

LOS POXVIRUS COMO VECTORES VIVOS: UNA PROMESA EN LA VACUNACIÓN

Dania Vázquez Blomquist

División de Vacunas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, apartado postal 6162, La Habana 10600, Cuba. Fax: (53-7) 218070, 336008; E-mail: carlos.duarte@cigb.edu cu

ABSTRACT

Vaccination against smallpox was the beginning of the use of poxviruses as live vectors. The first works in the molecular biology of vaccinia appeared in the 80's. Since that date many poxviruses have been used for vaccination of animals against different infectious diseases. In many cases, the vaccination with recombinant poxviruses conferred protection against diseases. Nevertheless, the complications and side effects associated with vaccinia virus immunization led to the search of new variants of poxviruses such as, attenuated vaccinia and avipoxviruses. The last ones, have a very restricted host range, so they do not replicate in mammals but the antigens can be expressed at early steps of the life circle and induce an immune response. NYVAC (derivative of vaccinia) and ALVAC (derivative of canary pox) are two of the attenuated recombinants. They have demonstrated their security in preclinical assays, so phase I trials in humans have already begun. Until now, ALVAC expressing antigens from the human immunodeficiency virus, is the immunogen with the best results in the induction of a CD8⁺ T cell response in immunized seronegative individuals. These recombinants have become in a promise for the fight against the acquired immunodeficiency syndrome.

Key words: poxviruses, vaccinia, ALVAC, NYVAC, HIV

Biotecnología Aplicada 1998;15:1-14

RESUMEN

El uso de los poxvirus en la vacunación contra la viruela humana, abrió el camino para su empleo como vectores vivos en la vacunación. El éxito del virus vaccinia, propició que en la década de los 80 comenzaran los trabajos de biología molecular con este virus. Así, surgieron diferentes recombinantes que expresaban antígenos de distintos agentes infecciosos. En muchos casos, la inoculación de estos recombinantes en animales de experimentación, confirió protección contra la enfermedad. Sin embargo, los efectos secundarios asociados a la vacunación con vaccinia, alentaron la búsqueda de variantes atenuadas de este virus y la utilización de los avipoxvirus en la vacunación. Estos últimos tienen un rango de hospedero restringido a células aviares y la replicación en mamíferos es abortiva, pero son capaces de expresar los antígenos en estadios tempranos del ciclo de vida, lo cual es suficiente para inducir la respuesta inmune contra los mismos. Entre los vectores atenuados se encuentran NYVAC (derivado de vaccinia) y ALVAC (proveniente de una cepa de viruela de canarios). El uso de estos recombinantes en ensayos preclínicos ha demostrado su seguridad y ha permitido la realización de ensayos clínicos en humanos. En especial, los recombinantes derivados de ALVAC, que expresan antígenos del virus de inmunodeficiencia humana, se han convertido en una promesa en la lucha contra el síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Palabras claves: poxvirus, vaccinia, ALVAC, NYVAC, VIH

Introducción

La viruela se consideró una enfermedad severa por más de 2 000 años, con una mortalidad entre un 20 y un 30 %. Aparentemente originada en la India o en el Asia occidental, se extendió poco a poco, hacia todo el mundo, y de este modo causó epidemias. La característica fundamental de esta enfermedad era la aparición de eritemas, que podían estar acompañados por fiebre, malestar y otros síntomas (1). Todas las personas eran susceptibles a la adquisición de la enfermedad, si bien la mortalidad era mayor en niños y personas de avanzada edad. En los sobrevivientes se presentaban secuelas, como marcas generalmente en la cara, y en pocos casos, ceguera.

Desde el siglo VI dñe los chinos trataron la viruela humana con la inoculación. No obstante, el primer

artículo publicado ("El tratamiento correcto de la viruela humana") le atribuye el mérito a una monja budista, practicante durante el reinado de Jen Tsung (1022-1063 dñe). Ella recomendaba la selección de costras con un mes de aparecidas y en lugares donde el clima es caliente, se recomendaban pústulas de 15 a 20 días. Estas costras se secaban y se unían con un tipo específico de planta. La mezcla obtenida, se introducía en la nariz de los pacientes con un tubo curvado de plata (2).

Otro texto médico chino (El espejo de oro de la medicina), enumera cuatro formas distintas de inoculación contra la viruela. Un siglo antes de Jenner, los chinos usaban pulgas blancas de las vacas para la prevención de la viruela (3). Las pulgas blancas se

crecían en un polvo y se hacían píldoras, lo cual quizás fue uno de los primeros intentos de inmunización oral.

En 1774, en Yeminstor, Inglaterra, un ordeñador de vacas llamado Benjamin Jesty, inmune a la viruela después de haber contraído la viruela de las vacas, inoculó a su esposa y dos hijos, a partir de vacas infectadas con la viruela para escapar de la epidemia humana. Gracias a este experimento se mantuvieron protegidos por 15 años (4). Más tarde, Jenner reconocería que esta experiencia de Jesty le sirvió de inspiración para sus trabajos.

Alrededor de esta fecha Edward Jenner, médico inglés, también observó casos similares de personas que eran protegidas de la viruela humana por previa exposición a la viruela vacuna. En una publicación en 1798 donde expone sus resultados plantea: "...lo que hace a la viruela vacuna tan extremadamente singular es que la persona que ha sido afectada por esta, está de por vida protegida de la infección con viruela humana; ni la exposición a secreciones contaminadas ni la inserción en la piel del material contaminante producen la enfermedad" (5).

En 1796, Jenner inoculó a un niño de 8 años, James Phipps, con el virus de la viruela vacuna aislado de la mano infectada de Sarah Nelmes, una ordeñadora (5). Jenner demostró que este niño fue resistente al reto con el virus de la viruela humana, lo cual fue corroborado por experimentos sucesivos. A partir de ese momento, se conoció este procedimiento como vacunación. Este procedimiento, a pesar de ser acogido inicialmente con temor, ha sido ampliamente aceptado. Durante los últimos 200 años la vacunación ha controlado nueve de las principales enfermedades, al menos en parte del mundo: la viruela, la difteria, el tétanos, la fiebre amarilla, la tosferina, la poliomielitis, el sarampión, la rubeola y las paperas. En el caso de la viruela se cumplió el sueño de la erradicación de la enfermedad.

El virus de la viruela vacuna fue sustituido posteriormente por el virus vaccinia (VV). Este virus produce una reacción más leve en el sitio de inoculación.

Jenner predijo la eliminación de la viruela humana con la práctica de la vacunación. De acuerdo con esta predicción, el último caso endémico de viruela ocurrió en 1977 (6) y ya en 1979, la Asamblea de la Organización Mundial de la Salud declaró la erradicación de la viruela humana y recomendó la eliminación de la vacunación contra su agente.

A principios de la década del 80 se empezó a aplicar con éxito la tecnología del ADN recombinante para el VV (7, 8). Este virus es la base actual de muchos de los vectores de expresión, candidatos vacunales, y en algunos casos vacunas contra agentes infecciosos heterólogos como la rabia, el sarampión, la encefalitis equina, entre otros (9, 10). El uso exitoso del VV recombinante extendió esta tecnología a otros poxvirus, los cuales han sido empleados en la vacunación de diferentes especies animales, contra distintas enfermedades infecciosas (11-13) (Tabla 1).

Tabla 1. Poxvirus utilizados como vectores en la vacunación.

Ortopoxvirus

- Vaccinia

Avipoxvirus (poxvirus que infectan especies aviares)

- Virus de la viruela aviar
- Virus de la viruela en canarios
- Virus de la viruela en palomas

Raccoonpoxvirus (poxvirus que infectan mapaches)

Capripoxvirus (poxvirus que infectan caprinos)

Suipoxvirus (poxvirus que infectan cerdos)

El objetivo de esta revisión es brindar una visión general del uso de los poxvirus como vectores vacunales contra diferentes enfermedades animales y humanas. También es su propósito exponer las direcciones fundamentales de las investigaciones en la actualidad. Se hace énfasis en la aplicación de los poxvirus en ensayos preclínicos y clínicos de diversas enfermedades y en especial el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Biología molecular de los poxvirus

La familia *Poxviridae* agrupa una serie de virus envueltos con un genoma de ADN de doble cadena, con replicación citoplasmática. Estos son los virus reconocidos como los de mayor genoma, entre 180 a 300 kb. El VV, prototipo del género *Ortopoxviridae*, fue el primer virus animal en ser visto microscópicamente, en ser multiplicado en cultivo de tejido, en ser titulado, purificado físicamente y analizado químicamente. Presenta una bicapa lipídica que rodea a un núcleo bicóncavo con dos cuerpos laterales, cuya función es discutida. Más recientemente, se ha planteado que estos cuerpos laterales aparecen como artefactos de la técnica usada para su visualización (Francisco Rodríguez, comunicación personal). Las formas extracelulares del virus tienen una bicapa lipídica adicional (14).

En el año 1990, apareció publicada la secuencia completa de los 191 kb de genoma de la cepa Copenhagen del virus, así como la función de muchos de sus genes (15). Entre las características más relevantes del genoma viral se encuentran la no presencia de intrones y el aprovechamiento al máximo del genoma, aunque es muy raro el solapamiento de los genes. Ambas cadenas codifican para proteínas y los extremos se encuentran unidos covalentemente por un lazo. Se ha podido definir que los genes esenciales para la sobrevivencia del virus se encuentran ubicados hacia el centro del genoma, mientras que hacia los extremos se ubican la mayoría de los genes no esenciales, como los que definen el rango de

hospedero. Tanto es así, que diferentes cepas del VV se pueden diferenciar por deleciones o inserciones que ocurren en los extremos del genoma.

El ciclo de vida del VV (14) comienza con la entrada viral y el desnudamiento primario del virus que da paso a la transcripción de los genes tempranos. Las proteínas que aparecen durante este tiempo son generalmente requeridas para pasos posteriores del ciclo de vida. Unas horas después el virus comienza a replicarse, y se "apaga" la transcripción de los genes tempranos, entonces comienza la transcripción de los genes tardíos que, en su mayoría, codifican para proteínas estructurales. Entre las 8 a 12 h ya empiezan a aparecer los primeros viriones, que permanecen intracelularmente o emergen de la membrana celular, para dar las formas extracelulares. Los mecanismos que regulan el paso de la transcripción de los genes tempranos a los genes tardíos, mediados por la replicación, no son bien conocidos. Se reconocen genes intermedios que se expresan un poco antes del comienzo de la replicación y existen algunos que se expresan durante todo el ciclo de vida.

Del estudio de estos genes, se han definido secuencias consenso para promotores tempranos y tardíos, lo cual ha permitido el diseño de promotores sintéticos capaces de provocar altos niveles de transcripción (16, 17). La definición de genes no esenciales y de regiones intergénicas ha sido también importante en la búsqueda de regiones de inserción en el genoma del VV (18).

En años más recientes, el estudio también se ha extendido a los miembros del género *Avipoxviridae*, que agrupa virus que infectan a las aves, y que tienen la ventaja potencial de tener un rango de hospedero restringido a células aviares, pues la replicación en mamíferos es abortiva. El virus de la Viruela Aviar (VVA) es el prototipo de este género. En muchos trabajos se han definido regiones genómicas del VVA con organización similar al VV (19-23) y en otros, se han encontrado segmentos con ciertas diferencias. Tal es el caso del gen de la timidínquinasa (TK) el cual está translocado a otra posición (24, 25). Se ha comprobado que es posible la transcripción de genes en el VVA bajo promotores del VV y viceversa, aunque puedan existir diferencias en cuanto a la eficiencia de la transcripción (26, 27).

Obtención de los vectores poxvirales

Para la obtención de poxvirus recombinantes generalmente se requiere de un plasmidio con una serie de elementos entre los que se encuentran (18):

- Un origen de replicación para bacterias y un gen marcador, que puede ser de resistencia a un antibiótico, un marcador metabólico o de otro tipo.
- Una región promotora insertada en el plasmidio que dirija la transcripción de los genes foráneos. Estos promotores deben ser originales

de poxvirus o sintéticos, con las regiones consenso reconocidas para la expresión temprana y/o la tardía.

- Un gen de interés clonado bajo el promotor de poxvirus con su ATG y sin intrones.
- Una señal de terminación de la transcripción de los genes tempranos en caso de usarse un promotor para la transcripción temprana.
- En algunos casos se puede usar un gen reportero bajo otro promotor de poxvirus, y a continuación del gen de interés, que permita la selección posterior de los recombinantes.
- Parte o toda una región no esencial, o intergénica en el genoma original que flanquee los elementos anteriores.

Después de tener un vector plasmídico con todos estos elementos, se transfectan las células con el plasmidio y se infectan con el poxvirus original, para que ocurra una doble recombinación homóloga *in vivo*, mediada por las regiones flanqueantes incluidas en el vector (Figura 1). Como resultado de la recombinación homóloga, la selección de los virus recombinantes, que portan el gen de interés insertado, se basa en la coexpresión del gen reportero, en la variación del tamaño de las placas, en el crecimiento en medios selectivos o en otras características, en dependencia del sistema escogido.

Esta vía ha sido la clásicamente utilizada para la obtención de los poxvirus recombinantes, si bien tiene la desventaja de que pueden ocurrir recombinaciones homólogas simples o no homólogas, lo cual hace más engorroso el sistema de selección (28). Algunos autores han reportado otras vías, que eliminan esta desventaja. Falkner y cols (29, 30), describieron la manipulación directa del genoma del VV, insertando en un sitio único un cassette que contiene un promotor de poxvirus seguido por dos sitios de restricción. De esta manera el gen de interés debe tener estos sitios de restricción en sus extremos para ser clonado bajo el promotor. La obtención de los virus recombinantes se hace por transfección del genoma del VV modificado y la coinfección con un virus auxiliador, que puede ser el VVA u otro poxvirus. Con este método se puede insertar más de una copia del gen foráneo, en diferentes orientaciones, mientras que con el sistema clásico solo existirá una copia del gen en una orientación definida. La utilización de un virus aviar como auxiliador, tiene la ventaja de que se elimina el posible fondo de este virus, al usar una selección por el rango de hospedero. Por ejemplo, si la selección se realiza en una línea celular no aviar solo se obtendrán los recombinantes con el genoma del VV modificado, pues los virus aviares no se replicarán en esa línea celular.

Ventajas y desventajas del uso de los poxvirus como vectores vivos

La replicación citoplasmática de estos virus, y la codificación en su genoma de gran parte de las enzi-

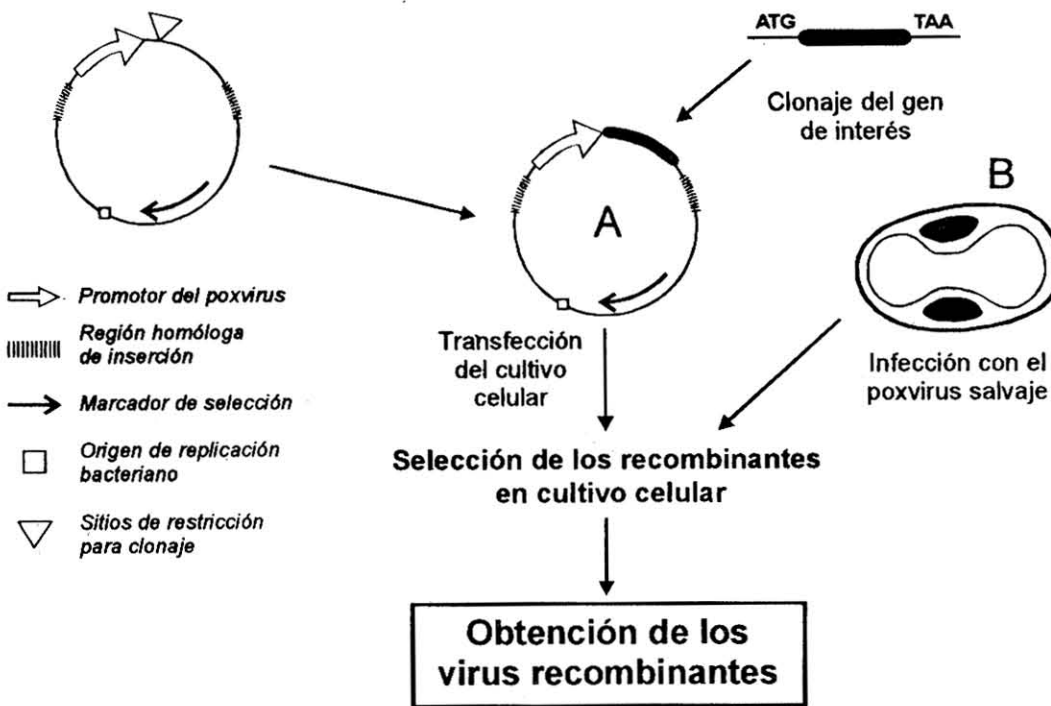


Figura 1. Representación esquemática de la obtención de los poxvirus recombinantes. A) vector plasmídico con el gen de interés clonado bajo un promotor de poxvirus y flanqueado por una región homóloga para la recombinación con el poxvirus salvaje, B) poxvirus salvaje empleado para la infección del cultivo celular y recombinación *in vivo*.

mas y factores requeridos para la transcripción, replicación y traducción, son sus mayores ventajas para su uso como vectores. Son capaces de perder gran parte de la información (genes no esenciales) sin que se afecte su replicación *in vitro*, y aceptar gran cantidad de información (hasta 25 kb).

La expresión a través de los vectores poxvirales permite la realización de las modificaciones postraduccionales y el tráfico intracelular normal de las proteínas, las cuales son presentadas en su configuración nativa. Esto es importante debido a que muchos anticuerpos neutralizantes están dirigidos contra epítopos conformacionales que aparecen en la proteína nativa, y que pudieran no aparecer en las variantes recombinantes.

Otra de sus ventajas es que con este sistema se puede lograr una buena respuesta citotóxica celular mediada por linfocitos CD8⁺, ya que se asegura que el antígeno se procesa en el interior de la célula infectada y los epítopos se presentan en el contexto del Sistema Principal de Histocompatibilidad Tipo I. Esto es un elemento importante a tener en cuenta, en enfermedades en las que es preciso obtener este tipo de respuesta para combatir el agente infeccioso.

El VV ha constituido un agente adecuado para la inmunización, sus preparaciones son estables, el costo de producción es bajo, la administración es fácil, la inducción de la inmunidad es de larga dura-

ción y tiene la capacidad de incorporar múltiples genes foráneos.

A pesar de lo anterior, el amplio uso del VV en la lucha contra la viruela humana, demostró la aparición, en algunos casos, de encefalitis con desmielinización, e infección progresiva con el VV, así como *eczema vaccinatum* (6, 31).

Las complicaciones estuvieron asociadas con la edad, el estado inmunológico de los vacunados y las cepas del VV usadas. Por ejemplo, en Dinamarca las complicaciones aparecieron en aproximadamente 1/4 000 de los vacunados, mientras que en Estados Unidos, con una cepa diferente, las complicaciones aparecieron en 1/250 000 de los vacunados (32).

Igualmente, es evidente que la base genética de la cepa usada afecta la potencia de los recombinantes obtenidos. Un VV recombinante (cepa WR) expresando la proteína gp34 del Virus Epstein Barr (EBV) protegió monos contra el reto con el EBV, mientras que otro VV recombinante (cepa Wyeth) expresando el mismo antígeno fue incapaz de proteger contra un reto idéntico (33).

Recientemente, se reportó la influencia de la cepa del virus parental en la virulencia e inmunogenicidad de un VV recombinante que expresa la proteína preS2-S del virus de la hepatitis B (34).

Por otra parte, la previa exposición de la población al VV puede ser desventajosa cuando se quiere obtener una respuesta inmune contra un antígeno heterólogo.

Es debido a esto que, actualmente, se explora el uso de otros vectores atenuados derivados del VV y de vectores con rango de hospedero más restringido, como los avipoxvirus.

Aplicaciones de los poxvirus recombinantes en la vacunación veterinaria

Vaccinia

Se han reportado numerosos ejemplos del uso del VV recombinante en la vacunación contra diferentes patógenos, y en muchos casos se ha visto protección contra el reto posterior (Tabla 2). En numerosos

ejemplos, la protección inducida por el VV recombinante se ha correlacionado con los anticuerpos neutralizantes contra proteínas de la envoltura de diferentes virus (95). Sin embargo, en algunos modelos animales la respuesta celular de linfocitos T citotóxicos (CTL) alcanzada, fue la responsable de la protección contra el reto viral (50, 87, 96, 97).

Vaccinia salvaje. La cepa del VV más ampliamente usada ha sido la WR, cepa altamente virulenta, por lo que su uso como vacuna veterinaria o humana no representa una buena opción. Otras cepas alternativas a la WR han sido la NYCBH y la Wyeth (DRYVAX). La cepa Copenhagen se ha usado ampliamente en Europa (35), y es muy efectiva como vehículo de inmunización.

Tabla 2: Vaccinias recombinantes protectores.

Patógeno	Cepa recombinante	Protección en animales
Rabia	Copenhagen	Ratón, mapache, zorro (35-38)
	NYCBH	Ratón, perro (39)
	NYVAC	Ratón (40)
Sarampión	Copenhagen	Ratón, rata, perro (41-44)
HBV	WR	Chimpancés (45)
HSV	WR	Ratón, curiel (46-49)
MCMV	Copenhagen	Ratón (50, 51)
EBV	WR	Mono (33)
Influenza	WR	Hámster, hurón, ratón (52-55)
	MVA	Ratón (56)
Dengue	WR	Ratón (57, 58)
Fiebre amarilla	WR, Copenhagen	Ratón (59, 60)
JEV	WR, Copenhagen	Ratón (61-63)
	NYVAC	Cerdo (64)
Virus sincicial respiratorio	WR	Rata, ratón, chimpancés (65-67)
HPV	Copenhagen	Ratón, rata (68-70)
Parainfluenza humana	WR	Mono (71)
Fiebre lassa	Wyeth, Lister	Curriel (72, 73)
Peste bovina	WR, Wyeth, LC16mo	Conejo, reses (74-78)
Virus equino del herpes	Copenhagen	Hámster (79)
Virus de la pseudorrahia	Copenhagen	Ratón, cerdo (80)
EIV	NYVAC	Caballo (81)
Virus de leucemia bovina	Copenhagen, WR, LC16mo	Oveja (82-84)
Virus del papiloma bovino	Copenhagen	Rata (85)
Virus polioma	Copenhagen	Rata (86)
Virus de leucemia Friend	WR	Ratón (87)
Virus cólera del cerdo	WR	Cerdo (88)
VEE	Wyeth	Ratón, mono, caballo (89-91)
Virus Sendai	WR	Ratón (92)
Influenza aviar	Wyeth, WR	Pollo (32, 93, 94)

HBV: Virus de la hepatitis B, HSV: Virus del herpes simplex, MCMV: Virus de la coriomeningitis murina, EBV: Virus Epstein Barr, JEV: Virus de la encefalitis japonesa, HPV: Virus papiloma humano, EIV: Virus de la influenza equina, VEE: Virus de la encefalomiocarditis equina venezolana.

Cepas atenuadas de vaccinia. Más recientemente, la cepa MVA ha sido propuesta para su desarrollo como candidato vacunal (98-100). Esta última se derivó de la cepa Ankara por más de 570 pases en cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo, lo cual resultó en la delección de regiones del genoma que han alterado el rango de hospedero de la cepa, y la pérdida de su capacidad replicativa en cultivos de células no aviares (101). Esta cepa, al igual que las virulentas, mostró una inmunogenicidad elevada en ratones (100).

Otra cepa, la LC16m8 derivada de la cepa del VV Lister, presentó una neurovirulencia reducida aunque no tan atenuada como la MVA. Su uso como vacuna recombinante confirió inmunidad a los animales inmunizados (102).

La inserción de genes de linfocinas en algunas regiones del genoma del VV, disminuye la virulencia del mismo, sin que se afecte la inmunogenicidad. Los virus recombinantes que expresan la IL2 (103) o IFN γ (104) humanos, o de ratón, son menos patogénicos para ratones atímicos desnudos inmunodeficientes, que los virus originales. El fenotipo del VV también ha sido atenuado por la delección específica de ciertos genes que codifican para TK (105), factor de crecimiento (106), hemaglutinina (102, 103), ribonucleótido reductasa (107), proteínas de la envoltura (108), proteínas para el control del complemento (109), y varios genes que controlan el rango de hospedero (110).

En 1992, Tartaglia y cols (111) describieron la obtención de un VV altamente atenuado, y más seguro, al que llamaron NYVAC y se derivó de la cepa Copenhagen del VV por la delección precisa de 18 marcos de lecturas, codificantes para funciones vinculadas con determinantes de patogenicidad, rango de hospederos y replicación. Entre sus principales ventajas se encuentran (40, 111):

- Capacidad replicativa *in vitro* altamente debilitada en células derivadas de ratón, cerdos, caballos y humanos.
- Habilidad de replicarse con alta eficiencia en cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo.
- Ausencia de endurecimiento y ulceración en el sitio de inoculación en la piel de conejos.
- Eliminación rápida del virus infeccioso en el sitio de inoculación intradérmico en piel de conejos.
- Ausencia de inflamación testicular en ratones desnudos.
- Virulencia altamente reducida después de un reto intracraneal, tanto en ratones de 3 semanas como recién nacidos.
- Patogenicidad altamente reducida y fallo en la diseminación de la infección, en ratones inmunocomprometidos.

La atenuación del NYVAC hizo que el Comité Supervisor del ADN Recombinante del Instituto

Nacional de Salud de los Estados Unidos, redujera el nivel de contención biológica para su manipulación, de BSL2 a BSL1 (112). Este es el único ortopoxvirus que se puede trabajar bajo estas condiciones.

En un estudio de reto con el virus de la rabia (40), el NYVAC-RG (NYVAC recombinante que expresa la glicoproteína de la rabia) mostró una dosis protectora al 50 % (PD50) de 3,7, similar a la PD50 de 3,74 de un VV replicativo recombinante, que expresa el mismo antígeno (VV-RG).

La inoculación con NYVAC-JEV, que expresa la proteína preM y proteínas de la envoltura del virus de la encefalitis japonesa (JEV), protegió cerdos contra el reto con JEV. Este inmunógeno fue capaz de generar anticuerpos neutralizantes y anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (64). La expresión de las hemaglutininas (HA) tipo A1 y A2 del virus de la influenza equina (EIV) por NYVAC, protegió caballos contra el reto con EIV tipo A2 y desarrolló solo síntomas atenuados de la enfermedad. En este estudio se detectaron anticuerpos inhibitorios de la hemaglutinación (81). En otro experimento, donde se inocularon cerdos con NYVAC, expresando las glicoproteínas gB y gD del virus de la pseudorrabia (PRV), estos se protegieron al ser retados con PRV (113, 114).

En artículos más recientes, se ha ensayado un NYVAC que codifica para el antígeno de superficie del HBV, y una proteína de fusión, en la que preS1 y preS2 están fusionadas al N-terminal del antígeno de la cápsida viral. La inoculación con este vector indujo una respuesta inmune alta contra todos los antígenos, en animales de laboratorio (115). De igual forma, los genes para las proteínas gp34, gp110 o gB, y gp85 del EBV y antígenos del HBV, se combinaron en una sola preparación vacunal basada en NYVAC. Esta forma de expresión de los antígenos fue capaz de inducir una respuesta de anticuerpos, contra el EBV y el HBV (115).

Estos ejemplos demuestran que NYVAC retiene la inmunogenicidad y la potencia de un vector del VV replicativo, y representa una opción más segura respecto a las cepas existentes.

Avipoxvirus

Aunque los avipoxvirus recombinantes no se replican en células de mamíferos, existe una síntesis *de novo* de las proteínas recombinantes, que induce una respuesta inmune contra la misma. En un experimento muy ilustrativo, animales inoculados con VVA recombinante para la glicoproteína de la rabia, generaron anticuerpos contra este virus. Sin embargo, animales inoculados con un virus recombinante inactivo, produjeron anticuerpos contra el vector viral pero no contra el antígeno del virus de la rabia. Esto indica que la respuesta inmune específica contra el virus de la rabia, fue inducida por las proteínas sintetizadas *de novo* en las células infec-

tadas y no por las proteínas introducidas al inocular el virus (116).

Virus de la Viruela Aviar. El VVA es el prototipo de este género y desde 1920 se ha usado una vacuna atenuada con el VVA para su control en aves (117).

La eficacia de este virus como vector para la inmunización, fue demostrada en 1988 por Taylor y cols (116, 118), tanto en especies aviares como no aviares. Especialmente en especies aviares, la inmunización con VVA que expresa diferentes antígenos, ha sido eficaz para combatir múltiples enfermedades. La inoculación de pollos y pavos con VVA, que expresa la HA del virus de la influenza aviar, los protegió contra un reto con el virus salvaje (119). La inmunización con VVA, recombinante para la HA neuraminidasa (120-122) y la proteína de fusión F (123, 124) del virus Newcastle protegió a pollos contra un reto viral (125). La coexpresión de ambas proteínas también ha inducido una respuesta inmune capaz de proteger a pollos contra el reto viral (122). El uso de VVA recombinantes, para la proteína gB del virus Marek's, protegió a pollos contra la aparición del linfoma característico de esta enfermedad, y contra la muerte, ante el reto con el virus salvaje (126). Este virus también se ha usado para combatir la leucosis aviar y el virus sarcoma (127).

La utilidad de los avipoxvirus en la inmunización de mamíferos se demostró con el uso de un VVA recombinante que expresa la glicoproteína del virus de la rabia. La inoculación con este recombinante protegió a gatos, perros y ratones ante el reto con el virus salvaje (116).

En 1993, una patente presentada por la compañía Virogenetics (128), describió la obtención de un VVA modificado genéticamente a partir de una placa aislada de VVA, al que llamaron TROVAC. En 1994, Radaelli y cols (129) reportaron la inoculación de conejos con este vector, recombinante para el virus de la inmunodeficiencia humana.

ALVAC. Tartaglia y cols, en 1992 (111), describieron también la obtención de un virus altamente atenuado, a partir de la cepa vacunal del virus de la viruela en canarios, al que llamaron ALVAC. En analogía al NYVAC, ALVAC exhibe una menor patogenicidad en ratones recién nacidos e inmunocomprometidos.

La respuesta inmune inducida por un VVA que expresa la glicoproteína de la rabia, no fue tan potente como la inducida por el VV-RG. Sin embargo, el ALVAC-RG (virus de la viruela en canarios recombinante para la glicoproteína de la rabia) indujo una respuesta inmune tan potente como el VV-RG. En un estudio de reto con el virus de la rabia (40), el ALVAC-RG tuvo una PD50 de 3,86, similar al VV-RG (3,74) y al NYVAC-RG (3,7). Las razones de las diferencias entre ambos avipoxvirus no son conocidas. ALVAC-RG protegió a perros y gatos contra la rabia (130). Once de doce perros resistieron el reto con el virus de la rabia después de 36 meses de la

inoculación con ALVAC-RG, a pesar de no detectarse anticuerpos neutralizantes antes del reto (131).

Perros inmunizados con ALVAC recombinante para la HA, y el antígeno F del sarampión desarrollaron anticuerpos neutralizantes. Estos animales resistieron el reto con un virus salvaje, de forma similar a los perros inoculados con un VV replicativo, expresando los mismos antígenos. Los perros inmunizados con este preparado contra sarampión, mostraron una respuesta de anticuerpos neutralizantes y fueron protegidos contra el reto (132) con el virus del moquillo canino (Morbillivirus específico de perros, semejante al del sarampión).

Los hurones han sido usados recientemente como modelo animal para investigar la protección contra el moquillo canino. Virus recombinantes basados en ALVAC y NYVAC han protegido a estos animales contra la infección sintomática (133).

La inoculación con ALVAC, que expresa las HA de tipo 1 y 2 de EIV protegió a caballos contra el EIV. Una sola inoculación indujo una respuesta de anticuerpos inhibitorios de la hemaglutinación contra A1 y contra A2 (81). Los síntomas fueron atenuados respecto a los provocados por la infección con el virus salvaje. Se midieron altos títulos de anticuerpos contra la HA tipo A2 en los caballos retados con un virus con este subtipo de HA.

Por otra parte, la inmunización con ALVAC-FelV, que expresa las proteínas Gag y Env del virus de la leucemia felina, protegió al 100 % de los gatos contra el reto oronasal con el virus salvaje. Cuando se le delecionó una región inmunosupresora a la proteína Env, los recombinantes ALVAC-FelV protegieron al 50 % de los gatos. El análisis serológico demostró que ninguno de los 12 gatos desarrollaron anticuerpos neutralizantes antes del reto con el virus, pero todos los gatos protegidos generaron anticuerpos neutralizantes después del reto (134). Estos resultados sugieren que la protección está asociada a una respuesta inmune primaria que es rápidamente amplificada una vez retados los animales. No obstante, la respuesta celular puede jugar un papel importante en la protección.

Ratones inoculados con ALVAC-JEV, que expresa las proteínas preM, E, NS1 de JEV fueron protegidos ante el reto con JEV (135).

Aplicación de los poxvirus en la vacunación humana

La historia de la vacunación en humanos con estos virus, comenzó con la inoculación contra la viruela. A partir de los años 80 se han probado diferentes vectores, en animales de laboratorio. Algunos de estos se encuentran en la fase preclínica, como un candidato vacunal basado en ALVAC contra el citomegalovirus humano (136), y otros han llegado a ensayos clínicos en humanos.

Uno de esos ejemplos es la vacuna contra la rabia, ALVAC-RG ensayada en humanos (Fase I) en Francia y Estados Unidos. Con esta vacunación se obtuvo una respuesta de anticuerpos neutralizantes y respuesta celular contra el virus de la rabia (137, 138).

El ALVAC que expresa la HA y la proteína de fusión del sarampión está siendo evaluado en ensayos clínicos en humanos. Igualmente, los vectores NYVAC-JEV y ALVAC-JEV están siendo probados en ensayos clínicos (Fase I) en humanos.

Entre los ejemplos más notables encontramos los ensayos de Fase I con ALVAC expresando proteínas del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), vCP125 y vCP205 (139-142); los cuales serán discutidos con posterioridad.

Por último, existen reportes del uso de NYVAC para combatir enfermedades parasitarias como la malaria (143). Actualmente está en curso un estudio de Fase I en humanos con un vector NYVAC, que expresa proteínas del *Plasmodium falciparum*. La alta inmunogenicidad de este preparado fue demostrada originalmente en macacos (144).

Poxvirus recombinantes y el desarrollo de vacunas contra el VIH

Debido a las características peculiares del VIH como agente etiológico del SIDA se han ensayado múltiples estrategias vacunales para su prevención. Entre estas encontramos: el uso de la proteína de la envoltura viral (gp160 o gp120) obtenida por vía recombinante, péptidos sintéticos, adenovirus recombinantes, poxvirus recombinantes, entre otros (145). Una de las características del SIDA es que no se conoce qué tipo de respuesta inmune es necesaria para lograr protección contra el virus, al no existir un modelo animal adecuado que reproduzca la enfermedad ante el reto con el VIH.

Vaccinia salvaje

El VV ha sido ampliamente usado para expresar un gran número de productos génicos del VIH, con el objetivo de investigar sus propiedades bioquímicas, funcionales e inmunológicas. En relación con el desarrollo de vacunas, los VV recombinantes para genes de VIH han sido ampliamente usados para caracterizar la respuesta inmune; particularmente la respuesta CTL (95), y para inducir una respuesta humoral y celular en diferentes modelos animales como macacos y chimpancés; también en ensayos clínicos en humanos (145).

La inmunización de ratones con algunos de estos recombinantes, ha inducido respuesta humoral. En especial, recombinantes que expresan la glicoproteína de la envoltura (146, 147) han inducido respuesta de anticuerpos neutralizantes. Existen algunos trabajos donde se protegen macacos al ser inoculados

con el VV que expresan genes del virus de inmunodeficiencia de simios (VIS), análogo al VIH (148, 149).

Macacos inmunizados con dosis iniciales de VV recombinante que expresa la glicoproteína de la envoltura de VIS y reactivados con una preparación recombinante de la glicoproteína de la envoltura del SIVmne fueron protegidos contra un reto con el virus SIV (aislamiento MNE) (149). Sin embargo, la inmunización de macacos con VV, que expresan diferentes proteínas de VIH-2, como Gag, Pol, Vif, Nef, Env, seguido de una reactivación con proteínas purificadas de la cepa ROD de VIH-2, no fueron capaces de proteger a los macacos contra un reto con la cepa SBL de VIH-2 (150). Lo anterior sugiere que la respuesta inmune inducida contra la cepa vacunal fue dirigida principalmente contra epitopos no conservados en la cepa que se empleó en el reto.

Como resultado de la expresión del gen *gag* en las células infectadas con VV, se producen partículas virales semejantes al VIH pero de carácter no infeccioso (VLP) (95, 151). La producción *in vivo* de estas VLP pudiera aumentar la inmunogenicidad de los VV, pero como su formación depende del tipo celular (151), no se conoce si se producen con la administración *in vivo*.

Un VV recombinante (HIVAC-1e) de las compañías Oncogen/Bristol-Myers Squibb, que expresa la glicoproteína de la envoltura de VIH-1 (aislamiento IIIB), ha entrado en Fase I en humanos (152-154). Los resultados con esta preparación sola, o en combinación con la proteína gp160 recombinante expresada en baculovirus, son los siguientes:

- 1) La respuesta inmune humoral y celular contra el VIH-1 o contra la gp160 recombinante es transitoria y de baja magnitud.
- 2) Los regímenes de inmunización en los que vacunan primeramente con HIVAc-1e y amplifican la respuesta inmune con la gp160 recombinante adyuvada en alúmina, han dado mejores resultados que cuando se usan los inmunógenos por separado.
- 3) Los regímenes combinados dieron como resultado una respuesta citotóxica específica contra VIH-1, de tipo CD4⁺ y CD8⁺, mientras que los inmunizados con las subunidades recombinantes solo exhibieron una respuesta celular de tipo CD4⁺.
- 4) La respuesta inmune fue más pronunciada en individuos vírgenes para el VV, en comparación con individuos con una respuesta previa contra el virus.

Estos resultados nos alertan sobre dos cosas: primero, que para obtener una respuesta inmune balanceada, se hace necesaria la inoculación de varias dosis, combinando el VV recombinante y un inmunógeno proteico; segundo, que la previa exposición del individuo vacunado al VV, es un factor negativo que limita la respuesta inmune contra un antígeno foráneo, expresado en este contexto.

Por último, un VV recombinante que expresa la proteína de la envoltura de VIH-1 de la cepa IIIB, y las proteínas Gag y Pol está en estudio en humanos (145). Con este candidato se realizó un ensayo clínico en individuos inmunes a vaccinia, llevado a cabo por la compañía Therion. Se planea un próximo estudio, en individuos vírgenes para vaccinia, a fin de comparar la respuesta inmune con respecto al experimento anterior.

NYVAC y ALVAC en animales

Abimiku y cols, en 1995 (155), inmunizaron macacos con NYVAC o ALVAC, que expresaban las proteínas de la envoltura viral del VIH-1: gp120 o gp160 de las cepas MN o IIIB. La reactivación de la respuesta inmune se realizó con péptidos octaméricos, gp120 nativa de la cepa IIIB u otra subunidad proteica, adyuvados en alúmina. El reto intravenoso con VIH-2 protegió a 3/8 macacos.

Franchini y cols, en 1995 (156), inmunizaron macacos con alguno de los siguientes inmunógenos: NYVAC o ALVAC que expresaban los genes *env*, *gag*, *pol* de VIH-2; NYVAC que expresaba gp160 o gp120 de VIH-2 en combinación con gp160 recombinante de VIH-2 adyuvada en alúmina. El reto intravenoso con VIH-2 protegió a 7/8 macacos. De los siete protegidos solo cinco de ellos siguieron protegidos al ser retados por segunda vez, seis meses después. Lo anterior demuestra la duración de la respuesta inmune.

Biberfeld y cols, en 1996 (157), usaron varios esquemas de inmunización en macacos. Los inmunógenos usados fueron: ALVAC recombinante para las proteínas de la envoltura, Gag y Pol de VIH-2 o ALVAC que expresaba la proteína de la envoltura de VIH-2 solamente. En estos esquemas se administró el virus solo o en combinación con la proteína de la envoltura viral de VIH-2 adyuvada en QS21, o con un péptido sintético en el mismo adyuvante. En general, se indujo una respuesta de anticuerpos neutralizantes pobre, pero alta respuesta linfoproliferativa en los grupos donde se usó la combinación con la glicoproteína. Solo tres de doce macacos mostraron una respuesta citotóxica. A pesar de que el 40 % de los macacos fueron protegidos contra el reto con VIH-2, en los grupos donde se amplificó con la glicoproteína no se encontró una correlación entre la respuesta inmune y la protección.

Las diferencias encontradas en los trabajos de Abimiku y cols (155) y Franchini y cols (156), se deben a diferencias en la procedencia de los inmunógenos usados y los virus empleados para el reto viral. En el primer caso, se usan inmunógenos con proteínas de VIH-1, mientras que el reto se realiza con VIH-2. En el segundo trabajo, la inmunización es con proteínas de VIH-2 y el reto con este mismo virus. Tanto el VIH-1 como el VIH-2, son los agentes etiológicos del SIDA, pero existen diferencias

genómicas y epitópicas entre ambos virus; tanto es así, que el VIH-2 guarda un mayor por ciento de homología con varias cepas de VIS, que con el propio VIH-1. Además, los macacos como modelo animal, tienen la desventaja que el VIH-1 no es capaz de infectarlos, por lo que hay que usar un modelo alternativo como el VIH-2 para llegar a conclusiones, que en algunos casos pueden no ser extrapolables a humanos.

De cualquier manera estos trabajos corroboran en macacos, que se requieren regímenes combinados de inmunización, con el virus recombinante y un inmunógeno de naturaleza proteica, para lograr protección contra la infección (158).

Girard en 1995 (159) reportó la inoculación de dos chimpancés con altas dosis (4×10^8 unidades formadoras de placas) de ALVAC-HIV-1(vCP205). Este recombinante expresa la gp120 de la cepa MN, la proteína Gag y la proteasa de la cepa LAI. Los chimpancés fueron retados intravenosamente con linfocitos de sangre periférica infectados con la cepa IIIB de VIH-1. Se indujeron anticuerpos de unión a la región variable 3 (V3) de la gp120 y neutralizantes, 3-4 veces mayor en magnitud en uno de los chimpancés con respecto al otro, en el momento del reto. El chimpancé que mostró mayores títulos de anticuerpos fue protegido contra el reto viral. En un reporte previo (160) se inocularon dos chimpancés con vCP125, recombinante que solo expresa gp160 de la cepa MN, y se amplificó la respuesta inmune con gp160MN/LAI (gp120 de MN y gp41 de LAI). Este régimen de inmunización no los protegió contra el reto con VIH-1 de la cepa SF2. La explicación que le dan los autores a este resultado es que la dosis utilizada era muy baja ($10^{6.1}$ unidades formadoras de placas).

Es de señalar que los experimentos con chimpancés, al ser con tan pocos animales, pueden no dar una información definitiva al comparar diferentes inmunógenos. Además, en este modelo animal solo se puede investigar la protección contra la infección viral inicial, pues los chimpancés no desarrollan SIDA, al menos en un tiempo corto. En este modelo animal no es posible medir la protección contra el desarrollo de la enfermedad.

Radaelli y cols, en 1994 (129), usaron los recombinantes del VVA, vFP62 y vFP63, que expresan la gp160 de SF2. Se les identificó como FPIS⁻ y FPIS⁺ y se les comparó con los recombinantes a partir del virus de la viruela en canarios, que expresan la misma proteína, llamados CPIS⁻ y CPIS⁺. Los anticuerpos presentes en los sueros de los conejos inmunizados con CPIS⁻, CPIS⁺ y FPIS⁻, neutralizaron la cepa SF2 *in vitro*. Sin embargo, no se detectó actividad neutralizante en los sueros de los inmunizados con FPIS⁺. Los experimentos de neutralización cruzada de las cepas de laboratorio MN, IIIB, o RF mostraron que, ninguno de los sueros, tenían anticuerpos capaces de neutralizar las mismas. Se detectó una res-

puesta de linfocitos T, en todos los animales. Los títulos de anticuerpos, y la actividad neutralizante de los mismos, fueron mayores en los conejos inoculados con los virus de viruela en canarios con respecto a los inoculados con los VVA. Estas diferencias en cuanto a respuesta inmune, entre ambos recombinantes aviáres, se pueden deber a que la transcripción de los genes o la síntesis proteica pueda ser más eficiente en un virus con respecto a otro. El modelo animal empleado puede también influir en los resultados obtenidos. Explicaciones adicionales, no se pueden descartar.

ALVAC en humanos

Los mejores resultados en ensayos de Fase I, en cuanto a respuesta celular y humoral, se han obtenido con los candidatos vacunales basados en ALVAC. El virus recombinante vCP125, expresa la gp160 de la envoltura de VIH-1 y el recombinante vCP205, expresa la gp120 de la cepa MN, la proteína Gag, la proteasa y la región transmembránica de la cepa IIIB. Estos virus se han usado en regímenes combinados con un inmunógeno proteico recombinante, generalmente gp120 o gp160. Algunos resultados se exponen a continuación.

El primer artículo apareció publicado en 1995 (139), si bien en la X Conferencia Internacional sobre SIDA, en Japón (1994) se habían presentado ya algunos datos alentadores en cuanto al uso de ALVAC como vector vacunal contra el VIH. En el mismo, se usó un régimen combinado de inmunización con vCP125 y la gp160 MN/LAI recombinante adyuvada en alúmina o Montanide ISA51 (adyuvante oleoso semejante al Incompleto de Freund). El 90 % de los individuos inoculados desarrollaron anticuerpos neutralizantes contra la cepa MN, y de estos sólo el 50 % desarrollaron anticuerpos neutralizantes contra SF2, cepa muy parecida en su secuencia aminoacídica al MN. Sin embargo, no se detectaron anticuerpos neutralizantes contra la cepa IIIB, cepa más divergente que la SF2, ni contra aislamientos virales primarios, provenientes de pacientes infectados. Se obtuvieron líneas celulares de CTL de las cuales el 39 % estaban dirigidas contra epitopos presentes en la proteína de la envoltura. La mayoría

de la respuesta CTL era debida a linfocitos T CD8⁺ (64-90 %) y sólo el 4 % a CD4⁺.

Clements y cols, 1996 (140), en la XI Conferencia Internacional sobre SIDA, en Vancouver, expusieron los resultados de la combinación de vCP125 con gp120 (Compañía Chiron) recombinante de la cepa SF2 adyuvada a MF59. Los resultados expuestos en ese evento se presentan en la Tabla 3.

En general, se logró una respuesta de anticuerpos neutralizantes, CTL y LP. Los esquemas con inmunización inicial con vCP125 (sobre todo el de mayor dosis) y la amplificación con gp120 recombinante indujeron una respuesta de anticuerpos neutralizantes y CTL más frecuentemente que los otros esquemas.

Lawrence y cols (142), investigaron la inmunogenicidad del virus recombinante vCP205 solo o en combinación con gp120 recombinante de la cepa SF2 (Compañía Chiron). Sólo el 10 % de los individuos mostraron anticuerpos contra péptidos de VIH-1, contra proteínas purificadas o contra lisados de células infectadas con el virus. Se detectó actividad CTL (CD8⁺) Gag-dependiente en el 70 % de los individuos, mientras solamente el 12 % mostró actividad CTL contra epitopos presentes en la proteína de la envoltura.

Recientemente se anunció el comienzo de estudios de Fase II en humanos con el virus recombinante, vCP205 (José Esparza, OMS, comunicación personal).

Consideraciones finales

El papel jugado por el VV en la erradicación de la viruela humana sugirió que los poxvirus pueden tener un uso importante como vectores vivos en la vacunación. En el campo veterinario algunas vacunas basadas en poxvirus han sido licenciadas para su uso y se comercializan. En humanos se dan los primeros pasos, basados en los resultados alentadores obtenidos con la vacuna contra la rabia. En algunas enfermedades infecciosas sin cura hasta este momento, como el SIDA, el uso de recombinantes que expresan antígenos del VIH-1 han mostrado resultados promisorios en experimentos de Fase I en humanos.

Los problemas concernientes a la seguridad del VV se han eliminado con el desarrollo de los vectores atenuados, ALVAC y NYVAC. Los mismos,

Tabla 3. Resultados de la combinación de vCP125 con gp120 recombinante de la cepa SF2.

Esquema	Neutralización contra		CTL CD8 ⁺ (%)	CTL CD4 ⁺ (%)	LP (%)
	MN(%)	SF2(%)			
4XALVAC 10 ⁶	4/10(40)	2/10(20)	10	10	86
2XALVAC10 ⁶ +2Xrgp120	9/9(100)	9/9(100)	25	25	100
4XALVAC 10 ⁷	12/18(67)	2/18(11)	17	17	50
2XALVAC10 ⁷ +2Xrgp120	29/29(100)	28/28(100)	42	21	80
4Xrgp120	5/9(56)	8/8(100)	10	0	-

CTL: Respuesta celular citotóxica, LP: Respuesta linfoproliferativa, rgp120:gp120 recombinante, 4X y 2X: 4 y 2 inoculaciones.

pueden expresar múltiples genes del mismo patógeno o de diferentes patógenos. Actualmente, el estudio de estos vectores para su uso como vacuna en humanos y en animales sigue avanzando y se encuentra en la mirilla de la investigación científica. Sin embargo, está por demostrar que la respuesta inmune, tanto humoral como celular, inducida en humanos sea capaz de protegerlos contra los agentes infecciosos o

el desarrollo de las enfermedades. Esta respuesta únicamente la darán el tiempo y la experimentación.

Agradecimientos

Quisiera agradecer al licenciado Rolando Pajón y al doctor Carlos Duarte por la revisión crítica de este artículo.

- Fenner F. Poxviruses. In: Fields BN, Knipe DM, editors. *Virology*, New York: Raven Press, 1990:2113-2133.
- Hume EH. *The Chinese way in medicine*. Baltimore: Johns Hopkins Press, 1940.
- Wong KC, Wu LT. *History of Chinese medicine*. Tientsin Press, 1932.
- Parish HJ. *A history of immunization*. London: E&S Livingstone, 1965.
- Jenner E. An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccine or cowpox. In: Charles W. Eliot, LL.D, editor. *The Harvard Classics*, New York: Collier & Son corporation, 1938;38:145-223.
- Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi ID. *Smallpox and its eradication*. Geneva, World Health Organization, 1988: 1460.
- Wittek R, Moss B. Tandem repeats within the inverted terminal repetition of vaccinia virus DNA. *Cell* 1980;21:277-284.
- Wittek R, Cooper J, Barbosa E, Moss B. Expression of vaccinia virus genome: analysis and mapping of mRNAs encoded within the inverted terminal repetition. *Cell* 1980;21: 487-493.
- Panicali D, Paoletti E. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious Vaccinia virus. *Proc Nat Acad Sci USA* 1982;79:4927-4931.
- Mackett M, Smith GL, Moss B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Nat Acad Sci USA* 1982;79:7415-7419.
- Letellier C, Burny A, Meulemans G. Construction of a pigeonpox virus recombinant: expression of the NDV fusion glycoprotein and protection of chickens against NDV challenge. *Arch Virol* 1991;118:43-56.
- Wasmoen TL, Kadakia NP, Unfer RC, Fickbohm BL, Cook CP, Chu HJ, Acree WM. Protection of cats from infectious peritonitis by vaccination with a recombinant raccoon poxvirus expressing the nucleocapsid gene of feline infectious peritonitis virus. *Adv Exp Med Biol* 1995;380:221-228.
- Hu L, Esposito JJ, Scott FW. Raccoon poxvirus feline panleukopenia virus VP2 recombinant protects cats against FPV challenge. *Virology* 1996;218:248-252.
- Moss B. Poxviridae and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, editors. *Virology*, New York: Raven Press, 1990:2079-2111.
- Goebel SJ, Johnson GP, Perkus ME, Davis SW, Winslow JP, Paoletti E. The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* 1990;179:247-266.
- Davinson AJ, Moss B. Structure of vaccinia virus early promoters. *J Mol Biol* 1989;210: 749-769.
- Davinson AJ, Moss B. Structure of vaccinia virus late promoters. *J Mol Biol* 1989; 210:771-784.
- Hruby DE. Vaccinia virus vectors: new strategies for producing recombinant vaccines. *Clinical Microbiology Reviews* 1990; 3:153-170.
- Drillien R, Spohner D, Villeval D, Lecocq JP. Similar genetic organization between a fragment of fowlpox virus DNA and the vaccinia virus HindIII J fragment despite divergent location of the thymidine kinase gene. *Virology* 1987;160:203-209.
- Binns MM, Tomley FM, Campbell J, Bournsnel MG. Comparison of a conserved region in fowlpox virus and vaccinia virus genomes and the translocation of the fowlpox virus thymidine kinase gene. *J Gen Virol* 1988;69:1275-1283.
- Binns MM, Britton BS, Mason C, Bournsnel MG. Analysis of fowlpox virus genome region corresponding to the vaccinia virus D6 to A1 region: location of, and variation in, non-essential genes in poxviruses. *J Gen Virol* 1990;71:2873-2881.
- Tartaglia J, Winslow J, Goebel S, Johnson GP, Taylor J, Paoletti E. Nucleotide sequence analysis of 10.5 kbp HindIII fragment of fowlpox virus: relationship to the central portion of the vaccinia virus HindIII region. *J Gen Virol* 1990;71:1571-1524.
- Zantinge JL, Krell PJ, Derbyshire JB, Nagy E. Partial transcriptional mapping of the fowlpox virus genome and analysis of EcoRI L fragment. *J Gen Virol* 1996;7:603-614.
- Weir JP, Moss B. Nucleotide sequence of the vaccinia virus thymidine kinase gene and the nature of spontaneous frameshift mutations. *J Virol* 1983;46:530-537.
- Boyle DB, Couper BEH, Gibbs AJ, Seigman LJ, Both GW. Fowlpox virus thymidine kinase: nucleotide sequence and relationships to other thymidine kinases. *Virology* 1987;156:355-365.
- Tripathy DN, Wittek R. Regulation of foreign gene in fowlpox virus by a vaccinia virus promoter. *Avian Diseases* 1990;34:218-220.
- Kumar S, Boyle DB. Activity of fowlpox virus late gene promoter in vaccinia and fowlpox virus recombinants. *Ach Virol* 1990;112:139-148.
- Nazerian K, Dhawale S. Structural analysis of unstable intermediate and stable forms of recombinant fowlpox virus. *J Gen Virol* 1991;72:2791-2795.
- Scheiflinger F, Dörner F, Falkner FG. Construction of chimeric vaccinia viruses by molecular cloning and packaging. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992;89:9977-9981.
- Pfleiderer M, Falkner FG, Dörner F. A novel vaccinia virus expression system allowing construction of recombinants without the need for selection markers, plasmids and bacterial hosts. *J Gen Virol* 1995;76:2957-2962.
- Lane JM, Ruben FL, Neff JM, Millar JD. Complications of smallpox vaccination, 1968. National surveillance in the United States. *New Engl J Med* 1969;281:1201-1208.
- Neff J. Vaccinia virus vaccines: virulence and attenuation of vaccinia strain variation. In: Quinnan G, editor. *Vaccinia virus as vectors for vaccine antigens*, New York: Elsevier Science Publishing Co, 1985:69-75.
- Morgan AJ, Mackett M, Finerty S, Arrand JR, Scullion FT, Epstein MA. Recombinant vaccinia virus expressing Epstein Barr virus glycoprotein gp34 protects cottontop tamarins against EB virus induced malignant lymphomas. *J Med Virol* 1988;25:189-195.
- Kutinova L, Ludvikova V, Krystofova J, Otavova M, Simanova V, Nemeckova S et al. Influence of the parenteral virus strain on the virulence and immunogenicity of recombinant vaccinia viruses expressing HBV preS2-S protein or VZV glycoprotein. *Vaccine* 1996; 14:1045-1052.
- Brochier B, Kiény MP, Costy F, Coppens P, Bauduin B, Lecocq JP et al. Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. *Nature* 1991;354: 520-522.
- Kiény MP, Lathe R, Drillien R, Spohner D, Skory S, Schmitt D et al. Expression of rabies glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* 1984;312:163-166.
- Ruprecht CE, Wiktor TJ, Johnston DH, Hamir AN, Dietzchold B, Wunner WH, Glickman LT, Koprowski H. Oral immunization and protection of raccoons (*Procyon lotor*) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. *Proc Nat Acad Sci USA* 1986;83:7947-7951.
- Blancou J, Kiény MP, Lathe R, Lecocq JP, Pastoret PP, Soulebot JP, Desmetre P. Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature* 1986;322:373-376.
- Esposito J, Brechling K, Baer G, Moss B. Vaccinia virus recombinants expressing rabies virus glycoprotein protect against rabies. *Virus Gene* 1987;1:7-21.
- Tartaglia J, Perkus ME, Taylor J, Norton EK, Audonnet JC, Cox WI et al. NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* 1992;188:217-232.
- Wild TF, Bernard A, Spohner D, Drillien R. Construction of vaccinia virus recombinants expressing several measles virus protein and analysis of their efficacy in vaccination of mice. *J Gen Virol* 1992;73:359-367.
- Taylor J, Pincus S, Tartaglia J, Richardson C, Alkhatib G, Briedis D et al. Vaccinia virus recombinants expressing either the measles virus fusion or hemagglutinin glycoprotein

- protect dogs against canine distemper virus challenge. *J Virol* 1991;65:4263-4274.
43. Drilling R, Spehner D, Kim A, Giraudon P, Buckland R, Wild F, Lecocq JP. Protection of mice from fatal measles encephalitis by vaccination with vaccinia virus recombinants encoding either the hemagglutinin or the fusion protein. *Proc Nat Acad Sci USA* 1988; 85:1252-1256.
44. Bankamp G, Brinckmann UG, Reich A, Niewiesk S, terMeulen V, Liebert U. Measles virus nucleocapsid protein protects rats from encephalitis. *J Virol* 1991;65:1695-1700.
45. Moss B, Smith GL, Gerin JL, Purcell RH. Live recombinant vaccinia virus protects chimpanzees against hepatitis B. *Nature* 1984;311:67-69.
46. Paoletti E, Lipinska BR, Samsonoff C, Mercer S, Panicali D. Construction of live vaccines using genetically engineered poxviruses: biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the hepatitis B virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D. *Proc Nat Acad Sci USA* 1984;81:193-197.
47. Cremer KJ, Mackett M, Wohlenberg C, Notkins AL, Moss B. Vaccinia virus recombinant expressing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D prevents latent herpes in mice. *Science* 1985;228:737-740.
48. Cantin EM, Eberle R, Baldick JL, Moss B, Willey DE, Notkins AL, Openshaw H. Expression of herpes simplex virus 1 glycoprotein B by a recombinant vaccinia virus and protection of mice against lethal herpes simplex virus 1 infection. *Proc Nat Acad Sci USA* 1987;84:5908-5912.
49. Wachsman M, Aurelian L, Smith CC, Lipinskas BR, Perkus ME, Paoletti E. Protection of Guinea pigs from primary and recurrent herpes simplex virus (HSV) type 2 cutaneous disease with vaccinia virus recombinants expressing HSV glycoprotein D. *J Infect Dis* 1987;155:1188-1197.
50. Jonjić S, DelVal M, Keil GM, Reddehase MJ, Koszinowski UH. A nonstructural viral protein expressed by a recombinant vaccinia virus protects against lethal cytomegalovirus infection. *J Virol* 1988;62:1653-1658.
51. Reddeltase MJ, Baltheisen M, Papp M, Jonjić S, Pavić I, Koszinowski UH. The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *J Exp Med* 1994;179:185-193.
52. Smith GL, Murphy BR, Moss B. Construction and characterization of an infectious vaccinia virus recombinant that expresses the influenza hemagglutinin gene and induces resistance to influenza virus infection in hamster. *Proc Nat Acad Sci USA* 1983;80: 7155-7159.
53. Jakeman KJ, Smith H, Sweet C. Mechanisms of immunity to influenza: maternal and passive neonatal protection following immunization of adult ferrets with a live vaccinia-influenza virus hemagglutinin recombinant but not recombinants containing other influenza virus proteins. *J Gen Virol* 1989;70:1523-1531.
54. Rota PA, Shaw MW, Kendal AP. Cross-protection against microvariants of influenza virus type B by vaccinia virus expressing hemagglutinin from egg- or MDCK cell derived subpopulations of influenza virus type B/England/222/82. *J Gen Virol* 1989; 70: 1533-1537.
55. Rota PA, De BK, Shaw MW, Black RA, Gamble WC, Kendal AP. Comparison of inactivated live and recombinant DNA vaccines against influenza virus in mouse model. *Virus Res* 1990;16:83-94.
56. Sutter G, Wyatt LS, Foley PL, Bennink JR, Moss B. 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* 1994;12:1032-1040.
57. Bray M, Zhao B, Markoff L, Eckels KH, Chanock RM, Lai C-J. Mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing dengue 4 virus structural proteins with or without nonstructural protein NS1 are protected against fatal dengue 4 virus encephalitis. *J Virol* 1989;63:2853-2856.
58. Falgout B, Bray M, Schlesinger JJ, Lai CJ. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *Virology* 1990;64:4356-4363.
59. Putnak JR, Schlesinger JJ. Protection of mice against yellow fever virus encephalitis immunization with a vaccinia virus recombinant encoding the yellow fever virus nonstructural proteins, NS1, NS2a, NS2b. *J Gen Virol* 1990;71:1697-1702.
60. Pincus S, Mason PW, Konishi E, Fonseca BAL, Shope RE, Paoletti E. Recombinant vaccinia virus producing the prM and E proteins of yellow fever virus protects mice from lethal yellow fever encephalitis. *Virology* 1992;187:290-297.
61. Yasuda A, Kimura-Kuroda J, Ogimoto M, Miyamoto M, Sata T, Sato T, Takamura C, Kurata C, Kojima A, Yasui K. Induction of protective immunity in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express prM and E glycoproteins of Japanese encephalitis virus. *J Virol* 1990;64:2788-2795.
62. Konishi E, Pincus S, Fonseca BAL, Shope RE, Paoletti E, Mason PW. Comparison of protective immunity elicited by recombinant vaccinia viruses that synthesize E or NS1 of Japanese encephalitis virus. *Virology* 1991; 185:401-410.
63. Mason PW, Pincus S, Fournier MJ, Mason TL, Shope RE, Paoletti E. Japanese encephalitis virus vaccinia recombinants produce particulate forms of the structural membrane proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection. *Virology* 1991; 180:294-305.
64. Konishi E, Pincus S, Paoletti E, Laegreid WW, Shope RE, Mason PW. A highly attenuated host range-restricted vaccinia virus strain, NYVAC, encoding the prM, E, NS1 genes of Japanese encephalitis virus prevents JEV viremia in swine. *Virology* 1992;190: 454-458.
65. Stott EJ, Taylor G, Ball LA, Anderson K, Young KKY, King AMQ, Wertz GW. Immune and histopathological responses in animals vaccinated with recombinant viruses that express individual genes of human respiratory syncytial virus. *J Virol* 1987;61:3855-3861.
66. Kulkarni AB, Connors M, Firestone CY, Morse III HC, Murphy BR. The cytolytic activity of pulmonary CD8+ lymphocytes induced by infection with a vaccinia virus recombinant expressing the M2 protein of respiratory syncytial virus(RSV) correlates with resistance to RSV infection in mice. *J Virol* 1993;67: 1044-1049.
67. Crowe Jr JE, Collins PL, London WT, Chanock RM, Murphy BR. A comparison in chimpanzees of the immunogenicity and efficacy of live attenuated RSV temperature-sensitive mutant vaccines and vaccinia virus recombinants that express the surface glycoproteins of RSV. *Vaccine* 1993;11:1395-1404.
68. Chen L, Thomas EK, Hu SL, Hellstrom I, Hellstrom KE. Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991;88:110-114.
69. Chen L, Mizuno AT, Singhal AC, Hu SL, Galloway DA, Hellstrom I, Hellstrom KE. Induction of cytotoxic T lymphocytes specific for syngeneic tumor expressing the E6 oncoprotein of HPV 16. *Immunity* 1992;148: 2617-2621.
70. Meneguzzi G, Cerni C, Kiény MP, Lathe R. Immunization against HPV type 16 tumor cells with recombinant vaccinia viruses expressing E6 and E7. *Virology* 1991;181:62-69.
71. Spriggs MK, Collins PL, Tierny E, London WT, Murphy BR. Immunization with vaccinia virus recombinants that express the surface glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 (PIV3) protects rhesus monkeys against PIV3 infection. *J Virol* 1988;62:1293-1296.
72. Auperin DD, Esposito JJ, Lange JV, Bauer SP, Knight J, Sasso DR, McCormick JB. Construction of a recombinant vaccinia virus expressing the Lassa virus glycoprotein gene and protection of Guinea pigs from a lethal Lassa virus infection. *Virus Res* 1988;9:233-248.
73. Clegg JCS, Lloyd G. Vaccinia recombinant expressing Lassa virus internal nucleocapsid protein protects Guinea pigs against Lassa fever. *Lancet* 1987;8552:186-189.
74. Barret T, Belsham GJ, Subbarao SM, Evans SA. Immunization with a vaccinia recombinant expressing the F protein protects rabbits from challenge with a lethal dose of rinderpest virus. *Virology* 1989;170:11-18.
75. Yilma T, Hsu D, Jones L, Owens S, Grubman M, Mebus C, Yamanaka M, Dale B. Protection of cattle against rinderpest with vaccinia virus recombinant expressing the HA or F genes. *Science* 1988;242:1058-1061.
76. Giavedoni L, Jones L, Mebus C, Yilma T. A vaccinia virus double recombinant expressing the F and H genes of rinderpest virus protects cattle against rinderpest and causes no pox lesions. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991;88:8011-8015.
77. Asano K, Tsukiyama K, Shibata S, Yamaguchi K, Momoki T, Maruyama T. Immunological and virological characterization of improved construction of recombinant vaccinia virus expressing rinderpest virus haemagglutinin. *Arch Virol* 1991;116:81-90.
78. Yamanouchi K, Inui K, Sugimoto M, Asano K, Nishimaki F, Kitching RP. Immunization of cattle with a recombinant vaccinia vector expressing the hemagglutinin gene of rinderpest virus. *Vet Res* 1993;132:152-156.
79. Guo P, Goebel S, Perkus ME, Taylor J, Norton E, Allen G et al. Coexpression by vaccinia virus recombinants of equine herpes virus-1 glycoproteins gp13 and gp14 results in potentiated immunity. *J Virol* 1990;64: 2399-2406.

80. Riviere M, Tartaglia J, Perkus ME, Norton EK, Molnar-Bongermine C, Desmettre P, Paoletti E. Immunological evaluation in mice and swine of pseudorabies virus glycoproteins gp50, gpII and gpIII expressed by vaccinia virus recombinants. *J Virol* 1992;66:3424-3434.
81. Taylor J, Tartaglia J, Moran T, Webster RG, Bouquet JF, Quimby FW et al. The role of poxvirus vectors in influenza vaccine development. In: Proceedings of the Third International Symposium on Avian Influenza. University of Wisconsin-Madison Extension Duplicating Services, 1992:311-335.
82. Portetelle D, Limbach K, Burny A, Mamerickx M, Desmettre P, Riviere M et al. Recombinant vaccinia virus expression of the bovine leukaemia virus envelope gene and protection of immunized sheep against infection. *Vaccine* 1991;9:194-200.
83. Gatei MH, Naif HM, Kumar S, Boyle DB, Daniel RCW, Good MF, Lavin MF. Protection of sheep against bovine leukemia virus (BLV) infection by vaccination with recombinant vaccinia viruses expressing BLV envelope glycoproteins: correlation of protection with CD4 T-cell response to gp51 peptide 51-70. *J Virol* 1993;67:1803-1810.
84. Ohishi K, Suzuki H, Yamamoto T, Maruyama T, Miki K, Ikawa Y et al. Protective immunity against BLV induced in carrier sheep by inoculation with a vaccinia virus-BLV env recombinant: association with cell-mediated immunity. *J Gen Virol* 1991;72:1887-1892.
85. Meneguzzi G, Kieny MP, Lecocq JP, Chambon P, Cuzin F, Lathe R. Vaccinia recombinants expressing early bovine papilloma virus (BPV1) proteins: retardation of BPV1 tumour development. *Vaccine* 1990;8:199-204.
86. Lathe R, Kieny MP, Gerlinger P, Clertan P, Guizani I, Cuzin F, Chambon P. Tumour prevention and rejection with recombinant vaccinia. *Nature* 1987;326:878-880.
87. Miyazama M, Nishio J, Chesebro B. Protection against Friend retrovirus-induced leukemia by recombinant vaccinia viruses expressing the gag gene. *J Virol* 1992;66:4497-4507.
88. Rumenapf T, Stark R, Meyers G, Thiel HJ. Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J Virol* 1991;65:589-597.
89. Kinney RM, Esposito JJ, Mathews JH, Johnson BJB, Roehrig JT, Barrett ADT, Trent DW. Recombinant vaccinia virus/Venezuelan equine encephalitis (VEE) virus protects mice from peripheral VEE virus challenge. *J Virol* 1988;62:4697-4702.
90. Monath TR, Cropp CB, Short WF, Bowen RA, Kinney RM, Roehrig JT, Trent DW. Recombinant vaccinia-Venezuelan equine encephalitis (VEE) vaccine protects non-human primates against parenteral and intranasal challenge with virulent VEE virus. *Vaccine Res* 1992;1:55-68.
91. Bowen RA, Short WA, Cropp CB, Mathews JH, Roehrig JT, Kinney RM et al. Protection of horses immunized with recombinant vaccinia-Venezuelan equine encephalitis vaccine. *Vaccine Res* 1992;1:111-121.
92. Sakaguchi T, Takao S, Kiyotani K, Fujii Y, Nakayama T, Yoshida T. Expression of the HN, F, NP, and M proteins of Sendai virus by recombinant vaccinia viruses and their contribution to protective immunity against sendai virus infection in mice. *J Gen Virol* 1993;74:479-484.
93. De BK, Shaw MW, Rota PA, Harmon MW, Esposito JJ, Rott R et al. Protection against virulent H5 avian influenza virus infection in chickens by an inactivated vaccine produced with recombinant vaccinia virus. *Vaccine* 1988;6:257-261.
94. Chambers TM, Kawaoka Y, Webster RG. Protection of chickens from lethal influenza infection by vaccinia-expressed hemagglutinin. *Virology* 1988;167:414-421.
95. Cox WI, Tartaglia J, Paoletti E. Poxvirus recombinants as live vaccines. In: Binns MM and Smith GL, editors. *Recombinant Poxviruses*. Boca Raton: CRC Press, 1992:123-162.
96. Klávková LS, Whittin L, Joly E, Oldstone MBA. Vaccination and protection from a lethal viral infection: identification, incorporation, and use of a cytotoxic T lymphocyte glycoprotein epitope. *J Virol* 1990;178:393-400.
97. Connors M, Kulkarni AB, Collins PL, Firestone CV, Holms KL, Morse HC III, Murphy BR. Resistance to respiratory syncytial virus (RSV) challenge induced by infection with a vaccinia virus recombinant expressing the RSV M2 protein (Vac-M2) is mediated by CD8+ T cells while that induced by Vac-F or Vac-G recombinants is mediated by antibodies. *J Virol* 1992;66:1277-1281.
98. Scheiflinger F, Falkner FG, Dörner F. Evaluation of the thymidine kinase (tk) locus as an insertion site in the highly attenuated vaccinia MVA strain. *Arch Virol* 1996;141:663-669.
99. Antoine G, Scheiflinger F, Halzer G, Langmann T, Falkner FG, Dörner F. Characterization of the vaccinia MVA HA gene locus and its evaluation as an insertion site for foreign genes. *Gene* 1996;177:43-48.
100. Sutter G, Wyatt LS, Foley PL, Bennink JR, Moss B. 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* 1994;12:1032-1040.
101. Sutter G, Moss B. Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992;89:10847-10851.
102. Shida H, Hinuma Y, Hatanaka M, Morita M, Kidokora M, Suzuki K et al. Effects and virulence of recombinant vaccinia viruses derived from attenuated strain that express the human T cell leukemia virus type 1 envelope gene. *J Virol* 1988;62:4474-4480.
103. Flexner C, Hugin A, Moss B. Prevention of vaccinia virus infection in immunodeficient nude mice by vector-directed IL2 expression. *Nature* 1987;330:259-262.
104. Kohone-Corish MRJ, Long NJC, Woodhams CE, Rämshaw IA. Immunodeficient mice recover from infection with vaccinia virus expressing interferon γ . *Eur J Immunol* 1990;17:1495-1503.
105. Buller RML, Smith GL, Cremer K, Notkins AL, Moss B. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature* 1985;317:813-815.
106. Buller RML, Chakrabarti S, Cooper JA, Twardzik DR, Moss B. Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence. *J Virol* 1988;67:866-874.
107. Child SJ, Palumbo G, Buller RM, Hruby D. Insertional inactivation of the large subunit of ribonucleotide reductase encoded by vaccinia virus is associated with reduced virulence in vivo. *Virology* 1990;174:625-629.
108. Rodríguez JR, Rodríguez D, Esteban M. Insertional inactivation of the vaccinia virus 32kD gene is associated with attenuation in mice and reduction of viral gene expression in polarized epithelial cells. *J Virol* 1992;66:183-189.
109. Isaacs SN, Kotwal GJ, Moss B. Vaccinia virus complement-control protein prevents antibody-dependent complement-enhanced neutralization of infectivity and contributes to virulence. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992;89:628-632.
110. Lee SL, Roos JM, McGuigan LC, Smith KA, Cormier N, Cohen LK, Roberts BE, Payne LG. Molecular attenuation of vaccinia virus: mutant generation and animal characterization. *J Virol* 1992;66:2617-2630.
111. Tartaglia J, Cox WI, Taylor J, Perkus M, Riviere M, Meigner B, Paoletti E. Highly attenuated poxvirus vectors. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992;8:1445-1447.
112. US Federal Register. September 13, 1994;58 (175).
113. Brockmeier SL, Lager K, Tartaglia G, Riviere M, Paoletti E, Mengeling WL. Vaccination of pigs against pseudorabies with highly attenuated vaccinia (NYVAC) recombinant viruses. *Vet Microb* 1993;38:41-58.
114. Brockmeier SL, Mengeling WL. Comparison of the protective response by NYVAC vaccinia recombinants expressing either gp50 or gpII and gp50 of pseudorabies virus. *Can J Vet Res* 1996;60:315-317.
115. Pincus S, Tartaglia J, Paoletti E. Poxvirus-based vectors as vaccine candidates. *Biologicals* 1995;23:159-164.
116. Taylor J, Weinberg R, Languet B, Desmettre B, Paoletti E. Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. *Vaccine* 1988;6:497-503.
117. Fatunmbi OO, Reed WM. Evaluation of a commercial modified live virus fowlpox vaccine for the control of "variant" fowl poxvirus infections. *Avian Dis* 1996;40:582-587.
118. Taylor J, Weinberg R, Kawaoka Y, Webster R, Paoletti E. Protective immunity against avian influenza induced by a fowlpox virus recombinant. *Vaccine* 1988;6:504-508.
119. Webster RG, Kawaoka Y, Taylor J, Weinberg R, Paoletti E. Efficacy of nucleoprotein and hemagglutinin antigens expressed in fowlpox virus as vaccine for influenza in chickens. *Vaccine* 1991;9:303-308.
120. Ogawa R, Yanagida N, Saeki S, Saito S, Ohkawa S, Gotah H et al. Recombinant fowlpox viruses inducing protective immunity against Newcastle disease and fowlpox viruses. *Vaccine* 1990;8:486-490.
121. Boursnell MEG, Green PF, Samson ACR, Campbell JIA, Deuter A, Peters RW et al. A recombinant fowlpox virus expressing the haemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against challenge by NDV. *Virology* 1990;178:297-300.
122. Edbauer C, Weinberg R, Taylor J, Rey-Senelonge A, Bouquet JF, Desmettre P,

- Paoletti E. Protection of chickens with a recombinant fowlpox virus expressing the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase gene. *Virology* 1990;179:901-904.
123. Taylor J, Edbauer C, Rey-Senelongo A, Bouquet JF, Norton E, Goebel S et al. Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. *J Virol* 1990;64:1441-1450.
124. Boursnell MEG, Green PF, Campbell JIA, Deuter A, Peters RW, Tomley FM et al. Insertion of the fusion gene from Newcastle disease virus into a non-essential region in the terminal repeats of fowlpox virus and demonstration of protective immunity induced by the recombinant. *J Gen Virol* 1990;71:621-628.
125. Taylor J, Christensen L, Getting R, Goebel J, Bouquet JF, Mickle TR, Paoletti E. Efficacy of a recombinant fowlpox-based Newcastle disease virus vaccine candidate against velogenic and respiratory challenge. *Avian Dis* 1996;40:173-180.
126. Nazerian K, Lee LF, Yanagida N, Ogawa R. Protection against Marek's disease by a fowlpox virus recombinant expressing the glycoprotein B from Marek's disease Virus. *J Virol* 1992;66:1409-1413.
127. Nazerian K, Yanagida N. A recombinant fowlpox virus expressing the envelope antigen of subgroup A avian leukosis/sarcoma virus. *Avian Dis* 1995;39:514-520.
128. Paoletti E, Tartaglia J, Cox WI, inventors. Virogenetics corporation, assignee. Immunodeficiency virus recombinant poxvirus vaccine. WO9222641. 1992 Dec 23.
129. Radaelli A, Gimelli M, Cremonesi C, Scarpini C, deGiuliMorghe C. Humoral and cell mediated immunity in rabbits immunized with live non-replicating avipox expressing the HIV-1 SF2 env gene. *Vaccine* 1994;12:1110-1117.
130. Taylor J, Trimarchi C, Weinberg R, Languet B, Guillemin F, Desmetre P, Paoletti E. Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. *Vaccine* 1991;9:190-193.
131. Taylor J, Tartaglia J, Riviere Y, Duret C, Languet B, Chappui G, Paoletti E. Application of canarypox (ALVAC) vectors in human and veterinary vaccination. In: Brown F, editor. *Recombinant vectors in vaccine development*. Dev Biol Stand Basel: Karger, 1995:165-170.
132. Taylor J, Weinberg R, Tartaglia J, Richardson C, Alkhatib G, Briedis D et al. Non-replicating viral vectors as potential vaccines: recombinant canarypox virus expressing measles virus fusion (F) and hemagglutinin (HA) glycoproteins. *Virology* 1992;187:321-328.
133. Stephensen CB, Welter J, Thaker SR, Taylor J, Paoletti E. CDV infection of ferrets as a model for testing morbillivirus vaccine strategies: NYVAC and ALVAC based CDV recombinants protects against symptomatic infection. *J Virol* 1997;71:1506-1513.
134. Tartaglia G, Jarrett O, Neil JC, Desmetre P, Paoletti E. Protection of cats against feline leukemia virus by vaccination with a canarypox virus recombinant, ALVAC-FL. *J Virol* 1993;67:2370-2375.
135. Konishi E, Pincus S, Paoletti E, Shope RE, Mason PW. Avipox virus-vectored Japanese encephalitis virus vaccine: use as vaccine candidate in combination with purified subunit immunogens. *Vaccine* 1994;12:633-638.
136. Gonczol E, Berencsi K, Pincus S, Endresz V, Maric C, Paoletti E, Plotkin S. Preclinical evaluation of an ALVAC(canarypox)- human cytomegalovirus glycoprotein B vaccine candidate. *Vaccine* 1995;13:1080-1085.
137. Cadoz M, Strady A, Meigner B, Taylor J, Tartaglia J, Paoletti E, Plotkin S. Immunization with canarypox virus expressing rabies glycoproteins. *Lancet* 1992;339:1429-1432.
138. Taylor J, Meigner B, Tartaglia J, Languet B, Vanderhoeven J, Franchini G et al. Biological and immunological properties of a canarypox-rabies recombinant, ALVAC RG (vCP65) in non-avian species. *Vaccine* 1995;13:539-549.
139. Pialoux G, Excler JL, Riviere Y, González-Canalis G, Feuillie Y, Coulaud P et al. A prime-boost approach to HIV preventive vaccine using a recombinant canarypox virus expressing glycoprotein 160 (MN) followed by a recombinant glycoprotein 160 (MN/LAI). *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995;11:373-381.
140. Clements ML, Weinhold KJ, Siliciano RF, Schwartz D, Matthews T, Graham B et al. HIV immunity induced by canarypox (ALVAC)-gp160/MN, rgp120/SF2 or both [Abstract]. XI International Conference on AIDS, Vancouver. 1996;Mo. A 281.
141. Lawrence C, Weinhold KJ, McElrath J, Excler JL, Duliege AM, Clements ML et al. Safety and immunogenicity of live recombinant canarypox virus vector containing the envelope, gag, and the protease genes of HIV-1 in seronegative adult volunteers [Abstract]. XI International Conference on AIDS, Vancouver. 1996;Mo. A282.
142. Egan MA, Pavlat WA, Tartaglia J, Paoletti E, Weinhold KJ, Clements ML, Siliciano RF. Induction of HIV-1 specific cytolytic T lymphocyte responses in seronegative adults by a replicating, host-range-restricted canarypox (ALVAC) carrying the HIV-1/MN env gene. *J Infect Dis* 1995;171:1623-1627.
143. Lanar DE, Tine JA, deTaine C, Seguin MC, Cox WI, Winslow JP et al. Attenuated vaccinia virus-circumsporozoite protein recombinants confer protection against rodent malaria. *Infect Immun* 1996;64:1666-1671.
144. Tine JA, Lanar DE, Smith DM, Welde BT, Schultheiss P, Ware LA et al. NYVAC-Pf7: a poxvirus-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for Plasmodium falciparum malaria. *Infection and Immunity* 1996;64:3833-3844.
145. Fast P. HIV vaccine clinical trials: experience of the NIAID AIDS vaccine evaluation group. In: Girard M and Dodet B, editors. *X Colloque des cent gardes. Retroviruses of human AIDS and related animal diseases*, Francia, 1995:283-290.
146. Hu SL, Klaniacki J, Dykers T, Sridhar P, Travis BM. Neutralizing antibodies against HIV-1 BRU and SF2 isolates generated in mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing HIV-1(BRU) envelope glycoproteins and boosted with homologous gp160. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991;7:615-620.
147. Dallo S, Maa JS, Rodriguez JR, Rodriguez D, Esteban M. Humoral immune response elicited by highly attenuated variants of vaccinia virus and by an attenuated recombinant expressing HIV-1 envelope protein. *Virology* 1989;173:323-329.
148. Hu SL, Zarling JM, Chinn J, Travis BM, Moran PA, Sias J et al. Protection of macaques against simian AIDS by immunization with a recombinant vaccinia virus expressing the envelope glycoprotein of simian type D retrovirus. *Proc Nat Acad Sci USA* 1989;86:7213-7217.
149. Hu SL, Abrams K, Barber GN, Moran P, Zarling JM, Langlois AJ et al. Protection of macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glycoprotein gp160. *Science* 1992;255:456-459.
150. Vogt G, le Grand R, Vaslin B, Boussin F, Bayon-Auboyer MH, Rivier Y et al. Heterologous HIV-2 challenge of rhesus monkeys immunized with recombinant vaccinia viruses and purified recombinant HIV-2 proteins. *Vaccine* 1995;13:202-208.
151. Dru A, Ludosky MA, Cataud J, Beaud G. Cell-line dependent release of HIV-like gag particles after infection of mammalian cells with recombinant vaccinia virus. *AIDS Res Hum Retrov* 1994;10:383-390.
152. Cooney EL, McElrath MJ, Corey L, Hu SL, Collier AC, Arditti D et al. Enhanced immunity to human immunodeficiency virus (HIV) envelope elicited by a combined vaccine regimen consisting of priming with a vaccinia recombinant expressing HIV envelope and boosting with gp160 protein. *Proc Nat Acad Sci USA* 1993;90:1882-1886.
153. Graham BS, Matthews TJ, Belshe RB, Clements ML, Dolin R, Wright PF et al. Augmentation of HIV-1 neutralizing antibody by priming with gp160 recombinant vaccinia virus and boosting with rgp160 in vaccinia-naïve adults. *J Infect Dis* 1993;167:533-537.
154. Cooney EL, Collier AC, Greenberg PD, Coombs RW, Jorling J, Arditti DE et al. Safety and immunological response to a recombinant vaccinia virus vaccine expressing HIV envelope glycoprotein. *Lancet* 1991;337:567-572.
155. Abimiku A, Franchini G, Tartaglia J, Aldrich K, Myagkikh M, Markham PD et al. HIV-1 recombinant poxvirus against HIV-2 challenge in rhesus macaques. *Nature Med* 1995;1:321-329.
156. Franchini G, Robert-Guroff M, Tartaglia J, Aggarwal A, Abimiku A, Benson J et al. Highly attenuated HIV-2 recombinant poxviruses, but not HIV-2 recombinant Salmonella vaccines, induce long-lasting protection in rhesus macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995;11:909-919.
157. Biberfeld G, Thorstensson R, Putkonen P. Protection against HIV-2 and SIV in macaques vaccinated against HIV-2. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996;12:443-446.
158. Myagkikh M, Alipanah S, Markham PD, Tartaglia J, Paoletti E, Gallo RC et al. Multiple immunizations with attenuated poxvirus HIV type 2 recombinants and subunit boosts required for protection of rhesus macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996;12:985-992.
159. Girard M. Homologous and heterologous protection from HIV-1 infection in chimpanzees. In: Girard M and Dodet B, editors. *X Colloque des cent gardes. Retroviruses of human AIDS and related animal diseases*, Francia, 1995:179-183.
160. Girard M, Meigner B, Barré-Sinoussi F. Vaccine protection of chimpanzees against infection by heterologous HIV-1. *J Virol* 1995;69:6239-6248.

Recibido en octubre de 1997. Aprobado en noviembre de 1997.