



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 079**

51 Int. Cl.:

A61K 39/21 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

C12N 15/49 (2006.01)

C12N 15/89 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02791473 .8**

96 Fecha de presentación : **26.07.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1411979**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2004**

54

Título: **Vacuna que comprende GP120 y NEF y/o TAT para la inmunización contra el VIH.**

30

Prioridad: **27.07.2001 GB 0118367**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.07.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.07.2011

73

Titular/es: **GlaxoSmithKline Biologicals S.A.**
89 rue de l'Institut
1330 Rixensart, BE
GLAXO GROUP LIMITED

72

Inventor/es: **Ertl, Peter Franz;**
Tite, John Philip;
Van Wely, Catherine Ann y
Voss, Gerald

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 363 079 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

Vacuna que comprende GP120 y NEF y/o TAT para la inmunización contra el VIH

La presente invención se refiere a nuevos usos de proteínas del VIH en medicina y composiciones de vacuna que contienen dichas proteínas de VIH. En particular, la invención se refiere al uso de las proteínas Tat del VIH y gp120 del VIH en combinación. Además, la invención se refiere al uso de las proteínas Nef y gp120 del VIH en combinación. La invención también se refiere a ADN que codifica Tat y/o Nef del VIH (en lo sucesivo en el presente documento ADN de Tat y/o ADN de Nef) y ADN que codifica la proteína gp120 del VIH (en lo sucesivo en el presente documento ADN de gp120) y a vectores que comprenden dichos ADN. La invención se refiere, en particular, a administrar las proteínas y/o ADN en un programa de sensibilización-refuerzo a través de un enfoque de bombardeo de partículas.

El VIH-1 es la causa principal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), que se considera uno de los mayores problemas de salud en todo el mundo. Aunque se han realizado exhaustivas y extensas investigaciones en todo el mundo para producir una vacuna, hasta ahora dichos esfuerzos no han tenido éxito.

La glicoproteína de la cubierta del VIH gp120 es la proteína viral que se usa para la fijación a la célula huésped. Esta fijación está mediada por la unión a dos moléculas de superficie de los linfocitos T colaboradores y de los macrófagos, conocidos como CD4, y a uno de los dos receptores de quimiotaxis CCR-4 o CXCR-5. La proteína gp120 se expresa primero como una molécula precursora más grande (gp160), que después se escinde postraduccionalmente para dar gp120 y gp41. La proteína gp120 se conserva sobre la superficie del virión mediante unión a la molécula gp41, que se inserta en la membrana del virus.

La proteína gp120 es la diana principal de los anticuerpos neutralizantes, pero, por desgracia, las regiones más inmunogénicas de las proteínas (bucle V3) son también las partes más variables de la proteína. Por tanto, se piensa que el uso de gp120 (o de su precursora, gp160) como antígeno de vacuna para producir anticuerpos neutralizantes es de uso limitado para una vacuna ampliamente protectora. La proteína gp120 también contiene epítomos que son reconocidos por linfocitos T citotóxicos (LTC). Estas células efectoras son capaces de eliminar las células infectadas por virus y, por tanto, constituyen un segundo mecanismo inmunitario antiviral fundamental. En contraste con las regiones diana de los anticuerpos neutralizantes. Algunos epítomos de los LTC parecen estar relativamente conservados entre diferentes cepas de VIH. Por este motivo, gp120 y gp160 se consideran útiles componentes antigénicos en las vacunas que están dirigidas a producir respuestas inmunitarias celulares (particularmente de LTC).

Se han descrito proteínas que no pertenecen a la cubierta del VIH-1 e incluyen, por ejemplo, proteínas de la estructura interna, tales como los productos de los genes *gag* y *pol* y otras proteínas estructurales tales como Rev, Nef, Vif y Tat (Greene y col., *New England J. Med.*, 324, 5, 308 et seq (1991) y Bryant y col. (Ed. Pizzo), *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 11, 5, 390 y sig.(1992).

Las proteínas Tat y Nef del VIH son proteínas tempranas, es decir, se expresan en estadios tempranos de la infección y en ausencia de proteínas estructurales.

En una presentación en una conferencia (C. David Pauza, Immunization with Tat toxoid attenuates SHIV89.6PD infection in rhesus macaques, 12th Cent Gardes meeting, Mames-La-Coquette, 26.10.1999), se describieron experimentos en los que se inmunizó a macacos rhesus con el toxoide Tat solo o en combinación con una vacuna de combinación con la glicoproteína de la cubierta gp160 (una dosis del virus variolovacunal recombinante y una dosis de la proteína recombinante). No obstante, los resultados observados mostraron que la presencia de la glicoproteína de la cubierta no proporcionaba ventajas sobre los experimentos realizados con Tat sola.

No obstante, los autores han descubierto que el inmunógeno que contiene Tat y/o Nef (especialmente una proteína de fusión Nef-Tat) actúa de forma sinérgica con gp120 en la protección de monos rhesus de una exposición a patógenos con el virus quimérico de la inmunodeficiencia humana-simio (VIHS). Hasta la fecha, la infección por SHIV de macacos rhesus se considera el modelo animal más relevante para el SIDA humano. Por tanto, los autores han usado este modelo pre-clínico para evaluar la eficacia protectora de vacunas que contienen un antígeno de gp120 y un antígeno que contiene Nef y Tat bien solo o en combinación. El análisis de dos marcadores de infección viral y patogenicidad, el porcentaje de células positivas para CD4 en la sangre periférica y la concentración de genomas de ARN de SHIV libres en el plasma de monos indicó que los dos antígenos actuaban en sinergia. La inmunización con gp120 o NefTat + Nef de SIV solos no dio como resultado ninguna diferencia en comparación con la inmunización con un adyuvante solo. En contraste, la administración de la combinación de los antígenos gp120 y NefTat + Nef de SIV dio como resultado una marcada mejora de los dos parámetros mencionados con anterioridad en todos los animales de dichos grupos experimentales concretos.

Como se ha descrito con anterioridad, la proteína NefTat, la proteína Nef y la proteína gp120 del SIV dan una respuesta potenciada sobre la que se observa cuando se usan NefTat + Nef del SIV o la gp120 por separado. Esta respuesta potenciada, o sinergia, se puede observar en una disminución de la carga viral como resultado de la vacunación con estas proteínas combinadas. Como alternativa, o de forma adicional, la respuesta potenciada se manifiesta con un mantenimiento de los niveles de CD4+ sobre los niveles observados en ausencia de vacunación con NefTat del VIH, Nef

del SIV y gp120 del VIH. El efecto sinérgico se atribuye a la combinación de gp120 y Tat o de gp120 y Nef, o gp120 y Nef y Tat.

Se ha descubierto que no solo las proteínas Nef, Tat o NefTat se combinan o se administran de forma ventajosa con la proteína gp120. Las mismas ventajas se observan cuando se administra ADN que codifica Nef, tat o NefTat con gp120 (proteína o el ADN correspondiente).

Se ha descubierto que las proteínas anteriores, o el ADN que codifica las proteínas, pueden administrarse de forma ventajosa a través de una estrategia de sensibilización-refuerzo. En un aspecto, la presente invención se refiere a dicha administración a través de un enfoque de bombardeo. De acuerdo con esto, la invención proporciona el uso de:

a) una proteína o polinucleótido de Tat del VIH; o

b) una proteína o polinucleótido de Nef del VIH; o

c) una proteína o polinucleótido de Tat del VIH unido a una proteína o polinucleótido de Nef del VIH;

U una proteína o polinucleótido de gp120 del VIH en la fabricación de una vacuna adecuada para una administración de sensibilización-refuerzo para la inmunización profiláctica o terapéutica de seres humanos contra el VIH, en la que la dosis de sensibilización es la proteína gp120 del VIH y la proteína Tat del VIH y/o la proteína Nef del VIH, y la dosis de refuerzo es el polinucleótido de gp120 del VIH y el polinucleótido de Tat del VIH y/o el polinucleótido de Nef del VIH, y en la que el polinucleótido se libera a través de un enfoque de bombardeo.

Se conocen numerosos procedimientos de llevar a cabo un enfoque de bombardeo de partículas. Véase, por ejemplo, el documento WO 91/07487. En un ejemplo ilustrativo, se puede alcanzar aceleración de partículas dirigida por gas con dispositivos tales como los fabricados por Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, UK) y Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI), algunos ejemplos de los cuales se describen en las patentes de EE.UU. n° 5.846.796; 6.010.478; 5.865.796; 5.584.807; y la patente EP n° 0500 799. Esto ofrece un abordaje de liberación sin aguja en el que una formulación en polvo seco de partículas microscópicas, revestidas con una sustancia como un polinucleótido, se acelera a alta velocidad en un chorro de gas helio generado por un dispositivo manual, que propulsa las partículas hacia un tejido diana de interés, habitualmente la piel. Preferentemente, las partículas son perlas de oro de un diámetro de 0,4-4,0 μm , más preferentemente de 0,6-2,0 μm , y, el polinucleótido, preferentemente ADN, recubre dichas perlas y, después, se introducen en un cartucho para su colocación en la "pistola gónica".

La adición de otras proteínas del VIH o del ADN que las codifica puede además potenciar el efecto sinérgico que se observó entre gp120 y Tat y/o Nef. Estas otras proteínas pueden también actuar de forma sinérgica con componentes individuales de la vacuna que contiene gp120, Tat y/o Nef, y no requieren la presencia de la combinación antigénica original completa. Las proteínas adicionales pueden ser proteínas reguladoras de VIH, tales como las Rev, Vif, Vpu y Vpr. También pueden ser proteínas estructurales derivadas de los genes *gag* o *pol* del VIH.

El gen *gag* del VIH codifica una proteína precursora p55, que pueden ensamblarse de forma espontánea en partículas similares a virus (VLP) inmaduras. Después, el precursor se escinde proteolíticamente en las proteínas estructurales principales p24 (cápside) y p18 (matriz) y en varias proteínas más pequeñas. Tanto la proteína precursora p55 como sus principales derivados p24 y p18 pueden considerarse antígenos vacunales adecuados que pueden además potenciar el efecto sinérgico observado entre gp120 y Tat y/o Nef. La precursora p55 y la proteína de la cápside p24 pueden usarse como VLP o como proteínas monoméricas.

La proteína Tat del VIH para usar en la presente invención puede, opcionalmente, estar unida a una proteína Nef del VIH, por ejemplo como proteína de fusión.

La proteína Tat del VIH, la proteína Nef del VIH o la proteína de fusión NefTat para usar en la presente invención pueden tener una cola de histidina en el extremo C que, preferentemente, comprende entre 5-10 residuos de histidina. La presencia de una cola de histidina (o "His") ayuda en la purificación.

En una realización preferida, las proteínas se expresan con una cola de histidina que comprende entre 5 y 10 y, preferentemente seis, residuos de histidina. Estos proporcionan ventajas ayudando en la purificación. Se ha comunicado la expresión por separado, en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), de Nef (Macreadie I.G. y col., 1993, *Yeast* 9 (6) 565-573) y de Tat (Braddock M y col., 1989, *Cell* 58 (2) 269-79). La proteína Nef y las proteínas Gag p55 t p18 están miristoiladas. La expresión de Nef y Tat por separado en un sistema de expresión *Pichia* (construcciones Nef-His y Tat-His) y la expresión de una construcción de fusión Nef-Tat-His se han descrito anteriormente en el documento WO99/16884.

Las secuencias de ADN y de aminoácidos de las proteínas de fusión Nef-HIS (Sec ID n° 8 y 9), Tat-His (SEC ID N° 10 y 11) y Nef-Tat-His (SEC ID N° 12 y 13) se exponen en la Figura 1.

Las proteínas del VIH se pueden usar en su conformación nativa o, más preferentemente, se pueden modificar para uso en vacunas. Estas modificaciones pueden ser necesarias por motivos técnicos relacionados con el procedimiento de

- purificación o se pueden usar para inactivar biológicamente una o varias propiedades funcionales de la proteína Tat o Nef. Por tanto, la invención abarca el uso de derivados de las proteínas o polinucleótidos del VIH, particularmente ADN, que pueden estar, por ejemplo, mutados. El término "mutado" se usa en el presente documento para querer decir un ADN o molécula proteica que ha sufrido delección, adición o sustitución de uno o más nucleótidos o aminoácidos usando técnicas bien conocidas para mutagénesis dirigida a sitio o cualquier otro procedimiento convencional.
- 5 Por ejemplo, se puede mutar una proteína Tat mutante de modo que sea biológicamente inactiva al tiempo que mantiene sus epítomos inmunogénicos. Un posible gen tat mutado, construido por D.Clements (Tulane University), (que se origina del clon molecular BH10) porta mutaciones en la región del sitio activo (Lys41→Ala) y en el motivo RGD (Arg78→Lys y Asp80→Glu) (Virology 235: 48-64, 1997).
- 10 Un Tat mutado se ilustra en la Figura 1 (SEC ID N° 22 y 23) como en Nef-Tat mutante en His (SEC ID N° 24 y 25).
- Las proteínas Tat o Nef del VIH para usar en la presente invención se pueden modificar mediante procedimientos químicos durante el procedimiento de purificación para convertir a las proteínas en estables y monoméricas. Un procedimiento para prevenir la agregación oxidante de una proteína tal como Tata o Nef es el uso de modificaciones químicas de los grupos tiol de la proteína. En una primera etapa, los puentes disulfuro se reducen mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT, beta-mercaptoetanol o glutatión. En una segunda etapa, los tioles resultantes se bloquean mediante la reacción con un agente alquilante (por ejemplo, puede hacerse que la proteína reaccione con yodoacetamida). Dicha modificación química no modifica las propiedades funcionales de Tat o Nef evaluadas mediante ensayos de unión celular e inhibición de la linfoproliferación de células mononucleares de sangre periférica humana.
- 15 Debe entenderse que la invención también abarca el uso de fragmentos de las proteínas de longitud completa, con la condición de que los fragmentos comprendan al menos un epítipo inmunogénico.
- La proteína Tat del VIH y las proteínas gp120 del VIH se pueden purificar mediante los procedimientos indicados en los ejemplos adjuntos.
- Mediante técnicas convencionales se puede preparar una cantidad inmunoprotectora o inmunoterapéutica de los componentes Tat y/o Nef o NefTat y gp120 (proteína o ADN) para usar en la invención.
- 25 La preparación vacunal generalmente se describe en New Trends and Developments in Vaccines, editado por Voller y col., University Park Press, Baltimore, Maryland, EE.UU. 1978. Fullerton, la patente de EE.UU. 4.235.877 describe la encapsulación en liposomas. La conjugación de proteínas con macromoléculas se divulga en, por ejemplo, Likhite, patente de EE.UU. 4.372.945 y en la patente de EE.UU. 4.474.757 de Armor y col.
- La cantidad de proteína en una dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en los vacunados típicos. Tal cantidad variará en función de qué inmunógenos específicos se emplean. Generalmente cabe esperar que cada dosis comprenda 1-1000 µg de cada proteína, preferentemente 2-200 µg, más preferentemente 4-40 µg, de Tat o Nef o NefTat, y, preferentemente 1-150 µg, más preferentemente 2-25 µg de gp120. Una cantidad óptima para una vacuna concreta puede determinarse mediante estudios convencionales que implican observación de títulos de anticuerpos y otras respuestas en sujetos. Un ejemplo concreto de una dosis de vacuna comprenderá 20 µg de NefTat y 5 o 20 µg de gp120. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir un refuerzo en aproximadamente 4 semanas y una segunda inmunización de refuerzo posterior.
- 30 Preferentemente, las proteínas de la presente invención se adyuvan en una formulación de vacuna de la invención. Opcionalmente, los polinucleótidos usados en la presente invención se adyuvan y se pueden liberar en una formulación con un adyuvante o por separado del adyuvante, bien simultánea o secuencialmente. Los adyuvantes se describen, en general, en Vaccine Design - the Subunit and Adjuvant Approach, editado por Powell and Newman, Plenum Press, New York, 1995.
- 40 Adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio, tal como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio, hierro o cinc, o pueden ser una suspensión insoluble de tirosina acilada o azúcares acilados, polisacáridos derivados catiónica o aniónicamente o polifosfacenos.
- 45 En la formulación de vacunas para usar en la invención se prefiere que la composición adyuvante induzca una respuesta Th1 preferencial. No obstante, se entenderá que no quedan excluidas otras respuestas, incluidas otras respuestas humorales.
- Se genera una respuesta inmunitaria frente a un antígeno a través de la interacción del antígeno con las células del sistema inmunitario. La respuesta inmunitaria resultante puede distinguirse ampliamente en dos categorías extremas, siendo respuestas inmunitarias humorales o celulares (que tradicionalmente se caracterizan por mecanismos de protección efectores de anticuerpos y celulares, respectivamente). Estas categorías de respuesta se han denominado respuestas de tipo Th1 (respuesta celular) y respuestas inmunitarias de tipo Th2 (respuesta humoral).
- 50 Las respuestas inmunitarias extremas de tipo Th1 se pueden caracterizar por la generación de linfocitos T citotóxicos

restringidos por haplotipo específicos de antígeno y respuestas celulares de tipo asesino natural. En ratones, las respuestas de tipo Th1 a menudo se caracterizan por la generación de anticuerpos del subtipo IgG2a, mientras que en el ser humano estas corresponden a los anticuerpos de tipo IgG1. Las respuestas inmunitarias de tipo Th2 se caracterizan por la generación de una amplia gama de isotipos de inmunoglobulina, incluidas en ratones IgG1, IgA y IgM.

5 Se puede considerar que la fuerza impulsora detrás del desarrollo de estos dos tipos de respuestas inmunitarias son citocinas, una serie de mensajeros proteicos identificados que sirven para ayudar a las células del sistema inmunitario y dirigir la eventual respuesta inmunitaria hacia una respuesta Th1 o Th2. Por tanto, niveles elevados de citocinas de tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunitarias celulares al antígeno dado, mientras que niveles elevados de citocinas de tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humorales al antígeno.

10 Es importante recordar que la distinción entre respuestas inmunitarias Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad, un individuo soportará una respuesta inmunitaria que se describe como predominantemente Th1 o predominantemente Th2. No obstante, a menudo es conveniente considerar las familias de citocinas en términos de lo descrito en los clones de linfocitos T CD4 +ve por Mosmann and Coffman (Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173).
 15 Tradicionalmente, las respuestas de tipo Th1 se asocian con la producción de las citocinas INF- γ e IL-2 por parte de los linfocitos T. Otras citocinas a menudo asociadas directamente con la inducción de respuestas inmunitarias de tipo Th1 no son producidas por los linfocitos T, tales como la IL-12. En contraste con ello, las respuestas de tipo Th2 se asocian con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y el factor de necrosis tumoral β (TNF- β).

20 Se sabe que ciertos adyuvantes de vacunas son particularmente adecuados para la estimulación de respuestas de citocinas de tipo Th1 o Th2. Tradicionalmente, los mejores indicadores del equilibrio Th1:Th2 de la respuesta inmunitaria tras una vacunación o infección incluye la medición directa de la producción de citocinas Th1 o Th2 por parte de los linfocitos T *in vitro* tras la reestimulación con antígeno, y/o la medición de la proporción IgG1:IgG2a de respuestas de anticuerpo específico de antígeno.

25 Por tanto, un adyuvante de tipo Th1 es uno que estimula las poblaciones de linfocitos T aisladas para producir niveles elevados de citocinas de tipo Th1 cuando se reestiman con el antígeno *in vitro* e induce respuestas de inmunoglobulina específicas de antígeno asociadas con el isotipo de tipo Th1.

Los inmunoestimuladores de tipo Th1 preferidos que se pueden formular para producir adyuvantes adecuados para usar en la presente invención incluyen, sin estar restringidos a ellos, los siguientes.

30 Lípido monofosforilo A, en particular monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL), es un inmunoestimulador de tipo Th1 preferido para usar en la invención. El 3D-MPL es un adyuvante bien conocido fabricado por Ribi Immunochem, Montana. Químicamente, a menudo se suministra en forma de una mezcla de monofosforil lípido A 3-O-desacilado con 4, 5, o 6 cadenas aciladas. Se puede purificar y preparar mediante los procedimientos enseñados en el documento GB 2122204B, referencia que también divulga la preparación de difosforil lípido A y variantes 3-O-desaciladas del mismo. Se han descrito otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos (documentos US 6.005.099 y EP 0 729 473 B1; Hilgers y col., 1986, Int.Anch.Allergy.Immunol., 79 (4):392-6; Hilgers y col., 1987, Immunology, 60(1):141-6; y el documento EP 0 549 074 B1).
 35 Una forma preferida de 3D-MPL está en forma de una formulación particulada que tiene un tamaño de partícula pequeño inferior a 0,2 μ m de diámetro y su procedimiento de fabricación se divulga en el documento 0 689 454.

40 Las saponinas son también inmunoestimuladores Th2 preferidos de acuerdo con la invención. Las saponinas son adyuvantes bien conocidos y se enseñan en: Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine vol 2 pp 363-386). Por ejemplo, Quil A (derivado de la corteza del árbol de sudamérica Quillaja Saponaria Molina), y fracciones de la misma, se describen en el documento US 5.057.540 y en "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2):1-55; y el documento EP 0 362 279 B1. Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas mediante HPLC de Quil A) se han descrito como potentes adyuvantes sistémicos y el procedimiento de su producción se divulga en la patente de EE.UU. n°
 45 5.057.540 y el documento EP 0 362 279 B1. En estas referencias también se describe el uso de QS7 (una fracción no hemolítica de Quil-A) que actúa como potente adyuvante para vacunas sistémicas. El uso de QS21 se describe adicionalmente en Kensil y col. (1991. J. Immunology vol 146, 431-437). Las combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina también se conocen (documento WO 99/10008). En los documentos WO 96/33739 and WO 96/11711 se describen sistemas de adyuvantes particulados que comprenden fracciones de QuilA, tales como QS21 y QS7.

50 Otro inmunoestimulador preferido es un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene dinucleótidos CpG no metilados ("CpG"). El CpG es una abreviatura de los motivos de dinucleótidos de citosina-guanosina presentes en ADN. CpG se conoce en la técnica como un adyuvante cuando se administra por vía tanto sistémica como mucosa (documentos WO 96/02555, EP 468520, Davis y col., J.Immunol, 1998, 160(2):870-876; McCluskie y Davis, J.Immunol., 1998, 161(9):4463-6). Tradicionalmente se ha observado que la fracción de ADN de BCG podría ejercer un efecto anti-tumoral. En otros
 55 estudios, se mostró que oligonucleótidos sintéticos derivados de secuencias génicas de BCG eran capaces de inducir efectos inmunoestimuladores (tanto *in vitro* como *in vivo*). Los autores de estos estudios concluyeron que ciertas

secuencias palindrómicas, incluido un motivo CG central, realizaba esta actividad. El papel central del motivo CG en inmunoestimulación se aclaró después en una publicación de Krieg, Nature 374, p546 1995. El análisis detallado ha demostrado que el motivo CG tiene que estar en un determinado contexto de secuencia y que dichas secuencias son frecuentes en el ADN bacteriano pero raros en el ADN de vertebrados. La secuencia inmunoestimuladora a menudo es:

5 Purina, Purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en la que el motivo CG no está metilado, pero otras secuencias CpG no metiladas se sabe que son inmunoestimuladoras y pueden usarse en la presente invención.

En ciertas combinaciones de los seis nucleótidos hay una secuencia palindrómica. Varios de estos motivos, como repeticiones de un motivo o una combinación de diferentes motivos, pueden estar presentes en el mismo oligonucleótido. La presencia de una o más de estas secuencias inmunomoduladoras que contienen oligonucleótidos puede activar varias

10 subpoblaciones inmunológicas. Incluidas células asesinas naturales (que producen interferón γ y tienen actividad citolítica) y macrófagos (Wooldrige y col. Vol 89 (no. 8), 1977). También se ha mostrado que otras secuencias que contiene CpG no metilado que no tienen esta secuencia consenso son inmunomoduladoras.

CpG, cuando se formula en vacunas, se administra, en general, en solución libre junto con el antígeno libre (documento WO 96/02555; McCluskie and Davis, supra) o conjugados covalentemente con un antígeno (documento WO 98/16247) o formulados con un vehículo tal como hidróxido de aluminio (antígeno de superficie de la hepatitis) Davis y col. ant. ; Brazolot-Millan y col., Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 1998, 95(26), 15553-8).

15 Dichos inmunoestimuladores, tal como se ha descrito con anterioridad, se pueden formular junto con vehículos, tales como, por ejemplo, liposomas, emulsiones de aceite en agua y/o sales metálicas, incluidas sales de aluminio (tales como hidróxido de aluminio). Por ejemplo, 3D-MPL pueden formularse con hidróxido de aluminio (documento EP 0 689 454) o emulsiones de aceite en agua (documento WO 95/17210); QS21 puede formularse de forma ventajosa con liposomas que contienen colesterol (documento 95/17210), emulsiones de aceite en agua (documento WO 95/17210) o alumbre (documento WO 98/15287); el CpG puede formularse con alumbre (Davis y col., anteriormente; Brazolot-Millan anteriormente) o con otros vehículos catiónicos.

Dichos inmunoestimuladores, tal como se ha descrito con anterioridad, se pueden formular junto con vehículos, tales como, por ejemplo, liposomas, emulsiones de aceite en agua y/o sales metálicas, incluidas sales de aluminio (tales como hidróxido de aluminio). Por ejemplo, 3D-MPL pueden formularse con hidróxido de aluminio (documento EP 0 689 454) o emulsiones de aceite en agua (documento WO 95/17210); QS21 puede formularse de forma ventajosa con liposomas que contienen colesterol (documento 95/17210), emulsiones de aceite en agua (documento WO 95/17210) o alumbre (documento WO 98/15287); el CpG puede formularse con alumbre (Davis y col., anteriormente; Brazolot-Millan anteriormente) o con otros vehículos catiónicos.

20 También se prefieren combinaciones de inmunoestimuladores, en particular una combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina (documentos WO 94/00153; WO 95/17210; WO 96/33739; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241), más particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se ha divulgado en el documento WO 94/00153. Como alternativa, una combinación de CpG más una saponina, tal como QS21 también forma un potente adyuvante para usar en la presente invención.

25 Por tanto, sistemas adyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, preferentemente 3DMPL, junto con una sal de aluminio. Un sistema potenciado implica la combinación de un monofosforil lípido a y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 and 3D-MPL, tal como se divulga en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en la que la QS21 se inactiva con liposomas que contienen colesterol (DQ) como se divulga en el documento WO 96/33739.

30 Una formulación adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210 y es otra formulación preferida para usar en la invención.

35 Otra formulación preferida comprende un oligonucleótido CpG solo o junto con una sal de aluminio.

Otra formulación preferida comprende un oligonucleótido CpG solo o junto con una sal de aluminio.

Combinaciones de adyuvante y/o vehículo particularmente preferidas son las siguientes:

i) 3D-MPL + QS21 en DQ

ii) Alumbre + 3D-MPL

40 iii) Alumbre + QS21 en DQ + 3D-MPL

iv) Alumbre + CpG

v) 3D-MPL + QS21 en DQ + emulsión de aceite en agua

vi) CpG

45 Como ya se ha indicado, la vacuna puede contener polinucleótidos, preferentemente ADN, que codifica uno o más de los polipéptidos Tat, Nef y gp120, de modo que el polipéptido se genera *in situ*.

Las construcciones de ADN *per se*, especialmente las descritas en el presente documento, también forman parte de la invención.

50 El polinucleótido puede estar presente en cualquiera de una diversidad de sistemas de liberación conocidos para los expertos habituales en la técnica, incluidos los sistemas de expresión de ácido nucleico tales como ADN de plásmido, sistemas de expresión bacterianos y virales. En la técnica se conocen bien numerosas técnicas de liberación génica, tales

como las descritas por Rolland, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143-198, 1998 y referencias citadas en el presente documento. Se conoce la liberación basada en plásmido de genes, particularmente para inmunización o terapia génica. Por ejemplo, la administración de ADN desnudo mediante inyección en músculo de ratón se indica en la solicitud de patente internacional WO90/11092 de Vical.

- 5 Johnston y col. en el documento WO 91/07457 describen procedimientos de transferencia de un gen a células de vertebrados mediante el uso de microproyectiles que se han recubierto con un polinucleótido que codifica un gen de interés y acelerando las micropartículas de modo que las micropartículas puedan penetrar en la célula diana.

Normalmente, las vacunas de ADN consisten en un vector plasmídico bacteriano en el que se inserta un promotor viral fuerte, el gen de interés que codifica un péptido antigénico y secuencias de poliadenilación/terminación de la transcripción.

- 10 El gen de interés puede codificar una proteína completa, una proteína de fusión que comprende diferentes antígenos o, simplemente, una secuencia peptídica antigénica relacionada con el patógeno, tumor u otro agente contra el que se quiere proteger. Por tanto, el plásmido puede codificar un fragmento de una proteína completa, con la condición de que el fragmento comprenda al menos un epítipo inmunogénico de la proteína completa. El plásmido se puede cultivar en bacterias, tales como, por ejemplo, E. coli. Y aislarse y prepararse en un medio adecuado, dependiendo de la vía de administración prevista, antes de su administración al huésped. Tras la administración, el plásmido es captado por las células del huésped, donde el péptido codificado se produce. Preferentemente, el vector plasmídico se fabricará sin un origen de replicación que sea funcional en células eucarióticas para evitar la replicación del plásmido en el mamífero huésped y la integración dentro del ADN cromosómico del animal afectado. Todas estas características se pueden aplicar por separado o en combinación con la presente invención.

- 20 La vacunación con ADN tiene numerosas ventajas con respecto a las técnicas de vacunación tradicionales. En primer lugar, se predice que, dado que las proteínas que están codificadas en la secuencia de ADN se sintetizan en el huésped, la estructura o conformación de la proteína será similar a la de la proteína nativa asociada con el estado de enfermedad. También es probable que la vacunación con ADN ofrezca protección contra diferentes cepas de un virus a través de la generación de una respuesta de linfocitos T citotóxicos que reconozcan epítomos de proteínas conservadas. Además, dado que los plásmidos son capturados por las células huésped, donde se puede producir la proteína antigénica, se producirá una respuesta inmunitaria duradera. La tecnología también ofrece la posibilidad de combinar diversos inmunógenos en una única preparación, para facilitar la inmunización simultánea en relación con una serie de estados de enfermedad.

- 30 En Donnelly y col. "DNA vaccines" Ann. Rev Immunol. 1997 15: 617-648 se proporciona información básica útil en relación con la vacunación con ADN.

En una realización preferida, el ADN se puede liberar a través de un enfoque con bombardeo de partículas, por ejemplo una "pistola de genes", tal como se ha descrito con anterioridad en el presente documento.

- 35 Sistemas de expresión de ácido nucleico adecuados contienen las secuencias de ADN necesarias para la expresión en el paciente (tal como un promotor adecuado y una señal de terminación). Cuando el sistema de expresión es un microorganismo vivo recombinante, tal como un virus o una bacteria, el gen de interés se puede insertar en el genoma de un virus o bacteria recombinante vivo. La inoculación y la infección *in vivo* con este vector vivo conducirá a la expresión *in vivo* del antígeno y a la inducción de respuestas inmunitarias. Los virus y bacterias usados para este fin son, por ejemplo: poxvirus (p. ej., variolavirus, virus de la viruela aviar, virus de la viruela del canario, poxvirus modificados, por virus de Ankara modificado (MVA)), alfavirus (virus Sindbis, virus del Semliki Forest, virus de la encefalitis equina venezolana), flavivirus (virus de la fiebre amarilla, virus del Dengue, virus de la encefalitis japonesa), adenovirus, virus adenoasociados, picornavirus (poliovirus, rinovirus), herpesvirus (virus de la varicela zoster etc.), Listeria, Salmonella, Shigella, Neisseria, BDG. Estos virus y bacterias pueden ser virulentos o pueden atenuarse de diversos modos para obtener vacunas con microorganismos vivos.

- 45 Por tanto, los componentes Nef, Tat y gp120 de una vacuna preferida de acuerdo con la invención se pueden proporcionar en forma de polinucleótidos o ADN recombinante que codifica las proteínas deseadas. Los polinucleótidos empleados en la invención pueden codificar una proteína completa, una proteína de fusión que comprende diferentes antígenos o una o más secuencias peptídicas antigénicas. Por tanto, los polinucleótidos pueden codificar un fragmento de una proteína completa, con la condición de que el fragmento comprenda al menos un epítipo inmunogénico de la proteína completa.

- 50 Al menos uno de los ADN para Nef, Tat, NefTat o gp120 puede ser, preferentemente, un codón optimizado, tal como se describe en, por ejemplo, Andre S. Seed B. Eberle J. Schraut W. Bultmann A. Haas J. (1998): Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage, Journal of Virology. 72(2):1497-503. En un aspecto preferido, el ADN que codifica la gp120 es codón optimizado.

- 55 La optimización de codones se usa para optimizar las secuencias polinucleotídicas para expresión en células de mamífero. Es decir, la secuencia se optimiza para simular el uso de codones de los genes en células de mamífero.

En una realización de la presente invención, la secuencia polinucleotídica de Nef, tat, NefTat o gp120 tiene un patrón de uso de codones que se asemeja al de los genes de mamíferos altamente expresados, particularmente genes humanos. Preferentemente, la secuencia polinucleotídica es una secuencia de ADN. Deseablemente, el patrón de uso de codones de la secuencia polinucleotídica es la habitual de genes humanos altamente expresados.

5 El código de ADN tiene 4 letras (A, T, C y G) y las usa para deletrear “codones” de tres letras que representan los aminoácidos que codifican las proteínas en los genes de un organismo. La secuencia lineal de los codones a lo largo de la molécula de ADN se traduce en la secuencia lineal de aminoácidos en la(s) proteína(s) codificada(s) por dichos genes. El código es altamente degenerado, con 61 codones que codifican para los 20 aminoácidos naturales y 3 codones que representan señales de “terminación”. Por tanto, los aminoácidos están codificados por más de un codón, de hecho varios
10 están codificados por cuatro o más codones diferentes.

15 Cuando se dispone de más de un codón para codificar un aminoácido dado, se ha observado que los patrones de uso de codones de los organismos son altamente no aleatorios. Especies diferentes muestran un sesgo diferente en su selección de codones y, además, el uso de codones puede ser marcadamente diferente en una única especie entre genes que se expresan a niveles altos y bajos. Este sesgo es diferente en virus, plantas, bacterias y células de mamífero, y algunas especies muestran un sesgo más fuerte alejado de una selección aleatoria del codón con respecto a otras. Por ejemplo, seres humanos y otros mamíferos están menos fuertemente sesgados que ciertas bacterias o virus. Por estas razones, existe una probabilidad significativa de que un gen de mamífero expresado en E.coli o un gen viral expresado en células de mamífero tengan una distribución inadecuada de codones para una expresión eficiente. Se cree que la presencia en una secuencia de ADN heterólogo de grupos de codones que rara vez se observan en el huésped en el que se va a producir la expresión es predictiva de niveles bajos de expresión heteróloga en dicho huésped.
20

25 En los polinucleótidos de la presente invención, el patrón de uso de codones está alterado con respecto al habitual de los virus de inmunodeficiencia humana para representar más estrechamente el sesgo del codón del organismo diana, por ejemplo un mamífero, especialmente un ser humano. El “coeficiente de uso de codones” es una medida de lo estrechamente que el patrón de un codón de una secuencia polinucleotídica dada se asemeja al de una especie diana. Las frecuencias de los codones pueden obtenerse en fuentes bibliográficas para los genes altamente expresados de muchas especies (véase, p. ej., Nakamura y col. Nucleic Acids Research 1996, 24:214-215). Las frecuencias de los codones para cada uno de los 61 codones (expresadas en forma del número de apariciones por 1000 codones de la clase de genes seleccionada) se normalizan para cada uno de los veinte aminoácidos naturales, de modo que el valor para el codón usado con mayor frecuencia para cada aminoácido se establece en 1 y las frecuencias para los codones menos
30 frecuentes se esclava para que queden entre cero y 1. Por tanto, a cada uno de los 61 codones se le asigna un valor de 1 o menor para los genes altamente expresados de la especie diana. Con el fin de calcular un coeficiente de uso de codones para un polinucleótido específico con respecto a los genes de expresión alta de dicha especie, se anota el valor escalado para cada codón del polinucleótido específico y se toma la media geométrica de todos estos valores (dividiendo la suma de los registros naturales de estos valores por el número total de codones y se efectúa el antilog). El coeficiente tendrá un valor entre cero y 1 y cuando mayor sea el coeficiente, más codones en el polinucleótido son codones de uso
35 frecuente. Si una secuencia de polinucleótidos tiene un coeficiente de uso de codones de 1, todos los codones son los codones “más frecuentes” para los genes altamente expresados de la especie diana.

40 De acuerdo con la presente invención, el patrón de uso de codones del polinucleótido excluirá, preferentemente, los codones raros que representan menos del 10% del uso del codón para un aminoácido en genes altamente expresados del organismo diana. En una realización preferida alternativa, el polinucleótido excluirá los codones con un valor RSCU inferior a 0,2 en genes altamente expresados del organismo diana. Un valor de uso de codones sinónimo relativo (RSCU) es el número observado de codones dividido por el número previsto si todos los codones para ese aminoácido se usaran con igual frecuencia. Un polinucleótido de la presente invención tendrá, en general, un coeficiente de uso de codones para genes humanos altamente expresados superior a 0,3, preferentemente superior a 0,4, más preferentemente superior a
45 0,5. Las tablas del uso de codones para seres humanos también se pueden encontrar en Genebank.

En comparación, un gen de acción beta altamente expresado tiene un RSCU de 0,747. La tabla de uso de codones para un *homo sapiens* se expone a continuación:

Tabla de uso de codones:

***Homo sapiens* [gbpri]: 27143 CDS (12816923 codones) Tabla convencional de uso de codones**

50 campos: [tripleto] [frecuencia: **por mil**] ([número])

UUU 17,0(217684) UCU 14,8(189419) UAU 12,1(155645) UGU 10,0(127719)

UUC 20,5(262753) UCC 17,5(224470) UAC 15,8(202481) UGC 12,3(157257)

UUA 7,3(93924) UCA 11,9(152074) UAA 0,7(9195) UGA 1,3(16025)

UUG 12,5(159611) UCG 4,5(57572) UAG 0,5(6789) UGG 12,9(165930)
 CUU 12,8(163707) CCU 17,3(222146) CAU 10,5(134186) CGU 4,6(59454)
 CUC 19,3(247391) CCC 20,0(256235) CAC 14,9(190928) CGC 10,8(137865)
 CUA 7,0(89078) CCA 16,7(214583) CAA 12,0(153590) CGA 6,3(80709)
 5 CUG 39,7(509096) CCG 7,0(89619) CAG 34,5(441727) CGG 11,6(148666)
 AUU 15,8(202844) ACU 12,9(165392) AAU 17,0(218508) AGU 12,0(154442)
 AUC 21,6(277066) ACC 19,3(247805) AAC 19,8(253475) AGC 19,3(247583)
 AUA 7,2(92133) ACA 14,9(191518) AAA 24,0(308123) AGA 11,5(147264)
 AUG 22,3(285776) ACG 6,3 (80369) AAG 32,6(418141) AGG 11,3(145276)
 10 GUU 10,9(139611) GCU 18,5(236639) GAU 22,4(286742) GGU 10,8(138606)
 GUC 14,6(187333) GCC 28,3(362086) GAC 26,1(334158) GGC 22,7(290904)
 GUA 7,0(89644) GCA 15,9(203310) GAA 29,1(373151) GGA 16,4(210643)
 GUG 28,8(369006) GCG 7,5(96455) GAG 40,2(515485) GGG 16,4(209907)

GC de codificación 52,5% 1ª letra GC 56,04% 2ª letra GC 42,35% 3ª letra GC 59.13%

15 De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un vector de expresión que comprende, y es capaz de dirigir, la expresión de una secuencia polinucleotídica de Nef y/o Tat o NefTat y de gp120 de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en particular cuando el patrón de uso de codones de al menos una de las secuencias polinucleotídicas de Nef, Tat, NefTat o gp120, particularmente la secuencia de gp120, es típico de genes de mamífero altamente expresados, preferentemente de genes humanos altamente expresados. El vector es adecuado para dirigir la expresión de ADN heterólogo en células de mamífero, particularmente células de seres humanos. En una forma de realización, el vector de expresión es p7313 (véase la figura 22).

20 En un aspecto adicional, la invención proporciona una pluralidad de partículas, preferentemente partículas de oro, revestidas con ADN que comprenden uno o más vectores que codifican gp120 y nef y/o tat o nefTat. Preferentemente, las partículas se recubren con un vector sencillo que codifica gp120 y nef y tat, estos últimos más preferentemente en forma de una proteína de fusión NefTat. Más preferentemente, una o más de las secuencias presentan optimización de codones para la expresión en células humanas.

25 En un aspecto preferido, el ADN que codifica nef, tat y gp120 está presente en un vector sencillo.

30 Preferentemente, el vector comprende las secuencias de nef, tat y gp120 insertadas en 3' de un promotor IE1 de HCMV potenciado para una expresión eficiente. Este es, preferentemente, el promotor temprano inmediato de HCMV desprovisto del intrón A, pero con el exón 1.

Un vector adecuado de acuerdo con la invención es el denominado p7313. que se describe adicionalmente más adelante.

35 Los vectores que comprenden las secuencias nucleotídicas descritas en el presente documento se administran en tal cantidad que sea profiláctica o terapéuticamente eficaz. La cantidad que se va a administrar está, en general, en el intervalo de un picogramo a 1 miligramo, preferentemente de 1 picogramo a 10 microgramos, para la liberación mediada por partículas tal como se describe en el presente documento. La cantidad exacta puede variar en función del peso del paciente que se está inmunizando y la vía precisa de administración.

40 Las inmunizaciones de acuerdo con la invención se pueden realizar con una combinación de formulaciones basadas en proteínas y ADN. Las vacunas proteicas adyuvadas inducen, principalmente, respuestas inmunitarias de anticuerpos y linfocitos T colaboradores, mientras que la liberación de ADN como plásmido o como un vector vivo induce fuertes respuestas de linfocitos T citotóxicos (LTC). Por tanto, la combinación de vacunación con proteína y ADN proporcionará una amplia variedad de respuestas inmunitarias. Esto es particularmente relevante en el contexto del VIH, ya que se piensa que tanto los anticuerpos neutralizantes como los LTC son importantes para la defensa inmunitaria contra el VIH.

45 El ADN puede liberarse como ADN plasmídico o en forma de un vector vivo recombinante, por ejemplo un vector poxvirus o cualquier otro vector vivo adecuado tal como los descritos en el presente documento. Los antígenos proteicos se pueden inyectar una o varias veces, seguido de una o más administraciones de ADN, el ADN puede usarse primero para una o más administraciones seguido de una o más inmunizaciones con proteína.

Un ejemplo concreto de inmunización de sensibilización-refuerzo de acuerdo con la invención implica sensibilización con ADN en forma de un vector vivo recombinante, tal como un vector de poxvirus modificado, por ejemplo el virus Ankara modificado (MVA) o un derivado del mismo, mediante, por ejemplo, pases o manipulación genética, o un vector de alfavirus, por ejemplo el virus de la encefalitis equina venezolana, seguido de refuerzo con una proteína, preferentemente una proteína adyuvada. Opcionalmente, el ADN se adyuva con un adyuvante de vacunas de ADN adecuado conocido en la técnica.

La invención se ilustra en los ejemplos y las figuras adjuntas.

Ejemplos

General

10 El gen de Nef del aislamiento Bru/Lai (Cell 40: 9-17, 1985) se seleccionó para las construcciones de estos experimentos, ya que este gen está entre los que están más estrechamente relacionados con la Nef consenso.

El material de partida para el gen de Nef de Bru/Lai fue un fragmento de ADN de 1170 pb clonado en el vector de expresión en mamíferos pcDNA3 (pcDNA3/Nef).

15 El gen de tat se origina en el clon molecular BH10. Este gen se recibió como un clon de ADNc del HTKV III denominado pCV1 y se ha descrito en Science, 229, p69-73, 1985.

La expresión de los genes Nef y Tat podría realizarse en *Pichia* o en cualquier otro huésped.

Ejemplo 1. EXPRESIÓN DE LAS SECUENCIAS nef Y tat DEL VIH-1 en PICHIA PASTORIS.

La proteína Nef, la proteína Tat y la proteína de fusión Nef-Tat se expresaron en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* bajo el control del promotor inducible de la alcohol oxidasa (AOX1).

20 Para expresar estos genes del VIH-1 se usó una versión modificada del vector integrativo PHIL-D2 (INVITROGEN). Este vector se modificó de tal modo que la expresión de la proteína heteróloga comienza inmediatamente después del codón ATG nativo del gen AOX1 y producirá una proteína recombinante con una cola de un residuo de glicina y seis residuos de histidina. Este vector PHIL-D2-MOD se construyó clonando un enlazador oligonucleotídico entre los sitios adyacentes AsuII y EcoRI del vector PHIL-D2 (véase la Figura 2, que incluye las SEC ID N° 26 y 27). Además de la cola de His, este enlazador porta los sitios de restricción NcoI, SpeI y XbaI entre los cuales se insertaron *nef*, *tat* y el gen de fusión *nef-tat*.

1.1 CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES INTEGRATIVOS pRIT14597 (que codifican la proteína Nef-His), pRIT14598 (que codifica la proteína Tat-His) y pRIT14599 (que codifica la proteína de fusión Nef-Tat-His).

El gen *nef* se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pcDNA3/Nef con los cebadores 01 y 02.

NcoI

CEBADOR 01 (SEC ID N° 1): 5' ATCGTCCATG.GGT.GGC.AAG.TGG.T 3'

SpeI

30 CEBADOR 02 (SEC ID N° 2): 5' CGGCTACTAGTGCAGTTCTTGAA 3'

El fragmento de PCR obtenido y el vector integrativo PHIL-D2-MOD se sometieron ambos a digestión con las enzimas de restricción by NcoI y SpeI, se purificaron en gel de agarosa y se ligaron para crear el plásmido integrativo pRIT14597 (véase la Figura 2).

El gen *tat* se amplificó mediante PCR a partir de un derivado del plásmido pCV1 con los cebadores 05 y 04:

SpeI

35 CEBADOR 04 (SEC ID N° 4): 5' CGGCTACTAGTTTCCTTCGGGCCT 3'

NcoI

CEBADOR 05 (SEC ID N° 5): 5' ATCGTCCATGGAGCCAGTAGATC 3'

Se introdujo un sitio de restricción NcoI en el extremo 5' del fragmento de PCR, mientras que se introdujo un sitio SpeI en el extremo 3' con el cebador 04. El fragmento de PCR obtenido y el vector PHIL-D2-MOD se sometieron ambos a digestión con las enzimas de restricción NcoI y SpeI, se purificaron en gel de agarosa y se ligaron para crear el plásmido integrativo pRIT14598.

Para construir el pRIT14599, un fragmento de ADN de 910 pb correspondiente a la secuencia de codificación *nef-tat*-His se ligó entre los sitios EcoRI (T4 polimerasa) y NcoI del vector PHIL-D2-MOD. El fragmento de codificación *nef-tat*-His se obtuvo mediante digestiones con XbaI (T4 polimerasa) y NcoI de pRIT14596.

1.2 TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA GS115(his4) DE PICHIA PASTORIS.

Para obtener cepas de *Pichia pastoris* que expresan Nef-His, Tat-His y la fusión Nef-Tat-His, la cepa GS115 se transformó con fragmentos lineales de NotI portadores de los respectivos casetes de expresión más el gen HIS4 para complementar *his4* en el genoma del huésped.

Se seleccionaron múltiples copias de los clones integrantes mediante análisis de transferencia puntual cuantitativa y se determinó el tipo de integración, inserción (fenotipo Mut⁺) o translocación (fenotipo Mut⁶).

Para cada transformación se seleccionó un transformante que muestra un nivel de producción elevada para la proteína recombinante:

Cepa Y1738 (fenotipo Mut⁺) productora de la proteína Nef-His recombinante, una proteína miristilada de 215 aminoácidos, que está compuesta por:

°Ácido mirístico

°Una metionina, creada mediante el uso de un sitio de clonación NcoI del vector PHIL-D2-MOD

° 205 aa de proteína Nef (comenzando en el aa 2 y extendiéndose hasta el aa 206)

°Una treonina y una serina creadas mediante el procedimiento de clonación (clonación en el sitio SpeI del vector PHIL-D2-MOD.

° Una glicina y seis histidinas.

Cepa Y1739 (fenotipo Mut⁺) productora de la proteína Tat-His, una proteína de 95 aminoácidos, que está compuesta por:

° Una metionina creada mediante el uso de un sitio de clonación o85 aa de la proteína Tat (comenzando en el aa 2 y extendiéndose hasta el aa 86)

° Una treonina y una serina introducidas mediante el procedimiento de clonación ° Una glicina y seis histidinas

Cepa Y1737(fenotipo Mut⁶) productora de la proteína de fusión recombinante Nef-Tat-His, una proteína miristilada de 302 aminoácidos, que está compuesta por:

°Ácido orístico

° Una metionina creada mediante el uso de un sitio de clonación °205 aa de la proteína Nef (comenzando en el aa 2 y extendiéndose hasta el aa 86)

° Una treonina y una serina creadas mediante el procedimiento de clonación °85 aa de la proteína Tat (comenzando en el aa 2 y extendiéndose hasta el aa 86)

° Una treonina y una serina introducidas mediante el procedimiento de clonación ° Una glicina y seis histidinas

Ejemplo 2. EXPRESIÓN DE LA Tat-MUTANTE DEL VIH-1 en PICHIA PASTORIS

También se ha expresado una proteína Tat recombinante mutante. La proteína Tat mutante debe ser **biológicamente inactiva** al tiempo que **mantiene sus epítomos inmunogénicos**.

Para estas construcciones se seleccionó un gen *tat* doble mutante, construido por D. Clemens (Tulane University).

Este gen *tat* (se origina del clon molecular BH10) porta mutaciones en la **región del sitio activo (Lys41→Ala) y en el motivo RGD (Arg78→Lys y Asp80→Glu)** (Virology 235: 48-64, 1997).

El gen *tat* mutante se recibió como un fragmento de ADNc subclonado entre los sitios EcoRI y HindIII dentro de un plásmido de expresión de CMV (pCMVLys41/KGE)

5 2.1 CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES INTEGRATIVOS pRIT14912 (que codifican la proteína *tat*-His mutante) y pRIT14913 (que codifica la proteína de fusión Nef-Tat-mutante-His).

El gen *tat* mutante se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pCMVLys41/KGE con los cebadores 05 y 04 (véase la sección 1.1, construcción de pRIT14598)

10 Se introdujo un sitio de restricción NcoI en el extremo 5' del fragmento de PCR, mientras que se introdujo un sitio SpeI en el extremo 3' con el cebador 04. El fragmento de PCR obtenido y el vector PHIL-D2-MOD se sometieron ambos a digestión con las enzimas de restricción NcoI y SpeI, se purificaron en gel de agarosa y se ligaron para crear el plásmido integrativo pRIT14912.

Para construir el pRIT14913, el gen *tat* mutante se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pCMVLys41/KGE con los cebadores 03 y 04.

SpeI

15 CEBADOR 03 (SEC ID N° 3): 5' ATCGTACTAGT.GAG.CCA.GTA.GAT.C 3'

SpeI

CEBADOR 04 (SEC ID N° 4): 5' CGGCTACTAGTTTTCCTTCGGGCCT 3'

20 El fragmento de PCR obtenido y el plásmido pRIT14597 (que expresa la proteína Nef-His) se sometieron ambos a digestión con la enzima de restricción SpeI, se purificaron en gel de agarosa y se ligaron para crear el plásmido integrativo pRIT14913.

2.2 TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA GS115 DE PICHIA PASTORIS.

Se obtuvieron las cepas de *Pichia pastoris* que expresan la proteína Tat-His mutante y la proteína de fusión Nef-Tat-mutante aplicando estrategias de integración y de selección de cepa recombinante previamente descritas en la sección 1.2.

25 Se seleccionaron dos cepas recombinantes productoras de la proteína Tat-His mutante, una proteína de 95 aminoácidos; Y1775 (fenotipo Mut⁺) e Y1776 (fenotipo Mut^s).

Se seleccionó una cepa recombinante que expresa la proteína de fusión Nef-Tat-His mutante, una proteína de 302 aminoácidos: Y1774 (fenotipo Mut⁺).

Ejemplo 3: FERMENTACIÓN DE PICHIA PASTORIS PRODUCTORA DE TAT-HIS RECOMBINANTE

30 Un procedimiento típico se describe en la tabla siguiente.

La fermentación incluye una fase de crecimiento (alimentación con un medio a base de glicerol de acuerdo con una curva adecuada), que conduce a un cultivo de alta densidad celular, y una fase de inducción (Alimentación con una solución de metano y sales/microelementos). Durante la fermentación, al crecimiento le sigue la toma de muestras y la medición de su absorbancia a 620 nm. Durante la fase de inducción se añadió metanol a través de una bomba y su concentración se monitorizó mediante cromatografía de gases (en las muestras de cultivo) y mediante análisis de gases con un espectrómetro de masas. Después de la fermentación, las células se recuperaron mediante centrifugación a 5020 g durante 30' a 2-8°C y la pasta celular se almacenó a -20°C. Para trabajos adicionales, la pasta celular se descongeló, se resuspendió a una DO (a 620 nm) de 150 en un tampón (Na₂HPO₄ 50 mM, a pH7, 5% de PMSF, isopropanol 4 mM) y se rompió mediante 4 pases en un aparato DynoMill (espacio 0,6 l, 3000 rpm, 6l/H, diámetro de las perlas de 0,40-0,70 mm).

40 Para la evaluación de la expresión, las muestras se extrajeron durante la inducción, se rompieron y analizaron mediante SDS-PAGE o transferencia de tipo Western. En geles de SDS teñidos con azul de Coomassie, la proteína Tat-his recombinante se identificó claramente en forma de una banda intensa que presentaba una intensidad máxima tras una inducción de alrededor de 72-96 h.

Descongelación de un vial de semillas de trabajo	
↓	
Precultivo sólido a 30°C, 14-16 h	<u>Medio sintético</u> : YNB + glucosa + agar
↓	
Precultivo líquido en dos erlenmeyer de 2 l, a 30°C, 200 rpm	<u>Medio sintético</u> : 2 x 400 ml de YNB + glucosa, Detención cuando la DO > 1 (a 620 nm)
↓	
Inoculación de un fermentador de 20 l	5 l de medio inicial (FSC006AA) 3 ml antiespuma SAG471 (de Witco) Valores predeterminados: Temperatura: 30°C Sobrepresión: 0,3 barg Flujo de aire: 20 NI/min O2 disuelto: regulado > 40% pH: regulado a 5 mediante NH ₄ OH
↓	
Fermentación discontinua: duración de la fase de crecimiento alrededor de 40 h	Alimentación con medio a base de glicerol FFB005AA DO final entre 200-500 DO (620 nm)
Fermentación discontinua: duración de la fase de inducción: hasta 97 h	Alimentación con metanol y con una solución de sales/microelementos (FSE021AB)
↓	
Centrifugación	5020 g/30 min/2-8°C
↓	
Recuperar la pasta celular y almacenar a -20°C	
↓	
Descongelar las células y resuspender a DO150 (620 nm) en tampón	<u>Tampón</u> : Na ₂ HPO ₄ 50 Mm, Ph 7, 5% de PMSF, isopropanol 4 Mm
Rotura de las células con 4 pases en Dyno-mill	<u>Dyno-mill</u> : (espacio 0,6 l. 3000 rpm, 6l/h, diámetro de las perlas de 0,40-0,70 mm).
↓	
Transferir para extracción/purificación	

Medios usados para la fermentación:

Precultivo sólido: (YNB + glucosa + agar)						
Glucosa	10 g/l	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O:	0,0002 g/l		Ácido fólico:	

ES 2 363 079 T3

KH ₂ PO ₄ :	1 g/l	MnSO ₄ .H ₂ O	0,0004 g/l	Inositol:		0,064 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g/l	H ₃ BO ₃ :	0,0005 g/l	Piridoxina:		0,008 g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O:	0,1 g/l	KI:	0,0001 g/l	Tiamina:		0,008 g/l
NaCl	0,1 g/l	CoCl ₂ .6H ₂ O:	0,00009 g/l	Niacina:		0,000032 g/l
FeCl ₃ .6H ₂ O:	0,0002 g/l	Riboflavina:	0,000016 g/l	Pantotenato Ca:		0,008 g/l
CuSO ₄ .5H ₂ O:	0,00004 g/l	Biotina:	0,000064 g/l	Ácido paraaminonenzoi- co		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0004 g/l	(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g/l	Agar		18 g/l

Precultivo líquido (YNB + glicerol)						
Glicerol	2% (v/v)	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O:	0,0002 g/l		Ácido fólico	
KH ₂ PO ₄ :	1 g/l	MnSO ₄ .H ₂ O:	0,0004 g/l	Inositol:		0,064 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5 g/l	H ₃ BO ₃	0,0005 g/l	Piridoxina:		0,008 g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O:	0,1 g/l	KI:	0,0001 g/l	Tiamina:		0,008 g/l
NaCl:	0,1 g/l	CoCl ₂ .6H ₂ O:	0,00009 g/l	Niacina;		0,000032 g/l
FeCl ₃ .6H ₂ O:	0,0002 g/l	Riboflavina:	0,000016 g/l	Pantotenato Ca		0,008 g/l
CuSO ₄ .5H ₂ O:	0,00004 g/l	Biotina:	0,000064 g/l	Ácido paraaminobenzoico		
ZnSO ₄ .7H ₂ O:	0,0004 g/l	(NH ₄) ₂ SO ₄ :	5 g/l			

Cambio del fermentador inicial: (FSC006AA)			
(NH ₄) ₂ SO ₄ : 6,4 g/l			
KH ₂ PO ₄ : 9 g/l	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O:	2,04 mg/l	
MgSO ₄ .7H ₂ O:	4,7 g/l	MnSO ₄ .H ₂ O:	4,08 mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O: 0,94 g/l	H ₃ BO ₃	5,1 mg/l	
FeCl ₃ .6H ₂ O: 10 mg/l	KI:	1,022 mg/l	
HCl: 1,67 mg/l	CoCl ₂ .6H ₂ O:	0,91 mg/l	
CuSO ₄ .5H ₂ O:	0,408 mg/l	NaCl:	0,06 g/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O: 4,08 mg/l	Biotina:	0,534 mg/l	

Solución de alimentación usada para la fase de crecimiento (FFB005AA)

Glicerol:	38,7% v/v	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O:	5,7 mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O:	13 g/l	CuSO ₄ .5H ₂ O:	1,13 mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O:	2,6 g/l	CoCl ₂ .6H ₂ O:	2,5 mg/l
FeCl ₃ .6H ₂ O:	27,8 mg/l	H ₃ BO ₃	14,2 mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O:4,08 mg/l	11,3 mg/l	Biotina:	1,5 mg/l
MnSO ₄ .H ₂ O	11,3 mg/l	KI:	2,84 mg/l
KH ₂ PO ₄ :	24,93 g/l	NaCl:	0,167 g/l

Solución de alimentación de sales y microelementos usados durante la inducción (FSE021AB):				
KH ₂ PO ₄ :	45 g/l	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O:	10,2 mg/l	
MgSO ₄ .7H ₂ O		23,5 g/l	MnSO ₄ .H ₂ O:	20,4 mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,70 g/l	H ₃ BO ₃	25,5 mg/l	
NaCl:	0,3 g/l	KI:	5,11 mg/l	
HCl:	8,3 ml/l	CoCl ₂ .6H ₂ O	4,55 mg/l	
CuSO ₄ .5H ₂ O:		2,04 mg/l	FeCl ₃ .6H ₂ O	50.0 mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O:	20,4 mg/l	Biotina:	2,70 mg/l	

Ejemplo 4: PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN Nef-Tat-His (PICHIA PASTORIS)

5 El esquema de purificación se ha desarrollado a partir de 146 g de células de Pichia pastoris recombinante (peso húmedo) o 2l de homogeneizado en Dyno-Mill a DO 55. Las etapas cromatográficas se realizan a temperatura ambiente. Entre etapas, las fracciones positivas para Nef-Tat se mantienen durante la noche en el cuarto frío (+4° C); para tiempos más prolongados, las muestras se congelan a -20°C.

146 g de células de Pichia pastoris	
↓	
Homogeneización	<u>Tampón:</u> 2 l PO ₄ 50 mM, pH 7,0 DO final: 50
↓	
Rotura con Dyno-Mill (4 pases)	
↓	
Centrifugación	Rotor JA10/9500 rpm/30 min/temperatura ambiente
↓	
Sedimento en Dyno-mill	
↓	
Lavado (1 h-4°C)	<u>Tampón:</u> +2l de PO ₄ 10 mM , a pH 7.5 - NaCl 150mM - 0,5% de empigen
↓	

Centrifugación	Rotor JA10/9500 rpm/30 min/temperatura ambiente
↓	
Sedimento	
↓	
Solubilización (O/N- 4 °C)	<u>Tampón:</u> +660 ml de PO ₄ 10 mM , a pH 7.5 - NaCl 150mM – GuHCl 4,0M
↓	
Reducción (4 h-temperatura ambiente- en oscuridad)	+ Ácido 2-mercaptoetanosulfónico 0,2M, sal de sodio (Adición de polvo)/pH ajustado a 7,5 (con solución de NaOH 0,5M) antes de la incubación
↓	
Reacción con yodoacetamida (carbamidometilación) (1/2 h, temperatura ambiente, en oscuridad)	+ Yodoacetamida 0,25M (adición de polvo)/pH ajustado a 7,5 (con solución de NaOH 0,5M) antes de la incubación
↓	
Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados en Ni ⁺⁺ -NTA-Agarosa (Qiagen - 30 ml de resina)	<u>Tampón de equilibrado:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM - GuHCl 4,0M <u>Tampón de lavado:</u> 1) Tampón de equilibrado 2) PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – Urea 6M 3) PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – Urea 6M – Imidazol 25 mM <u>Tampón de elución:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – Urea 6M – Imidazol 0,5 mM
↓	
Dilución	Hasta una fuerza iónica de 18 mS/cm ² <u>Tampón de dilución:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 7.5 – Urea 6M
↓	
Cromatografía de intercambio catiónico en SP Sefarosa FF (Pharmacia- 30 ml de resina)	<u>Tampón de equilibrado:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM - Urea 6,0M <u>Tampón de lavado:</u> 1) Tampón de equilibrado 2) PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 250mM – Urea 6M <u>Tampón de elución:</u> Borato 10 mM , a pH 9,0 – NaCl 2M - Urea 6M
↓	
Concentración	hasta 5 mg/ml Membrana Omega 10 kDa (Filtron)
↓	
Cromatografía de filtración en gel en Superdex200 XK 16/60 (Pharmacia- 120 ml de resina)	<u>Tampón de elución:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – Urea 6M 5 ml de muestra/inyección → 5 inyecciones
↓	
Diálisis (O/N- 4° C)	<u>Tampón:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 6,8 - NaCl 150mM – Arginina 0,5M*
↓	
Filtración estéril	Millex GV 0,22 μm
*proporción: Arginina 0,5M para una concentración proteica de 1600 μg/ml.	

Pureza

El nivel de pureza estimado mediante SDS-PAGE se muestra en la Figura 3 mediante tinción con Dauchi Silver y en la Figura 4 mediante azul de Coomassie G250.

Después de la etapa con Superdex200: > 95%

- 5 Tras las etapas de diálisis y filtración estéril: > 95%

Recuperación

51 mg de la proteína Nef-Tat-his se purifican a partir de 146 g de células de Pichia pastoris recombinante (= 2l de homogeneizado Dyno-mill DO 55)

Ejemplo 5: PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN NEF-TAT-HIS OXIDADA EN PICHIA PASTORIS

- 10 El esquema de purificación se ha desarrollado a partir de 73 g de células de Pichia pastoris recombinante (peso húmedo) o 1 l de homogeneizado en Dyno-Mill a DO 50. Las etapas cromatográficas se realizan a temperatura ambiente. Entre etapas, las fracciones positivas para Nef-Tat se mantienen durante la noche en el cuarto frío (+4° C); para tiempos más prolongados, las muestras se congelan a -20°C.

73 g de células de Pichia pastoris	
↓	
Homogeneización	<u>Tampón:</u> 1 l PO4 50 mM, pH 7,0 – Pefabloc 5 mM DO final: 50
↓	
Rotura con Dyno-Mill (4 pases)	
↓	
Centrifugación	Rotor JA10/9500 rpm/30 min/temperatura ambiente
↓	
Sedimento en Dyno-mill	
↓	
Lavado (2 h-4°C)	<u>Tampón:</u> +1l de PO4 10 mM , a pH 7.5 - NaCl 150mM - 0,5% de Empigen
↓	
Centrifugación	Rotor JA10/9500 rpm/30 min/temperatura ambiente
↓	
Sedimento	
↓	
Solubilización (O/N- 4 °C)	<u>Tampón:</u> +330 ml de PO4 10 mM , a pH 7.5 - NaCl 150mM – GuHCl 4,0M
↓	
↓	
Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados en Ni⁺⁺-NTA-Agarosa (Qiagen - 15 ml de resina)	<u>Tampón de equilibrado:</u> PO4 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM - GuHCl 4,0M <u>Tampón de lavado:</u> 1) Tampón de equilibrado 2) PO4 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – Urea 6M

	3) PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – Urea 6M – Imidazol 25 mM <u>Tampón de elución:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – Urea 6M – Imidazol 0,5 mM
↓	
Dilución	Hasta una fuerza iónica de 18 mS/cm ² <u>Tampón de dilución:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 7.5 – Urea 6M
↓	
Cromatografía de intercambio catiónico en SP Sefarosa FF (Pharmacia- 7 ml de resina)	<u>Tampón de equilibrado:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM - Urea 6,0M <u>Tampón de lavado:</u> 1) Tampón de equilibrado 2) PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 250mM – Urea 6M <u>Tampón de elución:</u> Borato 10 mM , a pH 9,0 – NaCl 2M - Urea 6M
↓	
Concentración	hasta 0,8 mg/ml Membrana Omega 10 kDa (Filtron)
↓	
Diálisis (O/N- 4° C)	<u>Tampón:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 6,8 - NaCl 150mM – Arginina 0,5M
↓	
Filtración estéril	Millex GV 0,22 µm

→ El nivel de pureza estimado mediante SDS-PAGE se muestra en la Figura 6 (mediante tinción con Dauchi Silver, azul de Coomassie G250, transferencia de tipo Western):

Tras las etapas de diálisis y filtración estéril: > 95%

5 → Recuperación (evaluada mediante un ensayo colorimétrico de proteínas: DOC TCA BCA)

2,8 mg de la proteína Nef-Tat-his oxidada se purifican a partir de 73 g de células de Pichia pastoris recombinante (peso húmedo) o 1 l del homogeneizado Dyno-mill DO 50)

Ejemplo 6: PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN TAT-HIS REDUCIDA (PICHIA PASTORIS)

10 El esquemas de purificación se ha desarrollado a partir de 160 g de células de Pichia pastoris recombinante (peso húmedo) o 2l de homogeneizado en Dyno-Mill a DO 66. Las etapas cromatográficas se realizan a temperatura ambiente. Entre etapas, las fracciones positivas para Tat se mantienen durante la noche en el cuarto frío (+4° C); para tiempos más prolongados, las muestras se congelan a -20°C.

160 g de células de Pichia pastoris	
↓	
Homogeneización	<u>Tampón:</u> 2 l PO ₄ 50 mM, pH 7,0 – PMSF 4 mM DO final: 66
↓	
Rotura con Dyno-Mill (4 pases)	
↓	
Centrifugación	Rotor JA10/9500 rpm/30 min/temperatura ambiente
↓	

Sedimento en Dyno-mill	
↓	
Lavado (1 h-4°C)	<u>Tampón:</u> +2l de PO ₄ 10 mM , a pH 7.5 - NaCl 150mM - 01% de Empigen
↓	
Centrifugación	Rotor JA10/9500 rpm/30 min/temperatura ambiente
↓	
Sedimento	
↓	
Solubilización (O/N- 4 °C)	<u>Tampón:</u> +660 ml de PO ₄ 10 mM , a pH 7.5 - NaCl 150mM – GuHCl 4,0M
↓	
Reducción (4 h-temperatura ambiente- en oscuridad)	+ Ácido 2-mercaptoetanosulfónico 0,2M, sal de sodio (Adición de polvo)/pH ajustado a 7,5 (con solución de NaOH 1M) antes de la incubación
↓	
Reacción con yodoacetamida (1/2 h, temperatura ambiente, en oscuridad)	+ Yodoacetamida 0,25M (adición de polvo)/pH ajustado a 7,5 (con solución de NaOH 1M) antes de la incubación
↓	
Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados en Ni ⁺⁺ -NTA-Agarosa (Qiagen - 60 ml de resina)	<u>Tampón de equilibrado:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM - GuHCl 4,0M <u>Tampón de lavado:</u> 1) Tampón de equilibrado 2) PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – Urea 6M 3) PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – Urea 6M – Imidazol 35 mM <u>Tampón de elución:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – Urea 6M – Imidazol 0,5 mM
↓	
Dilución	Hasta una fuerza iónica de 12 mS/cm ² <u>Tampón de dilución:</u> Borato 20 mM , a pH 8,5 – Urea 6M
↓	
Cromatografía de intercambio catiónico en SP Sefarosa FF (Pharmacia- 30 ml de resina)	<u>Tampón de equilibrado:</u> Borato 20 mM , a pH 8,5 – NaCl 150 mM - Urea 6,0M <u>Tampón de lavado:</u> Tampón de equilibrado: <u>Tampón de elución:</u> Borato 20 mM , a pH 8,5 – NaCl 400 mM - Urea 6,0M
↓	
Concentración	hasta 1,5 mg/ml Membrana Omega 10 kDa (Filtron)
↓	
Diálisis (O/N- 4° C)	<u>Tampón:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 6,8 - NaCl 150mM – Arginina 0,5M
↓	
Filtración estéril	Millex GV 0,22 μm

→El nivel de pureza estimado mediante SDS-PAGE se muestra en la Figura 7 (mediante tinción con Dauchi Silver, azul de Coomassie G250, transferencia de tipo Western):

Tras las etapas de diálisis y filtración estéril: > 95%

5 → Recuperación (evaluada mediante un ensayo colorimétrico de proteínas: DOC TCA BCA)

48 mg de la proteína Tat-his reducida se purifican a partir de 160 g de células de Pichia pastoris recombinante (peso húmedo) o 2 l del homogeneizado Dyno-mill DO 66.

Ejemplo 7: Purificación de la proteína Tat-his oxidada (PICHIA PASTORIS)

10 El esquemas de purificación se ha desarrollado a partir de 74 g de células de Pichia pastoris recombinante (peso húmedo) o 1 l de homogeneizado en Dyno-Mill a DO 60. Las etapas cromatográficas se realizan a temperatura ambiente. Entre etapas, las fracciones positivas para Tat se mantienen durante la noche en el cuarto frío (+4° C); para tiempos más prolongados, las muestras se congelan a -20°C.

74 g de células de Pichia pastoris	
↓	
Homogeneización	<u>Tampón:</u> 1 l PO4 50 mM, pH 7,0 – Pefabloc 5 mM DO final: 60
↓	
Rotura con Dyno-Mill (4 pases)	
↓	
Centrifugación	Rotor JA10/9500 rpm/30 min/temperatura ambiente
↓	
Sedimento en Dyno-mill	
↓	
Lavado (1 h-4°C)	<u>Tampón:</u> +1 l de PO4 10 mM , a pH 7.5 - NaCl 150mM - 01% de Empigen
↓	
Centrifugación	Rotor JA10/9500 rpm/30 min/temperatura ambiente
↓	
Sedimento	
↓	
Solubilización (O/N- 4 °C)	<u>Tampón:</u> +330 ml de PO4 10 mM , a pH 7.5 - NaCl 150mM – GuHCl 4,0M
↓	
Centrifugación	Rotor JA10/9500 rpm/30 min/temperatura ambiente
↓	
Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados en Ni ⁺⁺ -NTA-Agarosa (Qiagen - 30 ml de resina)	<u>Tampón de equilibrado:</u> PO4 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – GuHCl 4,0M <u>Tampón de lavado:</u> 1) Tampón de equilibrado 2) PO4 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – Urea 6,0M

	3) PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – Urea 6,0M Imidazol 35 mM <u>Tampón de elución:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 – NaCl 150 mM - Urea 6,0M – Imidazol 0,5M
↓	
Dilución	Hasta una fuerza iónica de 12 mS/cm ² <u>Tampón de dilución:</u> Borato 20 mM , a pH 8,5 – Urea 6M
↓	
Cromatografía de intercambio catiónico en SP Sefarosa FF (Pharmacia- 15 ml de resina)	<u>Tampón de equilibrado:</u> Borato 20 mM , a pH 8,5 – NaCl 150 mM - Urea 6,0M <u>Tampón de lavado:</u> 1) Tampón de equilibrado 2) Borato 20 mM , a pH 8,5 – NaCl 400 mM - Urea 6,0M <u>Tampón de elución:</u> Piperazina 20 mM , a pH 11,0 – NaCl 2M - Urea 6M
↓	
Concentración	hasta 1,5 mg/ml Membrana Omega 10 kDa (Filtron)
↓	
Diálisis (O/N- 4° C)	<u>Tampón:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 6,8 - NaCl 150mM – Arginina 0,5M
↓	
Filtración estéril	Millex GV 0,22 µm

→El nivel de pureza estimado mediante SDS-PAGE se muestra en la Figura 8 (mediante tinción con Dauchi Silver, azul de Coomassie G250, transferencia de tipo Western):

Tras las etapas de diálisis y filtración estéril: > 95%

5 → Recuperación (evaluada mediante un ensayo colorimétrico de proteínas: DOC TCA BCA)

19 mg de la proteína Tat-his oxidada se purifican a partir de 74 g de células de Pichia pastoris recombinante (peso húmedo) o 1 l del homogeneizado Dyno-mill DO 60.

Ejemplo 8: PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA NEF-HIS DEL SIV REDUCIDA (PICHIA PASTORIS)

10 El esquema de purificación se ha desarrollado a partir de 340 g de células de Pichia pastoris recombinante (peso húmedo) o 4 l de homogeneizado en Dyno-Mill a DO 100. Las etapas cromatográficas se realizan a temperatura ambiente. Entre etapas, las fracciones positivas para Nef se mantienen durante la noche en el cuarto frío (+4° C); para tiempos más prolongados, las muestras se congelan a -20°C.

340 g de células de Pichia pastoris	
↓	
Homogeneización	<u>Tampón:</u> 4 l PO ₄ 50 mM, pH 7,0 – PMSF 4 mM DO final: 100
↓	
Rotura con Dyno-Mill (4 pases)	
↓	
Centrifugación	Rotor JA10/9500 rpm/60 min/temperatura ambiente
↓	

Sedimento en Dyno-mill	
↓	
Solubilización (O/N- 4 °C)	<u>Tampón:</u> +2,6 l de PO ₄ 10 mM , a pH 7.5 - NaCl 150mM – GuHCl 4,0M
↓	
Centrifugación	Rotor JA10/9500 rpm/30 min/temperatura ambiente
↓	
Reducción (4 h – temperatura ambiente - en oscuridad)	+ Ácido 2-mercaptoetanosulfónico 0,2M, sal de sodio (adición de polvo)/pH ajustado a 7,5 (con solución de NaOH 1M) antes de la incubación
↓	
Reacción con yodoacetamida (1/2 h – temperatura ambiente – en oscuridad)	+ Yodoacetamida 0,25M (adición de polvo)/pH ajustado a 7,5 (con solución de NaOH 1M) antes de la incubación
↓	
Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados en Ni⁺⁺-NTA-Agarosa (Qiagen - 30 ml de resina)	<u>Tampón de equilibrado:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – GuHCl 4,0M <u>Tampón de lavado:</u> 1) Tampón de equilibrado 2) PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – Urea 6M Imidazol 25 mM <u>Tampón de elución:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 – NaCl 150 mM - Urea 6M – Imidazol 0,5M
↓	
Concentración	hasta 3 mg/ml Membrana Omega 10 kDa (Filtron)
↓	
Cromatografía en filtración en gel en Superdex 200 (Pharmacia – 120 ml de resina)	<u>Tampón de elución:</u> PO ₄ 10 mM, a pH 7,5 – NaCl 150 mM – Urea 6M
↓	
Concentración	hasta 1,5 mg/ml Membrana Omega 10 kDa (Filtron)
↓	
Diálisis (O/N- 4° C)	<u>Tampón:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 6,8 - NaCl 150mM – 0,3% Empigen
↓	
Filtración estéril	Millex GV 0,22 μm

→El nivel de pureza estimado mediante SDS-PAGE se muestra en la Figura 9 (mediante tinción con Dauchi Silver, azul de Coomassie G250, transferencia de tipo Western):

Tras las etapas de diálisis y filtración estéril: > 95%

5 → Recuperación (evaluada mediante un ensayo colorimétrico de proteínas: DOC TCA BCA)

20 mg de la proteína Nef-his del SIV reducida se purifican a partir de 340 g de células de Pichia pastoris recombinante (peso húmedo) o 4 l del homogeneizado Dyno-mill DO 100.

Ejemplo 9: PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA NEF-HIS DEL VIH REDUCIDA (PICHIA PASTORIS)

10 El esquema de purificación se ha desarrollado a partir de 160 g de células de Pichia pastoris recombinante (peso húmedo) o 3 l de homogeneizado en Dyno-Mill a DO 50. Las etapas cromatográficas se realizan a temperatura ambiente. Entre

etapas, las fracciones positivas para Nef se mantienen durante la noche en el cuarto frío (+4° C); para tiempos más prolongados, las muestras se congelan a -20°C.

160 g de células de Pichia pastoris	
↓	
Homogeneización	<u>Tampón:</u> 3 l PO ₄ 50 mM, pH 7,0 – Pefabloc 5 mM DO final: 50
↓	
Rotura con Dyno-Mill (4 pases)	
↓	
Congelación/Descongelación	
↓	
Centrifugación	Rotor JA10/9500 rpm/60 min/temperatura ambiente
↓	
Sedimento en Dyno-mill	
↓	
Solubilización (O/N- 4 °C)	<u>Tampón:</u> +1 l de PO ₄ 10 mM , a pH 7.5 - NaCl 150mM – GuHCl 4,0M
↓	
Centrifugación	Rotor JA10/9500 rpm/60 min/temperatura ambiente
↓	
Reducción (3 h – temperatura ambiente - en oscuridad)	+ Ácido 2-mercaptoetanosulfónico 0,1M, sal de sodio (adición de polvo)/pH ajustado a 7,5 (con solución de NaOH 1M) antes de la incubación
↓	
Reacción con yodoacetamida (1/2 h – temperatura ambiente – en oscuridad)	+ Yodoacetamida 0,15M (adición de polvo)/pH ajustado a 7,5 (con solución de NaOH 1M) antes de la incubación
↓	
Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados en Ni⁺⁺-NTA-Agarosa (Qiagen - 10 ml de resina)	<u>Tampón de equilibrado:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – GuHCl 4,0M <u>Tampón de lavado:</u> 1) Tampón de equilibrado 2) PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – Urea 6M 3) PO ₄ 10 mM , a pH 7,5 - NaCl 150mM – Urea 6M - Imidazol 25 mM <u>Tampón de elución:</u> Citrato 10 mM , a pH 6,0 – NaCl 150 mM - Urea 6M – Imidazol 0,5M
↓	
Concentración	hasta 3 mg/ml Membrana Omega 10 kDa (Filtron)
↓	
Cromatografía en filtración en gel en Superdex 200 (Pharmacia – 120 ml de resina)	<u>Tampón de elución:</u> PO ₄ 10 mM, a pH 7,5 – NaCl 150 mM – Urea 6M
↓	

Diálisis (O/N- 4° C)	<u>Tampón:</u> PO ₄ 10 mM , a pH 6,8 - NaCl 150mM – Arginina 0,5M
↓	
Filtración estéril	Millex GV 0,22 μm

→El nivel de pureza estimado mediante SDS-PAGE se muestra en la Figura 10 (mediante tinción con Dauchi Silver, azul de Coomassie G250, transferencia de tipo Western):

Tras las etapas de diálisis y filtración estéril: > 95%

5 → Recuperación (evaluada mediante un ensayo colorimétrico de proteínas: DOC TCA BCA)

20 mg de la proteína Nef-his del VIH reducida se purifican a partir de 160 g de células de *Pichia pastoris* recombinante (peso húmedo) o 3 l del homogeneizado Dyno-mill DO 50.

Ejemplo 10: EXPRESIÓN DE LA SECUENCIA *nef* DEL SIV EN PICHIA PASTORIS

10 Con el fin de evaluar los antígenos Nef y Tat en el modelo de exposición al SHIV patogénico, los autores han expresado la proteína Nef del virus de la inmunodeficiencia en simios (SIV) de macacos, SIVmac239 (Aids Research and Human Retroviruses, 6:1221-1231,1990). En la región de codificación de Nef, SIV mac 239 tiene un codón de terminación en el marco tras 92 aa que predice un producto truncado de sólo 10 kDa. El resto del marco de lectura de Nef está abierto y se predeciría que codifica una proteína de 263 aa (30 kDa) en su forma completamente abierta.

15 El material de partida de los autores para el gen *nef* de SIVmac239 fue un fragmento de ADN correspondiente a la secuencia codificadora completa, clonado en el plásmido LX5N (recibido del Dr. R.C. Desrosiers, Southborough, MA, EE.UU.) Este gen *nef* del SIV está mutado en el codón de terminación prematura (el nucleótido G en la posición 9353 sustituye al nucleótido T original) con el fin de expresar la proteína Nef de SIVmac239 de longitud completa.

20 Para expresar este gen *nef* del SIV en *Pichia pastoris*, se usó el vector PHIL-D2-MOD (previamente usado para la expresión de las secuencias *nef* y *tat* del VIH-1). La proteína recombinante se expresa bajo el control del promotor inducible de la alcohol oxidasa (AOX1) y el extremo c de la proteína se elonga mediante una cola de afinidad de histidina que facilitará la purificación.

10.1 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR INTEGRATIVO PRIT 14908

Para construir el **pRIT 14908**, el gen *nef* del SIV se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pLXSN/SIV-NEF con los cebadores SNEF1 y SNEF2.

CEBADOR SNEF1: 5' ATCGTCCATG.GGTGGAGCTATTTT 3'

NcoI

(SEC ID N° 6)

25

CEBADOR SNEF2: 5' CGGCTACTAGTGCGAGTTTCCTT 3'

SpeI

(SEC ID N° 7)

30 La región de ADN del *nef* del SIV amplificada comienza en el nucleótido 9077 y termina en el nucleótido 9865 (Aids Research and Human Retroviruses, 6:1221-1231,1990).

Se introdujo un sitio de restricción NcoI (que porta el codón ATG del gen *nef*) en el extremo 5' del fragmento de PCR al tiempo que se introdujo un sitio SpeI en el extremo 3'. El fragmento de PCR obtenido y el vector integrativo PHIL-D2-MOD se sometieron ambos a digestión con las enzimas de restricción NcoI y SpeI. Dado que hay un sitio de restricción NcoI presente en la secuencia amplificada del *nef* del SIV (en la posición 9286) se obtuvieron dos fragmentos de,

respectivamente, ± 200 pb y ± 600 pb, se purificaron en gel de agarosa y se ligaron en el vector PHIL-D2-MOD. El plásmido recombinante resultante recibió, tras la verificación de la región *nef* amplificada mediante secuenciación automática, la denominación pRIT 14908.

10.2 TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA GS115(his4) DE PICHIA PASTORIS.

- 5 Para obtener la cepa de *Pichia pastoris* que expresa *nef*-His de SIV, la cepa GS115 se transformó con un fragmento lineal de NotI que sólo porta el casete de expresión y el gen HIS4 (Fig. 11).

Este fragmento de ADN lineal de NotI, con homologías en ambos extremos con el gen residente de AOX1 de *P. pastoris*, favorece la recombinación en el locus AOX1.

Los clones integrantes de múltiples copias se seleccionaron mediante análisis de transferencia puntual cuantitativo.

- 10 Se seleccionó un transformante que mostraba el mejor nivel de producción de la proteína recombinante y recibió la denominación **Y1772**.

La cepa **Y1772** produce la proteína **Nef-His** recombinante del **SIV**, una proteína de **272 aminoácidos**, que estaría compuesta por:

- °Ácido mirístico
- 15 °Una metionina, creada mediante el uso de un sitio de clonación NcoI del vector PHIL-D2-MOD.
- ° 262 aminoácidos (aa) de la proteína Nef (comenzando en el aa 2 y extendiéndose hasta el aa 263, véase la Figura 12)
- °Una treonina y una serina creadas mediante el procedimiento de clonación (clonación en el sitio SpeI del vector PHIL-D2-MOD (Fig. 11, incluye la SEC ID N° 29).
- 20 ° Una glicina y seis histidinas.

Las secuencias nucleicas y proteicas se muestran en la Figura 12 (SEC ID N° 30 y 31). 30 and 31).

10.3 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO EXPRESADO DE LA CEPA Y1772

Nivel de expresión

- 25 Tras 16 horas de inducción en medio que contiene 1% de metanol como fuente de carbono, la abundancia de la proteína Nef-His recombinante se estimó al 10% de la proteína total (Fig. 14, calles 3-4).

Solubilidad

- 30 Los cultivos inducidos de la cepa Y1772 recombinante productores de la proteína Nef-His se centrifugaron. Los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón de rotura, se rompieron con perlas de cristal de 0,5 mm y los extractos celulares se centrifugaron. Las proteínas contenidas en el sedimento insoluble (P) y en el sobrenadante soluble (S) se compararon en un SDS-PAGE al 10% con tinción con azul de Coomassie.

Como se muestra en la figura 13, la mayoría de la proteína recombinante de la cepa Y1772 (calles 3-4) está asociada con la fracción insoluble.

La cepa Y1772 que presenta un nivel de expresión de la proteína recombinante satisfactorio se usa para la producción y purificación de la proteína Nef-His del SIV.

35 **Ejemplo 11: EXPRESIÓN DE GP120 EN CHO**

Se ha establecido una línea estable de células CHO-K1 que produce una glicoproteína gp120 recombinante. La glicoproteína gp120 recombinante es una forma recombinante truncada de la proteína gp120 de la cubierta del aislamiento del VIH-1 W61D. La proteína se excreta en el medio del cultivo celular, del que posteriormente se purifica.

40 Construcción del plásmido de transfección de gp120 pRIT13968

La secuencia de ADN codificadora de la cubierta (incluido el exón en 5' de *tat* y *rev*) del aislamiento del VIH-1 W61D se obtuvo (Dr. Tersmette, CCB, Amsterdam) como cubierta gp160 genómica que contiene el plásmido W61D (Nco-XhoI). El plásmido se denominó pRIT13965.

Con el fin de construir un casete de expresión de gp120 se tuvo que insertar un codón de terminación en el aminoácido

glu 515 codón de la secuencia de codificación de gp160 en pRIT13965 usando una secuencia oligonucleotídica cebadora (DIR 131) y tecnología de PCR. El cebador DIR 131 contiene tres codones de terminación (en todos los marcos de lectura abiertos) y un sitio de restricción Sall.

5 Después, la secuencia completa de la gp120 de la cubierta se reconstituyó a partir del fragmento N-terminal BamH1-DraI (170 pb) de un subclon plasmídico gp160 Pw61D ENV (pRIT13966) derivado de pRIT13965 y el fragmento DraI-Sall (510 pb) generado mediante PCR del pRIT13965. Ambos fragmentos se purificaron en gel y se ligaron juntos en el plásmido de E. coli pUC18, cortado primero con Sall (tratado con Klenow) y, después, con BamH1. Esto tuvo como resultado el plásmido pRIT13967. La secuencia génica del fragmento XmaI-Sall (1580 bp) que contiene el casete de codificación de gp120 se secuenció y se descubrió que era idéntica a la secuencia predicha. El plásmido RIT13967 se ligó en el vector de expresión GS de CHO Pee14 (Celltech Ltd., UK) cortando primero con BclI (tratado con Klenow) y, después, con XmaI. El plásmido resultante se denominó pRIT13968.

Preparación del banco de células maestras

15 La construcción de gp120 (pRIT13968) se transfeccionó en las células CHO mediante el clásico procedimiento de precipitación en CaPO_4 /shock con glicerol. Dos días después, las células CHOK1 se sometieron a medio de crecimiento selectivo (GMEM + metionina sulfoximina (MSX) 25 μM + glutamato + asparagina + 10% de suero bovino fetal). Tres clones transfectantes escogidos se amplificaron después en matraces de 175 m^2 y algunos viales con células se almacenaron a -80°C . se seleccionó C-env 23,9 para su posterior expansión.

20 Un pequeño pre-banco de células se preparó y se congelaron 20 ampollas. Para la preparación del pre-banco y el BCM, las células se cultivaron en medio de cultivo GMEM suplementado con 7,5% de suero bovino fetal y con MSX 50 μM . En estos cultivos celulares se analizó la esterilidad y la presencia de micoplasma, y se demostró que eran negativos.

25 El banco de células maestras CHOK1 env 23.9 (en el pase 12) se preparó usando células derivadas del pre-banco de células maestras. En resumen, dos ampollas de las semillas pre-maestras se sembraron en medio suplementado con 7,5% de suero bovino fetal dializado. Las células se distribuyeron en cuatro matraces de cultivo y se cultivaron a 37°C . Después de la unión celular, el medio de cultivo se cambió con medio fresco suplementado con MSX 50 μM . En la confluencia, las células se recogieron mediante tripsinización y se subcultivaron con una proporción de división de 1/8 en matraces T, frasco rotatorio, unidades de fábrica celular. Las células se recogieron de las unidades de fábrica celular mediante tripsinización y centrifugación. El sedimento celular se resuspendió en medio de cultivo suplementado con DMSO como conservante criogénico. Las ampollas se marcaron previamente, se autoclavaron y se sellaron con calor (250 viales). Se comprobó la existencia de fugas y se almacenaron durante la noche a 70°C antes de almacenar en nitrógeno líquido.

Cultivo celular y producción de la cosecha bruta

35 Dos viales de un banco de células maestras se descongelan rápidamente. Las células se combinan y se inoculan en dos matraces T a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ con un medio de cultivo adecuado suplementado con 7,5% DE suero bovino fetal (FBS) dializado. Cuando se alcanza la confluencia (pase 13), las células se recogen mediante tripsinización, se combinan y se expanden en 10 matraces T como se ha indicado con anterioridad. Las células confluentes (pase 14) se someten a tripsinización y se expanden en serie en 2 unidades de fábrica celular (cada 6000 cm^2 ; pase 15), después en 10 fábricas celulares (pase 16). El medio de cultivo de crecimiento se suplementa con 7,5% de suero bovino fetal (FBS) dializado y 1% de MSX. Cuando las células alcanzan la confluencia, el medio de cultivo se descarta y se sustituye por "medio de producción" que sólo contiene 1% de suero bovino fetal dializado y sin MSX. El sobrenadante se recoge cada dos días (intervalo de 48 horas) durante hasta 32 días. Los fluidos del cultivo recogidos se aclaran inmediatamente a través de una unidad de filtro de 1,2-0,22 μm y se mantuvieron a -20°C antes de purificar.

Ejemplo 12: PURIFICACIÓN DE GP120 DEL VIH (CHO W61D) DEL FLUIDO DEL CULTIVO CELULAR

45 Todas las etapas de purificación se realizan en un cuarto frío a $2-8^\circ\text{C}$. El pH de los tampones se ajusta a esta temperatura y se filtran en un filtro de 0,2 μm . Se analiza la presencia del contenido de pirógenos (ensayo LAL). La densidad óptica a 280 nm, el pH y la conductividad de los eluatos de la columna se monitorizan continuamente.

(i) Fluido de cultivo aclarado

El fluido de cultivo aclarado (FCA) recogido se esteriliza mediante filtración y, a pH 8,0, se añade tampón Tris hasta una concentración final de 30 mM. El FCA se almacena congelado a -20°C hasta la purificación.

(ii) Cromatografía por interacción hidrofóbica

50 Después de congelar, se añade sulfato amónico al fluido de cultivo aclarado hasta 1M. La solución se pasa durante la noche por una columna TSK/TOYOPEARL-BUTYL 650 M (TOSOHAAAS), se equilibra en tampón Tris 30 mM a pH 8,0- sulfato amónico 1M. En estas condiciones, el antígeno se une a la matriz de gel. La columna se lava con un gradiente escalonado descendente de sulfato amónico. El antígeno eluye en tampón Tris 30 mM- pH 8,0 – sulfato amónico 0,25M.

(iii) Cromatografía de intercambio aniónico

Después de reducir la conductividad de la solución entre 5 y 6 mS/cm, la combinación gp120 de fracciones se carga en una columna Q-Sepharosa de flujo rápido (Pharmacia), se equilibra en tampón Tris-solución salina, a pH 8,0. La columna funciona de un modo negativo, es decir la gp120 no se une al gel, aunque la mayoría de las impurezas se conservan.

5 (iv) Concentración y diafiltración mediante ultrafiltración

Con el fin de incrementar la concentración proteica, la combinación de gp120 se carga en una membrana FILTRON "Omega Screen Channel", con un corte a 50 kDa. Al final de la concentración, el tampón se intercambia mediante diafiltración con tampón fosfato 5 mM que contiene CaCl₂ 0,3 mM, a pH 7,0. Si no se realiza procesamiento adicional inmediatamente, la combinación de gp120 se almacena congelada a -20°C. Tras descongelar, la solución se filtra por una membrana de 0,2 µM con el fin de eliminar el material insoluble.

10

(v) Cromatografía en hidroxiapatita

La combinación de gp120 UF se carga en una columna de hidroxiapatita macro-Prep Ceramic de tipo II (Biorad) equilibrada en tampón fosfato 5 mM + CaCl₂ 0,3 mM, pH 7,0. La columna se lava con el mismo tampón. El antígeno atraviesa la columna y las impurezas se unen a la columna.

15 (vi) Cromatografía de intercambio catiónico

La combinación de gp120 se carga en una columna CM/TOYOPEARL-650 S (TOSHAAS) equilibrada en tampón acetato 20 mM, a pH 5,0. La columna se lava con el mismo tampón, después con acetato 20 mM, a pH 5,0 y NaCl 10 mM. Después, el antígeno se eluye con el mismo tampón que contiene NaCl 80 mM.

(vii) Ultrafiltración

20 Con el fin de aumentar la capacidad de aclaramiento del virus del procedimiento de purificación se lleva a cabo una etapa de ultrafiltración adicional. La combinación de gp120 se somete a ultrafiltración sobre una membrana FILTRON "Omega Screen Channel", corte de 150 kDa. Esta membrana de tamaño de poro no retiene el antígeno. Después del procedimiento, el antígeno diluido se concentra en el mismo tipo de membrana (Filtron), pero con un corte de 50 kDa.

(viii) Cromatografía en gel de exclusión por tamaño

25 La combinación de gp120 se aplica a una columna SUPERDEX 200 (PHARMACIA) con el fin de intercambiar el tampón y eliminar los contaminantes residuales. La columna se eluye con solución salina tamponada con fosfato (PBS).

(ix) Filtración estéril y almacenamiento

30 Las fracciones se esterilizan mediante filtración en una membrana de PVDF de 0,2 µM (Millipore) Después de la esterilización mediante filtración, el grueso purificado se almacena congelado a -20°C hasta la formulación. El esquema de purificación se resume en el diagrama de flujo siguiente.

El nivel de pureza del grueso purificado estimado mediante análisis SDS-PAGE (tinción de plata/azul de Coomassie/Transferencia de tipo Western) es ≥ 95%.

El rendimiento de la producción es de aproximadamente 2,5 mg/l de FCA (de acuerdo con el ensayo de Lowry)- El rendimiento de la purificación global es de aproximadamente un 25% (de acuerdo con un ensayo Elisa)

35 El material purificado es estable 1 semana a 37°C (de acuerdo con un análisis de transferencia de tipo western).

Purificación de gp120 del fluido del cultivo

La marca √ indica las etapas que son críticas para la eliminación del virus.

FLUIDO DE CULTIVO ACLARADO

↓

40 CROMATOGRFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA (BUTIL-TOYOPEARL 650 M)

↓

CROMATOGRFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO (MODO NEGATIVO) (Q-SEFAROSA) √

↓

ULTRAFILTRACIÓN 50 KD (CONCENTRACIÓN E INTERCAMBIO DE TAMPÓN)

↓

(ALMACENAMIENTO A -20°C)

↓

CROMATOGRAFÍA DE HIDROXIAPATITA (MODO NEGATIVO)

5 (HIDROXIAPATITA MACROPREP CERÁMICA II)

↓

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO CATIONICO (CM-TOYOPEARL 650 S)

ULTRAFILTRACIÓN 150 KD (OMEGA MEMBRANES / FILTRON) √

↓

10 ULTRAFILTRACIÓN 50 KD (CONCENTRACIÓN)

↓

CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO (SUPERDEX 200) ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN √

↓

VOLUMEN PURIFICADO

15 ALMACENAMIENTO A -20°C

Ejemplo 13: PREPARACIÓN DE LA VACUNA

Una vacuna preparada de acuerdo con la invención comprende los productos de expresión de uno o más recombinantes de ADN que codifican un antígeno. Además, las formulaciones comprenden una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-ACILADO 3D-MPL y QS21 en una emulsión de aceite/agua o un oligonucleótido que contiene motivos dinucleotídicos de CpG no metilados e hidróxido de aluminio como vehículo.

3D-MPL: Es una forma químicamente destoxificada del lipopolisacárido (LPS) de la bacteria gramnegativa Salmonella minnesota.

Los experimentos han demostrado que 3D-MPL combinado con varios vehículos potencia fuertemente la inmunidad humoral y la inmunidad celular de tipo Th1.

25 **QS21:** Es una saponina purificada de un extracto bruto de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina, que tiene una fuerte actividad adyuvante: induce la linfoproliferación específica de antígeno y los LTC frente a varios antígenos..

Los experimentos han demostrado un claro efecto sinérgico de las combinaciones de 3D-MPL y QS21 1 en la inducción de las respuestas inmunitarias tanto humoral como celular de tipo Th1.

30 La **emulsión de aceite/agua** está compuesta por 2 aceites (un tocoferol y un escualeno) y por PBS que contiene Tween 80 como emulsionante. La emulsión comprende 5% de escualeno, 5% de tocoferol, 2% de Tween 80, y tiene un tamaño medio de partícula de 180 nm (véase el documento WO 95/17210).

En los experimentos realizados se ha demostrado que la unión de esta emulsión de A/A con 3D-MPL incrementa de forma adicional sus propiedades de inmunoestimulación.

35 **Preparación de la emulsión de aceite/agua (concentrado por 2)**

El Tween 80 se disuelve en solución salina tamponada con fosfato (PBS), para dar una solución al 2% en PBS. Para proporcionar una emulsión concentrada multiplicada por dos, 5 g de DL alfa tocoferol y 5 ml de escualeno se agitan en vórtex para mezclar íntimamente. Se añaden 90 ml de la solución PBS/Tween y se mezclan completamente. La emulsión resultante se pasa después por una jeringuilla y, por último, se microfluidiza usando una máquina M110S Microfluidics. Las gotas de aceite resultantes tienen un tamaño de aproximadamente 180 nm.

40

Preparación de la formulación de aceite en agua.

Los antígenos (100 µg de gp120, 20 µg de NefTat y 20 µg de Nef de SIV, solos o combinados) se diluyeron en PBS

concentrado 10 veces a pH 6,8 y H₂O antes de la adición consecutiva de la emulsión de aceite en agua, 3D-MPL (50 µg), QS21 (50 µg) y 1 µg/ml de tiomersal como conservante a intervalos de 5 minutos. El volumen de la emulsión es igual al 50% del volumen total (250 µl para una dosis de 500 µl).

Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con agitación.

- 5 El oligonucleótido CpG (CpG) es un oligonucleótido no metilado sintético que contiene uno o varios motivos de la secuencia CpG. CpG es un inductor muy potente de la inmunidad de tipo Th1 en comparación con la formulación de aceite en agua, que induce, principalmente, una respuesta mixta TH1/TH2. CpG induce un nivel de anticuerpos menor que la formulación de aceite en agua y una buena respuesta inmunitaria celular. Cabe esperar que CpG induzca menor reactogenicidad local.
- 10 Preparación de la solución del oligonucleótido CpG: CpG en polvo seco se disolvió en H₂O para dar una solución de 5 mg/ml de CpG.

Preparación de la formulación de CpG:

Los 3 antígenos se dializaron contra NaCl 150 mM para eliminar los iones fosfato que inhiben la adsorción de gp120 en hidróxido de aluminio.

- 15 Los antígenos diluidos en H₂O (100 µg de gp120, 20 µg de NefTat y 20 µg de Nef de SIV) se incubaron con la solución de CpG (500 µg de CpG) durante 30 minutos antes de la adsorción en Al(OH)₃, para favorecer una potencial interacción entre la cola de His de los antígenos NefTat y Tat y el oligonucleótido (efecto de inmunoestimulación más fuerte de CpG descrito cuando se une al antígeno en comparación con CpG libre). Después, se añadieron consecutivamente a intervalos de 5 min Al(OH)₃ (500 µg), NaCl concentrado por 10 y 1 µg/ml de tiomersal como conservante.
- 20 Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con agitación.

Ejemplo 14: INMUNIZACIÓN Y EXPERIMENTO DE EXPOSICIÓN AL SHIV EN MONOS RHESUS

Primer estudio

Grupos de 4 monos rhesus fueron inmunizados por vía intramuscular a 0, 1, y 3 meses con las siguientes composiciones de vacuna:

- 25 Grupo 1: Adyuvante 2 + gp120
 Grupo 2: Adyuvante 2 + gp120 + NefTat + Nef de SIV
 Grupo 3: Adyuvante 2 + NefTat* + Nef de SIV
 Grupo 4: Adyuvante 6 + gp120 + NefTat + Nef de SIV
 Grupo 5: Adyuvante 2 + NefTat + Nef de SIV
 30 Grupo 6: Adyuvante 2

El adyuvante 2 comprende escualeno/tocoferol/Tween 80/3D-MPL/QS21 y el Adyuvante 6 comprende alumbre y CpG.

Tat* representa Tat mutada, en la que Lys41→Ala y en el motivo RGD Arg78→Lys y Asp80→Glu (Virology 235: 48-64, 1997).

- 35 Un mes después de la última inmunización, todos los animales fueron expuestos a un SHIV patogénico (cepa 89.6p). Desde la semana de la exposición (sem 16) se extrajeron muestras de sangre periódicamente a los puntos de tiempo indicados, para determinar el % de células positivas para CD4 entre las células mononucleares de sangre periférica mediante análisis FACS (Figura 14) y la concentración de genomas ARN virales en plasma mediante ensayo dADN (Figura 15).

Resultados

- 40 Todos los animales se infectaron tras la exposición a SHIV_{89.6p}.
- Las células positivas a CE4 disminuyen tras la exposición en todos los animales de los grupos 1, 3, 5 y 6, a excepción de un animal en cada uno de los grupos 1 y 6 (grupo control). Todos los animales del grupo 2 exhiben una ligera disminución de las células positivas para CD4 y recuperan los niveles basales en el tiempo. En los animales del grupo 4 se observa una tendencia similar (Figura 14).
- 45 Los datos de carga vírica son casi el inverso de los datos de CD4. La carga viral disminuye por debajo del nivel de detección en ¾ de los animales del grupo 2 (y en el animal control que mantiene sus células positivas para CD4) y el

cuarto animal muestra una carga viral sólo marginal. La mayoría de los demás animales mantienen una carga viral alta o intermedia (Figura 15).

Sorprendentemente, los títulos de anticuerpos anti-Tat y anti-Nef medidos mediante ELISA fueron de 2 a 3 veces mayores en el grupo 3 (con Tat mutada) que en el grupo 5 (el grupo equivalente con Tat sin mutar) a lo largo del curso del estudio.

- 5 La semana 68 (56 semanas después de la exposición), todos los animales de los grupos que habían recibido la combinación antigénica completa (grupos 2 y 4) estaban todavía vivos, mientras que la mayoría de los animales de los demás grupos tuvieron que ser sacrificados debido a síntomas similares a los del SIDA. Los animales supervivientes por grupo fueron:

Grupo 1: 2/4

10 Grupo 2: 4/4

Grupo 3: 0/4

Grupo 4: 4/4

Grupo 5: 0/4

Grupo 6: 1/4

15 Conclusiones

La combinación de gp120 y NefTat (en presencia de Nef de SIV) previene la pérdida de células positivas para CD4, reduce la carga viral en los animales infectados con SHIV_{89,6p} patogénico

Y retrasa o previene el desarrollo de los síntomas de enfermedad similares al SIDA, mientras que gp120 o NefTat/SIV solas no protegen de las consecuencias patológicas de la exposición al SHIV.

- 20 El adyuvante 2, que es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, tocoferol y Tween 80, junto con 3D-MPL y QS21 parece tener un efecto más fuerte sobre los criterios de evaluación del estudio que el adyuvante de alumbre/CpG.

Segundo estudio

- 25 Se realizó un segundo estudio de exposición al SHIV de monos rhesus para confirmar la eficacia de la vacuna candidato gp120/NefTat + adyuvante y para comparar diferentes antígenos a base de Tat. El estudio se realizó en un laboratorio diferente.

El diseño del estudio fue el siguiente:

Grupos de 6 monos rhesus fueron inmunizados a 0, 4 y 12 semanas con inyecciones i.m. y se expusieron a la semana 16 con una dosis convencional de SHIV_{89,6p} patogénico.

- 30 Grupo 1 es la repetición del Grupo 2 en el primer estudio.

Grupo 1: Adyuvante 2 + gp120 + NefTat + Nef de SIV

Grupo 2: Adyuvante 2 + gp120 + Tat (oxidada)

Grupo 3: Adyuvante 2 + gp120 + Tat (reducida)

Grupo 4 Adyuvante 2

- 35 Los criterios de seguimiento/evaluación fueron, de nuevo, el % de células positivas para CD4, la carga viral mediante RT-PCR, la morbilidad y la mortalidad

Resultados

Todos los animales, excepto uno en el grupo 2, se infectaron tras la exposición a SHIV_{89,6p}.

- 40 Las células positivas a CD4 disminuyen significativamente tras la exposición en todos los animales del grupo control 4 y el grupo 3, y en todos excepto en un animal del grupo 2. Solo un grupo 1 muestra una disminución marcada de las células positivas para CD4. Al contrario que los animales del primer estudio, los monos del segundo experimento muestran una estabilización de las células positivas para CD4 a diferentes niveles un mes después de la exposición al virus (Figura 16). En general, la estabilización es inferior al % inicial de células positivas para CD4, pero nunca conducen a una pérdida completa de las células. Esto puede ser indicativo de una susceptibilidad menor a la enfermedad inducida por el SHIV en

la población de monos que se usó para el segundo estudio. No obstante, Se puede demostrar un efecto beneficioso de la vacuna de gp120/NefTat/Nef de SIV y las dos vacunas con gp120/Tat. El número de animales con un % de células positivas para CD4 por encima de 20 es 5 para los animales vacunados, mientras que ninguno de los animales control del grupo de adyuvante permanece por encima de dicho nivel.

- 5 El análisis de las cargas virales en plasma en RAB confirma la relativamente baja susceptibilidad de los animales del estudio (Figura 17). Sólo 2 de los 6 animales control mantienen una carga viral elevada, mientras que el virus desaparece del plasma en los otros animales. Por tanto, es difícil de demostrar un efecto de la vacuna para el parámetro de la carga viral.

Conclusiones

- 10 El análisis de las células positivas para CD4 indica que la vacuna con gp120/NefTat + adyuvante (en presencia de Nef del SIV) previene el descenso de las células positivas para CD4 en la mayoría de los animales vacunados. Debido a la falta de susceptibilidad de los animales del estudio, el parámetro de la carga viral no pudo usarse para demostrar un efecto de la vacuna. En conjunto, la combinación de los antígenos gp120 y Tat y Nef del VIH proporciona protección contra las consecuencias patológicas de la infección por VIH, como se pone de manifiesto en un modelo de SHIV.

- 15 Los antígenos Tat solos en combinación con gp120 también proporcionan alguna protección de la disminución de las células positivas para CD4. El efecto es menos pronunciado que con la combinación de antígenos gp120/NefTat/Nef del SIV, pero demuestra que gp120 y Tat pueden mediar alguna eficacia protectora contra las manifestaciones de enfermedad inducidas por el SHIV.

- 20 El segundo estudio de exposición al SHIV se realizó con monos rhesus de una fuente completamente no relacionada con la fuente de animales del primer estudio. Ambos parámetros, el % de células positivas para CD4 y la carga viral en plasma, sugieren que los animales del segundo estudio eran menos susceptibles a la enfermedad inducida por SHIV y que había considerablemente más variabilidad entre los animales. No obstante, se observó un efecto beneficioso sobre el mantenimiento de las células positivas para CD4 de la vacuna con gp120/NefTat/Nef del SIV con la vacuna experimental que contiene gp120/NefTat y Nef del SIV. Esto indica que el efecto de la vacuna no sólo se repitió en un estudio aparte, sino que también se demostró en una población de monos no relacionada.

- 25

Ejemplo 15: Generación de vectores PMID para gp120 y NEf/Tat

- Los vectores de expresión se construyeron como se describe más adelante. Las preparaciones de plásmido sin endotoxina se prepararon y usaron para transfectar monocapas de células 293T subconfluentes en placas de cultivo tisular de 24 pocillos con 1 µg de ADN que usa lipofectamina 2000. Las muestras se recogieron 24 horas después de la transfección y analizaron mediante transferencia de tipo Western para evaluar los niveles de expresión. (Fig. 18 y 19)

- 30

La optimización de codones de gp120 tuvo como resultado un incremento sustancial de expresión independiente de REV.

Generación de plásmidos

Véase también las Figuras 20-23

gp120:

- 35 Se compararon la gp120 de tipo silvestre y optimizada.

De tipo silvestre: (pgp120w)

Clonado mediante PCR de pRIT 13968 (véase el Ejemplo 11) usando cebadores:

g120w-5' GAATTCGCGGCCGCAATGAAAGTGAAGGAGACCAG (SEC ID N° 32)

g120w-3' GAATTCGGATCCTTATCTCTGCACCAGTCTTC (SEC ID N° 33)

- 40 El gen se clonó en el vector p7313-ie como fragmento NotI-BamHI y se secuenció. Se encontró un cambio de una base (conservadora) respecto a la secuencia de referencia, pero este cambio también se descubrió al secuenciar pRIT 13968 (T1170C in gp120).

Optimización de codones (pgp120c)

- 45 La secuencia génica se basó en la secuencia de gp120 de pRIT 13968. Esto tiene un valor RSCU de 0,297. La optimización se realizó usando SynGen 2d, que tiene como resultado un valor de RSCU de 0,749. La secuencia se dividió en 40 oligonucleótidos solapantes, se ensambló por PCR y se recuperó usando los cebadores de finalización. El gen se clonó en el vector p7313-ie como fragmento NotI-BamHI y se secuenció. Los fragmentos de restricción de tres clones iniciales se combinaron para generar un único clon correcto.

Nef/Tat (pNTm y ptrNTm)

El gen para la proteína de fusión Nef/Tat se proporcionó en el plásmido pRIT15244. El plásmido pRIT 15244 es idéntico al pRIT 14913 descrito anteriormente, a excepción de que se ha eliminado la cola de His. La Tat en este plásmido contiene tres mutaciones como se ha descrito previamente. La fusión contiene la Nef de longitud completa, que tiene una función inmunomoduladora (Collins and Baltimore (1999)), que puede quedar anulada por la fragmentación en N-terminal. Por tanto, las construcciones se generaron para la NEF/Tat mutante (pNTm) de longitud completa y para la Nef/Tat mutante truncada (ptrNTm), en la que los primeros 65 aminoácidos de Nef se habían eliminado. Estas secuencias se amplificaron por PCR de pRIT15244 usando los cebadores:

5'Nef: GAATTCGCGGCCGCCATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAG

10 5'trNef: GAATTCGCGGCCGCCATGGTGGGTTTTCCAGTCACACC

3'Tat: GAATTCGGATCCTTATTCCTTCGGCCTGTCGGG (Seq ID Nos: 34, 35 y 36 respectivamente)

Los genes se clonaron en el vector p7313-ie como fragmento NotI-BamHI y se secuenciaron.

Vectores de expresión dual: (pRIX1 y pRIX2)

15 Los casetes de expresión de Nef/Tat y trNef/Tat se escindieron como fragmentos de restricción ClaI-XnnI y se ligaron en los sitios ClaI y Sse8387 I como del vector, que contiene la gp120 con optimización de codones para proporcionar plásmidos sencillos para la expresión de ambas proteínas (pRIX1 y pRIX2 respectivamente).

Composición del plásmido p7313-ie

El plásmido se construyó sustituyendo el gen de la beta-lactamasa que contiene el fragmento Eam1105I-PstI de pUC19 (disponible en Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Amersham Place, Little Chalfont, Bucks, HP7 9NA) con un fragmento de EcoRI de pUC4K (Amersham-Pharmacia) que contiene el gen de resistencia a kanamicina, seguido por fragmentación roma de ambos fragmentos usando la ADN polimerasa T4. El promotor IE1/potenciador del citomegalovirus humano, Intrón A, se obtuvo del plásmido JW4303 obtenido del Dr. Harriet Robinson, University of Massachusetts, y se insertó en el sitio SalI de pUC19 como fragmento XhoI -SalI, que incorpora la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. La delección del fragmento 5' Sall-BanI del promotor generó el promotor mínimo usado en el vector (documento WO00/23592-Powderject Vaccines Inc.). LA 3'UTR del antígeno de superficie del VHB se obtuvo del virus de la hepatitis B, serotipo adw, en el vector pAM6 (Moriarty y col., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 78, 2606-10,1981). El pAM6 (vector basado en pBR322) se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo, número de catálogo ATCC 45020. La 3'UTR se insertó en 5' de la señal de poliadenilación como un fragmento BamHI de 1,4 kb, con extremos romos para la inserción para eliminar los sitios BamHI. En una serie de etapas (que incluyen digestión con Bgl II, tratamiento con polimerasa Klenow, digestión con BstX I, digestión con NcoI, tratamiento con la nucleasa mung bean para eliminar los pendientes y posterior digestión con BstXI) se realizaron modificaciones en la región entre la región potenciadora 3'-no traducida del gen s del VHB y la señal bGHpA para eliminar todos los marcos de lectura abiertos de más de 5 codones entre el promotor del gen X y la señal bGHpA. Esto tuvo como resultado la delección de la secuencia que codifica la porción traducible de la proteína X (9 aminoácidos) y el codón de iniciación del gen X. La señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina se sustituyó por la señal de poliadenilación de la beta globina de conejo. Las secuencias codificadoras y no codificadoras en 5' del antígeno S se escindieron y reemplazaron con un enlazador oligonucleotídico para proporcionar múltiples sitios de clonación, como se muestra que produce el plásmido p7313-PL.

Hind---NotI-- EcoRV- -NdeI- -BamHI

AGCTTGCGGCCGCTAGCGATATCGGTACCATATGTCGACGGATCC....

....ACGCCGGCGATCGCTATAGCCATGGTCTACAGCTGCCTAGGCCGG

-NheI- -KpnI- -SalI- ΔNotI

40 (SEC ID N° 37)

Este polienlazador se extendió adicionalmente mediante inserción de un enlazador oligonucleotídico adicional entre los sitios KpnI y SalI.

AspI- -MunI- NaeI- NdeI-- BglIII-

GTACCGGTCAATTGGCGCCGGCGCGCCATATGACGTCAGATCTG----

----GCCAGTTAACCGCGGGCCGCGGGTATACTGCAGTCTAGACAGCT

--AgeI- -NarI-- AatII- SalI

(SEC ID N° 38)

La secuencia ColE1 cer se obtuvo de un subclon del plásmido pDAH212 de David Hodgeson (Warwick University) y se amplificó mediante PCR usando cebadores para introducir sitios de restricción EcoRI en los extremos de la secuencia. Después, la secuencia cer se insertó en el sitio EcoRI de p7313-PL para producir el plásmido p7313-PLc. La secuencia del cer amplificado se verificó frente a la entrada M11411 del Genbank.

La secuencia 3'UTR del VHB entre el promotor y la señal de poliadenilación se eliminó mediante amplificación por PCR de la señal de poliadenilación usando cebadores: sentido: CCATGGATCCGATCTTTTCCCTCTGCC (SEC ID N° 39) antisentido: GTTAGGGTGAAAAGCTTCCGAGTGAGAGACAC (SEC ID N° 40). El producto resultante se cortó con BamHI yXmnI y se usó para reemplazar el fragmento correspondiente que contiene la señal de poliadenilación y la 3'UTR. La secuencia del intrón A se eliminó del plásmido mediante amplificación por PCR del promotor/potenciador del CMV usando los cebadores:

sentido: GCTAGCCTGCAGGCTGACCGCCCAACGAC (SEC ID N° 41) antisentido: GTTCTCCATCGCGGCCGCACTCTTGGCACGGGG (SEC ID N° 42)

El producto resultante se cortó con Sse8387 I y NotI, y se volvió a insertar en los sitios Sse8387 I y NotI del vector parental.

Ejemplo 16: ESTUDIOS DE INMUNOGENICIDAD

Se puede realizar un estudio de inmunogenicidad en ratones para analizar la inmunogenicidad de las construcciones gp120 y NefTat liberadas mediante liberación inmunoterapéutica mediada por partículas (PMID) para mostrar que la construcción puede generar una respuesta inmunitaria *in vivo*. Las construcciones de ADN se pueden usar en combinación con proteínas para determinar si hay una ventaja del enfoque combinado en comparación con la inmunización con los componentes individuales. El objetivo es detectar y cuantificar las respuestas inmunitarias celular y humoral en ratones tras la sensibilización con proteína y el refuerzo con ADN (PMID) o sensibilización con ADN (PMID) y refuerzo con proteína.

El ADN se precipita en micropartículas de oro, que se usan para recubrir las paredes internas de un cartucho de tefzel. Los cartuchos de PMID se preparan usando una tasa de carga de ADN de 2, que da aproximadamente 0,5 µg de ADN por cartucho.

Los ratones se inmunizan mediante PMID en el abdomen proporcionando dos inyecciones que contienen gp120 o NefTat. Tras un refuerod PMID se extirpan los bazo y las células del bazo se usan para determinar la inmunogenicidad a construcciones individuales. Las respuestas se evalúan usando el ensayo IFN-γ ELISpot. En este ensayo se usan péptidos de gp120 y Nef para estimular las células del bazo para secretar IFNγ, que es capturado por un sistema de detección basado en anticuerpos. La medición de las respuestas humorales a gp120 y Nef se miden mediante ELISA.

Estudios de sensibilización y refuerzo con gp120/NefTat

El objetivo del estudio es detectar y cuantificar las respuestas inmunitarias celular y humoral en ratones tras la sensibilización con proteína y el refuerzo con ADN (PMID) o sensibilización con ADN (PMID) y refuerzo con proteína.

Preparación del cartucho

Los cartuchos de pistola gónica se preparan adecuadamente usando una tasa de carga de ADN (TCA) de 2, que dará aproximadamente 0,5 µg de ADN por cartucho.

Inmunogenicidad in vivo

Se puede llevar a cabo un experimento (experimento I) adecuadamente como se indica en la tabla siguiente. Las lecturas para este experimento se llevan a cabo mediante IFN-γ ELISpot con péptidos de Balb/c de gp120 y Nef, para medir las respuestas celulares y la detección de anticuerpos frente a gp120 y Nef mediante ELISA para la respuesta humoral.

Experimento I

Grupo	Cepa de ratón	Sensibilización	Refuerzo
A	Hembra Balb/c	PMID: gp120, 2 x 0,5 µg	PMID: gp120, 2 x 0,5 µg
B	Hembra Balb/c	PMID: NefTat, 2 x 0,5 µg	PMID: NefTat, 2 x 0,5 µg
C	Hembra Balb/c	PMID: Vector vacío, 2 x 0,5 µg	MID: Vector vacío, 2 x 0,5 µg
D	Hembra Balb/c	Proteína: gp120	Proteína: gp120
E	Hembra Balb/c	Proteína: NefTat	Proteína: NefTat
H	Hembra Balb/c	Proteína: irrelevante proteína	Proteína: irrelevante proteína
n= 3			

Otro experimento (Experimento II) se puede llevar a cabo del siguiente modo:

Experimento II

Grupo	Cepa de ratón	Sensibilización	Refuerzo
A	Hembra Balb/c	PMID: gp120, 2 x 0,5 µg	Proteína: gp120
B	Hembra Balb/c	PMID: gp120, 2 x 0,5 µg	PMID: gp120, 2 x 0,5 µg
C	Hembra Balb/c	PMID: NefTat, 2 x 0,5 µg	Proteína: NefTat
D	Hembra Balb/c	PMID: NefTat, 2 x 0,5 µg	PMID: NefTat, 2 x 0,5 µg
E	Hembra Balb/c	PMID: gp120, 2 x 0,5 µg, NefTat 2 x 0,5 µg	Proteína: gp120 + NefTat
F	Hembra Balb/c	PMID: gp120, 2 x 0,5 µg, NefTat 2 x 0,5 µg	PMID: gp120, 2 x 0,5 µg, NefTat 2 x 0,5 µg
G	Hembra Balb/c	PMID: Vector vacío 2 x 0,5 µg	Proteína: proteína irrelevante
H	Hembra Balb/c	Proteína: gp120	PMID: gp120, 2 x 0,5 µg
I	Hembra Balb/c	Proteína: gp120	Proteína: gp120
J	Hembra Balb/c	PMID: NefTat	PMID: NefTat, 2 x 0,5 µg
(CONT)			
K	Hembra Balb/c	PMID: NefTat	PMID: NefTat
L	Hembra Balb/c	Proteína: gp120 + NefTat	PMID: gp120 2 x 0,5 µg NefTat, 2 x 0,5 µg
M	Hembra Balb/c	Proteína: gp120 + NefTat	Proteína: gp120 + NefTat
N	Hembra Balb/c	Proteína: proteína irrelevante	PMID: Vector vacío, 2 x 0,5 µg
n= 3			

5 Protocolo de muestra

Se usan ratones hembra Balb/c. En todos los ratones se extrajo sangre previamente (de la vena de la cola) antes de

iniciar el experimento.

Grupos de 3 ratones/grupo se sacrifican después de la inmunización primaria y se extirpan los bazos para la enumeración de las células CD8 productoras de IFN- γ mediante ensayo ELISpot assay usando péptidos restringidos en gp120 y Nef-K^d.

- 5 Grupos de 3 ratones/grupo se sacrifican a un mínimo de dos puntos de tiempo tras la inmunización secundaria y se extraen muestras de sangre cardíaca. Éstas se analizan para detectar anticuerpos frente a gp120 y Nef usando ensayos ELISA. También se extirpan los bazos para la enumeración de las células CD8 productoras de IFN- γ mediante ensayo ELISpot assay usando péptidos restringidos en gp120 y Nef-K^d.

Ensayos inmunológicos

Ensayos ELISpot

- 10 Las respuestas inmunitarias celulares se detectan usando ensayos ELISpot de interferón- γ . Se aislarán los esplenocitos de 3 ratones por grupo en el punto de tiempo seleccionado (uno después de la administración primaria y un mínimo de dos después del refuerzo) y se incuban durante la noche con péptidos frente a epítomos de CD8 conocidos (restringidos a un K^d (Balb/c) anterior) en placas revestidas con α -Interferón- γ . Los esplenocitos se lisan y se desarrollan las placas usando un anticuerpo secundario frente a α -Interferón- γ y un sistema de amplificación con biotina-estreptavidina.

- 15 Ensayos ELISA

Las respuestas humorales se detectan usando ensayos convencionales de ELISA con anticuerpos. Placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos se revestirán con proteína y se bloquearán. Se realizan diluciones en serie del suero obtenido antes de la inmunización y después del refuerzo, y se incuban en las placas. Las placas se desarrollan después de la incubación con un anticuerpo anti-ratón. Se analizan las respuesta a gp120, Nef y Tat.

- 20 **Ejemplo 17: ESTUDIOS DE INMUNOGENICIDAD**

Protocolo

Se prepararon cartuchos para liberación mediada por partículas usando una pistola génica mediante procedimientos estándar. Se usó una tasa de carga de ADN de 2, que dará aproximadamente 0,5 μ g/ADN/cartucho.

- 25 Ratones F1 (C3H X Balab/c) recibieron una inmunización primaria con la proteína gp120 y NefTat en adyuvante (administrados por vía intramuscular) o con ADN de gp120, con optimización de codones u clonadas en el vector p7313-ie como se ha descrito en el Ejemplo 15 y un vector de expresión de una proteína de fusión Nef (usando liberación mediada por partícula en la que el ADN está recubriendo perlas de oro). Los ratones recibieron refuerzo 23 días después con proteína en adyuvante (administrada por vía intramuscular) o con ADN (usando liberación mediada por partícula en la que el ADN está recubriendo perlas de oro). Se sacrificó a los ratones 5 días después y se extirparon los bazos. Los esplenocitos se recogieron mediante aclaración, los eritrocitos se lisaron y los esplenocitos se lavaron y contaron. Se usaron placas especiales de ELISpot (revestidas con anticuerpo de captura de interferón gamma y de bloqueo). Los esplenocitos se transfirieron a estas placas y se incubaron durante la noche a 37°C/5% de CO₂ en presencia de medio control, péptido gp120E7 o varios péptidos de nef. Los esplenocitos se lisaron y la placa se desarrolló usando procedimientos convencionales para demostrar el número de células secretoras de interferón gamma presentes.
- 30

- 35 **Conclusión**

Aunque el ensayo ELISpot se llevó a cabo usando una concentración subóptima del péptido gp120 E7, los resultados indicaron que el programa más eficaz era cebar a los ratones con proteína en adyuvante (administrada i.m.) y, después, administrar el refuerzo con ADN (administrado mediante liberación mediada por partícula). Véase la Figura 24. Se obtuvieron resultados similares para nef, siendo los dos péptidos Nef19 y 20 únicamente reconocidos por ratones a los que se había sensibilizado con proteína y a los que se había administrado refuerzo con ADN. Las secuencias de estos dos péptidos son Nef29: VIH-1-Bru (171-190) GMDDPEREVLEWRFD SRLAF (SEC ID N° 43) y Nef 20: VIH-1 Bru (181-200) EWRFD SRLAFHHVARELHPE (SEC ID N° 44). Véase la figura 25.

40

Ejemplo 18: ESTUDIOS DE INMUNOGENICIDAD

Protocolo

- 45 Para inmunizaciones PMID (ADN) se prepararon cartuchos usando procedimientos convencionales. Se usó una tasa de carga de ADN de 2, que dará aproximadamente 0,5 μ g/ADN/cartucho y cada inmunización consistió en dos administraciones. La proteína se formuló en adyuvante que comprende escualeno/tocoferol/Tween 80/3D-MPL1QS21 justo antes de usar. Los ratones Balb/c recibieron una inmunización primaria de proteína gp120 en adyuvante (administrada por vía intramuscular) o con ADN con optimización de codones de gp120 preparado como se ha descrito en el Ejemplo 1 (usando PMID). Los ratones recibieron refuerzo 21 días después con proteína en adyuvante (administrada
- 50

5 por vía intramuscular) o con ADN (usando PMID). Se sacrificó a los ratones 7 días después y se extirparon los bazo. Los esplenocitos se recogieron mediante aclaración, los esplenocitos y los eritrocitos se lisaron. Los esplenocitos se lavaron y se contaron. Se usaron placas especiales de ELISpot (revestidas con anticuerpo de captura de interferón gamma y de bloqueo). Los esplenocitos se transfirieron a estas placas y se incubaron durante la noche a 37°C/5% de CO2 en presencia de combinaciones de péptidos de 15 unidades de gp 120. Los esplenocitos se lisaron y la placa se desarrolló usando procedimientos convencionales para demostrar el número de células secretoras de interferón gamma presentes. Los resultados se muestran en la Figura 26.

Conclusión

10 Tres grupos de péptidos de 15 unidades de gp120 fueron reconocidos por los ratones que habían sido sensibilizados con proteína y a los que se había administrado refuerzo con ADN. Respuestas a estos tres grupos de gp120 de 15 unidades no se detectaron en animales que habían recibido sensibilización con ADN y refuerzo con proteína o que habían sido inmunizados con la proteína o con ADN.

REIVINDICACIONES

1.- Uso de

a) una proteína o polinucleótido de Tat del VIH; o

b) una proteína o polinucleótido de Nef del VIH; o

5 c) una proteína o polinucleótido de Tat del VIH unido a una proteína o polinucleótido de Nef del VIH;

y una proteína o polinucleótido de gp120 del VIH en la fabricación de una vacuna adecuada para una administración de sensibilización-refuerzo para la inmunización profiláctica o terapéutica de seres humanos contra el VIH, en la que la dosis de sensibilización es la proteína gp120 del VIH y la proteína Tat del VIH y/o la proteína Nef del VIH, y la dosis de refuerzo es el polinucleótido de gp120 del VIH y el polinucleótido de Tat del VIH y/o el polinucleótido de Nef del VIH, y en la que el polinucleótido se libera a través de un enfoque de bombardeo.

10 2.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el enfoque de bombardeo comprende propulsar partículas a un tejido diana de interés, normalmente la piel.

3.- Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que las partículas son perlas de oro sobre las que se ha depositado la proteína o el polinucleótido.

15 4.- Uso de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que las partículas se aceleran a velocidad alta con un chorro de gas helio.

5.- Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que las perlas de oro tiene un diámetro de 0,4-4,0 μm .

6.- Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que las perlas de oro tiene un diámetro de 0-6 μm , a 2,0 mm

20 7.- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polinucleótido que codifica nef, tat o gp120 es ADN con optimización de codones.

8.- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polinucleótido que codifica nef, tat o gp120 está presente en un único vector.

25 9.- Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el vector comprende los polinucleótidos de nef, tat y gp120 insertados en 3' de un promotor IE1 de HCMV potenciado.

10.- Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el vector es p7313 como se muestra en la Figura 22.

30 11.- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en la formulación de vacuna se incluyen proteínas reguladoras o estructurales adicionales del VIH, tales como Rev, Vif, Vpu y Vpr, o proteínas derivadas de los genes *gag* o *pol* del VIH (y/o polinucleótidos que codifican dichas proteínas reguladoras o estructurales).

12.- Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la proteína está adyuvada.

13.- Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el adyuvante es una combinación de Qs21 y 3D-MPL.

35

FIGURA 1

Se ilustran las secuencias de ADN y de aminoácidos de Nef-His; Tat-His; fusión Nef-Tat-His y Tat mutada.

Construcciones expresadas en Pichia (constructos sencillos)

⇒ Nef - HIS

Secuencia de ADN (SEC ID N° 8)

ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAGA
 ATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGCAGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAA
 AAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGCTTGTGCCTGG
 CTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTA
 AGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGG
 GGACTGGAAGGGCTAATTCCTCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATC
 TACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTC
 AGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAG
 GTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCAT
 GGAATGGATGACCCTGAGAGAGAAGTGTTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCA
 TTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGGC
 CACCATCACCATCACCATTAA

Secuencia proteica (SEC ID N° 9)

MGGKWSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAACAW
 LEAQEEEEVGFVPTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWI
 YHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKLVPEPDKVEEANKGENTSLHPVSLH
 GMDDPEREVLEWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNCTSGHHHHHH.

⇒ Tat - HIS

Secuencia de ADN (SEC ID N° 10)

ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAA
 ACTGCTTGTAACCAATTGCTATTGTAAAAGTGTGGCTTTCATTGCCAAGTTTGTTC
 ATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGA
 CCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAA

TCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAACTAGTGGCCACCATCACCATCACCAT
TAA

Secuencia proteica (SEC ID N° 11)

MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKALGISYGRKKRRQRRR
PPQGSQTHQVLSKQPTSQSRGDPTGPKETSGHHHHHH.

⇒ Nef - Tat - HIS

Secuencia de ADN (SEC ID N° 12)

ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAGA
ATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGCAGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAA
AAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGCTTGTGCCTGG
CTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTA
AGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGG
GGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATC
TACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTC
AGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAG
GTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACCAGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCAT
GGAATGGATGACCCTGAGAGAGAAGTGTTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCA
TTTCATCACGTGGCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGAG
CCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAACCTGCT
TGTACCAATTGCTATGTAAAAGTGTGCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACA
AAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCT
CAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGA
GGGACCCGACAGGCCCGAAGGAACTAGTGGCCACCATCACCATCACCATTAA

Secuencia proteica (SEC ID N° 13)

MGGKWSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAISSNTAATNAACAW
LEAQEEEEVGFVPTQVPLRPMYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRQDILDLDWI
YHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWICYLVPVEPKVEEANKGENTSLHHPVSLH
GMDDPEREVLEWRFSRLAFHHVARELHPEYFKNCTSEPVDPRLEPWKHPGSQPKTA
CTNCYCKKCCFHCQVCFITKALGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVLSKQPTSQSR
GDPTGPKETSGHHHHHH.

Construcciones expresadas en E.coli (construcciones de fusión)

⇒ LipoD-Nef-HIS

Secuencia de ADN (SEC ID N° 14)

Los nucleótidos correspondientes a la pareja de fusión de la proteína D se indican en negrita.

La secuencia señal de lipidación está subrayada. Después de procesar, la cisteína codificada por el codón TGT, indicada con una estrella, se convierte en el residuo amino terminal que, después, se modifica mediante ácidos grasos unidos covalentemente.

*

ATGGATCCAAAACTTTAGCCCTTTCTTTATTAGCAGCTGGCGTACTAGCAGGTTGT
AGCAGCCATTCATCAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATCAGACAAAAATCATTATT
GCTCACCGTGGTGTAGCGGTTATTTACCAGAGCATAACGTTAGAATCTAAAGCACTT
GCTTTTGCACAACAGGCTGATTATTTAGAGCAAGATTTAGCAATGACTAAGGATGGT
CGTTTAGTGGTTATTCACGATCACTTTTTAGATGGCTTGACTGATGTTGCGAAAAAA
TTCCACATCGTCATCGTAAAGATGGCCGTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAA
GAAATTCAAAGTTTAGAAATGACAGAAAACTTTGAAACCATGGGTGGCAAGTGGTCA
AAAAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCA
GCAGCAGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGAGCAATCACA
AGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAG
GAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAG
GCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGACTGGAAGGGCTAATT
CACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTAC
TTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTT
GGATGGTGTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAA
GGAGAGAACACCAGCTTGTACACCCTGTGAGCCTGCATGGAATGGATGACCCTGAG
AGAGAAGTGTAGAGTGGAGTTTTGACAGCCGCTAGCATTTTCATCACGTGGCCCGA
GAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGGCCACCATCACCATCACCAT
TAA

Secuencia proteica de la proteína ProtD-Nef-HIS lipidada procesada (SEC ID N° 15)

(los aminoácidos correspondientes a la pareja de fusión de la Prot D están en negrita)

CSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKD
GRLVVIHDFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFETMGGKW
SKSSVVGWPTVRRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAISSNTAATNAACAWLEAQE
EEEVGFVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDLWIYHTQG
YFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKLVPEPDKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDDP
EREVLEWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNCTSGHHHHHH.

⇒ LipoD-Nef-Tat-HIS

Secuencia de ADN (SEC ID N° 16)

Los nucleótidos correspondientes a la pareja de fusión de la proteína D se indican en negrita.
 La secuencia señal de lipidación está subrayada. Después de procesar, la cisteína codificada por el codón TGT, indicada con una estrella, se convierte en el residuo amino terminal que, después, se modifica mediante ácidos grasos unidos covalentemente

*

ATGGATCCAAAACTTTAGCCCTTTCTTTATTAGCAGCTGGCGTACTAGCAGGTTGT
 AGCAGCCATTCATCAAATATGGCGAAATACCCAAATGAAATCAGACAAAATCATTATT
 GCTCACCGTGGTGCTAGCGGTTA^{*}TTACCAGAGCATAACGTTAGAATCTAAAGCACTT
 GCGTTTGCACAACAGGCTGATTATTTAGAGCAAGATTTAGCAATGACTAAGGATGGT
 CGTTTAGTGGTTATTCACGATCACTTTTTAGATGGCTTGACTGATGTTGCGAAAAA
 TTCCCACATCGTCATCGTAAAGATGGCCGTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAA
 GAAATCAAAGTTTAGAAATGACAGAAA^{*}CTTTGAAACCATGGGTGGCAAGTGGTCA
 AAAAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCA
 GCAGCAGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGAGCAATCACA
 AGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAG
 GAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAG
 GCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATT
 CACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTAC
 TTCCCTGATTGGCAGA^{*}ACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTT
 GGATGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAA
 GGAGAGAACACCAGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCATGGAATGGATGACCCTGAG
 AGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATCACGTGGCCCGA
 GAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGAGCCAGTAGATCCTAGACTA
 GAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAA^{*}ACTGCTTGTACCAATTGCTATTGT
 AAAAAGTGTGCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCC
 TATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCAT
 CAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCG
 AAGGAAACTAGTGGCCACCATCACCATCACCATTAA

Secuencia proteica de la proteína ProtD-NEF-TAT-HIS lipidada procesada (SEC ID Nº 17)
 (los aminoácidos correspondientes a la pareja de fusión de la Prot D están en negrita)

CSSHSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF^QQADYLEQDLAMTKD
 GRLVV^IHDHFLDGLTDVAKK^FPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFETMG^GKW
 SKSSVVGWPTVRE^RMRRAEPAADGVGAASRDLEKHGAI^TSNTAATNAACAWLEAQE
 EEEVGFVPTPQVPLR^PMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILD^LWIYHTQG
 YFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGW^CYKLVPEPKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMD^DP
 EREVLEWR^FDSRLAFHHVARELHPEYFKNCTSEPVDPRL^EPKHPGSQPKTACTNCY
 CKKCCFHCQVCFITKALGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTG
 PKETSGHHHHHH.

⇒ ProtD-Nef -HIS

Secuencia de ADN (SEC ID Nº 18)

Los nucleótidos correspondientes a la pareja de fusión de la proteína D se indican en negrita.

ATGGATCCAAGCAGCCATTCATCAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATCAGACAAA
 ATCATTATTGCTCACCGTGGTGCTAGCGGTATTTACCAGAGCATAACGTTAGAATCT
 AAAGCACTTGCCTTGCACACAGGCTGATTATTTAGAGCAAGATTTAGCAATGACT
 AAGGATGGTTCGTTTGTAGTGGTTATTCACGATCACTTTTTAGATGGCTTGACTGATGTT
 GCGAAAAAATCCACATCGTCATCGTAAAGATGGCCGTTACTATGTCATCGACTTT
 ACCTTAAAAGAAATTCAAAAGTTTAGAAATGACAGAAAACCTTTGAAACCATGGGTGGC
 AAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAGAATGAGACGA
 GCTGAGCCAGCAGCAGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGA
 GCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCA
 CAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCAACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATG
 ACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAA
 GGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACA
 CAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAGATATCCA
 CTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAG
 GCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCATGGAATGGAT
 GACCCTGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATCAC
 GTGGCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGGCCACCATCAC
 CATCACCATTAA

Secuencia proteica (SEC ID Nº 19)

(los aminoácidos correspondientes a la pareja de fusión de la Prot D están en negrita)

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYL
EQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLK
EIQSLEMTENFETMGGKWSKSSVVGWPTVRERMRRAEPAADGVGAASRD
EKHGAITSSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFVTPQVPLRPMTYKAAVDLSH
FLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWYIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGW
CYKLVPEPKVEEANKGENTSLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFDRLAFH
HVARELHPEYFKNCTSGHHHHHHH.

⇒ ProtD-Nef -Tat-HIS

Secuencia de ADN (SEC ID Nº 20)

Los nucleótidos correspondientes a la pareja de fusión de la proteína D se indican en negrita.

ATGGATCCAAGCAGCCATTCATCAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATCAGACAAA
 ATCATTATTGCTCACCGTGGTGTAGCGGTTATTTACCAGAGCATAACGTTAGAATCT
 AAAGCACTTGCCTTGCACAACAGGCTGATTATTTAGAGCAAGATTTAGCAATGACT
 AAGGATGGTCGTTTAGTGGTTATTCACGATCACTTTTATAGATGGCTTACTGATGTT
 GCGAAAAAATTCACATCGTCATCGTAAAGATGGCCGTTACTATGTCATCGACTTT
 ACCTTAAAAGAAATTCAAAGTTTAGAAATGACAGAAAACCTTGAACCATGGGTGGC
 AAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAGAATGAGACGA
 GCTGAGCCAGCAGCAGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGA
 GCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCA
 CAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCAACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATG
 ACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAA
 GGGCTAATCACTCCCAACGAAGACAAGATACTCTGATCTGTGGATCTACCACACA
 CAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCA
 CTGACCTTTGGATGGTGTCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAG
 GCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTACACCCTGTGAGCCTGCATGGAATGGAT
 GACCTGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTATCAC
 GTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGAGCCAGTAGAT
 CCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAAGCTAAAACCTGCTTGTACCAAT
 TGCTATTGTAAAAGTGTGCTTTTATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTA
 GGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGT
 CAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCG
 ACAGGCCCGAAGGAAACTAGTGGCCACCATCACCATCACCATTAA

Secuencia proteica (SEC ID N° 21)

(los aminoácidos correspondientes a la pareja de fusión de la Prot D están en negrita)

MDPSSHSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYLEQDLAMT
 KDGRLLVVIHDFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFETMGG
 KWSKSSVVGWPTVREMRRAEPAADGVGAASRDLEKHGAISSNTAATNAACAWLEA
 QEEEEVGFVPTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWLYHT
 QGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWICYKLVPEPDKVEEANKGENTSLHHPVSLHGMD
 DPEREVLEWRFDRLAFHHVARELHPEYFKNCTSEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTN
 CYCKKCCFHCQVCFITKALGISYGRKKRRRPPQGSQTHQVLSKQPTSQSRGDP
 TGPKETSGHHHHHH.

⇒ Tat-MUTANT-HIS

Secuencia de ADN (SEC ID N° 22)

ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATC	40
CAGGAAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTG	80
TAAAAAGTGTGTGCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACA	120
GCTGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGAC	160
AGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGT	200
TTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCAAAGGGGAG	240
CCGACAGGCCCGAAGGAACTAGTGGCCACCATCACCATC	280
ACCATTAA	288

Secuencia proteica (SEC ID N° 23)

Los aminoácidos mutados en las secuencias Tat están en negrita.

MEPVDPRL EPWKHPGSQP K TACTNCY C KK C CFHCQVCFIT	40
AALGISYGRKKRRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSKGE	80
PTGPKETS GH HHHHH .	95

⇒Nef-Tat-Mutant-HISSecuencia de ADN (SEC ID N° 24)

ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGGTTGGATGGC	40
CTACTGTAAGGGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGC	80
AGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACAT	120
GGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTG	160
CTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGG	200
TTTTCCAGTCAACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACT	240
TACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAA	280
AGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCCAACGAAGACA	320
AGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTAC	360
TTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCA	400
GATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTACC	440
AGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAG	480
AACACCAGCTTGTTACACCCCTGTGAGCCTGCATGGAATGG	520
ATGACCCTGAGAGAGAAGTGTTAGAGTGGAGGTTTGACAG	560
CCGCCTAGCATTTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCG	600
GAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGAGCCAGTAGATCCTA	640
GACTAGAGCCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAC	680
TGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTGCTTTCAT	720
TGCCAAGTTTGTTCATAACAGCTGCCTTAGGCATCTCCT	760
ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCA	800
AGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCC	840
ACCTCCCAATCCAAAGGGGAGCCGACAGGCCCGAAGGAAA	880
CTAGTGGCCACCATCACCATCACCATTAA	909

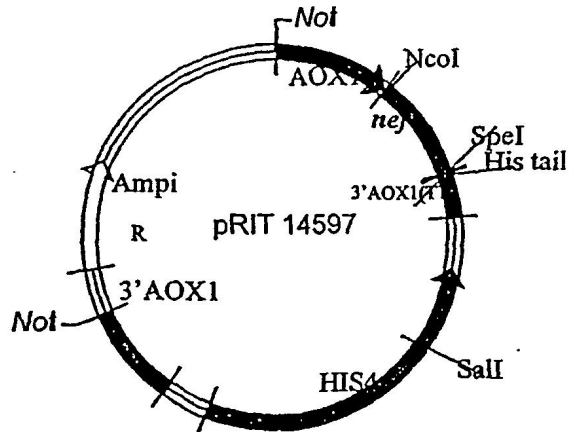
Secuencia proteica (SEC ID N° 25)

Los aminoácidos mutados en las secuencias Tat están en negrita.

MGGKWSKSSVVGWPTVVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKH 40
GAITSSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFPVTPQVPLRPMT 80
 YKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDLWIYHTQGY 120
 FPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKLPVEPKVEEANKGE 160
 NTSLLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFDSRLAFHHVARELHP 200
 EYFKNCTSEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFH 240
 CQVCFITAALGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQP 280
 TSQSKGEPTGPKETSGHHHHH. 302

Figura 2

Mapa del vector integrativo pRIT14597

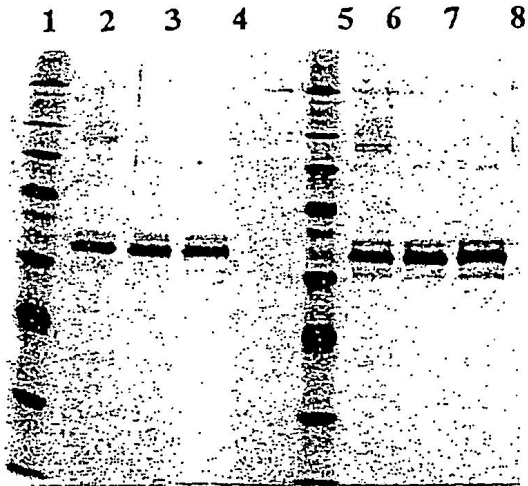


POLIENLAZADOR MCS: gen nef insertado entre los sitios NcoI y SpeI

<i>AsuII</i>	<i>NcoI</i>	<i>SpeI</i>	<i>EcoRI</i>
TTCGAA	<u>ACC.ATGGCCGCGG</u>	<u>GACTAGTGGC</u>	CAC.CAT.CAC.CAT.CAC.CAT.TAA.C <u>GGAATTC</u>
	Thr .Ser . Gly.	His . His . His . His . His . His	

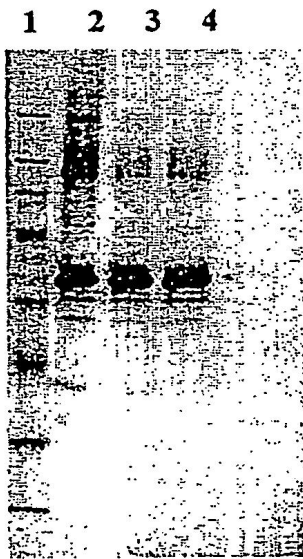
La secuencia de aminoácidos de la Figura 3 se refiere a la SEC ID N° 27 y la secuencia de ácido nucleico de la Figura 3 se refiere a la SEC ID N° 26.

Figura 3: SDS-PAGE: Proteína de fusión Nef-Tat-his



- 1: MW (175/83/62,5/47,5/32,5/25/16,5/6,5 kDa)
- 2: TNH/23 SP eluato : (250 ng)
- 3: TNH/23 Volumen purificado (250 ng)
- 4: TNH/22 Volumen purificado (250 ng)
- 5: MW (175/83/62,5/47,5/32,5/25/16,5/6,5 kDa)
- 6: TNH/23 SP eluato (400 ng)
- 7: TNH/23 Volumen purificado (400 ng)
- 8: TNH/22 Volumen purificado (400 ng)

Tinción Daichii Silver

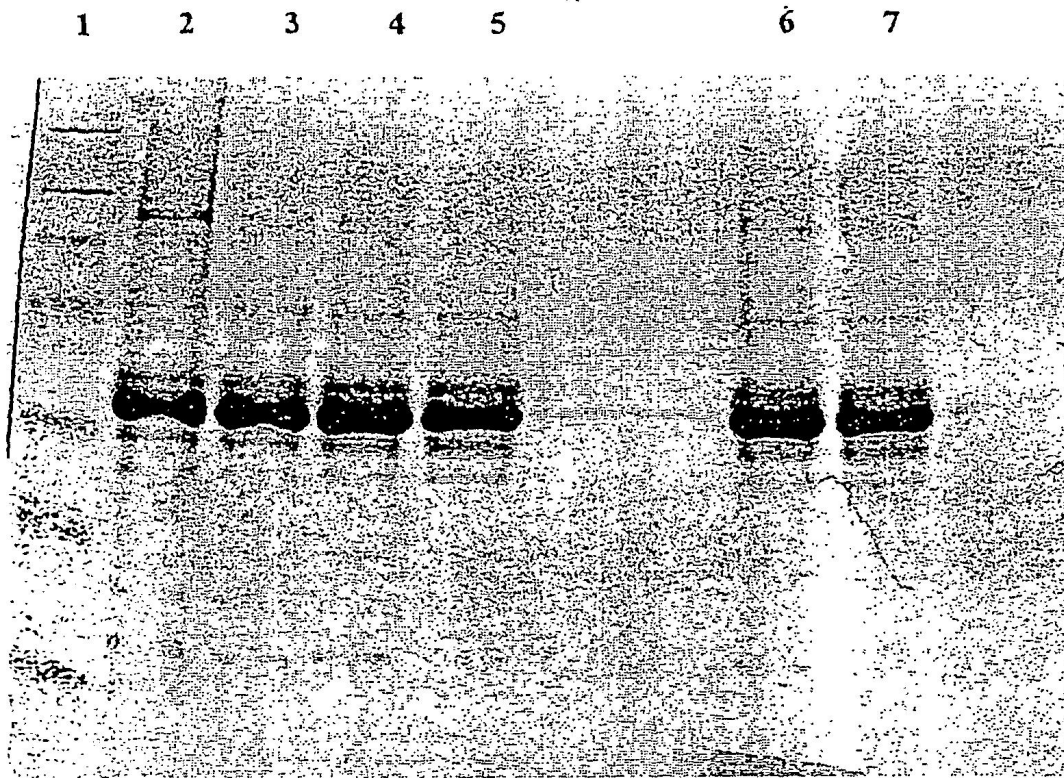


Transferencia α Nef-Tat (LAS 97340)



Transferencia **Tat2**

Figura 4: SDS-PAGE: Proteína de fusión Nef-Tat-



Azul de Coomassie G250

1: PM (175/83/62,5/47,5/32,5/25/16,5/6,5 kDa)

2: TNH/23 SP eluato (4 µg)

3: TNH/23 Superdex200 eluato (4 µg)

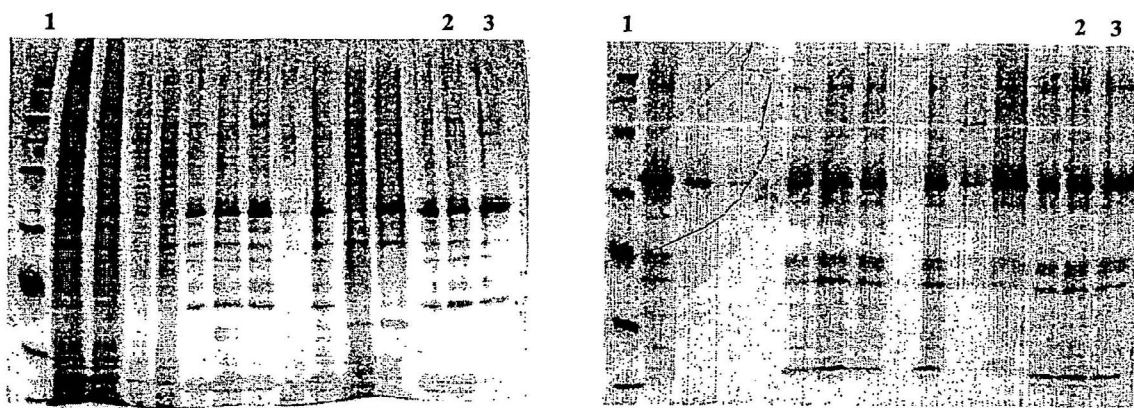
4: TNH/23 Volumen purificado (4 µg)

5: TNH/22 Volumen purificado (4 µg)

6: TNH/23 Volumen purificado (4 µg) / condiciones no reductoras

7: TNH/22 Volumen purificado (4 µg) / condiciones no reductoras

Figura 6: ANÁLISIS SDS-PAGE- condiciones reductoras (14% geles de poliacrilamida profundada- Novex) Véase el ejemplo 5



Tinción de plata

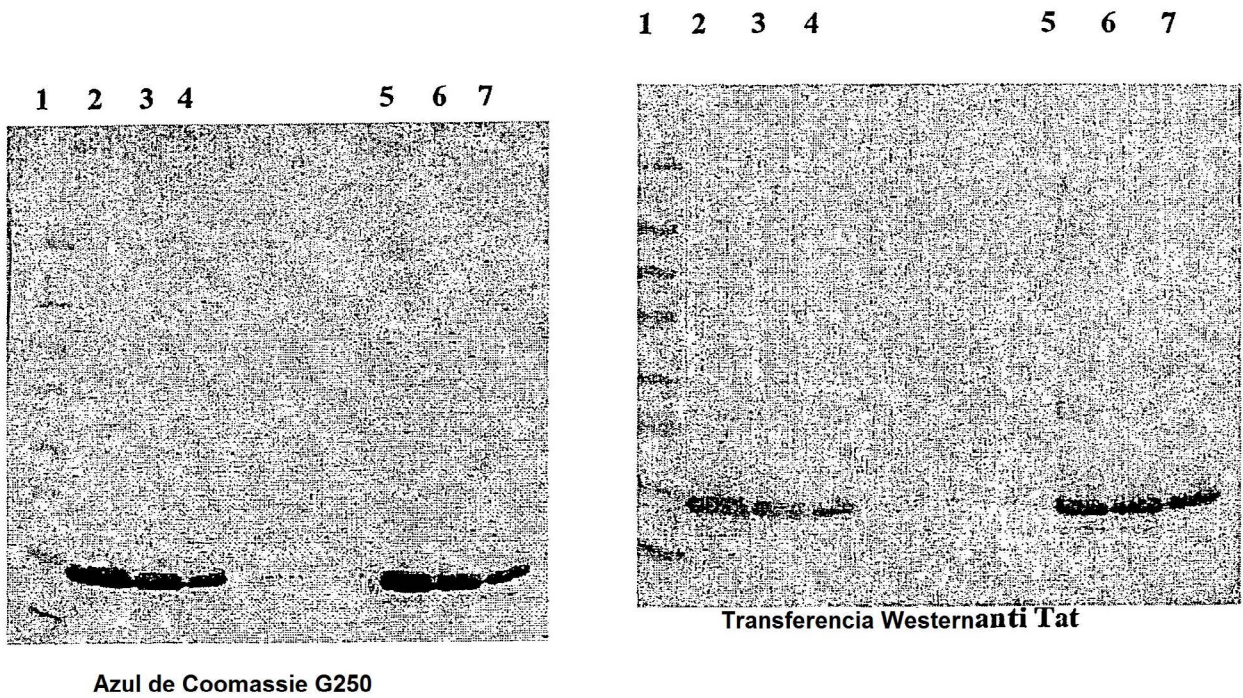
Transferencia Western α Tat

1: PM (175/83/62/47,5/32,5/25/16,5/6,5 kDa)

2: Volumen purificado

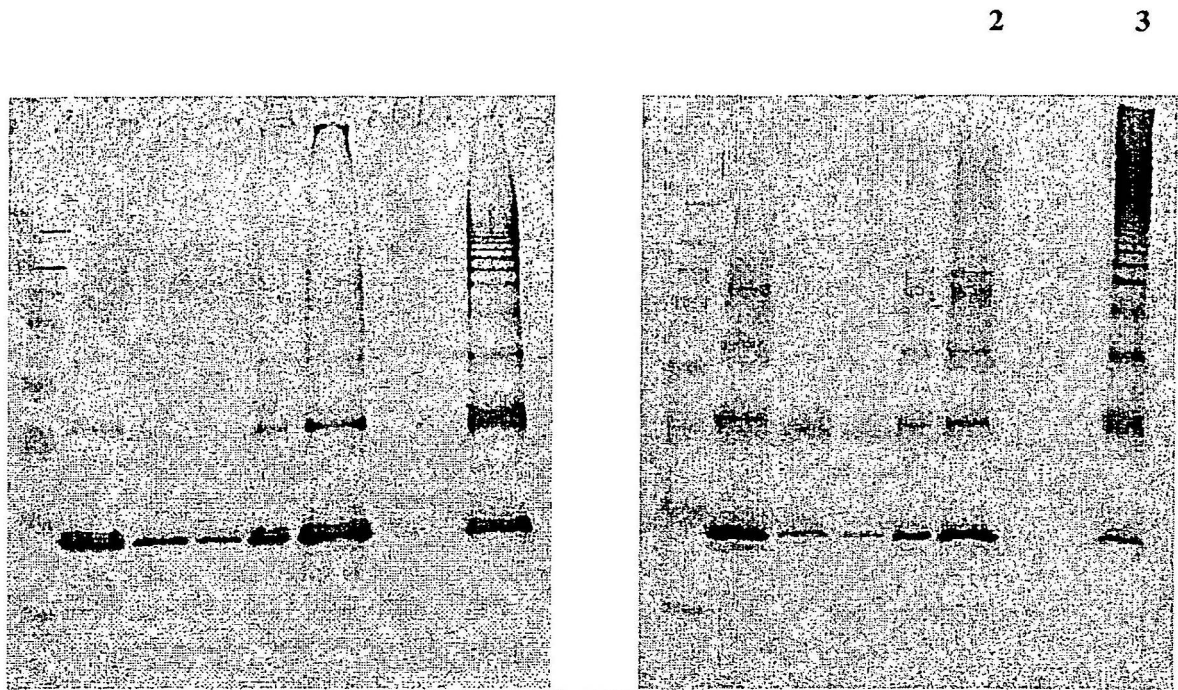
3: Volumen purificado

Figura 7 (en relación con el Ejemplo 6): ANÁLISIS SDS-PAGE
(4-20% geles de poliacrilamida profundida- Novex)



- 1: PM (175/83/62,5/47,5/32,5/25/16,5/6,5 kDa)
- 2: Volumen purificado (condiciones reductoras)
- 3: Volumen purificado (condiciones reductoras)
- 4: Volumen purificado (condiciones reductoras)
- 5: Volumen purificado (condiciones no reductoras)
- 6: Volumen purificado (condiciones no reductoras)
- 7: Volumen purificado (condiciones no reductoras)

Figura 8 (en relación con el Ejemplo 7): ANÁLISIS SDS-PAGE:
(4-20% geles de poliacrilamida profundida- Novex)



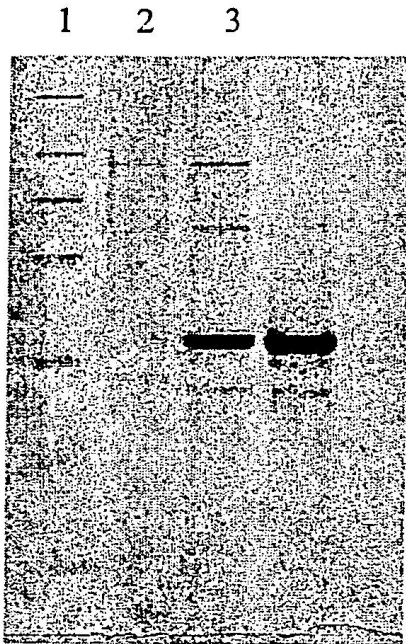
Azul de Coomassie G250

Transferencia Western anti Tat

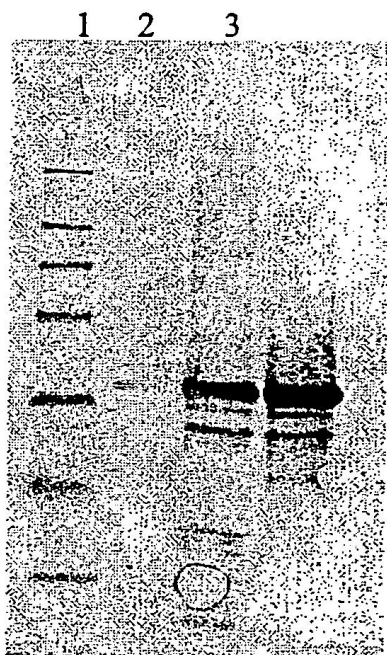
- 1: PM (175/83/62,5/47,5/32,5/25/16,5/6,5 kDa)
- 2: Volumen purificado (condiciones reductoras)
- 3: Volumen purificado (condiciones no reductoras)

FIGURA 9: ANÁLISIS SDS-PAGE- CONDICIONES REDUCTORAS CONDITIONS

(4-20% geles de poliacrilamida profundida- Novex) Véase el Ejemplo 8



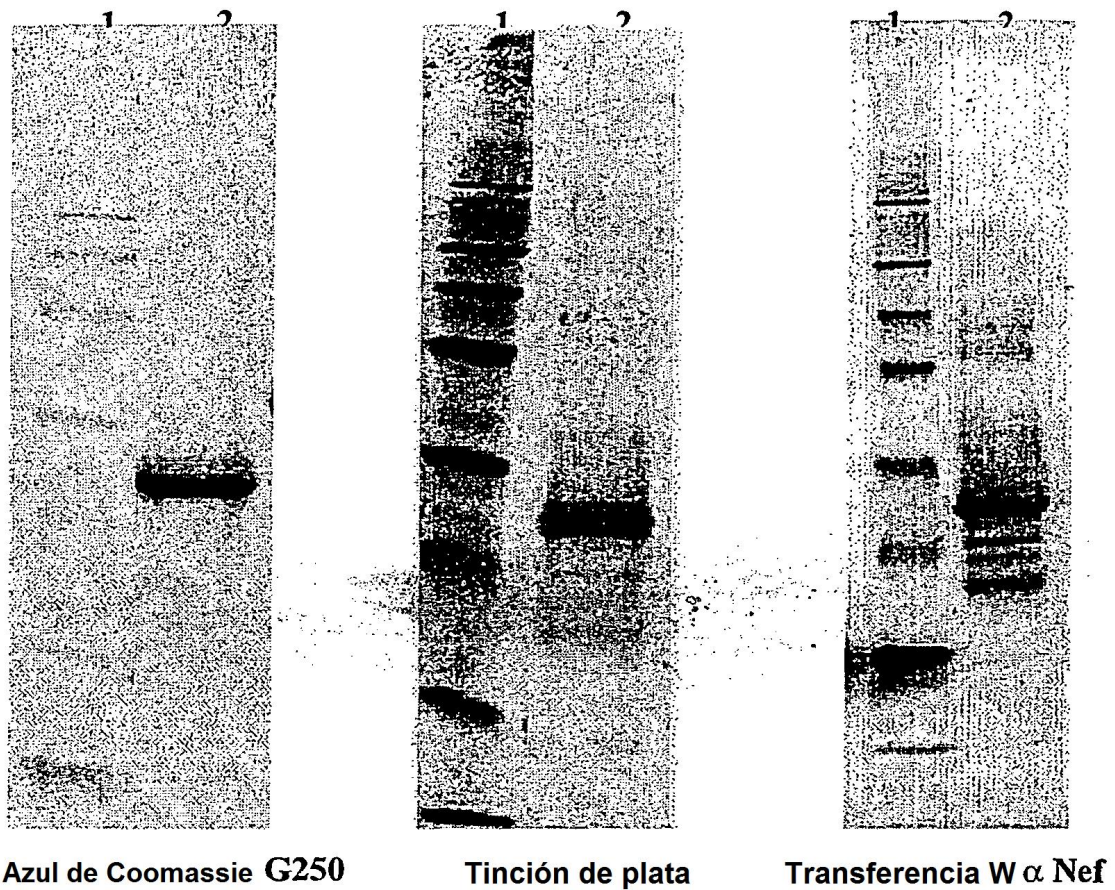
Azul de Coomassie R250



Tinción de plata

Figura 10: ANÁLISIS SDS-PAGE- Condiciones reductoras

(4-20% geles de poliacrilamida profundida- Novex) Véase Ejemplo 9



1: PM (175/83/62,5/47,5/32,5/25/16,5/6,5 kDa)

2: Volumen purificado

Figura 12**Secuencias de la proteína NEF-His del SIV expresada en Pichia****SECUENCIA DE ADN:**

```

atgggtggagctat t t c c a t g a g g c g g t c c a g g c c g t c t g g a g a t c t g c g      50
acagagactct t g c g g g c g c g t g g g g a g a c t t a t g g g a g a c t c t t a g g a g      100
aggtggaagatggatactcgcaatcccaggaggattagacaagggcttg      150
agctcactctcttg t g a g g g a c a g a a a t a c a a t c a g g g a c a g t a t a t g a a      200
tactccatggagaaaccagctgaagagagagaaaaattagcatacagaa      250
a ca a a a t a t g g a t g a t a t a g a t g a g g a a g a t g a t g a c t t g g t a g g g g t a      300
tcagtgaggccaaaagttcccctaagaacaatgagttacaaattggcaat      350
agacatgtctcattttataaaaagaaaaggggggactggaagggtattatt      400
acagtgcaagaagacatagaatcttagacataacttagaaaaggaagaa      450
ggcatcataccagattggcaggattacacctcaggaccaggaattagata      500
cccaaagacatttg g c t g g c t a t g g a a a t t a g t c c c t g t a a a t g t a t c a g      550
atgaggcacaggaggatgaggagcattatttaatgcatccagctcaaact      600
tcccagtgggatgacccttggggagaggttctagcatggaagtttgatcc      650
aactctggcctacacttatgaggcatatgtagataaccagaagagtttg      700
gaagcaagt c a g g c c t g t c a g a g g a a g a g g t t a g a a g a a g g c t a a c c g c a      750
agaggccttcttaacatggctgacaagaaggaaactcgcaactagtggcca      800
ccatcaccatcaccattaa .                               819

```

SECUENCIA DE LA PROTEÍNA:

```

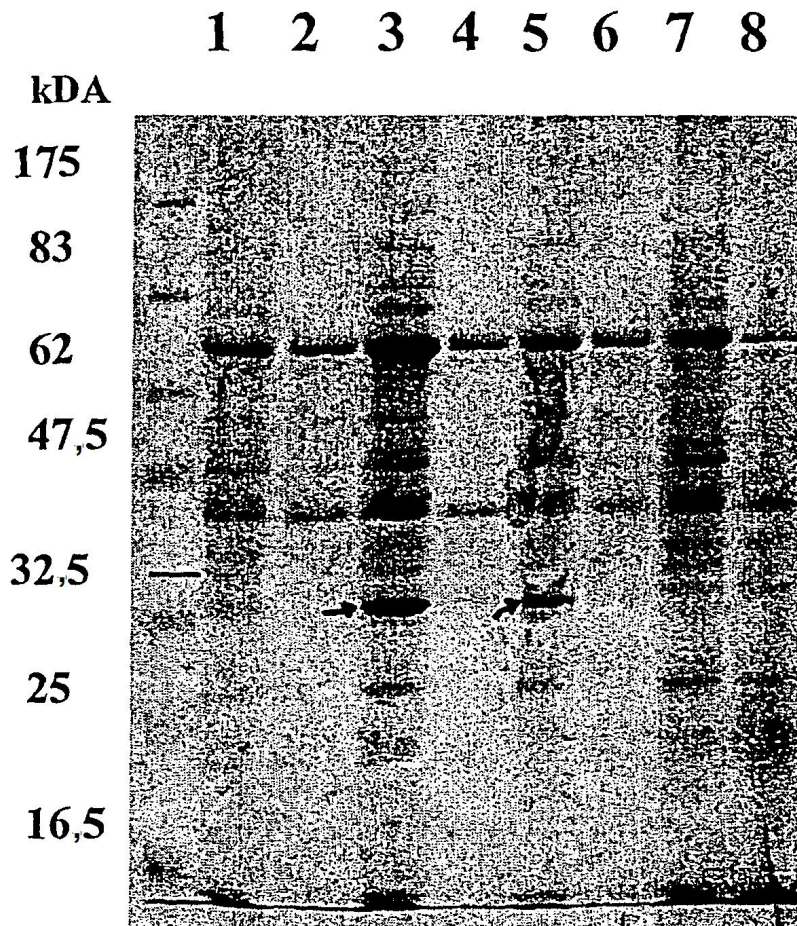
MGAISMRRSRPSGDLRQRLLRARGETYGRLLGEVEDGYSQSPGGLDKGL      50
SSLSCEGQKYNQGOYMNTPWRNPAEEREKLAYRKQNMDIDEEDDLVGV      100
SVRPKVPLRTMSYKLAIDMSHFIKEKGGLEGIYYSARRHRILDIYLEKEE      150
GIIPDWQDYTSGPGRYPKTFGWLWKLVPVNVSDEAQEDEEHYLMHPAQT      200
SQWDDPWGEVLAWKFDPTLAYTYEAYVRYPEEFGSKSGLSEEEVRRRLTA      250
RGLLNMAKKETRTSGHHHHHHH .                               272

```

Figura 13

SDS-PAGE con tinción con azul de Coomassie de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* que expresan SIV/NEF

inante



Calle 1: P-	Cepa Y1752
Calle 2: S-	“ “
Calle 3: P-	Cepa Y1772
Calle 4: S-	“ “ “
Calle 7: P-	Cepa GS115 (control negativo)
Calle 8: S-	“ “

Figura 14. Estudio 1 en monos. Análisis de células positivas para CD4 entre PBMC antes y después de la exposición a SHIV

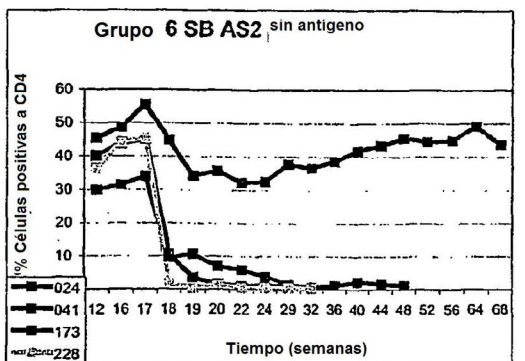
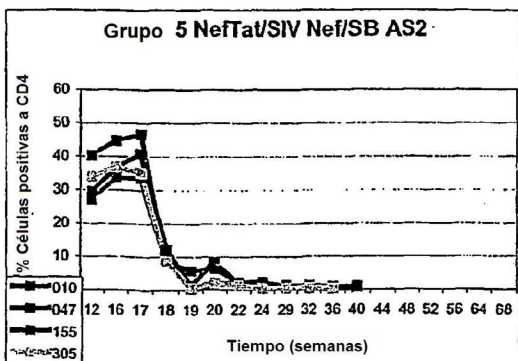
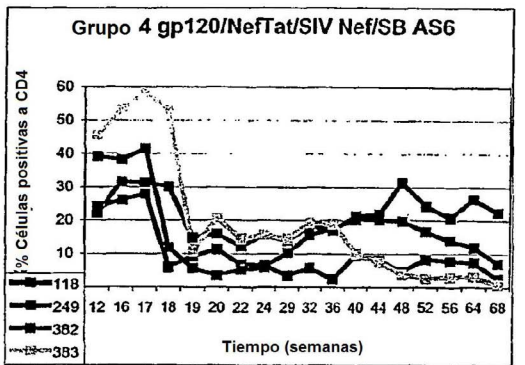
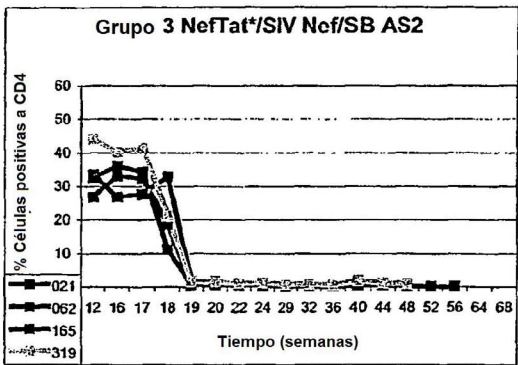
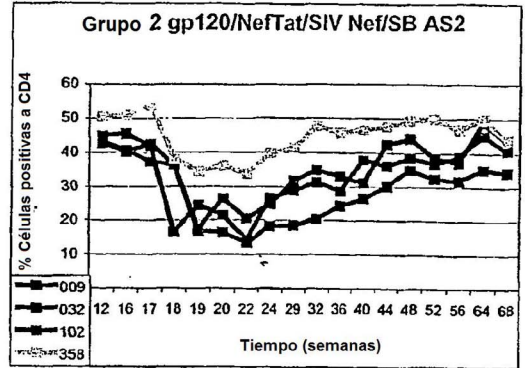
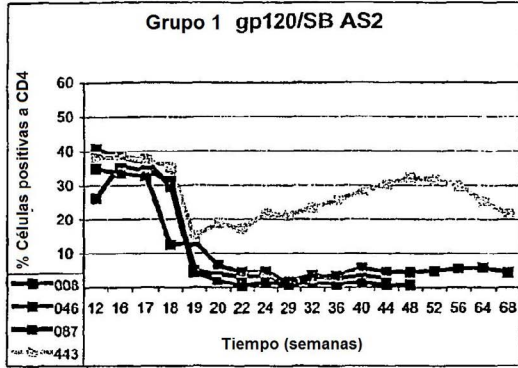


Figura 15. Estudio 1 en monos. Análisis de la carga viral en plasma de SHIV tras la infección con SHIV
 exposición a SHIV

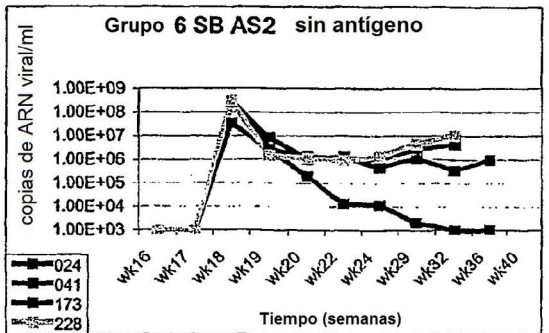
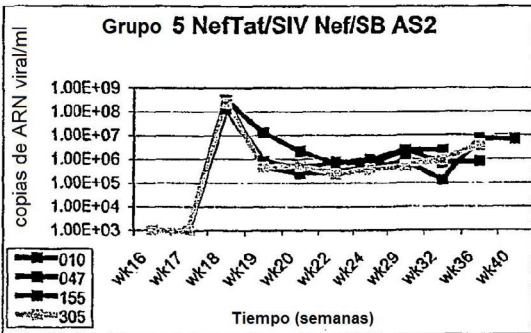
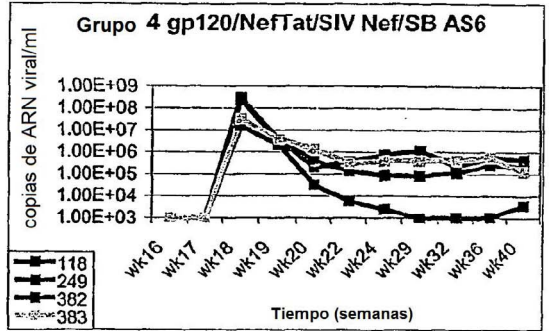
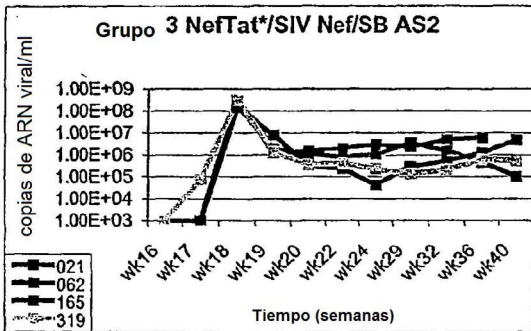
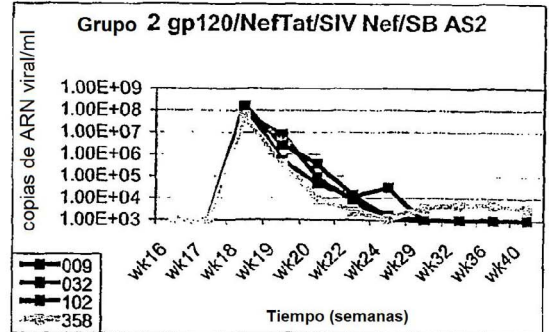
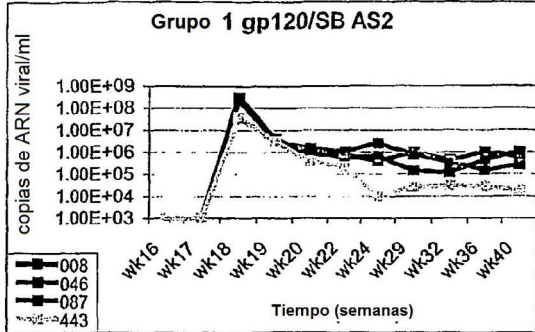


Figura 16. Estudio 2 en monos. Análisis de células positivas para CD4 entre PBMC antes y después de la exposición a SHIV.

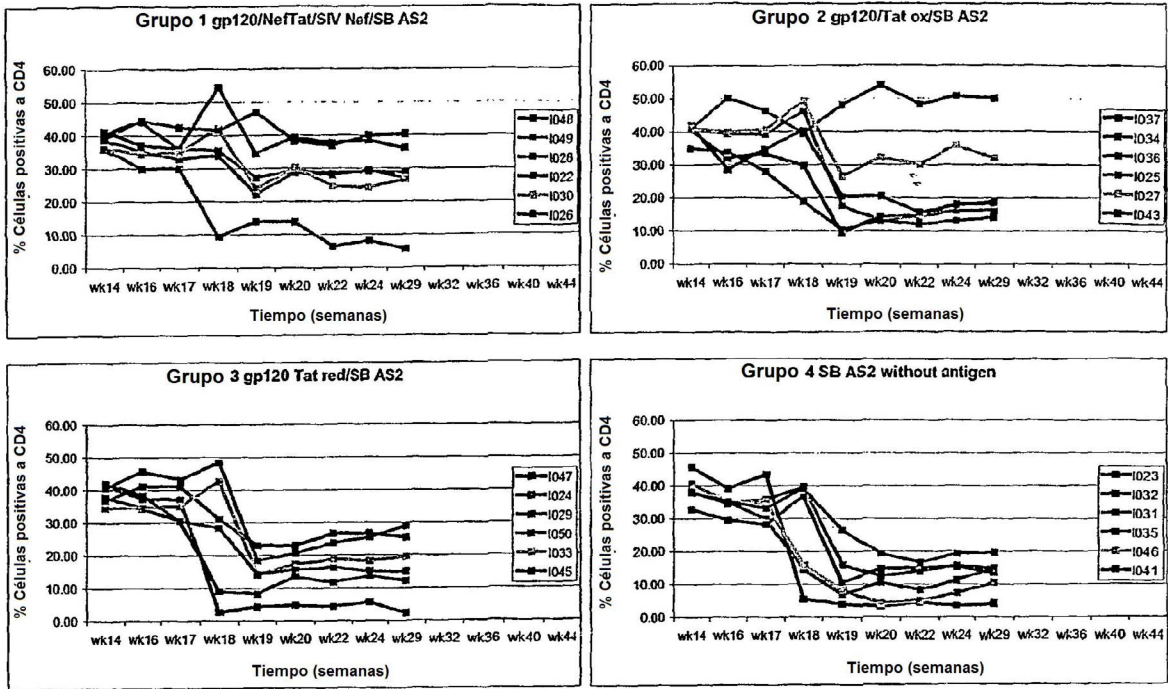
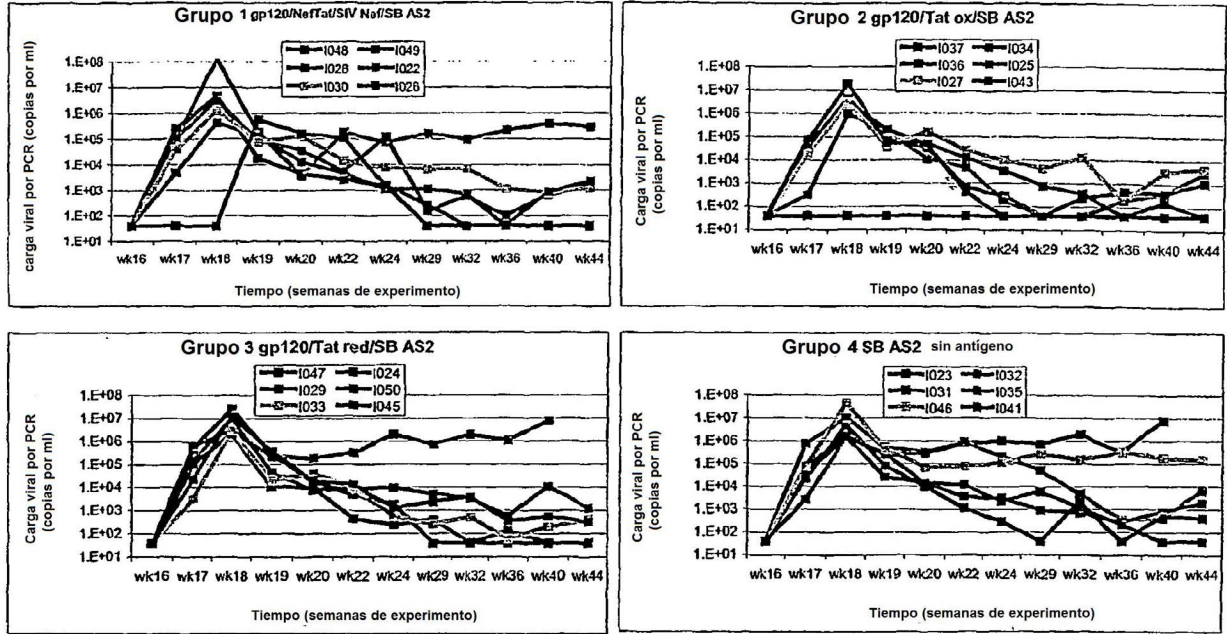


Figura 17. Estudio 2 en monos. Análisis de la carga viral en plasma de SHIV tras la exposición a SHIV



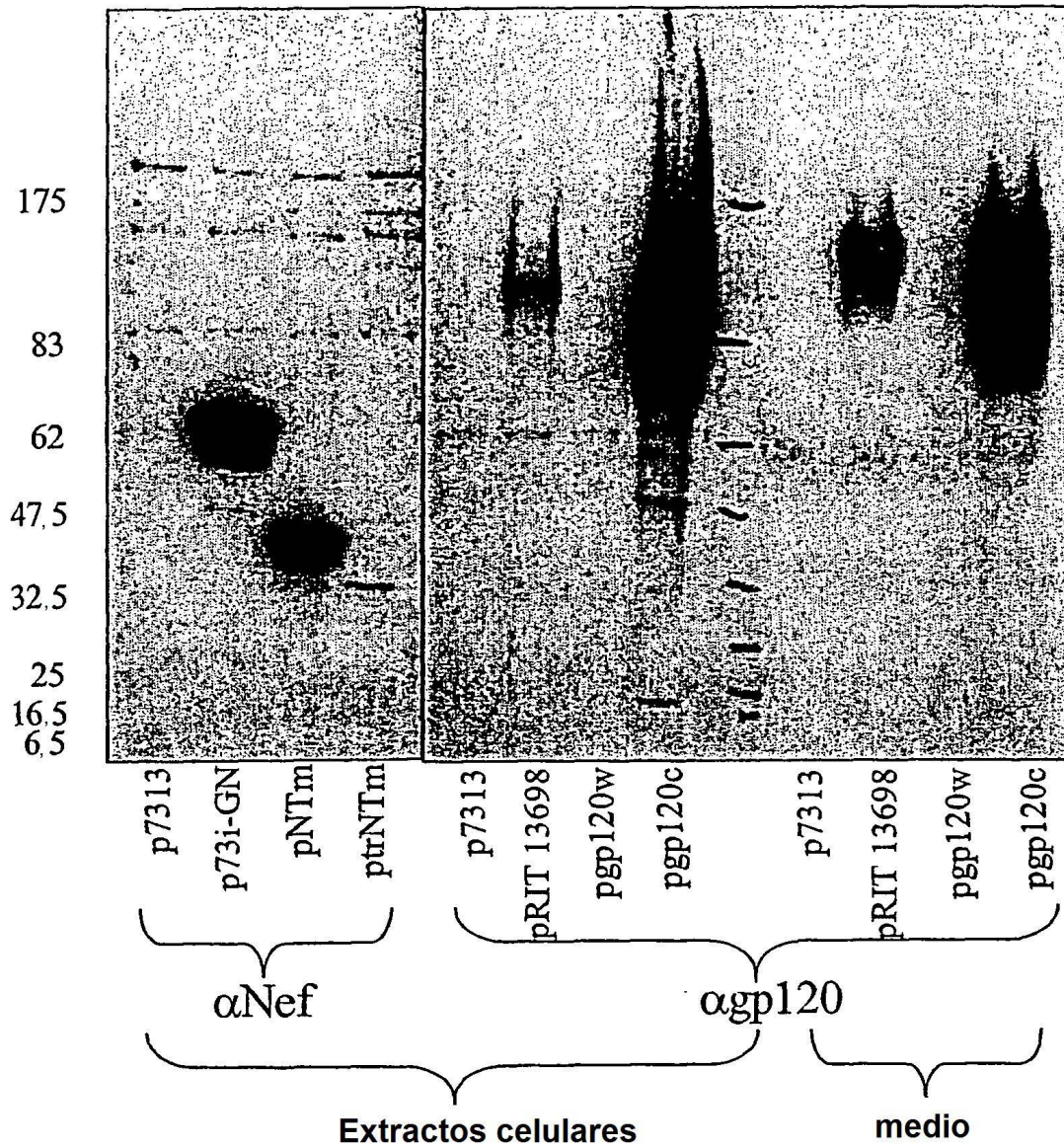


Fig.18. Transferencia Western que muestra el nivel de Nef detectado en extractos de células 293T y de gp120 en extractos celulares y medio del sobrenadante 24 h tras la transfección.

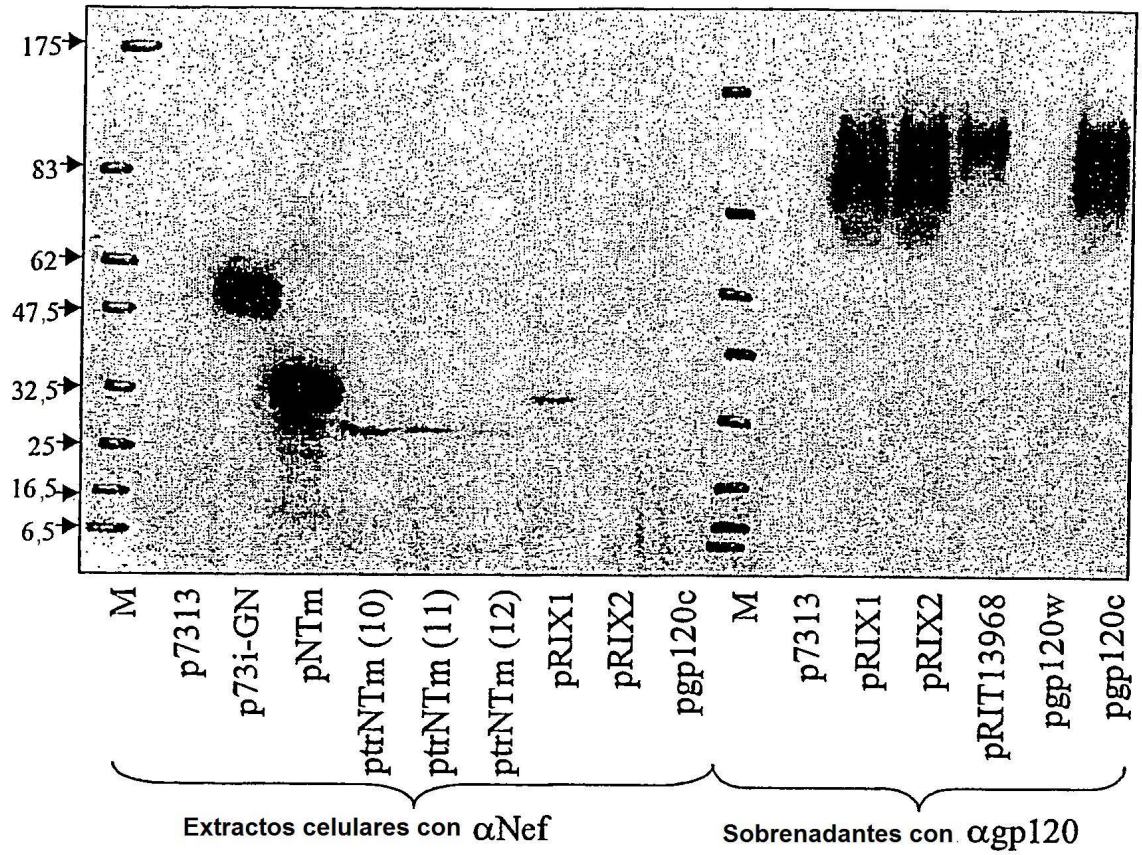


Fig.19. Transferencia Western que muestra el nivel de Nef detectado en extractos de células 293T y de gp120 en sobrenadantes 24 h tras la transfección.

Fig. 21. Oligos para optimización de codones y secuenciación de gp120:

```

g120-u:1      GAATTCGCGGCCGAATGAAGGTCAAGGAGACCAGAAAGAATACCAGCATCTGTG
g120-u:2      CCTGGGAATGCTGATGATCTGCTCCGCCCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGG
g120-u:3      GGCCACGACCACCTCTTCTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCTACGACACGGAAGTGCATAA
g120-u:4      TTGCGTGCCTACGGACCCCAACCCCCAGGAGGTGTGCTGGGAAACGTGACCGGACTT
g120-u:5      CATGGTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTG
g120-u:6      CTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACGCAA
g120-u:7      TCGGAAGGGCGAGATCAAGAATGCTCCTTCAATATCACGACCTCGATCAGAGACAAGGT
g120-u:8      GTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAAGAACAAGAC
g120-u:9      CATTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGCAGGCCTGCCCAAGGTGCTTTCGAACCAAT
g120-u:10     CCCTGCCGGATTTCGGCATCCTCAAGTGAACAACAAGACCTTCGACGGGAAGGGCCTGTG
g120-u:11     GCAGTGCACCCATGGCATCCGCCCCCGTCTGAGCAGCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCT
g120-u:12     GATCCGGTTCGGACAACCTTCATGGACAACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTC
g120-u:13     CCGGCCTAACAAACACCCGTAAGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCCTTCTATGC
g120-u:14     CGACATCCGGCAGGCCCATTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGGAAATAACACCTGAAAGCA
g120-u:15     AGAGCACTTTGGAAAACAAGACCATCAAGTTCATCAGAGTCTGGCGGAGACCCCGAGAT
g120-u:16     CTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGAACGG
g120-u:17     AGAGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTCCCGCATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCFA
g120-u:18     GTATGCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAACATCACCGGCCTGTGCT
g120-u:19     CGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCTTCAGGCCGGCGGGCGGACATGAG
g120-u:20     GCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTGGAGCCGCTCGGCGTGGCCCCACCCGGGCCAA
g120-l:1      GAATTCGGATCCTCATCTCTGCACGACCGGGCCTTGGCCCCGGTGGGGGCCACG
g120-l:2      ACCACCTTGTACTTGTACAGCTCGCTCCGCCAGTTATCCCTCATGTGCGCCGCCCGGGC
g120-l:3      TTCTCCGTGCCGTTGCCCTCGGTGCCCCCGTCTCTGGTGAGCAGCAGGCCGGTGTGTTG
g120-l:4      CCCCCGATGGGGGGGGCATAACATGGCCCTTCCACCTCCTGCCACATGTTGATGATCTGC
g120-l:5      GTGATAGTGGAGTTTCCCTCTGTGTGTGTGTGCTTCCCTCGGTGCGCTTCCAGGTGGAGTTGAAG
g120-l:6      TAGAAGAACTCGCCCCCGCAGTTGAAGGAGTGCCGCACGATCTCGGGGTCTCCGCCAGAA
g120-l:7      GTCTTGTTCCAAAGTGCTCTCTCAGCTTGATCAGGATCTGCTTCAGGGTGTATTCAC
g120-l:8      CAATGGGCCGCGGATGTGCGCGATGATCTTGGGGCGGCATAGAAGGCCCGTCCAGGC
g120-l:9      CGGGTGTTGTTGTTAGGCCGGGTACAGTTAATCGCCACAGACTCGTTCAGCTGGACGATG
g120-l:10     ATGAAGTTGCCGACCGGATCACACCTCCTCCTCAGCCAGGGACCCGTTCCAGCAGCAGC
g120-l:11     CGGATGCCATGGGTGCACGACCCGCTGACGTTGGTGCACAGGCCCTTCCCGTCAAG
g120-l:12     AGGATCGCGAATCCGGCAGGGGCACAGTAATGGATCGGGATFGGTTCAAGGACACCTTG
g120-l:13     ACGCTGCTGTTGCAGTGAATGAGTCTGAAATTACGCGTCTGCTTGTCTTGGTGGTGGCA
g120-l:14     ACCACATCGAGATTATAAAACAGCGCGTATTCCTCTGCACTTGTCTGATCGAGGTC
g120-l:15     TTCTTGATCTGCCCCCTCCGAATCTCTCCGGTCCAGCCGTTGCTGGTGGTGGTGGTGGT
g120-l:16     TCACAGTCCAGTGTACGACAGAGGGCGTCAGCTTCACGCAGGGCTTCAGGGACTGGTCC
g120-l:17     TCGTGCATCTGATCCACCATGTTATTCTTCCACATGTTGAAGTACTCGGTACGTTTCCC
g120-l:18     TTGGGGTCCGTAGGCACGCAAGCATGCGTCCGCCACACGTTATGCACTTCCGTGTCCGTAG
g120-l:19     CAGAAGAGGGTGGTCTGTGGCTCCTTCCACACAGGCACGCGGTAGTACGGTGCACCCAC
g120-l:20     CAGATCATCAGATTCCAGGAGCATGGTCCCCAGGCCACAGATGCTGGTAGTTCTTT

```

Cebadores para secuenciación de gp120 optimizada

```

g120c-SF1     cggcgtgcctgtgtggaaggaggc
g120c-SF2     gacaagggtgcagaaggaatacgcg
g120c-SF3     cgtccagctgaacgagtctgtggc
g120c-SF4     catgtggcaggagggtgggaaaggcc
g120c-SR1     gtgagcagcaggccggtgatgttgg
g120c-SR2     cggcatagaaggcccgctccaggcc
g120c-SR3     catgaccgctgctgttgcagtgaatg
g120c-SR4     aggcacgcaagcatgcgtcgccccac

```

Cebadores para secuenciación de gp120 silvestre

```

g120w-SF1     ccactctattctgtgcatcagatgc
g120w-SF2     ccttgatgtagtaccaatagatgatg
g120w-SF3     ggtatacatataggaccaggagagac
g120w-SF4     agatgttcatcaaatattacagggc
g120w-SR1     catatctcctcctccaggctctgaag
g120w-SR2     gttattccattgtgctctactaag
g120w-SR3     ggacaggcctgtgtcatgactgag
g120w-SR4     ctacttcttgtgggttgggtctg

```

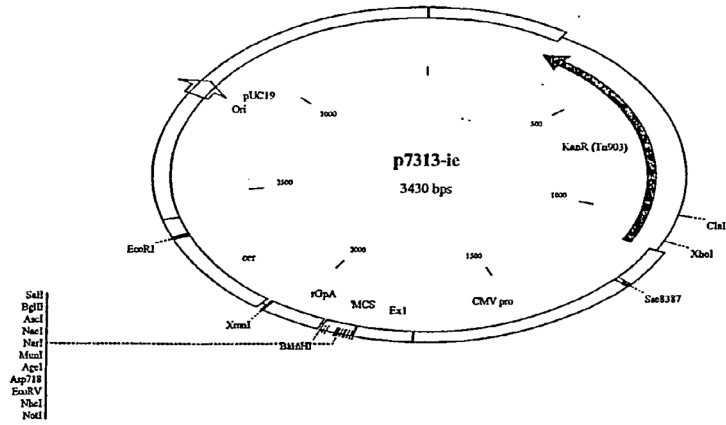



Figura 22. Mapa de p7313



Figura 23. Plásmido de expresión típico para antígenos

Representación esquemática del casete de expresión estándar usado para la expresión de antígenos. El gen de interés se insertó en un plásmido en 3' de un promotor IE1 de HCMV potenciado (iCMV + Exón 1) (nucleótidos -489 a +118 respecto al inicio de la transcripción) y en 5' de una señal de poliadenilación (pA) de la beta globina de conejos. La estructura del plásmido contenía adicionalmente un origen de replicación de pUC19 y un marcador de selección de kanamicina.

Figura 24. Respuestas de ratones F1 (Balb/c x C3H) inmunizados frente al péptido gp120 mediante IFN-gamma ELIsot a los 5 días del refuerzo

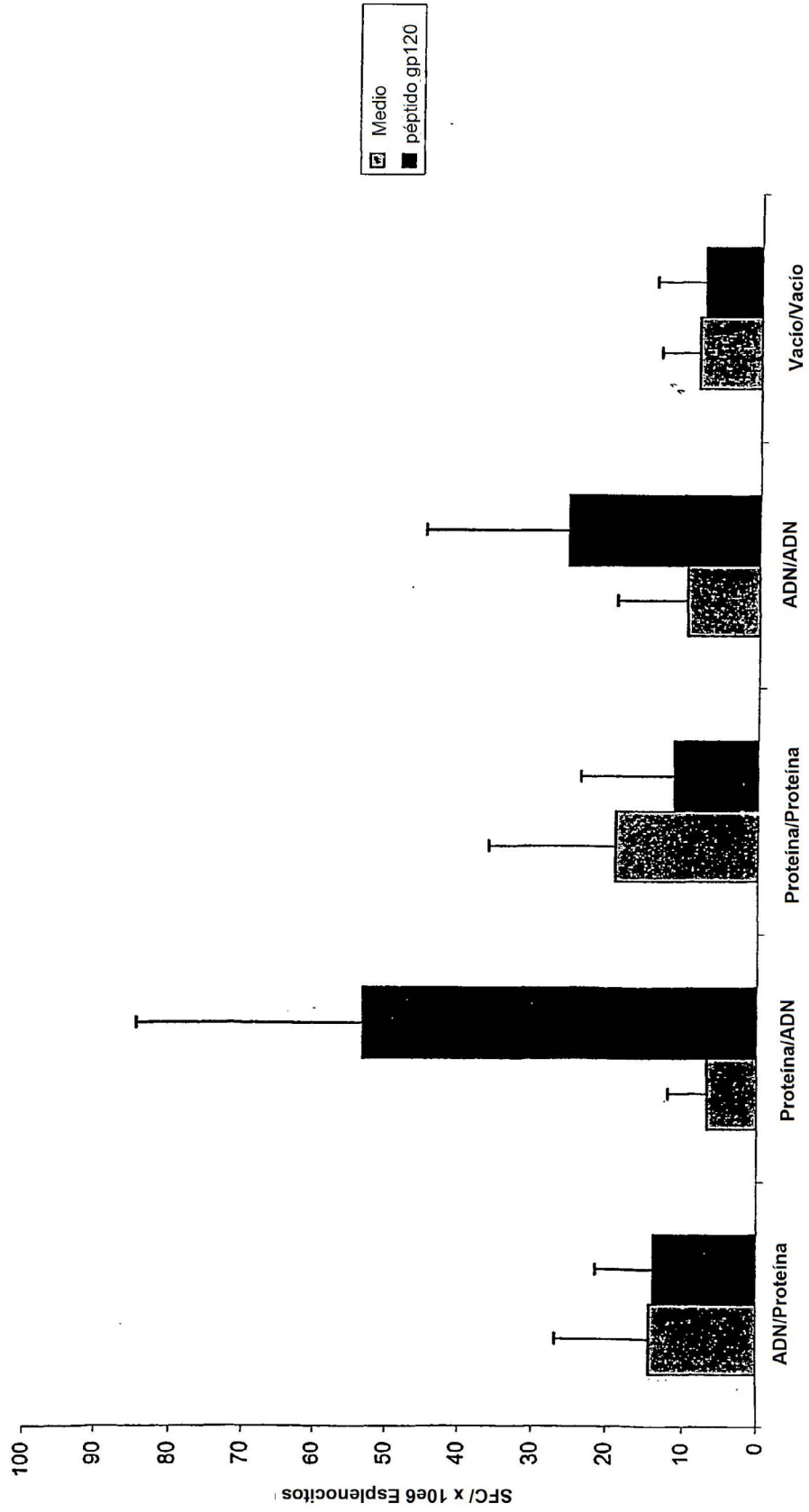


Figura 25: Respuestas a la biblioteca del péptido Nef de 20 mer por IFN-gamma ELISPOT a los 5 días del refuerzo

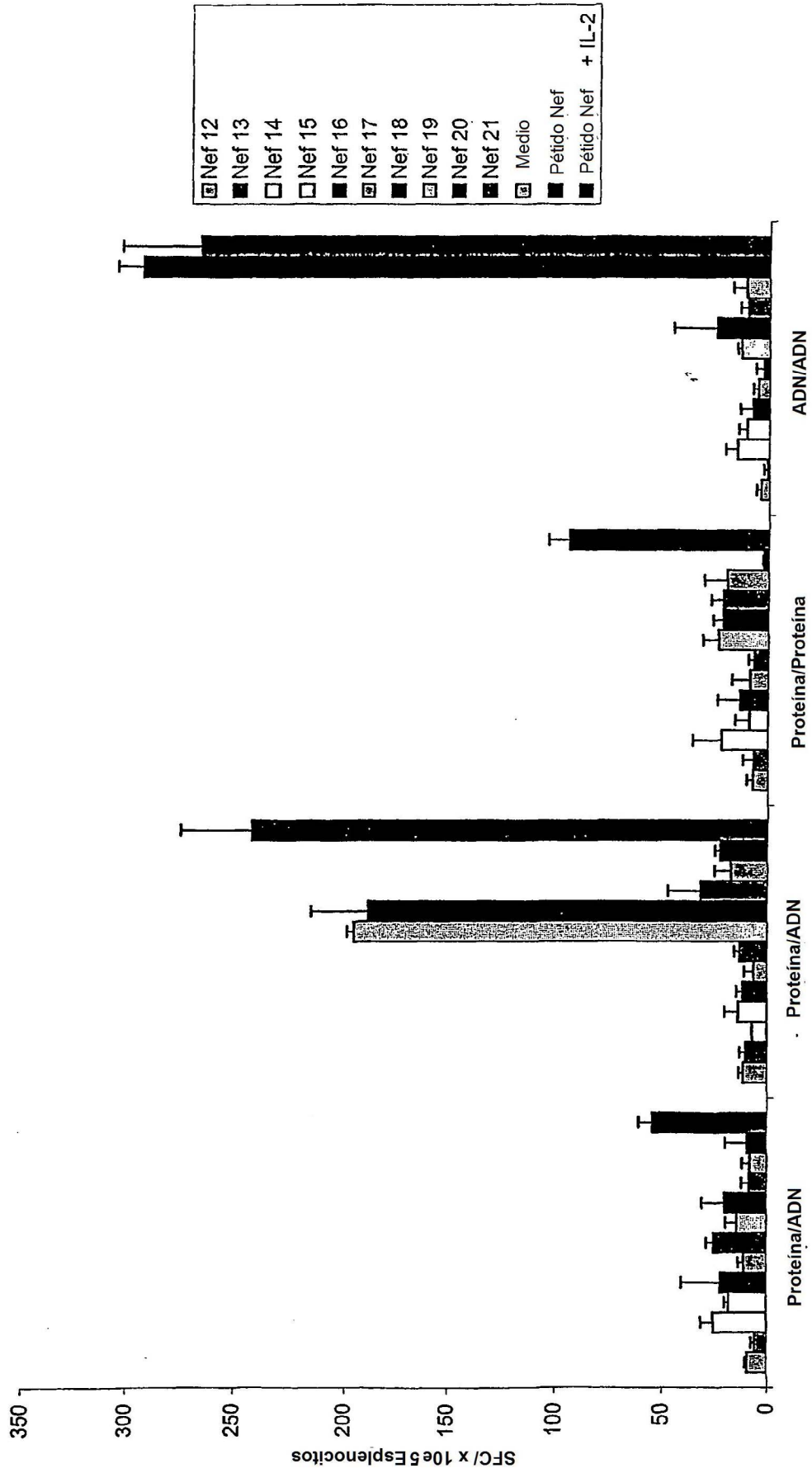


Figura 26: Respuestas de ratones BA1b/c inmunizados a conjuntos del péptido gp120 mediante IFN-gamma ELIsot a los 7 días del refuerzo

