



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 044**

51 Int. Cl.:

C12N 15/49 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05769948 .0**

96 Fecha de presentación : **03.08.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1773999**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54

Título: **Vacunas para la prevención y tratamiento de infección por VIH.**

30

Prioridad: **05.08.2004 GB 0417494**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.03.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.03.2010

73

Titular/es: **Glaxosmithkline Biologicals S.A.**
rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE

72

Inventor/es: **Abrecht, Helge;**
Delchambre, Martine;
Marchand, Martine;
Mathy, Nathalie Louise;
Permanne, Philippe Jean Gervais Ghislain y
Voss, Gerald Hermann

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 334 044 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

Vacunas para la prevención y tratamiento de infección por VIH.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a construcciones de polipéptidos de VIH nuevas, a su uso en medicina, a composiciones farmacéuticas que las comprenden y a procedimientos para su fabricación. La invención también se refiere a polinucleótidos que codifican los polipéptidos. En particular, la invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden Nef de VIH-1 y Gag de VIH-1 o fragmentos de los mismos, y a polinucleótidos que los codifican. De forma más particular, la invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden proteínas Nef de VIH-1, Pol de VIH-1 y Gag de VIH-1 o fragmentos de los mismos y a polinucleótidos que los codifican.

El VIH-1 es la causa primaria del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) que está catalogado como uno de los principales problemas de salud en el mundo. Hay una necesidad de una vacuna para la prevención y/o tratamiento de la infección por VIH.

Antecedente de la invención

El VIH-1 es un virus de ARN de la familia de los retrovirales. El genoma del VIH codifica al menos nueve proteínas que se dividen en tres clases: las proteínas estructurales principales Gag, Pol y Env, las proteínas regulatorias Tat y Rev, y las proteínas accesorias Vpu, Vpr, Vif y Nef. El genoma del VIH muestra la organización 5'LTR-gag-pol-env-LTR3' de todos los retrovirus.

La glicoproteína gp120 de envoltura del VIH es la proteína viral que se usa para la adhesión a la célula huésped. Esta adhesión está mediada por la unión de dos moléculas de superficie de las células T de ayuda y macrófagos, conocidos como CD4 y uno de los dos receptores de la quemoquina CCR-5 o CXCR-4. La proteína gp120 se expresa en primer lugar como una molécula precursora mayor (gp160), que luego se escinde post-translacionalmente para dar gp120 y gp41. La proteína gp120 está retenida sobre la superficie del virión mediante conexión a la molécula gp41, que está insertada en la membrana viral.

La proteína gp120 es la diana principal de los anticuerpos de neutralización, pero desafortunadamente la mayoría de las regiones inmunogénicas de las proteínas (bucle V3) son también las partes más variables de la proteína. Por tanto, se cree que el uso de gp120 (o su precursor gp160) como un antígeno para vacuna para educir anticuerpos de neutralización va a ser de uso limitado para una vacuna ampliamente protectora. La proteína gp120 también contiene epítomos que son reconocidos por linfocitos T citotóxicos (CTL). Estas células efectoras son capaces de eliminar las células infectadas con virus, y por tanto constituyen un segundo mecanismo inmunológico antiviral principal. Al contrario que las regiones diana de anticuerpos de neutralización algunos epítomos de CTL parecen ser conservados relativamente entre diferentes cepas de VIH. Por esta razón gp120 y gp160 pueden ser componentes antigénicos útiles en vacunas que ayudan a educir respuestas inmunes mediadas por células (particularmente CTL).

Proteínas de no envoltura de VIH-1 incluyen, por ejemplo, proteínas estructurales internas tales como los productos de genes gag y pol y otras proteínas no estructurales tales como Rev, Nef, Vif y Tat (Green y col., New England J. Med, 324, 5, 308 y siguientes (1991) y Bryant y col. (Ed. Pizzo), *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 11, 5, 390 y siguientes (1992).

La Nef del VIH es una proteína temprana, esto es, es expresada pronto en infección y en ausencia de proteína estructural.

El gen de Nef codifica pronto una proteína del VIH accesoria que ha demostrado poseer varias actividades. Por ejemplo, se sabe que la proteína Nef provoca la baja regulación de CD4, receptor del VIH, y moléculas de clase I MHC de la superficie celular, aunque está en debate la importancia biológica de estas funciones. De forma adicional, Nef interactúa con la ruta de señal de las células T e induce un estado activo, que en cambio puede promover expresión génica más eficiente. Algunos aislados del VIH presentan mutaciones en esta región, lo que hace que no codifiquen proteína funcional y se vean seriamente comprometidos en su replicación y patogénesis *in vivo*.

El gen de Gag se translada como una poliproteína precursora que se escinde mediante proteasa para dar productos que incluyen la proteína matriz (p17), la cápsida (p24), la nucleocápsida (p9), p6 y dos péptidos espaciales, p2 y p1.

El gen Gag da lugar a la proteína precursora Gag de 55 kilodalton (kD), también denominada p55, que se expresa a partir del ARNm viral no empalmado. Durante la translación el término N de p55 es miristoilado, activando su asociación con el aspecto citoplasmático de las membranas celulares. La poliproteína Gag asociada a la membrana recluta dos copias del ARN genómico viral con otras proteínas virales y celulares que activa la germinación de la partícula viral desde la superficie de una célula infectada. Tras la germinación se escinde la p55 mediante la proteasa codificada viralmente (un producto del gen de pol) durante el proceso de maduración viral en cuatro proteínas más pequeñas designadas MA (matriz [p17]), CA (cápsida [p24]), NC (nucleocápsida [p9]), y p6.

Además de las 3 proteínas Gag principales, todos los precursores de Gag contienen otras regiones distintas, que se escinden y permanecen en el virión como péptidos de varios tamaños. Estas proteínas tienen diferentes papeles,

por ejemplo, la proteína p2 tiene un papel propuesto en la regulación de la actividad de la proteasa y contribuye a la cronología correcta del procesamiento proteolítico.

El polipéptido p17 (MA) se deriva del extremo miristoilado, de terminal N de la p55. La mayoría de las moléculas de MA permanecen adheridas a la superficie interna de la bicapa lípida del virión, estabilizando la partícula. Se recluta un subconjunto de MA dentro de las capas más profundas del virión, donde comienza a formar parte del complejo que acompaña al ADN viral al núcleo. Estas moléculas de MA facilitan el transporte nuclear del genoma viral debido a que es reconocida una señal cariofílica en MA por parte de la maquinaria de importación nuclear celular. Este fenómeno permite al VIH infectar las células que no se dividen, una propiedad inusual para un retrovirus.

La proteína p24 (CA) forma el núcleo cónico de las partículas virales. Se ha demostrado que la ciclofilina A interactúa con la región p24 de la p55 llevando a su incorporación a las partículas de VIH. La interacción entre Gag y ciclofilina A es esencial debido a que la disrupción de esta interacción por parte de la ciclosporina A inhibe la replicación viral.

La región NC de Gag es responsable del reconocimiento específico de la denominada señal de empaquetamiento del VIH. La señal de empaquetamiento consiste en cuatro estructuras tallo-bucle localizadas cerca del extremo 5' del ARN viral, y es suficiente para mediar la incorporación de un ARN heterólogo en los viriones de VIH-1. La NC se une a la señal de empaquetamiento a través de interacciones mediadas por dos motivos dedo de cinc. La NC también facilita la transcripción inversa.

La región polipeptídica p6 media las interacciones entre p55 Gag y la proteína accesoria Vpr, llevando a la incorporación de Vpr en viriones de ensamblado. La región p6 también contiene un denominado dominio tardío que se requiere para la liberación eficiente de viriones de germinación desde una célula infectada.

El gen de Pol codifica dos proteínas que contienen las dos actividades necesitadas por el virus en la infección precoz, la RT y la proteína integrasa necesarias para la integración del ADN viral en el ADN de la célula. El producto primario de Pol se escinde mediante la proteasa del virión para dar el péptido RT de terminal amino que contiene necesariamente actividades para la síntesis de ADN (actividad de ADN polimerasa dependiente de ARN y ADN así como también una función de ARNasa H) y proteína integrasa de terminal carboxi. La RT del VIH es un heterodímero de RT (p66) de longitud completa y un producto de escisión (p51) al que le falta el dominio de ARNasa H de terminal carboxi.

RT es una de las proteínas más altamente conservadas codificada por el genoma retroviral. Dos actividades principales de RT son la ADN Pol y la ribonucleasa H. La actividad de ADN Pol de RT usa ARN y ADN como plantillas de forma intercambiable y como todas las ADN polimerasas conocidas es incapaz de iniciar la síntesis de ADN de nuevo, pero requiere una molécula pre-existente para servir como un cebador (ARN).

La actividad de la ARNasa H inherente en todas las proteínas RT juega el papel esencial, ya en la replicación, de eliminación del genoma de ARN cuando tiene lugar la síntesis de ADN. Degrada de forma selectiva el ARN de todas las moléculas híbridas ARN-ADN. Estructuralmente la polimerasa y la ribo H ocupan dominios no solapados, separados con la Pol cubriendo las dos terceras partes de los amino de la Pol.

La subunidad catalítica p66 está plegada en 5 subdominios distintos. El terminal amino 23 de estos tiene la parte con actividad de RT. El terminal carboxi de estos es el dominio ARNasa H.

El documento WO 03/025003 describe construcciones de ADN que codifican p17/24 Gag, Nef y RT del VIH-1, en los que las secuencias de ADN pueden estar optimizadas con codón para parecerse a genes humanos altamente expresados. Estas construcciones son útiles en vacunas de ADN.

Se han sugerido proteínas de fusión que contienen múltiples antígenos de VIH como candidatos a vacunas para VIH, por ejemplo, la fusión Nef-Tat como se describe en el documento WO 99/16884. Sin embargo, las proteínas de fusión no son de producción directa; puede haber dificultades en la expresión de las mismas debido a que no se corresponden con proteínas nativas. Puede haber dificultades a nivel de transcripción, o posteriormente. Estas tampoco son de formulación directa en una composición farmacéuticamente aceptable. De forma notable, la mayoría de los enfoques de vacunas para VIH que implican múltiples antígenos condensados conjuntamente, son enfoques de ADN o vector vivo más que proteínas de fusión de polipéptidos.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona construcciones nuevas para uso en vacunas para la profilaxis y tratamiento de infecciones por VIH y SIDA.

En un aspecto la invención proporciona un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones.

En las construcciones y composiciones de acuerdo con la invención como se describen en esta invención, la Nef es preferiblemente una Nef de longitud completa.

ES 2 334 044 T3

En las construcciones de acuerdo con la invención la p17 Gag y p24 Gag son preferiblemente p17 y p24 de longitud completa respectivamente.

5 En las construcciones de acuerdo con la invención la p17 Gag y p24 Gag son preferiblemente p17 y p24 de longitud completa respectivamente.

10 El polipéptido comprende tanto p17 como p24 Gag o fragmentos inmunogénicos de los mismos. En una construcción de este tipo el componente p24 Gag y el componente p17 Gag están separados por al menos un antígeno de VIH adicional o fragmento inmunogénico, tal como Nef y/o RT o fragmentos inmunogénicos o derivados de las mismas.

15 La construcción de polipéptido de acuerdo con la invención comprende además RT o un fragmento o derivado inmunogénico de la misma. Fragmentos particulares de RT que son adecuados para uso en la invención son fragmentos en los que la RT está truncada en el término C, preferiblemente de modo que les falta el dominio ARNasa H de terminal carboxi. Un fragmento de este tipo al que le falta el dominio ARNasa H de terminal carboxi es el fragmento p51 descrito en esta invención.

Preferiblemente la RT o fragmento inmunogénico en las proteínas de fusión descritas en esta invención es p66 RT o p51 RT.

20 El componente RT de la proteína de fusión o composición de acuerdo con la invención comprende de forma opcional una mutación en la posición 592, o mutación equivalente en cepas distintas a HXB2, de modo que la metionina se elimina mediante mutación en otro residuo, por ejemplo.

25 En las proteínas de fusión de acuerdo con la invención que comprenden p24 y RT, puede ser preferible que la p24 preceda a la RT en la construcción debido a que cuando los antígenos se expresan sólo en *E. coli* se observa mejor expresión de p24 que de RT.

Construcciones preferidas de acuerdo con la invención incluyen las siguientes:

- 30
1. p24 - RT - Nef - p17
 2. p24 - RT* - Nef - p17
 3. p24 - p51RT - Nef - p17
 - 35 4. p24 - p51RT* - Nef - p17

* representa mutación de metionina₅₉₂ en RT a lisina

40 El conector incluido en las construcciones enumeradas anteriormente puede ser cualquier secuencia de aminoácidos corta para disminuir las interacciones potenciales entre los dos partícipes de la fusión que los conecta. El conector puede ser, por ejemplo, de 4 a 10 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, puede ser una secuencia de 6 aminoácidos tal como la secuencia GSGGGP descrita en esta invención en los ejemplos.

45 En otro aspecto la presente invención proporciona una proteína de fusión de antígenos de VIH que comprende al menos cuatro antígenos de VIH o fragmentos inmunogénicos, en los que cuatro antígenos o fragmentos son o se derivan de Nef, Pol y Gag. En este aspecto Gag está presente como dos componentes separados que están separados por al menos otro antígeno en la fusión. Preferiblemente la Nef es Nef de longitud completa. Preferiblemente la Pol es p66 o p51RT. Preferiblemente la Gag es p17 y p24 Gag. Otros rasgos preferidos y propiedades de los componentes del antígeno de la fusión en este aspecto de la invención son como se describen en esta invención.

Realizaciones preferidas de este aspecto de la invención son las cuatro fusiones de componentes que ya se enumeraron anteriormente:

- 55
1. p24 - RT - Nef - p17
 2. p24 - RT* - Nef - p17
 3. p24 - p51RT - Nef - p17
 - 60 4. p24 - p51RT* - Nef - p17

65 El término “derivado de” o “derivado” respecto a los antígenos de VIH incluidos en la invención significa que los antígenos pueden haber sido alterados de modo limitado en comparación con sus contrapartes originales. Esto incluye mutaciones puntuales que pueden cambiar las propiedades de la proteína, por ejemplo, mediante la mejora de la expresión en sistemas procarióticos o eliminación de actividad no deseable incluyendo actividad del enzima no deseable. Las mutaciones puntuales descritas en esta invención para la RT se diseñan para alcanzar estos hechos. Sin embargo, los antígenos deben permanecer suficientemente similares a los antígenos nativos de modo que mantengan

las propiedades antigénicas deseables en una vacuna y así permanecer capaces de dar una respuesta inmune frente al antígeno nativo. De lugar o no un derivado determinado una respuesta inmune de este tipo se puede medir con un ensayo inmunológico adecuado tal como ELISA (para respuestas de anticuerpos) o citometría de flujo usando tinto adecuado para marcadores celulares y citoquinas (para respuestas celulares).

5

Las construcciones polipeptídicas de antígenos de VIH de acuerdo con la invención son capaces de ser expresadas en sistemas *in vitro* incluyendo sistemas procarióticos tales como *E. coli*. De forma ventajosa, estas se pueden purificar mediante procedimientos de purificación convencionales.

10

Las fusiones descritas en esta invención son preferiblemente solubles cuando se expresan en un sistema de expresión seleccionado, esto es, están presentes en una cantidad sustancial en el sobrenadante de un extracto bruto del sistema de expresión. La presencia de la proteína de fusión en el extracto bruto se puede medir mediante medios convencionales tales como elución en un gel SDS, tinto con Coomassie y comprobación de la banda apropiada mediante medida densitométrica. Las proteínas de fusión de acuerdo con la invención son preferiblemente solubles al menos en el 50%, más preferiblemente solubles al menos en el 70%, lo más preferiblemente solubles en el 90% o más medido mediante las técnicas descritas en esta invención en los ejemplos. Se conocen técnicas para mejorar la solubilidad de las proteínas expresadas recombinantemente, por ejemplo, en sistemas de expresión procarióticos se mejora la solubilidad mediante disminución de la temperatura a la que se induce la expresión génica.

15

20

Las proteínas de fusión descritas en esta invención se pueden purificar. En particular se pueden purificar mientras permanecen solubles o significativamente solubles.

25

Fragmentos inmunogénicos como se describen en esta invención contendrán al menos un epítipo del antígeno y mostrará antigenicidad por VIH y son capaces de dar una respuesta inmune cuando estaban presentes en una construcción adecuada, tal como por ejemplo cuando estaban condensados con otros antígenos de VIH o se presentaba en un vehículo, siendo dirigida la respuesta inmune contra el antígeno nativo. De forma típica los fragmentos inmunogénicos contienen al menos 20, preferiblemente 50, más preferiblemente 100 aminoácidos contiguos al antígeno de VIH.

30

La invención proporciona en un aspecto más polinucleótidos que codifican los polipéptidos de acuerdo con la invención.

35

Se pueden usar polinucleótidos de acuerdo con la invención como vacunas de polinucleótidos. Los polinucleótidos pueden estar presentes dentro de cualquiera de una variedad de sistemas de liberación conocidos por los especialistas en la técnica, incluyendo sistemas de expresión de ácido nucleico tales como ADN plásmido, sistemas de expresión bacterianos y virales. Son bien conocidas en la técnica numerosas técnicas de liberación de genes, tales como las descritas por Rolland, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143-198, 1998 y referencias citadas en ese documento. Sistemas de expresión de ácido nucleico apropiados contienen las secuencias de ADN necesarias para la expresión en el paciente (tal como un promotor adecuado y señal de terminación). Cuando el sistema de expresión es un microorganismo vivo recombinante, tal como un virus o bacteria, el gen de interés se puede insertar dentro del genoma del virus recombinante vivo o bacteria. La inoculación y la infección *in vivo* con este vector vivo llevará a la expresión *in vivo* del antígeno e inducción de respuestas inmunes. Virus y bacterias usadas para este fin son, por ejemplo: poxvirus (por ejemplo, vaccinia, fowlpox, canaripox, poxvirus modificados, por ejemplo, virus Ankara modificado (MVA)), alfavirus (virus Sindbis, virus Semliki Forest, virus de la encefalitis equina venezolana), flavivirus (virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis japonesa), adenovirus, virus adeno-asociados, picornavirus (poliovirus, rinovirus), virus de herpes (virus varicella zoster, etc), morbilivirus (e.g. rubeola), Listeria, Salmonella, Shigella, Neisseria, BCG. Estos virus y bacterias pueden ser virulentos, o ser atenuados de varias formas con el fin de obtener vacunas vivas. Tales vacunas vivas también forman parte de la invención.

45

50

Un vector de rubéola preferido para uso como un vector vivo de acuerdo con la invención es la cepa de Schwartz o una cepa derivada de la misma.

55

Un adenovirus preferido para uso como un vector vivo es un adenovirus humano sero-prevalente inferior tal como Ad5 o Ad35 o un adenovirus de origen no humano tal como un adenovirus de primate no humano tal como un adenovirus de simio. Tal adenovirus humanos sero-prevalentes inferiores o similares tendrán menos de 60, de forma típica menos del 50%, de sero-prevalencia en la población. Preferiblemente, los vectores son defectivos en la replicación. De forma típica estos virus contienen una delección en E1 y se pueden criar en líneas celulares que se transforman con un gen E1. Los adenovirus de simio preferidos son virus aislados de chimpancés. En particular C68 (también conocido como Pan9) (véase la patente de Estados Unidos n° 6083716) y se prefieren para uso en la presente invención Pan 5, 6 y Pan 7 (documento WO 03/046124). Estos vectores se pueden manipular para insertar un polinucleótido heterólogo de acuerdo con la invención de modo que se pueden expresar los polipéptidos de acuerdo con la invención. El uso, formulación y fabricación de tales vectores adenovirales recombinantes se describe detalladamente en el documento WO 03/046142.

60

65

Por tanto, se puede proporcionar Nef, p17 y p24 Gag y RT de una vacuna preferida de acuerdo con la invención en forma de un polinucleótido que codifica el polipéptido deseado.

Se pueden usar los polinucleótidos de acuerdo con la invención para expresar los polipéptidos codificados en un sistema de expresión seleccionado. Al menos uno de los antígenos de VIH, por ejemplo, la RT, se puede codificar me-

ES 2 334 044 T3

dian­te una se­cuen­cia opti­mi­za­da con co­dón en el po­linu­cleó­ti­do, esto quiere decir que la se­cuen­cia ha sido opti­mi­za­da para la ex­presión en un sis­te­ma de ex­presión re­com­bi­nan­te se­lec­cio­na­do tal como *E. coli*.

5 En otro aspecto la invención proporciona un polipéptido p51 RT o derivado del mismo o un polinucleótido que lo codifica, preferiblemente optimizado con codón para la expresión en un sistema de expresión adecuado, en particular un sistema procariótico tal como *E. coli*.

10 El polipéptido p51 RT o polinucleótido se puede usar sólo, o en combinación con una construcción de polipéptido o polinucleótido de acuerdo con la invención. Por tanto, en un aspecto más la invención proporciona una composición que comprende (i) un polipéptido que comprende Nef o un fragmento que contiene epítipo de Nef y p17 Gag y/o p24 Gag, en los que cuando ambos p17 y p24 Gag están presentes hay al menos un antígeno de VIH o fragmento inmunogénico entre ellos y (ii) un polipéptido p51 RT. La invención proporciona además polinucleótidos que codifican estos.

15 Preferiblemente Nef es Nef de longitud completa. Preferiblemente p17 es p17 de longitud completa.

20 Los polipéptidos y polinucleótidos de acuerdo con la invención se pueden combinar con otros antígenos o polinucleótidos que codifican otros antígenos. En particular, esto puede incluir proteínas env del VIH o fragmentos o derivados de las mismas. Las formas preferidas de env son gp120, gp140 y gp160. La env puede ser, por ejemplo, la proteína de envoltura descrita en el documento WO 00/07631 de un clon de envoltura de clado B de VIH-1 conocido como R2, o un fragmento o derivado del mismo. Por tanto, la invención proporciona además una composición que comprende cualquiera de los polipéptidos o composiciones de polipéptido de acuerdo con la invención, junto con una proteína env del VIH o fragmento o derivado de la misma. De forma similar la invención proporciona una composición que comprende un polinucleótido o polinucleótidos que codifican un polipéptido o polipéptidos de acuerdo con la invención y un polinucleótido que codifica una proteína env del VIH o fragmento o derivado de la misma.

25 La invención proporciona además procedimientos de preparación de los polipéptidos descritos en esta invención, tal procedimiento comprende la expresión de un polinucleótido que codifica el polipéptido en un sistema de expresión adecuado, en particular un sistema procariótico tal como *E. coli* y reconversión del polipéptido expresado. Preferiblemente se induce la expresión a una temperatura baja, que es una temperatura por debajo de 37°, para promover la solubilidad del polipéptido.

30 La invención proporciona además un procedimiento para la purificación de un polipéptido como se describe en esta invención, tal procedimiento comprende:

- 35
- i). proporcionar una composición que comprende el polipéptido no purificado;
 - ii). someter la composición a al menos dos etapas cromatográficas;
 - 40 iii). de forma opcional carboxiamidación del polipéptido;
 - iv) llevar a cabo una etapa de intercambio en tampón para proporcionar la proteína en un tampón adecuado para una formulación farmacéutica.

45 La carboxiamidación se puede llevar a cabo entre las dos etapas cromatográficas. La etapa de carboxiamidación se puede llevar a cabo usando yodoacetamida.

En un ejemplo, el procedimiento de acuerdo con la invención no usa más de dos etapas cromatográficas.

50 La invención proporciona además composiciones farmacéuticas y composiciones inmunogénicas y vacunas que comprenden los polipéptidos y polinucleótidos de acuerdo con la invención, en combinación con un adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las vacunas de acuerdo con la invención se pueden usar para inmunización profiláctica o terapéutica contra VIH.

55 La invención proporciona además el uso de los polipéptidos y composiciones de polipéptido y los polinucleótidos y composiciones de polinucleótido como se describen en esta invención, en la fabricación de una vacuna para inmunización profiláctica o terapéutica contra VIH.

60 La vacuna de la presente invención contendrá una cantidad inmunoprotectora o inmunoterapéutica del polipéptido y/o antígenos de polinucleótido y se puede preparar mediante técnicas convencionales.

La preparación de vacuna se describe en general en *New Trends and Developments in Vaccines*, editado por Voller y col., University Park Press, Baltimore, Maryland, EEUU 1978. La encapsulación dentro de liposomas se describe, por ejemplo, por parte de Fullerton, patente de Estados Unidos 4.235.877. La conjugación de proteínas en macromoléculas se describe, por ejemplo, por parte de Likhite, patente de Estados Unidos 4.372.945 y por parte de Armor y col., patente de Estados Unidos 4.474.757.

ES 2 334 044 T3

La cantidad de proteína en la dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmuno-protectora sin efectos secundarios adversos significativos en vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo de qué inmunógeno específico se use y del régimen de vacunación que se seleccione. En general se espera que cada dosis comprenda de 1 a 1000 μg de cada proteína, preferiblemente de 2 a 200 μg , lo más preferiblemente de 4 a 40 μg de la fusión de polipéptido. Se puede averiguar una cantidad óptima para una vacuna determinada mediante estudios convencionales que incluyen la observación de títulos de anticuerpo y otras respuestas inmunes en sujetos. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir un refuerzo en aproximadamente 4 semanas, y una segunda inmunización de refuerzo a continuación.

Las proteínas de la presente invención están preferiblemente adyuvadas en la formulación de vacuna de la invención. Se describen adyuvantes en general en Vaccine Design - the Subunit and Adjuvant Approach, editado por Powell and Newman, Plenum Press, Nueva York, 1995.

Adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, pero también pueden ser una sal de calcio, hierro o cinc, o pueden ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos derivatizados catiónicamente o aniónicamente, o polifosfatos.

En la formulación de la invención se prefiere que la composición adyuvante incluya una respuesta Th1 preferencial. Sin embargo, se entenderá que no se excluyan otras respuestas, incluyendo otras respuestas humorales.

Se genera una respuesta inmune a un antígeno a través de la interacción del antígeno con las células del sistema inmune. La respuesta inmune resultante se puede distinguir ampliamente en dos categorías extremas, siendo respuestas inmunes humorales o mediadas por células (caracterizadas tradicionalmente por mecanismos efectores de anticuerpo y celulares de protección respectivamente). Estas categorías de respuesta se han denominado respuestas de tipo Th1 (respuesta mediada por célula), y respuestas inmunes de tipo Th2 (respuestas humorales).

Las respuestas inmunes de tipo Th1 extremas se pueden caracterizar por la generación de linfocitos T citotóxicos restringidos por el haplotipo, específicos del antígeno, y respuestas de células asesinas naturales. En ratones, las respuestas de tipo Th1 se caracterizan frecuentemente por la generación de anticuerpos del subtipo IgG2a, mientras que en el humano estas corresponden a anticuerpos de tipo IgG1. Las respuestas inmunes de tipo Th2 se caracterizan por la generación de un amplio intervalo de isotipos de inmunoglobulina incluyendo en ratones IgG1, IgA e IgM.

Se puede considerar que la fuerza impulsora detrás del desarrollo de estos dos tipos de respuestas inmunes son las citoquinas, un número de mensajeros proteicos identificados que sirven para ayudar a las células del sistema inmunológico y dirigir la respuesta inmune eventual a una respuesta Th1 o Th2. Por tanto, niveles elevados de citoquinas de tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células respecto al antígeno administrado, mientras que niveles elevados de citoquinas de tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales respecto al antígeno.

Es importante recordar que la distinción de respuestas inmunes de tipo Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad un individuo soportará una respuesta inmune que se describe que es predominantemente Th1 o predominantemente Th2. Sin embargo, es frecuentemente conveniente considerar las familias de citoquinas en términos de lo descrito en clones de células T CD4+ve murinas por parte de Mosmann y 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, páginas 145 a 173*). Tradicionalmente las respuestas de tipo Th1 están asociadas con la producción de las citoquinas INF- γ e IL-2 por parte de linfocitos T. Otras citoquinas frecuentemente asociadas directamente con la inducción de respuestas inmunes de tipo Th1 no son producidas por células T, tales como IL-12. Por el contrario las respuestas de tipo Th2 están asociadas con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y factor de necrosis tumoral β (TNF- β).

Se sabe que ciertos adyuvantes de vacuna son particularmente adecuados para la estimulación de respuestas de citoquina de tipo Th1 o Th2. Tradicionalmente los mejores indicadores del equilibrio Th1 :Th2 de la respuesta inmune tras una vacunación o infección incluye la medida directa de la producción de citoquinas Th1 o Th2 por parte de linfocitos T *in vitro* tras reestimulación con antígeno, y/o la medida de la relación IgG1:IgG2a de respuestas de anticuerpo específicas de antígeno.

Por tanto, un adyuvante de tipo Th1 es uno que estimula poblaciones de células T aisladas para producir altos niveles de citoquinas de tipo Th1 cuando se re-estimulan con antígeno *in vitro*, e induce respuestas de inmunoglobulina específicas del antígeno asociadas con isotipo de tipo Th1.

Inmunoestimulantes de tipo Th1 preferidos que se pueden formular para producir adyuvantes adecuados para uso en la presente invención incluyen los siguientes sin restringirse a estos.

Monofosforil lípido A, en particular el monofosforil lípido A 3-de-O-acilado (3D-MPL), es un inmunoestimulante de tipo Th1 preferido para uso en la invención. 3D-MPL es un adyuvante bien conocido fabricado por Ribic Immunochem, Montana. Químicamente es suministrado frecuentemente como una mezcla de monofosforil lípido A 3-de-O-acilado con cadenas aciladas en 4, 5 ó 6. Se puede purificar y preparar mediante los procedimientos dados a conocer en el documento GB 2122204B, tal referencia también describe la preparación de difosforil lípido A, y variantes 3-

ES 2 334 044 T3

O-deaciladas del mismo. Se han descrito otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos (documentos US 6.005.099 y EP 0729473 B1; Hilgers y col., 1986, *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 79(4):392-6; Hilgers y col., 1987, *Immunology*, 60(1):141-6; y EP 0549074 B1). Una forma preferida de 3D-MPL es en la forma de una formulación particulada que tiene un tamaño de particular pequeño inferior a 0,2 μm de diámetro, y su procedimiento de fabricación se describe en el documento EP 0689454.

Las saponinas son también inmunoestimulantes Th1 preferidos de acuerdo con la invención. Las saponinas son adyuvantes bien conocidos y se dan a conocer en: Lacaille-Dubois, M y Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* volumen 2, páginas 363-386). Por ejemplo, se describen Quil A (derivado de la corteza del árbol sudamericano Quillaja Saponaria Molina), y fracciones del mismo, 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 en el documento EP 0362279 B1. Se han descrito saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones de Quil A purificadas con HPLC) como potentes adyuvantes sistémicos, y se describe el procedimiento de su producción en la patente de Estados Unidos número 5.057.540 y en el documento EP 0362279 B1. También se describe en estas referencias el uso de QS7 (una fracción no hemolítica de Quil-A) que actúa como un potente adyuvante para vacunas sistémicas. El uso de QS21 se describe además por parte de Kensil y col. (1991. *J. Immunology* volumen 146, 431-437). Se conocen también combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina (documento WO 99/10008). Los sistemas adyuvantes particulados que comprenden fracciones de QuilA, tales como QS21 y QS7 se describen en los documentos WO 96/33739 y WO 96/11711. Un sistema de este tipo es conocido como un Iscorn y puede contener una o más saponinas.

Otro inmunoestimulante preferido es un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene dinucleótidos CpG no metilados ("CpG"). CpG es una abreviatura de motivos de dinucleótido de citosin-guanosina presentes en ADN. CpG es conocido en la técnica como un adyuvante cuando se administra tanto por vía sistémica como mucosal (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). Históricamente se observó que la fracción de ADN de BCG podría ejercer un efecto anti-tumor. En otros estudios, se demostró que oligonucleótidos sintéticos derivados de secuencias de genes de BCG son capaces de inducir efectos inmunoestimuladores (tanto *in vitro* como *in vivo*). Los autores de estos estudios concluyeron que ciertas secuencias palindrómicas, incluyendo un motivo CG central, portaban esta actividad. El papel central del motivo CG en la inmunoestimulación se elucidaba más tarde en una publicación de Krieg, *Nature* 374, páginas 546 1995. Análisis detallados han mostrado que el motivo CG tiene que estar en un cierto contexto de secuencia, y que esas secuencias son comunes en ADN bacteriano pero que son raras en ADN de vertebrados. La secuencia inmunoestimuladora es frecuentemente: Purina, Purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en la que el motivo CG no está metilado, pero se conocen otras secuencias CpG no metiladas por ser inmunoestimuladoras y se pueden usar en la presente invención.

En ciertas combinaciones de los seis nucleótidos está presente una secuencia palindrómica. Pueden estar presentes en el mismo oligonucleótido varios de estos motivos, bien como repeticiones de un motivo o una combinación de distintos motivos. La presencia de una o varias de estas secuencias inmunoestimuladoras que contienen oligonucleótidos puede activar distintos subconjuntos inmunes, incluyendo células asesinas naturales (que producen interferona γ y tienen actividad citolítica) y macrófagos (Wooldrige y col. volumen 89 (número 8), 1977). Otras secuencias que contienen CpG no metilado que no tienen esta secuencia de consenso se ha demostrado también ahora que son inmunomoduladoras.

GpG cuando se formula en vacunas, se administra por lo general en solución libre junto con antígeno libre (documento WO 96/02555; McCluskie y Davis, véase anteriormente) o conjuntado covalentemente con un antígeno (documento WO 98/16247), o formularse con un vehículo tal como hidróxido de aluminio (antígeno de superficie de la hepatitis) Davis y col. véase anteriormente; Brazolot-Millan y col, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EEUU, 1998, 95(26), 15553-8).

Tales inmunoestimulantes como se describen anteriormente, se pueden formular junto con vehículos, tales como por ejemplo liposomas, emulsiones aceite en agua y o sales metálicas, incluyendo sales de aluminio (tal como hidróxido de aluminio). Por ejemplo, se puede formular 3D-MPL con hidróxido de aluminio (documento EP 0689454) o en emulsiones aceite en agua (documento WO 95/17210); se puede formular QS21 de forma ventajosa con liposomas que contienen colesterol (documento WO 96/33739), emulsiones aceite en agua (documento WO 95/17210) o alumbre (documento WO 98/15287); CpG se puede formular con alumbre (Davis y col. véase anteriormente; Brazolot-Millan véase anteriormente) o con otros vehículos catiónicos.

Se prefieren también combinaciones de inmunoestimulantes, 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 describe en el documento WO 94/00153. De forma alternativa, una combinación de CpG más una saponina tal como QS21 también forma un adyuvante potente para uso en la presente invención. De forma alternativa, la saponina se puede formular en un liposoma o en un Iscorn y combinarse con un oligonucleótido inmunoestimulador.

Por tanto, sistemas adyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, preferiblemente 3D-MPL, junto con una sal de aluminio. Un sistema mejorado incluye la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se describió en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica donde el QS21 se desactiva en liposomas que

ES 2 334 044 T3

contienen colesterol (DQ) como se describe en el documento WO 96/33739. Esta combinación puede comprender adicionalmente un oligonucleótido inmunoestimulador.

5 Se describe una formulación adyuvante particularmente potente que involucra QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión aceite en agua en el documento WO 95/17210 y es otra formulación preferida para uso en la invención.

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

10 En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un procedimiento para la fabricación de una formulación de vacuna como se describe en esta invención, en el que el procedimiento comprende mezcla de un polipéptido de acuerdo con la invención con un adyuvante adecuado.

Las combinaciones adyuvantes particularmente preferidas para uso en las formulaciones de acuerdo con la invención son como sigue:

- 15
- i) 3D-MPL + QS21 en un liposoma
 - ii) Alumbre + 3D-MPL

20

 - iii) Alumbre + QS21 en a liposome + 3D-MPL
 - iv) Alumbre + CpG
 - v) 3D-MPL + QS21 + emulsión aceite en agua

25

 - vi) CpG

La administración de la composición farmacéutica puede tomar la forma de una o de más de una dosis individual, por ejemplo, como dosis repetidas de la misma composición que contiene polipéptido, o en un régimen de vacunación "inducción-refuerzo" heterólogo. Un régimen inducción-refuerzo heterólogo usa administración de diferentes formas de vacuna en la inducción y el refuerzo, cada una de las cuales puede incluir por sí misma dos o más administraciones. La composición de inducción y la composición de refuerzo tendrán al menos un antígeno en común, aunque no es necesariamente una forma idéntica del antígeno, esta puede ser una forma diferente del mismo antígeno.

35 Se pueden llevar a cabo inmunizaciones de inducción refuerzo de acuerdo con la invención con una combinación de proteína y formulaciones basadas en ADN. Una estrategia de este tipo se considera que es efectiva en la inducción de amplias respuestas inmunes. Vacunas de proteína adyuvadas inducen principalmente anticuerpos y respuestas inmunes de células T de ayuda, mientras la liberación de ADN como un plásmido o un vector vivo induce fuertes respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL). Por tanto, la combinación de proteína y vacunación con ADN proporcionará una amplia variedad de respuestas inmunes. Esto es particularmente relevante en el contexto de VIH, ya que se cree que 40 ambos anticuerpos de neutralización y CTL son importantes para la defensa inmune contra VIH.

De acuerdo con la invención un calendario para la vacunación puede comprender la administración secuencial ("inducción-refuerzo") o simultánea de antígenos de de polipéptido y ADN que codifica los polipéptidos. El ADN se puede liberar como ADN desnudo tal como ADN plásmido o en la forma de un vector vivo recombinante, por ejemplo, un vector poxvirus, un vector adenovirus, un vector de virus de la rubeola, o cualquier otro vector vivo adecuado. Se pueden inyectar antígenos de proteína una o varias veces seguido de una o varias administraciones de ADN, se puede usar ADN en primer lugar durante una o más administraciones seguidas de una o más inmunizaciones con proteína.

50 Un ejemplo particular de inmunización por inducción-refuerzo de acuerdo con la invención incluye la inducción con ADN en la forma de un vector vivo recombinante tal como un vector de poxvirus modificado, en la inducción de respuestas inmunes amplias. Vacunas de proteína adyuvadas induce fuertes respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL). Por tanto, la combinación de proteína y vacunación con ADN proporcionará una amplia variedad de respuestas inmunes. Esto es particularmente relevante en el contexto de VIH, ya que se cree que ambos anticuerpos de neutralización y CTL son importantes para la defensa inmune contra VIH.

60 De acuerdo con la invención un calendario para la vacunación puede comprender la administración secuencial ("inducción-refuerzo") o simultánea de antígenos de de polipéptido y ADN que codifica los polipéptidos. El ADN se puede liberar como ADN desnudo tal como ADN plásmido o en la forma de un vector vivo recombinante, por ejemplo, un vector poxvirus, un vector adenovirus, un vector de virus de la rubeola, o cualquier otro vector vivo adecuado. Se pueden inyectar antígenos de proteína una o varias veces seguido de una o varias administraciones de ADN, se puede usar ADN en primer lugar durante una o más administraciones seguidas de una o más inmunizaciones con proteína.

65 Un ejemplo particular de inmunización por inducción-refuerzo de acuerdo con la invención incluye la inducción con ADN en la forma de un vector vivo recombinante tal como un vector poxvirus modificado, por ejemplo, virus Ankara modificado (MVA) o un alfavirus, por ejemplo, virus de encefalitis equina venezolana, o un vector adenovirus, o un vector de virus de la rubeola, seguido de refuerzo con una proteína, preferiblemente una proteína adyuvada.

ES 2 334 044 T3

Por tanto la invención proporciona además un kit farmacéutico que comprende:

- a) una composición que comprende un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable; y
- b) una composición que comprende un polinucleótido que codifica una o más de Nef o Gag o un fragmento o derivado inmunogénico de Nef o Gag que contiene un epítipo de Nef o Gag presente en el polipéptido de a), junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización alternativa el kit farmacéutico comprende:

- a) una composición que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, y
- b) una composición que comprende un polipéptido que comprende uno o más de Nef o Gag o un fragmento o derivado inmunogénico de Nef o Gag que contiene un epítipo de Nef o Gag presente en el polipéptido de a), junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Polipéptidos y polinucleótidos preferidos para uso en un kit para inducción/refuerzo de acuerdo con la invención son polipéptidos y polinucleótidos como se describen en esta invención. Por tanto, el componente proteico de un enfoque inducción/refuerzo de tipo proteína/ADN puede ser cualquiera de las proteínas de fusión preferidas descritas en esta invención. Igualmente, el componente ADN puede ser un polinucleótido que codifica cualquiera de las proteínas preferidas.

Por tanto, por ejemplo, las fusiones p24 - RT - Nef - p17, p24 - RT* - Nef - p17, p24 - p51RT - Nef - p17, p24 - p51RT* - Nef - p17 se pueden proporcionar en un kit de inducción refuerzo, productos tales como truncados. La adaptación de uso del codón a la expresión de *E. coli* puede eliminar también las secuencias de “desplazamiento de marco” putativas así como también la terminación prematura y/o sitios de iniciación internos.

El código de ADN tiene 4 letras (A, T, C y G) y usa estas para deletrear tres letras “codones” que representan los aminoácidos de las proteínas codificadas en un gen del organismo. La secuencia lineal de codones a lo largo de la molécula de ADN se translada en la secuencia lineal de aminoácidos en la(s) proteína(s) codificadas por estos genes. El código está altamente degenerado, con 61 codones que codifican para los 20 aminoácidos naturales y 3 codones que representan señales “de parada”. Por tanto, la mayoría de los aminoácidos están codificados por más de un codón - de hecho varios están codificados por cuatro o más codones diferentes.

Donde esté disponible más de un codón para codificar para un aminoácido dado, se ha observado que los patrones de uso de codón de organismos son altamente no aleatorios. Diferentes especies muestran una preferencia diferente en su selección de codón y, además, la utilización de los codones puede ser marcadamente diferente en una única especie entre genes que se expresan a niveles superiores e inferiores. Esta preferencia es diferente en virus, plantas, bacterias y células de mamíferos, y algunas especies muestran una preferencia más fuerte lejos de una selección de codón aleatoria que otros. Por ejemplo, los humanos y otros mamíferos no son menos fuertemente preferidos que ciertas bacterias o virus. Por estas razones, hay una probabilidad significativa de que un gen viral de un virus de mamífero expresado en *E. coli*, o un gen extraño o recombinante expresado en células de mamífero tengan una distribución inapropiada de codones para expresión eficiente. Se cree que la presencia en una secuencia de ADN heteróloga de bucles de codones o una abundancia de codones que se observan raramente en el huésped en cuya expresión se van a producir, es predictiva de bajos niveles de expresión heteróloga en ese huésped.

En los polinucleótidos de la presente invención el modelo de uso del codón puede estar alterado del típico de virus de inmunodeficiencia humana para representar más estrechamente la preferencia codónica del organismo diana, por ejemplo *E. coli*.

Hay una variedad de programas disponibles públicamente útiles para la optimización con codón, por ejemplo “CalcGene” (Hale y Thompson, Protein Expression and Purification 12: 185-189 (1998).

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción y expresión de F4 de fusión p24 - RT - Nef - p17 y F4 optimizada con codón (co) del VIH-1

1. F4 no optimizada con codón

Se expresaron proteínas gag p24 de (proteína cápsida) y p17 (proteína matriz), la transcriptasa inversa y Nef de VIH-1 en cepa B834 de *E. coli*. (B834 (DE3) es un pariente auxótrofo de la metionina de BL21 (DE3)), bajo control del promotor del bacteriófago T7 (sistema de expresión pET).

Estos se expresaron como una proteína de fusión simple que contiene la secuencia completa de las cuatro proteínas. La secuencia que codifica p24 madura proviene del clon molecular de BH10 del VIH-1, secuencia p17 madura y gen de RT de HXB2 y gen de Nef de aislado de BRU.

ES 2 334 044 T3

Tras inducción, las células recombinantes expresaron niveles significativos de la fusión p24-RT-Nef-p17 que ascendieron hasta el 10% de la proteína total.

5 Cuando se cultivaron células e indujeron a 22°C, la proteína de fusión p24-RT-Nef-p17 se confinó principalmente en la fracción soluble de los lisados bacterianos (incluso tras congelación/descongelación). Cuando se cultivaron a 30°C, en torno al 30% de la proteína recombinante estaba asociada con la fracción insoluble.

10 La proteína de fusión p24-RT-Nef-p17 está hecha de hasta 1136 aminoácidos con una masa molecular de aproximadamente 129 kDa. La proteína de longitud completa migra hasta aproximadamente 130 kDa en gel SDS. La proteína tiene un punto isoelectrónico teórico (pI) de 7,96 basado en su secuencia de aminoácidos, confirmado por electroforesis en gel 2D.

Detalles del plásmido recombinante:

15 nombre: pRIT15436 (o nombre de laboratorio pET28b/p24-RT-Nef-p17)
vector huésped: pET28b replicón: colE1
selección: kanamicin
20 promotor: T7
inserción: gen de fusión de p24-RT-Nef-p17.

Detalles de la proteína recombinante:

25 Proteína de fusión p24-RT-Nef-p17: 1136 aminoácidos

Término N - p24: 232a.a. - bisagra:2a.a. - RT: 562a.a. - bisagra:2a.a. - Nef: 206a.a. - P17: 132a.a. - Término C

Secuencias de nucleótidos y aminoácidos

Secuencia de nucleótidos

35 **atggttatcgtgcagaacatccaggggcaaatggtacatcaggccatatacactagaact**
ttaaatgcatgggtaaaagtagtagaagagaaggccttcagcccagaagtaatacccatg
tttcagcattatcagaaggagccaccccacaagattaaacacccatgctaaacacagtg
gggggacatcaagcagccatgcaaatggttaaagagaccatcaatgaggaagctgcagaa
40 **tgggatagagtacatccagtgcagggcctatgaccaggccagatgagagaacca**
aggggaagtgcatagcaggaactactagtaccctcaggaacaaataggatggatgaca
aataatccacctatcccagtaggagaaattataaaaagatggataatcctgggattaaat
aaaatagtagaatgtatagccctaccagcattctggacataagacaaggacaaaagaa
45 **ccttttagagactatgtagaccggtctataaaactctaagagccgagcaagcttcacag**
gaggtaaaaaatggatgacagaaacctgttgggtccaaaatgccaaccagattgtaag
actattttaaagcattgggaccagcggctacactagaagaaatgatgacagcatgtcag
50 **ggagtaggaggacccggccataaggcaagagttttgcatatgggccccattagccctat**
tgagactgtgtcagtaaaataaagccaggaatggatggcccaaaagttaaacaatggcc
atgacagaagaaaaataaaagcattagtagaaattgtacagagatggaaaaggaagg
gaaaatttcaaaaatgggcctgaaaatccatacaatactccagatttgccataaagaa
55 **aaaagacagtaactaaatggagaaaattagtagatttcagagaacttaataagagaactca**
agacttctgggaagtcaattaggaataccacatcccgcagggttaaaaaagaaaaatc
agtaacagtaactggatgtgggtgatgcatattttcagttcccttagatgaagacttcag
60 **gaaatatactgcattaccatacctagtataaacaatgagacaccagggattagatatca**
gtacaatgtgcttccacagggatggaaaggatcaccagcaatattccaaagtagcatgac
aaaaatcttagagccttttagaaaacaaaatccagacatagttatctatcaatacatgga
tgatttgtatgtaggatctgacttagaaatagggcagcatagaacaaaaatagaggagct
65 **gagacaacatctgttgaggtggggacttaccacaccagacaaaaaacatcagaaagaacc**
tccattccttaaaatgggttatgaactccatcctgataaatggacagtagcagcctatagt

ES 2 334 044 T3

Secuencia de aminoácidos

5	MVIVQNIQGQMVHQAISPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGATP	50
	QDLNTMLNNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMPREP	100
	RGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTS	150
	ILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANANPDCK	200
10	TILKALGPAATLEEMTACQGVGGPGHKARVLHMGPISPIETVSVKCLKPG	250
	MDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKK	300
	KDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLDVGDAY	350
15	FSVPLDEDFRKYTAFTIP SINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMT	400
	KILEPFRKQNPDIVIYQYMDLIVGSDLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGLT	450
	TPDKKHQKEPPFLKMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSWTVNDIQKLVGKLN	500
	WASQIYPGIKVRQLCKLLRGTALTEVIPLEEEAELELAENREILKEPVH	550
20	GVYYDPSKDLIAEIQKQGGQWTYQIQEPPFKNLKTGKYARMRGAHTNDV	600
	KQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKFKLPIQKETWETWWTEYWQATWIPEWE	650
	FVNTPLVVLKWLWYQLEKEPIVGAETFYVDGAANRETCLGKAGYVTNRGRQK	700
25	VVTLTDTTNQKTELQAIYLALQDSGLEVNIVTDSQYALGIIQAQPDQSES	750
	ELVNQII EQLIKKEKVYLAWVPAHKGIGNEQVDKLVSAGIRKVLAMGGK	800
	WSKSSVVGWPTVRERMRRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAA	850
30	CAWLEAQEEEEVGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQ	900
	RRQDILDLDWIYHTQGYFPDWQNYTPGGVRYPLTFGWICYKLVPEPDKVE	950
	EANKGENTSLHHPVSLHGMDDPEREVLEWRFD SRLAFHHVARELHPEYFK	1000
35	NCRPMGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKCKYKPKHIVWASRELERFAV	1050
	NPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKD	1100
	TKEALDKIEEEQNKSKKKAQQAADTGHSNQVSONY	1136

[Nº ID SEC:2]

40

Secuencia de P24: aminoácidos 1-232 (en negrita)

Secuencia de RT: aminoácidos 235-795

45

Secuencia de Nef: aminoácidos 798-1002

Secuencia de P17: aminoácidos 1005-1136

50

Cajas: aminoácidos introducidos mediante construcción genética

K (Lisine): en lugar de triptópano (W). Mutación introducida para eliminar la actividad enzimática.

55

Expresión de la proteína recombinante:

En el plásmido pET, el gen diana (p24-RT-Nef-p17) está bajo control del promotor del bacteriófago T7 fuerte. Este promotor no es reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli* y es dependiente de una fuente de T7 ARN polimerasa en la célula huésped. La célula huésped B834 (DE3) contiene una copia cromosomal del gen de T7 ARN polimerasa bajo control de lacUV5 y la expresión es inducida por la adición de IPTG al cultivo bacteriano.

60

Se cultivaron los pre-cultivos, en matraces de agitación, a 37°C hasta fase semi-logarítmica (A620:0,6) y luego se almacenaron a 4°C durante la noche (para evitar cultivos en fase estacionaria). Se cultivaron los cultivos en medio LBT suplementado con glucosa al 1% y 50 µg/ml de canamicina. La adición de glucosa al medio de crecimiento tiene la ventaja de reducir la expresión de proteína recombinante basal (evitando la depresión mediada por AMPc del promotor lacUV5).

65

ES 2 334 044 T3

Se usaron diez ml de cultivos almacenados durante la noche a 4°C para inocular 200 ml de medio LBT (sin glucosa) que contiene canamicina. Se cultivaron los cultivos a 30°C y 22°C y cuando la densidad óptica (OD) a 620 alcanzó 0,6, se añadió IPTG (1 mM final). Se incubaron los cultivos durante 3, 5 y 18 horas (durante la noche). Se recogieron muestras antes y después de 3, 5 y 18 horas de inducción.

La preparación del extracto fue como sigue:

Se suspendieron agregados celulares en tampón* de ruptura (a una densidad óptica (O.D.) teórica de 10) y se trituró mediante cuatro pasadas en prensa francesa (a 20.000 psi o 1250 bar). Se centrifugaron los extractos brutos (T) a 20.000 g durante 30 minutos para separar las fracciones solubles (S) e insolubles (P).

*Tampón de ruptura: Tris-HCL 50 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, DTT + cóctel de inhibidores de proteasa 1 mM (completo/Boehringer).

Análisis por SDS-PAGE y Transferencia western:

Se experimentaron fracciones correspondientes a agregado insoluble (P), sobrenadante (S) y extracto bruto (T) en SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras. Se detectó p24-RT-Nef-p17 recombinante mediante tinto de azul de Coomassie en Transferencia western (WB).

Tintado con Coomassie: la proteína p24-RT-Nef-p17 aparece como:
una banda a \pm 130 kDa (ajustando con PM calculado)

PM teórico: 128,970 Daltons

PM aparente: 130 kDa

Análisis por Transferencia western:

Reactivos = - anticuerpo monoclonal para RT (p66/p51)
Adquirido a ABI (Advanced Biotechnologies) dilución: 1/5000
- Anticuerpo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina dilución: 1/7500

Nivel de expresión: - banda específica de p24-RT-Nef-p17 muy fuerte tras inducción de 20 horas a 22°C, representando hasta el 10% de la proteína total (véase figura 1A).

“Solubilidad” de la proteína recombinante:

Extractos celulares “frescos” (fracciones T,S,P): con crecimiento/inducción a 22°C/20 horas, casi toda la proteína de fusión p24-RT-Nef-p17 se recupera en la fracción soluble del extracto celular (figura 1A). Con crecimiento/inducción a 30°C/20 horas, se asocia aproximadamente el 30% de la proteína p24-RT-Nef-p17 con la fracción insoluble (figura 1A).

“Congelación/descongelación” (fracciones S2, P2):

La fracción soluble (S1) (inducción de 20 horas a 22°C) se conservó a -20°C. Se congeló y se centrifugó a 20.000 g/30 minutos: S2 y P2 (resuspendidas en volumen 1/10).

Tampón de ruptura con DTT: casi toda la proteína de fusión p24-RT-Nef-p17 permanece soluble (sólo precipitó de 1 a 5%) (véase figura 1B)

Tampón de ruptura sin DTT: de 85 a 90 % de p24-RT-Nef-p17 permanece soluble (figura 1B)

Figuras:

Figura 1A - Tintado de Coomassie y transferencia western.

Figura 1B - ensayo de solubilidad de p24-RT-Nef-p17

La proteína F4 se purificó usando el procedimiento de purificación I en el ejemplo 7.

ES 2 334 044 T3

Las condiciones de crecimiento celular y de inducción y preparación de extractos celulares para los ejemplos que siguen son como se describe en el ejemplo 1 a menos que se especifiquen otras condiciones (por ejemplo, temperatura, composición del tampón de ruptura).

5

2. F4 optimizada con codón

Se optimiza con codón la siguiente secuencia de polinucleótidos de modo que el uso del codón se asemeja al uso del codón en un gen ampliamente expresado en *E. coli*. La secuencia de aminoácidos es idéntica a la dada anteriormente para F4 no optimizado con codón.

10

Secuencia de nucleótidos para F4co

15

**atggtcattgttcagaacatacagggccaaatggtccaccaggcaattagtcgcggaact
cttaatgcatgggtgaaggctcgtggaggaaaaggcattctccccggaggctattccgatg
ttttctgcgctatctgagggcgcaacgccgcaagaccttaataccatgcttaacacggta
ggcgggcaccaagccgctatgcaaagtctaaaagagactataaacgaagaggccgcca
tgggatcgagtgcaccgggtgcacgccggcccaattgcaccaggccagatgcgcgagccg
cgcggggtctgatattgcaggaactacgtctacccttcaggagcagattgggtggatgact
aacaatccaccaatcccggctcggagagatctataagaggtggatcatactgggactaac
aagatagtcgcgatgtattctccgactctatactggatatacgccaaggcccaaaggag
ccgttcagggactatgctcgaccgatctataagacccttcgcgcagagcaggcatcccag
gaggtcaaaaattggatgacagaaaactcttttgggtgcagaatgcgaatccggattgtaaa
acaattttaaaggctctaggaccggccgcaacgctagaagagatgatgacggcttgctcag
ggagtccgtggaccggggcataaaagcccgcgtctta^{ccacatgggccc}gatattctccgat
agaaacagtttcggccaagcttaaacagggatggatgggtccaaaggccaagcagtgggc
gctaaccggaagagaagattaaggcgctcgtagagatttgtactgaaatggagaaggaagg
caagataagcaagatccggccagagaaccctacaatacaccggatttgcaataaagaa
aaaggattcaacaaaatggcgaaagcttgtagattttagggaactaaacaagcgaacca
agacttttgggaagtccaactagggatcccacatccagccggtctaaagaagaagaatc
ggtcacagtcctggatgtaggagacgcataattttagtgtaccgcttgatgaggacttccg
aaagtatactgcgcttactataccgagcataaacaatgaaacgccaggcattcgctatca
gtacaacgtgctcccgcagggtggaaggggtctccggcgatatttcagagctgtatgac
aaaaatacttgaaccattccgaaagcagaatccggatattgtaatttaccatatacagga
cgatctctatgtgggctcggatctagaaattgggcagcatcgactaagattgaggaact
gaggcaacatctgcttcgatggggcctcactactcccgacaagaagcaccagaaggagcc**

50

55

60

65

ES 2 334 044 T3

gccgttcctaaagatgggctacgagcttcatccggacaagtggacagtacagccgatagt
gctgcccgaaggaattcttggaccgtaaatgatattcagaaactagtcggcaagcttaa
5 ctgggcctctcagatttaccagggcatttaaggtccgacagctttgcaagctactgagggg
aactaaggctctaacagaggtcatccattaacggaggaagcagagcttgagctggcaga
gaatcgcgaaattcttaaggagccggtgcacggggtatactacgaccctccaaggacct
10 tatagccgagatccagaagcaggggcagggccaatggacgtaccagatatatcaagaacc
gtttaagaatctgaagactgggaagtacgcgcgcatgagggggctcataactaatgatgt
aaagcaacttacggaagcagtaaaaaagattactactgagctctatttgtgatatggggcaa
gaccccaaagtccaagctgcccatacagaaggaacatgggaaacatgggtggactgaata
15 ttggcaagctacctggattccagaatgggaatttgtcaacacgcccacttgttaagct
ttggtagcagcttgaaaaggagccgatagtaggggcagagaccttctatgtcgatggcgc
cgcgaaatcgcgaaacgaagctaggcaaggcgggatacgtgactaatagggccgcaaaa
ggctgtaacccttacggataaccaccaatcagaagactgaactacaagcgatttaccttgc
20 acttcaggatagtgccctagaggtcaacatagtcacggactctcaatatgcgcttggcat
tattcaagcgcagccagatcaaagcgaaagcagagcttgtaaaccaataatagaacagct
tataaagaaagagaaggtatatctggcctgggtccccgctcacaagggaaattggcggcaa
25 tgagcaagtggaacagctagtcagcgtgggattcgcaaggttcttgcgattgggggta
agtggtctaagcttagcgtagtcggctggccgacagtcgcgagcgcattgagcgcgccc
aaccagccgcagatggcgtgggggcagcgtctagggatctggagaagcacggggctataa
cttccagtaaacgqcgccgacgaacgcccgatgagcgttgatagaagccaagaagagg
30 aagaagtagggtttccggtaactccccaggtgcccgttaaggccgatgacc
tataaggcagcgggtggatctttctcacttccctaaaggagaaaggggggctggagggctta
attcacagccagagggcagcaggatattcttgatctgtggatttaccataccaggggtac
tttccggactggcagaattacaccccggggccagggcgtgagctatcccctgactttcggg
35 tggtgctacaaactagtcacagtggaacccgacaaggtcgaagaggctaaatagggcgag
aacacttctctcttccacccgtaagcctgcacgggatggatgaccagaaacgagaggtt
ctagaatggaggttcgactctcgacttgcgttccatcacgtagcacgcgagctgcatcca
40 gaatattcaagaactgcccgaatgggcgcccagggccagtgactttagtgccggaga
actagatcgatgggaaaagatacgcctacgcccggggggcaagaagaagtacaagcttaa
gcacatttgtgtggcctctcgcaacttgagcgattcgagtgatccaggcctgcttga
45 gacgagtgaaggctgtaggcaaatctggggcagctacagccgagcctacagactggcag
cgaggagcttcgtagctttataataaccgtcgcgactctctactgcgttcatcaacgaat
tgaaataaaggataactaaagagcccttgataaaattgaggaggaacagaataagtcgaa
aaagaaggccagcagggccgcccgcacacggggcacagcaaccaggtgtcccaaaacta
50 ctaa

[Nº ID SEC:3]

55 La secuencia de p24 está en negrita

La secuencia de Nef está subrayada

Cajas: nucleótidos introducidos mediante construcción genética

60 Los procedimientos usados en relación con F4 no optimizado con codón se aplicaron para la secuencia optimizada con codón.

65

ES 2 334 044 T3

Detalles del plásmido recombinante:

nombre: pRIT15513 (nombre de laboratorio: pET28b/p24-RT-Nef -p17)

5 vector huésped: pET28b

replicón: colE1

10 selección: canamicina

promotor: T7

inserción: gen de fusión p24-RT-Nef-p17, optimizado con codón

15 Se expresó el gen optimizado con codón de F4 en células de *E. coli* BLR(DE3), un derivado de $recA^-$ de la cepa B834(DE3). La mutación de RecA evita la producción putativa de fagos lambda.

20 Se cultivaron pre-cultivos, en matraces de agitación, a 37°C hasta fase semi-logarítmica ($A_{620}:0,6$) y se almacenaron luego a 4°C durante la noche (para evitar cultivos en fase estacionaria).

Se cultivaron cultivos en medio LBT suplementado con glucosa al 1% y canamicina 50 $\mu\text{g/ml}$. La adición de glucosa al medio de crecimiento tiene la ventaja de reducir la expresión de proteína recombinante basal (evitando depresión mediada por AMPc del promotor lacUV5).

25 Se usaron diez ml de cultivos almacenados durante la noche a 4°C para inocular 200 ml de medio LBT (sin glucosa) que contiene canamicina. Se cultivaron cultivos a 37°C y cuando la densidad óptica (OD) a 260 alcanzó 0,6, se añadió IPTG (1 mM final). Se incubaron cultivos durante 19 horas más (durante la noche), a 22°C. Se recogieron muestras antes y a las 19 horas de la inducción.

30 *La preparación de extracto fue como sigue*

Se resuspendieron agregados de células en tampón de muestra (a una densidad óptica (OD) teórica de 10), se hirvió y se cargaron directamente en SDS-PAGE.

35 Análisis SDS-PAGE y Transferencia western:

Se experimentaron muestras de extractos brutos en SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras.

40 Se detecta proteína recombinante p24-RT-Nef-p17 mediante tinto con azul de Coomassie (figura 2) y en Transferencia western.

45 Tintado con Coomassie: la proteína p24-RT-Nef-p17 aparece como: una banda a ± 130 kDa (ajustada con PM calculado)

PM teórico: 128.967 Daltons

50 PM aparente: 130 kDa

Análisis Transferencia western:

55 Reactivos = - Anti RT policlonal de conejo (PO3L16 de conejo) dilución: 1/10.000

- Anti Nef-Tat policlonal de conejo (388 de conejo) dilución 1/10.000

- Anticuerpo anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina dilución: 1/7500

60 Tras inducción a 22°C durante 19 horas, las células recombinantes BLR(DE3) expresaron la fusión F4 a un nivel muy alto que varía de 10 a 15% de la proteína total.

65 En comparación con F4 del gen nativo, el perfil de producto recombinante de F4 del gen optimizado con codón se encuentra ligeramente simplificado. La principal banda relacionada con F4 a 60 kDa desapareció, así como también bandas menores por debajo (véase la figura 2). En comparación con la cepa recombinante B834(DE3) que expresa F4, la cepa BLR(DE3) que produce F4co tiene las siguientes ventajas: mayor producción de proteína de longitud completa F4, modelo de banda menos complejo del producto recombinante.

ES 2 334 044 T3

Ejemplo 2

Construcción y expresión de P51 RT (RT optimizada con codón, truncada)

5 La región RT/p66 entre los aminoácidos 428-448 es susceptible para las proteasas de *E. coli*. La construcción de P51 termina en Leu 427 dando lugar a la eliminación del dominio ARNasa H (véase alineación de la secuencia de RT en la figura 3).

10 También se eliminaron las secuencias “que desplazan el marco de lectura” de *E. coli* putativas en la secuencia de gen nativo de RT (mediante optimización con codón del gen p51).

Diseño/construcción del gen sintético p51:

15 La secuencia del gen p51 sintético se diseñó de acuerdo con el uso de codón en *E. coli*. Por tanto, este se optimizó con codón de modo que el uso de codón se asemeja al uso de codón en un gen altamente expresado en *E. coli*. Se construyó el gen sintético como sigue: se ensamblaron 32 oligonucleótidos en una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de etapa única. En una segunda PCR se amplificó el ensamblaje de longitud completa usando los cebadores de extremo y el producto de PCR resultante se clonó en plásmido intermedio pGEM-T. Tras corrección de errores puntuales introducidos durante la síntesis del gen, el gen sintético p51 se clonó en plásmido de expresión pET29a. Este plásmido recombinante se usó para transformar células B834 (DE3).

Características de la proteína recombinante

Secuencia de nucleótido de P51 RT

25
30
35
40
45
50
55
60

```
atgagtagtactgggtccgatctctccgatagaaacagtttcggtcaagcttaaaccagggatg 60
gatgggtccaaagggtcaagcagtgccgctaaccggaagagaagattaaggcgctcgtagag 120
atgtgtagtactgaaatggagaaggaaggcaagataagcaagatcgggccagagaaccggtac 180
aatacaccgggtatttgcaataaagaagaaggattcaacaaaatggcgaaagcttgtagat 240
tttagggaactaaacaagcgaacccaagacttttggggaagccaactaggtatcccacat 300
ccagccgggtctaaagaagaagaaatcgggtcacagtcctggatgtaggagacgcatat 360
agtgtaccgcttgatgaggacttccgaaagtatactgcggttactataccgagcataaac 420
aatgaaacgccaggcatctgctatcagtagaacgtgctcccgcagggctggaaggggtct 480

ccggcgatatttcagagctctatgacaaaaatacttgaaccattccgaaagcagaatccg 540
gatattgtaatttaccaatacatggacgatctctatgtgggctcggatctagaaatggg 600
cagcatcgcactaagattgaggaactgaggcaacatctgcttcgatggggcctcactact 660
cccgacaagaagcaccagaaggagccgcttccctaaagatgggctacgagcttcatccg 720
gacaagtggacagtagcagccgatagtgtgcccgaaaaggattcttggaccgtaaatagat 780
atcagaaaactagtcggcaagcttaactgggcctctcagatttaccaggcattaaggctc 840
cgacagctttgcaagctactgaggggaactaaggctctaaccagaggtcatcccat 900
gaggaagcagagcttgagctggcagagaatcgcgaaattcttaaggagccgggtgcacggg 960
gtatactacgacccctccaaggaccttatagccgagatccagaagcaggggagggccaa 1020
tggacgtaccagatatatcaagaaccgtttaagaatctgaagactgggaagtacgcgcgc 1080
atgagggggctcataactaatgatgtaagcaacttacggaagcagtagcaaaagattact 1140
actgagctctattgtgatatggggcaagaccccaaggttcaagctgcccatacagaaggaa 1200
acatgggaaacatgggtggactgaatattggcaagctacctggattccagaatgggaattt 1260
gtcaacacgccgcccgggtggtaaaactgagggcctgctaggttaa 1302
```

[Nº ID SEC:4]

65 Cajas: aminoácidos introducidos mediante construcción genética

ES 2 334 044 T3

Después de la congelación/descongelación de fracciones solubles (S1), preparadas en condiciones reductoras, así como en condiciones no reductoras, se recuperan aún el 99% de p51 y p66 en la fracción soluble (S2). Sólo se encuentra un 1% en el precipitado (P2). Esto se muestra en la figura 5.

5 Ejemplo 3

Construcción y expresión de p17-Nef y Nef-p17 con o sin conector

10 Se construyeron proteínas de fusión dobles con y sin conectores. Los conectores ayudaron a disminuir las interacciones potenciales entre los dos participantes de la fusión y son como siguen:



Construcción de plásmidos recombinantes

- 20 • *Vector de expresión pET29a/Nef-p17*

Se amplificó el gen de fusión Nef-p17 mediante PCR a partir del plásmido recombinante de F4. El producto de PCR se clonó en el vector de clonación pGEM-T intermedio y a continuación en el vector de expresión pET29a.

- 25 • *Vector de expresión pET28b/p17-Nef*

Se amplificó el gen de Nef mediante PCR a partir del plásmido recombinante de F4. Se clonó el producto de PCR en el vector de clonación pGEM-T intermedio y a continuación en el vector de expresión pET28b/p17, como un terminal C en la fusión de marco con el gen p17.

- 30 • *Vector de expresión pET29a/Nef-conector-p17 y pET28b/p17- conector-Nef*

Se insertó un fragmento de ADN de 18 bp que codifica para el conector hexapeptídico (GSGGGP) entre los participantes de la fusión Nef y p17, mediante mutagénesis dirigida al sitio (usando el “Sistema de mutagénesis dirigida al sitio GeneTailor”, Invitrogen).

Características de la proteína recombinante

- 40 • *Longitud, peso molecular, punto isoeléctrico (IP)*

Nef-p17 (denominado NP): 340 AA, PM: 38,5 kDa, IP:7,48

Nef-GSGGGP**-P17 (denominado NLP): 346 AA, PM:38,9 kDa, IP: 7,48**

p17-Nef (denominado PN): 342 AA, PM: 38,7 kDa, IP: 7,19

p17-GSGGGP**-Nef (denominado PLN): 348 AA, PM: 39,1k Da, IP: 7,19**

ES 2 334 044 T3

- *Secuencias de aminoácido y secuencias de polinucleótido*

Secuencia de nucleótido de Nef-p17

```

5      Atgggtggcaagtgggtcaaaaagtagtggttggatggcctactgtaagggaaagaatg      60
      Agacgagctgagccagcagcagatgggggtgggagcagcatctcgagacctggaaaaacat      120
      Ggagcaatcacaagtagcaatacagcagctaccaatgctgcttgctgctggaagca      180
10     Caagaggaggaggagggtgggttttccagtcacacctcaggtaccttaagaccaatgact      240
      Tacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaaggggggactggaagggtca      300
      Attcactccaacgaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctac      360
15     Ttccctgat tggcagaactacacaccagggccaggggtcagatatccactgacctttgga      420
      Tgggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagaggccaataaaggagag      480
      Aacaccagcttggttacacctgtgagcctgcatggaatggatgacctgagagagaagtg      540
      Ttagagtggagggttgacagccgectagcatttcatacagtgggccgagagctgcatccg      600
20     Gagtacttcaagaactgcaggcctatgggtgcgagagcgtcagattaaagcgggggagaa      660
      Ttagatcgatgggaaaaaatccggttaaggccagggggaaagaaaaaatataaattaaa      720
      Cata tagtatgggcaagcaggagctagaacgatccgcagttaatcctggcctgtagaa      780
25     Acatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaacctcccttcagacaggatca      840
      Gaagaacttagatcattatataatacagtagcaacctctattgtgtgcatcaaaggata      900
      Gagataaaagacaccaaggaagcttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaag      960
30     Aaaaaagcacagcaagcagcagctgacacaggacacagcaatcaggtcagccaaaattac      1020
      Taa                                                                    1023
  
```


[Nº ID SEC: 6]

35

Nef-p17 (NP)

```

      MGGKWSKSSVVGWPTVRRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAACAWLEA      60
35     QEEEEVGFPPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWYHTQGY      120
      PPDWQNYTPGGVRYPLTFGWICYKLVVPEPKVVEANKGENTSLHHPVSLHGMDPEREV      180

45     LEWRPDSRLAFHHVARELHPEYFKNCRPMGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLK      240
      HIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRI      300
      EIKDTKEALDKIEEQNKSKKKAQQAADTGHSNQVSQNY                          340
  
```

[Nº ID SEC:7]

Caja: aminoácidos introducidos mediante construcción genética.

55

60

65

ES 2 334 044 T3

La secuencia Nef está en negrita. Secuencia de nucleótidos de P17-Nef:

```

5      Atgggtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgatgggaaaaaatcgg      60
      Ttaaggccaggggaaagaaaaatataaattaaaacatatagtatgggcaagcaggag      120
      Ctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaata      180
      Ctgggacagctacaacccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataat      240
10     Acagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagct      300
      Ttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaaaaaagcacagcaagcagcagct      360
      Gacacaggacacagcaatcaggtcagccaaaattacctcgacaggcctatgggtggcaag      420
      Tggtcaaaaagtagtgtggttggatggcctactgtaagggaaagaatgagacgagctgag      480
15     Ccagcagcagatggggtgggagcagcatctcgagacctggaaaaacatggagcaatcaca      540
      Agtagcaatacagcagctaccaatgctgcttgtgcctggctagaagcacaaaggaggag      600
      Gagggtgggtttccagtcacacctcaggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagct      660
20     Gtagatcttagccactttttaaagaaaaggggggactggaagggttaattcactcccaa      720
      Cgaagacaagatcccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattgg      780
      Cagaactacacaccagggccaggggtcagatccactgaccttggatggtgctacaag      840
25     Ctagtaccagttgagccagataaaggtagaagaggccaataaaggagagaacaccagcttq      900
      Ttacacctgtgagcctgcatggaatggatgacctgagagagaagtgttagagtggagg      960
      Tttgacagccgcttagcatttcatcacgtggcccgagagctgcatccggagtagtccaag      1020
      Aactgctaa                                                                1029

```

30 [Nº ID SEC: 8]

35 *P17-Nef (PN)*

```

      MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQI      60
      LGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDRIBBEQNKSCKKAQAAA      120
40     DTGHSNQVSONYLDRPMGGKWSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAI      180
      SSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFVPTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQ      240
      RRQIDLWYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKLVPEPDKVEEANKGENTSL      300
45     LHPVSLHGMDPEREVLEWRFDLAFHHVARELHPEYFKNC                          342

```

[Nº ID SEC: 9]

50 Caja: aminoácidos introducidos mediante construcción genética.

55

60

65

ES 2 334 044 T3

La secuencia de p17 está en negrita. Secuencia de nucleótidos de Nef-conector-p17:

```

5      Atgggtggcaagtggcaaaaagtagtgtgggtgggatggcctactgtaagggaaagaatg      60
      Agacgagctgagccagcagcagatggggtgaggcagcatctcgagacctggaaaaacat      120
      Ggagcaatcacaagtagcaatacagcagctaccaatgctgcttgtgcctggctagaagca      180
      Caagaggaggaggaggtgggttttccagtcacacctcaggtaccttaagaccaatgact      240
10     Tacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaaggggggactggaagggtca      300
      Attcactcccaacgaagacaagatactcttgatctgtggatctaccacacacaaggctac      360
      Ttccctgattggcagaactacacaccaggggccaggggtcagatatccactgacctttgga      420
15     Tggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagaggccaataaaggagag      480
      Aacaccagcttgttacaccctgtgagcctgcatggaatggatgacctgagagagaagtg      540
      Ttagagtgagggttgacagccgcctagcatttcatcacgtggcccgagagctgcatccg      600
      Gagtacttcaagaactgcaggcctggatccggtggcggccctatgggtgagagagcgtca      660
20     Gtattaagcgggggagaattagatcgatgggaaaaaattcggtaaggccagggggaaag      720
      Aaaaaatataaattaaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagtt      780
      Aatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaacca      840
25     Tccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctat      900
      Tgtgtgcatcaaaggatagagataaaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaa      960
      Gagcaaaaacaaaagtaagaaaaaagcacagcaagcagcagctgacacaggacacagcaat      1020
      Caggtcagccaaaattactaa                                          1041
30     [Nº ID SEC:10]

```

Nef-conector-p17 (NPL)

```

35     MGGKWSKSSVVGWPTVRERMRRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAACAWLEA      60
      QEEEEVGFVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDLWIYHTQGY      120
      FPDWQNYTPGGVRYPLTFGWCYKLVPEPDKVEEANKGENTSLHHPVSLHGMDDPEREV      180
40     LEWRFDSRLAFHHVARELHPEYFKNRPGSGGGPMGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGK      240
      KKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLY      300
      CVHQRIEIKDTKEALDKIEEEQNKSKKKAQQAADTGHSNQVSQNY      346
45     [Nº ID SEC: 11]

```

Conector hexapeptídico

50 Caja: aminoácidos introducidos mediante construcción genética

Secuencia de nucleótido de P17-conector-Nef:

```

55     Atgggtgcgagagcgtcagtat taagcggggggagaattagatcgatgggaaaaaattcgg      60
      Ttaaggccagggggaaagaaaaatataaataaaaacataatagtatgggcaagcaggag      120
      Ctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaata      180
60     Ctgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataat      240
      Acagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaaagacaccaaggaagct      300

```

65

ES 2 334 044 T3

Ttagacaagatagaggaagagcaaaaacaaaagtaagaaaaaagcacagcaagcagcagct 360
 Gacacaggacacagcaatcaggtcagccaaaattacctcgacaggcctggatccggtggc 420
 Ggtcctatgggtggcaagtgggtcaaaaagtagtgtggttggatggcctactgtaagggaa 480
 5 Agaatgagacgagctgagccagcagcagatggggtgggagcagcatctcgagacctggaa 540
 Aaacatggagcaatcacaagtagcaatacagcagctaccaatgctgcttgtgcctggcta 600
 Gaagcacaagaggaggaggagggtgggttttccagtcacacctcaggtacctttaagacca 660
 10 Atgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaaagaaaaggggggactggaa 720
 Gggctaattcactcccaacgaagacaagatactctgatctgtggatctaccacacacaa 780
 Ggctacttccctgatggcagaactacacaccagggccaggggtcagatatccactgacc 840
 Tttggatggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagaggccaataaa 900
 15 Ggagagaacaccagcttgttacacctgtgagcctgcatggaatggatgacctgagaga 960
 Gaagtgttagagtggaggtttgacagccgcctagcatttcatcacgtggcccagagctg 1020
 Catccggagtacttcaagaactgctaa 1047
 20 [Nº ID SEC: 12]

P17-conector-Nef (PLN)

25 MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQI 60
 LGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEEQNKSKKKAQQAAA 120
 30 DTGHSNQVSQNYLDREPGSGGGPMGGKWSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLE 180
 KHGAITSSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFVPTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLE 240
 GLIHSQRRQDILDLDWIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWICYKLVPEPDKVEEANK 300
 GENTSLLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNC 348
 35 [Nº ID SEC:13]

Conector hexapeptídico

40 Caja: aminoácidos introducidos mediante construcción genética.

Expresión comparativa de Nef-p17, fusiones p17-Nef, con y sin conectores

45 Las cuatro cepas recombinantes se indujeron a 30°C durante 3 horas, en paralelo con cepas que producen F4 y Nef. Se prepararon extractos brutos y se analizaron mediante gel tintado con Coomassie y Transferencia westernting.

Análisis Transferencia western:

50 *Reactivos:* - anti RT policlonal de conejo (PO3L16 de conejo) (dilución: 1/10.000)
 - anticuerpo anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (dilución: 1/7500)

55 Como se ilustra en la figura 6, las fusiones Nef-p17 y p17-Nef, con y sin conector, se expresan a un alto nivel (10% de las proteínas totales).

60 En el Transferencia western: las cuatro construcciones de fusión dobles presentan un modelo multi-banda, pero menos complejo que el observado para F4. Cuando se expresan solas, las proteínas Nef y p17 presentan patrones de banda simples.

Se analizaron adicionalmente cepas que expresan fusiones Nef-p17 (NP) y p17-Nef (PN) sin péptido conector (ensayos de solubilidad, véase a continuación).

65

ES 2 334 044 T3

Ensayo de solubilidad de Nef-p17 y p17-Nef

Se indujeron proteínas Nef-p17 and p17-Nef en paralelo con cepas que producen F4 y Nef.

5 Condiciones de inducción: crecimiento/inducción de células a 30°C (+IPTG 1 mM), durante 3 horas.

Tampón de ruptura: Tris/HCl 50 mM pH: 8, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM

10 *Extractos celulares frescos*

Se prepararon extractos celulares (en condiciones no reductoras) y fracciones que corresponden a extractos brutos (T), agregado insoluble (P) y se analizaron los sobrenadantes (S1) en gel tintado con Coomassie y Transferencia western.

15 Como se ilustra en la figura 7 en gel tintado con Coomassie y Transferencia western, casi todas las Nef-p17, p17-Nef, así como también proteínas Nef se recuperan en la fracción soluble (S) de extractos celulares. Para la construcción F4: del 5 a 10% de proteína recombinante ya se recuperaba en la fracción de agregado.

20 *Conclusiones*

Todas las construcciones de fusión dobles ensayadas son altamente expresadas (> 10% de proteína total). Las proteínas de fusión P17-Nef y Nef-p17 son más solubles que F4. Ambas presentan un modelo de WB menos complejo.

25

Ejemplo 4

Construcción y expresión de p24-RT-Nef-p17 (F4*)*

30

F4* es una versión mutada de la fusión F4 (p24-RT/p66-Nef-p17) donde se sustituye la metionina en la posición 592 por una lisina. Esta metionina es un sitio de "inicio" transcripcional interno putativo, ya que soportó secuenciación del terminal N llevada a cabo en una muestra de eluido en Q-sepharosa del experimento de purificación de F4. Incluso, la banda pequeña relacionada con F4 principal a 62 kDa presente en la muestra eluída en Q comienza en la metionina 592.

35

La metionina se reemplaza por una lisina: RMR → RKR. El motivo RKR está presente de forma natural en secuencias de RT de clado A.

40 Se evaluó el impacto de esta mutación en epítomos CD4-CD8:

- se pierde un epítomo CTL de HLA-A3 (A* 3002), pero están presentes otros 9 epítomos HLA-A3 en la secuencia de RT.

45 - no se identificó epítomo de ayuda en esta región.

Características de proteína recombinante

50

Término N - p24: 232a.a. - bisagra:2a.a. - RT: 562a.a. - bisagra:2a.a. - Nef: 206a.a. -

55

- P17: 132a.a. - Término C

• Longitud, peso molecular, punto isoeléctrico (IP)

1136 AA, 129 kDa, IP: 8,07

60

• Secuencia de nucleótidos

65

**atgggtatcggtcagaacatccaggggcaaatgggtacatcaggccatatacctagaact
ttaaattgcatgggtaaaagtagtagaagagaaggctttcagcccagaagtaatacccatg
ttttcagcattatcagaaggagccaccccacaagatttaaaccatgctaaacacagtg**

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

gggggacatcaagcagccatgcaaatgtttaaagagaccatcaatgaggaagctgcagaa
tgggatagagtacatccagtgcagggcctattgcaccaggccagatgagagaacca
aggggaagtgcacatagcaggaactactagtacccttcaggaacaaataggatggatgaca
aataatccacctatcccagtaggagaaatttataaaagatggataatcctgggattaaat
aaaatagtaagaatgtatagccctaccagcattctggacataagacaaggaccaaagaa
ccttttagagactatgttagaccggttctataaaactctaagagccgagcaagcttcacag
gaggtaaaaaatggatgacagaaaccttggttggtccaaaatgcgaaccagattgtaag
actattttaaagcattgggaccagcggctacactagaagaaatgatgacagcattgtag
ggagttaggaggaccggccataaggcaagagttttgcatatggggcccattagccctat
tgagactgtgtcagtaaaattaaagccaggaatggatggcccaaaagttaaacaatggcc
attgacagaagaaaaataaaagcattagtagaaatttgtacagagatggaaaagggaagg
gaaaatttcaaaaatgggcctgaaaatccatacaatactccagatttgccataaagaa
aaaagacagtactaaatggagaaaattagtagatttcagagaacttaataagagaactca
agacttctgggaagttcaattaggaataccacatcccgcaggggttaaaaaagaaaaatc
agtaacagtactggatgtgggtgatgcatattttccagttcccttagatgaagacttcag
gaaatatactgcatttaccatacctagtataaacaatgagacaccagggattagatatca
gtacaatgtgcttccacagggatggaaaggatcaccagcaatattccaaagtagcatgac
aaaaatcttagagccttttagaaaacaaaatccagacatagttatctatcaatacatgga
tgatttgtatgtaggatctgacttagaaatagggcagcatagaacaaaaatagaggagct
gagacaacatctgttgaggtggggacttaccacaccagacaaaaaacatcagaaagaacc
tccattccttaaaatgggttatgaaactccatcctgataaatggacagtacagcctatagt
gctgccagaaaaagacagctggactgtcaatgacatacagaagttagtggggaaattgaa
ttgggcaagtcagatttaccagggattaaagtaaggcaattatgtaaactccttagagg
aaccaaagcactaacagaagtaataccactaacagaagaagcagagctagaactggcaga
aacagagagattctaaaagaaccagtagatggagtgattatgacctcaaaagactt
aatagcagaaatacagaagcaggggcaaggccaatggacatatcaaatttatcaagagcc
atftaaaaatctgaaaacaggaaaatatagcacgtaaacgcggtgcccacactaatgatgt
aaaacaattaacagaggcagtgcaaaaaataaccacagaaagcatagtaatatggggaaa
gactcctaaatttaaactgcccatacaaaaggaaacatgggaaacatgggtggacagagta
ttggcaagccacctggattcctgagtgggagtttggttaatacccctcctttagtgaatt
atggtagcagtttagagaaagaacctatagtaggagcagaaaccttctatgtatagatggggc
agctaacagggagactaaattaggaaaagcaggatagttactaatagaggaagacaaaa
agttgtcaccctaactgacacaacaaatcagaagactgagttacaagcaatttatctagc
tttgcaggattcgggattagaagtaaacatagtaacagactcacaatatgcattaggaat
cattcaagcacaaccagatcaaagtgaatcagagtttagtcaatcaataatagagcagtt
aataaaaaaggaaaaggctctatctggcatgggtaccagcacacaaaggaattggaggaaa
tgaacaagtagataaatagtcagtgctggaatcaggaaagtgctagctatgggtggca
agtggtcaaaaagt agtgggtggatggcctactgt aagggaaagaatgagacgagctg
agccagcagcagatgggggtgggagcagcatctcgagacctggaaaaacatggagcaatca
caagtagcaatacagcagctaccaatgctgcttgtgcctggctagaagcacaagaggagg
aggaggtgggttttccagtcacacctcaggtacctttaagaccaatgact
tacaaggcagctgtatagcttagccactttttaaagaaaaggggggactggaagggcta
attcactcccaacgaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctac

ES 2 334 044 T3

ttccctgattggcagaactacacaccagggccaggggtcagatatccactgacctttgga
tgggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaaggtagaagaggccaataaaggagag
aacaccagcttggttacaccctgtgagcctgcatggaatggatgaccctgagagagaagtg
ttagagtgagggtttgacagccgcctagcatttcacacgtggcccagagagctgcatccg
gagtactcaagaactgcagggcctatgggtgcgagagcgtcagtattaagcgggggaga
 attagatcgatgggaaaaaattcgggttaaggccagggggaaagaaaaataaattaaa
 acatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttaga
 aacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatc
 agaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggat
 agagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaa
 gaaaaaagcacagcaagcagcagctgacacaggacacagcaatcaggtcagccaaaatta
 ctaa

[Nº ID SEC: 14]

La secuencia de p24 está en negrita

La secuencia de Nef está subrayada

Cajas: nucleótidos introducidos mediante construcción genética

• *Secuencia de aminoácidos*

MVIVQNIQGQMVHQAISPRTLNAWVKVVEEKAFSPPEVIMFSA**LSEGATP** 50
QDLNTMLNTVGGHQAAMQ**MLKET**INEEAAEWDRVHPVHAGPIAPG**QMR**EP 100
RGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTS 150
ILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQ**AN**PDCK 200
TILKALGPAATLEMMTACQGVGGPGHKARVLMGPISPIETVSVKLKPG 250
MDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKK 300
KDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKSVTVLDVGDAY 350
FSVPLDEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMT 400
KILEPFRKQNPDIVIYQYMDLLYVGS**DLEIGQ**HRTKIEELRQHLLRWGLT 450
TPDKKHQKEPPFLMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSWTVNDIQKLVGKLN 500
WASQIYPGIKVRQLCKLLRGTKALTEV**IP**LTEEA**ELE**LAENREILKEPVH 550
GVYYDPSKDLIAEIQKQQGWTYQIYQEPFKNLKTGKYAR**RG**GAHTNDV 600
KQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKF**KLP**IQKETWETWWTEYWQATWIP**EWE** 650
FVNTPPPLV**KLWYQ**LEKEPIVGAETFYVDGAANRET**KL**GKAGYVTNRGRQK 700
VVTLTDTTNQKTELQAIYLALQDSGLEVNIVTDSQYALGI**IQ**AQPDQSES 750
ELVNQIIEQLIKKEKVYLAWVPAHKGIGGNEQVDKLV**SAGIRKVL**AMGGK 800
WSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHG**AIT**SSNTAAT**NAA** 850
CAWLEAQEEEEVGFVTPQVPLRPM**TYK**AAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQ 900
RRQDILD**LW**IYHTQGYFPDWQNYTPGGVRYPLTFGW**CYK**LVPVEPD**KVE** 950
EANKGENTSLLHPVSLHGMDDPEREVLEWR**FDS**R**LAF**HHVARELHPEYFK 1000

ES 2 334 044 T3

NCRPIMGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAV 1050
NPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKD 1100
5 TKEALDKIEEEQNKSKKKAQQAAADTGHNSQVSNY 1136

[Nº ID SEC: 15]

Secuencia de P24: aminoácidos 1-232 (en negrita)

10 Secuencia de RT: aminoácidos 235-795

Secuencia de Nef: aminoácidos 798-1002

Secuencia de P17: aminoácidos 1005-1136

15 Cajas: aminoácidos introducidos mediante construcción genética

K (Lisina): en lugar de metionina (codón "de comienzo" interno)

20 K (Lisina): en lugar de triptófano (W). Mutación introducida para eliminar la actividad del enzima.

Expresión de F4 en células B834(DE3)*

25 Se indujo cepa recombinante F4* a 22°C durante 18 horas, en paralelo con la construcción no mutada F4. Se prepararon extractos brutos y se analizaron mediante gel tintado con Coomassie y Transferencia westernting.

Como se ilustra en la figura 8, se expresó F4* en un alto nivel (10% de proteína total), ligeramente mayor en comparación con F4 y desapareció la banda a 62 kDa pequeña.

Análisis Transferencia western:

30 *Reactivos:* - anti p24 pool 3 Mabs (JC13.1, JC16.1, IG8.1.1)(dilución 1/5000)
- anti RT policlonal de conejo (O3L16 de conejo) (dilución: 1/10 000)
35 - anti Nef-Tat policlonal de conejo (388 de conejo) (dilución: 1/10 000)
- anticuerpo anticonejo conjugado con fosfatasa alcalina (dilución: 1/7500)
- anticuerpo antiratón conjugado con fosfatasa alcalina (dilución: 1/7500)

Ejemplo 5

Construcción y expresión de F3 y F3 (F3 mutado)*

45 F3 (p17-p51-Nef) y F3* (p17-p51*-Nef) en las que el sitio de iniciación de metionina interno putativo es reemplazado por lisina.

Se podrían usar las fusiones F3 y F3* en combinación con p24.

Construcción de plásmidos recombinantes

50 F3: Se excitó la secuencia que codifica p51 (como fragmento de ADN ScaI y StuI) a partir de plásmido de expresión pET29a/p51 y se ligó en plásmido pET28b/p17-Nef, en el sitio StuI (localizado entre p17 y el gen de Nef), como una fusión en marco con secuencias de p17 y Nef. La construcción de fusión resultante p17-p51-Nef se denomina F3.

55 F3*: Se consiguió mutación del sitio de iniciación de metionina interno putativo usando el "sistema de mutagénesis dirigida al sitio Gene Tailor" (Invitrogen), generando la construcción F3*.

Se usaron plásmidos F3 y F3* para transformar células B834 (DE3).

Características de proteína recombinante

60 **Término N** **p17: 134a.a.** - **bisagra:2a.a.** - **p51/p51*: 426a.a.** - **bisagra:2a.a.** -
Nef: 206a.a. **Término C**

65 • *Longitud, peso molecular, punto isoeléctrico (IP)*

770 AA, 88.5 kDa, IP:8,58

ES 2 334 044 T3

• *Secuencia de nucleótidos (para F3*)*

	atgggtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgatgggaaaaaattcgg	60
5	ttaaggccagggggaaagaaaaaatataaattaaaacatatagtatgggcaagcagggag	120
	ctagaacgattcgcagttaatcctggcctgtagaacaatcagaaggctgtagacaaata	180
	ctgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataat	240
10	acagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagct	300
	ttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaaaaagcacagcaagcagcagct	360
	gacacaggacacagcaatcaggtcagccaaaattacctcgacaggactGGTCCGATCTCT	420
	CCGATAGAAACAGTTTCGGTCAAGCTTAAACCAGGGATGGATGGTCCAAAGGTCAAGCAG	480
15	TGGCCGCTAACGGAAGAGAAGATTAAGGCGCTCGTAGAGATTTGTAAGTAAATGGAGAAG	540
	GAAGGCAAGATAAGCAAGATCGGGCCAGAGAACCCTACAATACACCGGTATTTGCAATA	600
	AAGAAGAAGGATTCAACAAAATGGCGAAAGCTTGTAGATTTTAGGGAACTAAACAAGCGA	660
20	ACCCAAGACTTTTGGGAAGTCCAAGTCCACTAGGTATCCACATCCAGCCGGTCTAAAGAAGAAG	720
	AAATCGGTACAGTCTGGATGTAGGAGACGCATATTTTAGTGTACCGCTTGATGAGGAC	780
	TTCCGAAAGTATACTGCGTTTACTATAACCGAGCATAAACAATGAAACGCCAGGCATTCGC	840
	TATCAGTACAACGTGCTCCCGCAGGGCTGGAAGGGGTCTCCGGCGATATTTAGAGCTCT	900
25	ATGACAAAAATACTTGAACCATTCGAAAGCAGAATCCGGATATTGTAATTTACCAATAC	960
	ATGGACGATCTCTATGTGGGCTCGGATCTAGAAATTTGGGCAGCATCGCACTAAGATTGAG	1020
	GAACTGAGGCAACATCTGCTTCGATGGGGCCTCACTACTCCCGACAAGAAGCACCAGAAG	1080
30	GAGCCGCCGTTCTTAAAGATGGGCTACGAGCTTCATCCGGACAAGTGGACAGTACAGCCG	1140
	ATAGTGCTGCCCGAAAAGGATTCCTGGACCGTAAATGATATTCAGAACTAGTCGGCAAG	1200
	CTTAACTGGGCCTCTCAGATTTACCCAGGCATTAAGGTCCGACAGCTTTGCAAGCTACTG	1260
	AGGGGAACTAAGGCTCTAACAGAGGTATCCCATTAACGGAGGAAGCAGAGCTTGAGCTG	1320
35	GCAGAGAATCGCGAAATTCCTAAGGAGCCGGTGCACAGGGTATACTACGACCCCTCCAAG	1380
	GACCTTATAGCCGAGATCCAGAAGCAGGGGCAGGGCCAATGGACGTACCAGATATATCAA	1440
	GAACCGTTTAAAGATCTGAAGACTGGGAAGTACGCGCGCAAACGAGGGGCTCATACTAAT	1500
40	GATGTAAAGCAACTTACGGAAGCAGTACAAAAGATTACTACTGAGTCTATTGTGATATGG	1560
	GGCAAGACCCCAAAGTTCAAGCTGCCCATACAGAAGGAAACATGGGAAACATGGTGGACT	1620
	GAATATTGGCAAGCTACCTGGATTCCAGAATGGGAATTTGTCAACACGCCCGCTGGTA	1680
	AAACTGaggcctATGgggtggcaagtggcaaaaagtagtgggttggatggcctactgta	1740
45	agggaaagaatgagacgagctgagccagcagcagatggggtgggagcagcatctcgagac	1800
	ctggaaaaacatggagcaatcacaagtagcaatacagcagctaccaatgctgcttgtgcc	1860
	tggctagaagcacaagaggaggagggtgggttttccagtcacacctcaggtaccttta	1920
50	agaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaagggggga	1980
	ctggaagggtcaattcactcccaacgaagacaagatatccttgatctgtggatctaccac	2040
	acacaaggctacttccctgattggcagaactacacaccagggccaggggtcagatatcca	2100
	ctgaccttggatggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagaggcc	2160
55	aataaaggagagaacaccagcttgttacacctgtgagcctgcatggaatggatgacct	2220
	gagagagaagtgttagagtggaggtttgacagccgcttagcatttcatcacgtggcccca	2280
	gagctgcatccggagtacttcaagaactgctaa	2213

60 [Nº ID SEC:16]

P17: secuencia en negrita

P51: secuencia en letras mayúsculas

65

Nef: secuencia en letras minúsculas

Cajas: nucleótidos introducidos mediante construcción genética

ES 2 334 044 T3

• Secuencia de aminoácidos (para F3)

5 **MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCROI** 60
LGQLQPSLQGTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTRKALDKIEBEQNKSKKKAQAAA 120
DTGHSNQVSNYLDRTGPISPIETVSVKLPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEK 180
 EGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKK 240
 10 KSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAFTIP SINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSS 300
 MTKILEPFRKQNPDI VI YQYMDLDLYVGS DLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGLTTPDKKHQK 360
 EPPFLMGMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPGIKVRQLCKLL 420
 15 RGTKALTEVIPLTEEALELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGQGWTYQIYQ 480
 EPFKNLKTGKYARMRGAHTNDVKQLTEAVQKITTESI VIWGT PKFKLPIQKETWETWWT 540
 EYWQATWIPEWEFVNT PPLVKLRMGGKWSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRD 600
 20 LEKHGAITSSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGG 660
 LEGLIHSQRRQDILD LWIYHTQGYFPDQWNYTPGPGVRYPLTFGWICYKLVPEPDKVEEA 720
 NKGENTSLLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNC 770

[N° ID SEC: 17]

Secuencia de P17: aminoácidos 1-134 (en negrita)

Secuencia de P51: aminoácidos 137-562

Secuencia de Nef: aminoácidos 565-770

Cajas: aminoácidos introducidos mediante construcción genética

Metionina 494 reemplazada por lisina (K) en construcción F3*

K(Lisina): en lugar de triptófano (W). Mutación introducida para eliminar la actividad del enzima.

Expresión de F3 en células B834(DE3)

Se evaluaron el nivel de expresión de F3 y las solubilidades de proteína recombinante en paralelo con cepas de producción de (p24-p66-Nef-p17) de F4 y p17-Nef (F2).

Condiciones de inducción: crecimiento de células a 37°C/inducidas a 30°C (+IPTG 1 mM), durante 3 horas.

Tampones de ruptura:

F4: Tris/HCl 50 mM pH:8,0, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, +/- DTT 1 mM

F2: Tris/HCl 50 mM pH:8,0, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, sin DTT

F3: Tris/HCl 50 mM pH:7,5, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, +/- DTT 1 mM

Análisis Transferencia western:

reactivos

- anti RT policlonal de conejo (PO3L16 de conejo) (dilución: 1/10 000)

- anti Nef-Tat policlonal de conejo (388 de conejo) (dilución 1/10 000)

- anticuerpo anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (dilución: 1/7500)

Extractos celulares "frescos"

Se analizaron las fracciones celulares correspondientes a extractos brutos (T), agregados insolubles (P) y sobrenadante (S) en SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras. Como se ilustra en la figura 9, la proteína de fusión F3 se expresa en un alto nivel (10% de proteína total). Casi toda la F3 se recupera en la fracción soluble (S) de extractos celulares, aunque de 5 a 10% de producto F4 está ya asociado con la fracción de agregado. El modelo de WB es simplificado en comparación con F4.

ES 2 334 044 T3

Expresión de F3* en células B834(DE3)

Se indujo la cepa recombinante F3* a 37°C durante 3 horas, construída en paralelo con F3 no mutada. Se prepararon los extractos celulares brutos y se analizaron mediante gel tintado con Coomassie y Transferencia westernting. Como se ilustra en la figura 10, se expresa la proteína de fusión F3* en un nivel muy alto (de 10 a 20% de proteína total). Hubo un modelo de WB simplificado en comparación con F3; había desaparecido una banda muy decaída a +/- 32 kDa (detectado sólo por WB).

10 Ejemplo 6

Construcción y expresión de F4(p51) y F4(p51)*

Se usó RT/p51 en la construcción de fusión F4 (en lugar de RT/p66).

$$F4(p51) = p24-p51-Nef-p17$$

F4(p51)* = p24-p51*-Nef-p17 - F4(p51) mutado: sitio de iniciación de metionina interno putativo (presente en la parte de RT) reemplazado por lisina, para simplificar adicionalmente el modelo del antígeno.

Construcción de plásmidos recombinantes:

F4(p51): Se amplificó la secuencia que codifica p51 mediante PCR a partir del plásmido de expresión pET29a/p51. Se incorporaron sitios de restricción dentro de los cebadores de PCR (NdeI y StuI en el extremo 5'. AvrII en el extremo 3' de la secuencia de codificación). Se clonó el producto de PCR en plásmido intermedio pGem-T y se secuenció. Se restringió el plásmido intermedio pGem-T/p51 mediante NdeI y AvrII y se ligó el fragmento p51 en el plásmido de expresión pET28b/p24-RT/p66-Nef-p17 restringido por NdeI y NheI (dando lugar a la escisión de la secuencia de RT/p66). La ligadura se llevó a cabo mediante combinación de reacciones de digestión a concentraciones apropiadas, en presencia de ligasa de ADN de T4. Se usó el producto de ligadura para transformar las células DH5 α de *E. coli*. Se confirmó la verificación de la inserción de p51 dentro del marco de lectura translacional correcto (en lugar de RT/p66 en la fusión f4) mediante secuenciación de ADN. La construcción de fusión resultante p24-RT/p51-Nef-p17 se denominó F4(p51).

F4(p51)*: Se consiguió la mutación del sitio de iniciación de la metionina interno putativo (presente en RT/p51) con "sistema de mutagénesis dirigido al sitio GeneTailor" (Invitrogen), generando la construcción F4(p51)*.

Se usaron plásmidos de expresión F4(p51) y F4(p51)* para transformar las células B834(DE3).

Características de proteínas recombinantes

Término N p24: 232a.a. - bisagra:4a.a. - p51/51*: 426a.a. - bisabra:3a.a. - Nef: 206a.a. -

bisagra:2a.a. - p17: 132a.a. - Término

C

- Longitud, peso molecular, punto isoeléctrico (IP)

1005 AA, 114.5 kDa, IP: 8,47

- Secuencia de nucleótidos (para F4(p51)*)

```
Atggttatcgtgcagaacatccaggggcaaatggtacatcaggccatcacctagaact 60
Ttaaatgcatgggtaaaagtagtagagaaggctttcagcccagaagtaataccatg 120
Ttttcagcattatcagaaggagccaccccacaagatttaaacaccatgctaaacacagt 180
Gggggacatcaagcagccatgcaaatgttaaaagagaccatcaatgaggaagctgcagaa 240
Tgggatagagtacatccagtgcagggcctattgcaccaggccagatgagagaacca 300
Aggggaagtgcacatagcaggaactactagtacccttcaggaacaaataggatggatgaca 360
Aataatccacctatcccagtaggagaaatttataaaagatggataatcctgggattaaat 420
```

ES 2 334 044 T3

Aaaatagtaagaatgtatagccctaccagcattctggacataagacaaggaccaaagaa 480
 Ccttttagagactatgtagaccggttctataaaactcctaagagccgagcaagcttcacag 540
 Gaggtaaaaaattggatgacagaaacctgttgggtccaaaatgcaaccagattgtaag 600
 Actattttaaaagcattgggaccagcggctacactagaagaaatgatgacagcatgtcag 660
 5 GgagtaggaggaccggccataaggcaagagttttgCATATGaggccGGTCCGATCTCT 720
 CCGATAGAAACAGTTTCGGTCAAGCTTAAACCAGGGATGGATGGTCCAAAGGTCAAGCAG 780
 TGGCCGCTAACGGAAGAGAAGATTAAGGCGCTCGTAGAGATTTGTACTGAAATGGAGAAG 840
 10 GAAGGCAAGATAAGCAAGATCGGGCCAGAGAACCCGTACAATACACCGGTATTTGCAATA 900
 AAGAAGAAGGATTCAACAAAATGGCGAAAGCTTGTAGATTTTAGGGAACAAACAAGCGA 960
 ACCCAAGACTTTTGGGAAGTCCAACCTAGGTATCCACATCCAGCCGGTCTAAAGAAGAAG 1020
 AAATCGGTACAGTCTTGGATGTAGGAGACGCATATTTTAGTGTACCGCTTGATGAGGAC 1080
 15 TTCCGAAAGTATACTGCGTTTACTATACCGAGCATAAACAATGAAACGCCAGGCATTTCGC 1140
 TATCAGTACAACGTGCTCCCGCAGGGCTGGAAGGGGTCTCCGGCGATATTTAGAGCTCT 1200
 ATGACAAAATACTTGAACCATCCGAAAGCAGAATCCGGATATTGTAATTTACCAATAC 1260
 ATGGACGATCTCTATGTGGGCTCGGATCTAGAAATTTGGGCAGCATCGCACTAAGATTGAG 1320
 20 GAACTGAGGCAACATCTGCTTCGATGGGGCCTCACTACTCCCGACAAGAAGCACCAGAAG 1380
 GAGCCCGCTTCCCTAAAGATGGGCTACGAGCTTCATCCGGACAAGTGGACAGTACAGCCG 1440
 ATAGTGCTGCCCGAAAAGGATTCTTGACCGTAAATGATATTCAGAACTAGTCGGCAAG 1500
 CTTAACTGGGCCTCTCAGATTTACCCAGGCATTAAGGTCCGACAGCTTTGCAAGCTACTG 1560
 25 AGGGGAACTAAGGCTCTAACAGAGGTATCCCATTAACGGAGGAAGCAGAGCTTGAGCTG 1620
 GCAGAGAATCGCGAAATCTTAAGGAGCCGGTGCACAGGGTATACTACGACCCCTCCAAG 1680
 GACCTTATAGCCGAGATCCAGAAGCAGGGGCAGGGCCAATGGACGTACCAGATATATCAA 1740
 GAACCGTTTAAGAATCTGAAGACTGGGAAGTACGCGCGCAAACGAGGGGCTCATACTAAT 1800
 30 GATGTAAAGCAACTTACGGAAGCAGTACAAAAGATTACTACTGAGTCTATTGTGATATGG 1860
 GGCAAGACCCCAAAGTTCAAGCTGCCATACAGAAGGAAACATGGGAAACATGGTGGACT 1920
 GAATATTGGCAAGCTACCTGGATTCCAGAATGGGAATTTGTCAACACGCCGCCGCTGGTA 1980
 35 AAATGgcccctaGCTATGggtggcaagtgggtcaaaaagttagtgggtggatggcctact 2040
 Gtaagggaaagaatgagacgagctgagccagcagcagatgggggtgggagcagcatctcga 2100
 Gacctggaaaaacatggagcaatcacaagtagcaatacagcagctaccaatgctgcttgt 2160
 Gcctggctagaagcacaagaggaggagggtgggtttccagtcacacctcaggtacct 2220
 40 Ttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaagggg 2280
 Ggactggaagggctaattcactcccaacgaagacaagatatccttgatctgtggatctac 2340
 Cacacacaaggctacttcctgatggcagaactacacaccagggccaggggtcagatat 2400
 Ccactgacctttggatgggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagag 2460
 45 Gccaataaaggagagaacaccagcttgttacaccctgtgagcctgcatggaatggatgac 2520
 Cctgagagagaagtgttagagtggaggttgacagccgcttagcatttcatcacgtggcc 2580
 CgagagctgcatccggagtacttcaagaactgcAGGCCTATGGGTGCGAGAGCGTCAGTA 2640
 TTAAGCGGGGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGAAAGAAA 2700
 50 AAATATAAATTA AACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTGCGAGTTAAT 2760
 CCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCC 2820
 CTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCCTCTATTGT 2880
 GTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAG 2940
 55 CAAAACAAAAGTAAGAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGCAATCAG 3000
 GTCAGCCAAAATTACTaa 3018

[N° ID SEC: 18]

P24: secuencia en negrita

P51: secuencia en letras mayúsculas

Nef: secuencia en letras minúsculas

P17: secuencia subrayada

Cajas: nucleótidos introducidos mediante construcción genética

ES 2 334 044 T3

• *Secuencia de aminoácidos (para F4(p51)*)*

```

5  MVI VQNI QGQMVHQA I SPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVI PMFSALSEGATPQDLNTMLNTV 60
GGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMT 120
NNPPI PVGEI YKRWI ILGLNKI VRMYSPTS I LDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQ 180
EVKNWMTETLLVQANANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLIHMREPGPIS 240
10 PIETVSVKCLKPGMDGPKVKQWPLTEEKI KALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAI 300
KKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGI PHPAGLKKKKSVTVLVDVGDAYFSVPLDED 360
FRKYTAFTI PSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGS PAIFQSSMTKILEPFRKQNPDI VI YQY 420
15 MDDL YVGS DLEIGQHRTKI EELRQHLLRWGLTTPDKKHQKEPPFLIMGYELHPDKWTVQP 480
IVLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQI YPGI KVRQLCKLLRGTKALTEVI PLTEEALEL 540
AENREILKEPVHGVVYDPSKDLIAEIQKQGQGWTYQI YQEPFKNLKTGKYARKKRGHTN 600
20 DVKQLTEAVQKITTES I VINGKTPKFKLPIQKETWETWWTEYQATWI PEWEFVNT PPLV 660
KLALAMGGKWSKSSVVGWPTVRERMRRRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAAC 720
AWLEAQEEEEVGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWIIY 780
25 HTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKLVPEPDKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDD 840
PEREVLEWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNCRFMGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKK 900
KYKCLKHIVASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQGTGSEELRSLYNTVATLYC 960
30 VHQRIEIKDTKEALDKIEEQNKSKKKAQQAADTGHSNQVSQNY 1005

```

[Nº ID SEC:19]

P24: aminoácidos 1-232

P51: aminoácidos 237-662

Nef: aminoácidos 666-871

P17: aminoácidos 874-1005

K (Lisina): en lugar de metionina (codón "de comienzo" interno)

K (Lisina) **K**: en lugar de triptófano (W). Mutación introducida para eliminar la actividad del enzima.

Expresión de F4(p51) en células B834(DE3)

Se evaluaron el nivel de expresión de F4(p51) y la solubilidad de la proteína recombinante en paralelo con la cepa que expresa F4.

Condiciones de inducción: crecimiento de células a 37°C/inducido a 22°C (+IPTG 1 mM), durante 19 horas.

Tampón de ruptura: Tris/HCl 50 mM pH:7,5, EDTA 1 mM, DTT 1 mM

Análisis Transferencia western:

reactivos

- anti RT policlona de conejo (PO3L16 de conejo) (dilución: 1/10 000)

- anti Nef-Tat policlona de conejo (388 de conejo) (dilución 1/10 000)

- anticuerpo anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (dilución: 1/7500)

Se analizaron fracciones celulares correspondientes a extractos brutos (T), agregado insoluble (P) y sobrenadante (S) en SDS-PAGE en condiciones de reducción del 10%.

ES 2 334 044 T3

Como se ilustra en la figura 11, se expresa F4(p51) a un alto nivel (10% de proteína total), similar a F4. Casi toda la F4(p51) se recupera en la fracción soluble (S) de extractos celulares. Tras detección con un reactivo anti-Nef-tat reagent, el modelo de WB para F4(p51) mostró ser simplificado (reducción de productos truncados por debajo de +/- 60 kDa).

5 *Expresión de F4(p51)* en células B834(DE3)*

Se indujo la cepa recombinante F4(p51)* a 22°C durante 18 horas, en paralelo con la construcción no mutada F4(p51), F4 y F4*. Se prepararon extractos celulares brutos y se analizaron mediante gel tintado con Coomassie y Transferencia westernting. Como se ilustra en la figura 12 se observó alta expresión de fusiones F4(p51) y F4(p51)*, representando al menos el 10% de la proteína total. Patrón de WB: reducción de productos truncados por debajo de +/- 60 kDa. Además, para la construcción F4(p51)*, ha desaparecido la banda de 47 kDa (debido al sitio de inicio interno).

15 Ejemplo 7

Purificación de F4, F4(p51) y F4* - Procedimiento de purificación I*

20 La proteína de fusión F4, que comprende los 4 antígenos de VIH-1 p24-RT-Nef-p17, se purificó a partir de homogeneizado de células de *E. coli* de acuerdo con el procedimiento de purificación I, que comprende las siguientes etapas principales:

- 25 ■ Precipitación de F4 con sulfato de amonio
- Cromatografía de intercambio de cationes en SO3 Fractogel (modo positivo)
- Cromatografía de interacción hidrófoba en octil-Sepharosa (modo positivo)
- 30 ■ Cromatografía de intercambio aniónico en Q-sepharosa FF (modo positivo)
- Cromatografía de filtración en gel Superdex 200 en presencia de SDS
- 35 ■ Diálisis y concentración

De forma adicional, se purificaron la proteína de fusión F4(p51)* (RT reemplazada por p51 optimizado con codón que porta una mutación adicional Met592Lys) y la proteína F4* (F4 que porta una mutación Met592Lys adicional) usando el mismo procedimiento de purificación I.

40 *Cuantificación de la proteína*

- 45 ■ Se determinó la proteína total usando el ensayo de Lowry. Antes de la medida de la concentración de proteína se dializan todas las muestras durante la noche frente a PBS, se usó SDS al 0,1% para eliminar las sustancias que interfieren (urea, DTT). Se usó BSA (Pierce) como patrón.

SDS-PAGE y transferencia western

- 50 ■ Se prepararon muestras en tampón de muestra para SDS-PAGE en condiciones no reductoras (+/- β -mercaptoetanol) y se calentó durante 5 minutos a 95°C.
- 55 ■ Se separaron las proteínas en geles SDS-poliacrilamida de 4 a 20% a 200 V durante 75 minutos usando geles de Tris-glicina de Novex pre-fundidos o geles Criterion (Bio-Rad), de un 1 mm de grosor.
- Se visualizaron las proteínas con azul de Coomassie R250.
- Para las transferencias western (WB), se transfirieron las proteínas desde el gel SDS a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) a 4°C durante 1,5 horas a 100 V o durante la noche a 30 V.
- 60 ■ Se detectó F4 usando anticuerpos monoclonales contra los distintos antígenos, anti-p24, anti-Nef-Tat, anti-RT (a veces se usó una mezcla de anti-p24 y anti Nef-Tat para detectar un número máximo de bandas de proteína).
- 65 ■ Se unieron anticuerpos anti-ratón o anti-conejo conjugados con fosfatasa alcalina a los anticuerpos primarios y se visualizaron bandas de proteínas usando BCIP y NBT como los sustratos.

ES 2 334 044 T3

Transferencia western de anti-E. coli

- Se separaron 5 µg de proteína (Lowry) mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa como anteriormente.
- Se detectaron proteínas de célula huésped residuales usando anticuerpos de anti *-E. coli* policlonales. Se visualizaron bandas de proteína con la reacción de fosfatasa alcalina como anteriormente.

10 *Procedimiento de purificación I*

El procedimiento I comprende una precipitación con sulfato de amonio y cuatro etapas cromatográficas:

- Se homogeneizaron células de *E. coli* en tampón Tris 50 mM a pH 8,0 en presencia de DTT 10 mM, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM a una densidad óptica a 50 (~360 ml). Se aplicaron 2 pasadas Rannie a 1000 bar.
- Se eliminaron mediante centrifugación a 14400 x g durante 20 minutos células detriticas y el material insoluble.
- Se añadió sulfato de amonio (AS) desde una solución stock 3,8M al sobrenadante clarificado hasta una concentración final de 1,2M. Se precipitaron proteínas durante ~2 horas a temperatura ambiente (RT) y luego se agregan mediante centrifugación (10 minutos a 14400 x g). Se resuspendió el agregado en urea 8M, DTT 10 mM en tampón fosfato 10 mM a pH 7,0.
- Se capturó el antígeno en una columna de SO3 Fractogel (Merck) en presencia de urea 8M y DTT 10 mM a pH 7,0 en tampón fosfato. Se lavó la columna para eluir la proteína no unida seguido de una etapa de pre-elución con NaCl 170 mM para eliminar las proteínas de célula huésped unidas (HCP). Se eluyó luego F4 con NaCl 460 mM, urea 8M, DTT 10 mM en tampón fosfato a pH 7,0.
- El eluido en SO3 se diluyó dos veces con tampón fosfato 10 mM, pH 7, y se cargó en una columna de octil-Sepharosa (Amersham Biosciences) en presencia de urea 4 M, DTT 1 mM, NaCl 230 mM en tampón fosfato a pH 7,0. Tras una etapa de lavado (tampón de equilibrado) se eluyó F4 unido con urea 8 M, DTT 1 mM en tampón Tris 25 mM a pH 8,0.
- Se diluyó el eluido en octilo y se ajustó a pH 9,0 y se unió luego F4 a una columna de Q-sepharosa (Amersham Bioscience) en presencia de urea 8M a pH 9,0 (Tris 25 mM). Se lavó por arrastre la proteína no unida (urea 8M, Tris 25 mM a pH 9,0) y una etapa de pre-elución (NaCl 90 mM en urea 8M, Tris 25 mM, pH 9,0) eliminó las HCP y los productos de degradación de F4. Se desorbió F4 de la columna con NaCl 200 mM, urea 8M en tampón Tris a pH 9,0.
- Se salpicó una alícuota de eluido en Q con SDS al 1% y se dializó frente a tampón PBS que contiene SDS al 0,1% y DTT 1 mM para eliminar la urea antes de inyectar la muestra en la columna de filtración en gel (Superdex 200 de calidad para preparación, dos columnas de 16 x 60 cm conectadas en serie). Se reunieron las fracciones relevantes tras análisis SDS-PAGE en proceso.
- Se dializaron las muestras dos veces a temperatura ambiente en membranas de diálisis (corte a 12-14 kDa) durante la noche frente a 1 l de arginina 0,5M, Tris 10 mM, glutatona 5 mM, pH 8,5.

Las etapas de purificación secuenciales se muestran en el flujograma siguiente.

(Esquema pasa a página siguiente)

ES 2 334 044 T3



cromatografía de filtración en gel Superdex 200 16 × 120 cm

TBS, SDS al 0,1%, pH 8,5



IPA SDS-PAGE



reunión/concentración/diálisis

→ tampón compatible con la formulación

IPA – Análisis en-proceso

Todos los tampones contienen DTT 1 mM si no es especifica de otra forma.

Resultados de la purificación de F4

Seguimiento de SDS-PAGE/Transferencia western del procedimiento de purificación

La figura 13 muestra el gel SDS y la transferencia western de anti-p24/anti-Nef-Tat de las fracciones que contienen F4 recogidas durante la purificación de F4.

El homogeneizado de *E. coli* se muestra en la figura 3, carril 2, estimando que F4 representa aproximadamente el 10% de las proteínas totales (barridos de densidad de geles SDS tintados con azul de Coomassie). Tras centrifugación se recuperó la fracción soluble de F4 en el sobrenadante clarificado (carril 3). La etapa de precipitación con sulfato de amonio eliminó muchas impurezas (carril 4) y redujo la carga proteica para la etapa cromatográfica subsiguiente. De forma adicional, se usó urea 8M para resuspender los complejos disociados precipitados de F4 con HCP y permitió tanto la captura completa de F4 como la elución cuantitativa desde la resina SO3. El eluido en SO3 mostrado en la carril 5 estaba enriquecido considerablemente en F4 pero el modelo heterogéneo permaneció principalmente invariable. La columna de octil-Sepharosa hidrófoba eliminó principalmente las HCP de bajo peso molecular (LMW) y los productos de degradación de F4 (carril 6), con lo que se simplifica el modelo de F4. La cromatografía en Q-sepharosa simplificó adicionalmente el modelo de F4 y eliminó muchas impurezas (carril 7). Se obtuvo pureza final en términos de *E. coli* tras esta etapa. De hecho, no se detectaron proteínas de célula huésped en el eluido en Q mediante análisis transferencia western de anti-*E. coli*. La F4 purificada producida de esta forma se designó como F4Q. La columna de Superdex 200 separó los productos de degradación de F4 de bajo peso molecular (LMW) del F4 de longitud completa mejorando la homogeneidad de F4 en el eluido de Superdex 200 (carril 8). El término F4S se puede usar para designar a F4 purificada de acuerdo con el esquema completo del procedimiento I.

Se realizó una transferencia western de anti-*E. coli* de las mismas fracciones recogidas durante la purificación de F4. La ausencia de bandas visibles en la transferencia western de anti-*E. coli* indicó contaminación por HCP por debajo del 1% en el eluido en Q y en el eluido en Superdex.

Recuperación de F4 y proteína

La recuperación de F4 en cada etapa del procedimiento de purificación se estimó a partir de análisis por SDS-PAGE y transferencia western. Para estimar la recuperación de F4 en geles SDS, los volúmenes de muestra cargados en los geles SDS correspondían a los volúmenes de las distintas fracciones recogidas durante la purificación.

La tabla 1 muestra la recuperación de proteína en las fracciones que contienen F4.

ES 2 334 044 T3

TABLA 1

Recuperación de proteína en las fracciones positivas de F4 recogidas durante el procedimiento de purificación (360 ml de homogeneizado). Se determinó la concentración de proteína con el ensayo Lowry

Etapa de purificación	Proteína (mg)	Recuperación en etapa (%)	Recuperación acumulada (%)
Homogeneizado	6500	100	100
Homogeneizado clarificado	4641	71	71,1
Precipitado con sulfato de amino (AS) resuspendido	728	16	11
Eluído en SO3	247	34	3,8
Eluído en octil-Sepharosa	129	52	2,0
Eluído en Q-sepharosa	74	57	1,1
Superdex 200	36	49	0,6

La tabla muestra la cantidad de proteína en el homogeneizado y el material soluble, incluyendo F4, recuperado en el sobrenadante tras la etapa de clarificación. La etapa de precipitación con sulfato de amonio (AS) eliminó una gran cantidad de HCP y sólo se observó una ligera pérdida de F4 en el gel SDS. La cromatografía en SO3 eliminó adicionalmente muchas impurezas y el gel SDS indicó una gran recuperación de F4. Por el contrario, las recuperaciones de proteína de ~50% medida con las columnas de octil-Sepharosa y Q-sepharosa se acompañaron también de pérdidas de F4. La recuperación de proteína tras la cromatografía de filtración en gel fue de aproximadamente el 50%. El gel SDS muestra que se eliminaron muchas bandas de proteína LMW (bandas de degradación de F4), reduciendo concomitantemente la recuperación de F4.

Rendimiento en F4

La tabla 1 anterior muestra que se podría obtener aproximadamente 36 mg de F4 purificada a partir de 360 ml de homogeneizado a una densidad óptica (OD) de 50. Por tanto, 1 l de homogeneizado a densidad óptica (OD) de 50 debería dar aproximadamente 100 mg de F4 purificada. Debido a que se alcanzaron densidades ópticas de 70-90 durante el procedimiento de fermentación, el rendimiento por litro de fermento estaría, de acuerdo con lo anterior, en el intervalo de 140 a 180 mg de F4.

*Resultados de la purificación de F4(p51)**

Se purificó la construcción de fusión F4(p51)* usando el procedimiento de purificación I descrito anteriormente sin modificaciones.

Seguimiento de SDS-PAGE/Transferencia western del procedimiento de purificación

La figura 14 muestra los análisis en gel SDS y transferencia western con anti-p24/anti-Nef-Tat de las fracciones que contienen F4(p51)* recogidas durante la purificación de F4(p51)*.

El gel SDS y el transferencia western demuestran que la proteína de fusión F4(p51)* se comporta globalmente de forma similar a F4 en la etapa de precipitación con sulfato de amonio así como también durante las etapas cromatográficas. F4(p51)* purificada presentaba un modelo de heterogeneidad similar a F4 purificada.

Una transferencia western de anti *E. coli* indicó que la contaminación con HCP estaba por debajo del 1% tanto en el eluído en Q como en el eluído en Superdex.

ES 2 334 044 T3

Rendimiento

Se perdieron aproximadamente el 25% de F4(p51)* en la fracción insoluble del homogeneizado. De forma adicional, debido a que el procedimiento de purificación no estaba adaptado a esta proteína, se observaron pérdidas en las etapas cromatográficas. Por lo tanto se redujo la recuperación global de F4(p51)* en aproximadamente 25 mg por litro de homogeneizado (densidad óptica, OD, 50). Extrapolado a 1 litro de cultivo a densidad óptica (OD) de 177, el rendimiento estaría, de acuerdo con lo anterior, en el intervalo de 85 mg de F4(p51)*.

10 *Resultados de purificación de F4**

La construcción de fusión F4* se purificó usando el procedimiento de purificación I descrito anteriormente sin modificaciones.

15 *Seguimiento de SDS-PAGE/Transferencia western del procedimiento de purificación*

La figura 15 muestra el gel SDS y transferencia western con anti-p24/anti-Nef-Tat de las fracciones que contienen F4* recogidas durante la purificación de F4*.

Como con F4(p51)* también se puede señalar que F4* se comportó globalmente de forma bastante similar a F4 durante el procedimiento de purificación. Se recuperó la proteína en las fracciones esperadas como se muestra en el gel SDS y transferencia western. Una transferencia western de anti-*E. coli* demostró también la eliminación de la mayor parte de HCP ya después de la columna de Q-sepharosa.

Rendimiento

La recuperación global fue de aproximadamente 17 mg de F4* purificada obtenida a partir de 465 mg de homogeneizado de densidad óptica (OD) 50. Extrapolado a un 1 l de cultivo a densidad óptica (OD) de 140, el rendimiento estaría, de acuerdo con lo anterior, en el intervalo de 100 mg de F4*.

En resumen, se purificaron las tres proteínas de fusión F4, F4(p51)* y F4* usando el procedimiento de purificación I. El gel SDS en la figura 16 compara las tres proteínas purificadas mostrando el distinto nivel de heterogeneidad de las construcciones después de la etapa de Q-sepharosa y después de la eliminación de bandas de LMW (bajo peso molecular) mediante la columna de Superdex 200.

Ejemplo 8

Purificación de F4 y F4co (optimizada con codón) - Procedimiento de purificación II

Procedimiento de purificación II

Se desarrolló también un procedimiento de purificación simplificado, el procedimiento II en comparación con el procedimiento I. El procedimiento II consiste únicamente en 2 etapas cromatográficas y diálisis/diafiltración final para intercambio de tampón. De forma reseñable, se introduce una columna cromatográfica CM hyperZ (BioSeptra) para reemplazar la etapa de clarificación, la precipitación con sulfato de amonio y la cromatografía en SO3 del procedimiento I (ejemplo 7). El procedimiento II se usó para purificar tanto F4 como F4 optimizada con codón completo ("F4co"). Para F4co, se desarrollaron dos formas distintas del procedimiento II, una que involucra la carboxiamidación y otra que no. La finalidad de la etapa de carboxiamidación era evitar la agregación por oxidación de la proteína. Esta carboxiamidación se lleva a cabo tras la primera etapa cromatográfica (CM hyperZ).

- Se homogeneizaron células de *E. coli* (que expresan F4 o F4co) en tampón Tris 50 mM a pH 8,0 en presencia de DTT 10 mM, a una densidad óptica (OD) de 90. Se aplicaron 2 pasadas por equipo Rannie a 1000 bar.
- Se añadió urea 8M al homogeneizado antes de aplicación a la resina CM hyperZ (BioSeptra) equilibrada con urea 8M en tampón fosfato a pH 7. Se realizó la captura del antígeno en un modo discontinuo. Se empaquetó luego la resina en una columna, se lavaron por arrastre las proteínas no unidas con el tampón de equilibrado y se eliminaron las proteínas de célula huésped unidas (HCP) mediante una etapa de pre-elución con NaCl 120 mM. Se eluyó luego F4co con NaCl 360 mM, urea 8M, DTT 10 mM en tampón fosfato a pH 7,0.
- Para controlar la agregación por oxidación de la proteína de fusión, se pueden carboxiamidar los grupos cisteína de F4co con yodoacetamida. Por tanto, se añade opcionalmente yodoacetamida 50 mM al eluido en CM hyperZ y se realizó la carboxiamidación durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

ES 2 334 044 T3

- El eluido en CM hyperZ se diluyó luego de forma adecuada (aproximadamente de 5 a 8 veces) y se ajustó a pH 9,0. Se unió luego F4co o F4coca a una columna de Q-sepharosa (Amersham Bioscience) en presencia de urea 8M en tampón Tris a pH 9,0. Se lavó por arrastre la proteína no unida con tampón de equilibrado y una etapa de pre-elución con NaCl 90 mM (sólo con proteína no carboxiamidada) en el mismo tampón eliminó la HCP unida. Se desorbió la F4co de la columna con NaCl 200 mM, urea 8M en tampón Tris a pH 9,0.
- Se dializaron muestras dos veces a temperatura ambiente en membranas de diálisis (corte 12-14 kDa) durante la noche frente a 1 l de arginina 0,5M, tampón Tris 10 mM, glutationa 10 mM (añadido sólo a la proteína no carboxiamidada), pH 8,5. De forma alternativa, se consiguió el intercambio de tampón mediante diafiltración frente a 10 volúmenes de muestra del mismo tampón usando una membrana de flujo tangencial con corte a 30 o 50 kDa.
- Finalmente, se filtró el producto dializado en condiciones de esterilidad a través de una membrana de 0,22 μm .

Se muestran las etapas de purificación secuenciales en el flujograma siguiente.

Diagrama de flujo de purificación

Homogeneizado densidad óptica (OD) 90 (Rannie)

Tris 50 mM pH 8,0, DTT 10 mM



adición de **urea 8M**, ajustando a **pH 7,0**



cromatografía en (+) CM hyperZ

pH 7,0, urea 8M, DTT 10mM, pre-elución a NaCl 120 mM, elución en NaCl 360 mM



carboxiamidación opcional: adición de yodoacetamida 50 mM, 30 minutos a temperatura ambiente



dilución y ajuste a pH 9,0, urea 8M



cromatografía en (+) Q Sepharose FF

Tris pH 9,0, urea 8M, pre-elución, elución con NaCl*



diálisis/diafiltración

→ tampón fosfato, arginina 0,5M, pH 8,5 (glutaciona 10 mM)



Filtración en condiciones de esterilidad

Todos los tampones contenían DTT si F4co no estaba carboxiamidada y glutaciona en el volumen purificado. Se omitieron agentes reductores una vez que la proteína estaba carboxiamidada. *NaCl - para F4co esto fue NaCl 200 mM, para elución de F4coca elution fue mediante gradiente de NaCl. Esta etapa se puede optimizar adicionalmente para F4coca mediante pre-elución con NaCl 60 mM y eluyendo con NaC 100 mM; y para F4co mediante elución con NaCl 100 mM (no se necesita etapa de pre-elución).

ES 2 334 044 T3

Resultados: purificación de F4co

La figura 17 muestra un gel SDS de fracciones que contienen F4 recogidas durante la purificación de F4co y la purificación de F4co carboxiamidado ("F4coca").

5 La resina CM hyperZ capturó completamente F4co del homogeneizado bruto (carril 1) en presencia de urea 8M y se alcanzó elución cuantitativa con NaCl 360 mM. El eluido en CM hyperZ mostrado en la carril 2 estaba enriquecido considerablemente en F4co. Después de dilución apropiada y ajuste de la muestra a pH 9, se unió F4co o F4coca a una columna de Q-sepharosa. Se eluyó luego de forma específica F4co o F4coca con NaCl 200 mM como se muestra en la carril 3. Esta cromatografía no eliminó sólo las proteínas de célula huésped que quedan sino también el ADN y endotoxinas. Para llevar el material purificado a un tampón compatible con la formulación, el eluido de Q-sepharosa se dializó frente a tampón Tris 10 mM, arginina 0,5 M, glutatona 10 mM pH 8,5 en una membrana de diálisis con corte a 12-14 kDa. Se omitió la glutatona con la proteína carboxiamidada.

15 La purificación de F4co y F4coca dio aproximadamente 500 mg de material purificado por l de cultivo de densidad óptica (OD) 130. Este estaba en un intervalo similar al observado previamente con el F4 no optimizado con codón.

Como se describió anteriormente, se han desarrollado dos procedimientos de purificación distintos (I y II) para purificar las distintas construcciones de F4. La figura 18 compara los distintos volúmenes purificados que se obtuvieron.

El gel SDS en la figura 18 ilustra claramente el distinto modelo de las dos diferentes proteínas, F4 y F4co. Mientras que F4 presentaba varias bandas (LMW) gruesas de peso molecular bajo, sólo las bandas finas fueron visibles con la F4co optimizada con codón. El procedimiento I y procedimiento II dan lugar a un modelo para F4co muy similar. El análisis de transferencia western de anti-*E. coli* confirmó la pureza de las proteínas purificadas indicando contaminación con proteína de célula huésped por debajo del 1% en todas las preparaciones.

Ejemplo 9

30 *Inmunogenicidad de F4 en ratones*

Formulación

35 *Formulación de adyuvante 1B*

Para preparar la formulación adyuvante 1B, se seca en vacío una mezcla de lípido (tal como fosfatidilcolina bien de yema de huevo o sintética) y colesterol y 3 D-MPL en disolvente orgánico (o de forma alternativa en una corriente de gas inerte). Se añade luego una solución acuosa (tal como solución salina tamponada con fosfato), y se agita el recipiente hasta que todo el lípido está en suspensión. Se microfluidiza luego esta suspensión hasta que el tamaño del liposoma se reduzca hasta aproximadamente 100 nm, y luego se filtra en condiciones de esterilidad a través de un filtro de 0,2 μ m. Se podría reemplazar esta etapa por extrusión o ultrasonidos.

De forma típica la relación de colesterol:fosfatidilcolina es 1:4 (en relación peso/peso), y se añade la solución acuosa para dar una concentración en colesterol final de 5 a 50 mg/ml.

Los liposomas tienen un tamaño definido de 100 nm y se designan como SUV (para vesículas unilamelares pequeñas). Si esta solución se congela y se descongela repetidamente las vesículas se condensan para formar estructuras multilamelares grandes (MLV) de tamaño que varía de 500 nm a 15 μ m.

50 Los liposomas son estables por sí mismos en el tiempo y no tienen capacidad fusogénica.

Se añade QS21 en solución acuosa a los liposomas para alcanzar concentraciones finales de 3 D-MPL y QS21 de 100 μ g/ml.

55 *Formulación 2A*

Monofosforil lípido A 3-desacilado y QS21 en una emulsión aceite en agua

60 La preparación de la emulsión aceite en agua se puede realizar siguiendo el protocolo que se describe en el documento WO 95/17210. La emulsión contiene en detalle: escualeno al 5%, tocoferol al 5%, tween 80 al 2,0%; el tamaño de partícula es 180 nm.

Preparación de emulsión de aceite en agua (concentrado dos veces)

65 Se disuelve Tween 80 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para dar una solución al 2% en PBS. Para proporcionar 100 ml se agitan 5 g de emulsión doblemente concentrada de DL alfatocoferol y 5 ml de escualeno para mezclar completamente. Se añade 90 ml de solución PBS/Tween y se mezcla completamente. Se pasa luego la

ES 2 334 044 T3

emulsión resultante a través de una jeringuilla y se microfluidiza finalmente usando un equipo microfluidics M110S. Las gotas de aceite resultante tienen un tamaño de aproximadamente 180 nm.

5 La emulsión en volumen estéril se añade a PBS para alcanzar una concentración final de 500 μ l de emulsión por ml (en relación volumen/volumen). Se añade luego 3 D-MPL para alcanzar una concentración final de 100 μ g. Se añade luego QS21 para alcanzar una concentración final de 100 μ g por ml. Entre cada adición de componente se agita el producto intermedio durante 5 minutos.

10 F4Q no optimizado con codón, purificado de acuerdo con el procedimiento de purificación I, se diluyó en un tampón de fosfato/arginina pH 6,8. Se mezcló la dilución con dos adyuvantes concentrados diferentes (adyuvantes 2A y 1B) con el fin de obtener una formulación final de 40 μ g/dosis de 500 μ l de F4 en presencia de 290 (para adyuvante 2A) - 300 (para adyuvante 1B) mM de argnina, 50 μ g de MPL y 50 μ g de QS21. Se inyectaron en ratones 100 μ l de cada formulación.

15 Se realizaron estudios de inmunogenicidad en ratones para evaluar las respuestas inmunes celulares y humorales a los cuatro antígenos encontrados dentro de F4 (p24, p17, RT y Nef).

20 Debido a la complejidad del antígeno F4, se inmunizaron dos veces ocho cepas de ratón, cada una con un antecedente genético diferente, en el día 0 y día 21 con 8 μ g de proteína F4 adyuvantada preparada como se describió anteriormente, en un volumen de 100 μ l. Se recogieron muestras de suero y bazo 14 días tras la última inmunización (día 35) para análisis de las respuestas humorales y celulares en cada uno de los cuatro componentes de F4 (p24, p17, RT y Nef), así como también F4.

25 Se caracterizaron las respuestas a anticuerpo totales mediante ELISA específico para p24, p17, RT, Nef y F4. La siguiente tabla, tabla 2, resume donde se observaron respuestas humorales específicas del antígeno en cada cepa. Los resultados indican la presencia o ausencia de anticuerpos en comparación con animales de control inmunizados con adyuvante sólo. Los resultados presentados son una compilación de dos experimentos separados pero idénticos. En la tabla, 2A se refiere al antígeno formulado con 3D-MPL y QS21 en una emulsión aceite en agua y 1B se refiere a antígeno formulado con 3D-MPL, QS21 y liposomas que contienen colesterol.

30

TABLA 2

Cepa de ratón	P17	P24	Nef	RT	F4
CB6F1	+/- +2A -1B	+	+	+	+
Balb/c	- +2A -1B	+	+	+	+
C3H	-	-	-	-	-
DBA	-	+	+	+	+
CBA	-	-	+/- +2A -1B	+ +2A +/-1B	+
129Sv	-	+	+	+	+
B6D2F1	+/- +2A -1B	+	+	+	+
OF1	+	+	+	+	+

+ = presencia de anticuerpos

- = ausencia de anticuerpos

55

Los ratones OF1 dieron respuestas de anticuerpo para los cuatro componentes de F4. Las respuestas observadas se muestran en la figura 19. +/- indica que la respuesta observada era débil o sólo se observó con uno de los adyuvantes. Por ejemplo, respuestas de p17 a ratones B6D2F1: +/- general con +2A y -1B significa que hay una respuesta con 2A (no débil) y ninguna con 1B. Respuestas p17 en ratones Balb/c: - general, con un +/- 2A y un - 1B, aquí el +/- significa que la respuesta con adyuvante 2A era débil.

60

Se caracterizaron respuestas celulares mediante tinto por citometría de flujo para expresión de CD4 y CD8, IFN γ y IL-2 (tinto de citoquina intracelular para expresión de IFN γ y IL-2), siguiendo reestimulación de células de bazo con péptidos específicos p24, p17, RT o Nef, usando colecciones de librerías de péptidos de 15 mers con solapamiento de 11 mer. Las respuestas de CD4 fueron la respuesta celular dominante observada. La siguiente tabla, tabla 3, resume dónde se observaron las respuestas de CD4+IL-2+ específicas del antígeno para cada cepa de ratón. De nuevo, esto se muestra como presencia o ausencia de una respuesta.

65

ES 2 334 044 T3

TABLA 3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Cepa de ratón	P17	P24	Nef	RT
CB6F1	- +/-2A -1B	+	+	+
Balb/c	-	+/- débil	+/- débil	+
C3H	+	+	-	+
DBA	-	+	+	+
CBA	+	+ +2A -1B	-	+
129Sv	-	+	-	+
B6D2F1	-	+	+	+
OF1	-	-	-	+

+ = presencia de CD4+IL-2+ - = ausencia de CD4+IL-2+

Ratones DBA dieron respuestas de CD4 a los cuatro componentes de F4. Las respuestas de CD4+IL-2+ y CD4+IFN γ + observadas para esta cepa de ratón se muestran en la figura 20.

En resumen, F4 formulada en cualquiera de las dos formulaciones de adyuvante es capaz de promover respuestas humorales y celulares a p24, p17, RT y Nef. Esto demuestra que cada región de F4 es inmunogénica en una situación *in vivo*.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que comprende Nef o un fragmento o derivado inmunogénico de la misma, p17 Gag y p24 Gag o fragmentos o derivados inmunogénicos de las mismas, en el que hay al menos un antígeno de VIH o fragmento inmunogénico entre p17 Gag y Gag, comprendiendo adicionalmente el polipéptido RT o un fragmento o derivado inmunogénico de la misma, en el que los fragmentos o derivados inmunogénicos son capaces de aumentar una respuesta inmune frente al antígeno nativo.
- 10 2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además Pol o un fragmento o derivado inmunogénico de la misma, en el que el fragmento o derivado inmunogénico es capaz de aumentar toda respuesta inmune frente al antígeno nativo.
- 15 3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en el que RT o fragmento inmunogénico es un fragmento en el que RT está truncada en el término C tal que le falta el dominio ARNasa H de terminal carboxi.
4. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el fragmento de RT es el fragmento p51.
- 20 5. El polipéptido de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 2 a 4, en el que RT comprende una mutación en la posición 592 para reemplazar la metionina por otro residuo, por ejemplo, lisina.
6. El polipéptido de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la Nef es Nef de longitud completa.
- 25 7. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado entre uno de los siguientes:
1. p24 Gag - RT - Nef - p17 Gag
 2. p24 Gag - RT* - Nef - p17 Gag
 - 30 3. p24 Gag - p51RT - Nef - p17 Gag
 4. p24 Gag - p51RT* - Nef - p17 Gag
- en los que * representa mutación de metionina₅₉₂ en RT a lisina
- 35 8. Un procedimiento para la purificación de un polipéptido de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1 a 7, tal procedimiento comprende:
- 40 i) proporcionar una composición que comprende el polipéptido no purificado;
 - ii) someter la composición a al menos dos etapas cromatográficas;
 - iii) de forma opcional carboxiamidación del polipéptido;
 - 45 iv) llevar a cabo una etapa de intercambio en tampón para proporcionar la proteína en un tampón adecuado para una formulación farmacéutica.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que no hay más de dos etapas cromatográficas.
- 50 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que la carboxiamidación se lleva a cabo entre las dos etapas cromatográficas.
11. Una composición que comprende polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1.
- 55 12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la RT o fragmento inmunogénico de la misma es un fragmento en el que RT está truncada en el término C de modo que le falta el dominio ARNasa H de terminal carboxi.
13. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el fragmento de RT es el fragmento p51.
- 60 14. La composición de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 11 a 1, en la que la RT comprende una mutación en la posición 592 tal que la metionina se reemplaza por otro residuo, por ejemplo, lisina.
15. La composición de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 11 a 14, en la que la Nef es Nef de longitud completa.
- 65 16. Un polinucleótido o polinucleótidos que codifica un polipéptido o composición de polipéptidos de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1 a 7 y 11 a 15.

ES 2 334 044 T3

17. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido o polinucleótido o composición de polipéptidos o polinucleótidos de acuerdo con cualquier reivindicación previa o un polipéptido purificado de acuerdo con cualquier reivindicación previa, junto con un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

5 18. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17, en la que el adyuvante es un adyuvante que induce Th1 tal como QS21 o 3D-MPL o una combinación de QS21 y 3D-MPL.

19. Un kit farmacéutico que comprende:

10 a) una composición que comprende un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable; y

15 b) una composición que comprende un polinucleótido que codifica una o más de Nef o Gag o un fragmento o derivado inmunogénico de Nef o Gag que contiene un epítipo de Nef o Gag presente en el polipéptido de a), junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que el fragmento o derivado inmunogénico es capaz de aumentar una respuesta inmune frente al antígeno nativo.

20. Un kit farmacéutico que comprende:

20 a) una composición que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, y

25 b) una composición que comprende un polipéptido que comprende uno o más de Nef o Gag o un fragmento o derivado inmunogénico de Nef o Gag que contiene un epítipo de Nef o Gag presente en el polipéptido de a), junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que el fragmento o derivado inmunogénico es capaz de aumentar una respuesta inmune frente al antígeno nativo.

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1A

SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras (F4 p24-RT-Nef-p17)

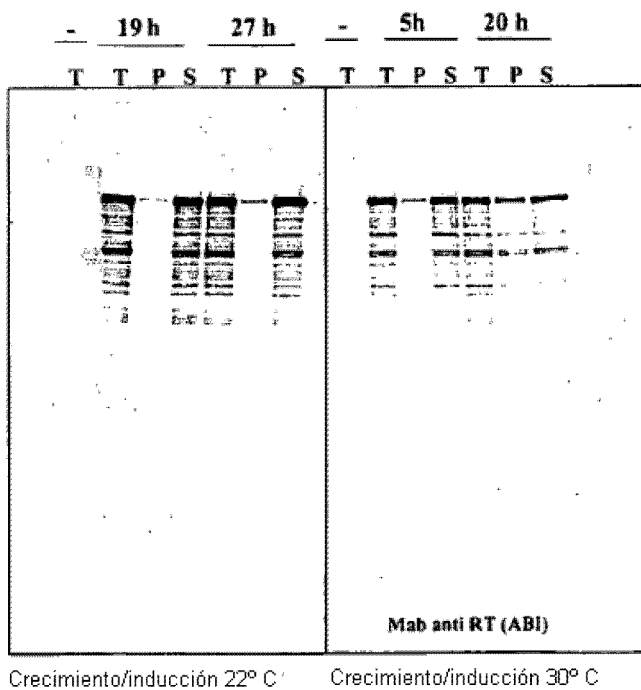
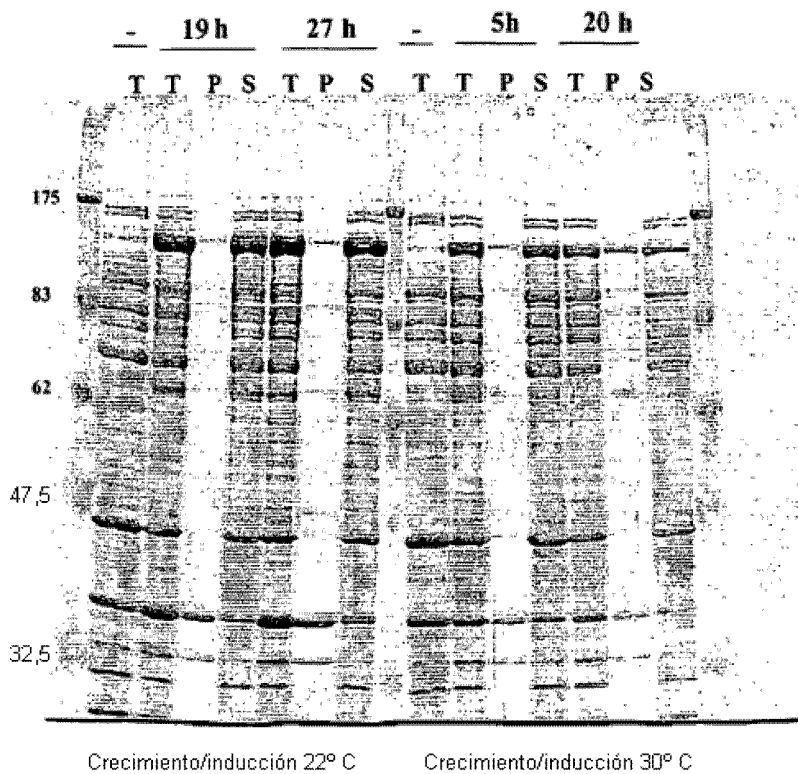
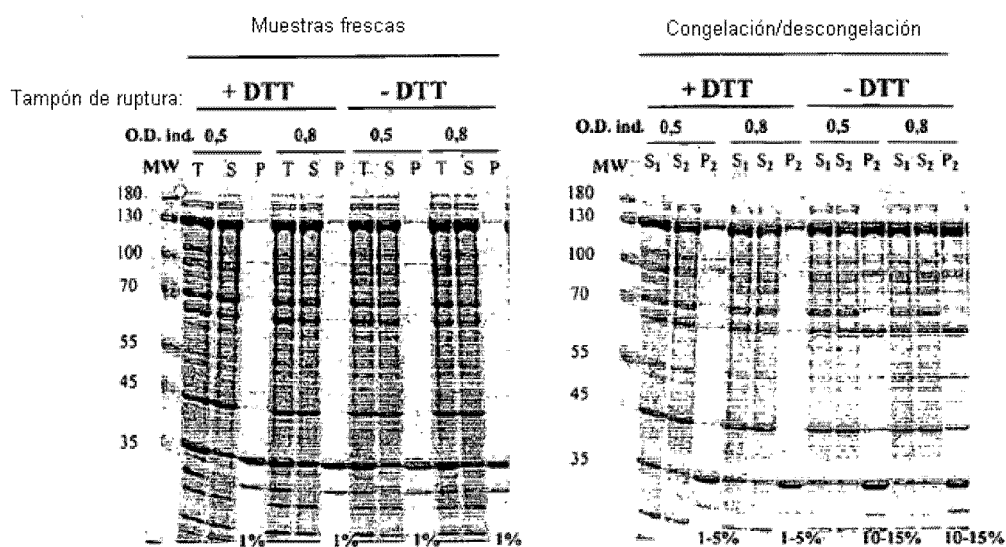


Figura 1B
 Ensayo de solubilidad (F4 p24-RT-Nef-p17)
 Geles reductores (SDS-PAGE al 10%)

Coomassie



Transferencia Western:

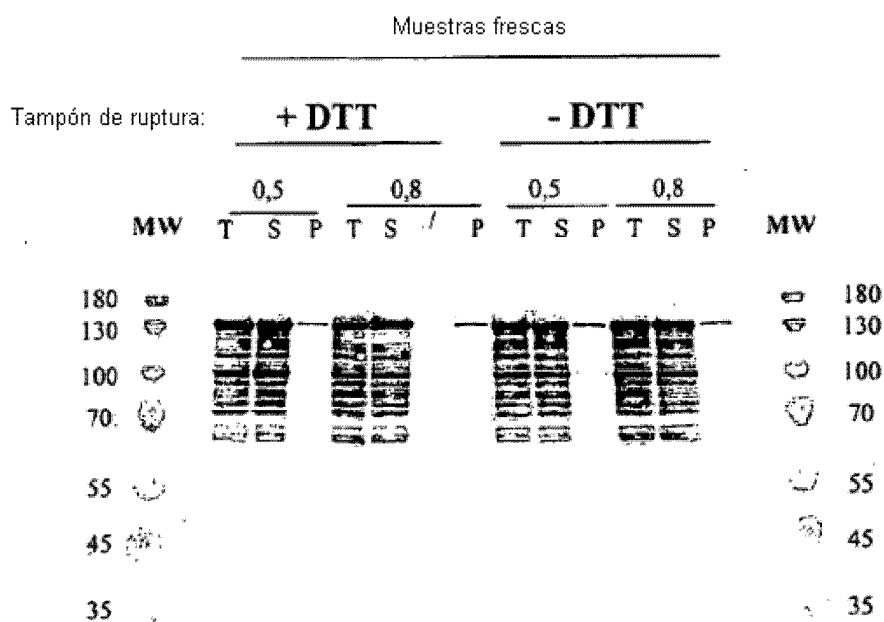
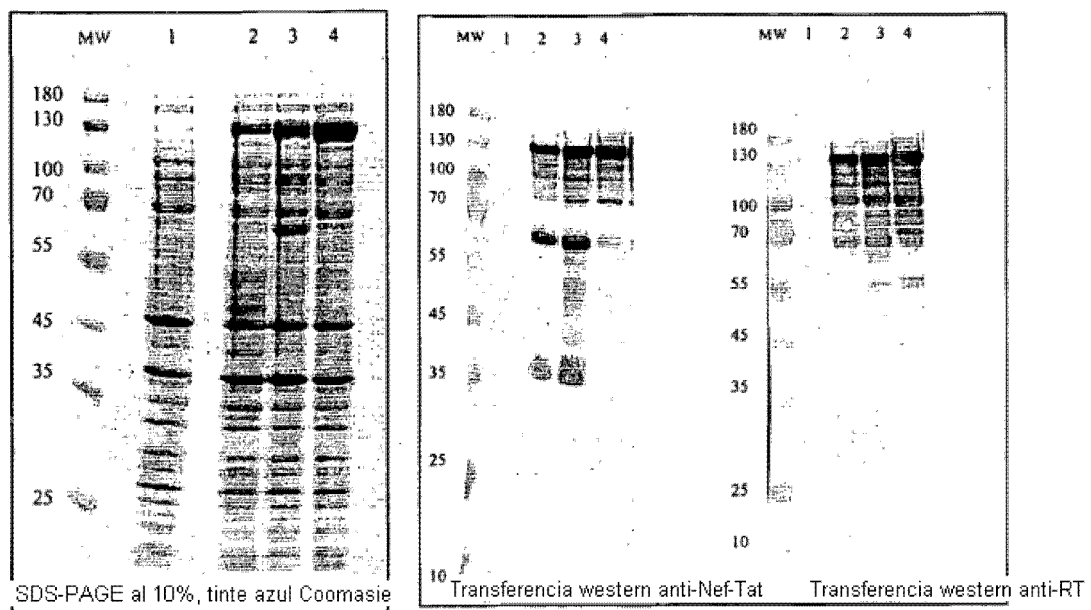


Figura 2: gel tintado con Coomasie y transferencia western para F4 optimizado con codón



1/ no inducido
2/ B834(DE3) / F4 (gen nativo)
3/ BLR(DE3) / F4 (gen nativo)
4/ BLR(DE3) / F4 (gen optimizado con codón)

Figura 3

Asignación de proteínas RT: construcción GSK, HXB2, BH10

	*	20	*	40	*	
RT-GSK	:	MGPISPIETVSVK	LPKPGMDGPKVKQWPL	TEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPE	:	55
RT-HXB2	:	--PISPIETVPVK	LKPGMDGPKVKQWPL	TEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPE	:	53
RT-BH10	:	--PISPIETVPVK	LKPGMDGPKVKQWPL	TEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPE	:	53
	60	*	80	*	100	*
RT-GSK	:	NPYNTPVFAIKK	KDSTKWRKLVDFREL	NKRTQDFWEVQLG	IHPHAGLKKKKS	SVTV : 110
RT-HXB2	:	NPYNTPVFAIKK	KDSTKWRKLVDFREL	NKRTQDFWEVQLG	IHPHAGLKKKKS	SVTV : 108
RT-BH10	:	NPYNTPVFAIKK	KDSTKWRKLVDFREL	NKRTQDFWEVQLG	IHPHAGLKKKKS	SVTV : 108
	120	*	140	*	160	
RT-GSK	:	LDVGDAYFSVPL	DEDFRKYTAFTIPS	INNETPGIRYQYNV	LPGQWKGSPAIFQSS	: 165
RT-HXB2	:	LDVGDAYFSVPL	DEDFRKYTAFTIPS	INNETPGIRYQYNV	LPGQWKGSPAIFQSS	: 163
RT-BH10	:	LDVGDAYFSVPL	DEDFRKYTAFTIPS	INNETPGIRYQYNV	LPGQWKGSPAIFQSS	: 163
	180	*	200	*	220	
RT-GSK	:	MTKILEPFRKQNP	DIVIQYMDDL	VVGSDEIGQHR	TKIEELRQHLLRWGL	TTPD : 220
RT-HXB2	:	MTKILEPFRKQNP	DIVIQYMDDL	VVGSDEIGQHR	TKIEELRQHLLRWGL	TTPD : 218
RT-BH10	:	MTKILEPFRKQNP	DIVIQYMDDL	VVGSDEIGQHR	TKIEELRQHLLRWGL	TTPD : 218
	240	*	260	*		
RT-GSK	:	KKHQKEPPFLM	MGYELHPDKWTVQ	PVLPKDSWTVNDI	QKLVGKLNWASQIYPG	: 275
RT-HXB2	:	KKHQKEPPFLM	MGYELHPDKWTVQ	PVLPKDSWTVNDI	QKLVGKLNWASQIYPG	: 273
RT-BH10	:	KKHQKEPPFLM	MGYELHPDKWTVQ	PVLPKDSWTVNDI	QKLVGKLNWASQIYPG	: 273
	280	*	300	*	320	*
RT-GSK	:	IKVRQLCKLLR	GTKALTEVIPLTE	EAELELAENREIL	KEPVHGVVYDPSK	DLIAE : 330
RT-HXB2	:	IKVRQLCKLLR	GTKALTEVIPLTE	EAELELAENREIL	KEPVHGVVYDPSK	DLIAE : 328
RT-BH10	:	IKVRQLCKLLR	GTKALTEVIPLTE	EAELELAENREIL	KEPVHGVVYDPSK	DLIAE : 328
	340	*	360	*	380	
RT-GSK	:	IQKQGGQWYQI	YQEPFKNLKTKG	YARMRGHAHTND	VKQLTEAVQKITTE	SIVIW : 385
RT-HXB2	:	IQKQGGQWYQI	YQEPFKNLKTKG	YARMRGHAHTND	VKQLTEAVQKITTE	SIVIW : 383
RT-BH10	:	IQKQGGQWYQI	YQEPFKNLKTKG	YARMRGHAHTND	VKQLTEAVQKITTE	SIVIW : 383
	400	*	420	*	440	
RT-GSK	:	GKTPKFLPIQK	ETWETWTEYQAT	WIPEWEFVNTPL	VKHWYQLEKEPIV	GAE : 440
RT-HXB2	:	GKTPKFLPIQK	ETWETWTEYQAT	WIPEWEFVNTPL	VKHWYQLEKEPIV	GAE : 438
RT-BH10	:	GKTPKFLPIQK	ETWETWTEYQAT	WIPEWEFVNTPL	VKHWYQLEKEPIV	GAE : 438
	460	*	480	*		
RT-GSK	:	TPYVDGAANRE	TKLGKAGYVTRGR	QKVVLTNTTNQK	TELOAIYLALQDS	GLEV : 495
RT-HXB2	:	TPYVDGAANRE	TKLGKAGYVTRGR	QKVVLTNTTNQK	TELOAIYLALQDS	GLEV : 493
RT-BH10	:	TPYVDGAANRE	TKLGKAGYVTRGR	QKVVLTNTTNQK	TELOAIYLALQDS	GLEV : 493
	500	*	520	*	540	*
RT-GSK	:	NIVTDSQYALG	IQAQPDQSESEL	VNOIIEQLIKKEK	VYLAWVPAHKGIG	GNEQV : 550
RT-HXB2	:	NIVTDSQYALG	IQAQPDQSESEL	VNOIIEQLIKKEK	VYLAWVPAHKGIG	GNEQV : 548
RT-BH10	:	NIVTDSQYALG	IQAQPDQSESEL	VNOIIEQLIKKEK	VYLAWVPAHKGIG	GNEQV : 548
	560					
RT-GSK	:	<u>D</u> KLVSAGI <u>R</u> KVL	:	562		
RT-HXB2	:	<u>D</u> KLVSAGI <u>---</u>	:	556		
RT-BH10	:	<u>D</u> KLVSAGI <u>---</u>	:	556		

K: mutación puntual introducida para eliminar actividad del enzima
 Negrita y subrayado: aminoácidos que difieren de RT/HXB2
 Bloque resaltado: dominio de RNasa H
 Negrita: primeros aminoácidos de integrasa
 Paréntesis: final de p51

Figura 4
Gel tintado con Coomasie y Transferencia western para P51 RT (optimizado con codón)

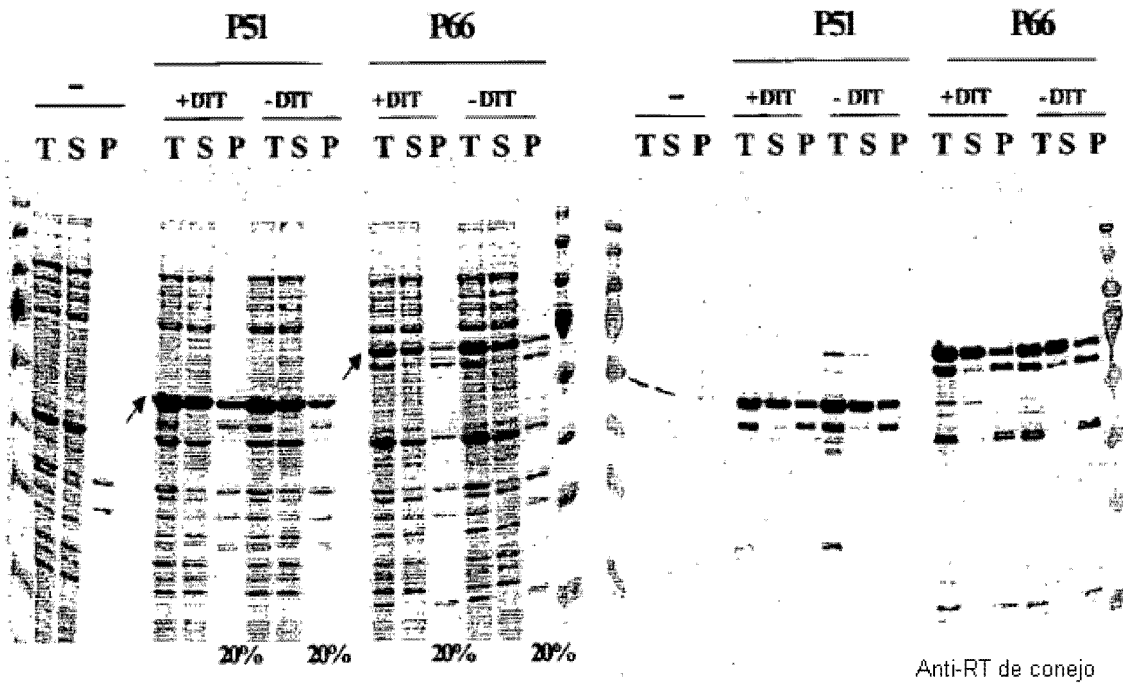
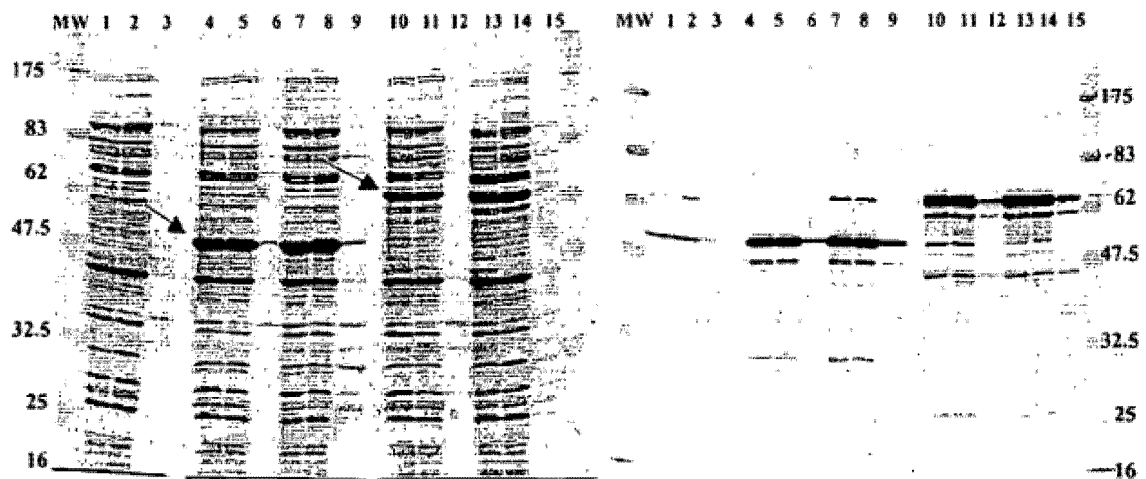


Figura 5:
Ensayo de solubilidad
RT/P51 y RT/p66

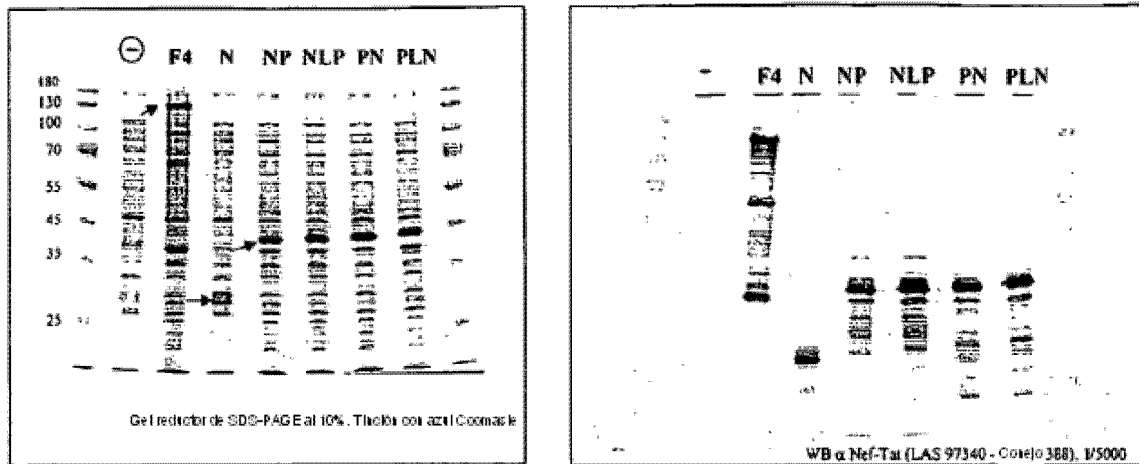
S1: fracción soluble (3 h de inducción a 30° C) conservada a -20° C,
descongelado y centrifugado a 20.000g / 30 min.

S2
P2 (resuspendido 1/10 vol.)



<table border="0" style="width: 100%;"> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">1. S1</td><td></td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">2. S2</td><td>+ DTT Control negativo</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">3. P2</td><td></td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">4. S1</td><td></td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">5. S2</td><td>+ DTT</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">6. P2</td><td>P51co</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">7. S1</td><td></td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">8. S2</td><td>- DTT</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">9. P2</td><td></td></tr> </table>	1. S1		2. S2	+ DTT Control negativo	3. P2		4. S1		5. S2	+ DTT	6. P2	P51co	7. S1		8. S2	- DTT	9. P2		<table border="0" style="width: 100%;"> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">10. S1</td><td></td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">11. S2</td><td>+ DTT</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">12. P2</td><td>P66</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">13. S1</td><td></td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">14. S2</td><td>- DTT</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">15. P2</td><td></td></tr> </table>	10. S1		11. S2	+ DTT	12. P2	P66	13. S1		14. S2	- DTT	15. P2	
1. S1																															
2. S2	+ DTT Control negativo																														
3. P2																															
4. S1																															
5. S2	+ DTT																														
6. P2	P51co																														
7. S1																															
8. S2	- DTT																														
9. P2																															
10. S1																															
11. S2	+ DTT																														
12. P2	P66																														
13. S1																															
14. S2	- DTT																														
15. P2																															

Figura 6



NP=Nef-p17

PN= p17-Nef

NLP=Nef- **GSGGGP**- p17

PLN= p17- **GSGGGP**- Nef

Figura 7

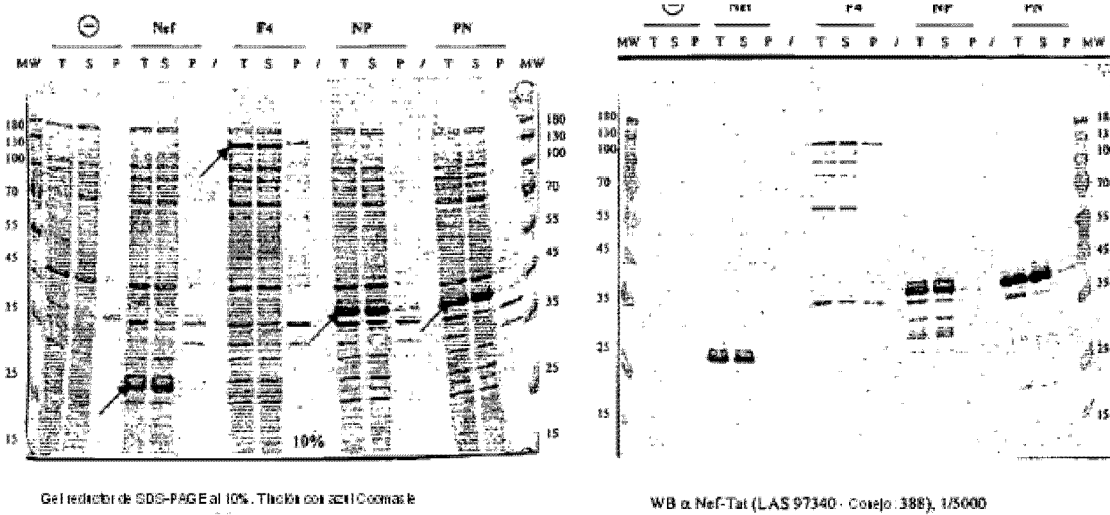
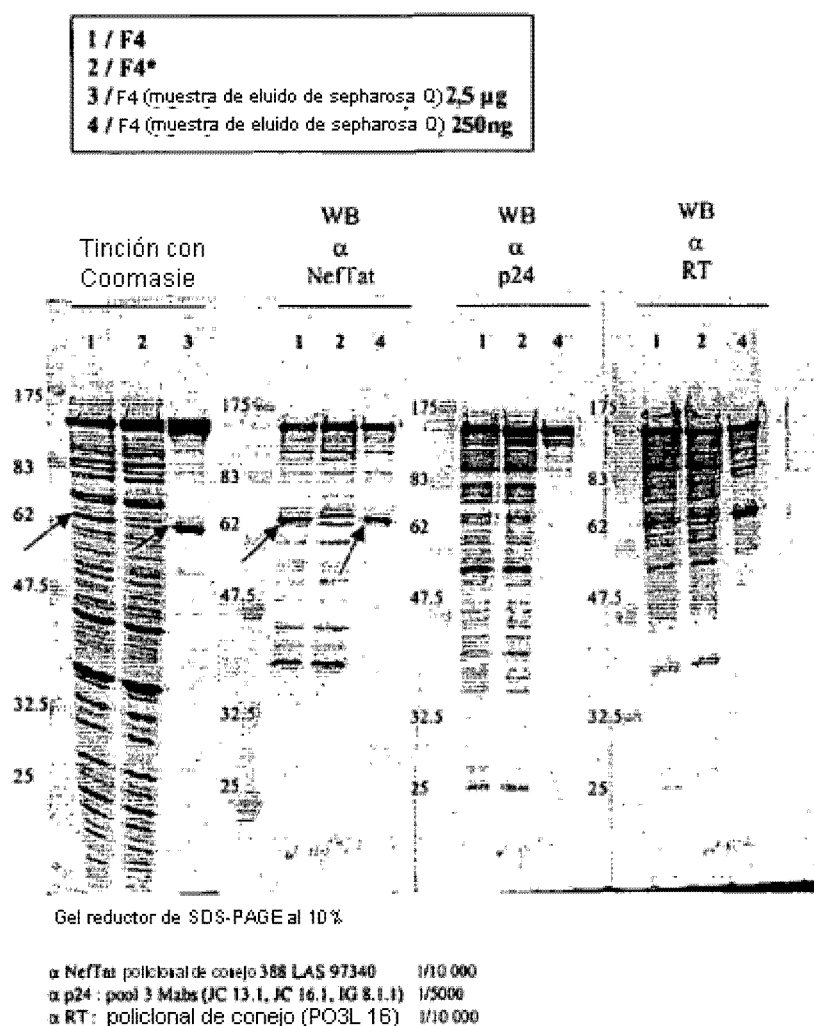


Figura 8

Inducción: 19 horas, 22° C



→ :Banda generada con el sitio "de inicio" interno de metionina

Figura 9

Condición de inducción; 3 h, 30° C

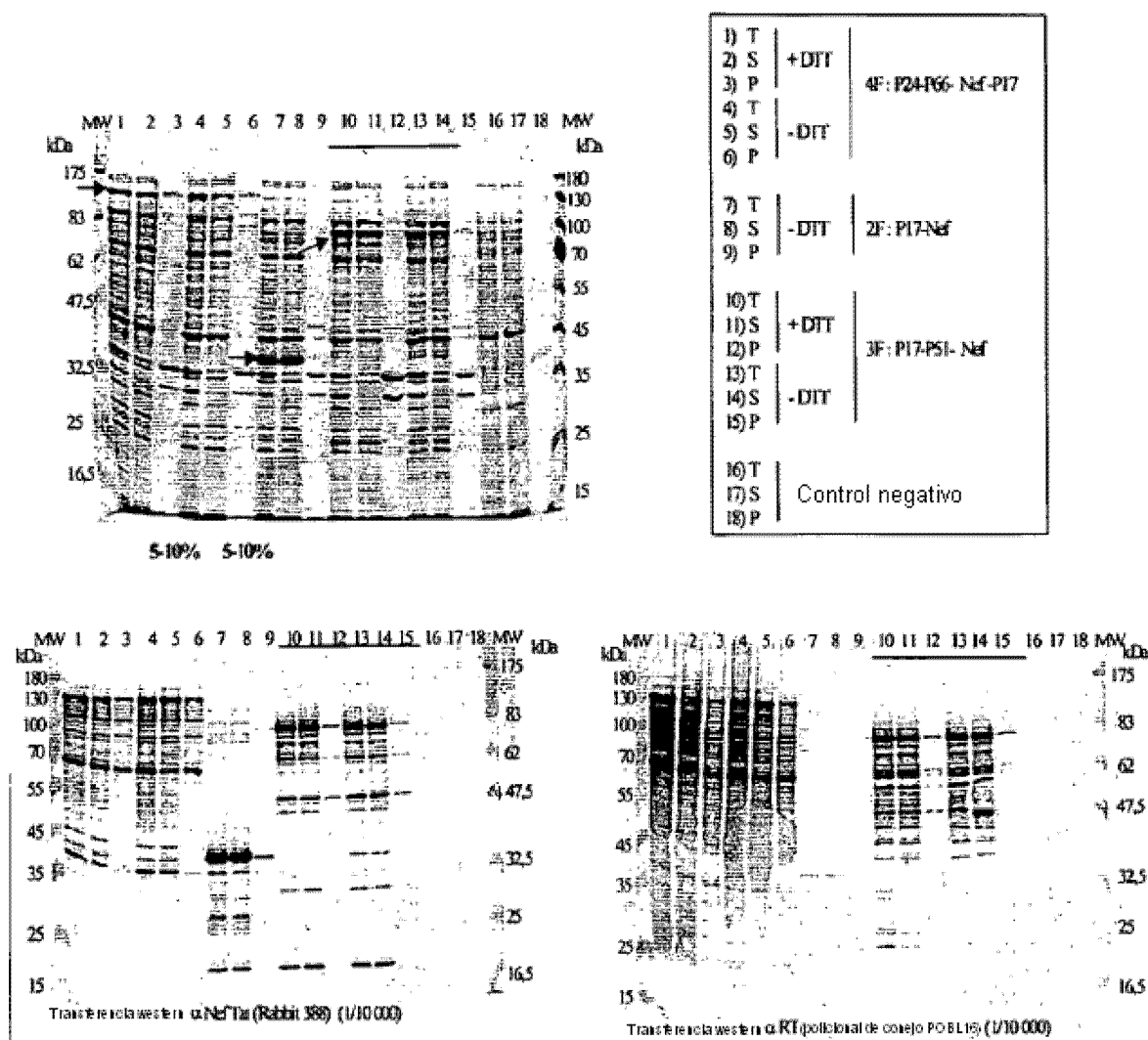


Figura 10

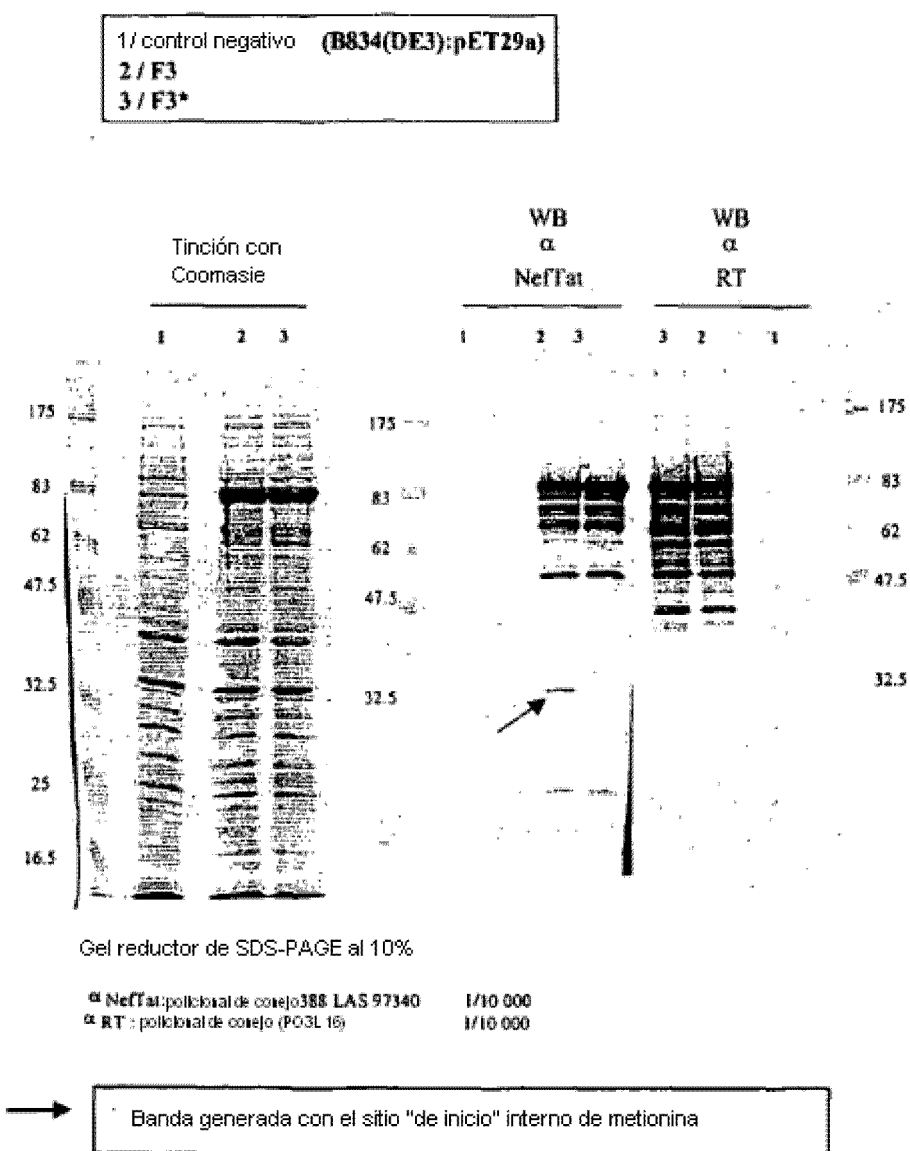


Figura 11

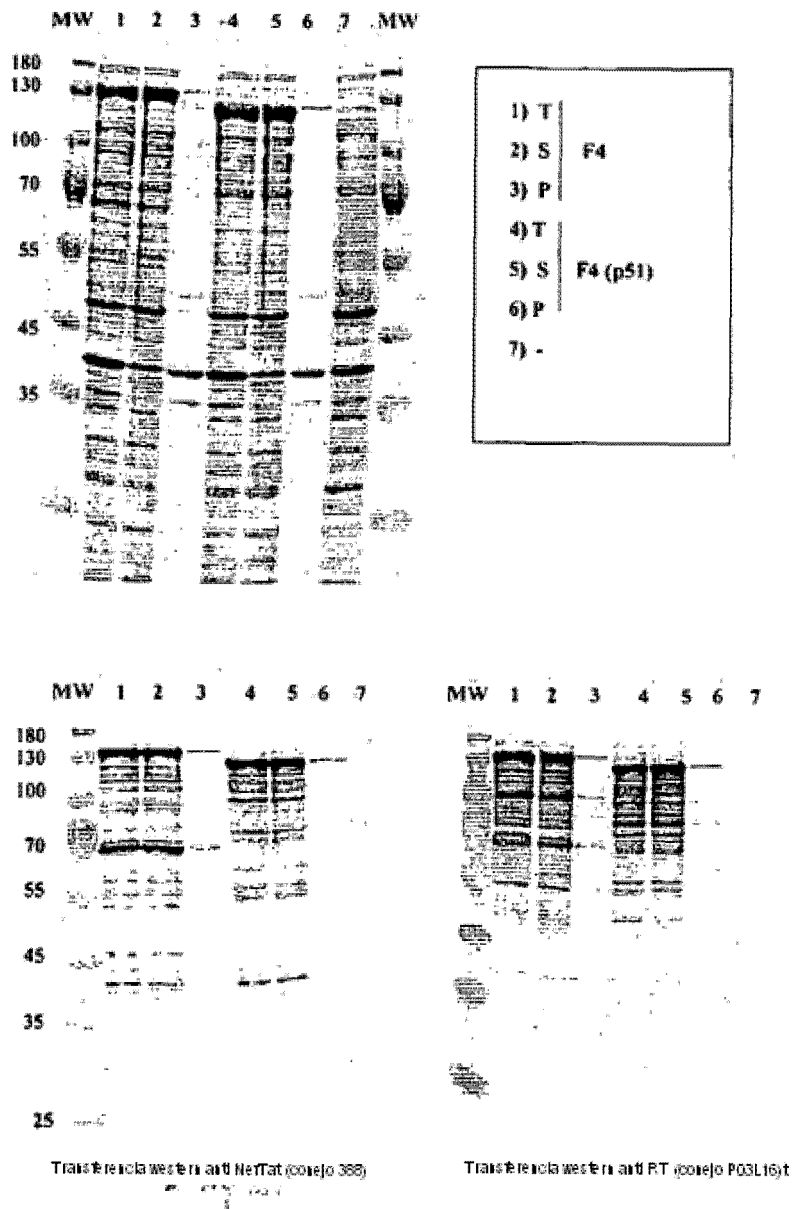
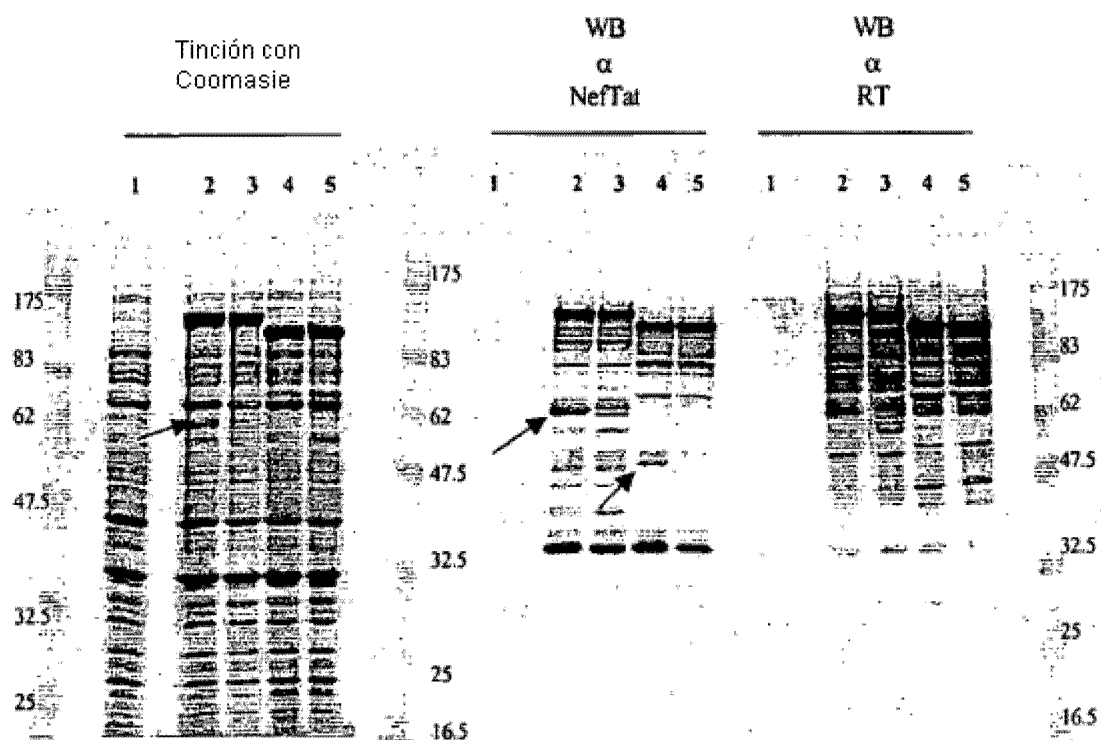


Figura 12

Inducción: 19 horas, 22° C

1/ Control negativo (B834(DE3):pET29a)
 2/ F4
 3/ F4*
 4/ F4 (p51)
 5/ F4 (p51)*



Gel reductor de SDS-PAGE al 10%

α NefTat : policlonal de conejo 388 LAS 97340 1/10 000
 α RT : policlonal de conejo (PQ3L 16) 1/10 000

→ Banda generada por el sitio "de inicio" interno de metionina

Figura 13

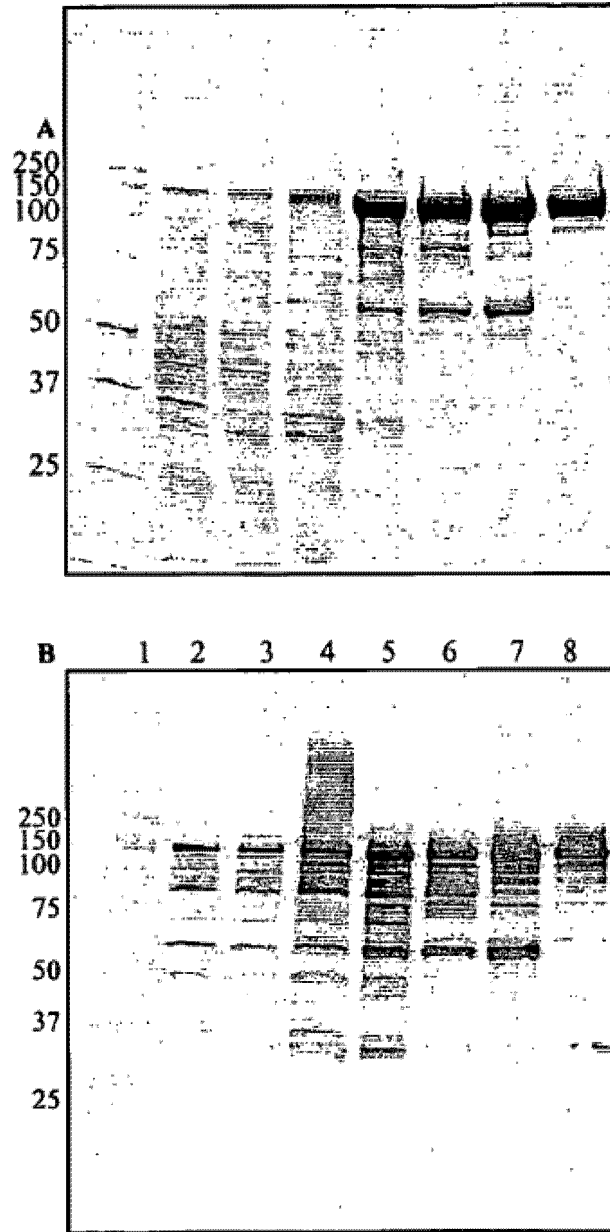


Figura 13: purificación de F4

A: Gel SDS al 4-20% tintado con azul Coomassie, 5 μ g de proteína/carril; B: transferencia western de anti-p24/anti Nef-Tat, 0,5 μ g de proteína/carril 1; patrón MW; carril 2, homogeneizado; carril 3, homogeneizado clarificado; carril 4, precipitado en AS resuspendido; carril 5, eluido en SO3; carril 6, eluido en octil sepharosa; carril 7, eluido en Q sepharosa; carril 8, eluido en Superdex 200.

Figura 14

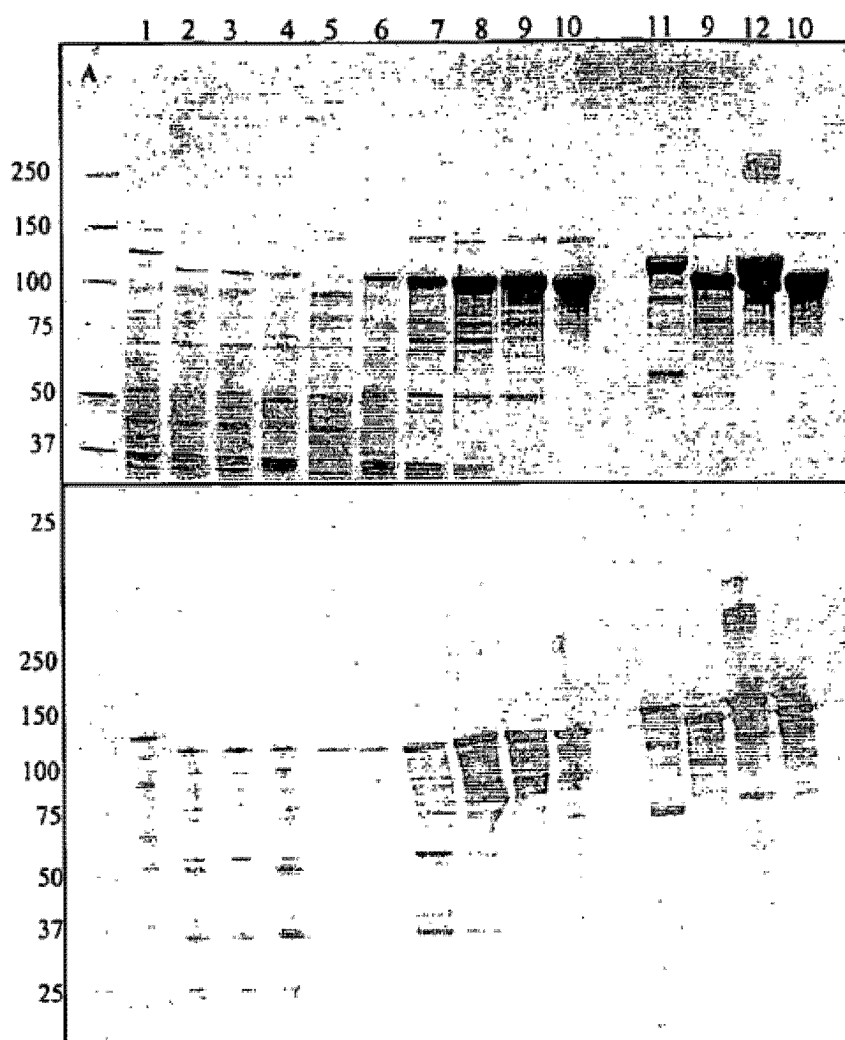


Figura 14: purificación de F4(p51)*

A: Gel SDS al 4-20% tintado con azul Coomassie, 5 μ g de proteína/carril; B: transferencia western de anti-p24/anti Nef-Tat, 0,5 μ g de proteína/carril. Carril 1, homogeneizado F4; carril 2, homogeneizado F4(51)*; carril 3, homogeneizado clarificado; carril 4, agregado de homogeneizado; carril 5, sobrenadante de precipitación en AS; carril 6, precipitado en AS resuspendido; carril 7, eluido en SO3; carril 8, eluido en octil sepharosa; carril 9, eluido en Q sepharosa; carril 10, eluido en Superdex 200; carril 11, eluido de F4 en Q; carril 12, eluido de F4 en Superdex 200.

Figura 15

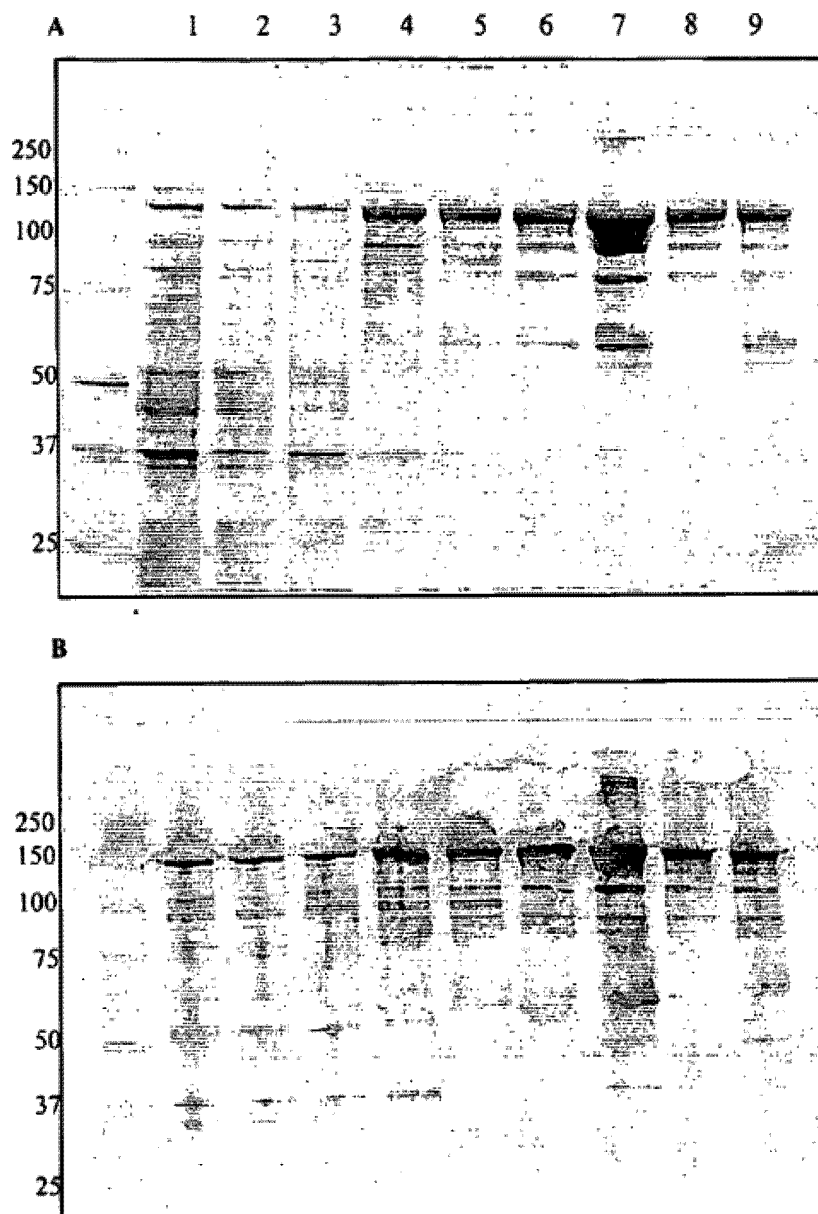


Figura 15: purificación de F4*.

A: Gel SDS al 4-20% tintado con azul Coomassie, 5 μ g de proteína/carril; B: transferencia western de anti-p24/anti Nef-Tat, 0,5 μ g de proteína/carril 1. Carril 1, homogeneizado; 2, homogeneizado clarificado; 3, precipitado en AS resuspendido; 4, eluido en SO3; 5, eluido en octil sepharosa; 6, eluido en Q; 7, eluido en Q sepharosa concentrado/dializado; 8, eluido en Superdex 200; 9, fracción rechazada de eluido en Superdex 200.

Figura 16

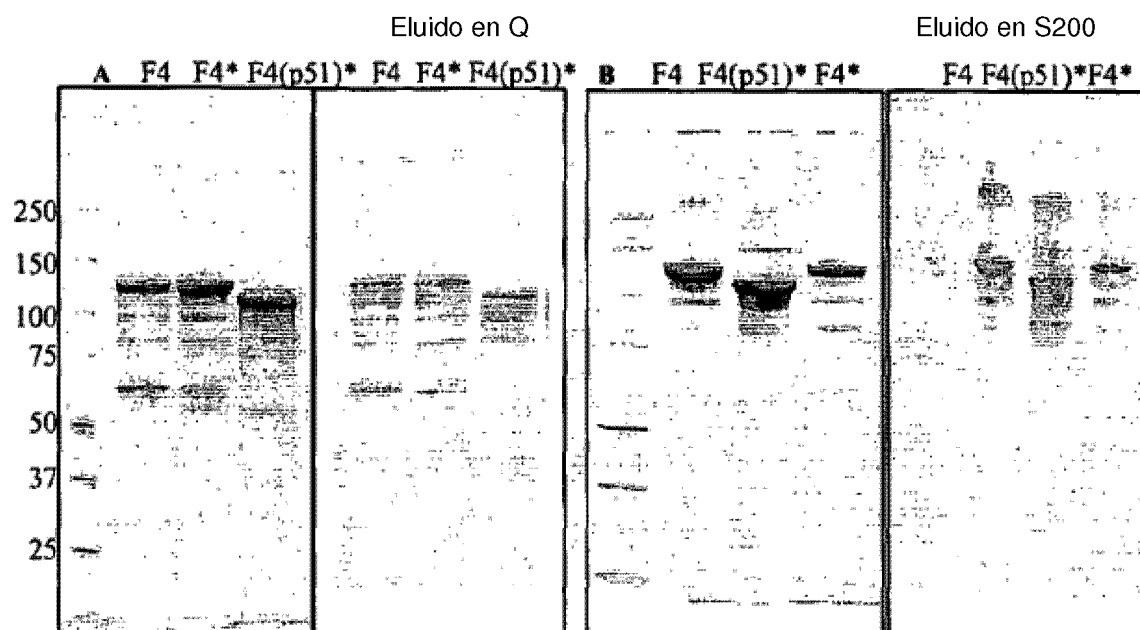


Figura 16: pureza de F4 vs F4* vs F4(51)*

A: eluido en Q, B: eluido en S200. Se cargaron los geles de SDS de 4-20% con 5 µg de proteína para el tinte azul Coomassie (en la izquierda) y con 0,5 µg para la transferencia western anti-p24/anti-Nef-Tat (en la derecha).

Figura 17

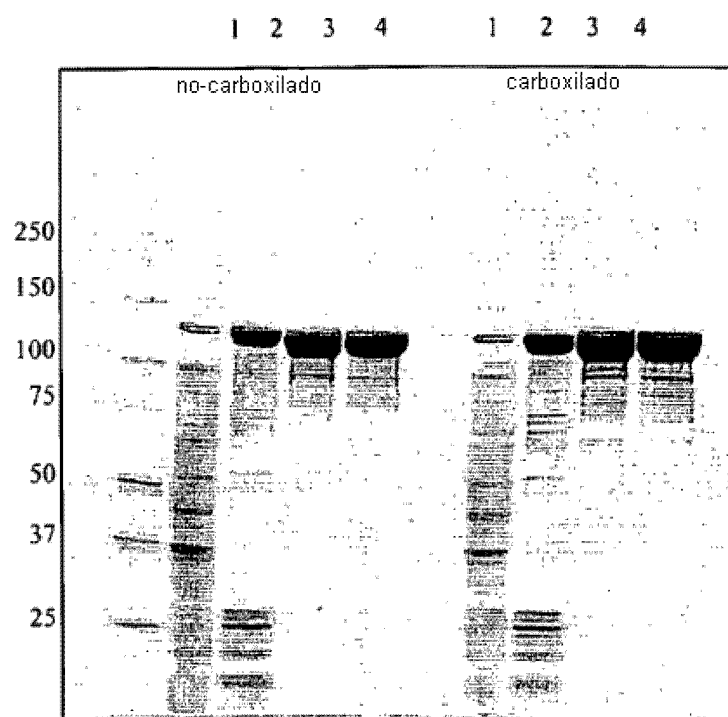


Figura 17: SDS-PAGE seguido de la purificación de F4co y F4co carboxilado. Se separaron 5 μg de cada fracción recogida durante la purificación de F4co o F4coca en un gel SDS al 4-12%. Se tiñó el gel con azul Coomassie. 1: homogeneizado; 2: eluido en CM hyperZ; 3: eluido en Q sepharosa; 4: volumen purificado.

Figura 18

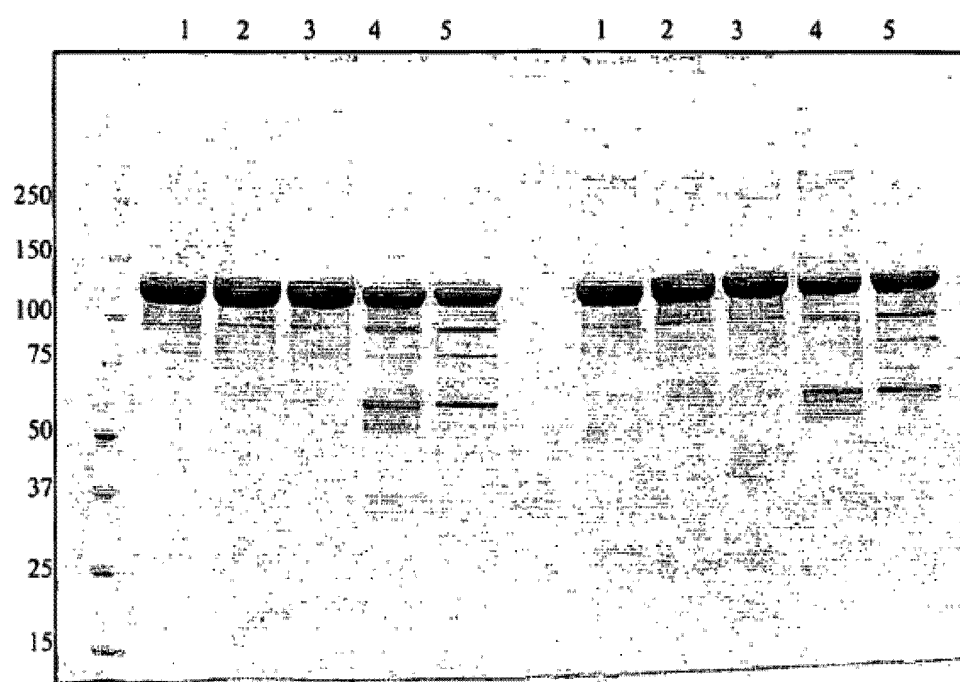


Figura 18: análisis por SDS-PAGE de F4, F4co y F4coca purificados de acuerdo con el procedimiento de purificación I o procedimiento de purificación II. Se separaron 5 μ g de cada proteína en un gel SDS al 4-12% en condiciones reductoras (izquierda) o en condiciones no reductoras (derecha). Se tiñó el gel con azul Coomassie. 1: procedimiento II – F4co; 2: procedimiento II – F4coca; 3: procedimiento I – F4coca; 4: procedimiento I – F4; 5: procedimiento I – F4 carboxiaminado.

Figura 19

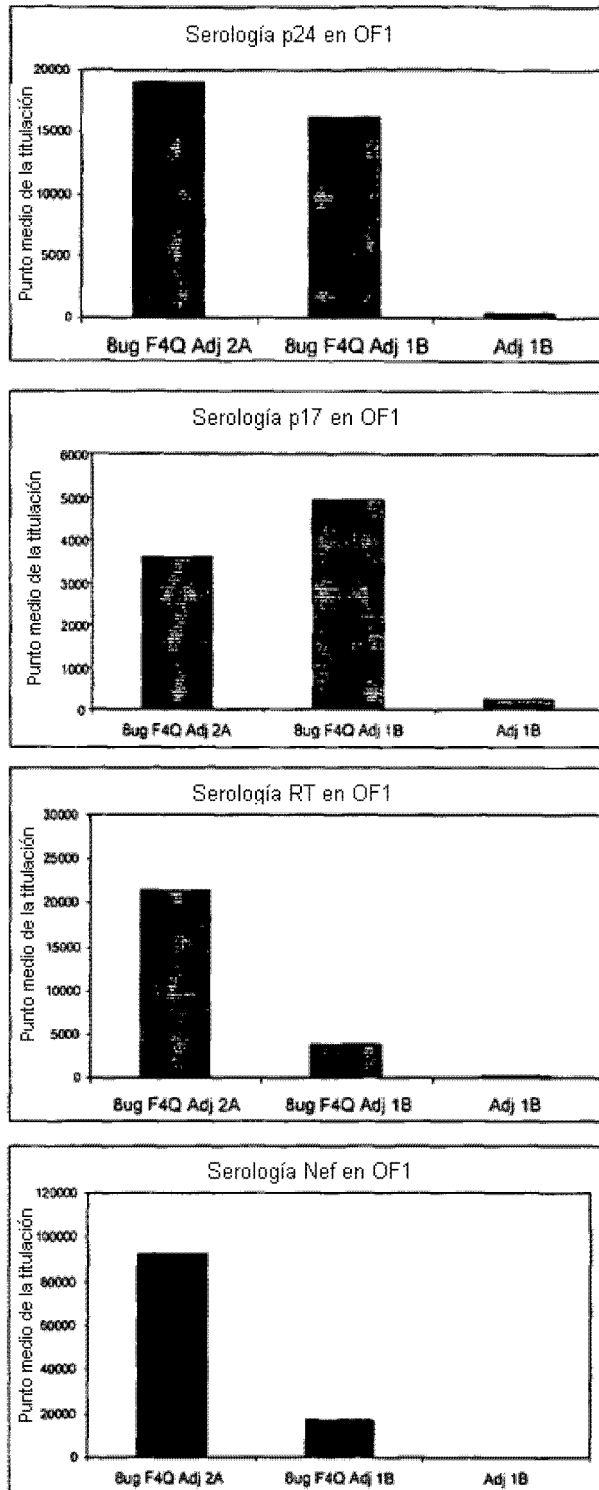


Figura 20

