



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 300**

51 Int. Cl.:

C12N 15/48 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99938094 .2**

96 Fecha de presentación : **12.08.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1105498**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.06.2001**

54 Título: **Vacuna contra el VIH.**

30 Prioridad: **12.08.1998 US 96235 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.10.2009

73 Titular/es: **University of Western Ontario
Office of Industry Liaison
Stevenson-Lawson Building, Room 319
London, Ontario N6A 5B8, CA**

72 Inventor/es: **Kang, Chil-Yong y
Li, Yan**

74 Agente: **Lazcano Gainza, Jesús**

ES 2 327 300 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra el VIH.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a una vacuna novedosa para su uso en el tratamiento del SIDA así como a métodos para la producción de la misma. Más particularmente, la invención se refiere a una vacuna que puede producirse en grandes cantidades y que es no citolítica y no virulenta.

10 **Antecedentes de la invención**

Pese a los recientes avances en la terapia antiviral, no hay cura permanente para el SIDA o la infección por VIH. La terapia farmacológica es un área prometedora de investigación en lo que se refiere a proporcionar una terapia eficaz, sin embargo debido a los efectos secundarios, el cumplimiento y el gasto, el progreso no ha sido rápido. Para agravar estas dificultades está el hecho de que la disponibilidad de tales fármacos es limitada en países en desarrollo en los que se estima que se producirá un 90% de las infecciones por VIH hacia el año 2000.

Debido al éxito que han tenido las vacunas para las enfermedades infecciosas, siendo el más notable contra la viruela y la poliomielitis, continúa la búsqueda de una vacuna eficaz contra el SIDA. Se ha intentado una variedad de enfoques. De hecho, la mayor parte del desarrollo de la vacuna contra el VIH-1 se ha concentrado en las vacunas de subunidades. La dificultad con el enfoque de la vacuna de subunidades ha sido la capacidad para producir inmunidad óptima. En la actualidad, no se conoce exactamente qué componentes del/de los antígeno(s) del VIH y del sistema inmunitario son necesarios para la protección frente a la infección natural.

Los ensayos iniciales con vacunas han considerado inmunógenos basados en proteínas de subunidades recombinantes, tal como la proteína gp120 de la envuelta del VIH-1. Los resultados de este enfoque han sido decepcionantes, aunque los regímenes de inmunización que emplean tanto virus recombinantes vivos como proteínas de subunidades han provocado, en algunos individuos, tanto CTL CD8+ específicos de la envuelta como anticuerpos neutralizantes frente a la envuelta del VIH-1 (Cooney E. L., *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 1882-86; McElrath M. J., *et al.* J Infect Dis. 169: 41-47 (1994); Graham B. S., *et al.* J Infect Dis 166: 244-52 (1992); y Graham B. S., *et al.* J Infect Dis 167: 533-37 (1993)).

Los estudios de la glicoproteína de la envuelta del VIH no han proporcionado un camino plausible hacia el desarrollo de vacunas. Por ejemplo, con respecto a la gp120 del VIH-1, se ha encontrado que la secuencia señal de la glicoproteína gp120 de la envuelta del VIH-1, que se denomina NSS para la secuencia señal natural del VIH-1, está asociada con el grado de secreción de la gp120. En cuanto a esto se ha mostrado que la sustitución de la NSS con la secuencia señal de o bien melitina o bien IL-3 da lugar a una producción de alto nivel y una secreción eficaz de la gp120 (Li, Y., *et al.* Virology 204: 266-278 (1994); y Li, Y., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 9606-9611 (1996). Sin embargo, no se conoce si la secuencia señal de la gp120 del VIH-1 tiene un papel que desempeñar en la patogenicidad del virus.

La vía preferida es el uso de vacunas de virus inactivado, completo, tal como la vacuna del virus poliomelítico inactivado, o vacunas de virus vivo atenuado, tal como la vacuna del virus poliomelítico oral. Desgraciadamente, este enfoque en la búsqueda de una vacuna contra el virus del SIDA parece ser demasiado peligroso, dado el potencial de producir problemas tales como el "incidente Cutter" en el que la inactivación inadecuada de la vacuna antipoliomelítica dio como resultado una poliomielitis clínica real. Un enfoque previo ha incorporado el uso de VIH-1 de tipo natural, sin embargo, fue imposible producir una cantidad adecuada de virus para virus completo inactivado porque el rendimiento de las líneas de células T infectadas con VIH-1 era muy bajo (Coffin *et al.* Retroviruses, CSH Press, 1989). Suponiendo que es posible aumentar el rendimiento, también hay una preocupación acerca de la responsabilidad potencial de hacer crecer grandes volúmenes de VIH-1 infeccioso.

Con respecto a las vacunas contra el VIH, se sabe que la delección del gen *nef* del VIH atenúa el virus. Desrosiers y sus asociados han demostrado que la vacunación de macacos con VIS con *nef* delecionado protegía contra la exposición al VIS de tipo natural (Daniels, M. D. *et al.* Science 258:1938 (1992); Desrosiers, R. C., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6353 (1989)) y otros han demostrado que el gen *nef* es prescindible para la replicación del VIS y el VIH (Daniels, M. D. *et al.* Science 258: 1938 (1992); Gibbs, J. S., *et al.* AIDS Res. and Human Retroviruses 10:343 (1994); Igarashi, T., *et al.* J. Gen. Virol. 78: 985 (1997); Kestler III, H. W., *et al.* Cell 65:651 (1991)). Además, la delección del gen *nef* convierte al virus en no patogénico en el huésped normalmente susceptible (Daniels, M. D. *et al.* Science 258:1938 (1992)). Aunque esta delección no proporciona una forma del virus que es posible que se produzca en grandes cantidades. Tampoco se ha mostrado que esta forma del virus sea segura para la producción de una vacuna.

En consecuencia, lo que se necesita es una vacuna que no sea virulenta así como que pueda producirse en grandes cantidades, y sin las preocupaciones y problemas previos de usar VIH-1 de tipo natural.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han encontrado que la secuencia señal natural (NSS) de la glicoproteína gp120 de la envuelta del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) es responsable de la apoptosis así como de la necrosis general de las células infectadas con el virus. Los inventores también han encontrado que la sustitución de la NSS con una secuencia señal más eficaz, tal como la secuencia señal de melitina o IL-3, genera un VIH-1 no citolítico que puede tener replicación y secreción sumamente eficaces de gp120. En consecuencia, la presente invención se refiere a un retrovirus no citolítico que puede realizar replicación viral sumamente eficaz y que por tanto es útil en la preparación de una vacuna retroviral. En su aspecto más amplio, la presente invención proporciona un retrovirus no citolítico en el que la secuencia señal natural de la glicoproteína de la envuelta del virus se modifica para que sea no citolítico o se sustituye con una secuencia señal no citolítica.

Según una realización, la modificación de la secuencia señal natural de una glicoproteína de la envuelta del retrovirus da como resultado una replicación más eficaz del virus, preferiblemente del VIH. Por consiguiente, la presente invención proporciona un VIH-1 recombinante no citolítico que puede realizar replicación sumamente eficaz en el que la NSS de la glicoproteína de la envuelta del virus se modifica suficientemente para prevenir el daño celular producido por el virus, preferiblemente mediante la eliminación de aminoácidos cargados positivamente, incluso más preferiblemente, dando como resultado tal eliminación o modificación no más de uno (1) y preferiblemente cero (0) aminoácidos cargados positivamente.

En otra realización, la sustitución de la secuencia señal natural da como resultado una replicación más eficaz del VIH. Por consiguiente, la presente invención proporciona un VIH-1 recombinante no citolítico que puede realizar replicación sumamente eficaz en el que la NSS de la glicoproteína de la envuelta del virus se sustituye con una secuencia señal no citolítica y más eficaz, que contiene preferiblemente no más de uno y preferiblemente cero aminoácidos cargados positivamente, más preferiblemente la secuencia señal de melitina (MSS) o la secuencia señal de IL-3 (ILSS).

Según otra realización, un retrovirus esencialmente no citolítico también es no virulento. Por consiguiente, la presente invención proporciona un retrovirus no virulento, no citolítico que comprende una adición o delección de secuencia de ácido nucleico que convierte al virus en no virulento y en el que la secuencia señal natural de la glicoproteína de la envuelta del virus o bien se modifica o bien se sustituye para proporcionar una secuencia señal no citolítica.

En una realización preferida se proporciona un retrovirus no virulento, no citolítico, que contiene una delección suficiente del gen *nef* para convertir el virus en no patogénico, y en el que la NSS de la glicoproteína gp120 de la envuelta del virus se modifica o se sustituye para proporcionar una secuencia señal más eficaz.

Según una realización específica de la invención se proporciona un VIH-1 no virulento, no citolítico que puede realizar replicación sumamente eficaz, con delección suficiente del gen *nef* para convertir el virus en no patogénico en un huésped normalmente susceptible y en el que la NSS de la glicoproteína gp120 de la envuelta del virus se sustituye con una secuencia señal más eficaz, preferiblemente MSS o ILSS.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una vacuna contra una infección retroviral que comprende un retrovirus recombinante no citolítico en el que la NSS de la glicoproteína de la envuelta del virus se modifica para proporcionar una NSS no citolítica o se sustituye con una NSS no citolítica. El retrovirus recombinante puede proporcionar protección frente al retrovirus de tipo natural pese a las modificaciones genéticas incorporadas en el retrovirus recombinante, ya que contendrá los epítomos conformacionales necesarios para generar inmunidad protectora. Preferiblemente, el retrovirus es el VIH, más preferiblemente todos los clados diferentes del VIH-1.

La presente invención también incluye un método de prevención de la apoptosis inducida por infección retroviral que comprende administrar una cantidad suficiente de antagonista para la NSS a un animal con necesidad del mismo, preferiblemente un anticuerpo o molécula antisentido.

La presente invención también incluye un método de prevención o tratamiento de una infección retroviral que comprende administrar un retrovirus recombinante no citolítico, en el que la NSS de la glicoproteína de la envuelta del virus se modifica para proporcionar una NSS no citolítica o se sustituye con una NSS no citolítica, a un animal con necesidad del mismo.

La presente invención incluye además un método de destrucción de células denominadas en el presente documento células "diana", preferiblemente células cancerosas, que comprende administrar un virus recombinante, específico para las células diana, que se ha obtenido mediante ingeniería genética para contener la NSS del VIH-1, a un animal con necesidad del mismo.

La presente invención incluye además una célula transfectada con un retrovirus recombinante de la presente invención.

Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención se facilitan a modo de ilustración únicamente, puesto que a los expertos en la

técnica les resultarán evidentes diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y el alcance de la invención a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora con relación a los dibujos en los que:

La figura 1 son fotografías de examen microscópico de células de SF2/insecto infectadas con baculovirus recombinante (AcVPN).

La figura 2 proporciona gráficos que ilustran los efectos de la secuencia señal de *env* de VIH-1 sobre la muerte celular.

La figura 3 muestra resultados de electroforesis en gel de agarosa que proporcionan un análisis de la fragmentación del ADN de células SF21 infectadas con AcVPN recombinante que expresa gp120 con diferentes secuencias señal.

La figura 4 muestra electroforesis en gel de agarosa que proporciona un análisis de la fragmentación del ADN de células SF21 infectadas con baculovirus recombinante que expresa la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VEV-G) con o sin la secuencia señal natural de *env* de VIH-1.

La figura 5 es una ilustración de una construcción de plásmido recombinante de la proteína VEV-G sin la secuencia señal.

La figura 6 es una ilustración de una construcción de la gp120 del VIH-1 que contiene la NSS.

La figura 7 es una ilustración del plásmido pBSK VEV-G-NSS; este plásmido contiene la secuencia génica de la proteína VEV-G con la secuencia señal natural de la proteína de *env* del VIH-1.

La figura 8 es una ilustración de una construcción de plásmido recombinante en la que el sitio EcoRI-BamHI contiene el fragmento subclonado de pNL4-3 en el vector pBluescript SK.

La figura 9 es una ilustración de una construcción de plásmido recombinante que contiene un fragmento de 2245 pb clonado en los sitios PstI+BamHI.

La figura 10 es una ilustración de una construcción de plásmido recombinante que contiene productos de PCR digeridos por EcoRI y Pst-I (fragmento de 445 pb).

La figura 11 es una ilustración de un plásmido recombinante, construcción que contiene un oligonucleótido que codifica o bien para la secuencia señal de melitina o bien para la secuencia señal de interleucina-3.

La figura 12 es una ilustración de una construcción de plásmido recombinante que contiene un fragmento de 421 pb aislado de la secuencia codificante del *gen nef* en los sitios Bam HI-XhoI del vector.

Descripción detallada de la invención

Retrovirus recombinante

Tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, la presente invención se refiere a un retrovirus no citolítico en el que la secuencia señal natural (NSS) de la glicoproteína gp120 de la envuelta del VIH-1 se modifica para que sea esencialmente no citolítico o se sustituye con una secuencia señal no citolítica. El término "esencialmente no citolítico" tal como se usa en el presente documento significa que el retrovirus no mata ni daña significativamente las células que infecta.

En una realización, la presente invención proporciona un VIH-1 recombinante no citolítico que puede realizar replicación sumamente eficaz en el que la NSS de la glicoproteína de la envuelta del virus se modifica suficientemente para prevenir el daño celular producido por el virus, preferiblemente mediante la eliminación de aminoácidos cargados positivamente, incluso más preferiblemente, dando como resultado tal eliminación o modificación no más de uno (1) y preferiblemente cero (0) aminoácidos cargados positivamente. Los aminoácidos cargados positivamente que se modifican o se sustituyen incluyen lisina y arginina.

En otra realización, la sustitución de la secuencia señal natural da como resultado una replicación más eficaz del VIH. Por consiguiente, la presente invención proporciona un VIH-1 recombinante no citolítico que puede realizar replicación sumamente eficaz en el que la NSS de la glicoproteína de la envuelta del virus se sustituye con una secuencia señal no citolítica y más eficaz. En una realización preferida, la sustitución de la NSS de la glicoproteína de la envuelta del VIH-1 con la secuencia señal o bien de melitina o bien de IL-3 disminuye la citotoxicidad del retrovirus. Como tal, la presente invención incluye dentro de su alcance la sustitución de la NSS con cualquier secuencia señal que convierta al retrovirus en no citolítico. Los inventores también han mostrado que la sustitución de la NSS con las secuencias señal de melitina o IL-3 da como resultado un mayor nivel de producción y secreción de la gp120, además

de la citotoxicidad reducida. Los inventores también han mostrado que la sustitución de la NSS da como resultado la delección parcial del gen *vpu*. Los estudios han mostrado que el gen *vpu* puede deleccionarse completamente sin ningún efecto medible en la capacidad para replicarse del virus (James *et al.* AIDS Res. Human Retrovirus 10:343-350, 1994).

5

En otra realización, el retrovirus se convierte en no virulento. En una realización preferida, el virus se convierte en no virulento mediante la delección del gen *nef*. Por consiguiente, la presente invención proporciona un retrovirus no virulento, esencialmente no citolítico que contiene una delección suficiente del gen *nef* para convertir el virus en no patogénico y en el que la secuencia codificante de la glicoproteína gp120 de la envuelta del virus se sustituye con una secuencia señal más eficaz. Tal como se usa en el presente documento, "delección suficiente" significa delección de suficiente cantidad de la secuencia para prevenir la transcripción y de ese modo la producción del producto proteico *nef*.

10

En una realización adicional, el retrovirus se convierte en no virulento, no citolítico, y contiene una delección suficiente del gen *nef* y del gen *vpu* para convertir el virus en no patogénico.

15

El retrovirus recombinante de la presente invención puede ser cualquier retrovirus incluyendo VIH-1, VIH-2, VIS, VLTH-1. Preferiblemente el retrovirus es un virus de la inmunodeficiencia humana seleccionado de VIH-1 y VIH-2, más preferiblemente, el retrovirus es el VIH-1.

20

Los retrovirus recombinantes de la presente invención pueden prepararse usando técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el retrovirus puede introducirse en una célula huésped en condiciones adecuadas para la replicación y la expresión del retrovirus en el huésped. Por consiguiente, la presente invención también proporciona una célula transfectada con un retrovirus recombinante en el que la secuencia señal natural de la glicoproteína gp120 de la envuelta del virus se modifica para proporcionar un virus no citotóxico o se sustituye con una secuencia señal no citolítica. La célula es preferiblemente un linfocito T, más preferiblemente una célula T que no proviene de una línea celular transformada.

25

El retrovirus no citolítico y no virulento de la presente invención será extremadamente útil para la prevención y el tratamiento de una infección retroviral ya que el retrovirus puede producirse en grandes cantidades y de una forma que no es patogénica para el huésped, preferiblemente el virus de la invención será útil para el desarrollo de vacunas contra el VIH/SIDA para la prevención y el tratamiento de infecciones por VIH. Por consiguiente, la presente invención también proporciona un método de prevención o tratamiento de una infección retroviral que comprende administrar una cantidad eficaz de un retrovirus recombinante inactivado no citolítico no virulento de la presente invención a un animal con necesidad del mismo. El término "cantidad eficaz" tal como se usa en el presente documento significa una cantidad eficaz y a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado. El término "animal" tal como se usa en el presente documento incluye todos los miembros del reino animal incluyendo los mamíferos, preferiblemente los seres humanos.

30

En una realización preferida, la presente invención proporciona un método de prevención o tratamiento de una infección retroviral que comprende administrar una cantidad eficaz de un retrovirus recombinante inactivado esencialmente no citolítico no virulento a un animal con necesidad del mismo, en el que la secuencia señal natural de la glicoproteína de la envuelta del virus, preferiblemente gp120, se modifica para proporcionar una secuencia señal no citolítica, convirtiéndose preferiblemente el virus en virulento mediante la delección del gen *nef*. Según una realización preferida, la modificación para proporcionar una NSS no citolítica da como resultado no más de un aminoácido cargado positivamente en la secuencia NSS, más preferiblemente cero aminoácidos cargados positivamente. Lo más preferiblemente, el animal es un ser humano, preferiblemente el retrovirus es el VIH-1.

35

En una realización preferida adicional, la presente invención proporciona un método de prevención o tratamiento de una infección retroviral que comprende administrar una cantidad eficaz de un retrovirus recombinante inactivado no citolítico no virulento a un animal con necesidad del mismo, en el que la secuencia señal natural de la glicoproteína de la envuelta del virus, preferiblemente gp120, se sustituye con una secuencia señal no citolítica, convirtiéndose preferiblemente el virus en no virulento mediante la delección del gen *nef*. Lo más preferiblemente, el animal es un ser humano, preferiblemente el retrovirus es el VIH-1.

40

Según una realización preferida del método en el que se sustituye la NSS, la secuencia señal no citolítica se selecciona del grupo que consiste en la secuencia de melitina y en la secuencia señal de IL-3.

55

Vacunas

60

La presente invención incluye además una vacuna que comprende una cantidad eficaz de un retrovirus no citolítico y uno no virulento en el que la secuencia señal natural de la glicoproteína de la envuelta del virus, preferiblemente gp120, se sustituye con una secuencia señal no citolítica y el virus se convierte en no virulento mediante la delección de una parte suficiente del gen *nef*. El retrovirus también puede tener una parte del gen *vpu* deleccionada como resultado de la sustitución de la NSS. Preferiblemente, la secuencia señal no citolítica se selecciona del grupo que consiste en la secuencia de melitina y la secuencia señal de IL-3.

65

Según una realización, la modificación de la secuencia señal natural de una glicoproteína de la envuelta del retrovirus da como resultado una replicación más eficaz del virus, preferiblemente VIH. Por consiguiente, la presente invención proporciona un VIH-1 recombinante no citolítico que puede realizar replicación sumamente eficaz en el que la NSS de la glicoproteína de la envuelta del virus se modifica suficientemente para prevenir el daño celular producido por el virus, preferiblemente mediante la eliminación de aminoácidos cargados positivamente, incluso más preferiblemente, dando como resultado tal eliminación o modificación no más de un (1) aminoácido cargado positivamente, más preferiblemente no más de cero (0) aminoácidos cargados positivamente.

En otra realización, la sustitución de la secuencia señal no citolítica da como resultado una replicación más eficaz del VIH. Por consiguiente, la presente invención proporciona una vacuna compuesta por un VIH-1 recombinante no citolítico que puede realizar replicación sumamente eficaz en el que la NSS de la glicoproteína de la envuelta del virus se sustituye con una secuencia señal no citolítica y más eficaz, que contiene preferiblemente no más de un aminoácido positivo, preferiblemente la secuencia señal de melitina (MSS) o la secuencia señal de IL-3 (ILSS).

Según otra realización, un retrovirus esencialmente no citolítico también es no virulento, preferiblemente a través de la delección del gen *nef*. Por consiguiente, la presente invención proporciona una vacuna que comprende un retrovirus no virulento, esencialmente no citolítico que comprende una adición o delección de secuencia de ácido nucleico que convierte al virus en no virulento y en la que la secuencia señal natural de la glicoproteína de la envuelta del virus o bien se modifica o bien se sustituye para proporcionar una secuencia señal esencialmente no citolítica.

Alternativamente, la vacuna puede comprender una cantidad eficaz de un retrovirus no virulento y no citolítico en el que la secuencia señal natural de la glicoproteína gp120 de la envuelta del virus se modifica para reducir el número de aminoácidos positivos hasta no más de un aminoácido cargado positivamente, preferiblemente no más de cero aminoácidos cargados positivamente y el virus se convierte en no virulento mediante la delección de una parte suficiente del gen *nef*.

Por consiguiente, la presente invención también incluye un método de prevención o tratamiento de una infección retroviral que comprende administrar una vacuna de la presente invención a un animal con necesidad del mismo. Tal como se usa en el presente documento, “vacuna” incluye todas las vacunas profilácticas y terapéuticas. Según una realización, la vacuna contiene un retrovirus recombinante no virulento y no citolítico, en el que la NSS de la glicoproteína de la envuelta del virus se modifica para proporcionar una NSS no citolítica o se sustituye con una NSS no citolítica y el virus se convierte en no virulento mediante la delección de una parte suficiente del gen *nef*.

Las composiciones de vacuna de la invención son adecuadas para su administración a sujetos de una forma biológicamente compatible *in vivo*. La expresión “forma biológicamente compatible adecuada para la administración *in vivo*” tal como se usa en el presente documento significa una forma de la sustancia que va a administrarse en la que cualquier efecto tóxico queda compensado por los efectos terapéuticos. Las sustancias pueden administrarse a cualquier animal, preferiblemente a seres humanos.

Las vacunas de la presente invención pueden contener adicionalmente diluyentes, adyuvantes y/o vehículos adecuados. Preferiblemente, las vacunas contienen un adyuvante que puede potenciar la inmunogenicidad de la vacuna *in vivo*. El adyuvante puede seleccionarse de muchos adyuvantes conocidos en la técnica incluyendo la parte de lípido A de la endotoxina de las bacterias Gram negativas, dimicolato de trehalosa de micobacterias, el fosfolípido lisolecitina, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA), ciertos polímeros de bloque lineales de polioxipropileno-polioxietileno (POP-POE), hidróxido de aluminio y liposomas. Las vacunas también pueden incluir citocinas que se sabe que potencian la respuesta inmunitaria incluyendo CM-CSF, IL-2, IL-12, TNF e IFN γ .

La dosis de la vacuna puede variar según factores tales como el estado patológico, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Puede ajustarse el régimen de dosificación para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas diariamente o la dosis puede reducirse proporcionalmente tal como indiquen las exigencias de la situación terapéutica. La dosis de la vacuna también puede variarse para proporcionar una respuesta a la dosis preventiva óptima dependiendo de las circunstancias.

Las vacunas pueden administrarse de cualquier manera conveniente tal como mediante inyección (subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc.), administración oral, inhalación, administración transdérmica (tal como pomada o crema tópica, etc.) o aplicaciones de supositorio.

Prevención de la apoptosis

La presente invención también incluye un método de prevención de que la NSS de un retrovirus ejerza sus efectos apoptóticos sobre una célula, apoptosis inducida por una infección retroviral. Por consiguiente, la presente invención proporciona un método de prevención o inhibición de la apoptosis que comprende administrar una cantidad suficiente de antagonista para la NSS a un animal con necesidad del mismo. El antagonista puede ser cualquier sustancia que pueda inhibir el gen de la NSS o su producto proteico al que se hace referencia en el presente documento como “proteína de NSS”, preferiblemente el antagonista es un anticuerpo o una molécula antisentido.

En una realización, el antagonista es una sustancia que inhibe la proteína de NSS tal como un anticuerpo específico para la proteína de NSS. Los anticuerpos frente a la proteína de NSS pueden prepararse usando técnicas conocidas en la técnica tales como las descritas por Kohler y Milstein, *Nature* 256, 495 (1975) y en las patentes estadounidenses números RE 32.011, 4.902.614, 4.543.439 y 4.411.993 (véanse también *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKearn, y Bechtol (eds.), 1980, y *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Dentro del contexto de la presente invención, se entiende que los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab y F(ab')₂) y parejas de unión producidas de manera recombinante. En consecuencia, la presente invención proporciona un método de inhibición de los efectos de la NSS de un retrovirus que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo que inhibe la proteína de NSS.

Además de los anticuerpos, también pueden usarse otros antagonistas o ligandos que se unen a la proteína de NSS y que inhiben su función. Pueden identificarse ligandos de la proteína de NSS sometiendo a ensayo una muestra para péptidos que se une a la proteína de NSS. Puede usarse cualquier sistema o método de ensayo que detecte interacciones proteína-proteína, incluyendo co-inmunoprecipitación, reticulación y co-purificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Pueden someterse a prueba muestras biológicas y bibliotecas comercialmente disponibles para péptidos de unión a la proteína de NSS. Por ejemplo, puede usarse proteína de NSS marcada o proteína de NSS soluble para sondear bibliotecas de presentación en fagos. Además, pueden usarse anticuerpos que se unen a la proteína de NSS para aislar otros péptidos con afinidad de unión a la proteína de NSS. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos marcados para sondear bibliotecas de presentación en fagos o muestras biológicas. Además, puede usarse una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de NSS para sondear muestras biológicas o bibliotecas para ácidos nucleicos que codifican para ligandos o proteínas de unión a la proteína de NSS.

En otra realización, el antagonista de NSS es un oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión de la proteína de NSS. En los métodos de la presente invención pueden usarse oligonucleótidos antisentido que son complementarios a una secuencia de ácido nucleico de un gen de la proteína de NSS para inhibir la proteína de NSS.

En consecuencia, la presente invención proporciona un método de inhibición de los efectos de la NSS de un retrovirus que comprende administrar una cantidad eficaz de un oligonucleótido antisentido que es complementario a una secuencia de ácido nucleico de un gen de la proteína de NSS a un animal con necesidad del mismo. Preferiblemente, el retrovirus es el VIH-1.

El término oligonucleótido antisentido tal como se usa en el presente documento significa una secuencia de nucleótidos que es complementaria a su diana.

El término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de monómeros de nucleósido o nucleótido que consisten en bases, azúcares y uniones entre azúcares (estructura principal) que se producen de manera natural. El término también incluye oligómeros modificados o sustituidos que comprenden monómeros que no se producen de manera natural o partes de los mismos, que funcionan de manera similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos pueden preferirse con respecto a las formas que se producen de manera natural debido a propiedades tales como captación celular potenciada, o estabilidad aumentada en presencia de nucleasas. El término también incluye oligonucleótidos quiméricos que contienen dos o más regiones químicamente distintas. Por ejemplo, los oligonucleótidos quiméricos pueden contener al menos una región de nucleótidos modificados que confieren propiedades beneficiosas (por ejemplo, resistencia a nucleasas aumentada, captación aumentada en las células), o dos o más oligonucleótidos de la invención pueden unirse para formar un oligonucleótido quimérico.

Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención pueden ser ácidos ribonucleico o desoxirribonucleico y pueden contener bases que se producen de manera natural incluyendo adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo. Los oligonucleótidos también pueden contener bases modificadas tales como xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo, 2-propilo y otras alquiladeninas, 5-halouracilo, 5-halocitosina, 6-azauracilo, 6-azacitosina y 6-azatimina, pseudouracilo, 4-tiouracilo, 8-halo adenina, 8-amino adenina, 8-tiol adenina, 8-tiolalquiladeninas, 8-hidroxi adenina y otras adeninas 8-sustituidas, 8-haloguaninas, 8-aminoguanina, 8-tiolguanina, 8-tiolalquilguaninas, 8-hidroxi guanina y otras guaninas 8-sustituidas, otros aza- y desazauracilos, timidinas, citosinas, adeninas o guaninas, 5-trifluorometiluracilo y 5-trifluorocitosina.

Otros oligonucleótidos antisentido de la invención pueden contener heteroátomos de oxígeno, fósforo modificado en la estructura principal de fosfato, uniones entre azúcares de cicloalquilo o alquilo de cadena corta o uniones entre azúcares heterocíclicas o heteroatómicas de cadena corta. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido pueden contener fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos y fosforoditioatos. En una realización de la invención hay uniones de enlaces de fosforotioato entre de la cuarta a la sexta bases del extremo 3' terminal. En otra realización, los enlaces de fosforotioato unen todos los nucleótidos.

Los oligonucleótidos antisentido de la invención también pueden comprender análogos de nucleótidos que pueden adaptarse mejor como reactivos terapéuticos o experimentales. Un ejemplo de un análogo de oligonucleótido es un ácido nucleico peptídico (PNA) en el que la estructura principal de desoxirribosa (o ribosa) - fosfato en el ADN (o el ARN) se sustituye con una estructura principal de poliamida que es similar a la encontrada en péptidos (P. E. Nielsen, *et al Science* 1991, 254, 1497). Se ha mostrado que los análogos de PNA son resistentes a la degradación mediante enzimas y que tienen vidas prolongadas *in vivo* e *in vitro*. Los PNA también se unen más fuertemente a una secuencia

de ADN complementaria debido a la falta de repulsión de cargas entre la hebra de PNA y la hebra de ADN. Otros oligonucleótidos pueden contener nucleótidos que contienen estructuras principales poliméricas, estructuras principales cíclicas o estructuras principales acíclicas. Por ejemplo, los nucleótidos pueden tener estructuras principales de morfolino (patente estadounidense número 5.034.506). Los oligonucleótidos también pueden contener grupos tales como grupos indicadores, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido antisentido. Los oligonucleótidos antisentido también pueden tener miméticos de azúcares.

Las moléculas de ácido nucleico antisentido pueden construirse usando reacciones de ligamiento enzimáticas y de síntesis química usando procedimientos conocidos en la técnica. Las moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención o un fragmento de las mismas, pueden sintetizarse químicamente usando nucleótidos que se producen de manera natural o nucleótidos modificados de diversas formas diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado con ARNm o el gen nativo, por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Las secuencias antisentido pueden producirse biológicamente usando un vector de expresión introducido en las células en la forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado en el que las secuencias antisentido se producen bajo el control de una región reguladora de alta eficacia, cuya actividad puede determinarse por el tipo celular en el que se introduce el vector.

Además, la presente invención también contempla un método para someter a ensayo una sustancia que inhibe la actividad de la NSS de un retrovirus que comprende hacer reaccionar un retrovirus que contiene una NSS con una sustancia de prueba, en condiciones que permiten la inhibición de la NSS, someter a ensayo la capacidad del retrovirus para inducir la apoptosis, y compararla con la capacidad para inducir apoptosis obtenida en ausencia de la sustancia de prueba, para determinar el efecto de la sustancia sobre la NSS del retrovirus.

25 *Apoptosis en células cancerosas*

La presente invención incluye además un método para matar o destruir células diana, preferiblemente células cancerosas, que comprende administrar a la célula o células una cantidad eficaz de un virus recombinante, preferiblemente VEV o cualquier otro virus de ARN portador, específico para las células diana, que contiene preferiblemente la NSS del VIH-1. Preferiblemente, las células están en un animal que lo necesita, lo más preferiblemente en un ser humano. Las células que están infectadas o son cancerosas expresan marcadores específicos celulares para los que puede incorporarse un sitio de reconocimiento complementario en un vector adecuado en el que se ha incorporado la NSS del VIH-1. Este enfoque se ha realizado con virus de la estomatitis vesicular (VEV) que se ha diseñado mediante ingeniería para incorporar los genes para CD4 y CXCR4 dirigiendo así el VEV modificado para infectar células infectadas con VIH-1 (Schnell, M.J. *et al.* Cell 90: 849-857 (1997)). En consecuencia, la presente invención proporciona un método para destruir células diana, tales como células cancerosas, que comprende administrar un virus recombinante que contiene la NSS y un sitio de reconocimiento específico para las células diana, a un animal que lo necesita. En una realización, la NSS del VIH-1 se incorpora en un vector de tipo VEV modificado que se ha dirigido a un tipo de célula cancerosa específica basándose en un antígeno de superficie de célula cancerosa particular proporcionando así al VEV la capacidad para inducir apoptosis en las células cancerosas seleccionadas como diana.

Los siguientes ejemplos no limitativos son ilustrativos de la presente invención:

45 **Ejemplos**

Ejemplo 1

50 *Construcción de baculovirus recombinantes*

La construcción de baculovirus recombinantes que expresan gp120-NSS, gp120-MSS y gp120-ΔS de VIH-1 se ha descrito previamente por Li *et al.* (Virology 204: 266-278, 1994).

55 La construcción de baculovirus recombinantes que expresan la glicoproteína (G) de VEV_{Ind} se describió previamente por Bailey *et al.* (Virology 169: 323-331, 1989).

Construcción de baculovirus recombinantes que expresan proteína G de VEV_{Ind} con la secuencia señal de *env* del VIH-1 (VEV-G-NSS):

60

65

Para sustituir la secuencia señal de la proteína VEV-G, los presentes inventores construyeron en primer lugar VEV-G-ΔS mediante PCR con dos cebadores:

cebador n.º 1: 5'-GGC GGATCC GGATCA ACG TTC ACC ATA GTT-3'
(cebador 5') BamHI SphI +1VSV-G

cebador n.º 2: complementario al gen de extremo C-terminal de VEV-G
(cebador 3') 5'GGC GGATCC TTA CTT TCC AAG TCG - 3'
BamHI codón de terminación

Se usó el plásmido pwK1 (que contiene el gen G de longitud completa de VEV_{Ind}, y proporcionado amablemente por el Dr. Robert R. Wagner, Universidad de Virginia, EE.UU.) como molde, y se amplificó con el kit Gene amp mediante 30 ciclos de PCR en un termociclador Cetus de Perkin-Elmer (los ciclos fueron 94°C, 1 min; 45°C, 2 min; 72°C, 3 min) a partir 20 ng de pwK1 como molde y 1.0 μ M de cada cebador.

Todos los cebadores tenían sitios de BamHI en su extremo 5' terminal de manera que el fragmento de ADN de VEV-G-ΔS amplificado podía insertarse en el sitio de BamHI del plásmido, pBluescript SK VECTOR (Stratagene). El clon en el que el extremo 5' terminal de VEV-G-ΔS hacia el promotor de T7 se seleccionó y se digirió con enzimas de restricción SphI más XhoI. El vector se muestra en la figura 5.

Amplificación de la secuencia señal del VIH-1

Se amplificó la secuencia señal del VIH-1 del gen *env* a partir de pBluescript-gp120-NSS mediante PCR con los siguientes dos cebadores:

cebador n.º 1
(cebador T7)

cebador n.º 2 5' - GGC GCATGC ACT ACA GAT CAT - 3'
(complementario SphI
al extremo c-terminal
del gen de secuencia
señal del VIH-1)

Esto se ilustra en la figura 6. Se digirió el fragmento de ADN amplificado que contenía la secuencia señal del VIH-1 con enzimas de restricción XhoI más SphI, y se insertó en el vector digerido con XhoI y SphI, pBluescript VEV-G-Δs. El plásmido resultante se denomina pBSK VEV-G-NSS, y el constructo se confirmó adicionalmente mediante secuenciación de ADN. Esto se ilustra en la figura 7.

Se insertó el fragmento de BamHI de VEV-G-NSS en el sitio de BamHI de un baculovirus pAcYM1 (Li *et al.* Virology 204: 266-278, 1994), y se generó baculovirus recombinante que expresaba VEV-G-NSS mediante un método de transfección convencional (Li *et al.* Virology 204: 266-278, 1994).

Ejemplo 2

Examen microscópico de células infectadas con baculovirus recombinantes

Se infectaron células SF21 con AcVPN recombinante a una m.o.i. de 5 UFP/célula y se incubaron a 27°C durante 48 h. Se examinaron las células infectadas mediante microscopio de contraste de fase. Los resultados se muestran en la figura 1. (A) células infectadas con AcVPN de tipo natural; (B) células infectadas con vAcgp120-NS (rgp120 con la secuencia señal natural del VIH-1 que muestra lisis celular); (C) células infectadas con vAcgp120-ΔS; (rgp120 sin la secuencia señal que muestra células intactas); (D) células infectadas con vAcgp120-MS (rgp120 con la secuencia

ES 2 327 300 T3

señal de melitina que muestra células intactas); (E) células infectadas con vAcVEV-G (proteína G de VEV que muestra células intactas); (F) células infectadas con vAcVEV-G-NS (proteína G de VEV con la secuencia señal natural de *env* del VIH-1 que muestra lisis celular).

Los resultados anteriores demuestran que la secuencia señal de *env* del VIH-1 destruye células rápidamente.

Ejemplo 3

Efectos de la secuencia señal de env del VIH-1 sobre la muerte celular

Ensayo de azul tripano

Se infectaron células SF21 con AcVPN recombinante a una m.o.i. de 5 UFP/célula durante 1 h, y se retiró el inóculo y se incubó con el medio completo TNM-FH que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10%. A las 24, 48 y 72 h tras la infección, se tiñeron las células con azul tripano (GIBCO, BRL) durante 5 min y se contaron las células con el microscopio y se determinó el porcentaje de células muertas usando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Células muertas (teñidas)}}{\text{Células viables (sin teñir) + Células muertas}} \times 100 = \% \text{ de células muertas}$$

Ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDRA, Lactate Dehydrogenase Release Assay)

Se realizó el LDRA según las instrucciones del fabricante (kit de detección de citotoxicidad Boehringer Mannheim).

Se infectaron células SF21 con AcVPN recombinante a una m.o.i. de 5 UFP/célula durante 1 h y se retiró el inóculo y se incubó con medio completo a 27°C, se recogió medio de cultivo a intervalos regulares de 12 h y se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 min. Se diluyó el sobrenadante del cultivo 10 veces y se incubaron 100 µl del sobrenadante con 100 µl de mezcla de reacción (kit de detección de la citotoxicidad) durante 30 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia de las muestras a 490 nm mediante cuantificación del tinte de formazán formado usando un lector de microplacas (ELISA) (Bio-Rad 550).

Los resultados de los ensayos de azul tripano y de liberación de lactato deshidrogenasa se ilustran en la figura 2A y 2B, respectivamente. Figura 2A; porcentaje de células permeabilizadas mediante azul tripano (células muertas) tras expresar rgp120 o proteínas VEV-G con diferentes secuencia señal. Figura 2B; ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) (kit de detección de citotoxicidad de Boehringer Mannheim). Las cantidades de LDH liberada a partir de células SF21 infectadas con virus recombinantes que expresan rgp120 o VEV-G con diferentes secuencias señal se midieron mediante cuantificación del tinte de formazán formado en placas de ELISA leídas a 490 nm.

En conclusión rgp120 y VEV-G con la secuencia señal natural de *env* del VIH-1 destruyen células mucho más rápido. Las células sobreviven mucho más tiempo sin la secuencia señal natural de *env* del VIH-1 o con la secuencia señal de melitina. La secuencia señal natural de *env* del VIH-1 es responsable de una rápida muerte celular.

Ejemplo 4

Examen de la apoptosis

Método de extracción de ADN total

Se infectaron células SF21 (3×10^6) con AcVPN recombinante a una m.o.i. de 5 UFP/célula durante 1 h. Se retiró el inóculo y se incubó con medio completo a 27°C durante 48 h. Se sedimentaron las células a 2500 rpm durante 10 min y se extrajeron con TSE (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, SDS al 1%, al que se añadió proteinasa K hasta una concentración final de 70 µg/ml). Entonces, se incubaron las muestras durante 2 h a 37°C, y al final de la incubación se añadió NaCl hasta una concentración final de 1 M y entonces se incubaron las muestras a 4°C durante la noche. Se extrajo el ADN con fenol:cloroformo (1:1) y con cloroformo. Finalmente, se añadió etanol (100%) para precipitar el ADN (15 min a 80°C) y se sedimentó el precipitado de ADN mediante microcentrifugación a 12.000 rpm durante 15 min. Se lavó el sedimento de ADN una vez con etanol al 70%. Volvió a suspenderse en TE (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) con ARNasa A (50 µg/ml), se sometió a electroforesis sobre gel de agarosa al 1,2% y se tiñó con bromuro de etidio. (N. Chejanovsky y E. Gershbarg, Virology 209: 519-525, 1995). Los resultados se ilustran en la figura 3. Se extrajo ADN celular total (A) o ADN de bajo peso molecular (B) a las 48 h tras la infección y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en presencia de bromuro de etidio. Carriles M, marcador de ADN; carriles WT, células infectadas con AcVPN de tipo natural; carriles células infectadas con ΔS (rgp120 sin la secuencia señal); carril NSS, células infectadas con vAcgp120-NS (rgp120 con la secuencia señal natural de *env* del VIH-1); carriles MSS, células infectadas con vAcgp120-MS (rgp120 con la secuencia señal de melitina). Los resultados anteriores demuestran que la secuencia señal natural de *env* del VIH-1 induce la apoptosis.

Extracción de ADN fragmentado

Se infectaron células SF21 con vAcVEV-G (VEV-G) o vAcVEV-G-NSS (VEV-G-NSS) a una m.o.i. de 5 UFP/célula y se incubaron a 27°C durante 48 horas. A las 48 h tras la infección, se sedimentaron las células SF21 (3 x 10⁶) a 2500 rpm durante 5 min y se sometieron a lisis en disolución que contenía Tris HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM y Triton X-100 al 0,5%, y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 25 min en una microcentrifugadora Eppendorf para sedimentar ADN cromosómico. Se digirió el sobrenadante con 0,1 mg de ARNasa por ml a 37°C durante 1 h y después durante 2 h con 1 mg de proteinasa K por ml a 50°C en presencia de SDS al 1%, se extrajo con fenol y cloroformo, se precipitó con etanol frío. Volvió a suspenderse el precipitado en TE y se sometió a electroforesis sobre gel de agarosa al 1,5% que contenía 5 µg de bromuro de etidio por ml. Se visualizó el ADN mediante transiluminación UV. (Rosario Leopardi y Bernard Roizman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9583-9587, 1996).

Los resultados se muestran en la figura 3, panel B y figura 4, panel B.

Ejemplo 5

Construcción de VIH-1 recombinante que contiene delección parcial de vpu y nef y sustitución de NSS

1. Construcción de plásmido pNL4-3 que contiene la sustitución de NSS (con MSS, IL-3 o cualquier otra secuencia señal) y delección de vpu

Un clon de ADN proviral de VIH-1 infeccioso, pNL4-3 (proporcionado por el Dr. Malcolm Martin mediante el programa de reactivo de referencia e investigación del SIDA ("AIDS Research and Reference Reagent"), Division of AIDS, NIAID, NIH, Adachi *et al.*, J. Virol. 59: 284-291, 1986), contiene dos sitios de enzima de restricción únicos; EcoRI (posición 5744) y BamHI (posición 8466). La región codificante del gen *env* comienza a partir de la posición 6221 y termina en la posición 8785. Para sustituir la secuencia señal natural de *env* del VIH-1 con melitina, IL-3 o cualquier otra secuencia señal de proteína secretora, se aísla el fragmento EcoRI-BamHI de pNL4-3 a partir de gel de agarosa y se subclona dentro del sitio de EcoRI - BamHI de vector pBluescript SK tal como se ilustra en la figura 8. A partir de este producto, se designan cuatro cebadores tal como sigue:

cebador n.º 1 (directo):

5' - GGC GAATTC TGC AAC AAC TGC TG - 3'

EcoRI

cebador n.º 2 (inverso):

5' - GGC CTG CAG TCA TTA GGC ACT GTC TTC TGC TCT TTC - 3'

PstI codones de terminación

cebador n.º 3 (directo):

5' - GGC CTG CAG CCA TGG ACA GAA AAA TTG TTG GTC ACA GTC - 3'

PstI NcoI

cebador n.º 4 (inverso):

5' - GGC GGATCC GTT CAC TAA TCG AAT GG - 3'

BamHI

ES 2 327 300 T3

Se usan pBSK-env como molde más los cebadores n.º 1 y n.º 2 y se realiza una PCR para amplificar la parte izquierda de la región de *env*, fragmento de 477 pb. De manera similar, se emplean los cebadores n.º 3 y n.º 4 para amplificar la parte derecha de *env*, 2245 pb. Se digirió el producto de PCR de EcoRI - PstI (fragmento de 477 pb) con EcoRI + PstI mientras que el producto de PCR de PstI-BamHI (fragmento de 2245 pb) se cortó con PstI + BamHI. Entonces, se clonó el fragmento de 2245 pb digerido con PstI-BamHI dentro de los sitios de PstI + BamHI del vector pBSK tal como se muestra en la figura 9.

Después de esto, se digirió pBSK-2245 con EcoRI + PstI y se ligó con los productos de PCR digeridos con EcoRI + PstI (fragmento de 445 pb) dando como resultado el plásmido pBSK-*env*-ΔS, tal como se muestra en la figura 10.

Se digirió el plásmido pBSK-*env*-ΔS con PstI + NcoI y después se ligó con el oligonucleótido sintético que codifica para MSS, la secuencia señal de IL-3 o cualquier otra secuencia señal deseada. Este oligonucleótido sintético contiene un sitio de PstI en el extremo 5' y un sitio de NcoI en el extremo 3'. Antes de la ligación dentro del vector, en primer lugar se digirieron estos oligonucleótidos bicatenarios con PstI + NcoI.

A. Oligonucleótido sintético que codifica para la secuencia señal de melitina (sólo se muestra el sentido positivo)

PstI
5'-GGC CTG CAG ATG AAA TTC TTA GTC AAC GTT GCC
CTT GTT TTT ATG GTC GTG TAC ATT TCT TAC
ATC TAT GCG GAT CCATGG GCC -3'
NcoI

Oligonucleótido sintético que codifica para la secuencia señal de interleucina 3 (sólo se muestra el sentido positivo):

PstI
5'-GGC CTG CAG ATG CTG CTC CTG CTC CTG ATG CTC
TTC CAC GGA CTC CAA GCT TCA ATC AGT GGC GAT
CCATGG GCC -3'
NcoI

El plásmido recombinante resultante se muestra en la figura 11.

Tras la secuenciación para verificar la correcta modificación, se digirió el plásmido con EcoRI + BamHI para aislar el fragmento de EcoRI - BamHI, que volvió a clonarse en los sitios de EcoRI-BamHI del vector de ADN proviral de pNL4-3. El plásmido resultante se denomina pVIH-1-MSS (o pVIH-1-IL3SS).

Además, durante la construcción anterior, la NSS se sustituye no sólo con MSS o secuencia señal de IL-3, sino que también se crea una delección parcial del gen *vpu*. El gen *vpu* codifica para 82 aa y su extremo 3' se solapa con la secuencia señal de gen *env* del VIH-1, aproximadamente 28 aa. Sin embargo, está en un marco de lectura diferente (-1 marco de lectura). Estudios han mostrado que la delección de los genes *vpu* o *nef* no alteró la replicación del virus en CMSP de chimpancé, CMSP humanas ni en la línea híbrida de células B/T CEMx174 (James *et al*, AIDS Res. Human Retrovirus 10:343-350, 1994). Por tanto, durante la amplificación de PCR del fragmento de 455 pb de la parte izquierda de *env* con los cebadores n.º 1 y n.º 2, se añadieron dos codones de terminación justo delante del codón de iniciación de los genes *env* lo que da como resultado la delección de 28 aa de *vpu* (véase el cebador n.º 2).

2 Construcción de plásmido que contiene delección de *nef*

La secuencia codificante del gen *nef* comienza a partir de la posición 8787 y termina en la posición 9407 en el clon de ADN proviral pNL4-3. También hay dos sitios de enzimas de restricción únicos; el sitio de BamHI en la posición 8466 en el gen *env* y el sitio de XhoI en la posición 8887 en el gen *nef*. Para realizar la delección del gen *nef*, se digirió el plásmido VIH-1-MSS (o IL-3SS) con BamHI y XhoI. Se aislaron los 421 pb resultantes de fragmento de BamHI-XhoI y se subclonaron en los sitios de BamHI-XhoI de vector pBSK tal como se muestra en la figura 12. Se diseñaron dos cebadores:

cebador n.º 5:
(directo)

BamHI
5' - GGC GGATCC TTA GCA CTT ATC TGG-3'

5

10

XhoI
cebador n.º 6: 5' - GCC CTC GAG TCA TTA ATA CTG CTC CCA CCC-3'
codones de terminación

15

El gen *nef* codifica para 260 aa según el presente diseño. Se insertaron dos codones de terminación en el sitio de XhoI lo que da como resultado que el gen *nef* sólo codifica para 33 aa. Tras la amplificación de PCR y digestión con BamHI + XhoI, se clonaron estos 421 pb de fragmento de ADN de PCR de nuevo dentro de BamHI-XhoI del vector pVIH-1-MSS (o IL-3SS). El plásmido recombinante resultante contiene la sustitución de NSS y delección parcial de *vpu* y *nef*, que se usa para la prueba de vacuna.

20

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a lo que se considera actualmente que son los ejemplos preferidos, debe entenderse que la invención no se limita a los ejemplos dados a conocer. Por el contrario, se pretende que la invención cubra diversas modificaciones y disposiciones equivalentes incluidas dentro del espíritu y el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

25

30

35

40

45

50

55

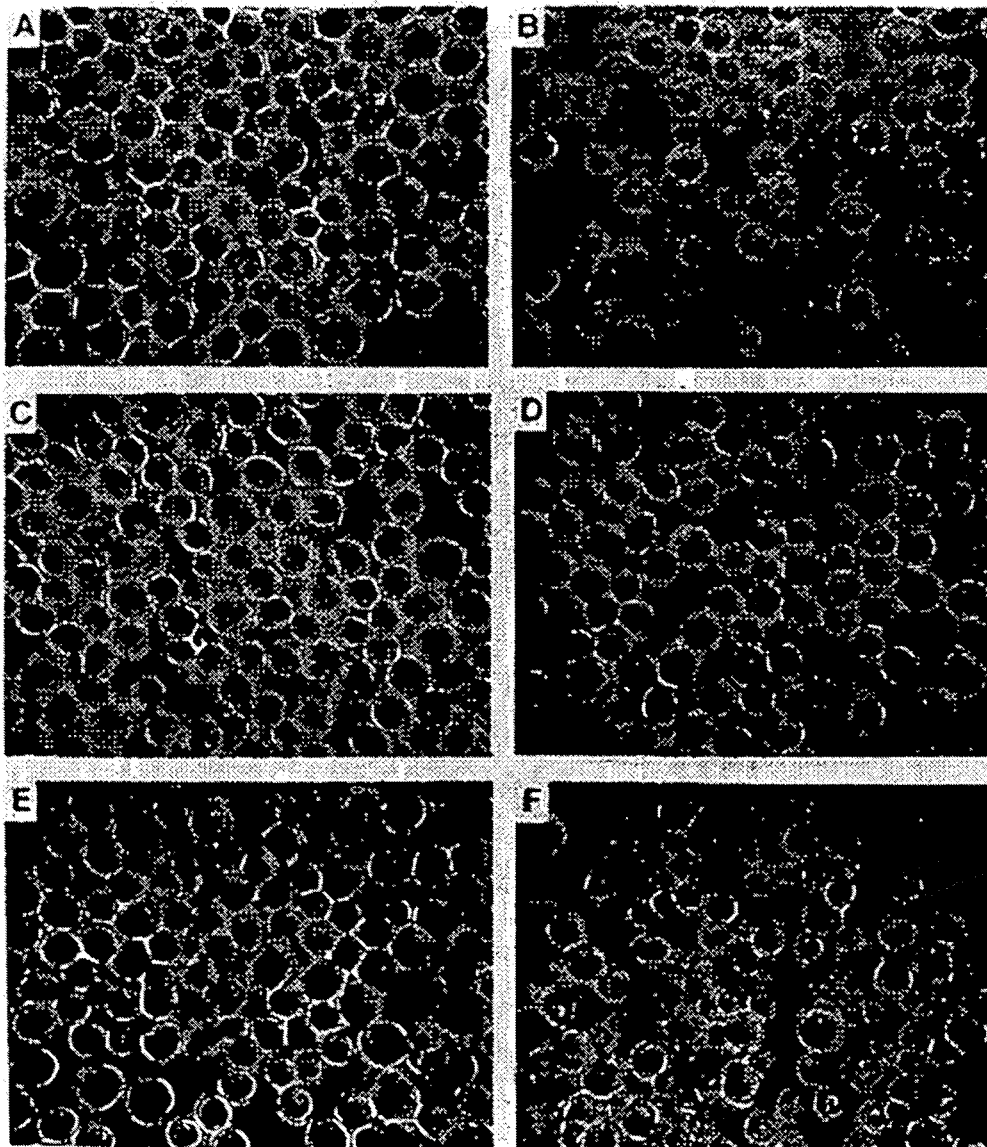
60

65

REIVINDICACIONES

1. Virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) recombinante no citolítico en el que la secuencia señal natural (NSS) de la glicoproteína de la envuelta del virus se modifica mediante la eliminación de aminoácidos cargados positivamente para proporcionar una secuencia señal no citolítica o en el que la NSS se sustituye con o bien una secuencia señal de melitina (MSS) o bien una secuencia señal de IL-3 (ILSS).
2. Retrovirus recombinante no citolítico según la reivindicación 1, en el que la secuencia señal no citolítica modificada se modifica para contener no más de un aminoácido cargado positivamente.
3. Retrovirus recombinante no citolítico según o bien la reivindicación 1 o bien la 2, en el que la secuencia señal no citolítica modificada se modifica para contener cero aminoácidos cargados positivamente.
4. Retrovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el retrovirus se convierte en no virulento mediante la delección del gen *nef*.
5. Vacuna que incorpora el retrovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Uso de un VIH-1 recombinante no citolítico, en el que la NSS de la glicoproteína de la envuelta del virus se sustituye con o bien una secuencia señal de melitina (MSS) o bien una secuencia señal de IL-3 (ILSS) para la fabricación de una preparación de vacuna para la prevención o el tratamiento de una infección retroviral.
7. Uso de un VIH-1 recombinante no citolítico, en el que la NSS de la glicoproteína de la envuelta del virus se modifica mediante la eliminación de aminoácidos cargados positivamente para proporcionar una NSS no citolítica para la fabricación de una preparación de vacuna para la prevención o el tratamiento de una infección retroviral.
8. Uso según la reivindicación 7, en el que la modificación para proporcionar una NSS no citolítica da como resultado no más de un aminoácido cargado positivamente en la secuencia NSS.
9. Uso según o bien la reivindicación 7 o bien la 8, en el que la modificación para proporcionar una NSS no citolítica da como resultado cero aminoácidos cargados positivamente.
10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que el virus se convierte en no virulento mediante la delección del gen *nef*.
11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que la preparación de vacuna es para el tratamiento de la infección por VIH.
12. Vacuna que comprende un VIH-1 recombinante no citolítico, en la que la NSS de la glicoproteína de la envuelta del virus se sustituye con o bien una secuencia señal de melitina (MSS) o bien una secuencia señal de IL-3 (ILSS).
13. Vacuna que comprende un VIH-1 recombinante no citolítico, en la que la NSS de la glicoproteína de la envuelta del retrovirus se modifica mediante la eliminación de aminoácidos cargados positivamente para proporcionar una NSS no citolítica.
14. Vacuna según la reivindicación 13, en la que la secuencia señal natural se modifica para reducir el número de aminoácidos cargados positivamente hasta no más de un aminoácido cargado positivamente.
15. Vacuna según la reivindicación 14, en la que el número de aminoácidos cargados positivamente es cero.
16. Vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en la que el retrovirus se convierte en no virulento mediante la delección del gen *nef*.
17. Vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, que comprende además un adyuvante.
18. Vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 para el tratamiento de la infección por VIH.
19. Uso de un VEV recombinante que contiene la NSS de una glicoproteína de la envuelta del VIH-1 y un sitio de reconocimiento específico para una célula cancerosa diana para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
20. Uso de un oligonucleótido antisentido que es complementario a una secuencia de ácido nucleico para una NSS del gen de la glicoproteína de la envuelta para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección retroviral.
21. Uso según la reivindicación 20, en el que la infección retroviral es infección por VIH.

FIGURA 1



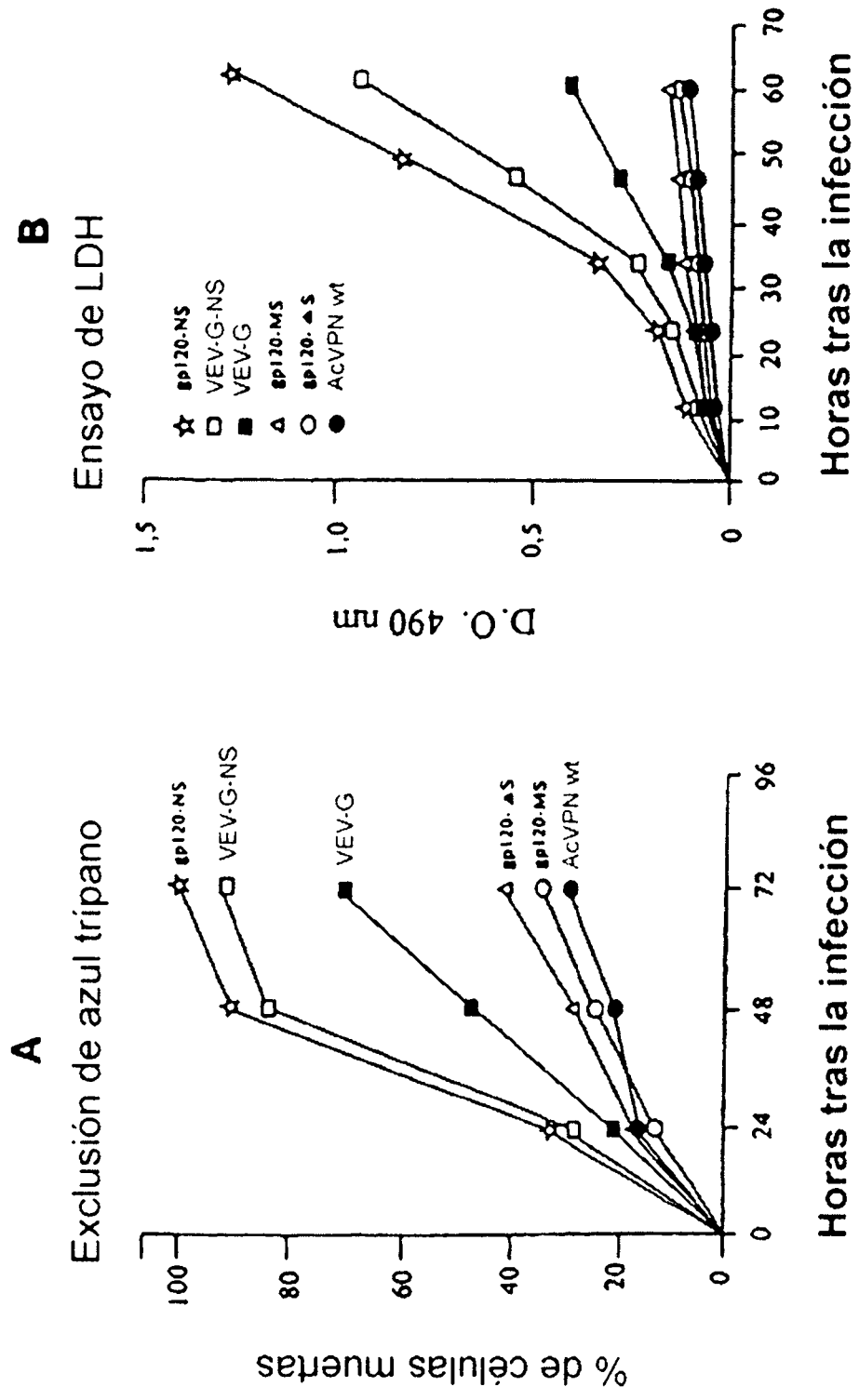


FIGURA 2

FIGURA 3

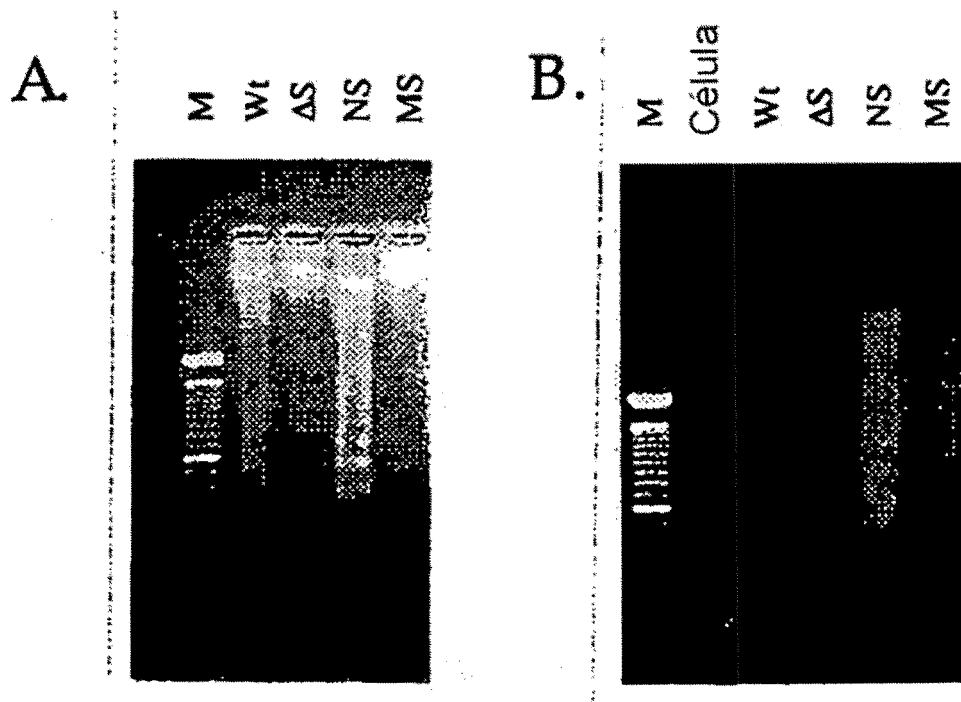


FIGURA 4

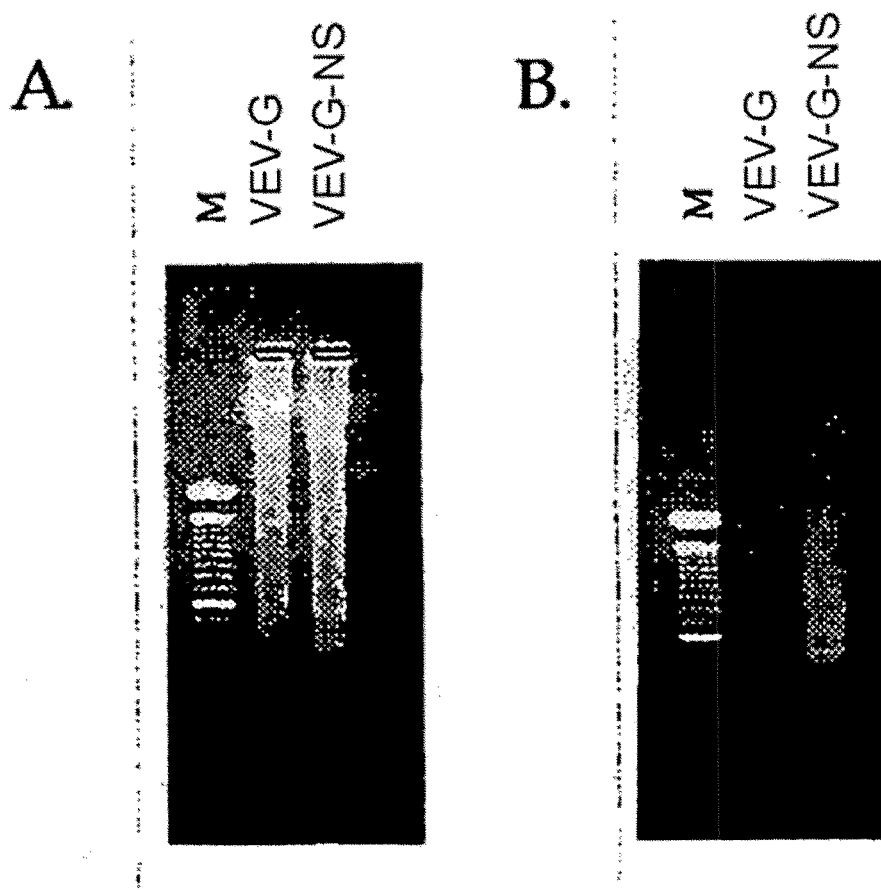


FIGURA 5

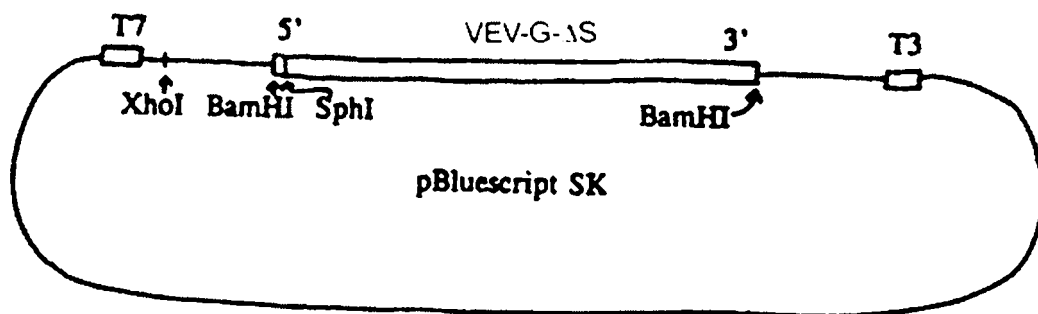


FIGURA 6

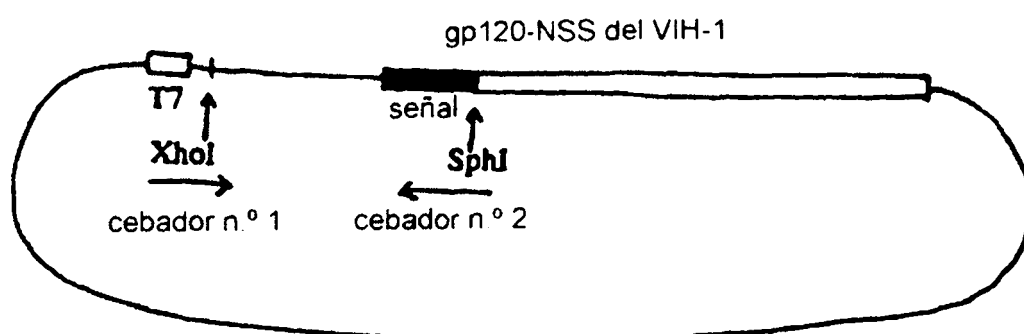


FIGURA 7

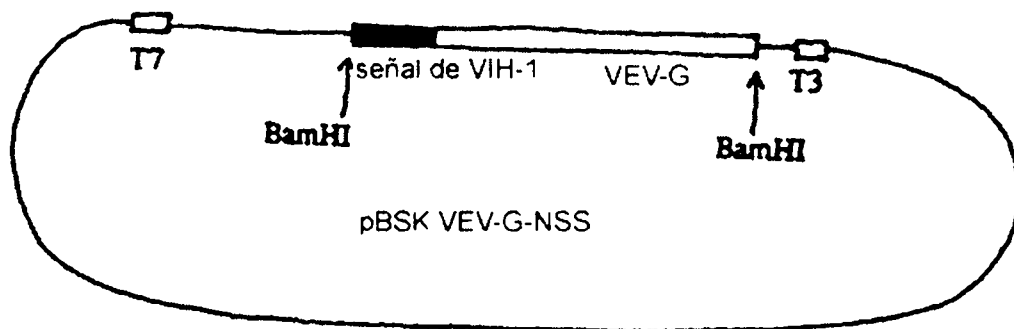


FIGURA 8

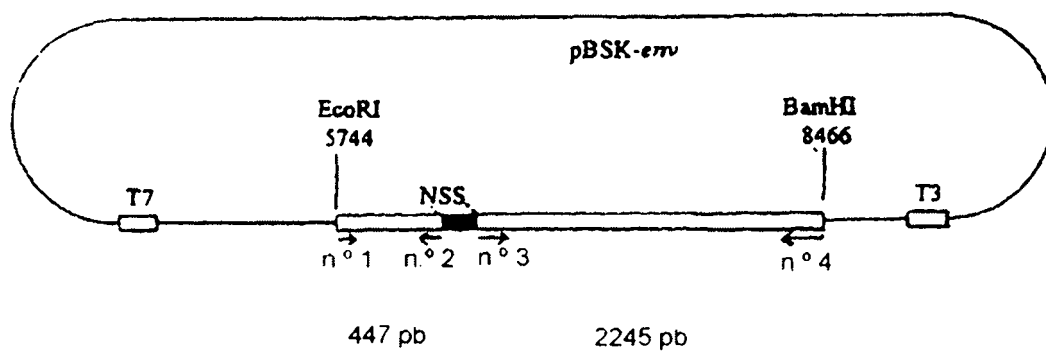


FIGURA 9

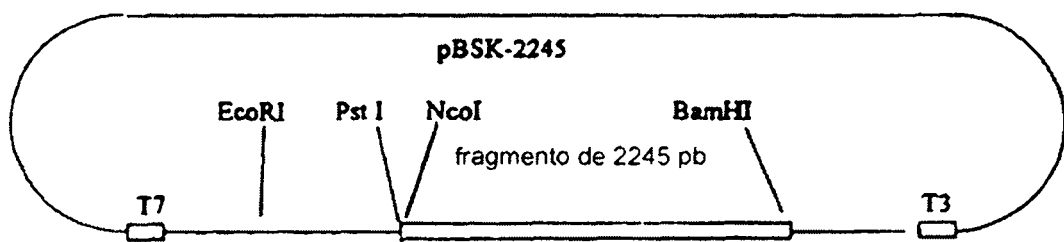


FIGURA 10

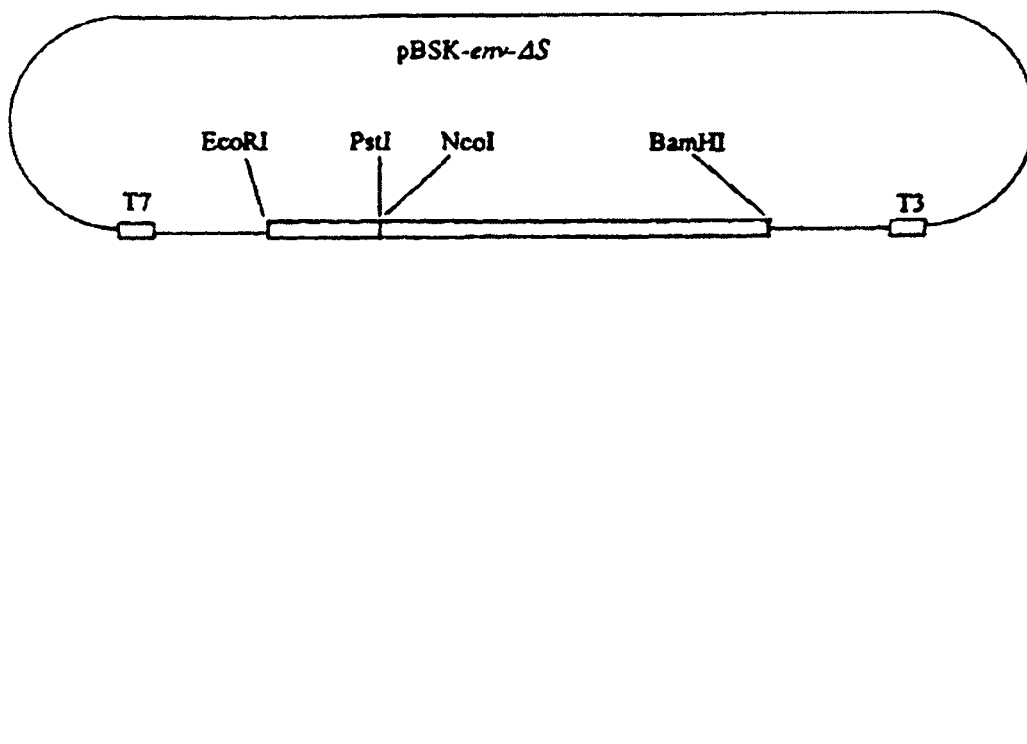


FIGURA 11

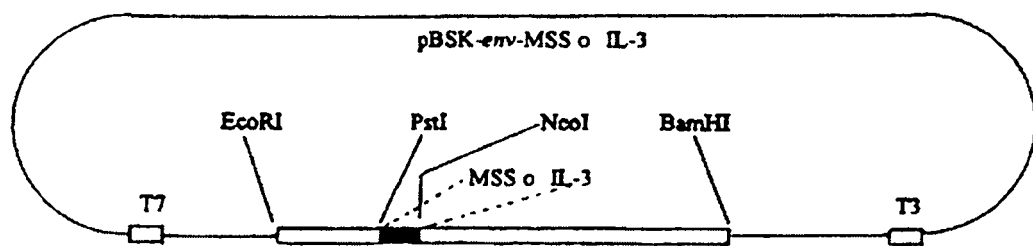


FIGURA 12

