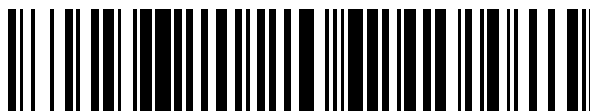


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 623**

51 Int. Cl.:

C12N 15/863 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2013** **PCT/EP2013/003239**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014** **WO14063832**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2013** **E 13783852 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020** **EP 2912183**

54 Título: **Promotor PR13.5 para respuestas contundentes de células T y anticuerpos**

30 Prioridad:

28.10.2012 US 201261719429 P

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

04.01.2021

73 Titular/es:

BAVARIAN NORDIC A/S (100.0%)

Hejreskovvej 10A

3490 Kvistgaard, DK

72 Inventor/es:

STEIGERWALD, ROBIN y

BRINKMANN, KAY

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 800 623 T3

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

DESCRIPCIÓN

Promotor PR13.5 para respuestas contundentes de células T y anticuerpos

Antecedentes de la invención

MVA se origina a partir de la cepa de vaccinia dérmica Ankara (virus de vaccinia corioalantoidea Ankara (CVA)) que se conservó en el Instituto de Vacunación, Ankara, Turquía durante muchos años y se utilizó como base para la vacunación de seres humanos. Sin embargo, debido a las complicaciones post-vacunales, a menudo graves, asociadas con los virus de vaccinia (VACV), hubo varios intentos de generar una vacuna contra la viruela más atenuada y más segura.

Durante el período de 1960 a 1974, el Prof. Anton Mayr logró atenuar el CVA mediante más de 570 pases continuos en células CEF (Mayr et al., 1975, Passage History: Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. Infection 3: 6-14). Como parte del desarrollo temprano de MVA como una vacuna pre-viruela, hubo ensayos clínicos que utilizaron MVA-517 (correspondiente al pase 517) en combinación con Lister Elstree (Stickl, 1974, Smallpox vaccination and its consequences: first experiences with the highly attenuated smallpox vaccine "MVA". Prev.Med. 3(1): 97-101; Stickl y Hochstein-Mintzel, 1971, Intracutaneous smallpox vaccination with a weak pathogenic vaccinia virus ("MVA virus"). Munch Med Wochenschr. 113: 1149-1153) en sujetos con riesgo de reacciones adversas por vaccinia. En 1976, MVA derivado del stock de semillas MVA-571 (correspondiente al pase 571) se registró en Alemania como la vacuna cebadora en un programa de vacunación parenteral contra la viruela en dos fases. Posteriormente, MVA-572 se utilizó en aproximadamente 120,000 individuos caucásicos, la mayoría niños entre 1 y 3 años de edad, sin efectos secundarios graves reseñados, a pesar de que muchos de los sujetos pertenecían a una población con alto riesgo de complicaciones asociadas con la el virus de vaccinia convencional (Mayr et al., 1978, La cepa de vacunación contra la viruela MVA: marcador, estructura genética, experiencia adquirida con la vacunación parenteral y comportamiento en organismos con un mecanismo de defensa debilitado (traducción del autor). Zentralbl. Bacteriol. (B) 167: 375-390). MVA-572 se depositó en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales, Laboratorio de Investigación y Producción de Vacunas, Servicio de Laboratorio de Salud Pública, Centro de Microbiología Aplicada e Investigación, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, Reino Unido, como ECACC V9401 2707.

Debido a que se utilizaron muchos pases para atenuar el MVA, existe un cierto número de cepas o aislados diferentes, dependiendo del número de pases en las células CEF. Todas las cepas de MVA proceden del Dr. Mayr y la mayoría se derivan de MVA-572 que se utilizó en Alemania durante el programa de erradicación de la viruela, o MVA-575 que se utilizó ampliamente como una vacuna veterinaria. MVA-575 se depositó el 7 de diciembre de 2000 en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (ECACC) con el número de depósito V001 20707.

Por propagación en serie (más de 570 pases) de la CVA en fibroblastos de embrión de pollo primarios, se obtuvo el MVA (virus de vaccinia Ankara modificado) atenuado en CVA. El MVA se hizo pasar adicionalmente por Bavarian Nordic y se designa MVA-BN. MVA, así como MVA-BN, carece de aproximadamente el 13% (26,5 kb de seis sitios de delección mayores y múltiples menores) del genoma en comparación con el virus CVA ancestral. Las delecciones afectan a un cierto número de genes de virulencia y de rango de huésped, así como a un gran fragmento del gen que codifica la proteína de inclusión de tipo A (ATI) y un gen que codifica una proteína estructural que dirige las partículas de virus maduras a los cuerpos de inclusión de tipo A. Una muestra de MVA-BN se depositó el 30 de agosto de 2000 en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) con el número V00083008.

MVA-BN puede unirse y penetrar en células humanas en los casos en los que los genes codificados por virus se expresan de manera muy eficiente. Sin embargo, no se produce el ensamblaje y la liberación del virus de la progenie. Se han administrado preparaciones de MVA-BN y derivados a muchos tipos de animales y a más de 2000 sujetos humanos, incluidos individuos inmunodeficientes. Todas las vacunas han demostrado ser generalmente seguras y bien toleradas.

La percepción de muchas publicaciones diferentes es que todas las cepas de MVA son iguales y representan un vector viral vivo altamente atenuado y seguro. Sin embargo, ensayos preclínicos han revelado que MVA-BN muestra una atenuación y eficacia superiores en comparación con otras cepas de MVA (documento WO 02/42480). Las cepas variantes de MVA MVA-BN como, p. ej., las depositadas en la ECACC con el número V00083008, tienen la capacidad de replicación reproductiva in vitro en fibroblastos de embrión de pollo (CEF), pero no tienen capacidad de replicación reproductora en células humanas en las que MVA 575 o MVA 572 puede replicarse de forma reproductora. Por ejemplo, MVA-BN no tiene capacidad de replicación reproductora en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT, la línea celular de riñón de embrión humano 293, la línea celular de osteosarcoma óseo humano 143B y la línea celular de adenocarcinoma cervical humano HeLa. Además, cepas de MVA-BN no se replican en un modelo de ratón que es incapaz de producir células B y T maduras, y como tal está gravemente comprometido de forma inmune

y es altamente susceptible a un virus replicante. Una propiedad adicional o alternativa de las cepas de MVA-BN es la capacidad de inducir al menos sustancialmente el mismo nivel de inmunidad en los regímenes de cebador de virus vaccinia/refuerzo de virus de vaccinia cuando se compara con los regímenes de cebador de ADN/cebador de virus de vaccinia.

- 5 La expresión "no es capaz de replicación reproductora" se utiliza en la presente solicitud como se define en el documento WO 02/42480 y la patente de EE.UU. 6.761.893. Por lo tanto, la expresión se aplica a un virus que tiene una relación de amplificación de virus a los 4 días después de la infección de menos de 1 utilizando los ensayos descritos en la Patente de EE.UU. 6.761.893. La "relación de amplificación" de un virus es la relación del virus producido a partir de una célula infectada (Salida) a la cantidad utilizada originalmente para infectar las células en primer lugar (Entrada). Una relación de "1" entre la Salida y la Entrada define un estado de amplificación en el que la cantidad de virus producida a partir de las células infectadas es la misma que la cantidad utilizada inicialmente para infectar las células.

- 15 MVA-BN o sus derivados, de acuerdo con una realización, se caracteriza por inducir al menos sustancialmente el mismo nivel de inmunidad en los regímenes de cebador de virus de vaccinia/refuerzo de virus de vaccinia cuando se comparan con los regímenes de cebador de ADN/refuerzo de virus de vaccinia. Se considera que un virus de vaccinia induce al menos sustancialmente el mismo nivel de inmunidad en los regímenes de cebador de virus de vaccinia/refuerzo de virus de vaccinia cuando se compara con los regímenes de cebador de ADN/refuerzo de virus de vaccinia si la respuesta CTL, medida en uno del "ensayo 1" y "ensayo 2" como se describe en el documento WO 02/42480, preferiblemente en ambos ensayos, es al menos sustancialmente la misma en los regímenes de cebador de virus de vaccinia/refuerzo de virus de vaccinia cuando se compara con los regímenes de cebador de ADN/refuerzo de virus de vaccinia. Más preferiblemente, la respuesta CTL después de la administración de cebador de virus de vaccinia/refuerzo de virus de vaccinia es mayor en al menos uno de los ensayos, en comparación con los regímenes de cebador de ADN/refuerzo de virus de vaccinia. Lo más preferiblemente, la respuesta CTL es mayor en ambos ensayos.

- 25 El documento WO 02/42480 describe cómo se obtienen los virus de vaccinia que tienen las propiedades de MVA-BN. El virus MVA-BN altamente atenuado puede derivarse, p. ej., mediante el pase adicional de un virus de vaccinia Ankara (MVA) modificado, tal como MVA-572 o MVA-575.

En resumen, MVA-BN ha demostrado que tiene el más alto perfil de atenuación en comparación con otras cepas de MVA y es seguro incluso en animales severamente inmunocomprometidos.

- 30 Aunque MVA exhibe una replicación fuertemente atenuada en células de mamífero, sus genes se transcriben de manera eficiente, estando el bloque en la replicación viral en el nivel de ensamblaje y de salida del virus. (Sutter y Moss, 1992, Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 89: 10847-10851; Carroll y Moss, 1997, Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. Virology 238: 198-211.)
- 35 A pesar de su alta atenuación y virulencia reducida, en estudios preclínicos se ha demostrado que MVA-BN provoca respuestas inmunes tanto humorales como celulares a VACV y a los productos de genes heterólogos clonados en el genoma de MVA (Harrer et al., 2005, Therapeutic Vaccination of HIV-1-infected patients on HAART with recombinant HIV-1 nef-expressing MVA: safety, immunogenicity and influence on viral load during treatment interruption. Antiviral Therapy 10: 285-300; Cosma et al., 2003, Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits Nef-specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals. Vaccine 22(1): 21-29; Di Nicola et al., 2003, Clinical protocol. Immunization of patients with malignant melanoma with autologous CD34(+) cell-derived dendritic cells transduced ex vivo with a recombinant replication-deficient vaccinia vector encoding the human tyrosinase gene: a phase I trial. Hum Gene Ther. 14(14): 1347-1 360; Di Nicola et al., 2004, Boosting T cell-mediated immunity to tyrosinase by vaccinia virus-transduced, CD34(+)-derived dendritic cell vaccination: a phase I trial in metastatic melanoma. Clin Cancer Res. 10(16): 5381-5390.)

- 45 Vacunas basadas en MVA-BN y MVA-BN recombinante pueden generarse, hacerse pasar, producirse y fabricarse en células CEF cultivadas en medio exento de suero. Muchas variantes de MVA-BN recombinante han sido caracterizadas por el desarrollo preclínico y clínico. No se han observado diferencias en términos de atenuación (ausencia de replicación en líneas celulares humanas) o seguridad (toxicidad preclínica o estudios clínicos) entre MVA-BN, la cadena principal del vector viral y las diversas vacunas basadas en MVA recombinante.

- 50 La inducción de una fuerte respuesta inmune humoral y celular contra un producto genético extraño expresado por un vector VACV se ve obstaculizada por el hecho de que el producto genético extraño tiene que competir con todos los más de 150 antígenos del vector VACV para el reconocimiento y la inducción de anticuerpos y células T específicos. El problema específico es la inmunodominancia de los epítomos de células T CD8 del vector que impide la inducción de una fuerte respuesta de las células T CD8 contra el producto génico extraño. (Smith et al., Immunodominance of

poxviral-specific CTL in a human trial of recombinant-modified vaccinia Ankara. J. Immunol. 175:8431-8437, 2005.) Esto se aplica a vectores VACV replicantes tales como Dryvax, así como a vectores no replicantes tales como NYVAC y MVA.

5 Para la expresión de un antígeno recombinante ("neoantígeno") por parte de VACV, se pueden utilizar promotores solamente específicos para poxvirus, pero no promotores eucarióticos comunes. La razón de esto es la biología específica de los poxvirus que se replican en el citoplasma y que traen consigo su propia maquinaria transcripcional autónoma celular que no reconoce los promotores eucarióticos típicos.

10 El ciclo de replicación viral se divide en dos fases principales, una fase temprana que comprende las dos primeras horas después de la infección antes de la replicación del ADN, y una fase tardía que comienza en la aparición de la replicación del ADN viral a las 2-4 horas después de la infección.

15 La fase tardía abarca el resto del ciclo de replicación viral a partir de ~ 2-20 h después de la infección hasta que la progenie del virus se libera de la célula infectada. Existe un cierto número de tipos de promotores poxvirales que se distinguen y nombran por los periodos de tiempo dentro del ciclo de replicación viral en el que son activos, por ejemplo, promotores tempranos y tardíos. (Véase, por ejemplo, Davison y Moss, J. Mol. Biol. 210:771-784, 1989; Davison y Moss, J. Mol. Biol. 210:749-769, 1989; y Hirschmann et al., Journal of Virology 64:6063-6069, 1990.)

20 Si bien los promotores tempranos también pueden ser tardíos activos en la infección, la actividad de los promotores tardíos se limita a la fase tardía. Una tercera clase de promotores, denominados promotores intermedios, es activa en la transición de la fase temprana a la tardía y depende de la replicación del ADN viral. Esto último también se aplica a los promotores tardíos, sin embargo, la transcripción de los promotores intermedios comienza antes que la de los promotores tardíos típicos y requiere un conjunto diferente de factores de transcripción.

25 Se hizo cada vez más evidente en los últimos años que la elección de la clase temporal del promotor poxviral para expresión del neoantígeno tiene efectos profundos en la fuerza y la calidad de la respuesta inmune específica para el neoantígeno. Se demostró que las respuestas de células T contra los neoantígenos expresados bajo el control de un promotor tardío son más débiles que las obtenidas con el mismo antígeno bajo un promotor temprano. (Bronte et al., Antigen expression by dendritic cells correlates with the therapeutic effectiveness of a model recombinant poxvirus tumor vaccine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 94:3183-3188, 1997. Coupar et al., Temporal regulation of influenza hemagglutinin expression in vaccinia virus recombinants and effects on the immune response. Eur. J. Immunol. 16:1479-1487, 1986.)

30 Aún más sorprendentemente, se ha demostrado recientemente que en inmunizaciones autólogas repetidas con VACV, así como con el MVA vector VACV de replicación defectuosa, las respuestas de células T CD8 contra antígenos bajo un promotor exclusivamente tardío pueden fallar por completo. Este fallo resultó en una respuesta de células T CD8 específica para antígenos casi indetectable después de la segunda inmunización. (Kastenmuller et al., Cross-competition of CD8+ T cells shapes the immunodominance hierarchy during boost vaccination. J. Exp. Med. 204:2187-2198, 2007.)

35 Por lo tanto, la expresión temprana de neoantígenos por parte de vectores VACV parece ser crucial para eficientes respuestas de células T CD8 específicas para neoantígenos. También se ha demostrado que un antígeno del vector VACV expresado de forma temprana no solo compite con los antígenos expresados tardíamente, sino también con otros antígenos tempranos por la inmunodominancia en la respuesta de células T CD8. (Kastenmuller et al., 2007.) Las propiedades específicas de la porción temprana del promotor poxviral podrían ser, por lo tanto, muy importantes para la inducción de una respuesta de células T específica para neoantígenos. Además, es una opinión común y una regla general que cantidades elevadas de antígeno son beneficiosas para la inducción de fuertes respuestas inmunes específicas para antígenos (para el sector de poxvirus, véase, por ejemplo, Wyatt et al., Correlation of immunogenicities and in vitro expression levels of recombinant modified vaccinia virus Ankara HIV vaccines. Vaccine 26:486-493, 2008).

45 Un promotor que combina 4 elementos de promotor temprano y un elemento de promotor tardío del gen ATI se ha descrito previamente (Funahashi et al., Increased expression in vivo and in vitro of foreign genes directed by A-type inclusion body hybrid promoters in recombinant vaccinia viruses. J. Virol. 65:5584-5588, 1991; Wyatt et al., Correlation of immunogenicities and in vitro expression levels of recombinant modified vaccinia virus Ankara HIV vaccines. Vaccine 26:486-493, 2008) y ha demostrado dirigir una expresión temprana incrementada de antígeno. Sin embargo, las respuestas de células T inducidas por un antígeno dirigido por un promotor de este tipo solo se analizaron después de una única inmunización y no fueron aparentemente diferentes de las obtenidas con el promotor clásico Pr7.5K en este contexto. (Funahashi et al., Increased expression in vivo and in vitro of foreign genes directed by A-type inclusion body hybrid promoters in recombinant vaccinia viruses. J. Virol. 65:5584-5588, 1991.)

Jin et al. Arco. Virol. 138:315-330, 1994, informaron sobre la construcción de promotores VACV recombinantes que consisten en un promotor ATI de VACV combinado con repeticiones en tándem (2 a 38 copias) de un promotor Pr7.5 mutado operativamente enlazado al gen CAT. Hasta 10 repeticiones del promotor Pr7.5 mutado fueron efectivas para aumentar la expresión génica temprana. La repetición adicional parecía ser inhibitoria. Con todas las construcciones, la cantidad de proteína CAT producida en presencia de arabinósido de citosina (AraC) (es decir, cuando el ciclo de replicación viral se detuvo en la fase temprana) fue inferior a la décima parte de la cantidad producida en ausencia de AraC (Jin et al. Arch. Virol. 138:315-330, 1994).

Recientemente, se demostró que las inmunizaciones repetidas de ratones con MVA recombinante que expresa OVA bajo el control de un promotor temprano-tardío híbrido (pHyb) que contiene cinco copias de un elemento temprano fuerte condujo a respuestas de células T CD8 aguda y de memoria superiores en comparación con las de OVA impulsadas por Pr7.5 y PrS. Baur et al., Journal of Virology, vol. 84 (17):8743-8752 (2010). Además, OVA expresado bajo el control de pHyb reemplazó la proteína B8R derivada de MVA como el antígeno de células T CD8 inmunodominante después de tres o más inmunizaciones. *Id*

Assarsson et al, P.N.A.S. 105:2140-45, 2008, midieron simultáneamente los niveles de expresión de 223 genes de virus de vaccinia anotados durante la infección y se determinó su cinética utilizando un enfoque de matriz de mosaico del genoma. Descubrieron que muchos genes en la cepa WR del virus de Vaccinia tenían altas tasas de transcripción. Assarsson et al. proporcionaron algunos ejemplos de genes altamente expresados: inmediatos-tempranos, VACWR-059 (proteína de unión a ARN de doble cadena) y VACWR-184 (desconocido); tempranos, VACWR-018 (desconocido); tempranos/tardíos, VACWR-131 (proteína central); y tardíos, VACWR-169 (desconocido). Assarsson et al. indicaron que, debido a sus niveles de expresión excepcionalmente altos, estos genes podrían ser de especial interés para futuras investigaciones, pero no identificaron los promotores que iniciaron la transcripción de estos genes.

Yang et al, P.N.A.S. 107:11513-11518, 2010, utilizaron la secuenciación de ARN profunda para analizar transcriptomas de virus de vaccinia (VACV) en momentos progresivos después de la infección. Antes de la replicación del ADN viral se detectaron transcripciones de 118 ORF de VACV; después de la replicación, se caracterizaron las transcripciones de 93 ORF adicionales. La alta resolución permitió la determinación de los límites precisos de muchos ARNm, incluyendo las transcripciones de lectura y la ubicación de los sitios de inicio de ARNm y promotores adyacentes.

Orubu et al, PLoS ONE 7 (6):e40167, 2012, demostraron que promotores tempranos potentes que impulsan la expresión de marcos de lectura abiertos (ORF) de MVA no funcionales o no esenciales pueden ser aprovechados para la expresión inmunogénica de antígeno recombinante. El reemplazo preciso de los ortólogos de MVA de C11R, F11L, A44L y B8R con un antígeno modelo situado para usar el mismo codón de inicio de la traducción permitió una expresión transgénica temprana similar o ligeramente mayor que la lograda por los promotores sintéticos p7.5 o cortos utilizados comúnmente. La frecuencia de células T CD8+ específicas para antígenos inducidas en ratones por vacunación única o cebada con adenovirus, con refuerzo de rMVA fue similarmente igual o marginalmente mejorada utilizando promotores endógenos en sus loci genómicos auténticos en comparación con las construcciones tradicionales. La mejora en la inmunogenicidad observada utilizando los promotores C11R o F11L en comparación con p7.5 fue similar a la obtenida con el promotor mH5 en comparación con p7.5.

Respuestas contundentes de células T y anticuerpos contra antígenos codificados por poxvirus recombinantes puede mejorar la eficacia de la vacuna. En consecuencia, existe la necesidad en la técnica de composiciones y métodos capaces de lograr fuertes respuestas de células T y anticuerpos contra antígenos codificados por poxvirus recombinantes, tales como MVA. La invención satisface esta necesidad.

Breve Sumario de la Invención

La invención abarca un virus recombinante modificado de Vaccinia Ankara (MVA) que comprende un promotor Pr13.5 enlazado a una secuencia de nucleótidos que codifica un neoantígeno y usos del mismo.

En una realización, la invención abarca un virus de Vaccinia Ankara modificado (MVA) recombinante para uso en la inducción de una respuesta contundente de células T CD8 contra un neoantígeno en un ser humano, que comprende administrar al ser humano una o más administraciones de dicho virus de Vaccinia Ankara modificado (MVA) recombinante; en donde el MVA recombinante comprende un promotor Pr13.5 enlazado operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica el neoantígeno, en donde el promotor Pr13.5 comprende al menos 1 copia de una secuencia de ácido nucleico de al menos 40 bases que tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, y al menos 1 copia de una segunda secuencia de nucleótidos de al menos 31 nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, y en donde dicho promotor genera al menos 1,5 veces más células T CD8 específicas para el neoantígeno que se generan con una construcción de MVA correspondiente, en la que el promotor ha sido reemplazado por el promotor PrS definido por SEQ ID NO: 6 después de una única inmunización.

En otra realización, la invención abarca un virus de Vaccinia Ankara modificado (MVA) recombinante que comprende un promotor Pr13.5 enlazado operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un neoantígeno, en donde el promotor Pr13.5 comprende al menos 1 copia de una secuencia de ácido nucleico de al menos 40 bases que tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, y al menos 1 copia de una segunda secuencia de nucleótidos de al menos 31 nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, y en donde dicho el promotor genera al menos 1,5 veces más células T CD8 específicas para el neoantígeno que las que se generan con una construcción de MVA correspondiente, en la que el promotor ha sido reemplazado por el promotor PrS definido por SEQ ID NO: 6 después de una única inmunización.

En diversas realizaciones, el promotor Pr13.5 comprende al menos 2 copias de una secuencia de ácido nucleico de al menos 40 bases que tiene al menos 98% o 100% de identidad con SEQ ID NO: 1.

En diversas realizaciones, el promotor Pr13.5 comprende los nucleótidos 15878-15775 en la Figura 1.

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 representa la secuencia aguas arriba del gen MVA013.5L (SEQ ID NO: 3). Se dan las secuencias de los promotores Pr13.5 corto y Pr13.5 largo. Línea discontinua: Pr13.5 largo (Pos. 15878-15755). Línea continua: Pr13.5-corto (Pos. 15808-15755). Subrayado: codón de inicio ATG de MVA013.5 (Pos. 15703-15701). Codón de parada TAA de MVA014L (Pos. 15878-15856). Flechas negras desde abajo: sitios de inicio de la transcripción definidos por RACE PCR (Pos. 15767 y 15747). Flechas grises desde la parte superior: sitios de inicio de la transcripción definidos por Yang et al., 2010, datos compl. En recuadro: promotor central según lo definido por Yang et al., 2010, datos compl. (Pos. 15913-15899). Posiciones de acuerdo con GenBank DQ983238.1

La Figura 2 representa la secuencia y la posición de los promotores Pr13.5 largo y Pr13.5 corto en el genoma de MVA (SEQ ID NO: 3). Hay una repetición de la secuencia de 44 pb (repetición directa) en la secuencia aguas arriba del gen MVA013.5. En recuadro: en recuadro está la secuencia repetida de 44 pb en la secuencia aguas arriba de 13.5, que está separada por un espaciador de 36 pb. Línea discontinua: Pr13.5 largo (Pos. 15878-15755). Línea continua: Pr13.5-corto (Pos. 15808-15755). Subrayado: codón de inicio ATG de MVA013.5 (Pos. 15703-15701). Posiciones de acuerdo con GenBank DQ983238.1.

La Figura 3 representa RT-qPCR que mide el ARNm de ovoalbúmina de células HeLa infectadas con las construcciones indicadas en los puntos de tiempo posteriores a la infección indicados.

La Figura 4 representa la expresión de la proteína Ova medida por FACS como la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células HeLa infectadas con las construcciones indicadas en los puntos de tiempo posteriores a la infección indicados. La media de wt (sin gen Ova incluido) en 399 MFI refleja el fondo del ensayo.

La Figura 5 representa la relación media de células Ova+/B8R+ de ratones vacunados con las construcciones indicadas después de la primera, segunda y tercera inmunizaciones.

La Figura 6 representa la relación media de respuesta de células T Ova+/B8R+ de ratones a las 10 semanas después de la tercera inmunización con las construcciones indicadas.

Las Figuras 7A y 7B representan la producción de anticuerpos a partir de las construcciones indicadas después de la primera, segunda y tercera inmunizaciones. A. Título medio geométrico (GMT) de anticuerpos. B. Relación de GMT en comparación con el promotor PrS. Los promotores MVA50L + PrSSL y MVA170R + PrSSL son los promotores de MVA de los genes respectivos fusionados en el lado 5' del promotor PrSSL Tardío Corto Sintético directamente aguas arriba del ATG del gen de ovoalbúmina. (AATTTTAAATATATAA; SEQ ID NO: 7; documento PCT WO 2010/060632 A1.)

Las Figuras 8A-8F representan un alineamiento BLAST de las secuencias de nucleótidos de diversos promotores Pr13.5 de poxvirus con SEQ ID NO: 1. Los nucleótidos idénticos se representan con puntos, los nucleótidos omitidos se representan con guiones y los cambios se indican con letras.

Las Figuras 9A-9D representan números de acceso y nombres para las secuencias en los alineamientos de las Figuras 8A-8F.

Descripción Detallada de la Invención

Células HeLa se infectaron con MVA-BN y se preparó ARN. Se generaron cebadores específicos para diversos ORF de MVA y se utilizó RACE-PCR (kit FirstChoice® RLM-RACE, Life Technologies, Darmstadt, Alemania) para generar productos de PCR representativos de los ARN de MVA que codifican estos ORF. Los productos de PCR se secuenciaron para identificar los sitios de inicio de la transcripción. En base a esta información, se identificaron promotores para la transcripción de ARNm que codifican estos ORF. Los promotores de MVA para los siguientes ORF se insertaron en construcciones de MVA para impulsar la expresión del gen de la ovoalbúmina (OVA): MVA13.5 (CVA022; WR 018), MVA050L (E3L; WR 059), MVA022L (K1L; WR 032) y MVA170R (B3R; WR 185).

Se infectaron células HeLa in vitro con los virus MVA recombinantes y la expresión de la proteína ovoalbúmina se examinó por análisis FACS. No se detectó expresión de proteína ovoalbúmina mediante análisis FACS para construcciones que contienen los promotores MVA050L (E3L; WR 059), MVA022L (K1L; WR 032) y MVA170R (B3R; WR 185) a las 2 o incluso 4 horas después de la infección. En contraposición, se detectó la expresión de ovoalbúmina de alto nivel con el promotor MVA13.5 (CVA022; WR 018) ya después de 2 horas.

Un supuesto elemento de núcleo del promotor para el ORF de MVA13.5L fue identificado previamente en Yang et al., 2010, como que contiene una secuencia del núcleo de 15 nt y un conductor no traducido de 177 nt. Sin embargo, el estudio actual indicó que los sitios de inicio de la transcripción utilizados por MVA13.5L ORF estaban aguas abajo del sitio de inicio identificado por Yang et al. en más de 100 nucleótidos. En consecuencia, el promotor MVA13.5 identificado por los autores de la invención difiere del elemento de núcleo del promotor identificado por Yang et al.

El promotor MVA13.5 identificado por los autores de la invención contiene una repetición de más de 40 nucleótidos: TAAAAATAGAAACTATAATCATATAATAGTGTAGGTTGGTAGTA (SEQ ID NO: 1). La secuencia repetida también se puede encontrar en muchos otros poxvirus, por ejemplo, virus de la viruela del caballo, virus de la viruela del mono, virus de la viruela de la vaca, variola virus, virus de vaccinia, virus de la viruela del camello, virus de la viruela del conejo, Ectromelia virus, y virus de la viruela del jerrillo de la India (Figuras 8 y 9).

Se generaron dos construcciones de MVA con promotores que contienen una copia (MVA13.5 corto; SEQ ID NO: 1) o dos copias (MVA13.5 largo; SEQ ID NO: 2) de la repetición que impulsa la expresión del gen de la ovoalbúmina (OVA). Se detectó la expresión de ovoalbúmina de alto nivel después de la infección de células HeLa in vitro con ambas construcciones. (Fig. 4).

La expresión de ARN de ovoalbúmina dirigida por diversos promotores en células HeLa infectadas in vitro se midió en diversos puntos de tiempo por RT-qPCR. Tanto MVA13.5 corto como MVA13.5 largo mostraron altos niveles de expresión temprana de ARN. (Fig. 3). MVA13.5 largo mostró los niveles más altos de expresión temprana de proteínas.

Respuestas de células T CD8 contra OVA expresada de forma recombinante bajo el control de los promotores PrS, Pr7.5 opt + espaciador, Pr13.5 corto y Pr13.5 largo se determinaron en ratones después de una, dos y tres inmunizaciones de MVA recombinante por ratón (Fig. 5-6). La respuesta de células T CD8 específicas para OVA y específicas para B8R (viral) se determinó evaluando el número de células T CD8 que se unen específicamente a hexámeros de MHC de clase I. Los dextrámeros de MHC de clase I se complejaron con sus respectivos péptidos de unión a H-2Kb, SIINFEKL (SEQ ID NO: 4) para OVA o TSYKFESV (SEQ ID NO: 5) para el péptido B8R viral.

La relación media de células T CD8 específicas para OVA a específicas para B8R fue aproximadamente 2,5 para MVA13.5-largo después de 3 inmunizaciones. Las otras 3 construcciones mostraron una relación media de menos de 1. Por lo tanto, podría lograrse una inversión de la jerarquía de inmunodominancia utilizando el promotor Pr13.5 largo para la expresión del neoantígeno, pero no utilizando los otros promotores.

Respuestas de anticuerpos contra OVA expresada de forma recombinante bajo el control de diversos promotores se determinaron en ratones después de una, dos y tres inmunizaciones de MVA recombinante por ratón. (Fig. 7A-B). La respuesta de anticuerpos con MVA13.5 largo fue sustancialmente mayor que la respuesta utilizando un MVA recombinante con el promotor PrS. Por lo tanto, el uso del promotor Pr13.5 largo para impulsar la expresión de neoantígeno a partir de MVA proporciona resultados inesperadamente superiores.

Promotores Pr13.5

La invención hace uso de ácidos nucleicos aislados que comprenden o que consisten de un promotor Pr13.5. Dentro del contexto de esta invención, un "promotor Pr13.5" comprende al menos

1 copia de una secuencia de ácido nucleico de al menos 40 bases que tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, y al menos 1 copia de una segunda secuencia de nucleótidos de al menos 31 nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, y en donde dicho promotor genera al menos 1,5 veces más células T CD8 específicas para el neoantígeno que se generan con una construcción de MVA correspondiente, en la que el promotor ha sido reemplazado por el promotor PrS definido por SEQ ID NO: 6 después de una única inmunización. Por lo tanto, un "promotor Pr13.5" puede, en diversas realizaciones, referirse a una secuencia de nucleótidos de MVA, a una secuencia sintética o a una secuencia poxviral análoga de un poxvirus distinto de MVA. Preferiblemente, el promotor Pr13.5 comprende al menos 2 copias de una secuencia de ácido nucleico de al menos 40 bases que tienen al menos un 98%, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO: 1. La secuencia de ácido nucleico es de preferiblemente 40, 41, 42, 43, 44 o 45 bases de longitud.

El porcentaje de identidad puede determinarse por inspección visual y cálculo matemático. Alternativamente, el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico se puede determinar comparando la información de la secuencia utilizando el programa informático GAP, versión 6.0 descrito por Devereux et al. (Nucl. Acids Res. 12:387, 1984) y disponible del Grupo de Computación Genética de la Universidad de Wisconsin (UWGC). Los parámetros predeterminados preferidos para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y de 0 para no identidades) para nucleótidos, y la matriz de comparación ponderada de Gribbskov y Burgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986, según se describe por Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358, 1979; (2) una penalización de 3,0 por cada hueco y una penalización adicional de 0,10 por cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización por huecos finales. También se pueden utilizar otros programas utilizados por un experto en la técnica de comparación de secuencias.

Preferiblemente, el promotor Pr13.5 está enlazado operativamente a una secuencia de ácido nucleico heterólogo. Dentro del contexto de esta invención, "secuencia de ácido nucleico heterólogo" significa una secuencia de ácido nucleico a la que el promotor no está enlazado en la naturaleza. Dentro del contexto de esta invención, "enlazado operativamente" significa que el promotor puede impulsar la expresión de la secuencia de ácido nucleico heterólogo en una célula infectada con poxvirus. La secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica preferiblemente un neoantígeno. Dentro del contexto de esta invención, un neoantígeno se refiere a un antígeno no expresado de forma natural por el vector poxviral.

El promotor Pr13.5 puede enlazarse operativamente a una secuencia de ácido nucleico heterólogo mediante tecnología de ADN recombinante. En diversas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico heterólogo se introduce en el ORF 13.5 del poxvirus.

Preferiblemente, el promotor Pr13.5 es un promotor de poxvirus que se produce de forma natural. Por ejemplo, el promotor Pr13.5 puede ser promotor Pr13.5 de virus de vaccinia Ankara modificado (MVA), virus de la viruela del mono, virus de la viruela de la vaca, variola virus, virus de vaccinia, virus de la viruela del camello, virus de la viruela del conejo, Ectromelia virus o virus de la viruela del jerrillo de la India virus. Promotores Pr13.5 preferidos pueden seleccionarse de los virus mostrados en la Figura 9 y las secuencias mostradas en la Figura 8.

En diversas realizaciones, el promotor Pr13.5 es un promotor Pr13.5 sintético.

En algunas realizaciones, el promotor Pr13.5 contiene 1 copia de una secuencia de nucleótidos de al menos 40 bases que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO: 1 y 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más copias de una segunda secuencia de nucleótidos de al menos 31 nucleótidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la segunda secuencia de nucleótidos tiene al menos 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 bases.

Preferiblemente, las secuencias repetidas están separadas por 20-80 nucleótidos, más preferiblemente 30-40 nucleótidos, y lo más preferiblemente por 33, 35, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos.

Preferiblemente, el promotor Pr13.5 comprende al menos una copia de la secuencia:

```
TAAAAATAGAACTATAATCATATAATAGTGTAGGTTGGTAGTATTGCTCT
TGTGACTAGAGACTTTAGTTAAGGTAAGTGTAAAAATAGAACTATAATCAT
ATAATAGTGTAGGTTGGTAGTA (SEQ ID NO:2).
```

En algunas realizaciones, el promotor Pr13.5 comprende uno o más de los cambios de nucleótidos mostrados en la Figura 8.

La divulgación abarca métodos de expresar un neoantígeno, que comprenden enlazar operativamente un promotor Pr13.5 a una secuencia de ácido nucleico heterólogo.

Poxvirus recombinantes que comprenden promotores Pr13.5

La divulgación abarca un vector poxviral recombinante que comprende un promotor Pr13.5 enlazado operativamente a una secuencia de ácido nucleico heterólogo. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico heterólogo se inserta en el ORF 13.5 de un poxvirus para enlazar operativamente la secuencia de ácido nucleico heterólogo al promotor Pr13.5 viral endógeno. En otro aspecto, la secuencia de ácido nucleico heterólogo está enlazada a un promotor Pr13.5 y está insertada en un sitio en el genoma distinto del ORF 13.5.

Preferiblemente, el vector de poxvirus se deriva de poxvirus que pertenecen a la subfamilia Chordopoxvirinae. Los poxvirus incluyen aquellos pertenecientes a los géneros Orthopoxvirus, Parapoxvirus, Avipoxvirus, Capripoxvirus, Lepripoxvirus, Suipoxvirus, Molluscipoxvirus y Yatapoxvirus. Los más preferidos son los poxvirus que pertenecen a los géneros Orthopoxvirus y Avipoxvirus.

- 5 Otros poxvirus tales como el virus de la viruela del mapache y el virus de la viruela del ratón se pueden emplear en la presente invención, por ejemplo, para la fabricación de la vacuna para la vida salvaje. Miembros del capripoxvirus y leporipox también se incluyen aquí, ya que pueden ser útiles como vectores para ganado y conejos, respectivamente.

- 10 En otro aspecto, el poxvirus se deriva de avipoxvirus. Ejemplos de avipoxvirus adecuados para uso en la presente invención incluyen cualquier avipoxvirus, tal como el virus de la viruela aviar, virus de la viruela del canario, uncopoxvirus, virus de la viruela de miná, virus de la viruela de la paloma, virus de la viruela de los psitaciformes, virus de la viruela de la codorniz, virus de la viruela del pavo real, virus de la viruela del pingüino, virus de la viruela del gorrión, virus de la viruela del estronino y virus de la viruela del pavo. Los avipoxvirus preferidos son el virus de la viruela del canario y el virus de la viruela aviar.

- 15 Preferiblemente, el poxvirus es un virus de vaccinia, lo más preferiblemente MVA. La invención abarca virus MVA recombinantes generados con cualquiera y todos los virus MVA. Virus MVA preferidos son cepas variantes de MVA MVA-BN, tales como, p. ej., las depositadas en el ECACC con el número V00083008; MVA-575, depositado el 7 de diciembre de 2000 en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (ECACC) con el número de depósito V001 20707; y MVA-572, depositado en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales como ECACC V9401 2707. También se prefieren derivados de la cepa depositada.

- 20 Preferiblemente, el MVA tiene la capacidad de replicación reproductora in vitro en fibroblastos de embrión de pollo (CEF) u otras líneas celulares aviares o in vivo en huevos embrionados, pero sin capacidad de replicación reproductora en células humanas en las que MVA 575 o MVA 572 puede replicar de forma reproductora. Lo más preferiblemente, el MVA no tiene capacidad de replicación reproductora en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT, la línea celular de riñón de embrión humano 293, la línea celular de osteosarcoma óseo humano 143B y la línea celular de adenocarcinoma de cuello uterino humano HeLa.

- 25 En realizaciones preferidas, el virus de vaccinia Ankara modificado (MVA) se caracteriza por tener la capacidad de replicación reproductora in vitro en fibroblastos de embrión de pollo (CEF) y por ser más atenuado que MVA-575 en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT, en la línea celular de osteosarcoma óseo humano 143B y en la línea celular de adenocarcinoma de cuello uterino humano HeLa. Preferiblemente, el virus MVA es capaz de una relación de amplificación de replicación mayor que 500 en células CEF.

- 30 Cualquier antígeno, incluyendo los que inducen una respuesta de células T, puede ser expresado por el MVA recombinante de la invención. Se prefieren los antígenos virales, bacterianos, fúngicos y cancerosos. Antígenos del VIH-1, antígenos del virus del Dengue, antígeno específico de próstata (PSA) y antígeno de la fosfatasa ácida de la próstata (PAP), antígenos HER-2/Neu, antígenos del ántrax, antígenos del virus del sarampión, virus de la gripe, picornavirus, coronavirus y antígenos del virus respiratorio sincitial son antígenos particularmente preferidos. Preferiblemente, el antígeno es un antígeno extraño o neoantígeno.

La divulgación abarca métodos de fabricación de poxvirus recombinantes, preferiblemente MVA, que comprenden insertar una secuencia de ácido nucleico heterólogo en un poxvirus de modo que la secuencia de ácido nucleico heterólogo esté enlazada operativamente a un promotor Pr13.5.

- 40 La divulgación abarca el uso del virus MVA recombinante de la invención en la fabricación de un medicamento o vacuna para el tratamiento o la prevención de infecciones y enfermedades de un mamífero, incluyendo un ser humano.

La divulgación abarca el uso del virus MVA recombinante de la invención para el tratamiento o la prevención de infecciones y enfermedades de un mamífero, incluyendo un ser humano.

- 45 La divulgación abarca el uso del virus MVA recombinante de la invención como vacunas, particularmente para el tratamiento o la prevención de infecciones y enfermedades de un mamífero, incluyendo un ser humano.

Kits que comprenden MVA recombinante

- 50 La divulgación proporciona kits que comprenden el vector poxviral recombinante, preferiblemente virus MVA, de acuerdo con la divulgación. El kit puede comprender al menos uno, dos, tres, cuatro o más recipientes o viales del vector poxviral recombinante, preferiblemente virus MVA, junto con instrucciones para la administración del virus a un mamífero, incluido un ser humano. Las instrucciones pueden indicar que el virus recombinante se administra al

mamífero, preferiblemente un ser humano, en una o múltiples dosis (es decir, 2, 3, 4, 5, 6, etc.) en puntos de tiempo específicos (p. ej., al menos 4 semanas, al menos 6 semanas, al menos 8 semanas después de la administración anterior). Preferiblemente, las instrucciones indican que el virus recombinante se debe administrar a un mamífero, preferiblemente un ser humano, en al menos 1, al menos 2, al menos 3 o al menos 4 dosis.

5 Métodos de Inducir una Respuesta de Células T CD8 y/o de Anticuerpos

La divulgación abarca métodos de inducir una respuesta de células T CD8 y/o de anticuerpos en un huésped. En un aspecto, el método comprende administrar al menos una, dos, tres, cuatro o cinco inmunizaciones de un poxvirus recombinante, preferiblemente MVA, que comprende un promotor Pr13.5 al mamífero, incluido un ser humano.

Administración a un Huésped

10 Los poxvirus recombinantes, preferiblemente MVA, de acuerdo con la invención se pueden utilizar para el tratamiento de una amplia gama de mamíferos, incluyendo seres humanos, e incluso seres humanos inmuno-comprometidos. Por lo tanto, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica y también una vacuna para inducir una respuesta inmune en un mamífero, incluido un ser humano.

15 La vacuna comprende preferiblemente el poxvirus recombinante, preferiblemente MVA, en un intervalo de concentraciones de 10^4 a 10^9 TCID₅₀/ml (dosis infecciosa del cultivo de tejido)₅₀/ml, preferiblemente en un intervalo de concentraciones de 10^5 a 5×10^8 TCID₅₀/ml, más preferiblemente en un intervalo de concentraciones de 10^6 a 10^8 TCID₅₀/ml, y lo más preferiblemente en un intervalo de concentraciones de 10^7 a 10^8 TCID₅₀/ml, especialmente 10^8 TCID₅₀/ml.

20 Una dosis de vacunación preferida para mamíferos, preferiblemente un ser humano, comprende 10^6 a 10^9 TCID₅₀, lo más preferiblemente una dosis de 10^7 TCID₅₀ o 10^8 TCID₅₀, especialmente 10^8 TCID₅₀.

25 La composición farmacéutica puede incluir generalmente uno o más soportes, aditivos, antibióticos, conservantes, adyuvantes, diluyentes y/o estabilizadores farmacéuticamente aceptables y/o aprobados. Sustancias auxiliares de este tipo pueden ser agua, solución salina, glicerol, etanol, aceite, agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tampón de pH o similares. Soportes adecuados son típicamente moléculas grandes, de metabolización lenta, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados lipídicos o similares.

30 Para la preparación de vacunas, el poxvirus recombinante, preferiblemente MVA, de acuerdo con la divulgación se puede convertir en una forma fisiológicamente aceptable. Esto se puede hacer en base a la experiencia en la preparación de vacunas contra el poxvirus utilizadas para la vacunación contra la viruela (según lo descrito por Stickl et al. 1974).

35 Por ejemplo, el virus purificado se puede almacenar a -80°C con un título de 5×10^8 TCID₅₀/ml formulada en aproximadamente Tris 10 mM, NaCl 140 mM pH 7,4. Para la preparación de vacunas, p. ej., se pueden liofilizar 10^2 - 10^8 partículas del virus en 100 µl a 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) en presencia de 2% de peptona y 1% de albúmina humana en una ampolla, preferiblemente una ampolla de vidrio. Alternativamente, las vacunas pueden producirse mediante liofilización gradual del virus en una formulación. Esta formulación puede contener aditivos adicionales, tales como manitol, dextrano, azúcar, glicina, lactosa o polivinilpirrolidona u otros adyuvantes, tales como antioxidantes o gases inertes, estabilizadores o proteínas recombinantes (p. ej., albúmina de suero humano) adecuados para la administración in vivo. La ampolla de vidrio se sella después y se puede almacenar entre 4 °C y la temperatura ambiente durante varios meses. Sin embargo, mientras no exista necesidad, la ampolla se almacena preferiblemente a temperaturas inferiores a -20 °C.

45 Para la vacunación o terapia, el liofilizado se puede disolver en una solución acuosa, preferiblemente solución salina fisiológica o tampón Tris, y administrar ya sea sistémica o localmente, es decir, por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intranasal, o cualquier otra vía de administración conocida para el practicante experto. Los expertos en la técnica pueden optimizar el modo de administración, la dosis y el número de administraciones de una manera conocida. Sin embargo, más comúnmente un mamífero, preferiblemente un ser humano, es vacunado con una segunda administración aproximadamente dos semanas a seis semanas después de la primera administración de la vacuna. Tercera, cuarta y administraciones subsiguientes serán más comúnmente de aproximadamente dos semanas a seis semanas después de la administración anterior.

50 La divulgación proporciona métodos para la inmunización de mamíferos, incluyendo un ser humano. En un aspecto, se inmuniza un mamífero objeto, que incluye ratas, conejos, ratones y seres humanos, que comprende administrar una dosis de un MVA recombinante al mamífero, preferiblemente a un ser humano. En un aspecto, la primera dosis

comprende 10^8 TCID₅₀ del virus MVA recombinante y la segunda y dosis adicionales (es decir, tercera, cuarta, quinta, etc.) comprenden 10^8 TCID₅₀ del virus. Las administraciones pueden estar en una primera dosis (cebado) y una segunda o más dosis (de refuerzo).

- 5 La inmunización puede administrarse ya sea sistémica o localmente, es decir, por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intranasal, o por cualquier otra vía de administración conocida por el practicante experto.

Respuestas de células T CD8 y anticuerpos

- 10 Inmunizaciones con el MVA recombinante de la invención pueden inducir una respuesta contundente de células T CD8. En realizaciones preferidas, después de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, etc. inmunización, el MVA recombinante induce una respuesta contundente de células T CD8 en el mamífero, preferiblemente un ser humano, contra el antígeno codificado que es mayor que la respuesta de las células T CD8 contra el epítipo de células T CD8 virales inmunodominantes, p. ej., TSYKFESV (SEQ ID NO: 5) codificado por el vector MVA. Preferiblemente, después de la segunda, tercera, cuarta, quinta, etc. inmunización se induce una respuesta de células T inmunodominantes en el mamífero, preferiblemente un ser humano, contra el antígeno codificado. Preferiblemente, después de la segunda, tercera, cuarta, quinta, etc. inmunización, el MVA recombinante induce una respuesta de células T CD8 en el mamífero, preferiblemente un ser humano, contra el antígeno codificado que es al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30% o 35% del total de células T CD8. Preferiblemente, después de la segunda, tercera, cuarta, quinta, etc. inmunización, el MVA recombinante aumenta la respuesta de las células T CD8 en el mamífero, preferiblemente un ser humano, contra el antígeno codificado al menos 2, 3, 4, 5 o 10 veces (es decir, del 1% al 2%, 3%, 4%, 5% o 10% del total de células T CD8) en comparación con la respuesta con el antígeno codificado después de una administración única o aumenta la respuesta de células T CD8 en el mamífero, preferiblemente un ser humano, contra el antígeno codificado al menos 2, 3, 4, 5 o 10 veces en comparación con la respuesta de células T de un antígeno viral (p. ej., B8R). Preferiblemente, el MVA recombinante genera una respuesta de células T CD8 en el mamífero, preferiblemente un ser humano, contra el antígeno codificado al menos 2, 3, 4, 5 o 10 veces en comparación con la respuesta de células T contra un antígeno viral (p. ej., B8R) después de una sola administración. Lo más preferiblemente, la respuesta de las células T CD8 en el mamífero, preferiblemente un ser humano, contra el antígeno codificado aumenta con 2, 3, 4 o 5, etc. inmunizaciones en mayor medida que la respuesta contra un antígeno tardío viral (p. ej., B8R).

- 30 El nivel de respuesta de las células T CD8 se puede determinar, por ejemplo, mediante la recopilación de aproximadamente 100-120 µl de sangre en tampón FACS/heparina. Las PBMC pueden prepararse lisando eritrocitos con tampón de lisis RBC. Las PBMC pueden teñirse conjuntamente entonces en una reacción única para células T CD8 específicas para OVA y B8R utilizando un anti-CD8α-FITC, CD44-PerCPy5.5 y dextrámeros de MHC de clase I complejados con sus respectivos péptidos de unión a H-2Kb, SIINFEKL (SEQ ID NO: 4) o TSYKFESV (SEQ ID NO: 5). El MHC de clase I, dextrámero SIINFEKL (SEQ ID NO: 4) se puede marcar con PE y el dextrámero TSYKFESV (SEQ ID NO: 5) con APC. Las células teñidas se pueden analizar mediante citometría de flujo en un sistema BD LSR II de BD Biosciences. Se pueden adquirir diez mil células T CD8+ por muestra.

- 35 Alternativamente, el nivel de respuesta de las células T CD8 se puede determinar mediante la toma de sangre de un mamífero inmunizado, preferiblemente un ser humano, y la separación de células mononucleares de la sangre periférica (PBMC). Estos se pueden resuspender en medio de crecimiento que contiene 5 µg/ml de brefeldina A (BFA, "GolgiPlug", BD Biosciences) con 1 µM de péptidos de ensayo, incluyendo péptidos contra epítopos inmunodominantes de MVA (es decir, TSYKFESV; SEQ ID NO: 5) ("B8R") y péptidos derivados del neoantígeno expresado. Las PBMC se pueden incubar entonces durante 5 h a 37°C en 5% de CO₂, recolectar, resuspender en 3 ml de PBS frío/FCS al 10%/EDTA 2 mM y almacenar durante la noche a 4°C. Al día siguiente, las PBMC pueden teñirse con anticuerpos anti-CD8a-Pac-Blue (clon 53-6.7), anti-CD62L-PE-Cy7, anti-CD44-APC-Alexa 750 y anti-CD4-PerCP-Cy5.5 (todos los anticuerpos de BD Biosciences). Las PBMC se pueden incubar con diluciones apropiadas de los anticuerpos indicados durante 30 min a 4°C en la oscuridad. Después del lavado, las células se pueden fijar y permeabilizar utilizando el kit Cytofix/Cytoperm™ Plus (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las PBMC pueden teñirse para interferón γ (IFN-γ) intracelular utilizando un anticuerpo anti-IFN-γ conjugado con FITC (BD Biosciences) diluido en tampón perm/lavado (BD Biosciences). Las células teñidas se pueden analizar mediante citometría de flujo.

- 50 Inmunizaciones con el MVA recombinante de la invención pueden inducir una respuesta contundente de los anticuerpos. Las respuestas de los anticuerpos se pueden medir por ELISA.

En el contexto de esta invención, una "respuesta contundente de las células T CD8" significa un alto porcentaje de células de T CD8 específicas para el neoantígeno que el porcentaje generado con la misma construcción de MVA que contiene el promotor PrS (5'AAAAATTGAAATTTTATTTTTTTTTTTTGGGAATATAA 3'; SEQ ID NO: 6) después de una única inmunización. En algunas realizaciones, la respuesta de células T CD8 demuestra al menos 1,5 veces o 2 veces

más células T CD8 específicas para el neoantígeno que la generada con la misma construcción de MVA que contiene el promotor PrS (SEQ ID NO: 6) después de una única inmunización.

En el contexto de esta invención, una "respuesta contundente de anticuerpos" significa un título de anticuerpos que es mayor que el título de anticuerpos obtenido con la misma construcción de MVA que contiene el promotor PrS (SEQ ID NO: 6) después de una única inmunización. En algunas realizaciones, el título de anticuerpo es al menos 1,5 veces o 2 veces mayor que el título de anticuerpos obtenido con la misma construcción de MVA que contiene el promotor PrS (SEQ ID NO: 6) después de una única inmunización.

El que un MVA recombinantes induzca una "respuesta contundente de células T CD8" o una "respuesta contundente de anticuerpos" contra un neoantígeno se puede determinar tal como se describe en los ejemplos de esta memoria. Por ejemplo, MVA13.5 corto y MVA13.5 largo inducen ambos una "respuesta contundente de células T CD8" tal como se define en esta memoria. MVA13.5 largo induce una "respuesta contundente de anticuerpos" tal como se define en esta memoria.

Aunque el método comprende preferiblemente una única administración del vector, en algunas realizaciones, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o más inmunizaciones de un MVA recombinante se puede administrar al mamífero, preferiblemente un ser humano.

En realizaciones preferidas, el antígeno codificado es un antígeno bacteriano, viral o de tumor. Preferiblemente, el antígeno es un antígeno extraño para el mamífero, incluyendo un ser humano.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Generación de recombinantes de MVA

Células HeLa se infectaron con MVA-BN a una MOI (multiplicidad de infección) de 10 (10 TCID₅₀ por célula) y el ARN total se preparó 2 y 8 horas después de la infección. Se generaron cebadores específicos para diversos ORF de MVA y se utilizó RACE-PCR (kit FirstChoice® RLM-RACE, Life Technologies, Darmstadt, Alemania) para generar productos de PCR representativos de los ARN de MVA que codifican estos ORF. Los productos de la PCR se secuenciaron para identificar los sitios de inicio de la transcripción. En base a esta información, se identificaron promotores para los ARN que codifican estos ORF. Los promotores de MVA para los siguientes ORF se insertaron en construcciones de MVA (Baur et al., Journal of Virology, Vol. 84 (17): 8743-8752 (2010)) para impulsar la expresión del gen de ovoalbúmina (OVA): MVA13.5 (CVA022; WR 018), MVA050L (E3L; WR 059), MVA022L (K1L; WR 032) y MVA170R (B3R; WR 185).

Ejemplo 2. Niveles de expresión de ARN dependientes del promotor *in vitro*

La infección de células Hela con virus recombinantes de MVA a una MOI de 10 se realizó utilizando la fijación del virus frío en hielo durante 1 h. Después de la fijación, las células se lavaron y se recogió el punto de tiempo de cero horas (0 h) o las células se incubaron a 37°C para la recogida de otros puntos de tiempo. Las muestras se recogieron a 0,5, 1, 2, 4 y 8 h p.i. Las células se homogeneizaron y se extrajo el ARN total. El ARN se digirió con ADNsa y el ADNc se sintetizó utilizando cebado oligo(dT). Las preparaciones de ADNc resultantes se utilizaron como molde en una reacción qPCR basada en Taqman para la amplificación simultánea de ADNc de OVA y actina. Las muestras se procesaron en un cicladador AB7500 de Applied Biosystem. Los resultados se muestran en la Figura 3.

Ejemplo 3. Niveles de expresión de proteínas dependientes del promotor *in vitro*

Células HeLa se cultivaron en DMEM con FCS al 10%. Células HeLa se infectaron con una MOI de 10 (10 TCID₅₀ por célula) del virus MVA recombinante. Las células infectadas se recogieron a 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h p.i., se fijaron y se permeabilizaron. Para cada una de las muestras, la mitad de las células se tiñeron para la proteína OVA utilizando un anticuerpo OVA anti-pollo de conejo y la otra mitad se tiñeron para antígenos MVA utilizando un anticuerpo policlonal anti-VACV de conejo. Las muestras se analizaron utilizando un analizador de citometría de flujo FACS-Calibur (BD Biosciences) y el software FlowJo. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Ejemplo 4. Inmunizaciones y sangrados de ratones

Se utilizaron grupos de ratones (C57/Bl6) para el estudio. Cada uno de los grupos recibió un total de tres inmunizaciones. Un grupo al que se inyectó PBS sirvió como control para las respuestas inmunes. Se extrajo sangre a través de la vena de la cola para analizar las respuestas inmunitarias durante todo el estudio.

Los ratones fueron inmunizados i.p. con 10^8 TCID₅₀ de los respectivos virus MVA diluidos en PBS (300 µL, volumen total) en las semanas 0, 4 y 8. Se realizaron sangrados para el análisis de células T una semana después de cada una de las inmunizaciones y se realizaron sangrados para el análisis de anticuerpos tres semanas después de cada una de las inmunizaciones

5 Ejemplo 5. Tinción de células T y detección de anticuerpos

Aproximadamente 100-120 µl de sangre por ratón se recogió en tampón FACS/heparina. Las PBMC se prepararon lisando eritrocitos con tampón de lisis RBC. Las PBMC se tiñeron luego conjuntamente en una reacción única para células T CD8 específicas para OVA y B8R utilizando un anti-CD8α-FITC, CD44-PerCPCy5.5 y dextrámeros de MHC de clase I complejados con sus respectivos péptidos de unión a H-2Kb, SIINFEKL (SEQ ID NO: 4) o TSYKFESV (SEQ ID NO: 5). El dextrámero SIINFEKL-MHC de clase I (SEQ ID NO: 4) se marcó con PE y el dextrámero TSYKFESV (SEQ ID NO: 5) con APC. Las células teñidas se analizaron por citometría de flujo en un sistema BD LSR II de BD Biosciences. Se adquirieron diez mil células T CD8+ por muestra. Los resultados se muestran en las Figuras 5-6.

Se preparó suero de sangre entera. Se realizaron ELISA para ovoalbúmina y ELISA para MVA para detectar anticuerpos específicos (kit Serazym de Seramun Diagnostika GmbH, Heidesee, Alemania). Los resultados se muestran en la Figura 7.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BAVARIAN NORDIC A/S

<120> PROMOTOR PR13.5 PARA RESPUESTAS CONTUNDENTES DE CÉLULAS T Y ANTICUERPOS

<130> BN83PCT

20 <150> 61 / 719,429

<151> 28-10-2012

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

25 <211> 44

<212> ADN

<213> virus de vaccinia

<400> 1

taaaaataga aactataatc atataatagt gtaggttggt agta 44

30 <210> 2

<211> 123

<212> ADN

<213> virus de vaccinia

<400> 2

taaaaataga aactataatc atataatagt gtaggttggt agtattgctc ttgtgactag 60

agacttttagt taggtactgt aaaaatagaa actataatca tataatagtg taggttggtgta 120

35 gta 123

<210> 3

<211> 273

<212> ADN

<213> virus de vaccinia

40 <400> 3

tagacgacat gatagaggag gtatccattg acgataatcg tttatcaaca ctaccgttag 60

aaattagaca ttgtattttc tcgtacgcgt tcctataaaa atagaaacta taatcatata 120

atagtgtagg ttggtagtat tgctcttggtg actagagact ttagttaagg tactgtaaaa 180

atagaaacta taatcatata atagtgtagg ttggtagtag ggtactcgtg attaatrtta 240

ttgttaaact tgtccttaag tcttattaat atg 273

ES 2 800 623 T3

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Péptido de OVA
 <400> 4
 Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
 1 5
 10 <210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido de B8R
 15 <400> 5
 Thr Ser Tyr Lys Phe Glu Ser Val
 1 5
 <210> 6
 <211> 37
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Promotor sintético
 <400> 6
 aaaaattgaa attttatttt ttttttgg aatataa 37
 25 <210> 7
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Promotor sintético
 <400> 7
 aatttttaaat atataa 16

REIVINDICACIONES

1. Un virus de vaccinia Ankara modificado (MVA) recombinante para uso en la inducción de una respuesta contundente de células T CD8 contra un neoantígeno en un ser humano, que comprende administrar una o más administraciones de dicho virus de vaccinia Ankara modificado (MVA) recombinante al ser humano;
- 5 en donde el MVA recombinante comprende un promotor Pr13.5 enlazado operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica el neoantígeno,
en donde el promotor Pr13.5 comprende al menos 1 copia de una secuencia de ácido nucleico de al menos 40 bases que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, y al menos 1 copia de una segunda secuencia de nucleótidos de al menos 31 nucleótidos que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, y
- 10 en donde dicho promotor genera al menos 1,5 veces más células T CD8 específicas para el neoantígeno que las que se generan con una construcción de MVA correspondiente en la que el promotor ha sido reemplazado por el promotor PrS definido por la SEQ ID NO: 6 después de una única inmunización.
2. El MVA para uso de la reivindicación 1, en donde el promotor Pr13.5 comprende al menos 2 copias de una secuencia de ácido nucleico de al menos 40 bases que tienen al menos 98% de identidad con SEQ ID NO: 1.
- 15 3. El MVA para uso de las reivindicaciones 1-2, en donde el promotor Pr13.5 comprende al menos 2 copias de una secuencia de ácido nucleico de al menos 40 bases que tienen una identidad de 100% con SEQ ID NO: 1.
4. El MVA para uso de la reivindicación 1, en donde el promotor Pr13.5 comprende 2 copias de una secuencia de nucleótidos de al menos 40 nucleótidos que tiene una identidad de 100% con SEQ ID NO: 1.
- 20 5. El MVA para uso de la reivindicación 1, en donde el promotor Pr13.5 comprende los nucleótidos 15878-15755 en la Figura 1.
6. Un virus de vaccinia Ankara modificado (MVA) recombinante que comprende un promotor Pr13.5 enlazado operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un neoantígeno,
en donde el promotor Pr13.5 comprende al menos 1 copia de una secuencia de ácido nucleico de al menos 40 bases que tienen al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, y al menos 1 copia de una segunda secuencia de nucleótidos de al menos 31 nucleótidos que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, y
- 25 en donde dicho promotor genera al menos 1,5 veces más células T CD8 específicas para el neoantígeno que las que se generan con una construcción de MVA correspondiente en la que el promotor ha sido reemplazado por el promotor PrS definido por SEQ ID NO: 6 después de una única inmunización.
7. El MVA recombinante de la reivindicación 6, en donde el promotor Pr13.5 comprende al menos 2 copias de una secuencia de ácido nucleico de al menos 40 bases que tienen al menos un 98% de identidad con SEQ ID NO: 1.
- 30 8. El MVA recombinante de las reivindicaciones 6-7, en donde el promotor Pr13.5 comprende al menos 2 copias de una secuencia de ácido nucleico de al menos 40 bases que tienen una identidad de 100% con SEQ ID NO: 1.
9. El MVA recombinante de la reivindicación 6, en donde el promotor Pr13.5 comprende 2 copias de una secuencia de nucleótidos de al menos 40 nucleótidos que tiene una identidad de 100% con SEQ ID NO: 1.
- 35 10. El MVA recombinante de la reivindicación 6, en donde el promotor Pr13.5 comprende los nucleótidos 15878-15755 en la Figura 1.



Figura 1

15973 TAGNCGCAT GNTAGAGGAG GTATCCATTG ACGATAATCG TTATCAACA CTACCGTTAG AATATGACA TTGATTTTC TCGTACGGGT TCCTATAAA

15873 ATAGAACTA TATCATATA ATAGTGTAGG TTGGTAGTAT TCTCTTTTG ACTAGAGACT TTAGTDTAGG TACTATATA ATAGAACTA TATCATATA

Pr13.5-largo

Pr13.5-corto

15773 ATAGTGTAGG TTGGTAGTAT GGTACTCGTG ATTAATTTA TTGTTAACT TGTCTTAAAG TCTTATTAAT ATG

Figura 2

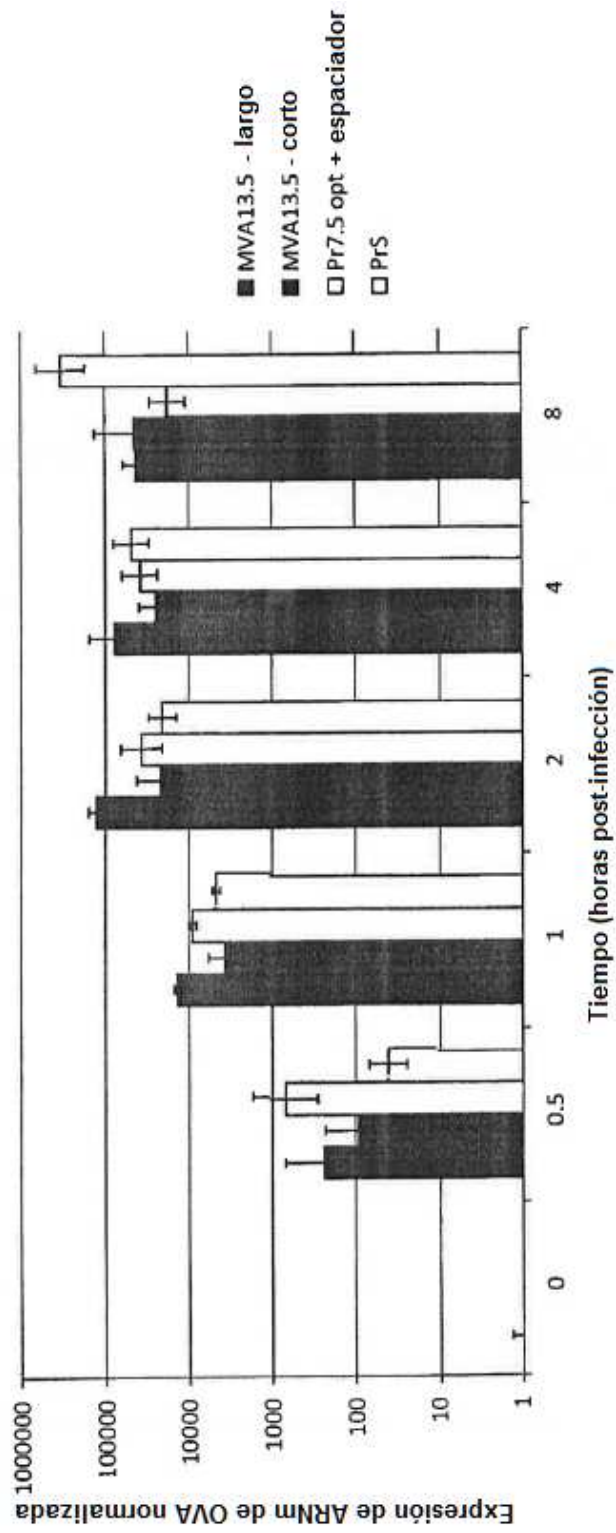


Figura 3

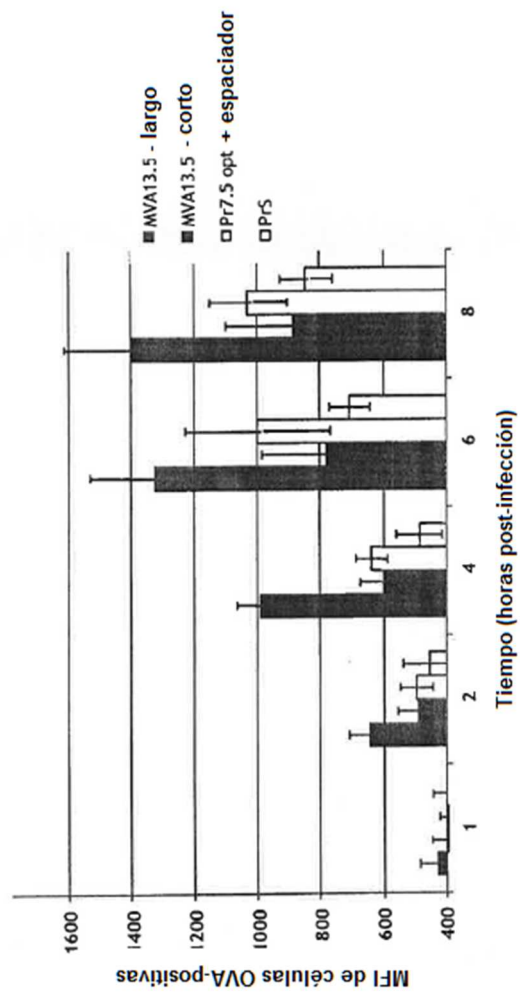


FIGURA 4

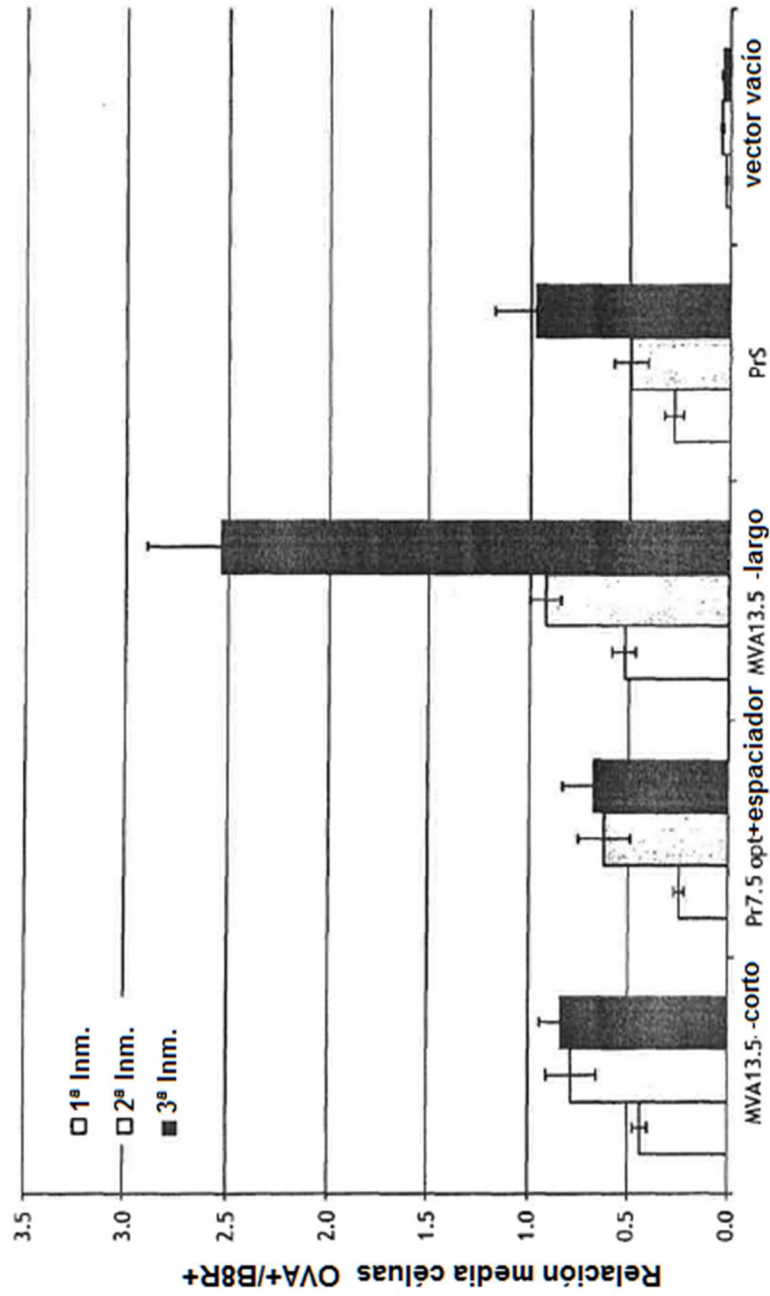


Figura 5

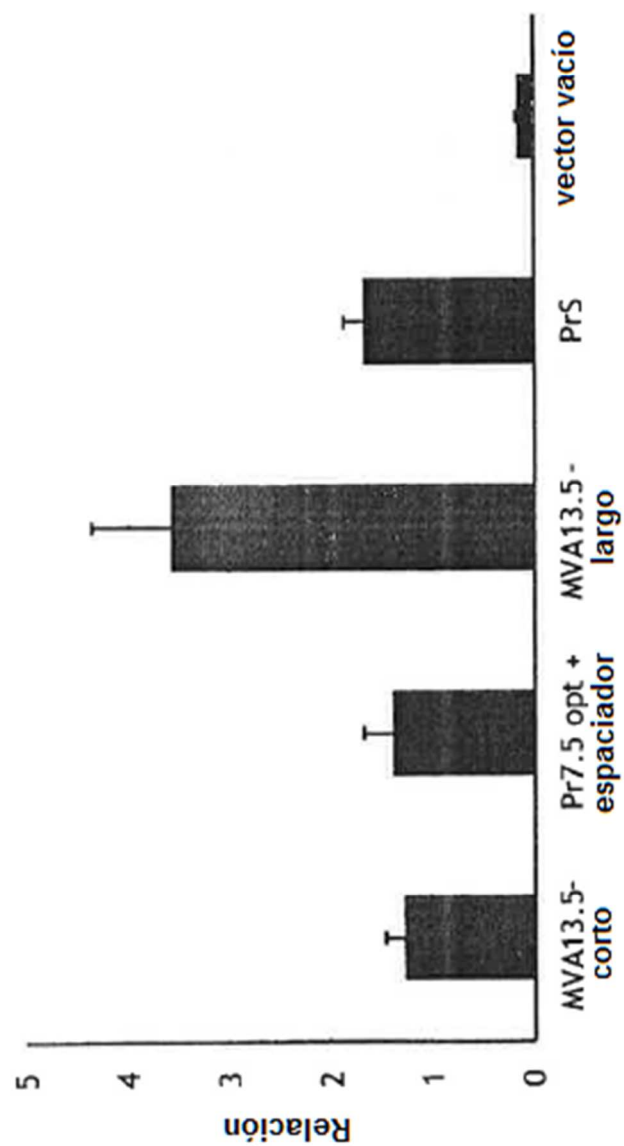


Figura 6

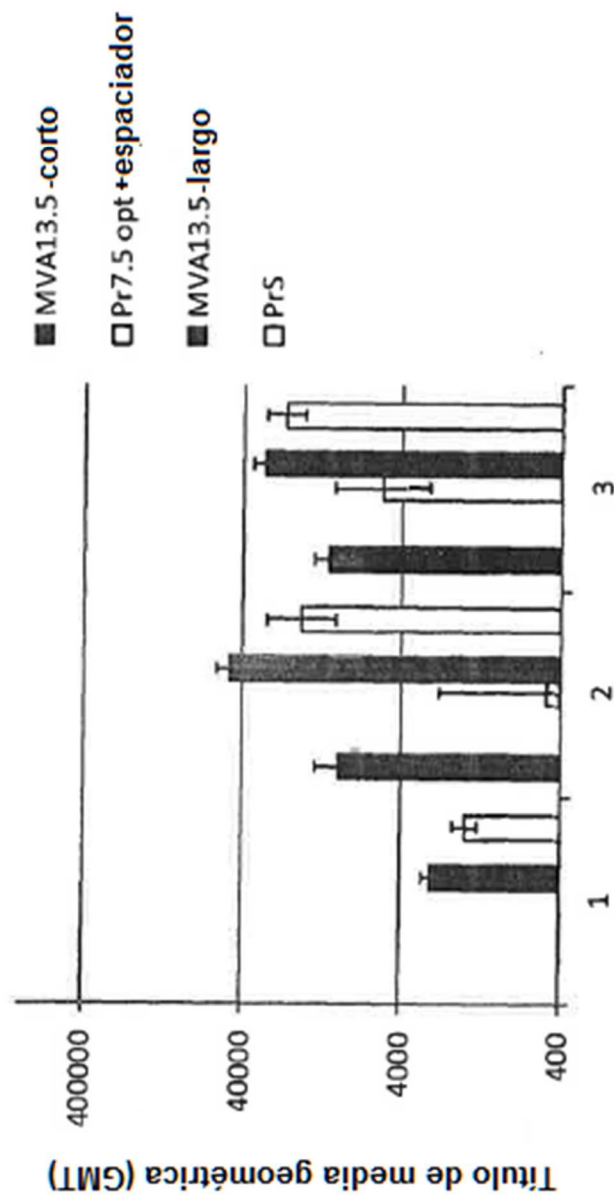


Figura 7A

Promotor	Múltiplo sobre PrS		
	1ª Inmunización	2ª Inmunización	3ª Inmunización
PrS	1.0	1.0	1.0
Pr13.5-corto	0.1	0.6	0.5
Pr13.5-largo	1.6	2.8	1.3
Pr7.5 opt +espaciador	0.0	0.0	0.2
MVA50L + PrSSL	0.1	0.2	0.1
MVA170 + PrSSL	0.0	0.8	0.5

Figura 7B

Consulta	1	TAAAAATAGAACTATAATCATATAATAGTGTAGGTTGGTAGTA	44
383866716	20492		20449
383866716	20410		20369
373449558	15874		15831
373449558	15954		15911
373449318	15878		15835
373449318	15958		15915
373449318	182742		182785
373449318	182822		182865
373449076	15864		15821
373449076	15944		15901
373449076	182666		182709
373449076	182746		182789
373448847	15961		15918
373448847	16041		15998
373448604	15956		15913
373448604	16036		15993
373448604	182785		182828
373448604	182865		182908
373448367	15865		15822
373448367	15945		15902
373448367	182603		182646
373448367	182683		182726
373448133	15832		15789
373448133	15912		15869
373447891	15957		15914
373447891	16037		15994
373447891	182788		182831
373447891	182868		182911
373447653	15866		15823
373447653	15946		15903
373447653	182609		182652
373447653	182689		182732
373447414	15833		15790
373447414	15913		15870
373447414	182552		182595
373447414	182632		182675
373447175	15860		15817
373447175	15940		15897
373447175	182579		182622
373447175	182659		182702
325558812	28969		28926
325558812	28889	T.....	28847
325558595	30006		29963
325558595	29924		29884
325558381	27900		27857
325558381	27817	C.....	27777
325558165	30228		30185
325558165	30148	T.....	30106
325557951	27554		27511
325557951	27472	C.....	27432
167412463	12323		12280
167412463	12403		12360

FIGURA 8A

160857876	13468		13425
160857876	13548		13505
149786253	9445		9402
149786253	9525		9482
119352440	15780		15737
119352440	15860		15817
90819652	18373		18330
90819652	18453		18410
115607420	9159		9116
115607420	9239		9196
115607419	9159		9116
115607419	9239		9196
115607418	9359		9316
115607418	9439		9396
115607417	9359		9316
115607417	9439		9396
111184167	24167		24124
111184167	24247	T.....	24204
109726482	7441		7398
109726482	7517		7474
109726279	7443		7400
109726279	7519		7476
109726076	7652		7609
109726076	7728		7685
109725872	7441		7398
109725872	7517		7474
109725669	7441		7398
109725669	7517		7474
109725465	7441		7398
109725465	7517		7474
109725262	7511		7468
109725262	7587		7544
109725056	7650		7607
109725056	7726		7683
109724854	7371		7328
109724854	7447		7404
109724650	7785		7742
109724650	7861		7810
109724445	7649		7606
109724445	7725		7682
109724243	7579		7536
109724243	7655		7612
109724039	7441		7398
109724039	7517		7474
94490104	7441		7398
94490104	7517		7474
94489896	7422		7379
94489896	7498		7455
94489695	7441		7398
94489695	7517		7474
94489496	7441		7398
94489496	7517		7474

FIGURA 8B

<u>94489293</u>	7372		7329
<u>94489293</u>	7448		7405
<u>94489094</u>	7581		7538
<u>94489094</u>	7657		7614
<u>94488894</u>	7443		7400
<u>94488894</u>	7519		7476
<u>94488693</u>	7722		7679
<u>94488693</u>	7798		7755
<u>94488492</u>	7653		7610
<u>94488492</u>	7729		7686
<u>94488292</u>	6666		6623
<u>94488292</u>	6742		6699
<u>94488092</u>	6666		6623
<u>94488092</u>	6742		6699
<u>94487887</u>	7441		7398
<u>94487887</u>	7517		7474
<u>94487685</u>	7444		7401
<u>94487685</u>	7520		7477
<u>94487484</u>	7443		7400
<u>94487484</u>	7519		7476
<u>94487278</u>	7449		7406
<u>94487278</u>	7373	 A	7330
<u>94487078</u>	7442		7399
<u>94487078</u>	7518		7475
<u>94486875</u>	7579		7536
<u>94486875</u>	7655		7612
<u>94486673</u>	7430		7387
<u>94486673</u>	7507		7463
<u>94486471</u>	7431		7388
<u>94486471</u>	7508		7464
<u>94486268</u>	7442		7399
<u>94486268</u>	7519		7475
<u>94486065</u>	7442		7399
<u>94486065</u>	7519		7475
<u>94485863</u>	7441		7398
<u>94485863</u>	7517		7474
<u>94485659</u>	7441		7398
<u>94485659</u>	7517		7474
<u>94485457</u>	7863		7820
<u>94485457</u>	7939		7896

FIGURA 8C

94485254	7863		7820
94485254	7939		7896
94485053	7648		7605
94485053	7724		7681
94484855	7648		7605
94484855	7724		7681
94484657	7648		7605
94484657	7724		7681
94484460	7648		7605
94484460	7724		7681
94484252	7422		7379
94484252	7498		7455
94484050	7450		7407
94484050	7526		7483
94483847	7450		7407
94483847	7526		7483
94483641	7510		7467
94483641	7586		7543
90660453	12795		12752
90660453	12719	T.....	12677
90660233	28919		28876
90660233	28837		28797
38348858	16052		16009
38348858	16132		16089
38348858	182942		182985
38348858	183022		183065
37551435	16065		16022
37551435	16145		16102
88900616	18618		18575
88900616	18698		18655
88900616	185511		185554
88900616	185591		185634
44971363	17722		17679
44971363	17802		17759
47088326	10008		9965
47088326	10088		10045
56713341	15689		15646
56713341	15769		15726
56713625	15689		15646
56713625	15769		15726
56713624	15612		15569
56713624	15692		15649
18482913	15989		15946
18482913	15911	T.....	15869
22123748	22960		22917
22123748	22878	-G.....	22837
19717929	14304		14261
19717929	14226	T.....	14184
2772662	15798		15755
2772662	15878		15835
29692106	13086		13043
29692106	13166		13123

FIGURA 8D

<u>5830555</u>	6996		6953
<u>5830555</u>	7072		7029
<u>885796</u>	7223		7180
<u>885796</u>	7299		7256
<u>885724</u>	6996		6953
<u>885724</u>	7072		7029
<u>885686</u>	7012		6969
<u>885686</u>	7088		7045
<u>456758</u>	6964		6921
<u>456758</u>	7040		6997
<u>6969640</u>	12632		12589
<u>6969640</u>	12712		12669
<u>623595</u>	7664		7621
<u>623595</u>	7740		7697
<u>335691</u>	3950		3907
<u>335691</u>	4030		3987
<u>335317</u>	16234		16191
<u>335317</u>	16154		16119
<u>325559026</u>	27934	A.....	27891
<u>325559026</u>	27854		27813
<u>325514012</u>	27520	C.....	27477
<u>325514012</u>	27600		27559
<u>325559238</u>	28458		28418
<u>325559238</u>	28540	A.....	28500
<u>30795158</u>	29579		29539
<u>30795158</u>	29661	A.....	29621
<u>325557737</u>	28302	C.....	28260
<u>325557737</u>	28382		28343
<u>68449479</u>	15249	C.....	15206
<u>68449479</u>	15169		15154
<u>68449280</u>	15746	C.....	15703
<u>68449280</u>	15666		15651
<u>68448677</u>	15249	C.....	15206
<u>68448677</u>	15169		15154
<u>59858806</u>	15322	C.....	15279
<u>59858806</u>	15242		15227
<u>58220470</u>	14913	C.....	14870
<u>58220470</u>	14833		14818
<u>51342166</u>	15076	C.....	15033
<u>51342166</u>	14996		14981
<u>30519405</u>	29201	C.....	29159
<u>30519405</u>	29282		29243
<u>323098609</u>	13319		13289
<u>323098609</u>	13398		13356
<u>323098410</u>	13348		13318
<u>323098410</u>	13427		13385
<u>300872625</u>	13482		13452
<u>300872625</u>	13561		13519
<u>56236951</u>	7856		7826
<u>56236951</u>	7935		7893
<u>68449077</u>	13480		13450
<u>68449077</u>	13559		13517

FIGURA 8E

<u>68448876</u>	13500		13470
<u>68448876</u>	13579		13537
<u>17529780</u>	13356		13326
<u>17529780</u>	13435		13393

FIGURA 8F

gi 383866716 JQ410350.1	Colección de cultivo del virus Estromelia ATCC:VR-1431, genoma completo
gi 373449558 JN654986.1	Cepa del virus de vaccinia Dryvax clon DPP21, genoma completo
gi 373449318 JN654985.1	Cepa del virus de vaccinia Dryvax clon DPP20, genoma completo
gi 373449076 JN654984.1	Cepa del virus de vaccinia Dryvax clon DPP19, genoma completo
gi 373448847 JN654983.1	Cepa del virus de vaccinia Dryvax clon DPP17, genoma completo
gi 373448604 JN654982.1	Cepa del virus de vaccinia Dryvax clon DPP16, genoma completo
gi 373448367 JN654981.1	Cepa del virus de vaccinia Dryvax clon DPP15, genoma completo
gi 373448133 JN654980.1	Cepa del virus de vaccinia Dryvax clon DPP13, genoma completo
gi 373447891 JN654979.1	Cepa del virus de vaccinia Dryvax clon DPP12, genoma completo
gi 373447653 JN654978.1	Cepa del virus de vaccinia Dryvax clon DPP11, genoma completo
gi 373447414 JN654977.1	Cepa del virus de vaccinia Dryvax clon DPP10, genoma completo
gi 373447175 JN654976.1	Cepa del virus de vaccinia Dryvax clon DPP9, genoma completo
gi 325558812 HQ420898.1	Cepa virus de viruela de la vaca Alemania_2002_MKY, genoma completo
gi 325558595 HQ420897.1	Cepa virus de viruela de la vaca Alemania_1998_2, genoma completo
gi 325558381 HQ420896.1	Cepa virus de viruela de la vaca Alemania_1990_2, genoma completo
gi 325558165 HQ420895.1	Cepa virus de viruela de la vaca Alemania_1980_EP4, genoma completo
gi 325557951 HQ420894.1	Cepa virus de viruela de la vaca Francia_2001_Nancy, genoma completo
gi 167412463 EU410304.1	Virus de vaccinia GLV-1h68, genoma completo
gi 160857876 AM501482.1	Cepa del virus de vaccinia de Ankara virus de vaccinia corioalantoidea Ankara (CVA), genoma codificante completo
gi 149786253 EF675191.1	Cepa de virus de vaccinia MVATGN33.1 Virus Ankara Modificado, genoma completo
gi 119352440 DQ121394.1	Cepa de virus de vaccinia Lister clon VACV107, genoma completo
gi 90819652 DQ439815.1	Cepa de virus de vaccinia DUKE, genoma completo
gi 115607420 DQ983239.1	Cepa de virus de vaccinia AGR-MVA-572 secuencia pre-genómica
gi 115607419 DQ983238.1	Cepa de virus de vaccinia MVA-BN secuencia genómica
gi 115607418 DQ983237.1	Cepa de virus de vaccinia MVA-572 secuencia genómica
gi 115607417 DQ983236.1	Cepa de virus de vaccinia MVA-1721 secuencia genómica
gi 111184167 DQ792504.1	Aislado de virus de viruela del caballo MNR-76, genoma completo
gi 109726482 DQ437592.1	Cepa de virus de variola Siria 1972 V70-199, genoma completo
gi 109726279 DQ437591.1	Cepa de virus de variola Sumatra 1970 V70-222, genoma completo
gi 109726076 DQ437590.1	Cepa de virus de variola Somalia 1977, genoma completo
gi 109725872 DQ437589.1	Cepa de virus de variola Pakistan 1969 (Rafiq Lahore), genoma completo
gi 109725669 DQ437588.1	Cepa de virus de variola Nepal 1973, genoma completo
gi 109725465 DQ437587.1	Cepa de virus de variola Iran 1972 2602 Tabriz, genoma completo
gi 109725262 DQ437586.1	Cepa de virus de variola India 1964 7125 Vellore, genoma completo

FIGURA 9A

gi 109725056 DQ437585.1	Cepa de virus de variola India 1964 7124 Vellore, genoma completo
gi 109724854 DQ437584.1	Cepa de virus de variola Alemania 1958 Heidelberg, genoma completo
gi 109724650 DQ437583.1	Cepa de virus de variola Congo 1970, genoma completo
gi 109724445 DQ437582.1	Cepa de virus de variola Cuerno de China 1948, genoma completo
gi 109724243 DQ437581.1	Cepa de virus de variola Bangladesh 1975 v 75-550 Banu, genoma completo
gi 109724039 DQ437580.1	Cepa de virus de variola Afganistán 1970 Variolator 4, genoma completo
gi 944890104 DQ441448.1	Cepa de virus de variola Yugoslavia 1972 V72-164, genoma completo
gi 94489896 DQ441447.1	Cepa de virus de variola Reino Unido 1952 Butler, genoma completo
gi 94489695 DQ441446.1	Cepa de virus de variola Reino Unido 1947 Higgins (Staffordshire), genoma completo
gi 94489496 DQ441445.1	Cepa de virus de variola Reino Unido 1946 Hinden (Middlesex), genoma completo
gi 94489293 DQ441444.1	Cepa de virus de variola Reino Unido 1946 Harvey, genoma completo
gi 94489094 DQ441443.1	Cepa de virus de variola Tanzanía 1965 kembula, genoma completo
gi 94488894 DQ441442.1	Cepa de virus de variola Sumatra 1970 V70-228, genoma completo
gi 94488693 DQ441441.1	Cepa de virus de variola Sudán 1947 (Rumbec), genoma completo
gi 94488492 DQ441440.1	Cepa de virus de variola Sudán 1947 (Juba), genoma completo
gi 94488292 DQ441439.1	Cepa de virus de variola Somalia 1977 (V77-1605), genoma completo
gi 94488092 DQ441438.1	Cepa de virus de variola Somalia 1977 (V77-1252), genoma completo
gi 94487887 DQ441437.1	Cepa de virus de variola Sierra Leona 1969 (V68-258), genoma completo
gi 94487685 DQ441436.1	Cepa de virus de variola Sudáfrica 1965 (103 Tvaal, Nelspruit), genoma completo
gi 94487484 DQ441435.1	Cepa de virus de variola Sudáfrica 1965 (102 Natal, Ingwavuma), genoma completo
gi 94487278 DQ441434.1	Cepa de virus de variola Niger 1969 (001, importación de Nigeria), genoma completo
gi 94487078 DQ441433.1	Cepa de virus de variola Kuwait 1967 (K1629), genoma completo
gi 94486875 DQ441432.1	Cepa de virus de variola Corea 1947 (Lee, Masterseed), genoma completo
gi 94486673 DQ441431.1	Cepa de virus de variola Japón 1951 (Stillwell, Masterseed), genoma completo
gi 94486471 DQ441430.1	Cepa de virus de variola Japón 1951 (Harper, Masterseed), genoma completo
gi 94486268 DQ441429.1	Cepa de virus de variola Japón 1946 (Yamada MS-2(A) Tokio), genoma completo
gi 94486065 DQ441428.1	Cepa de virus de variola India 1953 (Nueva Deli), genoma completo
gi 94485863 DQ441427.1	Cepa de virus de variola India 1953 (Kali-Muthu-M50 Madras), genoma completo

FIGURA 9B

gi 94485659 DQ441426.1	Cepa de virus de variola Guinea 1969 (005), genoma completo
gi 94485457 DQ441425.1	Cepa de virus de variola Etiopía 1972 (Eth17 R14-1X-72, Addis), genoma completo
gi 94485254 DQ441424.1	Cepa de virus de variola Etiopía 1972 (Eth16 R14-1X-72, Addis), genoma completo
gi 94485053 DQ441423.1	Cepa de virus de variola Congo 9 1970 (v 74-227 Gispén), genoma completo
gi 94484855 DQ441422.1	Cepa de virus de variola Bangladesh 1974 (Solaiman), genoma completo
gi 94484657 DQ441421.1	Cepa de virus de variola Bangladesh 1974 (Shahzaman), genoma completo
gi 94484460 DQ441420.1	Cepa de virus de variola Bangladesh 1974 (nur islam), genoma completo
gi 94484252 DQ441419.1	Cepa de virus de variola Brasil 1966 (v66-39 Sao Paulo), genoma completo
gi 94484050 DQ441418.1	Cepa de virus de variola Botswana 1973 (v73-225), genoma completo
gi 94483847 DQ441417.1	Cepa de virus de variola Botswana 1972 (v72-143), genoma completo
gi 94483641 DQ441416.1	Cepa de virus de variola Benin, Dahomey, 1968 (v68-59), genoma completo
gi 90660453 DQ437594.1	Cepa de virus de viruela del jerrillo de la India Dahomey 1968, genoma completo
gi 90660233 DQ437593.1	Cepa de virus de viruela de la vaca Alemania 91-3, genoma completo
gi 38348858 AY313847.1	Cepa de virus de vaccinia Acambis clon 2000, genoma completo
gi 37551435 AY313848.1	Cepa de virus de vaccinia Acambis clon 3, genoma completo
gi 88900616 DQ377945.1	Cepa de virus de vaccinia 3737, genoma completo
gi 44971363 AY484669.1	Virus de viruela del conejo, genoma completo
gi 47088326 AY603355.1	Cepa de virus de vaccinia Acambis 3000 Virus de Ankara Modificado (MVA), genoma completo
gi 56713341 AY678275.1	Cepa de virus de vaccinia LC16m8, genoma completo
gi 56713625 AY678277.1	Cepa de virus de vaccinia LC16mO, genoma completo
gi 56713624 AY678276.1	Cepa de virus de vaccinia Lister, genoma completo
gi 18482913 AF438165.1	Cepa de virus de viruela del camello M-96 de Kazakhstan, genoma completo
gi 22123748 AF012825.2	Cepa de virus de Estromelia Moscú, genoma completo
gi 19717929 AY009089.1	Cepa de virus de viruela del camello CMS, genoma completo
gi 2772662 U94848.1	Cepa de virus de vaccinia Ankara, secuencia genómica completa
gi 29692106 AY243312.1	Virus de vaccinia WR, genoma completo
gi 5830555 Y16780.1	Virus menor de variola, genoma completo
gi 885796 U18340.1	Virus de variola Somalia 1977, región variable izquierda
gi 885724 U18338.1	Virus de variola Garcia-1966, región próxima-terminal izquierda
gi 885686 U18337.1	Virus de variola Congo-1965, región próxima-terminal izquierda
gi 456758 X69198.1	ADN del virus de variola, genoma completo
gi 6969640 AF095689.1	Virus de vaccinia (cepa Tian Tan), genoma completo
gi 623595 L22579.1	Virus mayor de variola (cepa Bangladesh-1975, genoma completo)

FIGURA 9C

<u>gij335691IM22812.1</u>	Virus de vaccinia genoma, extremo izquierda
<u>gij335317IM35027.1</u>	Virus de vaccinia Copenhagen, genoma completo
<u>gij325559026IHQ420899.1</u>	Cepa del virus de viruela de la vaca Noruega_1994_MAN, genoma completo
<u>gij325514012IHQ407377.1</u>	Cepa del virus de viruela de la vaca Austria 1999, genoma completo
<u>gij325559238IHQ420900.1</u>	Cepa del virus de viruela de la vaca RU2000_K2984, genoma completo
<u>gij30795158IAF482758.2</u>	Cepa del virus de viruela de la vaca Brighton Red, genoma completo
<u>gij325557737IHQ420893.1</u>	Cepa del virus de viruela de la vaca Finlandia_2000_MAN, genoma completo
<u>gij68449479IDQ011157.1</u>	Cepa del virus de viruela del mono USA_2003_039, genoma completo
<u>gij68449280IDQ011156.1</u>	Cepa del virus de viruela del mono Liberia_1970_184, genoma completo
<u>gij68448677IDQ011153.1</u>	Cepa del virus de viruela del mono USA_2003_044, genoma completo
<u>gij59858806IAY753185.1</u>	Cepa del virus de viruela del mono COP-58, genoma completo
<u>gij58220470IAY741551.1</u>	Aislado del virus de viruela del mono Sierra Leona, genoma completo
<u>gij51342166IAY603973.1</u>	Cepa del virus de viruela del mono MPXV-WRAIR7-61, genoma completo
<u>gij30519405IX94355.2</u>	Cepa del virus de viruela de la vaca GRI-90, genoma completo
<u>gij323098609IHQ857563.1</u>	Cepa del virus de viruela del mono D14L, inactivado, genoma completo
<u>gij323098410IHQ857562.1</u>	Cepa del virus de viruela del mono V79-I005, genoma completo
<u>gij300872625IIM172544.1</u>	Cepa del virus de viruela del mono Zaire 1979-I005, genoma completo
<u>gij56236951IAY743598.1</u>	Cepa del virus de viruela del mono Congo-8, parcial
<u>gij68449077IDQ011155.1</u>	Cepa del virus de viruela del mono Zaire_1979_005, genoma completo
<u>gij68448876IDQ011154.1</u>	Cepa del virus de viruela del mono Congo_2003_358, genoma completo
<u>gij17529780IAF380138.1</u>	Cepa del virus de viruela del mono Zaire-96-I-16, genoma completo

FIGURA 9D