



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 274 566**

51 Int. Cl.:

C07K 14/16 (2006.01)

C12N 15/49 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98904971 .3**

86 Fecha de presentación : **03.02.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **0969862**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2000**

54 Título: **Genes gag del VIH sintéticos.**

30 Prioridad: **07.02.1997 US 37854 P**
12.03.1997 GB 9705040

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

73 Titular/es: **Merck & Co., Inc.**
126 East Lincoln Avenue
Rahway, New Jersey 07065, US

72 Inventor/es: **Shiver, John, W., Jr.;**
Davies, Mary-Ellen, M.;
Freed, Daniel, C.;
Liu, Margaret, A. y
Perry, Helen, C.

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Genes gag del VIH sintéticos.

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

No se aplica.

Declaración respecto a i+d de financiación federal

10 No se aplica.

Referencia al apéndice en microficha

15 No se aplica.

Campo de la invención

20 Vacunas contra el VIH.

Antecedentes de la invención

El virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) es el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA) y afecciones relacionadas. El VIH-1 es un virus de ARN de la familia *Retroviridae* y muestra la organización 5'LTR-gag-pol-env-LTR3' de todos los retrovirus. Además, el VIH-1 comprende unos pocos genes con funciones reguladoras o desconocidas, incluyendo los genes *tat* y *rev*. El gen *env* codifica la glicoproteína de la envoltura vírica, que se traduce como un precursor de 160 kilodalton (kDa) (gp160), cortado después por una proteasa celular para dar lugar a la glicoproteína externa de 120 kDa de la envoltura (gp120) y a la glicoproteína transmembrana de 41 kDa de la envoltura (gp41). Las proteínas gp120 y gp41 se mantienen asociadas y se exponen en las partículas víricas y en la superficie de las células infectadas por el VIH. La proteína gp120 se une al receptor CD4 presente en la superficie de los linfocitos T auxiliares, macrófagos y otras células diana. Después de que gp120 se une a CD4, gp41 media la fusión responsable de la entrada del virus.

La infección comienza cuando la proteína gp120 de la partícula vírica se une al receptor CD4 en la superficie de los linfocitos T4 u otras células diana. El virus unido se fusiona con la célula diana y transcribe de forma inversa su genoma de ARN en el ADN de doble cadena de la célula. El ADN vírico se incorpora en el material genético en el núcleo celular, donde dicho ADN vírico dirige la producción de nuevo ARN vírico, proteínas víricas y nuevas partículas víricas. Las nuevas partículas brotan a partir de la membrana de la célula diana e infectan otras células.

La destrucción de los linfocitos T4, que son críticos para la defensa inmunitaria, es una causa principal de la progresiva disfunción inmunitaria que es la característica de la infección por el VIH. La pérdida de células diana reduce gravemente la capacidad del cuerpo de combatir a la mayor parte de los invasores, pero tiene un impacto particularmente grave en las defensas contra virus, hongos, parásitos y algunas bacterias, incluyendo las micobacterias.

El VIH-1 mata las células que infecta al replicarse, brotar de ellas y dañar la membrana celular. El VIH-1 puede matar a las células diana indirectamente por medio de la proteína vírica gp120 expuesta en la superficie de una célula infectada. Dado que el receptor CD4 en las células T tiene una fuerte afinidad por gp120, las células sanas que expresan el receptor CD4 pueden unirse a gp120 y fusionarse con células infectadas para formar un sincitio.

El VIH-1 puede desencadenar también defensas inmunitarias celulares normales contra las células infectadas. Con o sin la ayuda de anticuerpos, las células defensivas citotóxicas pueden destruir una célula infectada que expone proteínas víricas en su superficie. Finalmente, las proteínas gag y gp120 libres pueden circular en la sangre de individuos infectados por el VIH-1. La proteína gp120 libre puede unirse al receptor CD4 de células sin infectar, haciéndolas parecer infectadas y provocando una respuesta inmunitaria.

La infección por el VIH-1 es casi siempre fatal y actualmente no hay cura para dicha infección por el VIH-1. Todavía no se dispone de vacunas eficaces para la prevención de la infección por el VIH-1. Debido al peligro de reversión o de infección, probablemente los virus vivos atenuados no pueden usarse como vacuna. Los tratamientos de la infección por el VIH-1, aunque prolongan las vidas de algunas personas infectadas, tienen graves efectos secundarios. Por lo tanto, existe una gran necesidad de tratamientos efectivos y vacunas para combatir esta infección letal.

La vacunación es una forma eficaz de prevención de enfermedades y ha demostrado tener éxito contra varios tipos de infecciones víricas. La determinación de los modos de presentar los antígenos del VIH-1 al sistema inmunitario humano para provocar una inmunidad protectora humoral y celular es una tarea difícil. Hasta la fecha, los intentos de generar una vacuna eficaz contra el VIH no han tenido éxito. En los pacientes con SIDA sólo hay virus libres a bajos niveles. La transmisión del VIH-1 se potencia por las interacciones célula-célula mediante fusión y formación de sincitios. Por tanto, los anticuerpos generados contra los virus o subunidades víricas libres son generalmente inefectivos para eliminar las células infectadas por los virus.

Las vacunas explotan la capacidad del cuerpo de “recordar” un antígeno. Después de los primeros encuentros con un antígeno dado, el sistema inmunitario genera células que retienen una memoria inmunológica del antígeno durante toda la vida del individuo. La exposición posterior al antígeno estimula la respuesta inmunitaria y resulta en la eliminación o inactivación del patógeno.

El sistema inmunitario combate a los patógenos de dos maneras: mediante la respuesta humoral y la respuesta mediada por células. En la respuesta humoral, los linfocitos generan anticuerpos específicos que se unen al antígeno, inactivando así al patógeno. La respuesta mediada por células implica a los linfocitos T citotóxicos y auxiliares que atacan y destruyen específicamente las células infectadas.

El desarrollo de vacunas con el virus VIH-1 presenta problemas porque el VIH-1 infecta algunas de las mismas células que la vacuna necesita activar en el sistema inmunitario (es decir, los linfocitos T4). Sería ventajoso desarrollar una vacuna que inactivase el VIH antes de producirse el daño en el sistema inmunitario. Un tipo particularmente apropiado de vacuna contra el VIH generaría una respuesta inmunitaria anti-VIH que reconociera las variantes del VIH y que funcionara en individuos VIH positivos que se hallan al principio de la infección.

Un reto muy importante en el desarrollo de vacunas contra virus, particularmente contra aquéllos con una tasa de mutación muy elevada como el virus de la inmunodeficiencia humana, contra los que es deseable el desencadenamiento de las respuestas inmunitarias neutralizante y protectora, es la diversidad de las proteínas de la envoltura vírica entre distintos aislamientos o cepas víricas. Dado que, tanto en ratones como en humanos, los linfocitos T citotóxicos (LTC) son capaces de reconocer los epítomos derivados de proteínas víricas internas conservadas, y se piensa que son importantes en la respuesta inmunitaria contra los virus, se han hecho esfuerzos dirigidos al desarrollo de vacunas de LTC capaces de proporcionar protección heteróloga contra distintas cepas víricas.

Se sabe que los LTC CD8+ matan las células infectadas víricamente cuando sus receptores de células T reconocen los péptidos víricos asociados con las moléculas del CMH de clase I. Los péptidos víricos derivan de proteínas víricas sintetizadas endógenamente, independientemente de la localización de dichas proteínas o de su función en el virus. Por tanto, al reconocer los epítomos de las proteínas víricas conservadas, los LTC pueden proporcionar protección cruzada entre cepas. Los péptidos capaces de asociarse con el CMH de clase I para el reconocimiento de los LTC se originan a partir de proteínas que están presentes en o pasan a través del citoplasma o el retículo endoplásmico. En general, las proteínas exógenas que entran en la ruta de procesamiento endosómico (como en el caso de los antígenos presentados por las moléculas del CMH de clase II) no son eficaces en la generación de respuestas de LTC CD8+.

La mayoría de los esfuerzos para generar respuestas de LTC han usado vectores que se replican para producir el antígeno proteico dentro de la célula o se han centrado en la introducción de péptidos en el citosol. Estos enfoques tienen limitaciones que pueden reducir su utilidad como vacunas. Los vectores retrovíricos presentan restricciones en cuanto al tamaño y la estructura de los polipéptidos que pueden expresarse como proteínas de fusión, manteniendo la capacidad de replicación del virus recombinante, y la efectividad de los vectores como vaccinia para inmunizaciones posteriores puede verse comprometida por las respuestas inmunitarias contra los vectores mismos. Además, los vectores víricos y los patógenos modificados poseen riesgos inherentes que pueden dificultar su uso en humanos. Adicionalmente, la selección de epítomos peptídicos para presentar depende de la estructura de los antígenos del CMH del individuo y, por tanto, las vacunas peptídicas pueden tener una efectividad limitada debido a la diversidad de los haplotipos del CMH en poblaciones exogámicas.

Benvenisty, N. y Reshef, L. [*PNAS* 83:9551-9555 (1986)] mostraron que el ADN precipitado con CaCl_2 introducido en ratones por vía intraperitoneal (i.p.), intravenosa (i.v.) o intramuscular (i.m.) podía expresarse. La inyección i.m. de vectores de expresión de ADN sin tratamiento con CaCl_2 en ratones resultó en la absorción del ADN por las células musculares y la expresión de la proteína codificada por el ADN. Los plásmidos se mantuvieron en forma episomal y no se replicaron. Posteriormente se ha observado una expresión persistente tras la inyección i.m. en el músculo esquelético de ratas, peces y primates y en el músculo cardíaco de ratas. La técnica del uso de ácidos nucleicos como agentes terapéuticos se describió en el documento WO90/11092 (4 de octubre de 1990), en el que se usaron polinucleótidos desnudos para vacunar vertebrados.

Para el éxito del procedimiento no es necesario que la inmunización sea por vía intramuscular. La introducción de microproyectiles de oro recubiertos con el ADN que codifica la hormona del crecimiento humano (hGH) en la piel de ratones resultó en la producción de anticuerpos anti-hGH en dichos ratones. Se ha usado un inyector a presión para la transfección de los tejidos dérmico, muscular, adiposo y mamario de animales vivos. Los diversos procedimientos para la introducción de ácidos nucleicos han sido revisados. Zhu y col., [*Science* 261:209-211 (9 de julio de 1993)] demostraron que la inyección por vía intravenosa de un complejo ADN:liposoma catiónico en ratones resultaba en la expresión sistémica de un transgén clonado. Ulmer y col., [*Science* 259:1745-1749 (1993)] describieron la protección heteróloga contra la infección por el virus de la influenza mediante la inyección intramuscular de un ADN que codificaba proteínas del virus de la influenza.

La presente invención se enfrenta a la necesidad de contar con agentes terapéuticos y profilácticos específicos capaces de desencadenar las respuestas inmunitarias deseadas contra patógenos y antígenos tumorales. En este enfoque terapéutico, es de particular importancia la capacidad de inducir respuestas inmunitarias de células T que puedan evitar las infecciones o enfermedades causadas incluso por cepas víricas heterólogas respecto a la cepa de la que se ha obtenido el gen antigénico. Esto es de particular interés en el caso del VIH, ya que se ha observado que este virus

5 muta con rapidez y se han identificado muchos aislamientos virulentos [véase por ejemplo, LaRosa y col., *Science* 249:932-935 (1990), con la identificación de 245 aislamientos independientes del VIH]. En respuesta a esta reconocida diversidad, los investigadores han intentado generar LTC basados en inmunización peptídica. Así, Takahashi y col., [*Science* 255:333-336 (1992)] describieron la inducción de células T citotóxicas de amplia reactividad cruzada que reconocen un determinante de la envoltura (gp160) del VIH. Sin embargo, estos investigadores reconocieron la dificultad de conseguir una respuesta de LTC de verdadera reactividad cruzada y sugirieron que existe una dicotomía entre el cebado o la reestimulación de las células T, que es muy estricto, y el desencadenamiento de la función efectora, incluyendo la citotoxicidad, a partir de LTC ya estimulados.

10 Wang y col., informaron del desencadenamiento de respuestas inmunitarias contra el VIH en ratones por inoculación por vía intramuscular con un gen genómico (sin escindir) del VIH clonado. Sin embargo, el nivel de respuestas inmunitarias alcanzadas en estos estudios fue muy bajo. Además, la construcción de ADN de Wang y col. utilizaba una pieza esencialmente genómica del VIH, que contenía las secuencias contiguas codificantes de Tat/rev-gp160-Tat/rev. Como se describe en detalle a continuación, éste es un sistema subóptimo para obtener un alto nivel de expresión de gp160. También es potencialmente peligroso, porque la expresión de Tat contribuye a la progresión del sarcoma de Kaposi.

20 El documento WO 93/17706 describe un procedimiento para la vacunación de un animal contra un virus, en el que las partículas portadoras se recubrieron con una construcción génica y las partículas recubiertas se aceleraron para introducirlas en las células del animal. Respecto al VIH, se propuso el uso del genoma esencialmente completo, menos las repeticiones terminales largas. Este procedimiento representa riesgos sustanciales para los receptores. Generalmente se cree que las construcciones del VIH deberían contener menos de aproximadamente el 50% del genoma del VIH para garantizar la seguridad de la vacuna; esto garantiza la eliminación de las fracciones enzimáticas y de las proteínas reguladoras víricas, muchas de las cuales tienen funciones desconocidas o poco comprendidas. Por tanto, aún quedan muchos problemas para que una vacuna humana útil contra el VIH surja de la tecnología de la transferencia génica.

30 La presente invención contempla cualquiera de los procedimientos conocidos para la introducción de polinucleótidos en tejidos vivos para inducir la expresión de proteínas. Sin embargo, esta invención proporciona un inmunógeno original para la introducción del VIH y otras proteínas en la ruta de procesamiento de antígenos para generar eficientemente LTC y anticuerpos específicos para el VIH. El producto farmacéutico es efectivo como vacuna para inducir las respuestas inmunitarias celular y humoral anti-VIH y la respuesta inmunitaria neutralizante del VIH. En la presente invención, se tratan y resuelven los problemas mencionados anteriormente, proporcionando inmunógenos polinucleotídicos que, al ser introducidos en un animal, dirigen la eficiente expresión de las proteínas y epítopos del VIH sin los riesgos acompañantes asociados con estos procedimientos. Las respuestas inmunitarias así generadas son eficaces en el reconocimiento del VIH, en la inhibición de la replicación del VIH, en la identificación y destrucción de las células infectadas por el VIH y presentan reactividad cruzada frente a muchas cepas del VIH.

40 Los apareamientos de codones de los organismos son muy poco aleatorios y difieren de organismo a organismo. Esta información se usa para construir y expresar genes alterados o sintéticos con los niveles deseados de eficiencia traduccional, para determinar qué regiones en un genoma son regiones codificantes de proteínas, para introducir sitios de pausa traduccional en genes heterólogos y para establecer una relación o el origen ancestral de secuencias nucleotídicas.

45 La expresión de genes heterólogos extraños en organismos transformados es ahora algo corriente. Un elevado número de genes de mamíferos, incluyendo por ejemplo, genes murinos y humanos, se ha insertado con éxito en organismos unicelulares. Las técnicas convencionales a este respecto incluyen la introducción del gen extraño que se ha de expresar en un vector, tal como un plásmido o un fago, y la utilización de este vector para insertar el gen en un organismo. Los promotores nativos de estos genes se sustituyen normalmente por promotores fuertes compatibles con el hospedador en el que se inserta el gen. La maquinaria para la secuenciación de proteínas permite elucidar las secuencias de aminoácidos de incluso cantidades mínimas de proteína nativa. A partir de estas secuencias de aminoácidos pueden deducirse las secuencias de ADN que codifican estas proteínas. La síntesis de ADN es también una técnica en rápido desarrollo y es posible construir fácilmente genes sintéticos que correspondan a estas secuencias de ADN deducidas.

55 A pesar del conocimiento creciente de los sistemas de expresión y del ADN recombinante, aún existen obstáculos de importancia cuando se intenta expresar un gen extraño o sintético en un organismo. Muchas proteínas nativas activas, por ejemplo, se glicosilan de una forma diferente de la que tiene lugar cuando se expresan en un hospedador extraño. Por esta razón, para la expresión de muchos genes de mamíferos se prefieren hospedadores eucarióticos, como las levaduras, a los hospedadores bacterianos. El problema de la glicosilación es objeto de continua investigación.

65 Otro problema se comprende peor. Frecuentemente, la traducción de un gen sintético, incluso cuando está ligado a un promotor fuerte, tiene lugar con mucha menor eficiencia de la esperada. Lo mismo ocurre frecuentemente con genes exógenos, extraños al organismo de expresión. Incluso cuando el gen se transcribe de forma lo suficientemente eficiente como para producir cantidades recuperables del producto de traducción, la proteína es frecuentemente inactiva o diferente de otro modo en propiedades a la proteína nativa.

Se reconoce que el último problema se debe normalmente a diferencias en el plegamiento de las proteínas en los diversos organismos. La solución de este problema es difícil de alcanzar y los mecanismos que controlan el plegamiento de las proteínas no se comprenden bien.

- 5 Se cree que los problemas acerca de la eficiencia traduccional están relacionados con efectos del contexto de los codones. Las regiones codificantes de proteínas de los genes en todos los organismos están sometidas a una amplia diversidad de restricciones funcionales, algunas de las cuales dependen de la necesidad de codificar una proteína que funcione adecuadamente, así como las señales apropiadas para el inicio y la parada de la traducción. Sin embargo, se han distinguido varias características de las regiones codificantes de proteínas que no se comprenden fácilmente desde el punto de vista de estas restricciones. Dos clases importantes de estas características son aquéllas que se refieren al uso de los codones y al contexto de los codones.

- Se sabe que la utilización de los codones está muy sesgada y varía considerablemente entre los diferentes organismos. Se ha demostrado que los patrones de uso de los codones guardan relación con la abundancia relativa de los ARNt isoaceptores. Los genes que codifican proteínas muy abundantes muestran diferencias en sus preferencias de codones frente a los que codifican proteínas poco abundantes. Se ha discutido ampliamente la posibilidad que los sesgos en el uso de los codones alteren las velocidades de elongación de los péptidos. Mientras que las diferencias en el uso de los codones están asociadas a diferencias en las velocidades de traducción, los efectos directos de la elección de los codones en la traducción han sido difíciles de demostrar. Otras restricciones propuestas en los patrones de uso de los codones incluyen maximizar la fidelidad de la traducción y optimizar la eficiencia cinética de la síntesis de proteínas.

- Aparte del uso no aleatorio de los codones, se ha acumulado una evidencia considerable de que el reconocimiento codón/anticodón se ve influido por secuencias fuera del codón mismo, un fenómeno conocido como “contexto de codones”. Existe una intensa influencia de los nucleótidos cercanos en la eficiencia de la supresión de los codones sin sentido así como de los codones de sentido erróneo. Claramente, la abundancia de actividad supresora en las poblaciones naturales de bacterias, así como el uso de codones de “terminación” para la codificación de selenocisteína y fosfoserina requiere que la terminación sea dependiente del contexto. Se ha demostrado que efectos de contexto similares influyen en la fidelidad de la traducción, así como en la eficiencia de la iniciación de la traducción.

- Los análisis estadísticos de las regiones de codificación de proteínas de *E. coli* demuestran otra manifestación del “contexto de codones”. La presencia de un codón particular en una posición influye intensamente en la frecuencia de la presencia de ciertos nucleótidos en los codones vecinos, y estas restricciones de contexto difieren notablemente en los genes de alto nivel de expresión respecto a los de bajo nivel de expresión. A pesar de que se ha reconocido el efecto del contexto, el valor predictivo de las reglas estadísticas respecto a los nucleótidos preferidos adyacentes a los codones es relativamente bajo. Esto ha limitado la utilidad de estos datos de preferencia de nucleótidos en la selección de codones para lograr los niveles deseados de eficiencia traduccional.

- La llegada del equipo automatizado de secuenciación de nucleótidos ha hecho disponibles grandes cantidades de datos de secuencias para una amplia diversidad de organismos. La comprensión de estos datos presenta dificultades sustanciales. Por ejemplo, es importante identificar las regiones codificantes del genoma, para relacionar los datos de secuencia genética con secuencias de proteínas. Además, la ascendencia del genoma de ciertos organismos es de un interés sustancial. Se sabe que los genomas de algunos organismos tienen una ascendencia mezclada. Algunas secuencias de origen vírico se encuentran ahora incorporadas de forma estable en el genoma de organismos eucarióticos. Las secuencias víricas en sí mismas pueden haberse originado en otra especie sin relación sustancial. La comprensión de la ascendencia de un gen puede ser importante para establecer analogías adecuadas entre genes relacionados y sus productos de traducción en otros organismos.

- Existe la necesidad de una mejor comprensión de los efectos del contexto de los codones en la traducción y de un procedimiento para determinar los codones apropiados para cualquier efecto traduccional deseado. También existe la necesidad de un procedimiento para identificar las regiones codificantes del genoma a partir de los datos de secuencia nucleotídica. También existe la necesidad de un procedimiento para controlar el plegamiento de las proteínas y para asegurar que un gen extraño se plegará adecuadamente al expresarse en un hospedador. Los genes modificados o contruidos de acuerdo con eficiencias traduccionales deseadas serían de un valor significativo.

- Otro aspecto de la práctica de las técnicas del ADN recombinante para la expresión por microorganismos de proteínas de interés industrial y farmacéutico es el fenómeno de la “preferencia de codones”. Mientras anteriormente se observó que la maquinaria existente para la expresión génica en las células hospedadoras transformadas genéticamente trabajará para construir un producto deseado dado, los niveles de expresión alcanzados en un microorganismo pueden estar sujetos a amplia variación, dependiendo en parte de las formas alternativas específicas del código genético de especificación de aminoácidos presentes en el gen exógeno insertado. Un codón “tripleto” de las cuatro bases nucleotídicas posibles puede existir en 64 variantes. El que estas formas proporcionen el mensaje para sólo 20 aminoácidos diferentes (así como el inicio y la terminación de la transcripción) significa que algunos aminoácidos pueden ser codificados por más de un codón. En efecto, algunos aminoácidos tienen hasta seis codones alternativos, “redundantes”, mientras que algunos otros requieren un único codón. Por razones que todavía no se comprenden completamente, los codones alternativos no están presentes uniformemente en absoluto en el ADN endógeno de tipos de células diferentes y parece existir una jerarquía natural variable o “preferencia” por ciertos codones en ciertos tipos de células.

Como ejemplo, el aminoácido leucina se especifica por cualquiera de seis codones de ADN, incluyendo CTA, CTC, CTG, CTT, TTA y TTG (que corresponden respectivamente a los codones de ARNm, CUA, CUC, CUG, CUU, UUA y UUG). Un análisis exhaustivo de las frecuencias de codones en el genoma de microorganismos ha revelado que el ADN endógeno de *E. coli* contiene con la mayor frecuencia el codón que especifica leucina CTG, mientras que el ADN de levaduras y mohos mucilaginosos incluye con la mayor frecuencia el codón que especifica leucina TTA. En vista de esta jerarquía, generalmente se mantiene que la probabilidad de obtener altos niveles de expresión de un polipéptido rico en leucina en un hospedador *E. coli* dependerá, en cierta medida, de la frecuencia del uso de codones. Por ejemplo, un gen rico en codones TTA, muy probablemente se expresará poco en *E. coli*, mientras que un gen rico en CTG mostrará probablemente una elevada expresión del polipéptido. De forma similar, cuando son células de levadura las células hospedadoras que se proyecta transformar para la expresión de un polipéptido rico en leucina, un codón preferido para usar en un ADN insertado sería TTA. Seed y col. [documento WO 96/09378 y *Current Biology* 6:31 (1996)] describen la expresión mejorada de las proteínas Env del VIH *in vitro* tras una optimización de codones.

Las implicaciones del fenómeno de la preferencia de codones en las técnicas de ADN recombinante son manifiestas y el fenómeno puede servir para explicar muchos fracasos anteriores en la consecución de altos niveles de expresión de genes exógenos en organismos hospedadores transformados con éxito - es posible que un codón menos "preferido" esté presente repetidamente en el gen insertado y que la maquinaria celular del hospedador para la expresión no trabaje tan eficientemente. Este fenómeno sugiere que los genes sintéticos que se han diseñado de modo que incluyan los codones preferidos de la célula hospedadora proyectada proporcionan una forma preferida de material genético extraño para la práctica de las técnicas de ADN recombinante.

La diversidad de funciones que tipifica a las células eucarióticas depende de la diferenciación estructural de sus membranas delimitantes. Para generar y mantener estas estructuras, las proteínas deben ser transportadas desde su lugar de síntesis en el retículo endoplásmico a sus destinos predeterminados en toda la célula. Esto requiere que las proteínas en tránsito expongan señales de clasificación que sean reconocidas por la maquinaria molecular responsable de la selección de la ruta, localizada en los puntos de acceso a las principales rutas de tránsito. Las decisiones de clasificación para la mayor parte de las proteínas sólo necesitan realizarse una vez mientras atraviesan sus rutas biosintéticas, ya que su destino final, la localización celular en la que realizan su función, será su residencia permanente.

El mantenimiento de la integridad intracelular depende en parte de la clasificación selectiva y del transporte preciso de las proteínas a sus destinos correctos. A lo largo de los últimos años, se ha estudiado intensamente la disección de la maquinaria molecular para el direccionamiento y la localización de las proteínas. Se han identificado motivos de secuencia definidos en las proteínas que pueden actuar como "etiquetas de dirección". Los péptidos líder o señal, como el del activador del plasminógeno tisular, tPA, sirven para transportar una proteína a la ruta de secreción celular a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Se ha descubierto una serie de señales de clasificación asociadas con los dominios citoplásmicos de las proteínas de membrana, tal como motivos aminoacídicos de di-leucina o secuencias basadas en tirosina, que pueden dirigir las proteínas a los compartimentos lisosómicos. Para el VIH, el transporte y la extrusión a partir de la célula de las partículas víricas depende de la miristoilación del resto de glicina número dos en el extremo amino de gag.

Resumen de la invención

Se proporcionan moléculas de ADN sintéticas que codifican el gen *gag* del VIH y modificaciones del gen *gag* del VIH. Específicamente, se proporciona un vector de vacuna de ADN plasmídico según la reivindicación 1 en lo sucesivo. Los codones de las moléculas sintéticas incluyen los codones preferidos por las células hospedadoras proyectadas. Las moléculas sintéticas pueden usarse como una vacuna polinucleotídica que proporciona una inmunoprofilaxis eficaz contra la infección por el VIH, a través de inmunidad por anticuerpos neutralizantes e inmunidad mediada por células. Esta invención proporciona polinucleótidos que, cuando se introducen directamente en un vertebrado *in vivo*, incluyendo mamíferos como primates y humanos, inducen la expresión en el animal de las proteínas codificadas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la expresión relativa de gag y tPA-gag en transfectantes de la línea celular 293 después de la transfección con el ADN de gag del VIH.

La figura 2 muestra respuestas séricas anti-gag mediadas por vacunas del ADN de gag o tPA-gag del VIH optimizados en ratones.

La figura 3 muestra respuestas de LTC anti-gag de esplenocitos obtenidos de ratones después de la vacunación con el ADN de gag o tPA-gag del VIH optimizados.

La figura 4 muestra la secreción de citocinas específicas para el antígeno gag de esplenocitos obtenidos de ratones después de la vacunación con el ADN de gag o tPA-gag del VIH optimizados.

La figura 5 muestra LTC anti-gag del VIH de ratones vacunados con los ADN de gag p55 del VIH.

Descripción detallada de la invención

Se proporcionan moléculas de ADN sintéticas que codifican el gen *gag* del VIH y moléculas de ADN sintéticas que codifican formas modificadas del gen *gag* del VIH. Los codones de las moléculas sintéticas están diseñados para usar los codones preferidos por la célula hospedadora proyectada. Las moléculas sintéticas pueden usarse como una vacuna polinucleotídica que proporciona una inmunoprofilaxis eficaz contra la infección por el VIH a través de inmunidad por anticuerpos neutralizantes e inmunidad mediada por células. Las moléculas sintéticas pueden usarse como una composición inmunogénica. Esta invención proporciona polinucleótidos que, cuando se introducen directamente en un vertebrado *in vivo*, incluyendo mamíferos como primates y humanos, inducen la expresión en el animal de las proteínas codificadas.

Como se usa en este documento, un polinucleótido es un ácido nucleico que contiene elementos reguladores esenciales, de modo que al ser introducido en una célula viva de vertebrado, es capaz de dirigir la maquinaria celular para producir los productos de traducción codificados por los genes que comprende el polinucleótido. En una realización de la invención, el polinucleótido es un ácido polidesoxirribonucleico que comprende al menos un gen del VIH ligado operativamente a un promotor transcripcional. Si la proteína codificada por el polinucleótido no se encuentra normalmente en el animal excepto en condiciones patológicas (es decir, una proteína heteróloga), como las proteínas asociadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA), el sistema inmunitario del animal se activa para desencadenar una respuesta inmunitaria protectora. Dado que estas proteínas exógenas son producidas por los tejidos animales, las proteínas expresadas se procesan por el sistema mayor de histocompatibilidad (CMH), de forma análoga a cuando tiene lugar una infección real por el organismo relacionado (VIH). El resultado, como se muestra en esta descripción, es la inducción de respuestas inmunitarias contra el patógeno relacionado.

Por consiguiente, los presentes inventores han preparado ácidos nucleicos que, al ser introducidos en el sistema biológico, inducen la expresión de proteínas y epítomos del VIH. La respuesta de anticuerpos inducida es a la vez específica de la proteína del VIH expresada y neutraliza el VIH. Además, se inducen linfocitos T citotóxicos que reconocen y destruyen específicamente las células infectadas por el VIH.

La presente invención hace posible un procedimiento para el uso de un polinucleótido que, al ser introducido en el tejido de mamíferos, induce la expresión de productos génicos discretos en una célula individual, *in vivo*. La presente invención proporciona una solución diferente que no requiere manipulaciones múltiples de los genes del VIH dependientes de Rev para obtener genes independientes de Rev. El sistema de expresión independiente de Rev descrito en este documento es útil en sí mismo y es un sistema para demostrar la expresión de un producto génico individual deseado en una célula individual *in vivo*.

Debido a que muchas de las aplicaciones de la presente invención se aplican a la vacunación antiviral, frecuentemente se hace referencia a los polinucleótidos como vacuna de polinucleótidos o VPN. Esto no quiere decir que usos adicionales de estos polinucleótidos, en la estimulación inmunitaria y en la terapéutica antitumoral, se consideren fuera del alcance de la invención.

En una realización de esta invención se incorpora un gen que codifica un antígeno *gag* del VIH en un vector de expresión. El vector contiene un promotor transcripcional reconocido por una polimerasa de ARN eucariótica y un terminador transcripcional en el extremo de la secuencia codificante del gen del VIH. En una realización preferida, el promotor es el promotor de citomegalovirus con la secuencia del intrón A (CMV-intA), aunque los expertos en la materia reconocerán que puede usarse cualquiera de una serie de otros promotores conocidos, como el fuerte promotor de la inmunoglobulina u otros promotores de genes eucarióticos. Un terminador transcripcional preferido es el terminador de la hormona de crecimiento bovino. Se prefiere particularmente la combinación de CMVintA-terminador de BGH.

Para asistir en la preparación de los polinucleótidos en células procarióticas se prefiere también incluir en el vector de expresión un marcador de resistencia a antibióticos bajo el control transcripcional de un promotor procariótico, de modo que la expresión del antibiótico no tiene lugar en las células eucarióticas. Pueden usarse genes de resistencia a ampicilina, genes de resistencia a neomicina y otros marcadores de resistencia a antibióticos aceptables farmacéuticamente. Para ayudar a la producción de altos niveles del polinucleótido por fermentación en organismos procarióticos, es ventajoso que el vector contenga un origen de replicación procariótico y que sea de elevado número de copias. Una serie de vectores de clonación procarióticos disponibles comercialmente proporcionan estas ventajas. Es deseable eliminar las secuencias de ADN que no sean esenciales. También es deseable que los vectores no sean capaces de replicarse en células eucarióticas. Esto minimiza el riesgo de integración de las secuencias de la vacuna polinucleotídica en el genoma del receptor. Los promotores o potenciadores específicos de tejidos pueden usarse siempre que se desee limitar la expresión del polinucleótido a un tipo de tejido particular.

En una realización se usa el vector de expresión pnRSV, en el que la repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rous (RSV) se usa como promotor. En otra realización se usa V1, un vector pBR322 mutado en el que se han clonado el promotor de CMV y el terminador transcripcional de bGH. En otra realización se han combinado los elementos de V1 y pUC19 para producir un vector de expresión denominado V1J. En V1J o en otro vector de expresión deseable se clona un gen del VIH, *gag*, que puede inducir una respuesta inmunitaria anti-VIH. En otra realización el gen de resistencia a ampicilina se elimina de V1J y se sustituye por un gen de resistencia a neomicina,

para generar V1J-*neo*, en el que se clona el gen *gag* del VIH para el uso según esta invención. En otra realización, el vector es V1Jns, que es el mismo que V1J-*neo*, excepto porque se ha creado un sitio único de restricción *Sfi*I en el sitio único *Kpn*I en la posición 2114 de V1J-*neo*. La incidencia de sitios *Sfi*I en el ADN genómico humano es muy baja (aproximadamente un sitio por 100.000 bases). Por tanto, este vector permite una cuidadosa monitorización de la integración del vector de expresión en el ADN del hospedador, simplemente mediante digestión con *Sfi*I del ADN genómico extraído. En un refinamiento adicional el vector es V1R. En este vector se ha “recortado” del vector tanto ADN no esencial como ha sido posible para producir un vector muy compacto. Este vector es un derivado de V1Jns. Este vector permite usar insertos mayores, con menos riesgo de que se codifiquen secuencias no deseables y optimiza la absorción por las células.

Una realización de esta invención incorpora los genes que codifican *gag* de cepas del VIH adaptadas a condiciones de laboratorio, tales como IIB o CAM-1. Los expertos en la materia reconocerán que se esperará que el uso de los genes de otras cepas del VIH-1 o de cepas del VIH-2 con funciones análogas a los genes del VIH-1 genere respuestas inmunitarias análogas a las descritas en este documento para las construcciones del VIH-1. Los procedimientos de clonación y manipulación para obtener estos genes son conocidos por los expertos en la materia.

Las secuencias de numerosos genes de numerosas cepas del VIH están ahora disponibles públicamente en el banco de datos GENBANK y puede disponerse de tales aislamientos de campo primarios del VIH a partir del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), que tiene un contrato con la empresa Quality Biological, Inc., (7581 Lindbergh Drive, Gaithersburg, Maryland 20879, EEUU) para hacer esas cepas disponibles. Estas cepas también pueden obtenerse de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Network for HIV Isolation and Characterization Vaccine Development Unit, Office of Research, Global Programme on AIDS, CH-1211 Ginebra 27, Suiza). A partir de este trabajo, los expertos en la materia reconocerán que una de las utilidades de la presente invención es proporcionar un sistema para el ensayo y análisis tanto *in vivo* como *in vitro*, de modo que pueda establecerse una correlación entre la diversidad de secuencias del VIH y la serología de la neutralización del VIH, así como otros parámetros. La incorporación de genes de aislamientos primarios de cepas del VIH proporciona un inmunógeno que induce respuestas inmunitarias contra aislamientos clínicos del virus y, por tanto, satisface una necesidad aún no satisfecha en el campo. Además, el inmunógeno puede modificarse a medida que los aislamientos virulentos cambian para reflejar las nuevas secuencias como sea necesario.

Para mantener una terminología coherente, en este documento se sigue la siguiente convención para describir las construcciones inmunogénicas polinucleotídicas: “nombre del vector - cepa del VIH - gen - elementos adicionales”. Los elementos adicionales que se añaden a la construcción se describen con más detalle posteriormente. Al cambiar la cepa etiológica del virus, puede cambiar el gen concreto óptimo para su incorporación en el producto farmacéutico. Sin embargo, como se demuestra a continuación, dado que se inducen respuestas de LTC capaces de proteger contra cepas heterólogas, la variabilidad de cepas es menos crítica en el inmunógeno y las vacunas de esta invención en comparación con las vacunas basadas en el virus entero o en subunidades polipeptídicas. Además, dado que el producto farmacéutico se manipula fácilmente para insertar un nuevo gen, éste es un ajuste que puede realizarse fácilmente por las técnicas convencionales de la biología molecular.

El término “promotor” como se usa en este documento se refiere a un sitio de reconocimiento en una cadena de ADN al que se une la ARN polimerasa. El promotor forma un complejo de iniciación con la ARN polimerasa para iniciar y hacer funcionar la actividad transcripcional. El complejo puede modificarse activando secuencias denominadas “potenciadores” o inhibiendo secuencias denominadas “silenciadores”.

El término “líder” como se usa en este documento se refiere a una secuencia de ADN en el extremo 5' de un gen estructural que se transcribe junto con el gen. La presencia del líder resulta normalmente en que la proteína tiene una extensión peptídica N-terminal llamada a veces presecuencia. Para las proteínas destinadas para su secreción al medio extracelular o a una membrana, esta secuencia señal, que generalmente es hidrofóbica, dirige la proteína al retículo endoplásmico, desde el que se descarga al destino apropiado.

El término “intrón” como se usa en este documento se refiere a una sección de ADN que se encuentra en medio de un gen y que no codifica ningún aminoácido en el producto génico. El ARN precursor del intrón se escinde y por tanto no se transcribe en ARNm ni se traduce a proteína.

El término “casete” se refiere a la secuencia de la presente invención que contiene la secuencia de ácido nucleico que ha de expresarse. El casete es similar en concepto a la cinta de casete. Cada casete tendrá su propia secuencia. Así, intercambiando el casete, el vector expresará una secuencia diferente. El casete puede fácilmente insertarse, eliminarse o sustituirse por otro casete gracias a los sitios de restricción en los extremos 5' y 3'.

El término “región 3' no traducida” o “3' UTR” se refiere a la secuencia en el extremo 3' de un gen estructural que generalmente se transcribe con el gen. Esta región contiene normalmente la secuencia de poli A. Aunque la 3' UTR se transcribe a partir del ADN, se escinde antes de la traducción a proteína.

El término “región no codificante” o “NCR” se refiere a la región contigua a la región 3' UTR del gen estructural. La región NCR contiene una señal de terminación de la transcripción.

El término “sitio de restricción” se refiere a un sitio de corte específico de endonucleasas de restricción.

El término “vector” se refiere a algún medio por el que pueden introducirse fragmentos de ADN en un organismo hospedador o en un tejido hospedador. Hay varios tipos de vectores incluyendo plásmidos, bacteriófagos y cósmidos.

El término “cantidad eficaz” significa que se inyecta suficiente VPN para producir los niveles adecuados de polipéptido. El experto en la materia reconocerá que este nivel puede ser variable.

Para proporcionar una descripción de la presente invención, se proporcionan los siguientes antecedentes respecto al VIH. El virus de la inmunodeficiencia humana tiene un genoma de ácido ribonucleico (ARN). Este genoma de ARN debe transcribirse de forma inversa según los procedimientos conocidos en la técnica para producir una copia de ADNc para su clonación y manipulación según los procedimientos que se muestran en este documento. En cada extremo del genoma hay una repetición terminal larga que actúa como promotor. Entre estos extremos, el genoma codifica *gag-pol-env*, en diversos marcos de lectura, como principales productos génicos: *gag* es el antígeno específico de grupo; *Pol* es la transcriptasa inversa o polimerasa; en esta región también se codifica, en otro marco de lectura, la proteasa vírica responsable del procesamiento post-traducciona, por ejemplo, de gp160 a gp120 y gp41; *env* es la proteína de la envoltura; *Vif* es el factor de infectividad del virión; *rev* es el regulador de la expresión de las proteínas del virión; *Nef* es el factor de regulación negativa; *vpu* es el factor “u” de productividad de viriones; *Tat* es el transactivador de la transcripción; *vpr* es la proteína vírica r. La función de cada uno de estos elementos ha sido descrita.

En una realización de esta invención, un gen que codifica una proteína *gag* del VIH se liga directamente a un promotor transcripcional. Sin embargo, la expresión de *gag* queda reprimida en ausencia de *rev*, debido a que los genes no escindidos no se exportan fuera del núcleo. Para la comprensión de este sistema, el ciclo vital del VIH debe describirse con mayor detalle.

En el ciclo vital del VIH, al infectar una célula hospedadora, el genoma de ARN del VIH se transcribe de forma inversa en un ADN provirico que se integra en el ADN genómico del hospedador como una sola unidad transcripcional. La LTR proporciona el promotor que transcribe los genes del VIH en la dirección 5’ a 3’ (*gag, pol, env*) para formar un transcrito sin escindir del genoma completo. El transcrito sin escindir funciona como el ARNm a partir del cual se transcriben *gag* y *pol*, mientras que para la expresión de los genes codificados por *env* ha de tener lugar una escisión limitada. Para que se exprese el producto génico regulador *Rev*, debe tener lugar más de una etapa de escisión, porque *rev* y *env* están superpuestos en el entorno genómico, como se muestra en la figura 1. La transcripción de *rev* debe pararse para que tenga lugar la transcripción de *env* y viceversa. Además, la presencia de *Rev* se requiere para la exportación de ARN sin escindir fuera del núcleo. Sin embargo, para que *Rev* funcione de esta manera, un elemento de respuesta a *Rev* (RRE) debe estar presente en el transcrito [Malim y col., *Nature* 338:254-257 (1989)].

En la vacuna polinucleotídica de esta invención, la escisión obligatoria de ciertos genes del VIH se elimina proporcionando genes completamente escindidos (es decir: se proporciona un marco de lectura abierto completo para el producto génico deseado sin la necesidad de cambios en el marco de lectura o de la eliminación de regiones no codificantes; los expertos en la materia reconocerán que cuando se escinde un gen particular hay una cierta flexibilidad en la secuencia exacta que resulta; esto es aceptable, sin embargo, siempre que se obtenga una secuencia codificante funcional). Así, en una realización, la secuencia completa de *gag* se escinde de modo que no se requiere la expresión intermitente de cada producto génico.

La respuesta inmunitaria doble, humoral y celular, generada según esta invención es de particular importancia para la inhibición de la infección por el VIH, dada la propensión del VIH a mutar dentro de la población, así como en los individuos infectados. Para formular una vacuna protectora eficaz contra el VIH es deseable generar tanto una respuesta de anticuerpos multivalentes, por ejemplo, contra gp160 (*env* está conservado aproximadamente en el 80% entre diversas cepas del clado B del VIH-1, que son las cepas corrientes en las poblaciones humanas de EEUU), la principal diana de neutralización en el VIH, como de células T citotóxicas reactivas contra las porciones conservadas de gp160 y las proteínas víricas internas codificadas por *gag*. Hemos preparado una vacuna contra el VIH que comprende los genes para gp160 seleccionados de cepas comunes de laboratorio; de los aislamientos víricos primarios predominantes encontrados dentro de la población infectada; genes para gp160 mutados, designados para desenmascarar los epítomos de anticuerpos de neutralización cruzada entre cepas; y otros genes representativos del VIH, como los genes *gag* y *pol* (conservados aproximadamente en el 95% entre los aislamientos del VIH).

Prácticamente todos los pacientes seropositivos para el VIH que aún no han avanzado hacia un estado inmunodeficiente contienen LTC anti-*gag*, mientras que aproximadamente el 60% de esos pacientes muestran LTC específicos para gp160 de acción cruzada entre cepas. Sin embargo, la cantidad de LTC específicos para el VIH que se encuentran en individuos infectados que han progresado al estado de enfermedad conocido como SIDA es mucho más bajo, demostrando la importancia de nuestro descubrimiento dado que se pueden inducir respuestas de LTC cruzadas entre cepas.

Se han demostrado respuestas inmunitarias inducidas por nuestras construcciones de vacunas polinucleotídicas de *env* y *gag* en ratones y primates. La monitorización de la producción de anticuerpos contra *Env* en ratones permite confirmar que una construcción dada es adecuadamente inmunogénica, es decir, una alta proporción de los animales vacunados muestra una respuesta de anticuerpos. Los ratones proporcionan también el modelo animal más fácil, adecuado para comprobar la inducción de LTC por nuestras construcciones y, por tanto, se usan para evaluar si una

construcción particular es capaz de generar tal actividad. Los monos (verde africano, Rhesus, chimpancés) proporcionan especies adicionales, incluyendo primates, para la evaluación de anticuerpos en animales de mayor tamaño, no roedores. Estas especies también se prefieren a los ratones para los ensayos de neutralización de antisueros, debido a los altos niveles de actividades neutralizantes endógenas contra los retrovirus que se han observado en sueros de ratón. Estos datos demuestran que nuestras vacunas producen una inmunogenicidad suficiente para alcanzar protección en experimentos en un modelo de exposición de chimpancés al VIH_{III}, basado en los niveles protectores conocidos de anticuerpos neutralizantes para este sistema. Sin embargo, la definición de protección que está surgiendo actualmente y aumentando en aceptación en la comunidad científica está apartándose de la denominada “inmunidad esterilizante”, que indica la protección completa contra la infección por el VIH, hacia la prevención de la enfermedad. Una serie de correlaciones con este objetivo incluye un título vírico reducido en la sangre, medido por PCR, actividad de la transcriptasa inversa del VIH, por la infectividad de muestras de suero, por ensayo ELISA de la concentración de p24 u otro antígeno del VIH en la sangre, aumento de la concentración de células T CD4+ y por el aumento de las tasas de supervivencia [véase, por ejemplo, Cohen, J., *Science* 262:1820-1821 (1993) para una discusión sobre la definición en evolución de la eficacia de las vacunas anti-VIH]. Los inmunógenos de la presente invención generan también respuestas inmunitarias neutralizantes contra aislamientos infecciosos (campo primario, clínico).

Un ensayo ELISA se usa para determinar si los vectores de vacuna con gag optimizado, que expresan tPA-gag secretada o gag nativa son eficaces para la producción de anticuerpos específicos para gag. Un análisis de inmunotransferencia de lisados de células transfectadas con gag optimizado proporciona la caracterización inicial *in vitro* de la expresión de gag por nuestros vectores de vacunación. Estos datos confirman y cuantifican la expresión de gag utilizando antisueros anti-VIH para visualizar la expresión de gag por las células transfectadas.

Generación de respuestas de LTC. Las proteínas víricas que se sintetizan dentro de las células originan respuestas de LTC restringidas por el CMH-I. Cada una de estas proteínas desencadena la producción de LTC en pacientes seropositivos. Nuestras vacunas también son capaces de desencadenar la producción de LTC en ratones y monos Rhesus. La inmunogenética de las cepas de ratón es propicia para estos estudios, como se ha demostrado con la proteína NP del virus de la influenza [véase Ulmer y col., *Science* 259:1745-1749 (1993)]. Se han definido varios epítomos para las proteínas *env*, *rev*, *nef* y *gag* del VIH [Frankel, F. R. y col., *J. Immunol.* 155:4775-82 (1995)] en ratones Balb/c, facilitando así los ensayos *in vitro* de cultivo y citotoxicidad de los LTC. Alternativamente, podría usarse el gen completo que codifica gp160, gp120, pol o *gag*. Para una revisión adicional de este tema, véase por ejemplo (HIV Molecular Immunology Database 1995, Korber y col., eds., Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, EEUU). Como se usa en este documento, la función efectora de las células T está asociada con el fenotipo maduro de las células T, por ejemplo, citotoxicidad, secreción de citocinas para la activación de las células B y/o reclutamiento o estimulación de macrófagos y neutrófilos.

Medición de las actividades T_H. Se analizan cultivos de células de bazo derivados de animales vacunados en cuanto a su memoria para antígenos específicos mediante la adición de proteína recombinante o de epítomos peptídicos. La activación de las células T por tales antígenos, presentados por las células acompañantes presentadoras de antígenos del bazo, CPA, se monitoriza por la proliferación de estos cultivos o por la producción de citocinas. El patrón de producción de citocinas permite también la clasificación de la respuesta T_H como del tipo 1 o del tipo 2. Debido a que las respuestas dominantes T_H2 parecen correlacionarse con la exclusión de la inmunidad celular en pacientes seropositivos inmunocomprometidos, es posible definir el tipo de respuesta engendrada en los pacientes por una VPN dada, permitiendo la manipulación de las respuestas inmunitarias resultantes.

Basándose en los estudios inmunológicos anteriores, es predecible que nuestras vacunas serán eficaces en vertebrados contra el ataque por VIH virulentos. Estos estudios se han llevado a cabo en un modelo de exposición de chimpancés al VIH_{III} después de la vacunación suficiente de estos animales con una construcción de VPN o un cóctel de construcciones de VPN, compuesto de gp160_{III}, gag_{III}, nef_{III} y REV_{III}. La cepa IIIB es útil a este respecto dado que el título de dosis letales de esta cepa para el chimpancé ha sido establecido. Sin embargo, se prevén los mismos estudios usando cualquier cepa del VIH y los epítomos específicos o heterólogos de la cepa dada. Un segundo modelo de vacunación/exposición, además de los chimpancés, es el ratón SCID-hu PBL. Este modelo permite analizar el sistema inmunitario de linfocitos humano y nuestra vacuna con la posterior exposición al VIH en un ratón hospedador. Este sistema es ventajoso, ya que se adapta fácilmente al uso con cualquier cepa del VIH y proporciona evidencia de protección contra múltiples cepas de aislamientos de campo primarios del VIH. Un tercer modelo de exposición utiliza virus híbridos VIH/VIS (VIHS), algunos de los cuales se ha demostrado que infectan monos Rhesus y conducen a la enfermedad de inmunodeficiencia que resulta en la muerte [véase Li, J. y col., *J. AIDS* 5:639-646 (1992)]. La vacunación de monos Rhesus con nuestras construcciones de vacunas polinucleotídicas protege contra la posterior exposición a dosis letales del VIHS.

La eficacia protectora de los inmunógenos polinucleotídicos del VIH contra la posterior exposición vírica se demuestra por la inmunización con el ADN plasmídico sin capacidad de replicación de esta invención. Esto es ventajoso porque no implica ningún agente infeccioso, no se requiere el ensamblaje de partículas víricas y se permite una selección determinante. Además, dado que la secuencia de *gag* está conservada entre diversas cepas del VIH, se posibilita la protección contra posteriores exposiciones a una cepa virulenta del VIH homóloga, así como a cepas heterólogas de la cepa de la que se ha obtenido el gen.

Esta invención ofrece un procedimiento para inducir inmunidad protectora cruzada entre cepas sin la necesidad de agentes o adyuvantes autorreplicativos. Además, la inmunización con los presentes polinucleótidos ofrece una serie de ventajas adicionales.

5 La facilidad de la producción y purificación de construcciones de ADN se compara favorablemente con los procedimientos tradicionales de purificación de proteínas, facilitando así la generación de vacunas de combinación. Por consiguiente, pueden prepararse, mezclarse y coadministrarse construcciones múltiples que codifican, por ejemplo gp160, gp120, gp41, *gag* o cualquier otro gen del VIH. Dado que la expresión de las proteínas se mantiene después de la inyección de ADN, la persistencia de la memoria de células B y T puede aumentarse, engendrando de este modo
10 inmunidad humoral y mediada por células de larga duración.

Las técnicas convencionales de biología molecular para la preparación y purificación de construcciones posibilitan la preparación de los inmunógenos de ADN de esta invención. Por tanto, mientras las técnicas convencionales de biología molecular son suficientes para la producción de los productos de esta invención, las construcciones específicas
15 descritas en este documento proporcionan inmunógenos polinucleotídicos originales con sorprendente neutralización cruzada entre cepas y de aislamientos primarios del VIH de los productos, un resultado hasta ahora inalcanzable con las vacunas convencionales con el virus completo inactivado o con subunidades proteicas.

La cantidad de ADN expresable o de ARN transcrito que ha de introducirse en el receptor de una vacuna dependerá de la fuerza de los promotores transcripcionales y traduccionales usados y de la inmunogenicidad del producto génico expresado. En general, una dosis inmunológicamente o profilácticamente eficaz de aproximadamente 1 ng a 100 mg y preferentemente de aproximadamente 10 μ g a 300 μ g se administra directamente en el tejido muscular. También se contemplan la inyección subcutánea, la introducción por vía intradérmica, la impresión a través de la piel y otros modos de administración, como las vías intraperitoneal, intravenosa o por inhalación. También se contempla que han
25 de proporcionarse vacunas de refuerzo. Después de la vacunación con el inmunógeno polinucleotídico del VIH se contempla también el refuerzo con inmunógenos de proteínas del VIH, como los productos génicos gp160, gp120 y *gag*. También es ventajosa la administración por vía parenteral, así como por vías intravenosa, intramuscular, subcutánea u otra forma de administración, de la proteína interleucina-12, simultáneamente o posteriormente a la introducción por vía parenteral de la VPN de esta invención.

30 El polinucleótido puede estar desnudo, es decir, sin asociar a proteínas, adyuvantes u otros agentes que afectan al sistema inmunitario del receptor. En este caso, es deseable que el polinucleótido se encuentre en una disolución fisiológicamente aceptable, tal como, pero sin limitarse a, disolución salina estéril o disolución salina tamponada estéril. Alternativamente, el ADN puede estar asociado con liposomas, tal como liposomas de lecitina u otros liposomas conocidos en la técnica, como una mezcla ADN/liposoma, o el ADN puede estar asociado con un adyuvante conocido en la técnica para reforzar las respuestas inmunitarias, tal como una proteína u otro vehículo. Los agentes que asisten en la absorción celular del ADN, tal como, pero sin limitarse a, iones de calcio también pueden usarse para su favorecimiento. Generalmente, en este documento se hace referencia a estos agentes como reactivos facilitantes de la transfección y vehículos farmacológicamente aceptables. Las técnicas de recubrimiento de
40 microproyectiles con polinucleótidos son conocidas en la técnica y son también de utilidad en conexión con esta invención.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no pretenden limitar la invención de ningún modo.

45 Ejemplo 1

Expresión heteróloga de los productos génicos tardíos del VIH

Los genes estructurales del VIH, como *env* y *gag*, requieren la expresión del gen regulador del VIH, *rev*, para producir eficientemente proteínas de longitud completa. Hemos encontrado que la expresión de *gag* dependiente de *rev* produce bajos niveles de proteína y que *rev* misma puede ser tóxica para las células. Aunque hemos conseguido niveles relativamente altos de expresión dependiente de *rev* de gp160 *in vitro*, esta vacuna produjo bajos niveles de anticuerpos contra gp160 después de la inmunización *in vivo* con el ADN de *rev/gp160*. Esto puede ser el resultado de los conocidos efectos citotóxicos de *Rev*, así como del aumento de la dificultad de obtener que *rev* funcione en
55 miotúbulos que contienen cientos de núcleos (la proteína *rev* necesita estar en el mismo núcleo que un transcrito dependiente de *rev* para que tenga lugar la expresión de las proteínas de *gag* o *env*). Sin embargo, ha sido posible obtener una expresión independiente de *rev* usando modificaciones seleccionadas del gen *env*.

En general, nuestras vacunas han utilizado fundamentalmente los genes *env* y *gag* del VIH (IIIB, MN o CAM-1) para optimizar la expresión dentro de nuestro vector de vacunación generalizado, V1Jns, que está compuesto por un promotor inmediato temprano (IE) de CMV, el sitio de poliadenilación de bGH y un esqueleto de pUC. Es posible conseguir eficiencias variables, dependiendo de la longitud del segmento de ADN usado (por ejemplo, gp120 frente a gp160) en la expresión de *env* independiente de *Rev*, sustituyendo su péptido líder de secreción nativo por el del gen del activador del plasminógeno tisular (tPA) y expresando el gen quimérico resultante detrás del promotor CMVIE
65 con el intrón A de CMV.

Como se ha afirmado previamente, consideramos que la realización de los siguientes objetivos es esencial para maximizar nuestras posibilidades de éxito con este programa: (1) vectores basados en *env* capaces de generar fuertes

respuestas de anticuerpos neutralizantes en primates; (2) vectores con *gag* y *env* que desencadenan fuertes respuestas de linfocitos T, como se caracterizan por las funciones efectoras de LTC y auxiliar en primates; (3) uso de los genes *env* y *gag* de cepas de importancia clínica del VIH-1 en nuestras vacunas y caracterización de las respuestas inmunológicas que desencadenan, especialmente la neutralización de aislamientos primarios; (4) demostración de la protección en un modelo de exposición animal, como chimpancé/VIH(IIIB) o Rhesus/VISH usando vacunas optimizadas apropiadas; y (5) determinación de la duración de las respuestas inmunitarias apropiadas para uso clínico. Se ha realizado un progreso importante en los tres primeros objetivos y se están llevando a cabo experimentos para determinar si nuestras recientes construcciones de vacunación para gp160 y *gag* mejorarán estos resultados iniciales.

10 Ejemplo 2

Vectores para la producción de vacunas

A. Vector de expresión V1Jneo

15 Fue necesario eliminar el gen *amp^r* usado para la selección por antibiótico de las bacterias que contienen V1J, debido a que la ampicilina no puede usarse en fermentadores a gran escala. El gen *amp^r* del esqueleto de pUC de V1J se eliminó por digestión con las enzimas de restricción *SspI* y *Eam1105I*. El resto del plásmido se purificó por electroforesis en gel de agarosa, se generaron extremos romos con la polimerasa de ADN de T4 y después se trató con fosfatasa alcalina de intestino de ternera. El gen *kan^r*, disponible comercialmente, derivado del transposón 903 y contenido en el plásmido pUC4K, se escindió usando la enzima de restricción *PstI*, se purificó por electroforesis en gel de agarosa y se generaron extremos romos con la polimerasa de ADN de T4. Este fragmento se ligó con el esqueleto de V1J y los plásmidos derivados, con el gen *kan^r* en cada orientación se designaron V1Jneo, números 1 y 3. Cada uno de estos plásmidos se confirmó por análisis de digestión con enzimas de restricción y secuenciación de ADN de las regiones de unión y se demostró que producían cantidades de plásmido similares a las de V1J. La expresión de los productos génicos heterólogos con estos vectores V1Jneo fue también comparable a la de V1J. Como construcción de expresión, seleccionamos arbitrariamente V1Jneo3, al que se hace referencia de aquí en adelante como V1Jneo, que contiene el gen *kan^r* en la misma orientación que el gen *amp^r* en V1J.

30 B. Vector de expresión V1Jns

Se añadió un sitio de restricción *SfiI* a V1Jneo para facilitar los estudios de integración. Un ligador *SfiI* de 13 pares de bases disponible comercialmente (New England Biolabs) se añadió al sitio *KpnI* dentro de la secuencia de bGH del vector. V1Jneo se linealizó con *KpnI*, se purificó en un gel, se generaron extremos romos con la polimerasa de ADN de T4 y se ligó con el ligador romo *SfiI*. Los aislamientos clonales se seleccionaron por cartografía de restricción y se verificaron por secuenciación a lo largo del ligador. El nuevo vector se designó V1Jns. La expresión de genes heterólogos en V1Jns (con *SfiI*) fue comparable a la expresión de los mismos genes en V1Jneo (con *KpnI*).

C. V1Jns-tPA

40 Para proporcionar la secuencia heteróloga de un péptido líder a proteínas secretadas y/o proteínas de membrana, se modificó V1Jn incluyendo el líder del activador del plasminógeno tisular (tPA). Dos oligómeros sintéticos complementarios se alinearon y después se ligaron a V1Jn digerido con *BglII*. Estos oligómeros tienen bases sobresalientes compatibles para el ligamiento con secuencias cortadas con *BglII*. Después del ligamiento, se destruye el sitio *BglII* secuencia arriba, mientras que el sitio *BglII* secuencia abajo se mantiene para ligaciones posteriores. Ambos sitios de unión, así como la secuencia líder completa de tPA se verificaron por secuenciación de ADN. Además, para ajustarse a nuestro vector optimizado consenso V1Jns (=V1Jneo con un sitio *SfiI*), se incluyó un sitio de restricción *SfiI* en el sitio *KpnI* dentro de la región del terminador de bHG en V1Jn-tPA, generando extremos romos en el sitio *KpnI* con la polimerasa de ADN de T4, seguido del ligamiento con un ligador *SfiI* (n° de catálogo 1138, New England Biolabs). Esta modificación se verificó por digestión de restricción y electroforesis en gel de agarosa.

D. Preparación del vector V1R

55 En un esfuerzo para continuar optimizando nuestro vector básico de vacunación, preparamos un derivado de V1Jns designado como V1R. El propósito de la construcción de este vector fue obtener un vector de vacuna de tamaño mínimo, es decir sin las secuencias de ADN innecesarias, que aún mantuviese las características generales optimizadas de expresión de genes heterólogos y los elevados rendimientos plasmídicos que ofrecen V1J y V1Jns. A partir de la bibliografía, así como experimentalmente, determinamos que (1) las regiones del esqueleto de pUC que comprenden el origen de replicación de *E. coli* podían eliminarse sin afectar al rendimiento plasmídico en bacterias; (2) la región 3' del gen *kan^r* que sigue al marco de lectura abierto para kanamicina podía eliminarse si se insertaba en su lugar un terminador bacteriano; y (3) que podían eliminarse aproximadamente 300 pb de la mitad 3' del terminador de bGH sin afectar a su función reguladora (después del sitio original para la enzima de restricción *KpnI* en el elemento de bGH).

65 V1R se construyó usando PCR para sintetizar tres segmentos de ADN de V1Jns que representan los elementos, promotor CMVintA/terminador de bGH, origen de replicación y resistencia a kanamicina, respectivamente. Al extremo de cada segmento se añadieron sitios para enzimas de restricción únicos para cada segmento usando los oligómeros obtenidos por PCR: *SspI* y *XhoI* para CMVintA/bGH; *EcoRV* y *BamHI* para el gen *kan^r*; *yBclI* y *Sall* para el ori^r.

Estos sitios para enzimas de restricción se eligieron porque permiten el ligamiento direccional de cada uno de los segmentos de ADN derivados de PCR con la subsiguiente pérdida de cada sitio: *EcoRV* y *SspI* dejan segmentos de ADN de extremos romos que son compatibles para ligamiento, mientras que *BamHI* y *BclI* dejan salientes complementarios, al igual que *Sall* y *XhoI*. Después de la obtención de estos segmentos por PCR, cada segmento se digirió con las enzimas de restricción apropiadas indicadas anteriormente y después se ligaron todos juntos en una única mezcla de reacción conteniendo los tres segmentos de ADN. El extremo 5' del *ori^r* se diseñó para que incluyera la secuencia terminadora independiente de Rho, T2, que se encuentra normalmente en esta región, de modo que pudiera proporcionar información de terminación para el gen de resistencia a kanamicina. El producto ligado se confirmó por digestión con enzimas de restricción (>8 enzimas), así como por secuenciación de ADN de las uniones de ligamiento. Los rendimientos en ADN plasmídico y la expresión heteróloga usando genes víricos en V1J parece ser similar a los de V1Jns. La reducción neta alcanzada en el tamaño del vector fue 1346 pb (V1Jns = 4,86 kb; V1R = 3,52 kb).

Ejemplo 3

Diseño de segmentos génicos sintéticos para el aumento de la expresión del gen gag

Los segmentos génicos se convirtieron en secuencias de traducción idéntica pero con un uso de codones alternativo como se define por R. Lathe en un artículo de investigación de *J. Mol. Biol.* vol. 183, págs. 1-12 (1985) con el título "Synthetic Oligonucleotide Probes Deduced from Amino Acid Sequence Data: Theoretical and Practical Considerations". La metodología descrita a continuación para aumentar la expresión de los segmentos del gen *gag* del VIH se basó en nuestra hipótesis de que la conocida incapacidad para expresar eficientemente este gen en células de mamíferos es una consecuencia de la composición general de los transcritos. Por tanto, el uso de codones alternativos que codifican la misma secuencia de proteína puede eliminar las limitaciones para la expresión de *gag*. El procedimiento específico de sustitución de codones empleado puede describirse como sigue:

1. Identificar la posición de los codones para un correcto marco de lectura abierto.
2. Comparar el codón de tipo natural en cuanto a la frecuencia de uso observada para los genes humanos.
3. Si el codón no es el empleado con mayor frecuencia, sustituirlo por un codón óptimo para alta expresión en células humanas.
4. Repetir este procedimiento hasta haber sustituido la totalidad del segmento génico.
5. Inspeccionar las nuevas secuencias génicas por la presencia de secuencias no deseadas generadas por estas sustituciones de codones (por ejemplo, secuencias "ATTTA", creación inadvertida de sitios de reconocimiento para la escisión de intrones, sitios para enzimas de restricción no deseados, etc.) y sustituir los codones que eliminen estas secuencias.
6. Ensamblar los segmentos génicos sintéticos y analizar la mejora de la expresión.

Estos procedimientos se usaron para crear los siguientes segmentos génicos sintéticos para *gag* del VIH, creando un gen que consta enteramente de un uso de codones óptimo para la expresión. Mientras el procedimiento anterior proporciona un resumen de nuestra metodología para diseñar genes de codones optimizados para vacunas de ADN, el experto en la materia comprenderá que una eficacia de vacunas similar o un aumento en la expresión génica puede conseguirse mediante menores variaciones del procedimiento o menores variaciones en la secuencia.

Ejemplo 4

I. Construcciones de vacuna de gag del VIH

Esta es una orf completa del gen *gag* del VIH-1 (CAM1) que consta de codones óptimos.

ES 2 274 566 T3

1 AGATCTACCA TGGGTGCTAG GGCTTCTGTG CTGTCTGGTG GTGAGCTGGA
 51 CAAGTGGGAG AAGATCAGGC TGAGGCCTGG TGGCAAGAAG AAGTACAAGC
 101 TAAAGCACAT TGTGTGGGCC TCCAGGGAGC TGGAGAGGTT TGCTGTGAAC
 151 CCTGGCCTGC TGGAGACCTC TGAGGGGTGC AGGCAGATCC TGGGCCAGCT
 201 CCAGCCCTCC CTGCAAACAG GCTCTGAGGA GCTGAGGTCC CTGTACAACA
 251 CAGTGGCTAC CCTGTACTGT GTGCACCAGA AGATTGATGT GAAGGACACC
 301 AAGGAGGCCC TGGAGAAGAT TGAGGAGGAG CAGAACAAGT CCAAGAAGAA
 351 GGCCCAGCAG GCTGCTGCTG GCACAGGCAA CTCCAGCCAG GTGTCCCAGA
 401 ACTACCCCAT TGTGCAGAAC CTCCAGGGCC AGATGGTGCA CCAGGCCATC
 451 TCCCCCGGA CCCTGAATGC CTGGGTGAAG GTGGTGGAGG AGAAGGCCCTT
 501 CTCCCCTGAG GTGATCCCCA TGTCTCTGTC CCTGTCTGAG GGTGCCACCC
 551 CCCAGGACCT GAACACCATG CTGAACACAG TGGGGGGCCA TCAGGCTGCC
 601 ATGCAGATGC TGAAGGAGAC CATCAATGAG GAGGCTGCTG AGTGGGACAG
 651 GCTGCATCCT GTGCACGCTG GCCCCATTGC CCCCAGCCAG ATGAGGGAGC
 701 CCAGGGGCTC TGACATTGCT GGCACCACCT CCACCCTCCA GGAGCAGATT
 751 GGCTGGATGA CCAACAACCC CCCCATCCCT GTGGGGGAAA TCTACAAGAG
 801 GTGGATCATC CTGGGCCTGA ACAAGATTGT GAGGATGTAC TCCCCACCT
 851 CCATCCTGGA CATCAGGCAG GGCCCCAAGG AGCCCTTCAG GGAATATGTG
 901 GACAGGTTCT ACAAGACCTT GAGGGCTGAG CAGGCCTCCC AGGAGGTGAA
 951 GAACTGGATG ACAGAGACCC TGCTGGTGCA GAATGCCAAC CCTGACTGCA
 1001 AGACCATCCT GAAGGCCCTG GGCCCTGCTG CCACCCTGGA GGAGATGATG
 1051 ACAGCCTGCC AGGGGGTGGG GGGCCCTGGT CACAAGGCCA GGGTCTGGC
 1101 TGAGGCCATG TCCCAGGTGA CCAACTCCGC CACCATCATG ATGCAGAGGG
 1151 GCAACTTCAG GAACCAGAGG AAGACAGTGA AGTGCTTCAA CTGTGGCAAG
 1201 GTGGGCCACA TTGCCAAGAA CTGTAGGGCC CCCAGGAAGA AGGGCTGCTG
 1251 GAAGTGTCGC AAGGAGGGCC ACCAGATGAA GGACTGCAAT GAGAGGCAGG
 1301 CCAACTTCCT GGGCAAAATC TGGCCCTCCC ACAAGGGCAG GCCTGGCAAC
 1351 TTCCTCCAGT CCAGGCCTGA GCCCACAGCC CCTCCCAGG AGTCCTTCAG
 1401 GTTTGGGGAG GAGAAGACCA CCCCAGCCA GAAGCAGGAG CCCATTGACA
 1451 AGGAGCTGTA CCCCCTGGCC TCCCTGAGGT CCTGTTTGG CAACGACCCC
 1501 TCCTCCAGT AAAATAAAGC CCGGGCAGAT CT

(ID SEC N°:1)

Ejemplo 5

Expresión in vitro de la vacuna de gag

- 5 La expresión *in vitro* se ensayó en células humanas de rhabdomyosarcoma (RD) o células 293 transfectadas con estas construcciones. La cuantificación de gag a partir de células 293 transfectadas mostró que los vectores V1Jns-opt gag y V1Jns-tPA-opt gag produjeron gag secretada.

Ejemplo 6

10

Ensayo para determinar los linfocitos T citotóxicos contra gag del VIH

- Los procedimientos descritos en esta sección ilustran el ensayo como se usa para ratones vacunados. Un ensayo esencialmente similar puede usarse con primates, excepto porque deben establecerse líneas de células B autólogas para usarlas como células diana para cada animal. Esto puede conseguirse para humanos usando el virus de Epstein-Barr y para el mono Rhesus usando el virus del herpes B.

- Se obtienen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a partir de sangre recién extraída o del bazo usando centrifugación sobre Ficoll-Hypaque para separar los eritrocitos de los leucocitos. Para ratones pueden usarse también los ganglios linfáticos. Los LTC efectores pueden prepararse a partir de las CMSP por cultivo *in vitro* en IL-2 (20 U/ml) y concanavalina A (2 µg/ml) durante 6-12 días o usando un antígeno específico usando un número igual de células irradiadas presentadoras de antígenos. El antígeno específico puede consistir en péptidos sintéticos (9-15 aminoácidos normalmente) que son epítomos conocidos para el reconocimiento por el haplotipo del CMH de los animales usados, o construcciones del virus vaccinia modificadas para expresar el antígeno apropiado. Las células diana pueden ser singénicas o líneas celulares correspondientes al haplotipo del CMH, que han sido tratadas para presentar el antígeno apropiado como se describe para la estimulación *in vitro* de los LTC. Para los ratones Balb/c, el péptido gag de Paterson (*J. Immunol.*, 1995) se usó a una concentración de 10 µM para reestimar los LTC *in vitro*, usando esplenocitos singénicos irradiados y puede usarse a 1-10 µM para sensibilizar las células diana durante el ensayo de citotoxicidad, por incubación a 37°C durante aproximadamente dos horas antes del ensayo. Para estos ratones del haplotipo H-2^d del MCH, la línea celular de mastocitoma murino, P815, proporciona células diana adecuadas. Las células diana sensibilizadas por el antígeno se cargan con Na⁵¹CrO₄, el cual se libera del interior de las células diana al ser destruidas por los LTC, por incubación de las dianas durante 1-2 horas a 37°C (0,2 mCi para aproximadamente 5 x 10⁶ células) seguida de varios lavados de dichas células diana. Poblaciones de LTC se mezclan con las células diana en relaciones variables de efectores a dianas tales como 100:1, 50:1, 25:1, etc, se sedimentan conjuntamente y se incuban durante 4-6 horas a 37°C antes de recoger los sobrenadantes, que se ensayan después en cuanto a la liberación de radiactividad usando un contador gamma. La citotoxicidad se calcula como un porcentaje del total de cuentas que pueden liberarse de las células diana (obtenido usando un tratamiento con el 0,2% de Triton X-100), del que se ha sustraído la liberación espontánea de las células diana.

40 Ejemplo 7

Ensayo de anticuerpos específicos para gag del VIH

- Se diseñaron ensayos ELISA para detectar los anticuerpos generados contra el VIH usando cualquier proteína recombinante específica gag p24 como antígenos sustrato. Placas de microtítulo de 96 pocillos se recubrieron a 4°C durante toda la noche con el antígeno recombinante a 2 µg/ml en disolución de PBS (solución salina tamponada con fosfato) usando 50 µl/pocillo en una plataforma agitadora de balanceo. Los antígenos consistieron en gag p24 recombinante (Intracell). Las placas se lavaron cuatro veces usando tampón de lavado (PBS/0,05% Tween 20) seguido de la adición de 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo (disolución de leche evaporada Carnation al 1% en PBS/0,05% Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación por balanceo. Los presueros y sueros inmunitarios se diluyeron en tampón de bloqueo en el intervalo de diluciones deseado y se añadieron 100 µl por pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación por balanceo y después se lavaron cuatro veces con tampón de lavado. A cada muestra se añadieron entonces anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (anti-Ig de Rhesus, Southern Biotechnology Associates; anti-Ig de ratón y anti-Ig de conejo, Jackson Immuno Research), diluidos 1:2000 en tampón de bloqueo, a 100 µl/pocillo, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación por balanceo. Las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado y después se revelaron mediante la adición de 100 µl/pocillo de una disolución de o-fenilendiamina (o-PD, Calbiochem) de 1 mg/ml en tampón citrato 100 mM a pH 4,5. Las placas se leyeron determinando la absorbancia a 450 nm, tanto cinéticamente (en los primeros 10 minutos de la reacción), como en los puntos finales a 10 y a 30 minutos (lector de microplacas Thermo max, Molecular Devices).

Ejemplo 8

Ensayos de proliferación de células T

65

- Se obtuvieron CMSP y se ensayaron en función de las respuestas de memoria frente un antígeno específico como se determina por la proliferación dentro de la población de CMSP. La proliferación se monitoriza usando ³H-timidina, que se añade a los cultivos celulares durante las últimas 18-24 horas de incubación antes de su recogida. Los recogedores de

células retienen el ADN que contiene isótopos en filtros si ha habido proliferación, mientras que las células quiescentes no incorporan el isótopo, que no se retiene en el filtro en forma libre. Para cada especie de roedor o primate se aplican 4×10^5 células en placas de microtítulo de 96 pocillos, en un total de 200 μ l de medio completo (RPMI/10% suero bovino fetal). Las respuestas de proliferación de fondo se determinan usando CMSP y medio solamente, mientras que las respuestas no específicas se generan usando lectinas, como fitohemaglutinina (PHA) o concanavalina A (Con A), a concentraciones de 1-5 μ g/ml para servir de control positivo. El antígeno específico consiste en epítomos peptídicos conocidos, proteína purificada o virus inactivados. Las concentraciones de antígeno oscilan de 1-10 μ M para los péptidos y de 1-10 μ g/ml para las proteínas. La proliferación inducida por lectinas muestra un pico a los 3-5 días de la incubación de los cultivos celulares, mientras que las respuestas específicas para el antígeno muestran un pico a los 5-7 días. Una proliferación específica tiene lugar cuando las cuentas de radiación obtenidas son al menos tres veces superiores al fondo medio y se indica frecuentemente como una relación respecto al fondo o índice de estimulación (IE).

Ejemplo 9

Las estrategias que empleamos están diseñadas para inducir tanto la respuesta de linfocitos T citotóxicos (LTC) como la respuesta de anticuerpos neutralizantes contra el VIH, dirigidas principalmente contra los productos génicos de *gag* (conservado aproximadamente en el 95%) y *env* (gp160 o gp120; conservados en el 70-80%) del VIH. La proteína gp160 contiene los únicos epítomos de anticuerpos neutralizantes conocidos en la partícula del VIH, mientras que la importancia de las respuestas de LTC anti-Env y anti-*gag* se ponen de relieve por la conocida asociación del comienzo de estas inmunidades celulares con el aclaramiento de la viremia primaria después de la infección, que tiene lugar antes de la aparición de los anticuerpos neutralizantes [Koup y col., *Virology* 68:4650 (1994)], así como el papel de los LTC en el mantenimiento del estado libre de enfermedad. Aunque el VIH es conocido por su diversidad genética, esperamos obtener una mayor amplitud de anticuerpos neutralizantes, incluyendo varios genes *env* representativos derivados de aislamientos clínicos y gp41 (conservada aproximadamente en el 90%; y contiene el epítomo neutralizante más conservado 2F5), mientras que el muy conservado gen *gag* debería generar amplias respuestas de LTC cruzadas entre cepas. Dado que esta estrategia de vacuna genera fuertes inmunidades humoral y celular contra el VIH en primates no humanos, este enfoque ofrece ventajas únicas comparado con otras estrategias disponibles de vacunación contra el VIH.

A. Desarrollo de la vacuna polinucleotídica de *gag* del VIH-1

Basado en nuestros experimentos para la expresión del gen *env* del VIH, utilizando genes que constan de codones óptimos para la expresión en humanos, se diseñó y sintetizó un gen sintético de *gag* p55 (opt *gag*) que contenía un uso de codones óptimo a lo largo de todo el gen, resultando en aproximadamente 350 mutaciones silenciosas (de un total de 1500 nt) y se clonó en V1R. También se construyó una segunda forma del vector de opt *gag* que contenía la secuencia codificante del péptido señal de tPA en el extremo NH₂, similar al descrito anteriormente para el gen *env* del VIH, y también eliminaba un motivo de secuencia de localización nuclear situado en esta posición en el gen de tipo natural. Esta modificación se diseñó para analizar si la alteración de los patrones normales de tránsito intracelular para *gag* en la ruta de secreción ER/Golgi podía alterar la inmunogenicidad de la vacuna del ADN de *gag*. La adición del péptido líder de tPA a *gag* ocasionó niveles mucho mayores de secreción de *gag* y la proteína secretada migró como una forma de mayor peso molecular comparada con *gag* de tipo natural. Esto indicó que una modificación posttraduccional, probablemente glicosilación, tuvo lugar como resultado de la modificación con el péptido líder de tPA.

Los ratones que habían sido inmunizados con una cualquiera de las dos construcciones de *gag* p55 optimizado (V1R-opt *gag* $\pm$ líder de tPA) o con V1R-*gag* se analizaron en cuanto a respuestas de LTC anti-péptidos *gag* después de una inyección (dosis de vacunación = 10, 3,3 ó 1 μ g/ratón). Se generaron altos niveles de LTC anti-*gag* con los ADN de los dos V1R-opt *gag* a todas las dosis, dando V1R-tPA-opt *gag* la mayor eficiencia destructora específica (aproximadamente el 85% para E/D = 3 con la dosis de 1 μ g). La comparación de las curvas de citotoxicidad para cada dosis de ADN demostró que la vacunación con V1R-tPA-opt *gag* produjo respuestas de LTC 100 veces más fuertes que V1R *gag* (tipo natural). En general, las respuestas inmunitarias para los tres tipos de vacunas mostraron las mismas potencias relativas para las respuestas de LTC, T auxiliares y anticuerpos (en orden de mayor a menor respuesta): V1R-tPA-opt *gag* > V1R-opt *gag* > V1R *gag* (tipo natural). En resumen, las respuestas de LTC, humoral y de células T auxiliares son mucho mayores para las construcciones de *gag* optimizado, especialmente con un líder de tPA.

Ejemplo 10

60 Procedimiento de tratamiento

Una persona con necesidad de una inmunización terapéutica o profiláctica contra la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana recibe la inyección de un ADN del VIH que codifica todo o parte del gen *gag* o combinaciones del mismo con la totalidad o parte de los genes *env* o *pol*. La inyección puede ser intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o intradérmica. El ADN del VIH puede usarse como un cebador de la respuesta inmunitaria o puede usarse como un refuerzo de la respuesta inmunitaria. La inyección de ADN puede anteceder, coincidir o seguir a la inyección de la persona con una composición farmacéutica que comprende el VIH inactivado, VIH atenuado, composiciones con proteínas derivadas del VIH o combinaciones de los mismos.

Ejemplo 11

Procedimiento de tratamiento

- 5 Una persona con necesidad de un tratamiento terapéutico para la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana se trata con un agente antiviral anti-VIH o combinaciones del mismo. El individuo tratado es inyectado con las composiciones farmacéuticas con el ADN del VIH de la presente descripción.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

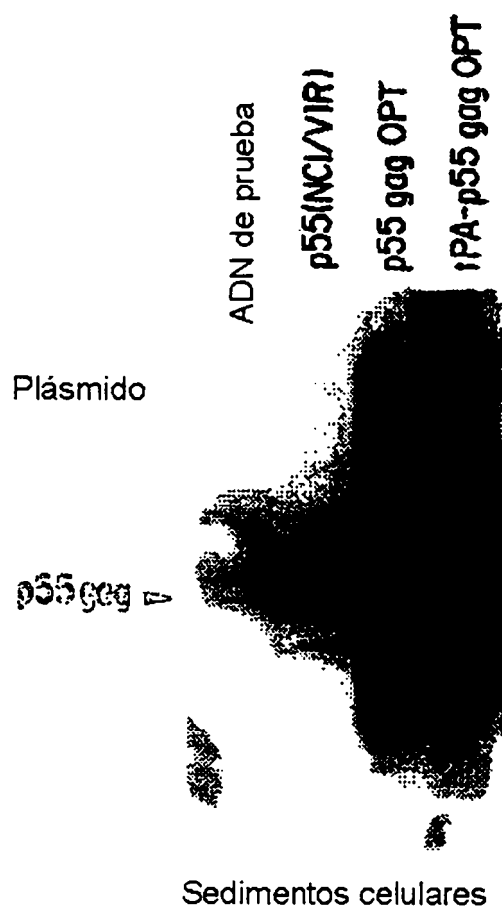
55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector de vacuna de ADN plasmídico para uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en un hospedador mamífero, comprendiendo dicho vector de vacuna de ADN plasmídico una secuencia polinucleotídica que codifica un antígeno gag del VIH, y comprendiendo dicha secuencia polinucleotídica un marco de lectura abierto completo para el antígeno gag del VIH como se establece en ID SEC N°:1.
- 10 2. El vector de vacuna de ADN plasmídico de la reivindicación 1, en el que la secuencia polinucleotídica que codifica el antígeno gag del VIH consiste en el marco de lectura abierto completo para el antígeno gag del VIH como se establece en ID SEC N°:1.
- 15 3. Un vector de vacuna de ADN plasmídico según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende un promotor inmediato-temprano de CMV operable y el intrón A de CMV del lado 5' de la secuencia polinucleotídica que codifica un antígeno gag del VIH.
- 20 4. El vector de vacuna de ADN plasmídico de la reivindicación 3, que comprende una secuencia señal de tPA del lado 3' del promotor inmediato-temprano de CMV/intrón A de CMV, y en el que la secuencia polinucleotídica que codifica un antígeno gag del VIH está en el lado 3' de la secuencia señal de tPA.
- 25 5. El vector de vacuna de ADN plasmídico de la reivindicación 3 o la reivindicación 4 que comprende además una secuencia operable de terminación de BGH en el extremo 3' de la secuencia polinucleotídica que codifica un antígeno gag del VIH.
- 30 6. Una formulación farmacéutica que comprende un vector de vacuna de ADN plasmídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. El uso de un vector de vacuna plasmídico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la preparación de un medicamento para la inducción de una respuesta inmunitaria contra el virus de la inmunodeficiencia humana en un hospedador mamífero.



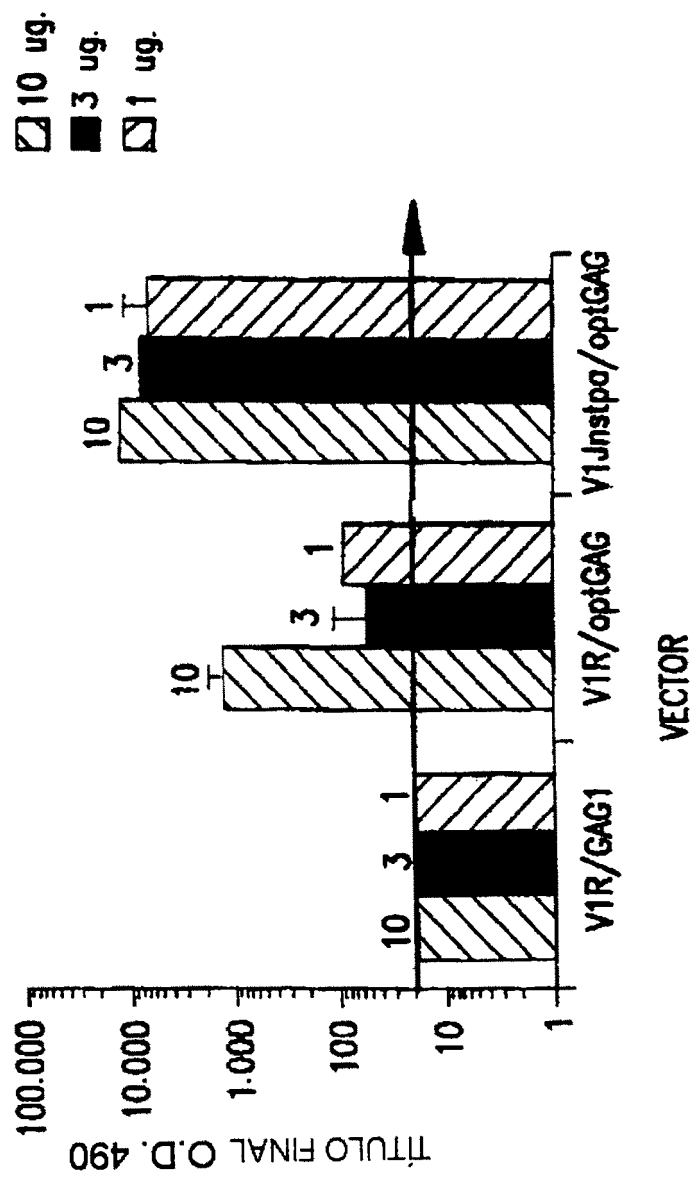


FIG. 2

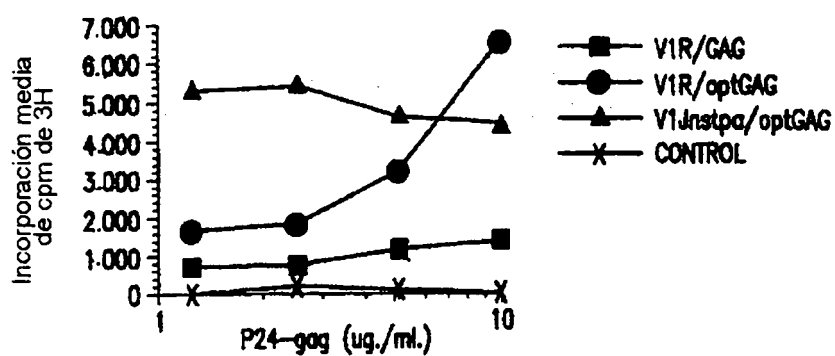


FIG. 3A

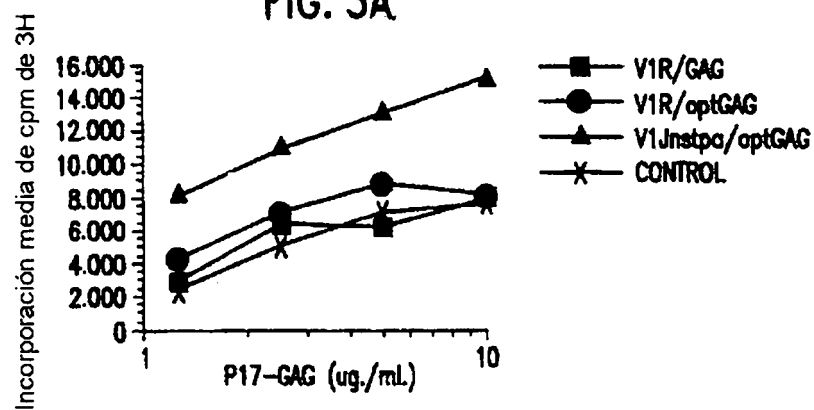


FIG. 3B

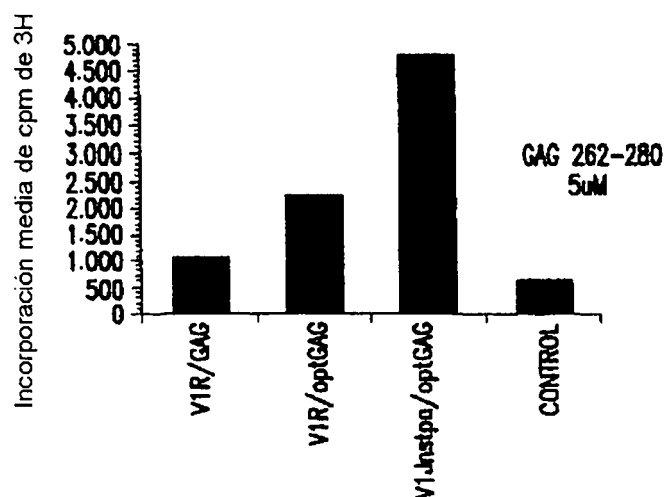


FIG. 3C

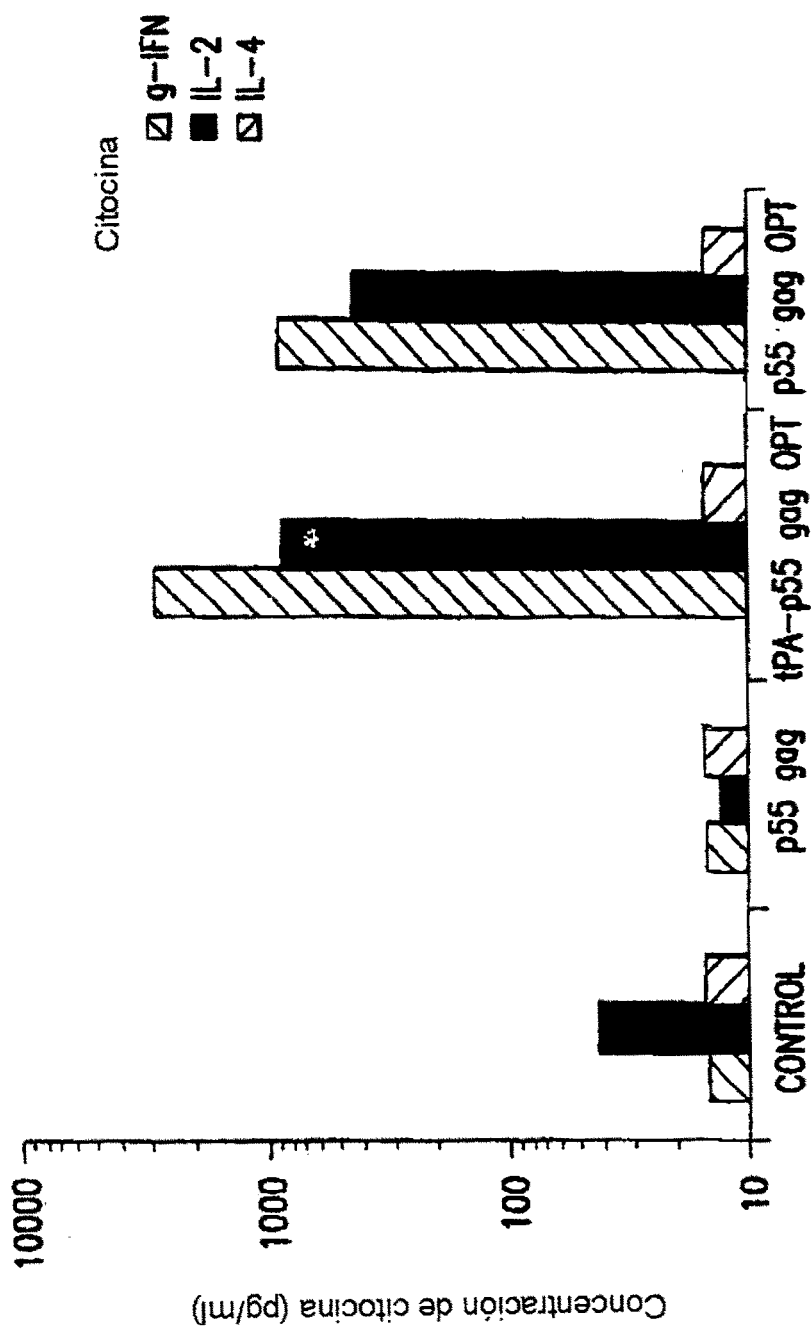


FIG. 4

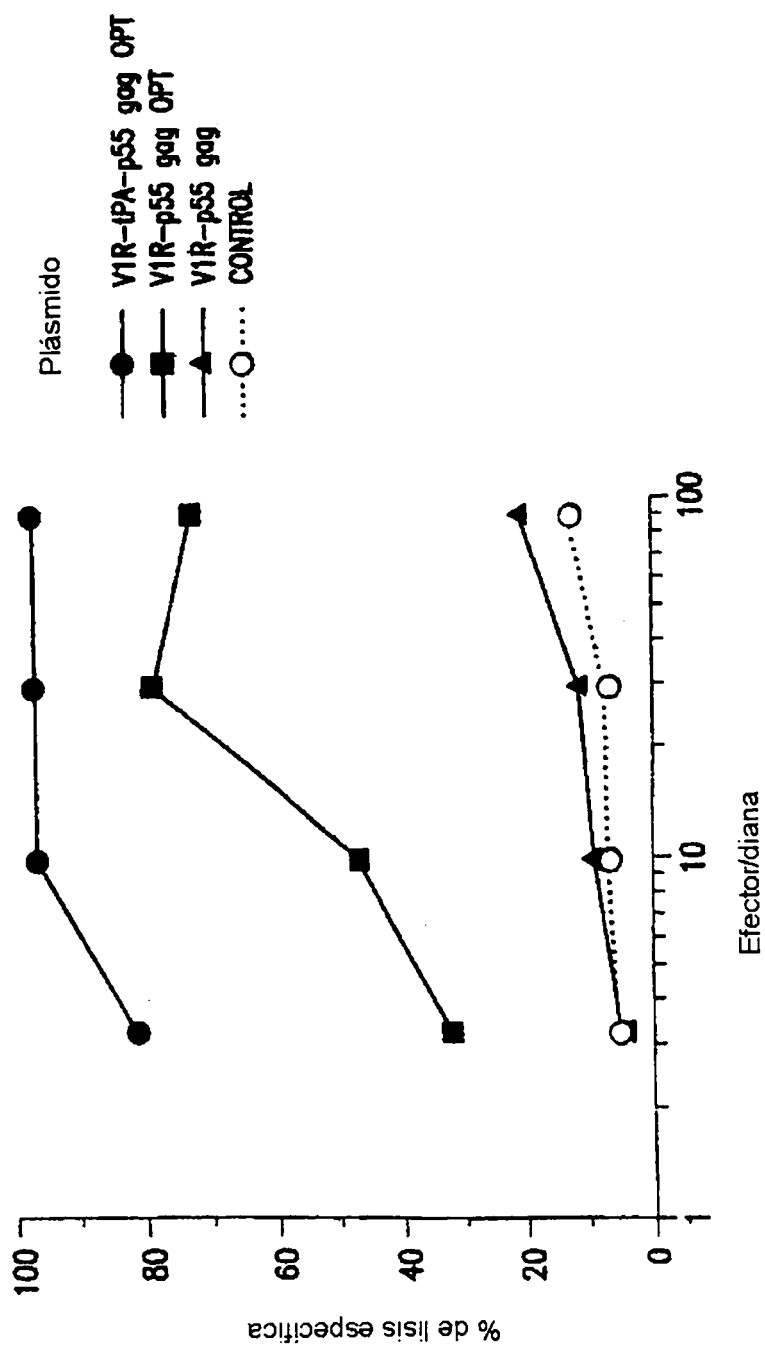


FIG. 5