agc gag aac ctg aag agc ctg tac aac  240
Leu Ser Val Leu Ala Pro Leu Val Pro Thr Gly Ser Glu Asn Leu Lys Ser Leu Tyr Asn
                 65                  70                  75                  80

acc gtg tgc gtg atc tgg tgc atc cac gcc gag gag aag gtg aag cac acc gag gag gcc  300
Thr Val Cys Val Ile Trp Cys Ile His Ala Glu Glu Lys Val Lys His Thr Glu Glu Ala
                 85                  90                  95                 100

aag cag atc gtg cag agg cac ctg gtg gtg gag acc ggc acc acc gag acc atg ccc aag  360
Lys Gln Ile Val Gln Arg His Leu Val Val Glu Thr Gly Thr Thr Glu Thr Met Pro Lys
                105                 110                 115                 120

acc agc agg ccc acc gcc ccc agc tcc ggc cgc ggc ggc aac tac ccc gtg cag cag atc  420
Thr Ser Arg Pro Thr Ala Pro Ser Ser Gly Arg Gly Gly Asn Tyr Pro Val Gln Gln Ile
                125                 130                 135                 140

ggc ggc aac tac gtg cac ctg ccc ctg agc ccc agg acc ctg aac gcc tgg gtg aag ctg  480
Gly Gly Asn Tyr Val His Leu Pro Leu Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Leu
                145                 150                 155                 160

atc gag gag aag aag ttc ggc gcc gag gtg gtg ccc ggc ttc cag gcc ctg agc gag ggc  540
Ile Glu Glu Lys Lys Phe Gly Ala Glu Val Val Pro Gly Phe Gln Ala Leu Ser Glu Gly
                165                 170                 175                 180

tgc acc cct tac gac atc aac cag atg ctg aac tgc gtg ggc gac cac cag gcc gcc atg  600
Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu Asn Cys Val Gly Asp His Gln Ala Ala Met
                185                 190                 195                 200

cag atc atc agg gac atc atc aac gag gag gcc gcc gac tgg gac ctg cag cac cct cag  660
Gln Ile Ile Arg Asp Ile Ile Asn Glu Glu Ala Ala Asp Trp Asp Leu Gln His Pro Gln
                205                 210                 215                 220

ccc gcc cct cag cag ggc cag ctg agg gag ccc agc ggc agc gac atc gcc ggc acc aca  720
Pro Ala Pro Gln Gln Gly Gln Leu Arg Glu Pro Ser Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
                225                 230                 235                 240

agc agc gtg gac gag cag atc cag tgg atg tac agg cag cag aac cct atc ccc gtg ggc  780
Ser Ser Val Asp Glu Gln Ile Gln Trp Met Tyr Arg Gln Gln Asn Pro Ile Pro Val Gly
                245                 250                 255                 260

aac atc tac agg agg tgg atc cag ctg ggc ctc cag aag tgc gtg agg atg tac aac ccc  840
Asn Ile Tyr Arg Arg Trp Ile Gln Leu Gly Leu Gln Lys Cys Val Arg Met Tyr Asn Pro
                265                 270                 275                 280
```

```
aca aac atc ctg gac gtg aag cag gga cca aag gag ccc ttc cag tca tat gtg gac agg  900
Thr Asn Ile Leu Asp Val Lys Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Gln Ser Tyr Val Asp Arg
                285                 290                 295                 300

ttc tac aag agc ctg agg gcc gag cag acc gac gcc gcc gtg aag aac tgg atg acc cag  960
Phe Tyr Lys Ser Leu Arg Ala Glu Gln Thr Asp Ala Ala Val Lys Asn Trp Met Thr Gln
                305                 310                 315                 320

acc ctg ctg atc cag aac gcc aac ccc gac tgc aag ctg gtg ctg aag ggc ctg ggc gtg 1020
Thr Leu Leu Ile Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Leu Val Leu Lys Gly Leu Gly Val
                325                 330                 335                 340

aac ccc acc ctg gag gag atg ctg acc gcc tgc cag ggc gtg ggc ggc ccc ggc cag aag 1080
Asn Pro Thr Leu Glu Glu Met Leu Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro Gly Gln Lys
                345                 350                 355                 360

gct agg ctg atg gcc gag gct ctg aag gag gcc ctg gcc ccc gtg ccc atc ccc ttc gcc 1140
Ala Arg Leu Met Ala Glu Ala Leu Lys Glu Ala Leu Ala Pro Val Pro Ile Pro Phe Ala
                365                 370                 375                 380

gcc gcc cag cag agg gga ccc agg aag ccc atc aag tgc tgg aac tgc ggc aag gag ggc 1200
Ala Ala Gln Gln Arg Gly Pro Arg Lys Pro Ile Lys Cys Trp Asn Cys Gly Lys Glu Gly
                385                 390                 395                 400

cac agc gcc agg cag tgc agg gcc ccc agg agg cag ggc tgc tgg aag tgc ggc aag atg 1260
His Ser Ala Arg Gln Cys Arg Ala Pro Arg Arg Gln Gly Cys Trp Lys Cys Gly Lys Met
                405                 410                 415                 420

gac cac gtg atg gcc aag tgc ccc gac agg cag gcc ggt ttt agg cct tgg tcc atg ggg 1320
Asp His Val Met Ala Lys Cys Pro Asp Arg Gln Ala Gly Phe Arg Pro Trp Ser Met Gly
                425                 430                 435                 440

aaa gaa gcc ccg caa ttt ccc cat ggc tca agt gca tca ggg gct gat gcc aac tgc tcc 1380
Lys Glu Ala Pro Gln Phe Pro His Gly Ser Ser Ala Ser Gly Ala Asp Ala Asn Cys Ser
                445                 450                 455                 460

ccc aga gga ccc agc tgt gga tct gct aaa gaa cta cat gca gtt ggg caa gca gca gag 1440
Pro Arg Gly Pro Ser Cys Gly Ser Ala Lys Glu Leu His Ala Val Gly Gln Ala Ala Glu
                465                 470                 475                 480

aga aaa gca gag aga aag cag aga gaa gcc tta caa gga ggt gac aga gga ttt gct gca 1500
Arg Lys Ala Glu Arg Lys Gln Arg Glu Ala Leu Gln Gly Gly Asp Arg Gly Phe Ala Ala
                485                 490                 495                 500

cct caa ttc tct ctt tgg agg aga cca gta gtg acc gcc cac atc gag ggc cag ccc gtg 1560
Pro Gln Phe Ser Leu Trp Arg Arg Pro Val Val Thr Ala His Ile Glu Gly Gln Pro Val
                505                 510                 515                 520

gag gtg ctg ctg aac acc ggc gcc gac gac agc atc gtg acc ggc atc gag ctg gga ccc 1620
Glu Val Leu Leu Asn Thr Gly Ala Asp Asp Ser Ile Val Thr Gly Ile Glu Leu Gly Pro
                525                 530                 535                 540

cac tac acc ccc aag atc gtg ggc ggc atc ggc ggc ttc atc aac aca aag gag tac aag 1680
His Tyr Thr Pro Lys Ile Val Gly Gly Ile Gly Gly Phe Ile Asn Thr Lys Glu Tyr Lys
                545                 550                 555                 560

aac gtg gag atc gag gtg ctg ggc aag agg atc aag ggc acc atc atg acc ggc gac acc 1740
Asn Val Glu Ile Glu Val Leu Gly Lys Arg Ile Lys Gly Thr Ile Met Thr Gly Asp Thr
                565                 570                 575                 580

ccc atc aac atc ttc ggc agg aac ctg ctg acc gcc ctg ggc atg agc ctg aac ttc ccc 1800
Pro Ile Asn Ile Phe Gly Arg Asn Leu Leu Thr Ala Leu Gly Met Ser Leu Asn Phe Pro
                585                 590                 595                 600
```

```
atc gcc aag gtg gag ccc gtg aag gtg gcc ctg aag ccc ggc aag gac ggc ccc aag ctg 1860
Ile Ala Lys Val Glu Pro Val Lys Val Ala Leu Lys Pro Gly Lys Asp Gly Pro Lys Leu
                605                 610                 615                 620

aag cag tgg cct ctg agc aag gag aag atc gtg gcc ctg agg gaa atc tgc gag aag atg 1920
Lys Gln Trp Pro Leu Ser Lys Glu Lys Ile Val Ala Leu Arg Glu Ile Cys Glu Lys Met
                625                 630                 635                 640

gag aag gac ggc cag ctg gag gag gcc cct ccc acc aac ccc tac aac acc ccc acc ttc 1980
Glu Lys Asp Gly Gln Leu Glu Glu Ala Pro Pro Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Thr Phe
                645                 650                 655                 660

gcc atc aag aag aag gac aag aac aag tgg agg atg ctg atc gac ttc agg gag ctg aac 2040
Ala Ile Lys Lys Lys Asp Lys Asn Lys Trp Arg Met Leu Ile Asp Phe Arg Glu Leu Asn
                665                 670                 675                 680

agg gtg aca cag gac ttc acc gag gtg cag ctg ggc atc cct cac ccc gcc ggc ctg gcc 2100
Arg Val Thr Gln Asp Phe Thr Glu Val Gln Leu Gly Ile Pro His Pro Ala Gly Leu Ala
                685                 690                 695                 700

aag aag gag aag ggc ggc ctg gag ggc atc tac tac agc gcc agg agg cac agg atc ctg 2160
Lys Lys Glu Lys Gly Gly Leu Glu Gly Ile Tyr Tyr Ser Ala Arg Arg His Arg Ile Leu
                705                 710                 715                 720

gac atg tac ctg gag aag gag gag ggc atc atc ccc gac tgg cag gac tac acc agc ggc 2220
Asp Met Tyr Leu Glu Lys Glu Glu Gly Ile Ile Pro Asp Trp Gln Asp Tyr Thr Ser Gly
                725                 730                 735                 740

ccc ggc atc aga tac ccc aag acc ttc ggc tgg ctg tgg aag ctg gtg ccc gtg aac gtg 2280
Pro Gly Ile Arg Tyr Pro Lys Thr Phe Gly Trp Leu Trp Lys Leu Val Pro Val Asn Val
                745                 750                 755                 760

agc gac gag gcc cag gag gac gag agg cac tac ctg atg cag ccc gcc cag acc agc aag 2340
Ser Asp Glu Ala Gln Glu Asp Glu Arg His Tyr Leu Met Gln Pro Ala Gln Thr Ser Lys
                765                 770                 775                 780

tgg gac gac ccc tgg ggc gag gtg ctg gcc tgg aag ttt gac ccc acc ctg gcc tac acc 2400
Trp Asp Asp Pro Trp Gly Glu Val Leu Ala Trp Lys Phe Asp Pro Thr Leu Ala Tyr Thr
                785                 790                 795                 800

tac gag gcc tac gcc aga tac ccc gag gag ctg gag gcc agc cag gcc tgc cag agg aag 2460
Tyr Glu Ala Tyr Ala Arg Tyr Pro Glu Glu Leu Glu Ala Ser Gln Ala Cys Gln Arg Lys
                805                 810                 815                 820

agg ctg gag gag ggc atg ggc ggc gcc atc agc atg agg agg agc aag ccc gcc ggc gac 2520
Arg Leu Glu Glu Gly Met Gly Gly Ala Ile Ser Met Arg Arg Ser Lys Pro Ala Gly Asp
                825                 830                 835                 840

ctg agg cag aag ctg ctg agg gcc agg ggc gag acc tac ggc agg ctg ctg ggc gag gtg 2580
Leu Arg Gln Lys Leu Leu Arg Ala Arg Gly Glu Thr Tyr Gly Arg Leu Leu Gly Glu Val
                845                 850                 855                 860

gag gac ggc agc agc cag agc ctg ggc ggc ctg ggc aag ggc ctg agc agc agg agc tgc 2640
Glu Asp Gly Ser Ser Gln Ser Leu Gly Gly Leu Gly Lys Gly Leu Ser Ser Arg Ser Cys
                865                 870                 875                 880

gag ggc cag aag tac aac cag ggc cag tac atg aac acc ccc tgg agg aac ccc gcc gag 2700
Glu Gly Gln Lys Tyr Asn Gln Gly Gln Tyr Met Asn Thr Pro Trp Arg Asn Pro Ala Glu
                885                 890                 895                 900

gag aag gag aag ctg gcc tac agg aag cag aac atg gac gac atc gac gag gag gac gac 2760
Glu Lys Glu Lys Leu Ala Tyr Arg Lys Gln Asn Met Asp Asp Ile Asp Glu Glu Asp Asp
                905                 910                 915                 920
```

```
gac ctg gtg ggc gtg agc gtg agg ccc aag gtg ccc ctg agg gcc atg acc tac aag ctg 2820
Asp Leu Val Gly Val Ser Val Arg Pro Lys Val Pro Leu Arg Ala Met Thr Tyr Lys Leu
                925                 930                 935                 940

gcg atc gac atg agc cac ttc atc ctg aac agc atc ggc ttc agc acc ccc gag gag aag 2880
Ala Ile Asp Met Ser His Phe Ile Leu Asn Ser Ile Gly Phe Ser Thr Pro Glu Glu Lys
                945                 950                 955                 960

ttc cag aag gac cct ccc ttc cag tgg atg ggc tac gag ctg tgg ccc acc aag tgg aag 2940
Phe Gln Lys Asp Pro Pro Phe Gln Trp Met Gly Tyr Glu Leu Trp Pro Thr Lys Trp Lys
                965                 970                 975                 980

ctc cag aag atc gag ctg ccc cag agg gag acc tgg acc gtg aac gac atc cag aag ctg 3000
Leu Gln Lys Ile Glu Leu Pro Gln Arg Glu Thr Trp Thr Val Asn Asp Ile Gln Lys Leu
                985                 990                 995                1000

gtg ggc gtg ctg aac tgg gcc gcc cag att tac ccc ggc atc aag acc aag cac ctg tgc 3060
Val Gly Val Leu Asn Trp Ala Ala Gln Ile Tyr Pro Gly Ile Lys Thr Lys His Leu Cys
               1005                1010                1015                1020

agg ctg atc cgc ggc aag atg aca ctg acc gag gag gtg cag tgg acc gag atg gcc gag 3120
Arg Leu Ile Arg Gly Lys Met Thr Leu Thr Glu Glu Val Gln Trp Thr Glu Met Ala Glu
               1025                1030                1035                1040

gcc gag tac gag gag aac aag atc att ctg agc cag gag cag gag ggc tgc tac tac cag 3180
Ala Glu Tyr Glu Glu Asn Lys Ile Ile Leu Ser Gln Glu Gln Glu Gly Cys Tyr Tyr Gln
               1045                1050                1055                1060

gag ggc aag ccc ctg gag gcc acc gtg atc aag agc cag gac aac cag tgg agc tac aag 3240
Glu Gly Lys Pro Leu Glu Ala Thr Val Ile Lys Ser Gln Asp Asn Gln Trp Ser Tyr Lys
               1065                1070                1075                1080

atc cac cag gag gac aag atc ctg aag gtg ggc aag ttc gcc aag atc aag aac acc cac 3300
Ile His Gln Glu Asp Lys Ile Leu Lys Val Gly Lys Phe Ala Lys Ile Lys Asn Thr His
               1085                1090                1095                1100

acc aac ggc gtg agg ctg ctg gcc cac gtg atc cag aag atc ggc aag gag gcc atc gtg 3360
Thr Asn Gly Val Arg Leu Leu Ala His Val Ile Gln Lys Ile Gly Lys Glu Ala Ile Val
               1105                1110                1115                1120

atc tgg ggc cag gtg ccc aag ttc cac ctg ccc gtg gag aag gac gtg tgg gag cag tgg 3420
Ile Trp Gly Gln Val Pro Lys Phe His Leu Pro Val Glu Lys Asp Val Trp Glu Gln Trp
               1125                1130                1135                1140

tgg acc gac tac tgg cag gtg aca tgg atc ccc gag tgg gac ttc atc agc acc cct cct 3480
Trp Thr Asp Tyr Trp Gln Val Thr Trp Ile Pro Glu Trp Asp Phe Ile Ser Thr Pro Pro
               1145                1150                1155                1160

ctg gtg agg ctg gtg ttc aat ctg gtg aag gac ccc atc gag ggc gag gag acc tac tac 3540
Leu Val Arg Leu Val Phe Asn Leu Val Lys Asp Pro Ile Glu Gly Glu Glu Thr Tyr Tyr
               1165                1170                1175                1180

acc gac ggc agc tgc aac aag cag agc aag gag ggc aag gcc ggc tac atc acc gac agg 3600
Thr Asp Gly Ser Cys Asn Lys Gln Ser Lys Glu Gly Lys Ala Gly Tyr Ile Thr Asp Arg
               1185                1190                1195                1200

ggc aag gac aag gtg aag gtg ctg gag cag acc acc aac cag cag gcc gag ctg gag gcc 3660
Gly Lys Asp Lys Val Lys Val Leu Glu Gln Thr Thr Asn Gln Gln Ala Glu Leu Glu Ala
               1205                1210                1215                1220

ttc ctg atg gcc ctg acc gac agc ggc ccc aag gcc aac atc atc gtg gac agc cag tat 3720
Phe Leu Met Ala Leu Thr Asp Ser Gly Pro Lys Ala Asn Ile Ile Val Asp Ser Gln Tyr
               1225                1230                1235                1240
```

```
gtg atg ggc atc atc acc ggc tgc ccc acc gag agc gag agc agg ctg gtg aac cag atc 3780
Val Met Gly Ile Ile Thr Gly Cys Pro Thr Glu Ser Glu Ser Arg Leu Val Asn Gln Ile
                1245                1250                1255                1260

atc gag gag atg att aag aag agc gag att tac gtg gcc tgg gtg ccc gcc cac aag ggc 3840
Ile Glu Glu Met Ile Lys Lys Ser Glu Ile Tyr Val Ala Trp Val Pro Ala His Lys Gly
                1265                1270                1275                1280

atc ggc ggc aac cag gag atc gac cac ctg gtg agc cag ggc atc agg cag gtg ctg agg 3900
Ile Gly Gly Asn Gln Glu Ile Asp His Leu Val Ser Gln Gly Ile Arg Gln Val Leu Arg
                1285                1290                1295                1300

aag agg atc acc gtg ctg gac atc ggc gac gcc tac ttc agc atc cct ctg gac gag gag 3960
Lys Arg Ile Thr Val Leu Asp Ile Gly Asp Ala Tyr Phe Ser Ile Pro Leu Asp Glu Glu
                1305                1310                1315                1320

ttc agg cag tac acc gcc ttc acc ctg ccc agc gtg aac aac gcc gag ccc ggc aag agg 4020
Phe Arg Gln Tyr Thr Ala Phe Thr Leu Pro Ser Val Asn Asn Ala Glu Pro Gly Lys Arg
                1325                1330                1335                1340

tac atc tac aag gtg ctg ccc cag ggc tgg aag ggc agc ccc gcc atc ttc cag tac acc 4080
Tyr Ile Tyr Lys Val Leu Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro Ala Ile Phe Gln Tyr Thr
                1345                1350                1355                1360

atg agg cac gtg ctg gag ccc ttc agg aag gcc aac ccc gac gtg acc ctg gtg cag tac 4140
Met Arg His Val Leu Glu Pro Phe Arg Lys Ala Asn Pro Asp Val Thr Leu Val Gln Tyr
                1365                1370                1375                1380

atg gac gac atc ctg atc gcc tcc gac agg acc gac ctg gag cac gac agg gtg gtg ctc 4200
Met Asp Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asp Arg Thr Asp Leu Glu His Asp Arg Val Val Leu
                1385                1390                1395                1400

cag agc aag gag ctg tag                                                         4218
Gln Ser Lys Glu Leu  .
                1405
```

<210> 5
<211> 7180
<212> ADN
<213> Secuencia artificial quimérica
<220>
<221> Secuencia flanqueante izquierda de TK
<222> 1..499
<223> TK-L
<220>
<221> Secuencia complementaria a secuencia codificante
<222> 519..2033
<223> Secuencia complementaria a la secuencia codificante de la proteína 89.6P-gp120
<220>
<221> Secuencia complementaria de promotor
<222> 2081..2119
<223> Secuencia complementaria del promotor pE/L para 89.6P-gp120
<220>
<221> Promotor
<222> 2144..2183
<223> Promotor pE/L para SIVgpn
<220>

<221> Secuencia codificante
<222> 2227..6444
<223> Secuencia codificante de la proteína SIVgpn
<220>
<221> Secuencia flanqueante derecha de TK
<222> 6488..7179
<223> TK-R
<220>
<223> Secuencia del inserto presente en el genoma de los vectores MVA-89.6P-SIVgpn y NYVAC-89.6P-SIVgpn

<400>

```
aagcttttgc gatcaataaa tggatcacaa ccagtatctc ttaacgatgt tcttcgcaga      60
tgatgattca ttttttaagt atttggctag tcaagatgat gaatcttcat tatctgatat     120
attgcaaatc actcaatatc tagactttct gttattatta ttgatccaat caaaaaataa     180
attagaagcc gtgggtcatt gttatgaatc tctttcagag gaatacagac aattgacaaa     240
attcacagac tctcaagatt ttaaaaaact gtttaacaag gtccctattg ttacagatgg     300
aagggtcaaa cttaataaag gatatttgtt cgactttgtg attagtttga tgcgattcaa     360
aaaagaatcc tctctagcta ccaccgcaat agatcctatt agatacatag atcctcgtcg     420
cgatatcgca ttttctaacg tgatggatat attaaagtcg aataaagtga acaataatta     480
attctttatt gtcatcatgg gtaccaaggc gcggatcctt actacctctt ctccctctgc     540
acggtcctcc tcttggccct ggtgggggcc acgccgatgg gctcgatcct caccaccttg     600
tacttgtaca gctcgctcct ccagttgtcc ctcatgtcgc cgccgccggg cctgaagatc     660
tcggtctcgg tctcggtgct gttgccgccg tcgcgagtca gcagcaggcc ggtgatgttg     720
ctgctgcacc tgatctggcc ggtgatggga ggggcgtaca tggccttgcc caccttctgc     780
cacatgttga tgatctgctt gatcctgcac tgcagggtga tgatgtcgtt gccctcggtg     840
ccgttggtgc cgccggccac gttccaggtg ctgttgaaca gctgggcggt gttgcagtag     900
aagaactcgc cgccgcagtt gaagctgtgc atcacgatct cggggtcgcc gccgctgctc     960
tggttgaagg cgatggtctt gttcctgaac ttctccctca gcttgatgac gatctgctgc    1020
agggtgttgt tccacttggc cctgctgatg ttgcagtggg cctgcctgat gtcgccgatg    1080
atgttcctcc tggcgtagaa ggccctgccg gggccgatgc tcagcctctc cctggtgttg    1140
ttgttgggcc tggtgcagtt aatcaccacg ctctcgttca gctgcacgat gatggtcttc    1200
acgttgtcgg tgaagtcctc gctcctgatc acgatgtcct cttcggccag gctgccgttc    1260
agcagcagct gggtagacac cacgggcctg atgccgtggg tgcactgcac ggtgctcacg    1320
ttggtgcagg ggccgctgcc gttgaaggtc ttgttgttgc acttcaggat ggcgaagccg    1380
gcgggcacgc agtagtggat ggggatgggc tggaagctca ctttagggca ggcctgggta    1440
atcacgctgg tgttgcagct aatcagcctg tacttggtgt tgctggtgtt cttcacgggc    1500
accacgtcca gcctgttgaa cagggcgtac tccttcttca ccttgttcct gatggaggtg    1560
gtgatgtaga agctgcagtt cttgatctcg ccctcctcca tcatgcccca gctgctgctg    1620
gtcaggttgg tggtgttctt ggtgatgttc aggttggtgc agttcagggt cacgcacagg    1680
ggggtcagct tcacgcaggg cttcaggctc tcgtcccaca ggctgatgat gtcctcgtgc    1740
atctggtcca ccatgttgtt cttccacata ttgaagttct cggtcacgtt gcccagcacc    1800
```

```
acctcctggg ggttggggtc ggtgggcacg caggcgtggg tggcccacac gttgtgcacc  1860
tcggtgtcgt aggctttggc gtcgctggcg cagaacaggg tggtggtggc ctccctccac  1920
acgggcacgc cgtagtacac ggtcacccac agcttctcgg tcgctagcac ggaagcgacc  1980
agcatcccca gcaggtacaa ggtggccagc ggttgcagag accccatggg catgctggcg  2040
gcgaattggg taccaggcct agatctgtcg acttcgagct tatttatatt ccaaaaaaaa  2100
aaaataaaat ttcaattttt aagctcgcgc caaatttagc ttaaaaattg aaattttatt  2160
ttttttttt ggaatataaa taagctcgaa gtcgacagat ctaggcctgg tacccaattc  2220
gccaggatgc gcgtgaggaa cagcgtgctg agcggcaaga aggccgacga gctggagaag  2280
atcaggctga ggcccaacgg caagaagaag tatatgctga agcacgtggt gtgggccgcc  2340
aacgagctgg acaggttcgg cctggccgag agcctgctgg agaacaagga gggctgccag  2400
aagatcctga gcgtgctggc ccccctggtg cccaccggca gcgagaacct gaagagcctg  2460
tacaacaccg tgtgcgtgat ctggtgcatc cacgccgagg agaaggtgaa gcacaccgag  2520
gaggccaagc agatcgtgca gaggcacctg gtggtggaga ccggcaccac cgagaccatg  2580
cccaagacca gcaggcccac cgcccccagc tccggccgcg gcggcaacta ccccgtgcag  2640
cagatcggcg gcaactacgt gcacctgccc ctgagcccca ggaccctgaa cgcctgggtg  2700
aagctgatcg aggagaagaa gttcggcgcc gaggtggtgc ccggcttcca ggccctgagc  2760
gagggctgca ccccttacga catcaaccag atgctgaact gcgtgggcga ccaccaggcc  2820
gccatgcaga tcatcaggga catcatcaac gaggaggccg ccgactggga cctgcagcac  2880
cctcagcccg cccctcagca gggccagctg agggagccca gcggcagcga catcgccggc  2940
accacaagca gcgtggacga gcagatccag tggatgtaca ggcagcagaa ccctatcccc  3000
gtgggcaaca tctacaggag gtggatccag ctgggcctcc agaagtgcgt gaggatgtac  3060
aaccccacaa acatcctgga cgtgaagcag ggaccaaagg agcccttcca gtcatatgtg  3120
gacaggttct acaagagcct gagggccgag cagaccgacg ccgccgtgaa gaactggatg  3180
acccagaccc tgctgatcca gaacgccaac cccgactgca agctggtgct gaagggcctg  3240
ggcgtgaacc ccaccctgga ggagatgctg accgcctgcc agggcgtggg cggccccggc  3300
cagaaggcta ggctgatggc cgaggctctg aaggaggccc tggcccccgt gcccatcccc  3360
ttcgccgccg cccagcagag gggacccagg aagcccatca agtgctggaa ctgcggcaag  3420
gagggccaca gcgccaggca gtgcagggcc cccaggaggc agggctgctg gaagtgcggc  3480
aagatggacc acgtgatggc caagtgcccc gacaggcagg ccggttttag gccttggtcc  3540
atggggaaag aagccccgca atttccccat ggctcaagtg catcaggggc tgatgccaac  3600
tgctccccca gaggacccag ctgtggatct gctaaagaac tacatgcagt tgggcaagca  3660
gcagagagaa aagcagagag aaagcagaga gaagccttac aaggaggtga cagaggattt  3720
gctgcacctc aattctctct ttggaggaga ccagtagtga ccgcccacat cgagggccag  3780
cccgtggagg tgctgctgaa caccggcgcc gacgacagca tcgtgaccgg catcgagctg  3840
ggaccccact acacccccaa gatcgtgggc ggcatcggcg gcttcatcaa cacaaaggag  3900
tacaagaacg tggagatcga ggtgctgggc aagaggatca agggcaccat catgaccggc  3960
gacacccccа tcaacatctt cggcaggaac ctgctgaccg ccctgggcat gagcctgaac  4020
ttccccatcg ccaaggtgga gcccgtgaag gtggccctga agcccggcaa ggacggcccc  4080
aagctgaagc agtggcctct gagcaaggag aagatcgtgg ccctgaggga aatctgcgag  4140
aagatggaga aggacggcca gctggaggag gcccctccca ccaacccctа caacacccсc  4200
accttcgcca tcaagaagaa ggacaagaac aagtggagga tgctgatcga cttcagggag  4260
ctgaacaggg tgacacagga cttcaccgag gtgcagctgg gcatccctca ccccgccggc  4320
ctggccaaga aggagaaggg cggcctggag ggcatctact acagcgccag gaggcacagg  4380
atcctggaca tgtacctgga gaaggaggag ggcatcatcc ccgactggca ggactacacc  4440
agcggccccg gcatcagata ccccaagacc ttcggctggc tgtggaagct ggtgcccgtg  4500
aacgtgagcg acgaggccca ggaggacgag aggcactacc tgatgcagcc cgcccagacc  4560
agcaagtggg acgacccctg gggcgaggtg ctggcctgga agtttgaccc caccctggcc  4620
tacacctacg aggcctacgc cagatacccc gaggagctgg aggccagcca ggcctgccag  4680
aggaagaggc tggaggaggg catgggcggc gccatcagca tgaggaggag caagcccgcc  4740
ggcgacctga ggcagaagct gctgagggcc aggggcgaga cctacggcag gctgctgggc  4800
gaggtggagg acggcagcag ccagagcctg ggcggcctgg gcaagggcct gagcagcagg  4860
agctgcgagg gccagaagta caaccagggc cagtacatga acacccccctg gaggaacccc  4920
gccgaggaga aggagaagct ggcctacagg aagcagaaca tggacgacat cgacgaggag  4980
gacgacgacc tggtgggcgt gagcgtgagg cccaaggtgc ccctgagggc catgacctac  5040
aagctggcga tcgacatgag ccacttcatc ctgaacagca tcggcttcag caccccgag  5100
gagaagttcc agaaggaccc tcccttccag tggatgggct acgagctgtg gcccaccaag  5160
tggaagctcc agaagatcga gctgccccag agggagacct ggaccgtgaa cgacatccag  5220
aagctggtgg gcgtgctgaa ctgggccgcc cagatttacc ccggcatcaa gaccaagcac  5280
ctgtgcaggc tgatccgcgg caagatgaca ctgaccgagg aggtgcagtg gaccgagatg  5340
```

```
gccgaggccg agtacgagga gaacaagatc attctgagcc aggagcagga gggctgctac      5400
taccaggagg gcaagcccct ggaggccacc gtgatcaaga gccaggacaa ccagtggagc      5460
tacaagatcc accaggagga caagatcctg aaggtgggca agttcgccaa gatcaagaac      5520
acccacacca acggcgtgag gctgctggcc cacgtgatcc agaagatcgg caaggaggcc      5580
atcgtgatct ggggccaggt gcccaagttc cacctgcccg tggagaagga cgtgtgggag      5640
cagtggtgga ccgactactg gcaggtgaca tggatccccg agtgggactt catcagcacc      5700
cctcctctgg tgaggctggt gttcaatctg gtgaaggacc ccatcgaggg cgaggagacc      5760
tactacaccg acggcagctg caacaagcag agcaaggagg gcaaggccgg ctacatcacc      5820
gacaggggca aggacaaggt gaaggtgctg gagcagacca ccaaccagca ggccgagctg      5880
gaggccttcc tgatggccct gaccgacagc ggccccaagg ccaacatcat cgtggacagc      5940
cagtatgtga tgggcatcat caccggctgc cccaccgaga gcgagagcag gctggtgaac      6000
cagatcatcg aggagatgat taagaagagc gagatttacg tggcctgggt gcccgcccac      6060
aagggcatcg gcggcaacca ggagatcgac cacctggtga gccagggcat caggcaggtg      6120
ctgaggaaga ggatcaccgt gctggacatc ggcgacgcct acttcagcat ccctctggac      6180
gaggagttca ggcagtacac cgccttcacc ctgcccagcg tgaacaacgc cgagcccggc      6240
aagaggtaca tctacaaggt gctgccccag ggctggaagg gcagccccgc catcttccag      6300
tacaccatga ggcacgtgct ggagcccttc aggaaggcca accccgacgt gaccctggtg      6360
cagtacatgg acgacatcct gatcgcctcc gacaggaccg acctggagca cgacagggtg      6420
gtgctccaga gcaaggagct gtagctcgag ggggatccac tagttctaga gcggccgccc      6480
taattaacta atattatatt ttttatctaa aaaactaaaa ataaacattg attaaatttt      6540
aatataatac ttaaaaatgg atgttgtgtc gttagataaa ccgtttatgt attttgagga      6600
aattgataat gagttagatt acgaaccaga aagtgcaaat gaggtcgcaa aaaaactgcc      6660
gtatcaagga cagttaaaac tattactagg agaattattt tttcttagta agttacagcg      6720
acacggtata ttagatggtg ccaccgtagt gtatatagga tcggctcctg gtacacatat      6780
acgttatttg agagatcatt tctataattt aggaatgatt atcaaatgga tgctaattga      6840
cggacgccat catgatccta ttctaaatgg attgcgtgat gtgactctag tgactcggtt      6900
cgttgatgag gaatatctac gatccatcaa aaaacaactg catccttcta agattatttt      6960
aatttctgat gtaagatcca aacgaggagg aaatgaacct agtacggcgg atttactaag      7020
taattacgct ctacaaaatg tcatgattag tattttaaac cccgtggcat ctagtcttaa      7080
atggagatgc ccgtttccag atcaatggat caaggacttt tatatcccac acggtaataa      7140
aatgttacaa ccttttgctc cttcatattc aggggaattc                            7180
```

<210> 6
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<223> E/L

<400>

tatttttttt ttttggaata taaatag 27

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 282 041

(21) Nº de solicitud: 200600762

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **24.03.2006**

(32) Fecha de prioridad:

# INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

## DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|---|---|---|
| Y | WO 02072754 A1 (US GOV.(DEP. OF HEALTH AND HUMAN SERVICES)) 01.03.2002, páginas 15-19,23; página 24, líneas 6-22; página 27, líneas 19-21; página 28, líneas 1-10; página 33, líneas 13-19; reivindicaciones 1,4,5,12,14,17,22,26. | 1,3-7, 13-33,36 |
| A | Todo el documento. | 2,8-12, 34-35, 37-38 |
| Y | US 2005058657 A1 (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; reivindicaciones 1,8-9. | 1,3-7, 13-33,36 |
| A | Todo el documento. | 2,8-12, 34-35, 37-38 |
| Y | US 20030220276 A1 (NARAYAN OPENDRA) 27.11.2003, figura 1; página 1, párrafo [15]; página 3, párrafos [26-37]; página 11, párrafo [80]; reivindicaciones 42,46. | 1,3-7, 13-33,36 |
| A | | 2,8-12, 34-35, 37-38 |
| A | WO 0232943 A2 (US GOV.) 25.04.2002, SEQ ID Nº: 84-87,158. | 10-12 |

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

| Fecha de realización del informe | Examinador | Página |
|---|---|---|
| 03.09.2007 | L. Seriñá Ramírez | 1/2 |

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

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