

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 416 629**

51 Int. Cl.:

A61K 39/21 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

C12N 15/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2003** **E 03796672 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013** **EP 1578766**

54 Título: **Vacunas polivalentes de ADN de glicoproteína de VIH-1 primaria y procedimientos de vacunación**

30 Prioridad:

03.12.2002 US 430732 P

19.09.2003 US 503907 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.08.2013

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS (50.0%)

225 Franklin Street, 12th Floor

Boston, MA 02110 , US y

ADVANCED BIOSCIENCE LABORATORIES, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

LU, SHAN;

WANG, SHIXIA;

PAL, RANAJIT;

KALYANARAMAN, V. S.;

WHITNEY, STEPHEN CHARLES;

KEEN, TIM;

NAIR, BALACHANDRAN C. y

MARKHAM, PHILLIP

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 416 629 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas polivalentes de ADN de glicoproteína de VIH-1 primaria y procedimientos de vacunación

5 CAMPO TÉCNICO

La invención se refiere a composiciones para el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

10 ANTECEDENTES

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente etiológico del SIDA. Hay dos tipos de VIH actualmente reconocidos, VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es la forma predominante en el mundo. La forma de VIH-1 que domina la epidemia global se llama el grupo principal de VIH-1. Hay tres grupos de VIH-1, el grupo principal (grupo M), el grupo divergente (grupo O) y el grupo no M/no O (grupo N). El grupo N se divide adicionalmente en al menos once subtipos genéticos distintos que se denominan comúnmente clados, A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y K, con más secuencias esperando a ser clasificadas. El clado B es el más prevalente en los Estados Unidos, mientras que el clado D es el más prevalente en el mundo. La distribución geográfica de los subtipos genéticos está cambiando continuamente, y los datos presentes ofrecen cálculos estimados incompletos.

Aproximadamente el 95% de las nuevas infecciones por el VIH están produciéndose en países desarrollados, por tanto, una vacuna puede ser la forma más eficaz para controlar la epidemia. Sin embargo, el desarrollo de vacunas eficaces para prevenir la infección por el VIH o neutralizar la infección por el VIH ha sido un reto difícil para la comunidad científica. Es un objetivo primario desarrollar una vacuna del VIH que pueda provocar eficazmente anticuerpos neutralizantes antivirales específicos, además de respuestas inmunitarias mediadas por células, para prevenir la infección y controlar la propagación del VIH, con una posibilidad de amplitud considerable de reactividad a través de clados genéticos. NYAMBI P.N. Y COL. describen que la inmunorreactividad de viriones intactos del tipo 1 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) revela la existencia de menos inmutipos del VIH-1 que genotipos (J. VIROL. vol. 74, nº 22, noviembre de 2000, páginas 10670 - 10680). El documento US 6139843 desvela composiciones de péptido para el tratamiento del VIH que comprenden péptidos de diferentes cepas aisladas primarias. El extraordinario grado de diversidad genética del VIH ha sido problemático para el desarrollo de vacunas (Fomsgaard, Immunology Letters 1999, 65:127-131, informa de una vacuna de mini-genes multi-valente usada para inducir una respuesta CTL que engloba una parte más ancha del alto grado de diversidad de antígenos del VIH. Un único plásmido que codifica un conjunto de epítopes mínimos se usó en vacunación de ADN con pistola de genes).

RESUMEN

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Los procedimientos y composiciones en el presente documento se proporcionan basándose, en parte, en el descubrimiento de que vacunas polivalentes de ADN de cepas aisladas primarias como se define por las reivindicaciones inducen eficazmente una respuesta inmunitaria contra el VIH (por ejemplo, VIH-1). También se ha descubierto que refuerzos con composiciones de proteínas del VIH recombinantes aumentan respuestas inmunitarias contra el VIH en sujetos a los que se les ha administrado una vacuna polivalente de ADN de cepas aisladas primarias. La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Se desvelan composiciones de ácido nucleico que incluyen una pluralidad de conjuntos de moléculas de ácidos nucleicos, por ejemplo, plásmidos de ADN, codificando cada molécula de ácido nucleico un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), por ejemplo, VIH-1, glicoproteína de la envuelta, en las que cada conjunto de moléculas de ácidos nucleicos codifica un tipo diferente de glicoproteína de la envuelta del VIH, o comprende una secuencia de cepa aislada primaria de un clado genético distinto. Los ácidos nucleicos pueden ser secuencias naturales o secuencias que son el 80, 90, 95, 98 o el 99 por ciento idénticas a secuencias naturales. Las proteínas codificadas pueden ser secuencias naturales, o pueden incluir conservación de sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1 en 10, 1 en 20, 1 en 30, o menos, por ejemplo, 1, 2, 5 ó 10 localizaciones de aminoácidos. En ciertas realizaciones pueden usarse secuencias consenso (basadas en una colección de diferentes secuencias naturales).

La glicoproteína de la envuelta del VIH puede ser una cualquiera o más de gp120, gp140, gp160 y gp41. Las composiciones de ácido nucleico pueden incluir adicionalmente un conjunto de moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína gag del VIH. Las glicoproteínas de la envuelta pueden ser de un clado de un grupo importante (M) de clados, por ejemplo, el clado puede ser el clado A, B, C, D, E, F, G, H, I, J o K. Alternativamente, la glicoproteína de la envuelta puede ser de un clado de un grupo divergente (O) de clados o un grupo N de clados. La glicoproteína de la envuelta puede ser una glicoproteína de la envuelta de una cepa aislada Ba-L o una cepa aislada B715. El clado puede ser el clado C. La glicoproteína de la envuelta puede ser de una cepa aislada Czm. Uno o más de los conjuntos de ácidos nucleicos pueden incluir uno o más codones optimizados.

En otro aspecto se desvelan composiciones de ácido nucleico que incluyen una pluralidad de conjuntos de moléculas de ácidos nucleicos, en las que la pluralidad incluye dos o más de los siguientes conjuntos: un conjunto de moléculas de ácidos nucleicos, codificando cada uno una glicoproteína de la envuelta del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) del clado A; un conjunto de moléculas de ácidos nucleicos, codificando cada uno una glicoproteína de la envuelta del VIH del clado B; un conjunto de moléculas de ácidos nucleicos, codificando cada uno una glicoproteína de la envuelta del VIH del clado C; y un conjunto de moléculas de ácidos nucleicos, codificando cada uno una glicoproteína de la envuelta del VIH del clado E; en las que cada conjunto de moléculas de ácidos nucleicos codifica una secuencia de cepa aislada primaria de la glicoproteína de la envuelta. La composición pueden incluir adicionalmente un conjunto de moléculas de ácidos nucleicos que codifica una proteína gag del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en la que el conjunto codifica una secuencia de cepa aislada primaria de la proteína gag, por ejemplo, del clado C, y/o de la cepa aislada Czm. La proteína gag también puede ser una proteína gag del clado B.

La composición puede contener entre 50 µg y 2.500 µg de ácido nucleico de cada conjunto.

Se desvela adicionalmente una composición farmacéutica que contiene una o más de las nuevas composiciones descritas en el presente documento y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se desvelan procedimientos para tratar un individuo con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), administrando al individuo una cantidad de las nuevas composiciones farmacéuticas suficiente para inhibir la progresión de la enfermedad debido al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En estos procedimientos, el modo de administración puede ser administración tópica, administración por vía oral, inyección por aguja, inyección por chorro sin aguja, administración intradérmica, administración intramuscular y administración con pistola de genes. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria protectora, por ejemplo, una respuesta inmunitaria mediada por células, una respuesta inmunitaria humoral, o ambas.

En ciertos procedimientos, las nuevas composiciones pueden administrarse en combinación con una segunda terapia para infección por el VIH, por ejemplo, terapia con un inhibidor de la transcriptasa inversa de nucleósidos, terapia con un inhibidor de la transcriptasa inversa de no nucleósidos y/o terapia con un inhibidor de proteasas del VIH.

También se desvelan procedimientos de inducción de una respuesta inmunitaria contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o un epítipo del VIH en un mamífero vertebrado administrando al mamífero una cantidad de las nuevas composiciones suficiente para provocar una respuesta inmunitaria contra el VIH o un epítipo del VIH en el mamífero vertebrado. Estos procedimientos pueden incluir adicionalmente aislar células inmunitarias del mamífero vertebrado; y probar una respuesta inmunitaria de las células inmunitarias aisladas *in vitro*. En estos procedimientos, la composición puede administrarse en múltiples dosis durante un periodo de tiempo prolongado (por ejemplo, durante un periodo de 2, 3, 4 semanas o más, por ejemplo, varios meses).

Los procedimientos también pueden incluir administrar un adyuvante, refuerzo o facilitar el agente antes, durante o después de la administración de la composición. Los mamíferos vertebrados pueden ser un ratón, una rata, un conejo, un primate no humano o un ser humano, por ejemplo, un ser humano infectado con, o en riesgo de infección por, VIH. El modo de administración puede ser administración tópica, administración por vía oral, inyección por aguja, inyección por chorro sin aguja, administración intramuscular, administración intradérmica y administración con pistola de genes.

En otro aspecto se desvelan composiciones de proteína aislada que incluyen un conjunto de moléculas de glicoproteínas de la envuelta del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) aisladas, en las que cada molécula en el conjunto incluye una secuencia de cepa aislada primaria.

También se desvelan composiciones de proteína que incluyen una pluralidad de conjuntos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) aislado, por ejemplo, VIH-1, moléculas de glicoproteínas de la envuelta, en las que cada molécula en los conjuntos incluye un tipo diferente de glicoproteína de la envuelta del VIH, o una secuencia de cepa aislada primaria de un clado genético distinto. Por ejemplo, la glicoproteína de la envuelta de cada conjunto puede ser una o más de gp120, gp140, gp160 y gp41. Los clados y cepas aisladas pueden ser iguales a como se describe en el presente documento para las composiciones de ácido nucleico. Las composiciones de proteína pueden incluirse en composiciones farmacéuticas que incluyen un excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se desvelan procedimientos para tratar un individuo con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) administrando al individuo una cantidad de las nuevas composiciones farmacéuticas suficiente para inhibir la progresión de la enfermedad debido al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

En otro aspecto se desvelan procedimientos de inducción de una respuesta inmunitaria contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o un epítipo del VIH en un mamífero vertebrado administrando al mamífero una o más de las composiciones de ácido nucleico, y administrando al mamífero una o más de las nuevas composiciones de proteína; en los que la composición de ácido nucleico y la composición de proteína se administran en cantidades

suficientes para provocar una respuesta inmunitaria detectable contra el VIH o un epítipo del VIH en el mamífero vertebrado. También pueden aislarse células inmunitarias del mamífero vertebrado y probar una respuesta inmunitaria de las células inmunitarias aisladas *in vitro*.

En estos procedimientos, la composición de proteína puede administrarse después de la composición de ácido nucleico, por ejemplo, entre 4 y 8 semanas después de la composición de ácido nucleico. Además, puede probarse una respuesta inmunitaria mediada por células, puede probarse una respuesta inmunitaria humoral y/o puede probarse una respuesta humoral neutralizante.

También se desvelan kits que incluyen una o más de las nuevas composiciones de ácido nucleico e instrucciones para administrar las composiciones de ácido nucleico a un individuo, por ejemplo, según uno o más de los procedimientos descritos en el presente documento. Los kits también pueden incluir una o más de las nuevas composiciones de proteína que incluyen un conjunto de moléculas de glicoproteínas de la envuelta del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) aislado. Los kits pueden incluir adicionalmente uno o más conjuntos adicionales de glicoproteínas de la envuelta del VIH aislado, en los que cada conjunto es un tipo diferente de glicoproteína de la envuelta del VIH, o comprende una secuencia de cepa aislada primaria de un clado genético distinto. En estos kits, una o más de las glicoproteínas de la envuelta del VIH codificadas por las moléculas de ácidos nucleicos de la composición de ácido nucleico puede ser de un mismo tipo o clado que una o más, o cada una, de las glicoproteínas de la envuelta de la composición de proteína.

Los kits también pueden incluir una o más de las nuevas composiciones de proteína que incluyen un conjunto de moléculas de glicoproteínas de la envuelta del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) aislado, en las que cada conjunto incluye un tipo diferente de glicoproteína de la envuelta del VIH, o una secuencia de cepa aislada primaria de un clado genético distinto; e instrucciones para la administración de la composición a un individuo al que se le ha administrado una vacuna del VIH, por ejemplo, una vacuna del VIH de ácido nucleico. El kit puede incluir un excipiente, por ejemplo, ciclodextrina, y/o un adyuvante, tal como QS-21.

Las instrucciones en el kit pueden indicar que la composición de ácido nucleico y/o la composición de proteína van a administrarse al individuo dos o más veces.

También se desvelan procedimientos de aumento de una respuesta inmunitaria al VIH en un individuo que ha sido inoculado con una vacuna del VIH, administrando al individuo una o más de las nuevas composiciones en una cantidad eficaz para aumentar la respuesta inmunitaria al VIH con respecto a un control. Por ejemplo, el individuo puede haber sido inoculado con una vacuna del VIH de ácido nucleico.

Una "vacuna" es una composición que induce una respuesta inmunitaria en el receptor o huésped de la vacuna. Procedimientos y composiciones descritas en el presente documento engloban un ácido nucleico, por ejemplo, plásmido de ADN, vacuna que induce respuestas humores (por ejemplo, anticuerpo neutralizante) y/o respuesta inmunitaria mediada por células (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos (CTL)), respuestas en el receptor como protección contra la presente o futura infección por el VIH (por ejemplo, VIH-1). La vacuna puede inducir protección contra la infección tras la posterior exposición al VIH. Protección se refiere a la resistencia (por ejemplo, resistencia parcial) a infección persistente de un animal huésped con el VIH. Los anticuerpos neutralizantes generados en el huésped vacunado pueden proporcionar esta protección. En otras situaciones, las respuestas de CTL pueden proporcionar esta protección. En algunas situaciones, tanto los anticuerpos neutralizantes como las respuestas inmunitarias mediadas por células (por ejemplo, CTL) proporcionan esta protección.

Las respuestas protectoras pueden evaluarse mediante una variedad de procedimientos. Por ejemplo, la generación de anticuerpos neutralizantes contra las proteínas del VIH (por ejemplo, glicoproteínas de la envuelta, "gp de Env") y la generación de una respuesta inmunitaria mediada por células contra las proteínas del VIH pueden ambas indicar una respuesta protectora. Las respuestas protectoras también incluyen aquellas respuestas que producen menores cargas virales (por ejemplo, en la sangre o en órganos linfoides) en un animal huésped vacunado expuesto a un inóculo dado de virus con respecto a un animal huésped expuesto al inóculo de virus, y al que no se le ha administrado la vacuna.

"Polivalencia" y "multivalencia" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a un rasgo de una composición de ácido nucleico o de proteína, por ejemplo, vacuna de ADN o composición de refuerzo con proteína, que codifica o comprende una pluralidad de diferentes proteínas. Cada ácido nucleico, por ejemplo, plásmido, codifica tanto una glicoproteína de la envuelta del VIH (gp de Env) diferente o gp de Env en forma de partículas víricas del VIH defectuosas como una glicoproteína de la envuelta del VIH de diferentes clados, o una combinación de estas posibilidades, permitiendo flexibilidad de esta de vacuna de ácido nucleico polivalente, por ejemplo, plásmido de ADN. Como se usa en el presente documento, "glicoproteínas de la envuelta" (gp de Env) se refiere no solo a gp de Env aisladas, sino también a gp de Env en forma de partículas víricas defectuosas. "3-valente" se refiere a una composición de tres antígenos distintos (por ejemplo, un gen env de una cepa aislada del clado A, y gen env de una cepa aislada del clado B, y un gen env de una cepa aislada del clado C). Asimismo, "4-valente" y "8-valente" se refieren a composiciones con 4 y 8 antígenos únicos, respectivamente.

“DP6-001”, “formulación DP6-001” y “vacuna DP6-001” se refieren a una formulación de ADN y proteína. El componente de ADN de DP6-001 es una composición que contiene ácidos nucleicos de codón optimizado que codifican cinco antígenos de Env del VIH-1 (gp120) diferentes y un único antígeno Gag. Los antígenos gp120 son de cepas aisladas del VIH-1 A, B715, Ba-L, Czm y E. El antígeno Gag es de la cepa aislada Czm. El componente de proteína de DP6-001 es una composición de proteína que contiene cinco antígenos gp120 del VIH-1 diferentes de las cepas aisladas del VIH-1 A, B715, Ba-L, Czm y E.

Secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos de “cepa aislada viral primaria” o “cepa aislada primaria” se refieren a secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos de las células o sueros de individuos infectados por el VIH (por ejemplo, VIH-1) en vez de una cepa de laboratorio del VIH. Una cepa aislada viral primaria es una cepa aislada viral que ha sido propagada y mantenida solo en linfocitos T, monocitos y/o macrófagos humanos primarios, y no ha sido propagada y mantenida en líneas celulares. Por tanto, una cepa aislada primaria se diferencia de lo que se denomina una “cepa de laboratorio”.

Las cepas de laboratorio del VIH se han sometido ampliamente a pases en el laboratorio, en algunos casos durante muchos años. Pueden denominarse cepas de TCLA, que representa tanto cepas adaptadas en laboratorio a cultivo de tejido como cepas adaptadas a línea de linfocitos T. Por otra parte, las cepas aisladas virales primarias se recogen del campo (por ejemplo, de pacientes humanos infectados) y se propagan o se someten a pases en el laboratorio, por ejemplo, solo con el fin de determinar si es posible o no el crecimiento del virus, y entonces posteriormente puede obtenerse la secuencia viral. La propagación o sometimiento a pases de las cepas aisladas primarias se produce co-cultivando el virus con células mononucleares de sangre periférica, por ejemplo, para determinar si puede producirse el crecimiento viral. La cantidad de propagación/sometimiento a pases depende del virus particular y puede variar, pero en cualquier caso, la propagación/sometimiento a pases se considera, por tanto, mínima o limitada. Este sometimiento a pases mínimo o limitado es lo que diferencia una cepa aislada viral primaria de una cepa de laboratorio.

La invención proporciona varias ventajas. Debido a su polivalencia, es menos probable que las nuevas vacunas pierdan su eficacia debido a la alta tasa de mutación del VIH. Las vacunas de ácido nucleico descritas en el presente documento proporcionan muchos antígenos diferentes en forma de secuencias de clados genéticos distintos y, por tanto, mutaciones individuales del virus infectante no disminuirán fácilmente la eficacia de las vacunas en los receptores. Otra ventaja que proporciona la invención es la inducción de respuestas inmunitarias más amplias, debido a que las diferentes proteínas están codificadas por secuencias de cepa aislada viral primaria en vez de cepas de laboratorio.

La administración de tanto composiciones de ADN polivalentes como refuerzos con proteína provoca respuestas inmunitarias humores y mediadas por células robustas. El uso de las combinaciones de composiciones descritas en el presente documento proporciona respuestas de anticuerpos neutralizantes. La presencia de respuestas humores y mediadas por células proporciona mejor protección de la infección en individuos sin tratamiento previo. La presencia de respuestas inmunitarias humores y mediadas por células puede retrasar la progresión de la enfermedad en individuos que se infectan por el virus antes de la vacunación.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque procedimientos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, los procedimientos y materiales adecuados se describen más adelante. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no está previsto que sean limitantes.

Otros rasgos y ventajas de la invención serán evidentes de la siguiente descripción detallada, los dibujos y de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una tabla que representa ADN y antígenos de proteína, y el programa de administración de ADN y antígenos de proteína en estudios de vacunación en conejos.

La Figura 2 es una tabla que representa el porcentaje de neutralización de cepas aisladas del VIH-1 primarias por sueros aislados de conejos inmunizados con vacunas monovalentes y polivalentes. Los sueros se aislaron después de la inmunización con ADN. Los números de animal se corresponden con los números de conejo mostrados en la Figura 1.

La Figura 3 es una tabla que representa el porcentaje de neutralización de cepas aisladas del VIH-1 primarias por sueros aislados de conejos inmunizados con vacunas monovalentes y polivalentes. Los sueros se aislaron después del primer refuerzo con proteína. Los números de animal se corresponden con los números de conejo mostrados en la Figura 1.

La Figura 4 es una tabla que representa el porcentaje de neutralización de cepas aisladas del VIH-1 primarias por sueros aislados de conejos inmunizados con vacunas monovalentes y polivalentes. Los sueros se aislaron después de dos refuerzos con proteína. Los números de animal se corresponden con los números de conejo mostrados en la Figura 1.

Las Figuras 5A-5C es un conjunto de gráficas que representan el porcentaje de neutralización por sueros de conejos inmunizados con vacunas monovalentes y polivalentes. "Último ADN" se corresponde con ensayos para sueros tomados después de la última inmunización con ADN. "Proteína-1" se corresponde con ensayos para sueros tomados después de la primera inmunización con proteína.

La Figura 6 es un gráfico de barras que representa títulos de valoración finales de respuestas anti-IgG de env después de la sensibilización con ADN, como se mide por ELISA. Placas de ELISA se recubrieron con los diferentes antígenos gp120 primarios como se indica (Ba-L, C1, E, B, A, D, F o G).

Las Figuras 7A-F son gráficas que representan respuestas de anticuerpos anti-gp120 después de la sensibilización con ADN y refuerzo con proteína en el grupo de animales C4 inmunizado con la vacuna de gp120 3-valente. "Último ADN" se refiere a sueros recogidos después de la 4ª inmunización con ADN. "Proteína I" se refiere a sueros recogidos después de un refuerzo con proteína. "Proteína II" se refiere a sueros recogidos después de dos refuerzos con proteína. Se presentan los datos para sueros de conejos inmunizados con ADN de B, C1 y E, y reforzados con proteínas de B, C1 y E. Las Figs. 7A y 7B representan datos para sueros probados contra proteína de Env B. Las Figs. 7C y 7D representan datos para sueros probados contra proteína de Env C1. Las Figs. 7E y 7F representan datos para sueros probados contra proteína de Env E.

Las Figuras 8A-P son gráficas que representan respuestas anti-IgG de gp120 contra antígenos de Env incluidos en el refuerzo con proteína en el grupo de animales C7 inmunizado con vacuna gp120 8-valente. Se presentan los datos para sueros de conejos inmunizados con ADN de Ba-L, B, C1, E, A, D, F y G, y reforzados con proteínas de B, C1, E y Ba-L. Las Figs. 8A y 8B representan datos para sueros probados contra proteína de Env B. Las Figs. 8C y 8D representan datos para sueros probados contra proteína de Env Ba-L. Las Figs. 8E y 8F representan datos para sueros probados contra proteína de Env C. Las Figs. 8G y 8H representan datos para sueros probados contra proteína de Env E. Las Figs. 8I y 8J representan datos para sueros probados contra proteína de Env A2. Las Figs. 8K y 8L representan datos para sueros probados contra proteína de Env D. Las Figs. 8M y 8N representan datos para sueros probados contra proteína de Env F. Las Figs. 8O y 8P representan datos para sueros probados contra proteína de Env G.

La Figura 9 es una gráfica que representa el porcentaje de neutralización contra el virus indicador 89.6-GFP del VIH-1 con sueros de conejo obtenidos antes de la inmunización, después de la inmunización con ADN y después de un refuerzo con proteína. Cada grupo de animales se inmunizó con una formulación de gp120 diferente como se indica.

La Figura 10 es una gráfica que representa el porcentaje de neutralización contra SF162 del VIH-1 con sueros de conejo obtenidos antes de la inmunización, después de la inmunización con ADN, después de un refuerzo con proteína y después de dos refuerzos con proteína. Cada grupo de animales se inmunizó con una formulación de gp120 diferente como se indica.

La Figura 11 es una gráfica que representa el porcentaje de neutralización contra Ba-L del VIH-1 con sueros de conejo obtenidos antes de la inmunización, después de la inmunización con ADN, después de un refuerzo con proteína y después de dos refuerzos con proteína. Cada grupo de animales se inmunizó con una formulación de gp120 diferente como se indica.

La Figura 12 es una gráfica que representa el porcentaje de neutralización contra JRCSF del VIH-1 con sueros de conejo obtenidos antes de la inmunización, después de la inmunización con ADN, después de un refuerzo con proteína y después de dos refuerzos con proteína. Cada grupo de animales se inmunizó con una formulación de gp120 diferente como se indica.

Las Figuras 13A-D son un conjunto de gráficas que representan el porcentaje de neutralización de la cepa aislada primaria del clado A del VIH-1 DJ263 (Figs. 8A y 8D) y la cepa aislada primaria del clado C TV1 (Figs. 8B y 8C) con sueros de conejo después de la sensibilización con ADN y refuerzo con proteína. Cada grupo de animales se inmunizó con una formulación de gp120 diferente como se indica.

La Figura 14 representa las secuencias de aminoácidos de gp120 de las cepas aisladas A, Ba-L, B715, Czm y E.

Las Figuras 15A-E son un conjunto de gráficas que representan niveles de respuestas anti-IgG de gp120 después de cada inmunización con ADN y después de cada refuerzo con proteína gp120. Los antígenos de recubrimiento para ELISA se muestran en la parte superior de cada figura (clado A, B, Czm y E para las Figs. 15A, 15B, 15C y 15D, respectivamente). Los tiempos de administración de ADN y proteína se representan con

flechas continuas y discontinuas, respectivamente. "PG" se refiere a administración con pistola de genes. "IM" se refiere a administración intramuscular. "ID" se refiere a administración intradérmica.

Las Figuras 16A y 16B son un conjunto de gráficas que representan niveles de respuestas anti-gp120 en conejos inmunizados con la vacuna DP6-001 a los que el ADN se administró por una vía IM. Se muestra la reactividad por ELISA de sueros de conejos inmunizados con cuatro inoculaciones de ADN (IM) (círculo relleno) o cuatro inoculaciones de ADN (IM) y tres proteínas (IM) (círculo blanco). Los sueros se recogieron 14 días después de la última inmunización con ADN o con proteína y se probaron contra gp120 reunidas de clados B (B715 y Ba-L), cepas aisladas del VIH-1 de C, E y A. Los datos para machos se muestran en la Fig. 16A. Los datos para hembras se muestran en la Fig. 16B.

Las Figuras 17A y 17B son un conjunto de gráficas que representan respuesta anti-gp120 en conejos inmunizados con la formulación DP6-001 a los que el ADN se administró por una vía ID. Se muestra la reactividad por ELISA de sueros de conejos inmunizados con cuatro inoculaciones de ADN (ID) (círculo relleno) o cuatro inoculaciones de ADN (ID) y tres proteínas (IM) (círculo blanco). Los sueros se recogieron 14 días después de la última inmunización con ADN o con proteína y se probaron contra gp120 reunidas de los clados B (B715 y Ba-L), cepas aisladas del VIH-1 de C, E y A. Los datos para machos se muestran en la Fig. 17A. Los datos para hembras se muestran en la Fig. 17B.

Las Figuras 18A y 18B son un conjunto de gráficas que representan respuestas anti-gag en conejos inmunizados con la formulación DP6-001 a los que el ADN se administró por una vía IM. Se muestra la reactividad por ELISA de sueros de conejos inmunizados con cuatro inoculaciones de ADN (IM) (círculo relleno) o cuatro inoculaciones de ADN (IM) y tres proteínas (IM) (círculo blanco). Los sueros se recogieron 14 días después de la última inmunización con ADN o con proteína y se probaron contra proteína gag. Los datos para machos se muestran en la Fig. 18A. Los datos para hembras se muestran en la Fig. 18B.

La Figura 19A y 19B son un conjunto de gráficas que representan respuestas anti-gag en conejos inmunizados con la formulación DP6-001 a los que el ADN se administró por vía ID. Se muestra la reactividad por ELISA de sueros de conejos inmunizados con cuatro inoculaciones de ADN (ID) (círculo relleno) o cuatro inoculaciones de ADN (ID) y tres proteínas (IM) (círculo blanco). Los sueros se recogieron 14 días después de la última inmunización con ADN o con proteína y se probaron contra proteína gag. Los datos para machos se muestran en la Fig. 19A. Los datos para hembras se muestran en la Fig. 19B.

Las Figuras 20A-E son un conjunto de gráficas que representan títulos de anticuerpos en macacos inmunizados con ADN polivalente y proteína gp120. Los títulos de anticuerpos en sueros de macacos que recibieron dos (ADN2), tres (ADN3) y cuatro (ADN4) inmunizaciones con ADN y uno (Proteína 1) y dos (Proteína 2) refuerzos se ensayaron por ELISA contra proteínas gp120 de B715 (A), gp120 de Ba-L (B), gp120 de Czm (C), gp120 de E960 (D) y gag (E). El suero se recogió dos semanas después de cada inmunización. Los títulos de anticuerpos se basan en los títulos de ELISA de punto final y se obtuvieron de la dilución de suero inmune que produce dos veces la densidad óptica a 450 nm en comparación con la dilución correspondiente de suero de un animal sin tratamiento previo.

Las Figuras 21A-21C son un conjunto de gráficas que representan el porcentaje de neutralización de Ba-L del VIHs por el suero de macacos inmunizados con sensibilización con ADN y refuerzo con proteína. El suero de cada animal recogido después de cuatro ADN (ADN 4) y uno (proteína 1) y dos (proteína 2) refuerzos se ensayaron para neutralizar la actividad contra la cepa aislada VIHs_{Ba-L} en células U373. El porcentaje de inhibición de la infección se basó en el grado de infección observado en presencia de suero inmune en comparación con controles sin tratar.

Las Figuras 22A-22E son un conjunto de gráficas que representan títulos de ELISA de punto final de suero en macacos inmunizados con ADN polivalente y proteína gp120. Los títulos de anticuerpos en sueros de macacos que recibieron dos (ADN 2), tres (ADN 3) y cuatro (ADN 4) inmunizaciones con ADN y un refuerzo (Proteína 1) y dos refuerzos (Proteína 2) 5, 9 y 13 semanas después de sueros de refuerzo con proteína se ensayaron para ELISA contra las proteínas gp120 de Ba-L (A), gp120 de A (B), gp120 de E760 (C), gp120 de B715 (D) y gp120 de Czm (E). El suero se recogió dos semanas después de cada inmunización y 5, 9 y 13 semanas después del segundo refuerzo con proteína. Los títulos de anticuerpos se basan en los títulos de ELISA de punto final y se obtuvieron de la dilución de suero inmune que produce dos veces la densidad óptica a 450 nm en comparación con la dilución de suero correspondiente de un animal sin tratamiento previo.

Las Figuras 23A-23C son un conjunto de gráficas que representan el porcentaje de neutralización de Ba-L del VIHs por el suero de macacos inmunizados con sensibilización con ADN y refuerzo con proteína. El suero de cada animal recogido después de cuatro ADN (ADN 4; Fig. 23A) y uno (proteína 1; Fig. 23B) y dos (proteína 2; Fig. 23C) refuerzos se ensayaron para neutralizar la actividad contra cepas aisladas de Ba-L del VIHs en células U373. El porcentaje de inhibición de la infección se basó en el grado de infección observado en presencia de suero inmune en comparación con controles sin tratar.

Las Figuras 24A-24R son un conjunto de gráficas que representan números de PBMC que expresan IFN- γ de macacos inmunizados con formulaciones de ADN/proteína, en las que PBMC se estimularon con péptidos gag. Se realizaron ensayos de ELISPOT usando PBMC de macacos aislados después del cuarto ADN (ADN 4), primer (proteína 1) y segundo (proteína 2) refuerzos con proteína gp120. Varios conjuntos de péptidos 15-meros con solapamiento de 11 aminoácidos de la proteína gag del clon molecular VIH-1HXB2 se usaron para la estimulación de PBMC durante 18 h antes de que las manchas se revelaran y se cuantificaran. Los datos para inmunización ID se muestran en la Fig. 24A-24I. El ADN para inmunización IM se muestra en las Figs. 24J-24R.

Las Figuras 25A y 25B son un conjunto de gráficas que representan números de PBMC que expresan IFN- γ de macacos inmunizados con formulaciones de ADN que codifican el gen gag natural y de codón optimizado, en los que PBMC se estimularon con péptidos gag. Comparación de PBMC que expresan IFN- γ como se mide por ELISPOT contra proteína gag en macacos inmunizados con ADN que codifica el gen gag natural y de codón optimizado por vía intradérmica (Estudio 1 en la Fig. 25A, y Estudio 2 en la Fig. 25B).

Las Figuras 26A-26D son un conjunto de gráficas que representan números de PBMC que expresan IFN- γ de macacos inmunizados con formulaciones de ADN/proteína, en las que las PBMC se estimularon con péptidos de Env del clado E y Ba-L. Se realizaron ensayos de ELISPOT usando PBMC de macacos aislados después del cuarto ADN (ADN 4; Figs. 26A y 26C) y después de primer refuerzo con proteína (proteína 1; Fig. 26B y 26D). Cuatro conjuntos de péptidos 15-meros con solapamiento de 11 aminoácidos de proteínas gp120 de VIH-1_{Ba-L} y cepas aisladas del clado E se usaron para la estimulación de PBMC durante 18 h antes de que las manchas se revelaran.

Las Figuras 27-38 son representaciones de secuencias de ADN naturales y de codón optimizado de genes gp120 y gag de las cepas aisladas del VIH-1 Czm, Ba-L, B, E y A.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las composiciones en el presente documento se proporcionan basándose, en parte, en el hallazgo de que cepas aisladas del VIH-1 primarias de múltiples subtipos genéticos diferentes del VIH pueden combinarse para crear composiciones de ADN polivalentes que pueden inducir amplias respuestas de anticuerpos (por ejemplo, respuestas de anticuerpos neutralizantes) y respuestas inmunitarias mediadas por células (por ejemplo, linfocito citotóxico T (CTL)). Las composiciones proporcionadas en el presente documento también se basan en el hallazgo de refuerzos con proteína, en los que proteínas del VIH de cepas aisladas primarias pueden usarse para aumentar respuestas inmunitarias en sujetos a los que se les han administrado composiciones de ADN polivalente. Estrategias recientes solo han sufrido protección inmune mínima debido al escape del reconocimiento de CTL (Barouch y col., 2002, Nature, 415:335-339; Goulder y col., 2001, Nature, 412:334-338; Goulder y col., 1997, Nature Med., 3:212-217). Para tratar este problema, secuencias de ácidos nucleicos de cepas aisladas del VIH-1 primarias se usan para generar composiciones polivalentes, mejorando así las respuestas inmunitarias mediadas por células y disminuyendo la probabilidad de escape de CTL por el virus, además de mejorar la respuesta de anticuerpos neutralizantes. Esto proporciona flexibilidad en el diseño de composiciones basadas en combinaciones de vectores que codifican diferentes proteínas del VIH-1 y combinaciones de proteínas del VIH-1.

Los refuerzos con proteína pueden incluir proteínas del VIH correspondientes a todas las proteínas codificadas por ADN administrado en etapas de vacunación con ADN previas. Alternativamente se administra un subconjunto de proteínas correspondiente a la vacuna de ADN. Por ejemplo, si el ADN que codifica cinco proteínas del VIH diferentes se administra (por ejemplo, genes de Env de cinco cepas aisladas del VIH-1 diferentes), el (los) posterior(es) refuerzo(s) con proteína puede(n) incluir las cinco proteínas de Env, cuatro de las proteínas de Env, o menos.

Las composiciones de ADN y de proteína pueden incluir diferentes genes y proteínas de cepas aisladas del VIH. En algunas realizaciones, los antígenos de Env y Gag están codificados por las composiciones de ADN, y los antígenos de Env están incluidos en las composiciones de proteína. Por consiguiente, en el presente documento se describen composiciones que comprenden glicoproteínas de Env (gp), una combinación de vectores que codifica glicoproteínas de Env derivadas de las secuencias de más de una cepa aislada primaria del VIH-1 (por ejemplo, clado A, B, C, D, E, F o G), una combinación de tanto tipos diferentes como clados diferentes, y/o combinaciones que codifican proteínas gag del VIH-1.

Las composiciones de ADN y de proteína pueden incluir secuencias de cepas aisladas de múltiples clados, o múltiples cepas aisladas de un único clado. Pueden usarse diferentes combinaciones. Por ejemplo, una composición de ADN puede incluir genes que codifican un antígeno de una cepa aislada del clado A, una cepa aislada del clado B, una cepa aislada del clado D y una cepa aislada del clado E. La composición puede incluir adicionalmente un antígeno de una segunda cepa aislada del clado B.

Las secuencias codificantes de gp de Env del VIH-1 primarias pueden clonarse en ácido nucleico, por ejemplo, ADN, vectores de vacuna que producen un panel de plásmidos de vacuna de ADN. La envoltura del VIH es

la diana predominante de los anticuerpos neutralizantes en individuos infectados por el VIH. Por tanto, una vacuna que codifica gp de Env puede usarse para inducir anticuerpos neutralizantes. Las gp de Env del VIH-1 primarias incluyen gp120, gp140, gp160 y sgp41. Para preparar nuevas vacunas, estas gp de Env pueden codificarse por ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN, de cepas aisladas primarias que engloban los siete clados genéticos, A, B, C, D, E, F y G del grupo principal del VIH-1. Estas secuencias se aislaron de distintas regiones geográficas: América del norte, África, Asia y América del sur. Las gp de Env también pueden codificarse por ADN de cepas aisladas primarias que engloban otros clados genéticos del grupo principal del VIH-1 (por ejemplo, H, I, J y K), clados genéticos del grupo O del VIH-1 y clados genéticos del grupo N del VIH-1.

Debido a la diversidad genética del VIH, las vacunas basadas en antígenos de cepas de laboratorio del VIH-1, a diferencia de cepas aisladas primarias, se han limitado en su capacidad para generar amplias respuestas inmunitarias contra cepas primarias del VIH prevalentes (por ejemplo, véanse Barouch y col., 2002, *Nature*, 415:335-339; Johnston y Flores, 2001, *Curr. Op. In. Pharmac.*, 1:504-510; y Mascola y col., 1996, *J. Infect. Dis.*, 173:340-348). Combinando múltiples moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, plásmidos de ADN) que codifican proteínas de cepas aisladas primarias (por ejemplo, múltiples gp de Env) en una vacuna polivalente, las nuevas vacunas proporcionan una anchura considerable de la reactividad a través de clados genéticos. El ADN de cepas aisladas primarias puede recogerse directamente de pacientes infectados por el VIH, someterse mínimamente a pases como mucho, secuenciarse y clonarse en múltiples vectores de vacuna de ADN para preparar una vacuna polivalente. El sometimiento a pases mínimo puede requerirse para propagar el ADN si no está disponible suficiente ADN para la secuenciación. Esta vacuna polivalente provoca una amplia respuesta inmunitaria y amplia neutralización contra gp de Env de las diferentes cepas aisladas. La polivalencia disminuye la probabilidad de baja eficacia producida por la diversificación genética constantemente variable y mutación del VIH.

Vacunas de ácido nucleico

Las vacunas son útiles en prevenir o reducir la infección o enfermedad induciendo respuestas inmunitarias, a un antígeno o antígenos, en un individuo. Por ejemplo, las vacunas pueden usarse profilácticamente en individuos sin tratamiento previo, o terapéuticamente en individuos ya infectados por el VIH. Vacunas tradicionales, que incluyen virus inactivados o antígeno de proteínas de subunidad, han tenido escasa inmunogenicidad, escasa inducción de inmunidad mediada por células, asuntos de seguridad y estabilidad y baja eficacia. El desarrollo de vacunas de ácido nucleico ha demostrado ser prometedor.

Las nuevas vacunas de ADN tienen la ventaja de ser más resistentes a la rápida evolución y mutación del VIH debido a su polivalencia. Las nuevas vacunas de ADN tienen la ventaja añadida de estar derivadas de cepas aisladas primarias, que en combinación con su polivalencia, puede inducir respuesta inmunitaria más amplia, concretamente anticuerpos neutralizantes más eficaces contra el VIH (por ejemplo, VIH-1) y/o respuestas inmunitarias mediadas por células (por ejemplo, linfocito citotóxico T (CTL)), proporcionando así una vacuna más eficaz para el VIH. Esta combinación de polivalencia y de ser derivada de ADN de cepas aisladas primarias confiere sus ventajas como una vacuna novedosa para el VIH (por ejemplo, VIH-1).

Composiciones de ácido nucleico

Se proporcionan composiciones de ácido nucleico que codifican antígenos de cepas aisladas primarias del VIH. Hay muchas formas de presentar ácido nucleico que codifica antígeno a un huésped. Las vacunas de ADN pueden consistir en plásmido de ADN desnudo que codifica el antígeno. También pueden usarse vectores bacterianos, vectores de replicón, bacterias atenuadas vivas, co-administración de vacunas de ADN con vectores atenuados vivos y vectores víricos para la expresión de genes heterólogos. También pueden usarse vectores bacterianos tales como BCG y *Listeria*. En el caso de vectores de replicón de ADN desnudo, un plásmido de expresión de mamífero sirve de vehículo para la transcripción inicial del replicón. El replicón se amplifica dentro del citoplasma, produciendo ARNm más abundante que codifica el gen heterólogo de forma que la eficiencia de transfección inicial pueda ser menos importante para la inmunogenicidad. Los vectores víricos atenuados vivos (por ejemplo, variolovacuna recombinante (por ejemplo, variolovacuna Ankara modificada (MVA), IDT, Alemania), adenovirus recombinantes, virus de la viruela aviar (por ejemplo, viruela del canario (por ejemplo, ALVAC®, Aventis Pasteur) o viruela aviar), virus de la poliomielitis, y vectores del virión de alfavirus) han sido satisfactorios en inducir respuesta inmunitaria mediada por células y también pueden usarse. Los virus de la viruela aviar son defectuosos en huéspedes de mamífero, pero pueden expresar genes heterólogos insertados bajo promotores tempranos. Los vectores de adenovirus y virus de la poliomielitis recombinantes pueden desarrollarse en el intestino y así pueden estimular eficientes respuestas inmunitarias de la mucosa. Finalmente, las bacterias atenuadas también pueden usarse como vehículo para la administración de vacunas de ADN. Ejemplos de bacterias adecuadas incluyen *S. enterica*, *S. typhimurium*, *Listeria* y BCG. El uso de bacterias mutantes con paredes celulares débiles puede ayudar a la salida de plásmidos de ADN de la bacteria.

La captación de ADN puede mejorarse algunas veces por el uso de adyuvantes apropiados. Polímeros sintéticos (por ejemplo, poliaminoácidos, co-polímeros de aminoácidos, saponina, aceite de parafina, muramidipéptido, Regressin (Vetrepharm, Athens GA) y Avridine) y formulaciones liposómicas pueden añadirse como adyuvantes a la formulación de vacuna para mejorar la estabilidad de ADN y captación de ADN por las células

huésped, y puede disminuir la dosificación requerida para inducir una respuesta inmunitaria eficaz. Independientemente de la vía, los adyuvantes pueden administrarse antes, durante o después de la administración del ácido nucleico. No solo puede el adyuvante aumentar la captación de ácido nucleico en células huésped, puede aumentar la expresión del antígeno del ácido nucleico dentro de la célula, inducir células presentadoras de antígeno a infiltrarse en la región de tejido en la que el antígeno está siendo expresado, o aumentar la respuesta específica para antígeno proporcionada por linfocitos.

La captación de ácidos nucleico también puede mejorarse de otras formas. Por ejemplo, la captación de ADN por administración IM de vacuna puede mejorarse mediante la adición de fosfato de sodio a la formulación. El aumento de la captación de ADN por administración IM también puede llevarse a cabo por electrotransferencia (por ejemplo, aplicando una serie de impulsos eléctricos al músculo inmediatamente después de la inmunización con ADN). Adyuvantes que también pueden añadirse a la vacuna para mejorar la estabilidad y captación de ADN, además de mejorar la inducción inmune, incluyen emulsiones de agua (por ejemplo, adyuvante completo e incompleto de Freund), aceite, *Corynebacterium parvum*, *Bacillus Calmette Guérin*, óxido de hierro, alginato de sodio, hidróxido de aluminio, aluminio y sales de calcio (es decir, alumbre), motivos CpG sin metilar, glucano y sulfato de dextrano. La coinyección de citocinas, ubiquitina o moléculas coestimuladoras también puede ayudar a mejorar la inducción inmune. Los antígenos descritos en el presente documento también pueden fusionarse con genes de citocina, epítopos colaboradores, ubiquitina o secuencias señal para potenciar una respuesta inmunitaria. Las fusiones también pueden usarse para ayudar a elegir como diana ciertos tipos de células.

El medio en el que el vector de ADN se introduce debe ser fisiológicamente aceptable por motivos de seguridad. Vehículos farmacéuticos adecuados incluyen agua estéril, solución salina, dextrosa, glucosa u otras disoluciones tamponadas (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato). En el medio pueden estar incluidos conservantes, estabilizadores, diluyentes, emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, agente potenciadores de la viscosidad, colores fisiológicamente aceptables, etc.

Una vez se ha administrado la vacuna de ADN, las moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, plásmidos de ADN) se recogen en células huésped, que luego expresan el ADN de plásmido como proteína. Una vez expresada, la proteína se procesa y se presenta en el contexto de moléculas de clase I y clase II de auto-histocompatibilidad mayor (MHC). Entonces, el huésped desarrolla una respuesta inmunitaria contra el inmunogén codificado por ADN. Para mejorar la eficacia de la vacuna pueden usarse múltiples inyecciones para terapia o profilaxis durante periodos prolongados de tiempo. Para mejorar la inducción inmune puede emplearse una estrategia de sensibilización-refuerzo. La vacunación de sensibilización con ADN y una modalidad diferente para reforzar (por ejemplo, vector vírico vivo o antígeno de proteína) ha sido satisfactoria en inducir inmunidad mediada por células. El momento apropiado entre la sensibilización y el refuerzo varía y se ajusta para cada vacuna.

Administración de vacunas de ADN

Las composiciones de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden administrarse, o inocularse, a un individuo como moléculas de ácidos nucleicos desnudas (por ejemplo, plásmido de ADN desnudo) en disolución fisiológicamente compatible tal como agua, solución salina, tampón Tris-EDTA (TE), o en solución salina tamponada con fosfato (PBS). También puede administrarse en presencia de sustancias (por ejemplo, agentes de facilitación y adyuvantes) que tienen la capacidad de promover la captación de ácidos nucleicos o reclutar células del sistema inmune al sitio de inoculación. Los adyuvantes se describen en cualquier parte en el presente documento. Las vacunas tienen muchos modos y vías de administración. Pueden administrarse intradérmicamente (ID), intramuscularmente (IM) y por cualquier ruta, pueden administrarse por inyección con aguja, pistola de genes o inyección por chorro sin aguja (por ejemplo, Biojector™ (Bioject Inc., Portland, OR). Otros modos de administración incluyen inoculación oral, intravenosa, intraperitoneal, intrapulmonar, intravítrea y subcutánea. La inoculación tópica también es posible, y puede denominarse vacunación mucosa. Éstas incluyen vías tópicas intranasales, oculares, orales, vaginales o rectales. La administración por estas vías tópicas puede ser por gotas nasales, colirios, inhalantes, supositorios o microesferas.

Dosis adecuadas de composiciones de ácido nucleico para seres humanos pueden oscilar de 1 µg/kg a 1 mg/kg de ácido nucleico total, por ejemplo, de 5 µg/kg - 500 mg/kg de ADN total, 10 µg/kg - 250 µg/kg de ADN total, o 10 µg/kg - 170 µg/kg de ADN total. En una realización, a un sujeto humano (18-50 años de edad, 45-75 kg) se administran 1,2 mg - 7,2 mg de ADN. "ADN total" y "ácido nucleico total" se refieren a un conjunto de ácidos nucleicos que codifica distintos antígenos. Por ejemplo, una dosis de 50 mg de ADN total que codifica 5 antígenos de Env diferentes puede tener 1 mg de cada antígeno. Las vacunas de ADN pueden administrarse múltiples veces, por ejemplo, entre dos-seis veces, por ejemplo, tres veces. En un procedimiento a modo de ejemplo, 100 µg de una composición de ADN se administra a un sujeto humano las 0, 4 y 12 semanas (100 µg por administración).

Composiciones de proteína

Proteínas, por ejemplo, proteínas aisladas, que codifican antígenos de cepas aisladas primarias del VIH pueden administrarse como "refuerzos" tras la vacunación con composiciones de ácido nucleico. Las proteínas recombinantes (por ejemplo, proteínas producidas clonando ADN que codifica antígenos de cepas aisladas primarias

usando técnicas biológicas moleculares convencionales) pueden ser una fuente de proteínas aisladas para refuerzo. Proteínas usadas para reforzar un individuo pueden incluir las mismas secuencias que las codificadas por las vacunas de ADN previamente administradas al individuo, por ejemplo, gp120, gp140, gp160 y/o gp41.

Para la producción a gran escala de proteínas del VIH recombinantes, líneas celulares transfectantes se generan (por ejemplo, transfectantes de células de ovario de hámster chino), y líneas celulares que expresan establemente las proteínas del VIH se generan a partir de los transfectantes. Las líneas que expresan en exceso la proteína se seleccionan para la producción. Se mantiene bancos de células maestras y de trabajo de células seleccionadas. Las proteínas se expresan cultivando células en cultivos a gran escala en medio sin proteína. Los sobrenadantes de las células se recogen. Entonces se purifica la proteína (por ejemplo, usando cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de filtración en gel), y se prueban para pureza. Las proteínas se purifican y se concentran usando técnicas tales como cromatografía de filtración en gel y de intercambio iónico. A continuación, las proteínas se evalúan para identidad, potencia, pureza, cantidad, esterilidad, la presencia de endotoxina y la seguridad general según las pautas de las Buenas prácticas de fabricación (GMP). La identidad puede determinarse con ELISA con anticuerpos específicos para el clado de la proteína. La potencia puede evaluarse con ELISA (por ejemplo, reactividad de sueros de conejo con la proteína purificada). La pureza puede evaluarse con SDS-PAGE y análisis de tinción con plata de la proteína, y cromatografía de líquidos de alto rendimiento por exclusión de tamaño. Las cantidades pueden determinarse por ensayos basados en Coomassie, ensayos espectrofotométricos y mediciones de volumen. La calidad de las preparaciones de proteína puede determinarse por inspección visual y mediciones de pH. La esterilidad puede determinarse mediante procedimientos descritos en el artículo 21 del C.F.R. n° 610.12. La endotoxina puede determinarse por ensayos de amebocito de *Limulus*. La seguridad general puede determinarse mediante procedimientos descritos en el artículo 21 del C.F.R. n° 610.11.

Pueden administrarse composiciones de proteína que contienen una cantidad inmunogénicamente eficaz de una proteína del VIH recombinante, o fragmentos de la misma. Composiciones adecuadas puede incluir, por ejemplo, lipopéptidos (por ejemplo, Vitiello y col., 1995, J. Clin. Invest., 95:341), composiciones de péptido encapsuladas en microesferas de poli(DL-lactida-co-glicolida) ("PLG") (véase, por ejemplo, Eldridge y col., 1991, Molec. Immunol., 28:287-94; Alonso y col., 1994, Vaccine, 12:299-306; Jones y col., 1995, Vaccine 13:675-81) y composiciones de péptido contenidas en complejos inmunestimulantes (ISCOM) (véase, por ejemplo, Takahashi y col., 1990, Nature 344:873-75; Hu y col., 1998, Clin. Exp. Immunol. 113:235-43).

Vehículos útiles que pueden usarse con las composiciones inmunogénicas y vacunas descritas en el presente documento son muy conocidos, e incluyen, por ejemplo, tiroglobulina, albúminas tales como albúmina de suero humano, toxoide tetánico, poliaminoácidos tales como poli L-lisina, ácido poli L-glutámico, gripe, proteína del núcleo del virus de la hepatitis B y similares. Las composiciones y vacunas pueden contener un diluyente fisiológicamente tolerable (es decir, aceptable) tal como agua o solución salina, normalmente solución salina tamponada con fosfato. Las composiciones y vacunas también incluyen normalmente un adyuvante. Adyuvantes tales como QS-21, adyuvante incompleto de Freund, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio o alumbre son ejemplos de materiales muy conocidos en la técnica. Adicionalmente, las respuestas de CTL pueden sensibilizarse conjugando proteínas S (o fragmentos, derivado o análogos de las mismas) con lípidos, tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina (P₃CSS).

Administración de composiciones de proteína

La inmunización con una composición que contiene una composición de proteína del VIH, por ejemplo, mediante inyección, aerosol, vía oral, transdérmica, transmucosa, intrapleurale, intratecal, u otra vía adecuada, induce al sistema inmunitario del huésped a responder a la composición. En una realización se administra una composición de proteínas de Env. En una realización se administra una composición de proteína de Env y Gag.

Un intervalo a modo de ejemplo para una cantidad inmunogénica de composición de proteína es 5 µg/kg-500 µg/kg, por ejemplo, 10-100 µg/kg de proteína total, con adyuvante. En una realización, una dosis de 325 µg de una composición de proteína se administra a un ser humano (18-55 años de edad, 45-75 kg). Un programa a modo de ejemplo de administración de la composición de proteína incluye un primer refuerzo intramuscular 8 semanas después de la inmunización con ácido nucleico final, seguido de un segundo refuerzo intramuscular con la composición de proteína 8 semanas después del primer refuerzo.

Kits

Se proporcionan kits que comprenden las composiciones de ácido nucleico y de proteína. Los kits pueden incluir uno o varios de otros elementos que incluyen: instrucciones para su uso; otros reactivos, por ejemplo, un diluyente, dispositivos u otros materiales para preparar la composición para administración; vehículos farmacéuticamente aceptables; y dispositivos u otros materiales para administración a un sujeto. Instrucciones para su uso pueden incluir instrucciones para la administración terapéutica (por ejemplo, vacunación de ADN y refuerzo con proteína) que incluye dosificaciones y/o modos de administración sugeridos, por ejemplo, en un sujeto humano, como se describe en el presente documento.

El kit puede contener adicionalmente al menos un reactivo adicional, tal como un agente de diagnóstico o terapéutico, por ejemplo, un agente de diagnóstico para monitorizar una respuesta a respuesta inmunitaria a las composiciones en el sujeto, o un agente terapéutico adicional como se describe en el presente documento (véase, por ejemplo, "Terapias de combinación", a continuación).

En una realización, el kit incluye un vial (u otro recipiente adecuado) que contiene ácidos nucleicos que codifican tres, cuatro, cinco o seis gp de Env del VIH distintas. El kit también incluye un segundo vial que contiene gp de Env del VIH recombinantes que son las mismas gp de Env que las codificadas por los ácidos nucleicos en el kit. El kit puede incluir adyuvante QS-21 (50 µg/dosis/sujeto) y ciclodextrina como excipiente (30 mg/sujeto). El adyuvante y el excipiente se formulan con la proteína, y pueden incluirse en la formulación o envasarse por separado dentro del kit.

Terapias de combinación

El ácido nucleico y las composiciones de proteína descritas en el presente documento pueden usarse en procedimientos para tratar sujetos infectados por el VIH. Los procedimientos para tratar estos sujetos con estas composiciones pueden incluir terapias de combinación en las que se administran otros tratamientos para el VIH. Por ejemplo, a un sujeto que se somete a vacunación de ADN con refuerzo con proteína pueden administrársele fármacos antirretrovirales individualmente, o como terapia antirretroviral altamente activa ("HAART"), que se refiere a terapia con diversas combinaciones de inhibidores de la transcriptasa inversa de nucleósidos, inhibidores de la transcriptasa inversa de no nucleósidos e inhibidores de proteasas del VIH.

Los inhibidores de la transcriptasa inversa de nucleósidos incluyen, por ejemplo, zidovudina (AZT); didanosina (ddI); zalcitabina (ddC); estavudina (d4T); lamivudina (3TC); abacavir (1592U89); adefovir dipivoxilo [bis(POM)-PMEA]; lobucavir (BMS-180194); y lidenosina (FddA), 9-(2,3-didesoxi-2-fluoro-b-D-treo-pentofuranosil)adenina.

Los inhibidores de la transcriptasa inversa de no nucleósidos incluyen nevirapina (BI-RG-587); delaviradina (BHAP, U-90152); y efavirenz (DMP-266).

Los inhibidores de proteasas incluyen saquinavir (Ro 31-8959); ritonavir (ABT-538); indinavir (MK-639); nelfinavir (AG-1343) disponible bajo la marca registrada VIRACEPT™ de Agouron Pharmaceuticals, Inc.; amprenavir (141 W94), un inhibidor de proteasas de no péptido, marca registrada AGENERASE™; y lasinavir (BMS-234475).

El ácido nucleico y composiciones de proteína descritas en el presente documento pueden potenciar la eficacia de cualquier terapia contra el SIDA conocida, por ejemplo, reduciendo la carga viral del VIH en el paciente infectado. Las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse como una terapia auxiliar para potenciar una respuesta inmunitaria del individuo infectado contra el virus.

Evaluación de respuestas inmunitarias a vacunaciones y refuerzos con proteína

Los avances en el campo de la inmunología han permitido evaluaciones más minuciosas y sensibles de respuestas celulares a vacunas del VIH candidatas. Tales ensayos como tinción intracelular (por ejemplo, citometría de flujo) y ELISPOT (un formato de enzimmunoanálisis de adsorción) permiten detectar y contar células que producen citocinas (por ejemplo, TNF α y IFN- γ) en respuesta a antígenos. Por ejemplo, el aislamiento de esplenocitos o células monocíticas de sangre periférica (PBMC) de animales o pacientes humanos seguido de exposición *in vitro* a epítopo del VIH tal como V3, y finalmente ensayo por ELISPOT y/o tinción intracelular de citocinas (ICS), puede determinar las posibilidades de una respuesta inmunitaria mediada por células en receptores de vacuna. La citometría de flujo usando tetrámeros (es decir, moléculas que consisten en cuatro copias de una molécula de clase I dada unida a su péptido relacionado y fosfatasa alcalina) permite la enumeración de linfocitos T específicos para antígeno (por ejemplo, detección de linfocitos T que reconocen péptidos específicos unidos a moléculas de clase I del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC)). Puede usarse un ensayo de liberación de cromo convencional para evaluar la citotoxicidad. Para evaluar una respuesta inmunitaria mediada por células a una vacuna de ADN también pueden usarse los enfoques más tradicionales de medir la proliferación de linfocitos T en respuesta a antígeno y la destrucción mediada por CTL de células autólogas que expresan epítopos del VIH.

Pueden usarse ensayos de ELISA y transferencias Western para evaluar respuestas inmunitarias humorales. En particular, pueden usarse ELISA y transferencias Western para evaluar la unión a anticuerpo, capacidad de neutralización de anticuerpos, inhibición de la fusión mediada por anticuerpos y citotoxicidad dependiente de anticuerpo.

Ensayo de MT-2 – Puede realizarse un ensayo de MT-2 para medir respuestas de anticuerpos neutralizantes. La neutralización mediada por anticuerpo de IIIB y MN del VIH-1 (una cepa de laboratorio del clado B) puede medirse en un ensayo de destrucción de células MT-2 como se ha descrito previamente (Montefiori y col., 1988, J. Clin. Microbiol., 26:231-237). IIIB y MN del VIH-1 inducen la formación de sincitios en linfocitos T MT-2. La

inhibición de la formación de sincitios por los sueros muestra la actividad de anticuerpos neutralizantes presentes dentro de los sueros, inducida por la vacunación. Brevemente, sueros de prueba y de control vacunados pueden exponerse a células viralmente infectadas (por ejemplo, línea de linfocitos T MT-2). La neutralización puede medirse por tinción de células viables (por ejemplo, con rojo neutro de Finter cuando los efectos citopáticos en los pocillos de control son aproximadamente >70% pero inferiores al 100%). El porcentaje de protección puede determinarse calculando la diferencia en la absorción (A_{540}) entre pocillos de prueba (células+virus) y dividiendo este resultado entre la diferencia en la absorción entre pocillos de control de células (células solo) y pocillos de control de virus (virus solo). Los títulos de neutralización se expresan entonces como el recíproco de la dilución en plasma requerido para proteger al menos el 50% de las células de la destrucción inducida por el virus.

EJEMPLOS

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Construcción de glicoproteínas de la envuelta del VIH-1 gp120, gp140 y gp41. Vacunas de ADN de cepas aisladas primarias del clado A-G

Los fragmentos de genes que codifica la porción extracelular de gp de Env primarias del VIH-1, tanto en forma de gp120 como de una gp140 escindible con el sitio de escisión natural intacto entre gp120 y gp41, se amplificaron por PCR a partir de 9 genes de Env primarios diferentes que representaban 7 clados genéticos, A a G, del grupo M del VIH-1 (Tabla 1). Se diseñó un par de cebadores de PCR consenso y se usó para amplificar nuevos genes gp120 diferentes: un cebador de hebra positiva GP120-p-fl (p-ctgtgggtcacagtctattatgggtacc) (SEC ID N°: 1) y un cebador de hebra negativa GP120-p-b1 (gtgcggatccttactccaccactcttcttggcc) (SEC ID N°: 2). Los cebadores consenso para amplificar genes gp140 fueron GP120-p-fl para la hebra positiva y JAPCR502 (cgacggatccttatgtatgcaaccaattccac) (SEC ID N°: 3) para la hebra negativa.

Los productos de PCR con el extremo como diseñado en 5' se digirieron adicionalmente por BamHI en el extremo 3', y se clonaron en el vector de vacuna de ADN pJW4303 (Chapman, y col., 1991, Nucleic Acids Res 19:3979-3986; Lu y col., 1996, J Virology 70:3978-3991; Lu y col., 1998, AIDS Res y Hum Retroviruses 14:151-155). El vector pJW4303 se digirió primero con NheI, seguido de tratamiento con fragmento de Klenow para hacer como el extremo y luego se cortó de nuevo con BamHI. El sitio NheI se regeneró después de la ligación con los insertos de Env, que están en marco con la secuencia conductora del activador tisular del plasminógeno (tPA) en pJW4303.

Los plásmidos de vacuna de ADN se llamaron pJW4303/gp120 o pJW4303/gp140.A1, A2, B, C1, C2, D, E, F y G respectivamente (Tabla 1). La Tabla 1 muestra componentes de vacuna polivalente útiles, la cepa y el número de acceso de GenBank del que se derivaron, el clado genético y el país de origen. Para vacunas de ADN de gp41 soluble (sgp41), los cebadores consenso GP41-P-F1 (gtcgctccgtagcgagtggaataggagctgtgttcctgggttc) (SEC ID N°: 4) y JAPCR502 se usaron para amplificar genes sgp41, que se clonaron en NheI de pJW4303 y

Tabla 1. Componentes de vacuna de ADN de glicoproteína de la envuelta del VIH-1 polivalente

Componentes de vacuna de ADN de gp120 polivalente	Componentes de vacuna de ADN de gp140 polivalente	Componentes de vacuna de ADN de gp41 polivalente	Cepas de VIH-1	Clados genéticos	Regiones geográficas	Número de acceso de GeneBank
gp120.A1	gp140.A1	sgp41.A1	92RW020.5	A	África	U08794
gp120.A2	gp140.A2	sgp41.A2	92UG037.8	A	África	U09127
gp120.B	gp140.B	sgp41.B	92US715.6	B	América del Norte	U08451
gp120.C1	gp140.C1	sgp41.C1	92BR025.9	C	América del Sur	U09126
gp120.C2	gp140.C2	sgp41.C2	93MW965.26	C	África	U08455
gp120.D	gp140.D	sgp41.D	92UG021.16	D	África	U27399
gp120.E	gp140.E	sgp41.E	93TH976.17	E	Asia	U08458
gp120.F	gp140.F	sgp41.F	93BR020.17	F	América del Sur	U27401
gp120.G	gp140.G	sgp41.G	92UG975.10	G	África	U27426

Sitios BamHI. Para una vacuna polivalente dada puede usarse cualquier combinación de dos o más de los componentes enumerados en la Tabla 1. La vacuna polivalente puede administrarse como plásmido de ADN desnudo, con un agente de facilitación, con un adyuvante y/o con un refuerzo de proteína descrito en el presente documento.

Ejemplo 2: Respuesta inmunitaria producida por la vacuna de ADN de cepa aislada primaria del VIH-1

Inmunización con ADN. Un conejo de Nueva Zelanda hembra (2 kg) recibió tres inmunizaciones con ADN mensuales por pistola de genes. Cada disparo administró 1 µg de ADN y un total de 36 disparos no solapantes se administraron a cada conejo en cada uno de los tres momentos de tiempo en la superficie de piel abdominal afeitada

después de que los animales se anestesiaran según protocolos aprobados por IACUC. Se recogieron muestras de suero inmediatamente antes y 4 semanas después de cada inmunización.

ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción). Las muestras de suero de conejo se probaron para respuestas de anticuerpos para IgG específica para gp120 por ELISA. Se recubrieron placas de microtitulación con ConA (5 µg por pocillo) durante 1 hora y luego se lavaron 5 veces con tampón de lavado (PBS a pH 7,2 con 0,1% de Triton X-100). Se añadieron antígenos de Env a 1 µg/ml (100 µl para cada pocillo) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El bloqueo se hizo con 200 µl/pocillo de 4% de tampón de bloqueo de suero de la leche durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de eliminar el tampón de bloqueo y otros lavados de 5 veces se añadieron seriadamente 100 µl de sueros diluidos y se incubaron durante 1 hora. Las placas se lavaron 5 veces y se incubaron con 100 µl de anti-IgG de conejo biotinilada diluida a 1:1000 durante 1 hora, seguido de lavados. Entonces se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante diluida a 1:2000 (100 µl/pocillo) y se incubó durante 1 hora. Después de los lavados finales se añadieron 100 µl de sustrato TMB fresco por pocillo y se incubaron durante 3,5 min. La reacción se detuvo añadiendo 25 µl de H₂SO₄ 2 M y la densidad óptica (DO) de la placa se midió a 450 nm. Los ensayos de ELISA en los que se evaluó la reactividad del suero para gp120 se describen en los siguientes ejemplos.

Análisis de transferencia Western. Los antígenos gp120 expresados transitoriamente de sobrenadantes de células 293T y lisados celulares se sometieron a SDS-PAGE desnaturizante y se inmunotransfirieron sobre membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF). El bloqueo se hizo con 0,1% de I-Block. Se usó suero de conejo inmunizado con vacunas de ADN de gp120 polivalentes mixtas como anticuerpo de detección a dilución 1:500 y se incubó durante 45 minutos. Posteriormente, las membranas se lavaron con tampón de bloqueo y luego se hicieron reaccionar con anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de conejo o humana conjugada con AP a dilución 1:5000. Después del lavado final, el sustrato de luz para Western se aplicó a las membranas durante 5 minutos. Una vez se secaron las membranas, películas Kodak se expusieron a la membrana y se revelaron con un procesador X-Omat. La reactividad de env también se observó por transferencia Western.

Ejemplo 3: Ensayo de neutralización

Una forma de determinar la posible eficacia de una vacuna en animales es realizar ensayos funcionales *in vitro* de las células inmunitarias del animal. El ensayo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y el ensayo de MT-2 descrito anteriormente son ejemplos de respuestas humorales de evaluación en animales de ensayo vacunados *in vitro*. Como se describe más adelante, respuestas inmunitarias mediadas por células también pueden probarse para evaluar la capacidad funcional de células inmunitarias de animales vacunados. Estos ensayos también pueden realizarse *in vitro* con células inmunitarias aisladas de sujetos humanos en la determinación de la posible eficacia de una vacuna.

Ensayo de PBMC. La presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de un animal vacunado se probó en un ensayo funcional denominado un ensayo de neutralización. Se inmunizaron conejos como se describe en el Ejemplo 2, anteriormente, con una vacuna monovalente (filas 3-10) o vacuna polivalente (fila 11). La columna izquierda designa con qué vacuna de la cepa aislada primaria se vacunó el conejo. Los sueros, recogidos cuatro semanas después de la tercera inmunización, se aplicaron a células monocíticas de sangre periférica (PBMC) infectadas por las diferentes cepas aisladas virales primarias (designadas en la fila superior). La Tabla 2 muestra los resultados de este ensayo de neutralización de PBMC de inmunización monovalente y polivalente e inmunización de conejos. Los resultados de este ensayo se expresan como porcentaje de inhibición de virus en comparación con control de virus sin sueros de conejo de inmunizados. Los resultados de las vacunaciones monovalentes muestran una tendencia general hacia la capacidad a responder autológamente. Sin embargo, como se observa en la última fila, en la que se usó la vacuna polivalente, se obtuvo más del 57% de la inhibición contra cualquiera de los virus de cepas aisladas virales primarias probadas, que muestra que la vacuna de Env del VIH-1 primaria polivalente pudo generar amplias respuestas de anticuerpos neutralizantes en los conejos que reciben esta vacuna.

Tabla 2. Resultados de ensayos de neutralización

Sueros de conejo	PBMC con cepas aisladas primarias			
	A1	B	C1	E
A1	<10	38%	100%	<10
A2	99%	<10	5%	96%
B	<10	94%	24%	<10
C1	<10	<10	<10	<10
C2	<10	<10	100%	<10
D	<10	97%	100%	<10
E	32%	58%	13%	93%
F	27%	56%	36%	37%
G	< 10	0%	1%	<10
A a G	78%	57%	60%	97%

Ejemplo 4: Ensayo de la inmunidad protectora

La eficacia de las nuevas vacunas de ADN puede probarse en un modelo animal. Preferentemente se prueban respuestas en animales que pueden infectarse por el VIH tales como un primate no humano (por ejemplo, un chimpancé) o un animal, tal como un ratón, que tiene células inmunitarias humanas en circulación. Deben usarse
 5 números de animales suficientemente grandes para lograr significancia estadística, aunque en el caso de primates no humanos los números pueden limitarse y, por tanto, los experimentos pueden repetirse, por ejemplo, en el mismo animal. Una vez se vacunan animales de ensayo y se vacunan animales de control con un control negativo que contiene el mismo vector, pero sin el ADN de gp de Env heterólogo, ambos grupos de animales pueden entonces infectarse por el VIH. Pueden infectarse con cepas aisladas primarias o con cepas de laboratorio, o ambas. Después
 10 de una duración adecuada de tiempo para permitir la infección por el VIH y en el cual los animales vacunados con vacuna de control negativo empiezan a mostrar una disminución del número de linfocitos T, entonces los animales de ensayo y de control pueden probarse para respuesta inmunitaria protectora.

Una forma de probar una respuesta inmunitaria protectora es obtener sueros de los animales y usar ELISA (véase anteriormente) para probar la presencia de respuestas de anticuerpos para IgG específicas (véase el Ejemplo 2 anterior). Los animales pueden monitorizarse para la presencia, retardo o ausencia de infección por el VIH con respecto a animales de control negativo usando procedimientos conocidos en la técnica.

La eficacia de una vacuna puede evaluarse en animales sin infectar realizando ensayos funcionales *in vitro* sobre las células inmunitarias del animal vacunado. La presencia de anticuerpo neutralizante puede probarse en animales vacunados (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, primates no humanos) que no han sido infectados por el VIH. Este ensayo de neutralización se describe anteriormente en el Ejemplo 3. Las respuestas inmunitarias mediadas por células (por ejemplo, CTL) pueden probarse en animales (por ejemplo, ratón o primate no humano) sin infección por el VIH. Para probar una respuesta inmunitaria mediada por células pueden aislarse esplenocitos. Los
 25 esplenocitos se exponen entonces al antígeno de péptido V3, un antígeno del VIH comúnmente usado que proporciona un buen epítipo para probar la capacidad de linfocitos T a organizar una respuesta inmunitaria mediada por células *in vitro*. Entonces se realizan ELISPOT y/o tinción intracelular de citocinas (ICS) para determinar la función de linfocitos T. Pueden realizarse otras pruebas para la capacidad para resistir a infección que se conocen en la técnica. Aunque la mejor prueba de protección contra el VIH es exponer ese animal al VIH, actualmente no hay
 30 forma definitiva para infectar un animal no humano por el VIH. Se ha probado la infección por VIH de primates no humanos. El actual estándar de probar en animales para probar la vacunación es, como se ha tratado, el aislamiento de células inmunitarias de un animal vacunado y prueba funcional para la actividad contra antígeno tal como V3, por ejemplo, o generación de anticuerpo neutralizante.

A continuación se describen experimentos en los que se prueban vacunas de ADN y refuerzos con proteína.

Ejemplo 5: Vacunación con ADN anti-gp120 y refuerzo en conejos

Se prepararon composiciones de ADN y de proteína con los antígenos enumerados en la Tabla 3. Los antígenos se administraron a conejos según el diseño del estudio presentado en la Figura 1. Brevemente, se inmunizaron conejos con vacunas de ADN monovalentes, 3-valentes, 8-valentes o de control a 0, 4, 8 y 16 semanas como se enumera en la Figura 1. Los animales recibieron refuerzos con proteína en la semana 24 y 28 como se representa en la Figura 1. Se midió la neutralización de cepas aisladas del VIH-1 primarias por sueros de animales
 45 inmunizados. Los títulos de neutralización para sueros recogidos después de la última inmunización con ADN (y antes de la primera inmunización con proteína) se representan en la Figura 2. Los títulos de neutralización para sueros recogidos después de la primera inmunización con proteína se representan en la Figura 3. Los porcentajes de neutralización para sueros (dilución 1:5) recogidos después de la segunda inmunización con proteína se representan en la Figura 4. Los títulos se calculan basándose en la dilución de suero inmune que presenta el 50% de infección con respecto a controles sin tratar. Las filas inferiores de cada tabla bajo "Anticuerpos positivos" enumeran valores de neutralización obtenidos con anticuerpos HIVIG, 2F5 y 2G12, que se sabe que se neutralizan en estos ensayos. Las mediciones de suero que muestran un alto nivel de actividad neutralizante están sombreadas en cada figura. La Fig. 2 muestra que la vacunación de ADN monovalente y polivalente produjo altos niveles (50%⁺) de actividad neutralizante con la cepa aislada SF162 del clado B.

También se detectó la actividad neutralizante con respecto a las otras cepas aisladas del clado B, C, A y E. La Fig. 3 muestra que la vacunación de ADN con un refuerzo con proteína indujo altos niveles de actividad neutralizante contra las cepas aisladas SF162, Ba-L y JRCSF del clado B, con bajos niveles de actividad contra otras cepas aisladas. Se observó actividad en todos los animales que recibieron vacunación polivalente y
 60 aproximadamente la mitad de los animales que recibieron vacunación monovalente. Tanto las pautas monovalentes como polivalentes produjeron respuestas con altos niveles de actividad en algunos animales. La Figura 4 muestra que el segundo refuerzo produjo alta actividad neutralizante en todos los animales, con grados de sensibilidad variables a diferentes cepas aisladas.

Se probaron respuestas neutralizantes contra virus del clado B adicionales (MN, HXB2-GFP y 89.6 GFP). La construcción de virus que expresa proteína verde fluorescente (GFP) se describe en el Ejemplo 9, más adelante.

La Figura 5A, B y C muestra el % de neutralización observada para sueros de los animales enumerados en la tabla en la Figura 1. Los sueros tomados de animales después de la vacunación de ADN y después de un refuerzo con proteína muestran que se indujeron altos niveles de actividad neutralizante contra la cepa aislada MN en animales que recibieron tanto ADN monovalente como polivalente. La actividad neutralizante contra las cepas aisladas HXB2 y 89.6 fue inferior, pero se alcanzaron altos niveles en algunos animales con refuerzo con proteína. Los anticuerpos monoclonales 2F5 y 2G12 se neutralizaron con altos niveles (75%) de actividad neutralizante contra aquellas cepas en este ensayo (datos no mostrados).

Tabla 3: Inmunógenos de gp120 usados en estudios de vacunación de ADN y refuerzo con proteína en conejos

Inmunógeno de gp120	Subtipo genético	Cepa del VIH-1	Uso de co-receptor	Nº de acceso de GenBank®
A-120	A	92UG037.8	CCR5	U09127
B-120*	B	92US715.6	CCR5	U08451
C1-120*	C	92BR025.9	CCR5	U09126
D-120	D	92UG021.16	CXCR4	U27399
E-120*	EA	93TH976.17	CCR5	U08458
F-120	F	93BR020.17	CXCR4	U27401
G-120	G	92UG975.10	CCR5	U27426
Ba-L-120*	B	Ba-L	CCR5	M68893

Ejemplo 6: Una vacuna de ADN de Gag del VIH-1 es inmunogénica en ratones

Se examinaron respuestas inmunitarias mediadas por células (CMI) provocadas por vacunas de ADN de Gag de codón optimizado con o sin secuencia conductora de tPA.

Se inmunizaron ratones Balb/C (hembra) usando una pistola de genes para evaluar la inmunogenicidad de vacunas de ADN. Esta vacuna incluyó un inserto del gen gag de codón optimizado de la cepa aislada del VIH-1 Czm. Cada animal recibió 4 inmunizaciones mensuales con 6 µg de ADN administrado en cada inmunización. Una semana después de la última inmunización, los animales se sacrificaron y los bazo se recogieron para análisis de respuestas CMI. Este estudio comparó la inmunogenicidad relativa de dos construcciones diferentes con un inserto de genes de Gag (Tabla 4). Una construcción (.wt) usó una secuencia de genes gag optimizada por codones sin ninguna modificación adicional sobre los aminoácidos codificantes. La otra (.tPA) codifica una secuencia conductora de plasminógeno de tejido humano (tPA) adicional en el mismo extremo N. Se informó que el conductor de tPA era responsable de la expresión e inmunogenicidad mejorada de vacunas de ADN de Gag (Qiu, y col., 2000, J. Virology. 74(13):5997-6005). Sin embargo, en estudios previos de los presentes inventores usando gen gag de codón no optimizado de una cepa aislada del VIH-1 adaptada de laboratorio (IIB) se encontró que el inserto del gen gag natural era más inmunogénico que el inserto del gen gag con un conductor de tPA en la inducción de respuestas CMI. Este estudio se realizó para investigar si los insertos del gen gag de codón no optimizado de la cepa aislada primaria del VIH 96ZM651 (Czm) mostrarían hallazgos similares. Se analizaron respuestas CMI provocadas por estas vacunas por ensayos de ELISPOT y tinción intracelular de citocinas (IFN γ) (ICS) con un péptido inmunodominante de la estimulación del antígeno Gag p24.

Tanto los procedimientos de ELISPOT como de tinción intracelular de citocinas (ICS) se usaron para medir las respuestas inmunitarias mediadas por células. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Animales que recibieron cualquiera de las dos vacunas de ADN de gag mostraron todas respuestas CMI específicas para Gag, como se muestra por tanto datos de ELISPOT como de ICS. Los grupos de vector solo no mostraron respuestas CMI específicas para Gag. El inserto gag natural pareció ligeramente más inmunogénico que el inserto gag con un conductor de tPA.

Tabla 4: Respuestas inmunitarias mediadas por células específicas para Gag promedio en ratones inmunizados con vacunas de ADN de Gag

Grupos de animales	Nº de animales por grupo	ELISPOT: Manchas específicas para péptido Gag*/millones de células	ICS: Linfocitos T CD8+ que expresan IFN específico para péptido Gag* (%)
Vector pSW3891	5	4,25 $\pm$ 4,34	0,2 $\pm$ 0,03
pSW3891/Gag.Czm. Opt.wt	4	1020 $\pm$ 470,31	3,74 $\pm$ 2,59
pSW3891/Gag.Czm. Opt.tPA	4	604 $\pm$ 538,63	2,29 $\pm$ 2,87
* Péptido Gag p24 (199-207): AMQMLKDTI; secuencia de péptidos de referencia, p24 (aa 65-73)			

Por tanto, el inserto gag de Czm de codón optimizado fue altamente inmunogénico en el vector pSW3891, y fue más inmunogénico cuando se expresó con sus secuencias del extremo N naturales que con una secuencia conductora de tPA. Este es el diseño de la construcción usada en DP6-001.

Ejemplo 7: Vacunas de Env monovalentes y 4-valentes inducen respuestas anti-IgG de Env del VIH-1 en conejos

Se examinó la inmunogenicidad de vacuna de ADN de Env del VIH-1 como tanto formulaciones monovalentes como 4-valentes. En este estudio, conejos blancos de Nueva Zelanda (NZW) (hembra) se inmunizaron con vacunas de ADN que expresan antígenos de la Env del VIH-1 primarios. Cada grupo incluyó dos (grupos 10, 11, 14 y 17) o tres conejos (grupos 1 y 3). Cada animal recibió cuatro inmunizaciones con ADN mensuales con 36 µg de plásmido de ADN total (36 µg de un único ADN para el grupo monovalente y 9 µg de cada ADN para el grupo 4-valente) administrado por una pistola de genes (Bio-Rad) en cada inmunización. En este estudio se usaron vacunas de ADN no de codón optimizado. Los sueros recogidos dos semanas después de la última inmunización con ADN se midieron por ELISA para niveles de respuestas anti-IgG de Env. Se recubrieron placas de ELISA con antígenos de Env primarios recombinantes. La dilución del suero de partida fue 1:500 en estos experimentos.

Los datos de ELISA de sueros de conejo NZW inducidos por tanto un componente de vacuna de ADN de la Env del VIH-1 (monovalente) como una combinación de cuatro componentes de vacuna de ADN de la Env (4-valentes) se resumen en la Tabla 5. Mientras que los sueros monovalentes tuvieron en general mayores títulos contra los antígenos de Env autólogos respectivos que los antígenos de Env heterólogos, la vacuna de ADN 4-valente pudo generar un anticuerpo de alto título contra un amplio espectro de antígenos de Env del VIH primarios, que incluyen tanto antígenos homólogos (tales como B, Ba-L, Czm y E) como heterólogos (tales como A2, D, F y G).

Por tanto, la inmunización con ADN fue eficaz en inducir respuestas de anticuerpos anti-Env de alto título con tanto formulaciones de vacuna monovalentes como polivalentes. Las formulaciones polivalentes pudieron inducir un mayor nivel de respuestas de anticuerpos contra múltiples antígenos de Env del VIH-1 primarios que la formulación monovalente.

Tabla 5: Títulos de valoración de punto final de anti-IgG de Env de sueros de conejo

Grupos de conejos NZW	Vacunas de ADN usadas para la inmunización de conejos	Antígenos de Env recubiertos para placas de ELISA							
		Ba-L	B	C	E	A2	D	F	G
1	Ba-L	233.644	54.000	112.325	54.000	162.000	77.881	25.960	77.881
11	B	54.000	324.000	162.000	54.000	54.000	54.000	54.000	36.000
14	Czm	12.000	36.000	486.000	108.000	108.000	54.000	54.000	36.000
3	E	54.000	12.481	112.325	486.000	77.881	37.442	112.325	112.325
17	B, Ba-L, Czm, E	972.000	324.000	162.000	486.000	486.000	108.000	324.000	324.000
10	vector	<500	<500	<500	<500	<500	<500	<500	<500

Ejemplo 8: Respuestas anti-IgG de Env del VIH-1 para vacunación con ADN + proteína 3-valente y 8-valente

Se evaluó la inmunogenicidad de vacunas de ADN de Env+ proteína polivalentes en conejos. Se inmunizaron conejos blancos de Nueva Zelanda (hembra) con vacunas de ADN que expresaban antígenos de Env del VIH-1 primarios. Cada grupo incluyó tres conejos. Cada animal recibió cuatro inmunizaciones con ADN mensuales con 36 µg de plásmido de ADN (12 µg de cada ADN para grupo 3-valente y 4,5 µg de cada ADN para grupo 8-valente) administradas por una pistola de genes (Bio-Rad) en cada inmunización. En este estudio se usaron vacunas de ADN no de codón optimizado.

Después de dos meses de descanso se administraron subcutáneamente dos refuerzos con proteína mensuales en adyuvante incompleto de Freund (IFA). Los refuerzos con proteína combinaron la sensibilización con ADN con los antígenos gp120 de las mismas cepas aisladas virales primarias (Tabla 6). Cada conejo recibió un total de 100 µg de proteínas gp120 recombinantes para cada refuerzo con proteína (33,3 µg de cada proteína en el grupo C4 y 25 µg de cada proteína en el grupo C7).

Tabla 6: Diseño de grupos de animales para sensibilización con ADN + refuerzo con proteína

Grupos de animales	Números de animal	Componentes de sensibilización con ADN	Componentes de refuerzo con proteína
C4	C4-1, C4-2, C4-3	B, C1, E	B, C1, E
C7	C7-1, C7-2, C7-3	Ba-L, B, C1, E, A, D, F y G	B, C1, E, Ba-L

Los sueros recogidos dos semanas después de la última inmunización con ADN y después de cada refuerzo con proteína se midieron por ELISA para los niveles de respuestas anti-IgG de Env.

Para medir respuestas anti-Env, diferentes antígenos de gp120 primarios se recubrieron individualmente sobre las placas de ELISA como se indica (Ba-L, C1, E, B, A, D, F o G). Los datos de ELISA de sueros de conejo NZW inducidos por o bien los tres componentes de la vacuna de ADN de Env del VIH-1 (3-valente, B, C1 y E) o bien los ocho componentes de ADN de Env (8-valente, B, C1, E, Ba-L, A, D, F y G) se resumen en la Fig. 6. Tanto las

formulaciones de ADN 3-valentes como 8-valentes indujeron respuestas de anticuerpos de alto título contra antígenos de Env del VIH-1 primarios. La formulación 3-valente provocó respuestas de anticuerpos de alto título contra tanto antígenos de Env homólogos (tales como B, C1 y E) como heterólogos (tales como Ba-L, A, D, F y G). En las condiciones usadas, la formulación 8-valente no pareció mejorar esta respuesta inmunitaria.

Se midieron la respuesta anti-IgG de Env después de refuerzos con proteína en animales que recibieron formulación de vacuna de ADN de Env 3-valente (Fig. 7). En este estudio se probaron tres diluciones de sueros: 1:10.000; 1:40.000 y 1:160.000. En el grupo "Último ADN", los sueros se recogieron después de la cuarta inmunización con ADN. En el grupo "Proteína I", los sueros se recogieron después de un refuerzo con proteína. En el grupo "Proteína II", los sueros se recogieron después de dos refuerzos con proteína. Después de un refuerzo con proteína (Proteína-I), las respuestas anti-IgG de Env en conejos sensibilizados con las mismas vacunas de ADN alcanzaron rápidamente el nivel pico. El segundo refuerzo con proteína (Proteína-II) no aumentó la respuesta en este experimento. Esto fue cierto para los tres antígenos de Env (B, C1 y E) probados en este estudio de ELISA.

Sin embargo, para animales que recibieron vacunas de ADN de Env 8-valentes, normalmente se requirieron dos refuerzos con proteína para que anti-IgG de Env alcanzara el mismo nivel que se encuentra en el grupo 3-valente. Los datos en la Fig. 8A representan las respuestas de IgG de conejo contra antígenos de Env primarios incluidos en tanto las inmunizaciones de sensibilización con ADN como de refuerzo con proteína. Los datos en la Fig. 8B representan las respuestas de IgG contra antígenos de Env primarios que se incluyeron solo en la fase de sensibilización con ADN. Los patrones fueron muy similares entre los grupos. Se necesitaron dos proteínas para inducir un mayor nivel de respuestas anti-IgG de Env.

Estos datos muestran que la inmunización con ADN con una formulación de Env del VIH-1 3-valente indujo una respuesta inmunitaria eficaz contra gp20 de cepas homólogas y algunas heterólogas del VIH-1. Esta respuesta no mejoró con el uso de una formulación 8-valente, en las condiciones usadas para estos estudios. Las proteínas de Env del VIH-1 recombinantes fueron muy eficaces en reforzar las respuestas anti-Env en todos los animales sensibilizados con ADN. Se necesitó un refuerzo con proteína para alcanzar niveles de anticuerpo pico en animales que recibieron sensibilización con ADN 3-valente, mientras que se necesitaron dos refuerzos con proteína con el grupo 8-valente para alcanzar los mismos niveles pico. En DP6-001, cinco vacunas de ADN de Env primarias se incluyeron en la fase de sensibilización para cubrir al menos 4 clados de antígenos de Env del VIH-1 sin comprometer la inmunogenicidad de la sensibilización con ADN. Se proponen dos refuerzos con proteína en DP6-001 para maximizar el efecto del refuerzo.

Ejemplo 9: Respuestas de anticuerpos neutralizantes con sueros de conejo inmunizados con formulaciones de ADN de Env + proteína monovalentes y polivalentes

Se examinaron las respuestas de anticuerpos neutralizantes provocadas por la pauta de vacuna de sensibilización con ADN + refuerzo con proteína contra múltiples cepas aisladas del VIH-1 primarias. Como se muestra en la Tabla 7, cada animal recibió 4 inmunizaciones con ADN mensuales (sensibilización con ADN) y dos refuerzos con proteína mensuales a dosis individuales variables como se describe más adelante. Para grupos monovalentes y 3-valentes, los refuerzos con proteína combinaron la sensibilización con ADN con los mismos antígenos gp120 primarios. El grupo monovalente (grupo C1) recibió gp120.Ba-L, un antígeno de Env del VIH-1 primario. El grupo 3-valente (grupo C4) recibió tres antígenos de Env del VIH-1 primarios: gp120-B, gp120-C y gp120-E. Para el grupo 8-valente (grupo C7), los animales recibieron vacunas de ADN que expresaban ocho antígenos de Env del VIH-1 primarios: gp120.A, gp120-B, gp120-Ba-L, gp120-C, gp120-D, gp120-E, gp120-F y gp120-G, seguido de los refuerzos con proteína que incluyen 4 antígenos gp120 recombinantes: gp120-B, gp120-Ba-L, gp120-C y gp120-E. El grupo C10 es un grupo de control en el que conejos se inocularon primero cuatro veces con el vector de ADN vacío pSW3891, seguido de refuerzo con proteína de una mezcla de cuatro antígenos de proteína de Env (mismos del grupo 7). En este estudio preclínico, los genes env insertados en las vacunas de ADN no fueron de codón no optimizado.

Tabla 7: Diseño de grupos animales para respuestas de anticuerpos neutralizantes para VIH-1

Grupos de animales	Números de animal	Componentes de sensibilización de ADN de gp120	Componentes de refuerzo de proteína gp120
C1	C1-1B, C1-2B	Ba-L	Ba-L
C11	C11-1, C11-2	B	B
C2	C2-1, C2-1	C1	C1
C3	C3-1, C3-2	E	E
C4	C4-1, C4-2	B, C1, E	B, C1, E
C7	C7-1, C7-2	Ba-L, B, C1, E, A, D, F y G	B, C1, E, Ba-L
C10	C10-1	Control de vector	B, C1, E, Ba-L

Se recogieron sueros de conejo de los animales descritos en la Tabla 7 en la pre-inmunización, después de la cuarta inmunización con ADN y después del primer y segundo refuerzos con proteína. Se realizaron ensayos de neutralización para examinar si sueros de conejo con respuestas de anticuerpos anti-IgG de Env positivas podrían o no neutralizar cepas aisladas del VIH-1 primarias. La actividad de neutralización de cada suero se probó a dilución

1:5 usando un sistema de ensayo indicador de proteína verde fluorescente (GFP).

Virus indicadores de la proteína verde fluorescente (GFP) recombinante para su uso en los ensayos de neutralización se generaron por co-transfección de células 293T con el plásmido pNL4-3env- (ADN proviral del VIH-1 NL4-3 de longitud completa con un desplazamiento de marco en *env* y que codifica GFP en lugar de nef) y el plásmido pSVIIIenv, que codifica la proteína de Env del clado B 89.6. El sobrenadante que contiene virus indicador se recogió 48 h después de la transfección, se clarificó por centrifugación y filtración en 0,45 µm y se guardó a -80 °C antes de uso. Para realizar los ensayos, PBMC humanas se incubaron con virus indicador en presencia o ausencia de anticuerpo. Las respuestas de anticuerpos neutralizantes se midieron por el porcentaje de reducción de PBMC humanas positivas para GFP con respecto a los números en controles con suero de pre-inmunización.

Un conjunto de datos de neutralización se representa en la Fig. 9. La intensidad del anticuerpo neutralizante se clasificó en tres niveles: alta (superior al 80% de reducción en PBMC humanas positivas para GFP), moderada (superior al 60% de reducción) y baja (superior al 40% de reducción). El enfoque de vacunación de ADN + proteína fue altamente eficaz en inducir respuestas de anticuerpos neutralizantes contra el virus que expresa Env-GFP de la cepa aislada 89.6, un virus del VIH-1 primario.

Todos los animales, excepto el animal de control, produjeron bajos niveles de anticuerpo neutralizante después de la vacunación de ADN y antes de la administración de proteína. Un animal que recibió una vacunación monovalente produjo bajos niveles (aproximadamente del 50%) de anticuerpo neutralizante. Un segundo animal en el grupo monovalente produjo niveles moderados (aproximadamente del 75%). Los animales que recibieron la vacunación 3-valente produjeron anticuerpo con niveles altos o casi altos (aproximadamente del 78%) de neutralización. El grupo 8-valente produjo niveles bajos de aproximadamente el 40% de neutralización. El conejo de control (C10-1), que recibió una única inmunización de proteína de Env después de cuatro inoculaciones del vector de ADN vacío, no produjo anticuerpo neutralizante detectable después de la vacunación de ADN, y demuestra una respuesta de anticuerpo neutralizante muy baja (aproximadamente del 10%) después de la administración de proteína.

Otros análisis de estos sueros de conejo contra virus del VIH-1 de clado B primarios adicionales también mostraron actividades neutralizantes positivas (Fig. 10 a 15). Las Figs. 9 a 12 muestran que el enfoque de sensibilización con ADN/refuerzo con proteína usando formulación polivalente fue altamente eficaz en inducir respuestas de anticuerpos neutralizantes contra varias cepas aisladas del clado B del VIH-1 primarias. En estos ensayos, las respuestas de anticuerpos neutralizantes se midieron por el porcentaje de reducción de PBMC positivas para p24 con respecto a los números en control con suero de pre-inmunización por un ensayo basado en FACS (Mascola, y col., 2002 J. Virol. 76, 4810-4821).

Como se muestra en la Figura 10, niveles significativos de respuestas de anticuerpos neutralizantes estuvieron presentes al final de la sensibilización con ADN. Los sueros de ratones que recibieron los protocolos de vacunación de ADN + proteína 3-valentes y 8-valentes presentaron altos niveles (80%⁺) de actividad neutralizante hacia la cepa aislada del VIH-1 primaria, SF162, después de uno y dos refuerzos con proteína. Se alcanzaron niveles pico de actividad neutralizante después del primer refuerzo con proteína. Se obtuvieron altos niveles de actividad neutralizante en sueros del animal que recibió dos refuerzos de una vacunación de proteína 8-valente (sin vacunación de ADN).

Para Ba-L (Figura 11) y JRCSF (Figura 12), los refuerzos con proteína fueron eficaces en generar mayores niveles de actividad neutralizante que con la sensibilización con ADN sola. Como se muestra en las Figuras 11 y 12, se obtuvieron altos niveles de actividad neutralizante para la cepa Ba-L y JRCSF del VIH-1 primaria, respectivamente, en animales que recibieron el protocolo de vacunación 3-valente. El grupo 8-valente mostró niveles de aproximadamente el 60-80% después de dos refuerzos con proteína. Con las condiciones usadas, una formulación de ADN de Env 8-valente no produjo una respuesta de anticuerpos más robusta que la provocada por la formulación 3-valente. Se necesitó un refuerzo con proteína para el grupo 3-valente para alcanzar el nivel de anticuerpo neutralizante pico mientras que se necesitó un segundo refuerzo con proteína para el grupo 8-valente. Este hallazgo está de acuerdo con los resultados del análisis de anticuerpos de unión en fase sólida que se muestra en los siguientes ejemplos.

El suero del animal de control, 10-1, no mostró ninguna actividad neutralizante después de la sensibilización con ADN. Este animal solo recibió el vector de ADN vacío. Sin embargo, el suero mostró algunas actividades neutralizantes de bajo nivel después de uno o dos refuerzos con proteína. Los niveles de actividad neutralizante fueron mucho más bajos que en el enfoque de ADN + proteína, respaldando la observación de que la sensibilización con ADN es muy útil para la rápida inducción de respuestas de anticuerpos neutralizantes por 1-2 refuerzos con proteína, especialmente contra las cepas aisladas del VIH-1 primarias, que son frecuentemente difíciles de neutralizar.

Se realizaron ensayos de neutralización adicionales para examinar si estos sueros de conejo también neutralizaron cepas aisladas virales primarias que representan otros clados del VIH-1. La Fig. 13 muestra datos obtenidos después del segundo refuerzo con proteína en animales que recibieron inyecciones monovalentes y

polivalentes. Después de dos refuerzos con proteína, varios sueros de conejos inmunizados (dilución 1:5) mostraron actividades neutralizantes positivas contra los subtipos DJ263 (clado A) y TV1 (clado C) del VIH-1.

En resumen, estos datos muestran que la modalidad de vacunación de sensibilización con ADN/refuerzo con proteína fue eficaz en inducir respuestas de anticuerpos neutralizantes contra cepas aisladas del VIH-1 primarias a través de varios subtipos.

Ejemplo 10: Respuestas anti-IgG de Env de conejo con insertos de genes Env de codón optimizado en la formulación DP6-001

Se examinó la inmunogenicidad de los componentes de la vacuna de ADN de env y gag de codón no optimizado y los componentes del refuerzo con proteína de Env que van a usarse en la vacuna DP6-001. Se inmunizaron conejos con componentes de ADN de la vacuna DP6-001 por pistola de genes, inoculación ID o IM, seguido de refuerzo con proteína gp120 por la vía IM de manera que pudieran compararse respuestas de anticuerpos anti-Env. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas usadas en los refuerzos con proteína DP6-001 se muestran en la Figura 14, con las secuencias alineadas entre sí. En estudios de conejos previos, solo se usaron vacunas de ADN no de codón optimizado.

Para los datos presentados en los estudios previos, plásmidos de ADN se administraron por un procedimiento de inmunización por pistola de genes. El estudio descrito en este ejemplo demuestra la inmunogenicidad de vacunas de ADN por inyecciones intramusculares (IM) e intradérmicas (ID).

Se inmunizaron conejos hembra con vacunas de ADN que expresaban cinco antígenos de Env del VIH-1 primarios y un antígeno Gag del VIH-1 primario, seguido de dos refuerzos con proteína que incluyeron cinco antígenos gp120 primarios. Los detalles de los protocolos de inmunización se muestran en la Tabla 8. Los componentes de ADN y de proteína usados en este estudio son los mismos que en la formulación DP6-001. Cada grupo de conejos blancos de Nueva Zelanda (dos por grupo) recibió tres inmunizaciones con ADN en las semanas 1, 5 y 13 y dos refuerzos con proteína en las semanas 21 y 29. Los animales recibieron la inmunización con ADN tanto por una pistola de genes (PG), inyección IM como ID. Las proteínas se formularon en adyuvante QS-21 y se inmunizaron por vía IM. La dosis total de inmunógenos para cada inmunización se enumera en la Tabla 8.

Tabla 8: Diseño de grupos de conejos inmunizados con vacunas de ADN optimizadas por codones

Grupos	Sensibilización de ADN	Vía de ADN	Dosis de ADN total por inmunización	Refuerzo de proteína	Dosis de proteína total por inmunización
C30	Env (A, B, Ba-L, Czm, E) + Gag (Czm)	Pistola de genes	36 µg (6 µg por ADN individual)	A, B, Ba-L, Czm, E	100 µg (20 µg por proteína)
C31	Env (A, B, Ba-L, Czm, E) + Gag (Czm)	IM	600 µg (100 µg/ADN)	A, B, Ba-L, Czm, E	100 µg (20 µg por proteína)
C32	Env (A, B, Ba-L, Czm, E) + Gag (Czm)	ID	600 µg (100 µg por ADN)	A, B, Ba-L, Czm, E	100 µg (20 µg por proteína)

Los datos de ELISA que muestran respuestas anti-IgG de Env en conejos NZW que recibieron la sensibilización con ADN por diferentes vías (pistola de genes, IM o ID) se representan en las Figuras 15A-E. Las Figuras 15A, 15B, 15C, 15D y 15E representan respuestas contra cepas las aisladas A del VIH-1, B del VIH-1, Czm de VIH-1, E del VIH-1 y Ba-L del VIH-1, respectivamente. En global, la formulación polivalente fue capaz de inducir amplias respuestas de anticuerpos que reconocen los cinco antígenos de Env primarios.

Mientras que la inmunización con pistola de genes sigue siendo el enfoque más eficaz en las sensibilización de respuestas de anticuerpos anti-Env, tanto las vías IM como ID pudieron sensibilizar los animales e indujeron respuestas anti-IgG de Env poco después de un refuerzo con proteína. Parece que ID tuvo mayores variaciones en las respuestas de anticuerpos que el grupo de inyección IM. Las respuestas de anticuerpos permanecieron a nivel relativamente alto durante más de 8 semanas después del último refuerzo.

Estos datos muestran que la formulación DP6-001 es inmunogénica en conejos NZW. Tanto las vías IM como ID son eficaces en la sensibilización de respuestas de anticuerpos anti-Env, similar al enfoque con pistola de genes. Los refuerzos con proteína son altamente eficaces para llevar las respuestas de anticuerpos a nivel pico, principalmente en animales inmunizados con ADN por vías ID e IM. La inclusión de una construcción de ADN de gag no parece que interfiera con la inmunogenicidad de los plásmidos de ADN que expresan Env polivalentes.

Ejemplo 11: Títulos de anticuerpos en suero provocados por un vacuna DP6-001 intramuscular, intradérmica o intramuscular e intradérmica de dosis repetida durante un estudio de toxicidad en conejos

Las respuestas de anticuerpos provocadas por la administración repetida de vacuna DP6-001 en conejos blancos de Nueva Zelanda se evaluaron para examinar si sueros de conejos que participaron en un estudio de toxicidad tuvieron o no anticuerpos anti-Env y anti-Gag reactivos con inmunógenos de la vacuna DP6-001. Para la

fase de inmunización con ADN, animales (al menos cinco/sexo/grupo total) se inmunizaron cuatro veces cada cuatro semanas intramuscularmente para una dosis por animal total de 7,2 mg por inmunización (en 1,2 ml de diluyente por ADN) o intradérmicamente para una dosis por animal total de 3,6 mg por inmunización (0,6 mg por ADN) de vacuna de ADN polivalente. Los animales de control se alternaron (entre fechas de inyección) entre inyecciones intradérmicas e intramusculares con el control de solución salina. Para la fase de refuerzo con proteína, los animales se inmunizaron tres veces cada cuatro semanas intramuscularmente para una dosis por animal total de 0,375 mg por inmunización (0,075 mg por gp120). Cada dosis de proteína contuvo 0,05 mg de adyuvante, QS-21, y 30 mg de excipiente, ciclodextrina. QS-21 es un adyuvante de saponina (un ácido quillaico de 3,28-O-bisglucósido) que puede obtenerse en alta pureza de extractos de Quillaja saponaria Molina (Kensil, y col., 1998, Dev Biol Stand., 92:41-7). Los sueros se recogieron de cada conejo catorce días después de tanto cuatro inmunizaciones con ADN como cuatro con ADN y tres con proteína y se ensayaron por ELISA para anticuerpos para proteína gp120 (inmunógenos en DP6-001) y para gag reunida. Los sueros de animales de control también se ensayaron para reactividad de fondo.

La Fig. 16 muestra títulos de anticuerpos anti-Env en conejos macho y hembra inmunizados con 7,2 mg de ADN por vía IM o 7,2 mg de ADN por vía ID, seguido de 0,375 mg de refuerzo con gp120 intramuscularmente. La Fig. 17 muestra títulos de anticuerpos anti-Env en conejos macho y hembra inmunizados con 3,6 mg de ADN por vía ID o 3,6 mg de ADN por vía IM, seguido de 0,375 mg de refuerzo con gp120 intramuscularmente. La Fig. 18 representa títulos de anticuerpos anti-Gag en conejos macho y hembra inmunizados con 7,2 mg de ADN por vía IM o 7,2 mg de ADN por vía ID, seguido de 0,375 mg de refuerzo con gp120 intramuscularmente. La Fig. 19 muestra títulos de anticuerpos anti-Gag en conejos macho y hembra inmunizados con 3,6 mg de ADN por vía ID o 3,6 mg de ADN por vía IM, seguido de 0,375 mg de refuerzo con gp120 intramuscularmente.

El ADN administrado por tanto vías IM como ID pudo provocar una fuerte respuesta de anticuerpos en conejos contra tanto proteínas gp120 como gag. Los títulos de anticuerpos para gp120 se reforzaron significativamente tras el refuerzo con proteína gp120. Como era de esperar, los títulos para proteína gag estuvieron afectados, ya que el refuerzo con proteína no contuvo proteína gag. No se observó diferencia significativa en títulos de anticuerpos entre grupos que recibieron 3,6 ó 7,2 mg de ADN. Los sueros de animales de control no mostraron ninguna reactividad con tanto proteína gp120 como gag (no mostrado).

Tanto las inmunizaciones con ADN como con proteína gp120 de la vacuna DP6-001 realizadas durante el estudio de toxicología provocaron una fuerte respuesta de anticuerpos en conejos. Las inmunizaciones con ADN tuvieron un efecto de sensibilización muy fuerte, que se reforzó significativamente tras la inmunizaciones con proteína gp120.

Ejemplos 12 y 13: Inmunogenicidad de vacunas de ADN polivalentes que codifican genes env y gag de codón no optimizado, seguido de refuerzo con proteína gp120 en primates no humanos

Se realizaron dos estudios en primates no humanos para evaluar la inmunogenicidad de vacunas de sensibilización con ADN / refuerzo con proteína gp120 polivalente. En el primer estudio (denominado ADN wt/ Estudio 1 de proteínas), la inmunogenicidad de cinco vacunas de ADN que codifican genes gp120 (B715, Ba-L, Czm y E) y gag (pNL4-3) naturales se administraron tanto por vía ID como por pistola de genes. El refuerzo con proteína consistió en gp120 de los clados B715, Ba-L, Czm y E. Este estudio reveló que ADN administrado por pistola de genes favoreció la respuesta de anticuerpos con respecto a CMI, mientras que el ADN administrado por vía ID tuvo respuesta CMI medible. Las respuestas de anticuerpos se potenciaron notablemente tras el refuerzo con gp120 en tanto los grupos ID como de pistola de genes. Para provocar tanto respuestas CMI como de anticuerpos se realizó un segundo estudio (denominado ADN opt/ Estudio 2 de proteínas) en el que se examinó la inmunogenicidad de la vacuna DP6-001 que contenía genes gp120 de codón optimizado de las cepas aisladas A, B715, Ba-L, Czm y E y el gen gag de Czm. En este estudio, el ADN se administró por tanto vía ID como IM.

Ejemplo 12: ADN wt/Estudio 1 de proteínas para investigar la inmunogenicidad de una combinación polivalente de vacuna de ADN que codifica cuatro proteínas de Env gp120 naturales y una proteína gag y refuerzos con cuatro proteínas gp120 en macacos Rhesus

Los experimentos en este ejemplo se realizaron para examinar la respuesta inmunitaria en macacos rhesus provocadas por sensibilización con vacunas de ADN polivalentes que codifican una proteína gag y cuatro proteínas de Env, seguido de refuerzo con cuatro proteínas gp120 homólogas a las vacunas de ADN. En este estudio se incluyeron seis macacos rhesus (macho). La formulación de vacuna polivalente probada en este estudio tuvo un antígeno Gag y cuatro antígenos de Env a diferencia de la formulación DP6-001, que tuvo un antígeno Gag y cinco antígenos de Env. Los animales se inmunizaron cuatro veces con una mezcla de cinco plásmidos de ADN (cuatro plásmidos que codifican genes env naturales de Ba-L del clado B, B715 del clado B, Czm del clado C y 976 del clado E; y un plásmido que codifica el gen gag del clado B del VIH-1) en solución salina. Tres animales (961L, 963L y 969L) se inmunizaron con ADN por pistola de genes, mientras que los otros tres animales (971L, 974L y 975L) recibieron ADN por vía ID. Cada animal se reforzó entonces con gp120 purificada de cuatro cepas aisladas que representan B, Ba-L, Czm y E dos veces por vía IM. Para cada inmunización ID se inyectaron 500 µg de cada ADN de plásmido (2,5 mg totales) por separado. Para la inoculación con pistola de genes se administraron 20 µg de cada

ADN (100 µg totales). Cada animal recibió 75 µg de cada gp120 (300 µg de gp120 reunido) formulado en 100 µg de adyuvante QS-21 en PBS. Los animales se inmunizaron con ADN en las semanas 0, 6, 12 y 18, seguido de refuerzos con proteína en las semanas 24 y 32. El suero se recogió en momentos designados, generalmente dos semanas después de cada inmunización.

Los títulos de anticuerpos en suero para las cinco proteínas de la envuelta y gag tras cada inmunización con ADN y proteína se ensayaron por ELISA (Figura 20). Estos resultados demuestran claramente que el ADN administrado por pistola de genes provocó mayor respuesta de anticuerpos contra proteínas gp120 y gag que el ADN administrado por inoculación ID, y los títulos de anticuerpos aumentaron progresivamente tras cada inmunización con ADN. Sin embargo, el refuerzo de animales sensibilizados con ADN con una única proteína gp120 potenció notablemente los títulos de anticuerpos en ambos grupos de animales a un nivel comparable. Se observó un ligero aumento en la respuesta de anticuerpos tras el segundo refuerzo con gp120. Como era de esperar, no se observó cambio en los títulos de anticuerpos anti-gag tras la inmunización con gp120 (Figura 20E).

Para determinar si los anticuerpos provocados por esta vacuna son funcionales o no, sueros recogidos después del cuarto ADN y refuerzo de dos proteínas se ensayaron para la neutralización de cepas aisladas de VIH-1 y VIHS que codifican genes *env* homólogos a genes gp120 de la vacuna DP6-001. Estos virus incluyen tanto las cepas aisladas VIHS_{Ba-L} como VIH-1_{Ba-L} primarias que codifican el gen *env* Ba-L, VIH-1_{Czm} que codifica el gen *env* Czm y VIH-1_{B715} que codifica el gen *env* B715. Los sueros obtenidos de macacos después de cuatro inmunizaciones con ADN y refuerzo con gp120 neutralizaron VIHS_{Ba-L} (Figura 21). Cuatro inmunizaciones con ADN no provocaron actividad neutralizante contra una cepa aislada de VIHS_{Ba-L} (Figura 21A). Sin embargo, sueros de los animales inmunizados recogidos después de cada refuerzo con gp120 pudieron inhibir la infección por VIHS_{Ba-L} (Figuras 21B y C). Los títulos de neutralización de sueros de estos animales recogidos después del refuerzo con proteína contra varias cepas aisladas del VIH-1 homólogas y algunas heterólogas se presentan en la Tabla 9A. El porcentaje de inhibición de la infección por los sueros se presenta en la Tabla 9B. Los sueros recogidos después de cuatro inoculaciones de ADN no neutralizaron ninguna de estas cepas aisladas (datos no mostrados). Sin embargo, algunas de estas cepas aisladas se neutralizaron por sueros después del refuerzo con proteína.

Tabla 9A: Títulos de neutralización de suero de animales inmunizados contra cepas aisladas del VIH-1/VIHS

Número de animal	Título de neutralización					
	Clado B del VIH-1				Clado C del VIH-1	
	VIHS _{Ba-L}	MN	89.6	B715	93MW160	931N101
961L	23	41	6	<5	<5	<5
963L	41	100	6	<5	<5	<5
969L	24	48	15	<5	<5	<5
971L	27	54	8	5,5	<5	<5
974L	78	100	8	10	<5	<5
975L	17	51	7	<5	<5	<5

Se ensayó el suero recogido después de 2 refuerzos con proteína. Los títulos de neutralización se calculan basándose en la dilución de suero inmune que inhibe el 50% de infección en comparación con controles sin tratar.

Tabla 9B:

Número de animal	% de inhibición de la infección					
	Clado B del VIH-1					
	Ba-L	SF162	ADA	5768	515	PVO
961L	80	63	0	0	0	0
963L	77	87	0	0	0	0
969L	16	81	10	0	0	0
971L	67	66	0	0	0	0
974L	89	93	0	0	0	0
975L	47	76	0	0	0	0

Se ensayó el suero recogido después de 4 ADN y 2 refuerzos con proteína. Cada suero se probó a dilución 1:16 para la neutralización de las cepas aisladas del VIH-1 indicadas usando dianas de PBMC humanas. El porcentaje de inhibición se basó en el grado de infección observada en presencia de suero inmune en comparación con controles sin tratar.

En resumen, la inmunización de macacos con vacunas de ADN polivalentes que codifican cuatro genes de Env y un gen *gag* sensibiliza el sistema inmunitario significativamente. Los refuerzos con proteína son altamente eficaces en provocar una amplia respuesta de anticuerpos. Esta respuesta de anticuerpos pudo neutralizar cepas aisladas del VIH-1 primarias homólogas, y a menor grado, heterólogas.

Ejemplo 13: ADN opt/Estudio 2 de proteínas: Inmunogenicidad de la vacuna DP6-001 en macacos Rhesus

Se examinaron respuestas inmunitarias humores y celulares provocadas por la vacuna DP6-001 en macacos rhesus. En este estudio participaron seis (cinco machos y una hembra) macacos rhesus. Los animales se inmunizaron con una mezcla de seis plásmidos de ADN: cinco plásmidos que codifican genes env de codón no optimizado del clado A, Ba-L de B, B715 del clado B, Czm del clado C y 976 del clado E, y un plásmido que codifica el gen gag del clado C del VIH-1, en solución salina cuatro veces. Tres animales (51M, 978L, 980L) se inmunizaron con ADN por vía IM y tres animales (991L, 997L, 998L) recibieron ADN por vía ID. Cada animal se reforzó entonces con gp120 purificada de cinco cepas aisladas que representan A, B, Ba-L, Czm y E dos veces por vía IM. Para cada inmunización, 500 µg de cada ADN de plásmido (3 mg totales) se reunieron y se suspendieron en un volumen total de 2 ml de solución salina. Cada animal recibió 3 mg de ADN total tanto por vía IM como ID. Para la inmunización ID, el ADN se administró en 19 sitios (100 µl por sitio). Para la inoculación IM, el ADN se administró en 4 sitios (500 µl por sitio). Los animales recibieron 375 µg de gp120 reunidas (75 µg de cada gp120) en 100 µg de adyuvante QS-21 en 1 ml de PBS. Los animales se inmunizaron con ADN en las semanas 0, 6, 12 y 18, seguido de refuerzo con proteína en las semanas 24 y 32. El suero se recogió aproximadamente dos semanas después de cada inmunización. Los sueros se recogieron hasta la semana 49 para un ensayo de anticuerpo de unión.

Los títulos de anticuerpos para las cinco proteínas de la envuelta tras cada inmunización con ADN y proteína se ensayaron por ELISA y los resultados se muestran en la Figura 22. Estos resultados demuestran que el ADN administrado por vía IM provocó una mayor respuesta de anticuerpos contra al menos contra tres de las cinco proteínas de la envuelta con respecto al ADN administrado por vía ID, y los títulos de anticuerpos aumentaron progresivamente tras cada inmunización con ADN. Sin embargo, el refuerzo de animales sensibilizados con ADN con proteína gp120 potenció notablemente los títulos de anticuerpos en ambos grupos de animales a un nivel comparable. Los niveles de anticuerpos disminuyeron ligeramente tras el segundo refuerzo con proteína con descenso progresivo con el tiempo. Los títulos de anticuerpos anti-Gag fueron bajos en cada animal durante tanto la fase de inmunización con ADN como con proteína (datos no mostrados).

Para determinar si los anticuerpos provocados por la vacuna DP6-001 son funcionales o no, sueros recogidos después de la cuarta administración de ADN y el refuerzo con proteína se ensayaron para la neutralización de algunas cepas aisladas de VIH-1 y VIHS que codifican genes env homólogos a genes gp120 de la vacuna DP6-001. Estos virus incluyen tanto cepas aisladas VIHS_{Ba-L} como VIH-1_{Ba-L} primarias que incluyen un gen env Ba-L, VIH-1_{Czm} un gen env Czm y VIH-1_{B715} que incluye un gen env B715. Se ensayó la neutralización de tanto la transmisión libre de células como de célula a célula de VIH-1/VIHS por los sueros hiperinmunes. Para ensayos con virus libre de células, el suero inactivado por calor se incubó a 37 °C con virus sin células y la mezcla virus/suero se usó posteriormente para infectar una línea celular U373 que contenía el gen indicador β-galactosidasa. La neutralización de la transmisión célula a célula del VIH-1 se realizó por un ensayo de inhibición del sincitio en el que células crónicamente infectadas se cocultivaron con células sin infectar en presencia de los sueros. El cocultivo de células induce la formación de sincitio, que se inhibió por los sueros neutralizantes. Cada ensayo de neutralización incluyó controles en los que se realizaron ensayos de infección con tanto sin suero como suero de Rhesus pre-inmune o normal.

La Figura 23 demuestra la neutralización de una cepa aislada VIHS_{Ba-L} por sueros de macacos después de cuatro inmunizaciones con ADN y refuerzo con gp120. Cuatro inmunizaciones con ADN no provocaron la actividad neutralizante contra la cepa aislada VIHS_{Ba-L}. Sin embargo, los sueros de los animales inmunizados recogidos después de un refuerzo con gp120 pudieron inhibir la infección por VIHS_{Ba-L}. El suero recogido después de cuatro inoculaciones de ADN no neutralizó ninguna de estas aisladas (datos no mostrados). Sin embargo, estas cepas aisladas del VIH-1 homólogas se neutralizaron por sueros después de un refuerzo con proteína. Los títulos de neutralización de suero de estos animales después del primer refuerzo con proteína contra varias cepas aisladas del VIH-1 homólogas se presentan en la Tabla 10. Los sueros después del primer refuerzo con proteína también se probaron para neutralización de varias cepas aisladas del VIH-1 homólogas, y los resultados se muestran en la Tabla 11. También se realizaron ensayos de neutralización adicionales con suero recogido después de 4 ADN y primer y segundo refuerzos con proteína contra una amplia gama de cepas aisladas del VIH-1 primarias de los clados A, B, C y E y los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 10: Títulos de neutralización de suero de animales inmunizados recogidos después del primer refuerzo con proteína contra cepas aisladas del VIH-1/VIHS homólogos

Animal	Clado B SHIV _{BA-L} ¹	Clado C VIH-1 _{Czm} ^{1,2}	Clado B VIH-1 _{B715} ^{1,2}
51M	82	83	>1280
978L	37	61	>1280
980L	<10	38	89
991L	>160	44	952
997L	41	46	840
998L	>160	54	>1280

¹Los títulos de neutralización se calculan basándose en la dilución de suero inmune que inhibe el 50% en comparación con controles sin tratar.

²La neutralización de VIH-1_{Czm} y VIH-1_{B715} se ensayaron por ensayo de transmisión célula a célula en el que células CEM crónicamente infectadas por el VIH-1_{Czm} o VIH-1_{B715} se cocultivaron con células CEM sin infectar en presencia de suero inmune y los sincitios se puntuaron después de 48 h.

Tabla 11: Neutralización títulos de suero de animales inmunizados recogidos después del primer refuerzo con proteína contra cepas aisladas del VIH-1 heterólogas

Animal	MN Clado B ¹	SF162 Clado B ¹	Ba-L Clado B ²	Bx08 Clado B ²	6101 Clado B ²	92RW020 Clado A ²	92RW020 Clado A ⁷	Du1 79 Clado C ²	CM244 Clado E ²
51M	217	717	55	72	30	37	18	21	34
978L	248	361	6	64	0	10	0	22	19
980L	50	463	70	75	29	20	20	20	18
991L	236	407	54	49	0	15	30	0	0
997L	94	321	36	58	0	0	0	0	0
998L	2455	4632	72	91	13	37	26	28	18

¹Los títulos de neutralización se calculan basándose en la dilución de suero inmune que inhibe el 50% en comparación con controles sin tratar.

³Cada suero se probó a dilución 1:15 para la neutralización de cepas aisladas del VIH-1 indicadas usando una línea celular indicadora. El porcentaje de inhibición se basó en el grado de infección observado en presencia de suero inmune en comparación con controles sin tratar como se mide por salida de quimioluminiscencia.

Tabla 8-10: Neutralización de cepas aisladas del VIH-1 primarias por el suero de animales inmunizados recogidos después de 4 ADN y primer y segundo refuerzos con proteína

Animal	Suero inmune	Neutralización de VIH-1 (% de inhibición de la infección)									
		Clado B				Clado C			Clado A		Clado E
		SF162	JRCFSF	ADA	BAL	TV1	DU151	S007	DJ263	RW020	CM235
51M	Pos 4 ADN	24	14	31	-3	5	2	-13	15	-50	-58
	Pos1 Proteína	94	46	47	27	74	2	-9	50	14	-66
	Pos 2 Proteína	86	41	33	20	60	25	-20	45	2	-136
978L	Pos 4 ADN	33	29	18	-34	21	2	-8	35	-26	-19
	Pos 1 Proteína	79	33	39	7	18	11	-7	40	-37	-61
	Pos 2 Proteína	64	81	28	8	-44	9	-16	51	-13	-130
980L	Pos 4 ADN	12	0	8	-18	-16	15	25	36	-50	-21
	Pos 1 Proteína	62	23	32	1	41	22	8	54	-7	-3
	Pos 2 Proteína	37	-17	19	-18	-47	30	33	54	-29	-1
991L	Pos 4 ADN	-37	-34	33	-37	-34	-9	-35	-21	-17	-68
	Pos 1 Proteína	76	32	59	3	-34	-2	-23	26	-57	-51
	Pos 2 Proteína	44	13	46	-23	-99	-31	-31	25	-101	-153
997L	Pos 4 ADN	29	-6	32	-30	-28	-28	2	19	-99	-7
	Pos 1 Proteína	87	33	52	6	-3	15	12	57	-90	-25
	Pos 2 Proteína	58	0	36	-32	8	15	23	62	-79	-54
998L	Pos 4 ADN	51	0	20	-31	-9	-10	-9	16	-67	-68
	Pos 1 Proteína	96	82	63	59	67	20	3	68	16	-90
	Pos 2 Proteína	85	76	46	-11	-2	5	2	56	-33	-122

El suero se probó a dilución 1:5. El ensayo se realizó como se describe en cualquier parte (Mascola y col., 2002, J. Virol. 76, 4810-4821).

La respuesta CMI específica para anti-Gag provocada por la vacuna DP6-001 se ensayó por ELISPOT para la producción de IFN- γ . En este ensayo se usaron conjuntos de péptido Gag que contenía cada uno seis péptidos 15-meros con solapamientos de 11 aminoácidos y dos conjuntos de péptidos consecutivos se mezclaron para la estimulación. Las secuencias de Gag fueron de una cepa aislada HXB-2 del VIH-1. Como se muestra en la Fig. 24,

varios animales tuvieron respuestas de ELISPOT positivas específicas para anti-Gag después de cuatro inmunizaciones con ADN, pareciendo la inoculación ID más eficaz que la inoculación IM en inducir una respuesta inmunitaria mediada por células.

5 También se comparó la respuesta CMI específica para anti-Gag provocada por vacunas *gag* naturales y de codón optimizado (Estudio 1 y Estudio 2). Como se muestra en la Fig. 25, la inmunización de macacos con un gen *gag* de codón optimizado provoca respuesta de ELISPOT significativamente mayor en comparación con ADN que codifica el gen *gag* natural.

10 Las respuestas CMI específicas para anti-Env provocadas por la vacuna DP6-001 contra Ba-L y envolturas del clado E se ensayaron por ELISPOT para la producción de IFN- γ . Los resultados se muestran en la Fig. 26. Aunque se provocó una débil respuesta de ELISPOT en animales tras cuatro inmunizaciones con ADN, el refuerzo de animales sensibilizados con ADN con las proteínas gp120 polivalentes potenció notablemente tal respuesta.

15 La inmunización de macacos con las vacunas DP6-001 de ADN sensibiliza significativamente los sistemas inmunitarios. Los refuerzos con proteína son altamente eficaces en provocar una amplia respuesta de anticuerpos. Se observaron respuestas CMI contra el antígeno Gag como se mide por el ensayo de ELISPOT tras la inmunización con ADN principalmente por vía ID. Tomados conjuntamente estos resultados demuestran que la inmunización de macacos con la vacuna DP6-001 provoca CMI y una amplia respuesta de anticuerpos de unión, que
20 puede neutralizar varias cepas aisladas del VIH-1.

Ejemplo 14: DP6-001 - Biodistribución intradérmica o intramuscular de dosis repetida de 63 días y estudio de integración en conejos blancos de Nueva Zelanda

25 Se examinó la biodistribución de ADN durante un transcurso de 64 días tras una única inmunización con ADN por vía IM o ID. Se usaron un total de 54 conejos (27/sexo) en este estudio. Los animales se dividieron igualmente en tres grupos. Los animales se aceptaron inicialmente en el conjunto de aleatorización basándose en el peso corporal y examen físico. Se asignaron a grupos de estudio usando números aleatorios generados por ordenador. En la aleatorización, el peso corporal medio para cada grupo no fue estadísticamente diferente de la
30 media de control. Los animales se asignaron a tres grupos como se muestra en la Tabla 13. Los animales de control (grupo 1) se inyectaron una vez con solución salina intradérmicamente e intramuscularmente. Los animales del grupo 2 se administraron intramuscularmente con una dosis única de 7,2 mg de vacuna del VIH (plásmido) DP6-001 (2,4 ml totales a 1,2 ml por sitio de inyección), mientras que los conejos del grupo 3 recibieron una única inmunización de 3,6 mg de vacuna del VIH (plásmido) DP6-001 mediante una vía intradérmica (1,2 ml totales con
35 0,12 ml por sitio de inyección). La dosis intramuscular se distribuyó igualmente entre 2 sitios de inyección en los músculos del muslo derecho izquierdo y derecho (1,2 ml administrados por muslo). La dosis intradérmica se distribuyó igualmente entre 10 sitios de inyección, localizados en el área dorsal (aproximadamente 0,12 ml por inyección sitio). Todos los sitios de inyección se afeitaron y se marcaron. El diseño del estudio global se describe en la Tabla 13.

40 **Tabla 13: Diseño del estudio realizado para examinar la biodistribución de ADN en conejos**

Grupo	Artículo de prueba	Dosis clínica	Dosis mg	Fechas de dosis	Vía ²	Volumen de dosis ³ ml	Número de Animales	
							Macho	Hembra
45 1	Control de solución salina		NA	SDI	IM/ID	2,4/1,2	9	9
2	Plásmido de ADN	IX	7,2	SDI	IM	2,4	9	9
50 3	Plásmido de ADN	IX	3,6	SDI	ID	1,2	9	9
² IM: Intramuscular; IM/ID: Combinación de intramuscular e intradérmica (la vía de administración intramuscular e intradérmica se alternarán entre las fechas de dosificación); ID: Intradérmica; NA: No aplicable ³ El volumen de dosis es constante independientemente de los pesos corporales de los animales								

55 Las observaciones en el laboratorio incluyeron observaciones para mortalidad, agonía, salud general y signos de toxicidad. Las observaciones clínicas incluyeron evaluación de la piel y características del pelo, ojo y membranas mucosas, aparatos respiratorio, circulatorio, sistemas autonómico y nervioso central, y patrones somatomotores y de comportamiento.

60 Seis animales (tres por sexo por momento de tiempo) se sacrificaron en el día de estudio (DE) 8, 29 y 64 por inyección de pentobarbital sódico y se extirparon los siguientes tejidos, se congelaron criogénicamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -70 $\pm$ 10°: sangre (antes de la eutanasia se recogió ~ 1 ml por punción de la arteria auricular medial en tubos de EDTA, se invirtieron varias veces y se transfirieron a tubos de criovial); ovarios/testículos; timo; corazón; pulmón; hígado; gastrointestinal (sección del intestino delgado); riñón; bazo; hipodermis (solo en el sitio de inyección intradérmica); piel solo en el sitio de inyección intradérmica (muestra
65 representativa); músculo del sitio de inyección intradérmica, ambos sitios (muestra representativa; se tomaron ~2 g

adicionales de muestra en DE 64 para el análisis de integración); músculo del sitio de inyección intramuscular, ambos sitios (se tomaron ~2 g adicionales de muestra en DE 64 para el análisis de integración); ganglio linfático poplíteo o mesentérico contralateral; médula ósea (aislada del fémur); y cerebro.

5 Todos los tejidos se procesaron (excepto las muestras de piel) y se analizaron por qPCR para la presencia de los plásmidos usando un procedimiento validado por Buenas prácticas de laboratorio (GLP) para biodistribución.

10 No se observaron cambios relacionados con el artículo de prueba en la mortalidad, signos clínicos de toxicidad, pesos corporales, cambios del peso corporal o consumo de alimentos. El análisis por qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) de la biodistribución determina que la vacuna del VIH (plásmido) DP6-001 estaba presente en el músculo y la hipodermis en los sitios de inyección intradérmica y músculo en los sitios de inyección intramuscular. La frecuencia de signos y el número de copias fueron los mayores en la autopsia de DE 8 y disminuyeron progresivamente a través de las autopsias de DE 29 y 64. Solo algunos signos esporádicos fueron evidentes en otros tejidos y éstos se consideraron el resultado de variación biológica. Como el plásmido persistió en los sitios de inyección intradérmica e intramuscular a través de DE 64, el análisis de integración se realizó en muestras de músculo del sitio de inyección representativas. El análisis de integración se realizó extrayendo ADN de sitios de administración y realizando qPCR para determinar si las secuencias de vacuna estaban presentes en ADN de alto peso molecular (es decir, cromosómico). Si este ensayo dio positivo, se extrajo ADN cromosómico del tejido y se purificó usando electroforesis en gel de inversión de campo, y se volvió a probar para la presencia de ADN de 20 vacuna. No se detectó integración en muestras para este estudio.

25 En resumen, una única inyección intramuscular o intradérmica de vacuna del VIH (plásmido) DP6-001 en conejos blancos de Nueva Zelanda no presentó ningún signo obvio de toxicidad bajo las condiciones de estudio usadas. El plásmido se distribuyó en el músculo del sitio de inyección intradérmica, hipodermis y el músculo del sitio de inyección intramuscular sin ninguna integración en el sitio de inyección.

Ejemplo 15: Tolerabilidad y seguridad de DP6-001

30 El perfil de tolerabilidad y seguridad de la formulación de vacuna DP6-001 se examinó en el modelo de conejo. Como esta formulación de vacuna contiene tanto componentes de ADN como de proteína, la posible toxicidad de ambos de estos componentes se examinó usando la mayor dosis que iba a usarse en los ensayos de fase I, recibiendo cada animal una inoculación adicional en comparación con el protocolo clínico. Como se ha propuesto en el ensayo clínico, se administró ADN tanto por vía IM como ID mientras que la proteína se inoculó por vía IM en el estudio de toxicología. Como la inmunización con proteína puede formularse con adyuvante QS-21 y con el excipiente ciclodextrina, la posible toxicidad de la mezcla de QS-21/ciclodextrina también se examinó en un brazo adicional del estudio usando la dosis que iba a usarse en el ensayo clínico. Las características destacadas del estudio de toxicidad y las conclusiones globales se tratan más adelante.

40 Se examinó la posible toxicidad de una vacuna del VIH DP6-001 de sensibilización con plásmido y refuerzo con proteína cuando se administra repetidamente a múltiples niveles de dosis por la vía intramuscular o intradérmica durante un periodo de estudio de 26 semanas a conejos de Nueva Zelanda macho y hembra. El modelo de conejo se seleccionó debido a que se recomienda por la FDA para su uso en estudios preclínicos de vacunas. Se seleccionaron las vías intramuscular e intradérmica de inmunización ya que éstas son las posibles para la administración a seres humanos. Los componentes de la vacuna de ADN es una mezcla de seis plásmidos de ADN diferentes a concentraciones iguales que expresan seis variantes de proteína del VIH diferentes y se usó para la fase de sensibilización con ADN del estudio. El componente de proteína de la vacuna DP6-001 es una mezcla de cinco proteínas diferentes a concentraciones iguales que expresan cinco variantes de proteína del VIH diferentes y se usó para la fase de refuerzo con proteína del estudio. La dosis (7,2 mg de ADN reunido) seleccionada para los inmunógenos del plásmido que van a administrarse intramuscularmente se basaron en dosis clínicas esperadas. Sin embargo, para inmunización intradérmica, la dosis de toxicidad (3,6 mg) de ADN de plásmido fue tres veces la dosis clínica propuesta. La dosis de proteína usada en el estudio de toxicidad fue comparable a la dosis clínica.

55 Los animales se aceptaron inicialmente en el conjunto de aleatorización basándose en el peso corporal y examen físico. Se asignaron a grupos de estudio usando números aleatorios generados por ordenador. En la aleatorización, el peso corporal medio para cada grupo no fue estadísticamente diferente de la media de control. Los animales se asignaron a grupos como se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14: Diseño del estudio de toxicología realizado con la vacuna DP6-001

Grupo	Artículo de prueba	Dosis clínica ¹	Dosis ² mg	Fechas de dosis	Vía ³	Volumen de dosis ⁴ ml	Número de Animales	
							Macho	Hembra
5	1	Control de solución salina	IX	SD	IM/ID	2,4/1,2	8	8
		Control de PBS	IX	SD	IM	1,0		
10	2	Control de solución salina	IX	SD	IM/ID	2,4/1,2	8	8
		Control de PBS	IX	SD	IM	1,0		
15	3	QS-21	IX	SD	IM	1,0	10	10
	4	Plásmido de ADN	IX	SD	ID	2,4		
20	5	Plásmido de ADN	3X	SD	ID	1,2	5	5
		Plásmido de ADN	IX	SD	IM	2,4		
25	6	Proteína	IX	SD	IM	1,0	5	5
	7	Plásmido de ADN	3X	SD	ID	1,2		
30	8	Proteína	IX	SD	IM	1,0	5	5
	9	Plásmido de ADN	IX	SD	IM	2,4		
35	10	Plásmido de ADN	3X	SD	ID	1,2	5	5
		Proteína	IX	SD	IM	1,0		
40	11	Plásmido de ADN	3X	SD	ID	1,2	5	5
		Proteína	IX	SD	IM	1,0		

¹ Los valores suministrados son los múltiplos de la mayor dosis clínica humana esperada
² Proteína que va a administrarse con QS-21 a 50 µg y ciclodextrina a 30 mg
³ IM: Intramuscular; IM/ID: Combinación de intramuscular e intradérmica (la vía intramuscular e intradérmica de administración se alternarán entre las fechas de dosificación); ID: Intradérmica; NA: No aplicable
⁴ El volumen de dosis es constante independientemente de los pesos corporales de los animales

El esquema de administración de dosis para tanto inmunógenos de ADN como de proteína se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15: Esquema de administración de dosis de inmunógenos de ADN y proteína en el estudio de toxicología

Vía de administración	Intramuscular, intradérmica, o combinación de intramuscular e intradérmica (alternadas entre las fechas de dosificación empezando con intramuscular)
Frecuencia de dosificación	Una vez al día en DE 1, 29, 57, 85, 113, 141, 169 como se ha designado en la Tabla 14
Volumen de dosis	Plásmido IM: 2,4 ml fraccionados entre dos sitios de dosificación Proteína IM: 1,0 ml en un sitio Plásmido ID: 1,2 fraccionados entre 10 sitios de dosificación
Sitios de dosis ^a	Intramuscular: muslos derecho e izquierdo para plásmido y muslo derecho para proteína Intradérmica: área escapular dorsal
Equipo	Intramuscular: 23 de calibre, aguja de 5/8 de pulgada con jeringuilla de 3 ml Intradérmica: jeringuilla de 0,5 ml con 27 de calibre, aguja de 1/8 de pulgada
Condiciones de dosificación	Las formulaciones se mantuvieron sobre hielo húmedo hasta que se administraron

a - Las inyecciones se administraron a un sitio afeitado/marcado. Los sitios se volvieron a afeitar y se volvieron a marcar según se necesitara.
IM - Intramuscular ID - Intradérmica

Conejos blancos de Nueva Zelanda (5/sexo/grupo mínimo) recibieron administración intramuscular (volumen de dosis de 2,4 ml, produciendo una dosis de 7,2 mg/animal) o intradérmica (volumen de dosis de 1,2 ml, produciendo una dosis de 3,6 mg/animal) de la vacuna de ADN del VIH DP6-001 o control de solución salina en el día de estudio (DE) 1, 29, 57 y 85. Para la fase de refuerzo con proteína del estudio, los conejos recibieron administración intramuscular (dosificación de 1,0 ml, produciendo una dosis de 0,375 mg/animal) de la vacuna de proteína del VIH DP6-001, control de solución salina tamponada con fosfato o control de adyuvante QS-21 y ciclodextrina (50 µg y 30 mg por inyección, respectivamente) en DE 113, 141 y 169. Entonces, se hizo la autopsia de los animales en DE 87 (autopsia de ADN aguda), DE 99 (autopsia de ADN de recuperación), DE 171 (autopsia de proteínas aguda) o DE 183 (autopsia de proteínas de recuperación). Los parámetros evaluados incluyeron mortalidad, observaciones clínicas, observaciones de Draize, pesos corporales, consumo de alimentos, patología clínica, pesos de órganos, patología macroscópica e histopatología. También se midieron los títulos de anticuerpos de unión provocados por las inmunizaciones con ADN y proteína.

No se observaron cambios relacionados con el artículo de prueba en mortalidad, observaciones clínicas, pesos corporales, consumo de alimentos, pesos de órganos, signos de patología clínica, observaciones macroscópicas e histopatología. Tanto la sensibilización con ADN como los refuerzos con proteína provocaron una fuerte respuesta de anticuerpos del suero como se mide por ELISA. Se observó una elevada frecuencia de signos de

Draize recuperables en el sitio de inyección de la vacuna de ADN intradérmica. A continuación se facilitan algunas observaciones específicas hechas bajo cada parámetro examinado.

Mortalidad y observaciones clínicas: El tratamiento con la vacuna del VIH DP6-001 no produjo mortalidad, y no tuvo efecto sobre las observaciones clínicas u observaciones en el laboratorio. Un macho del grupo 3 tuvo una abrasión en la nariz en DE 64 y 78. Un macho del grupo 10 tuvo hinchazón del escroto en DE 92 que no se observó en ningún otro animales del grupo 10 o grupo 6. Se observó que un macho en cada uno de los grupos 3, 4, 5, 7, 9 y 10 estuvo delgado varias veces durante el estudio. Estas observaciones se resolvieron en el plazo de tres semanas o menos desde la primera observación, y la baja incidencia sugirió una ausencia de cualquier efecto del artículo de prueba. Se encontró que un macho del grupo 1 tenía abrasiones/ abscesos en la patas delanteras y traseras. Como éste era un animal de control, estos signos no se consideraron relacionados con el artículo de prueba. Debido a estos abscesos, el animal tuvo pérdida del apetito y se observó pálido durante este periodo. Varios animales tuvieron observaciones intermitentes de lacrimación durante todo el estudio.

Observaciones de Draize: El tratamiento intramuscular con la vacuna de plásmido del VIH DP6-001 no tuvo efecto sobre las observaciones dérmicas. Para las inyecciones de plásmido intramusculares (sitios tratados 1 y 2), principalmente se observaron puntuaciones mínimas de eritema y edema, con la excepción de algunas puntuaciones leves. Como estas observaciones también se observaron en los grupos de control (grupos 1 y 2), no se consideraron relacionadas con el artículo de prueba y se atribuyeron al procedimiento de inyección.

El tratamiento intradérmico con vacuna del plásmido del VIH DP6-001 tuvo un efecto sobre las observaciones dérmicas. Para la administración de plásmido intradérmica (sitio tratado 3), las puntuaciones de eritema y edema para los controles (grupos 1 y 2 en DE 29 y 85) alcanzaron niveles leves de intensidad. Para los grupos 5, 7, 9 y 11, la intensidad y frecuencia de las observaciones aumentaron con respecto a los controles, sugiriendo un aumento relacionado con el artículo de prueba en la reactividad dérmica. Sin embargo, aunque medió el artículo de prueba, estas observaciones se recuperaron con el tiempo.

Para inyección intramuscular con vacuna de proteína del VIH DP6-001 fueron evidentes signos de mínimos a leves para eritema y edema en los grupos de control (grupos 1-3) e inmunizados con proteína (grupos 6, 7, 10 y 11). Como los signos fueron comparables entre grupos de control e inmunizados con proteína, éstos no se consideraron que estuvieran relacionados con el artículo de prueba y en su lugar se atribuyeron al procedimiento de inyección.

Peso corporal y consumo de alimentos: No se observaron efectos relacionados con el tratamiento sobre el peso corporal o aumentos de peso corporal en ningún grupo. Adicionalmente no hubo efectos relacionados con el tratamiento sobre el consumo de alimentos en ningún grupo.

Patología clínica: No hubo efectos relacionados con el artículo de prueba evidentes debido a niveles de dosis múltiples repetidas de la vacuna del VIH DP6-001 en el conejo. La mayor globulina observada en algunos grupos en DE31 y 87 fue muy ligera y puede ser debido a la producción de anticuerpo, pero lo más probablemente es que fuera debido a la variación de animales individuales. Todos los otros cambios menores se atribuyeron a la variación de animales individuales, y no tuvieron significancia biológica.

Hematología, química clínica, coagulación: No se observaron diferencias estadísticas entre los grupos de control e inmunizados y todas las diferencias fueron debidas a la variación de animales individuales.

Patología macroscópica: No hubo efectos relacionados con el tratamiento sobre la patología macroscópica. Como no hubo correlaciones histopatológicas, no se observó respuesta a dosis, y la mayoría de los signos observados también se observaron en los animales de control, estos signos no se consideraron relacionados con el artículo de prueba.

Pesos de los órganos: No hubo cambios relacionados con el tratamiento en los pesos de los órganos en ningún grupo. Cambios estadísticamente significativos en los pesos de los órganos, relaciones de peso de órgano con respecto a corporal y de peso de órgano con respecto a cerebro incluyen: una disminución en el peso del cerebro de las hembras del grupo 4 en DE 87, disminución en el peso del timo en las hembras del grupo 3 en DE 171, disminuciones en los pesos de adrenal, corazón y bazo de las hembras del grupo 3 en DE 183, y una disminución en la relación de peso del bazo con respecto a corporal y relación de peso de corazón con respecto a cerebro de las hembras del grupo 3 en DE 183. Estos cambios no se consideraron que estuvieran relacionados con el artículo de prueba, ya que no se observó patrón obvio e implican cambios en pesos de tejido o relaciones en los animales de control con adyuvante del grupo 3 con respecto al control de solución salina del grupo 1 ó 2.

Histopatología: No hubo efectos relacionados con el tratamiento sobre la histopatología en ningún grupo.

Respuestas inflamatorias, material extraño y hemorragia ocasional observados en sitios de inyección se consideraron relacionados con el procedimiento de dosificación. No hubo cambios histopatológicos considerados efectos tóxicos de la administración del (de los) artículo(s) de prueba o vehículo(s). Los signos en los sitios de inyección incluyeron infiltración celular inflamatoria o inflamación con gravedades mínima y leve, con hemorragia poco frecuente e incidencia comparativamente baja de depósitos refractivos locales de material extraño. Estos

signos se produjeron en tanto conejos de control como tratados, sin diferencias evidentes relacionadas con el grupo de tratamiento y todos se consideraron que estaban relacionados con los procedimientos de dosificación.

En riñones se observó nefropatía (reconocida como microfocos dispersos de cambios regenerativos y/o degenerativos de células epiteliales tubulares con desorganización tubular, células hipercromáticas, vacuolización de células tubulares y el conjunto de material floculento pálido y residuos celulares en segmentos inferiores de túbulo colectores) con mínima gravedad a través de todos los grupos. Se produjeron mineralización tubular multifocal o vacuolización de células tubulares por separado o en combinación con nefropatía. Estos signos renales son típicos de patología espontánea en riñones de conejos blancos de Nueva Zelanda de esta edad; no mostraron relación evidente con la administración del (de los) artículo(s) de prueba.

Cambios grasos y vacuolización de hepatocitos, además de infiltrado(s) de células mixtas focales o células mononucleares en el hígado se correlacionaron microscópicamente con el agrandamiento y la decoloración observados macroscópicamente. Estos signos hepáticos se producen espontáneamente en conejos, y se observaron sin relación aparente con la dosificación.

La manifestación esporádica de depósitos de hemosiderina en el bazo, respuestas inflamatorias focales en el pulmón, cambio graso en el subepicardio del corazón y otros signos esporádicos de baja incidencia en otros órganos no mostró relación evidente con la dosis y se consideraron sin relacionar con la administración del artículo de prueba.

Por tanto, bajo estas condiciones de estudio, la administración intramuscular repetida de la vacuna del VIH DP6-001 a conejos blancos de Nueva Zelanda no presentó ningún signo específico de toxicidad sistémica, pero produjo observaciones de Draize reversibles en el sitio de inyección.

Ejemplo 16: Estudio clínico de fase I de DP6-001

Se realizan ensayos clínicos humanos con el fin de determinar la seguridad de una vacuna y para determinar la eficacia de una vacuna. Para determinar la seguridad, voluntarios normales se inmunizan con la vacuna. Se observa la incidencia de efectos secundarios. Para determinar la eficacia se siguen los protocolos establecidos por los NIH. La población de alto riesgo (por ejemplo, drogadictos, poblaciones con actividad sexual de alto riesgo, poblaciones en las que la incidencia del VIH es alta). Para probar una población de alto riesgo, la incidencia de la infección por el VIH en el grupo de control negativo que se inmuniza con una vacuna de ADN que contiene el vector solo se compara con la incidencia de infección por el VIH en el grupo de prueba que recibe la vacuna de ADN polivalente que contiene secuencias de la cepa aislada primaria (por ejemplo, secuencias de gp120, gp140, gp56 y/o gp41). Se realiza un ensayo de doble ciego. La pauta de inmunización es, por ejemplo, tres inmunizaciones de vacuna de ADN por pistola de genes, cada una administrada separada un mes. Los sueros se extraen durante la pauta para monitorizar el estado inmunitario por experimentos tal como los descritos en los Ejemplos 2-4, anteriormente. Adicionalmente se prueba la inmunidad mediada por células (respuesta de CTL) en pacientes humanos aislando PBMC, seguido de prueba funcional *in vitro* de estas células como se describe para esplenocitos en el Ejemplo 4, anteriormente. Entonces se prueba la presencia de anticuerpos neutralizantes en los sueros del paciente como se describe en el Ejemplo 3, anteriormente. Se prueba la infección por VIH y el análisis estadístico se hace para determinar si la incidencia es significativamente diferente entre grupos de control y de prueba.

Un estudio clínico de fase I para evaluar DP6-001 se realiza del siguiente modo. Los objetivos del estudio son evaluar la seguridad de múltiples niveles de dosificación de DP6-001, evaluar la capacidad de DP6-001 para inducir respuestas inmunitarias humores a componentes de vacuna y evaluar la capacidad de DP6-001 para inducir respuestas inmunitarias mediadas por células.

Aproximadamente 36 sujetos humanos participan en el estudio. Estos sujetos son voluntarios adultos no infectados por el VIH sanos de 18-55 años de edad. Tienen bajo o mínimo riesgo de infección por el VIH como se define por el Estado de riesgo de HVTN. No tienen historia de inoculaciones de vacuna del VIH experimental previa.

Cada participante recibe una de las tres pautas de dosis en las que se administra DP6-001 por vías ID o IM. La administración se aleatoriza, con un componente de ADN creciente, múltiples dosis, con un refuerzo de vacuna de proteína continuado. Un programa de prueba de administración a seres humanos es el siguiente: administrar aproximadamente 50 µg/kg de la composición de ADN DP6-001 en la semana 0, semana 4 y semana 12 (es decir, 3 dosis por persona, aprox. 2,5 mg dosis para una persona de 50 kg); y administrar 7 µg/kg de la composición de proteína DP6-001 en la semana 20 y la semana 28.

Para evaluar la capacidad de DP6-001 para inducir respuestas humores a componentes de vacuna se realiza ELISA usando un conjunto de las glucoproteínas gp120 usadas para vacunación. También se realiza ELISA usando la proteína gag de Czm del VIH-1. Se realizan ensayos de anticuerpos neutralizantes contra paneles de laboratorio adaptados y cepas aisladas del VIH-1 primarias por laboratorios certificados por la HVTN. Pueden usarse ensayos en fase sólida adicionales tales como transferencias Western para confirmar adicionalmente la inmunidad y

caracterizar respuestas inmunitarias y distinguir entre vacunación y la posible nueva infección. Por ejemplo, si la vacuna no incluye gp41, el sujeto vacunado no presentaría una respuesta a gp41. La detección de la reactividad de gp41 en el sujeto sería entonces indicativa de una posible nueva infección.

- 5 Para evaluar la capacidad de DP6-001 para inducir respuestas inmunitarias mediadas por células pueden realizarse ensayos de ELISPOT de IFN- γ específicos para epítopes Gag o Env del VIH-1. También pueden usarse ensayos de linfocitos T citotóxicos en cultivo a granel y ensayos de tinción intracelular de citocinas de citometría de flujo.

REIVINDICACIONES

1. Un composición de ácido nucleico que comprende

- 5 (a) al menos tres moléculas de ácidos nucleicos diferentes que codifican glicoproteínas de la envuelta gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), en la que cada molécula de ácido nucleico codifica una glicoproteína de la envuelta de una cepa aislada primaria de un clado seleccionado del grupo que consiste en los clados A, B, C y E; y
(b) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína gag del VIH de una cepa aislada primaria.

10 2. La composición de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que la composición de ácido nucleico comprende al menos cuatro moléculas de ácidos nucleicos diferentes que codifican glicoproteínas de la envuelta gp120 del VIH-1, en la que cada molécula de ácido nucleico codifica una glicoproteína de la envuelta de una cepa aislada primaria de un clado seleccionado del grupo que consiste en los clados A, B, C y E.

15 3. La composición de ácido nucleico de la reivindicación 2, en la que las al menos cuatro moléculas de ácidos nucleicos diferentes codifican glicoproteínas de la envuelta gp120 del VIH-1 de las cepas aisladas primarias B715, Ba-L y Czm, y de una cepa aislada primaria del clado E.

20 4. La composición de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que las moléculas de ácidos nucleicos comprenden plásmidos de ADN.

25 5. La composición de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que la composición comprende un conjunto de moléculas de ácidos nucleicos que codifican glicoproteína de la envuelta gp120 de una cepa aislada primaria del clado A, opcionalmente en la que la cepa aislada primaria del clado A es 92UG037.8.

6. La composición de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que la composición comprende un conjunto de moléculas de ácidos nucleicos que codifican glicoproteína de la envuelta gp120 de una cepa aislada primaria del clado E, opcionalmente en la que la cepa aislada primaria del clado E es 93TH976.17.

30 7. La composición de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que la proteína gag del VIH-1 es una proteína gag de NL4-3, o en la que la proteína gag del VIH-1 es una proteína gag de una cepa aislada Czm.

35 8. La composición de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que el conjunto de moléculas de ácidos nucleicos que codifica la proteína gag comprende codones optimizados.

9. La composición de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que una o más de las moléculas de ácidos nucleicos comprenden codones optimizados.

40 10. Una composición farmacéutica que comprende la composición de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 que comprende además un segundo agente terapéutico para infección por el VIH.

45 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que el segundo agente terapéutico para infección por el VIH es un inhibidor de la transcriptasa inversa de nucleósidos, un inhibidor de la transcriptasa inversa de no nucleósidos o un inhibidor de proteasas del VIH.

50 13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en el tratamiento de un individuo con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) que inhibe la progresión de la enfermedad debido a un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en el individuo.

55 14. La composición de la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento de un individuo con SIDA, en la que la composición se formula para administración tópica, administración por vía oral, inyección por aguja, inyección por chorro sin aguja, administración intradérmica, administración intramuscular o administración con pistola de genes.

60 15. La composición de la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento de un individuo con SIDA, en la que la composición está presente en una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmunitaria contra el VIH o un epítipo del VIH en el mamífero vertebrado.

16. La composición de la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento de un individuo con SIDA, en la que el mamífero vertebrado es un ratón, una rata, un conejo, un primate no humano o un ser humano.

65 17. La composición de la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento de un individuo con SIDA, en la que la composición se formula para administración tópica, administración por vía oral, inyección por aguja, inyección por

chorro sin aguja, administración intramuscular, administración intradérmica o administración con pistola de genes.

18. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 15-17 para su uso en el tratamiento de un individuo con SIDA, en la que el mamífero vertebrado es un ser humano.

5 19. La composición de la reivindicación 18 para su uso en el tratamiento de un individuo con SIDA, en la que el ser humano está en riesgo de, o infectado con, el virus de la inmunodeficiencia humana.

10 20. La composición de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y una composición de proteína para su uso en inducir una respuesta inmunitaria humoral contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o un epítotope del VIH en un mamífero vertebrado, en la que la composición de proteína comprende moléculas de glicoproteínas de la envuelta del VIH aisladas de cada una de las cepas aisladas primarias en la composición de ácido nucleico, en la que la composición de proteína va a administrarse después de la composición de ácido nucleico.

15 21. Un kit que comprende:

20 la composición de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y una composición de proteína que comprende moléculas de glicoproteínas de la envuelta del VIH aisladas de cada una de las cepas aisladas primarias en la composición de ácido nucleico.

25 22. La composición de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-10 y una composición de proteína para su uso en inducir una respuesta inmunitaria mediada por células contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o un epítotope del VIH en un mamífero vertebrado, en la que la composición de proteína comprende moléculas de glicoproteínas de la envuelta del VIH aisladas de cada una de las cepas aisladas primarias en la composición de ácido nucleico, y la composición de proteína se administra al mamífero vertebrado después de la composición de ácido nucleico.

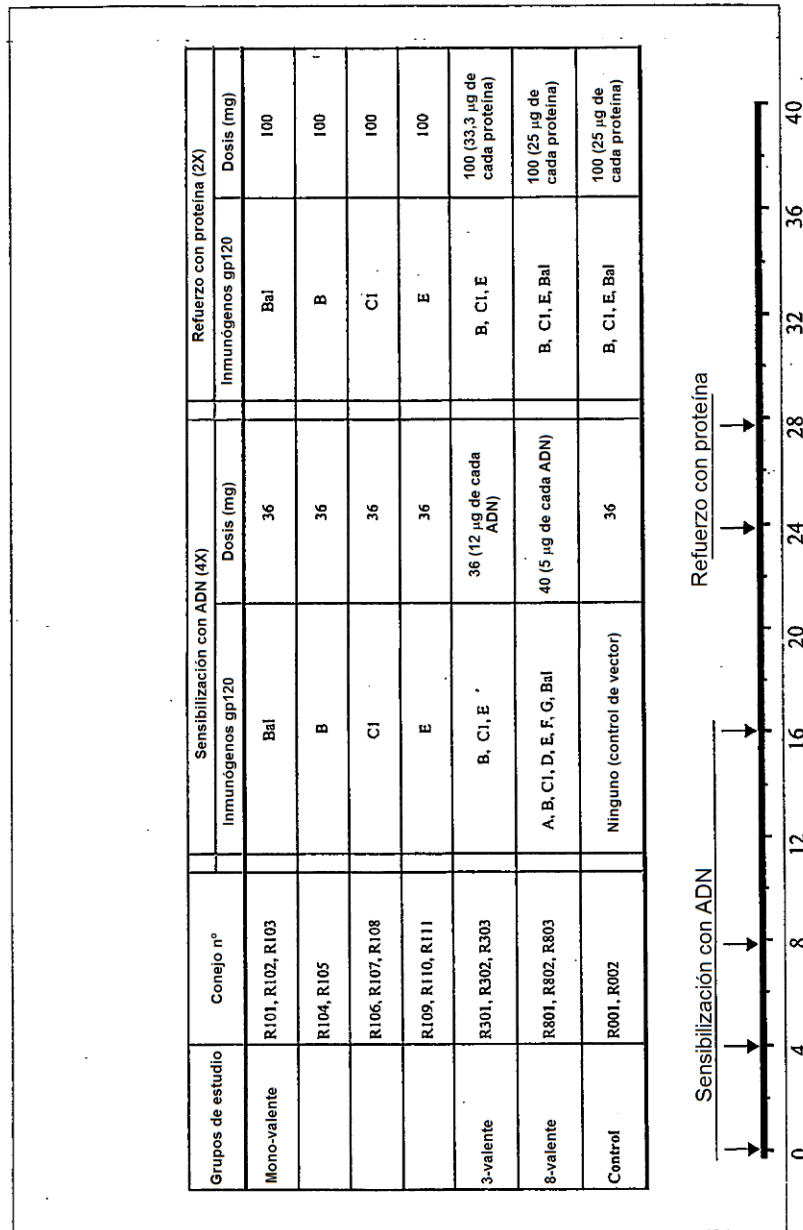


FIG. 1

Neutralización contra cepas aisladas primarias del VIH-1 de los clados A, B, C y E después de la última inmunización con ADN

Grupos de estudio	Animal nº	Clado B				Clado C			Clado A		Clado E		
		ADA	SF162	Ba1	JRCSF	TV1	DU151	S007	DJ263	CM235	CM244		
Mono-valente	R101	0,0	34,2	10,9	21,2	0,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0		
	R102	0,0	37,9	11,3	12,1	0,0	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
	R104	16,0		15,0	34,0	43,6	0,0	13,8	44,9	0,0	0,0		
	R105	4,0	55,0	15,0	46,0	27,1	8,2	0,0	4,0	0,0	0,0		
	R106	16,9	59,6	4,0	30,0	31,6	17,6	11,3	39,0	0,0	2,4		
	R107	1,8	47,9	5,8	21,5	22,5	0,0	0,6	21,3	0,0	2,4		
	R109	0,0	38,6	0,0	18,9	14,2	33,8	0,0	32,0	0,0	29,9		
Poli-valente	R110	8,9	46,6	0,0	0,0	16,9	0,0	21,1	12,2	0,0	19,7		
	R301	0,0	71,8	17,9	45,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
	R302	0,0	42,1	0,0	16,3	14,0	0,0	39,0	0,0	0,0	0,0		
	R801	0,0	63,5	5,2	40,7	26,0	1,0	0,0	3,0	0,0	0,0		
	R802	0,0	34,8	0,0	0,0	31,0	0,0	10,0	28,0	0,0	0,0		
	R001	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	0,0	0,0	6,0		
Control													
Anticuerpos positivos													
Concentración													
HIVIG													
10 mg/ml													
1 mg/ml													
50 µg/ml													
5 µg/ml													
50 µg/ml													
5 µg/ml													

FIG. 2

Neutralización contra cepas aisladas primarias del VIH-1 de los clados A, B, C y E después del primer refuerzo con proteína

Grupos del estudio	Animal n°	Clado B					Clado C		Clado A		Clado E	
		ADA	SF162	Bal	JRCSF	TVI	DUI51	S007	DJ263	CM235	CM244	
Mono-valente	R101	0,0		58,9	70,4	21,0	0,0	47,0	24,0	0,0	0,0	
	R102	0,0	74,6	63,9	57,0	14,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	R104	31,5			69,0	59,7	0,0	5,4	57,7	0,0	0,0	
	R105	6,0	46,5				0,0	0,0	41,5	0,0	0,0	
	R106	10,8	47,4	31,1	30,0	20,4	15,4	27,5	42,7	0,0	0,0	
	R107	2,7	54,0	0,0	6,2	39,5	0,0	7,0	16,7	0,0	26,2	
	R109	13,0	35,1	0,0	19,7	40,3	1,3	0,0	44,4	0,0	8,5	
	R110	10,5	31,9	0,0	0,0	34,8	4,9	34,3	36,5	0,0	28,4	
	R301	11,5		53,6	50,5		23,0	0,0	14,0	0,0	0,0	
	R302	0,0		79,4	64,2		33,0	54,0	55,0	0,0	27,0	
Poli-valente	R801	0,0		61,6	73,9	68,0	23,0	31,0	36,0	0,0	0,0	
	R802	0,0	73,0	13,5	41,4	74,0	0,0	13,0	65,0	0,0	0,0	
	R001	0,0	33,5	0,2	24,1	0,0	0,0	36,0	0,0	0,0	6,0	
	R001	0,0	33,5	0,2	24,1	0,0	0,0	36,0	0,0	0,0	6,0	
Anticuerpos positivos	HIVIG	Concentración										
		10 mg/ml	44,6	58,3	58,3	58,3	19	58,6	69,9	29,3	35,2	
		1 mg/ml	74,9	58,3	58,3	58,3		29	39,2	27,9	61,4	
		5 µg/ml	43,4	67,8	52,6	52,6	29	16,6	17,5	10,8	61,4	
		50 µg/ml	32,7	59,2	53,0	57,9	28,2	5,5	2,3	4,7	0	
	5 ug/ml	20,3	43,6	53,3	57,9	15,7	16	9	0	0	6	

FIG. 3

Neutralización contra cepas aisladas primarias del VIH-1 de los clados A, B, C y E después del segundo refuerzo con proteína

Grupos del estudio		Animal n°	Clado B			Clado C			Clado A		Clado E	
			ADA	SF162	Bal	JRC5F	TVI	DU151	S007	DJ263	CM235	CM244
Mono-valente	R101		0,0		70,0	67,9		0,0	0,0	22,0	0,0	27,7
	R102		1,0	77,3	56,0	49,4	52,8	0,0	0,0	56,4	0,0	17,0
	R104		33,5									
	R105		37,0					22,8	33,0	65,7	0,0	0,0
	R106		35,1					34,9	0,0	49,5	0,0	0,0
	R107		26,1					54,1	62,5		25,5	33,4
	R109		37,2					0,0	66,8	68,5	0,0	45,3
	R110		11,3					0,0	3,4	68,2	0,0	0,0
	R301		24,0					43,7	59,1	70,0	0,0	28,4
	R302		13,0					8,7	39,0	70,2	10,9	33,4
Poli-valente	R801		24,0					0,0	44,0	64,0	16,1	23,7
	R802		29,0					0,0	42,4	62,5	3,3	32,5
								1,2	3,7		15,2	37,6
	R001		0,0	40,6	23,7	35,4	50,1	0,0	0,0	22,0	0,0	0,0
Control												
Anticuerpos positivos												
HIVIG	10 mg/ml											
	1 mg/ml											
2F5	50 µg/ml											
	5 µg/ml											
2G12	50 µg/ml											
	5 µg/ml											

FIG. 4

Neutralización de virus del clado B del VIH-1

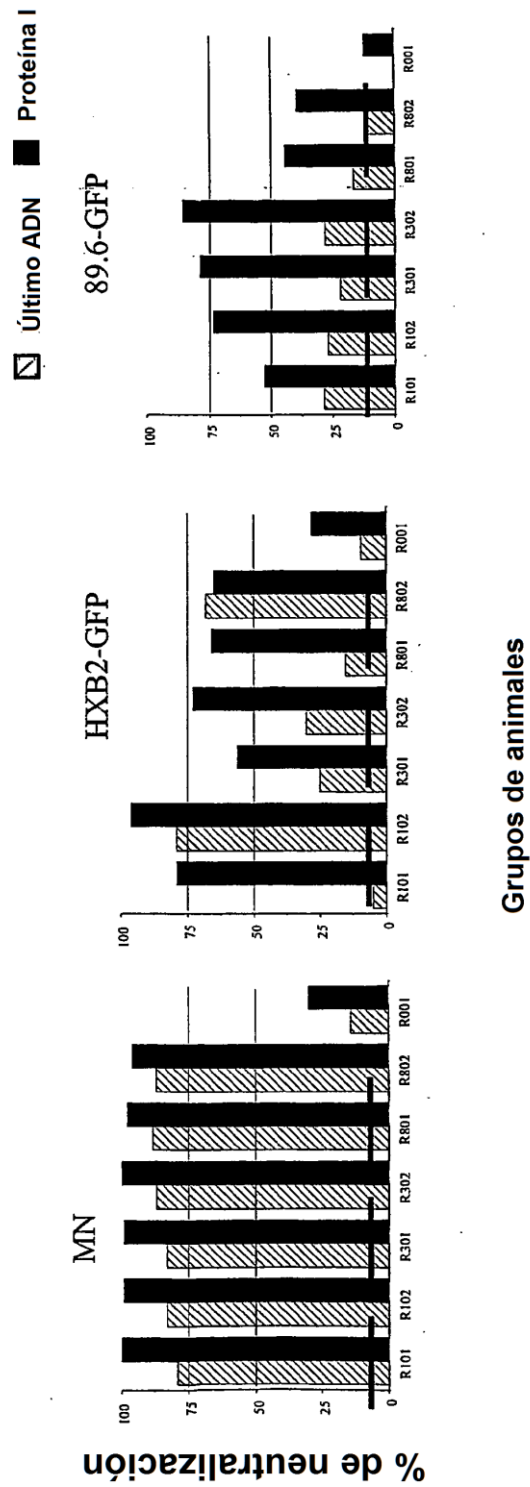


FIG. 5A

FIG. 5B

FIG. 5C

Respuestas anti-IgG de Env después de la sensibilización con ADN medida por ELISA

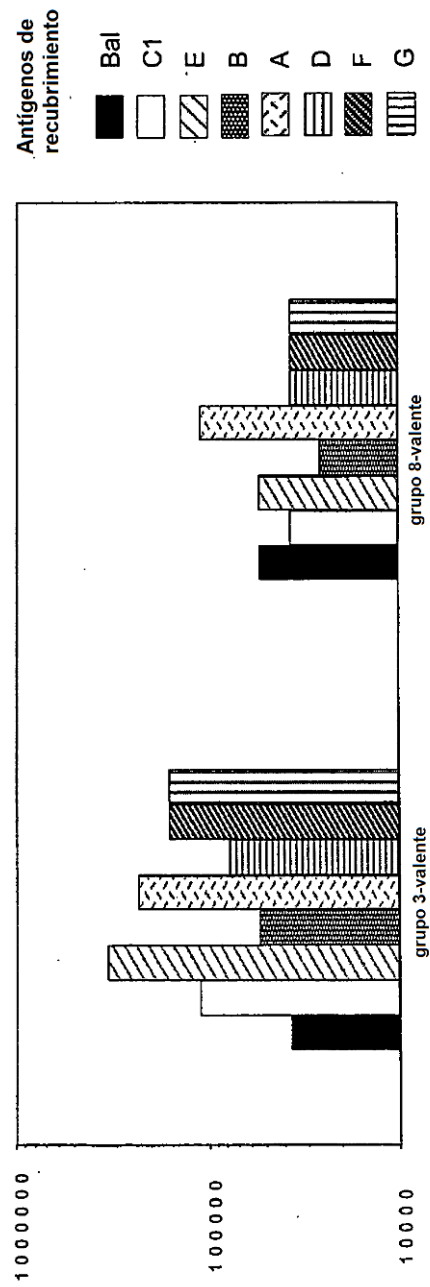
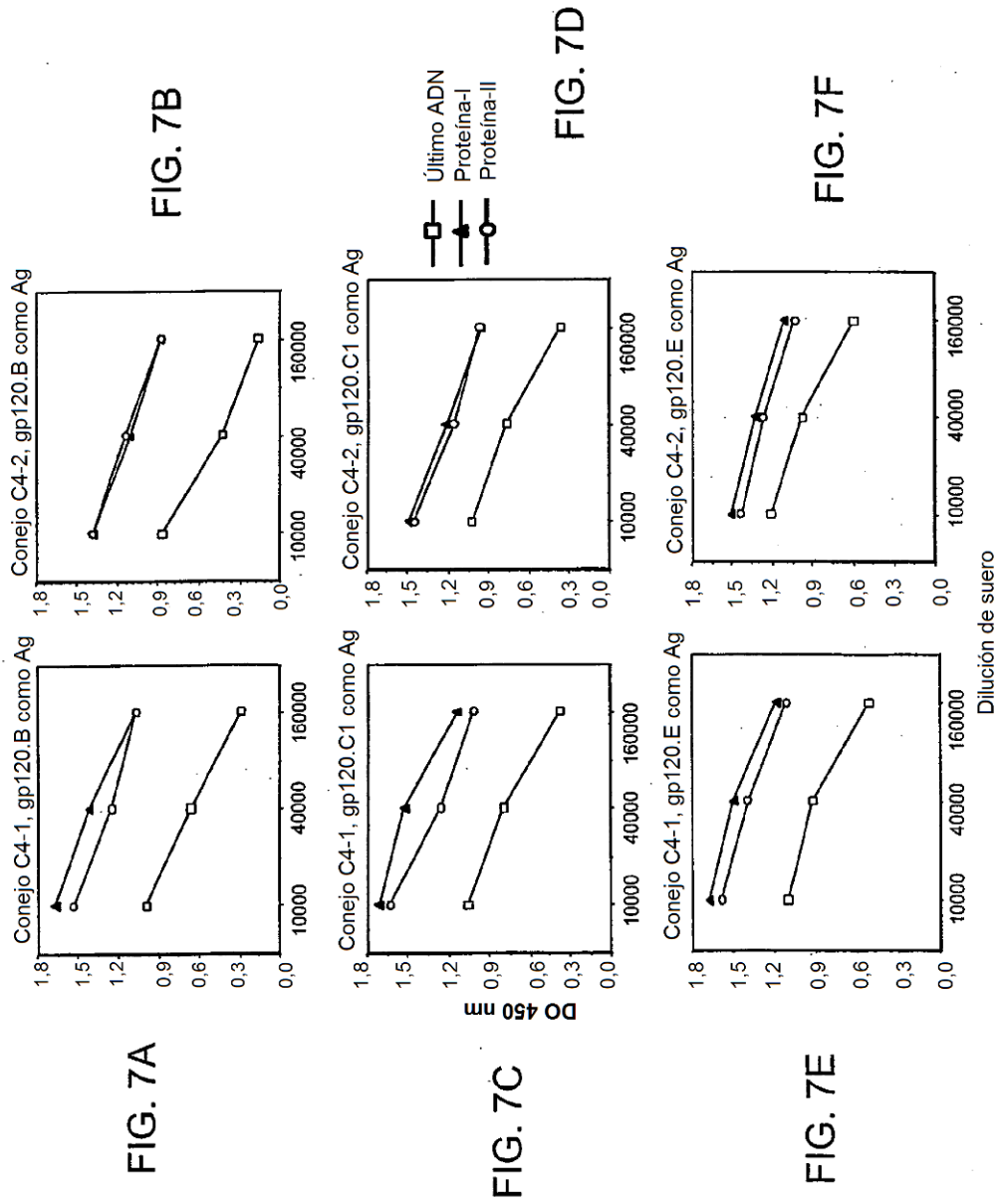
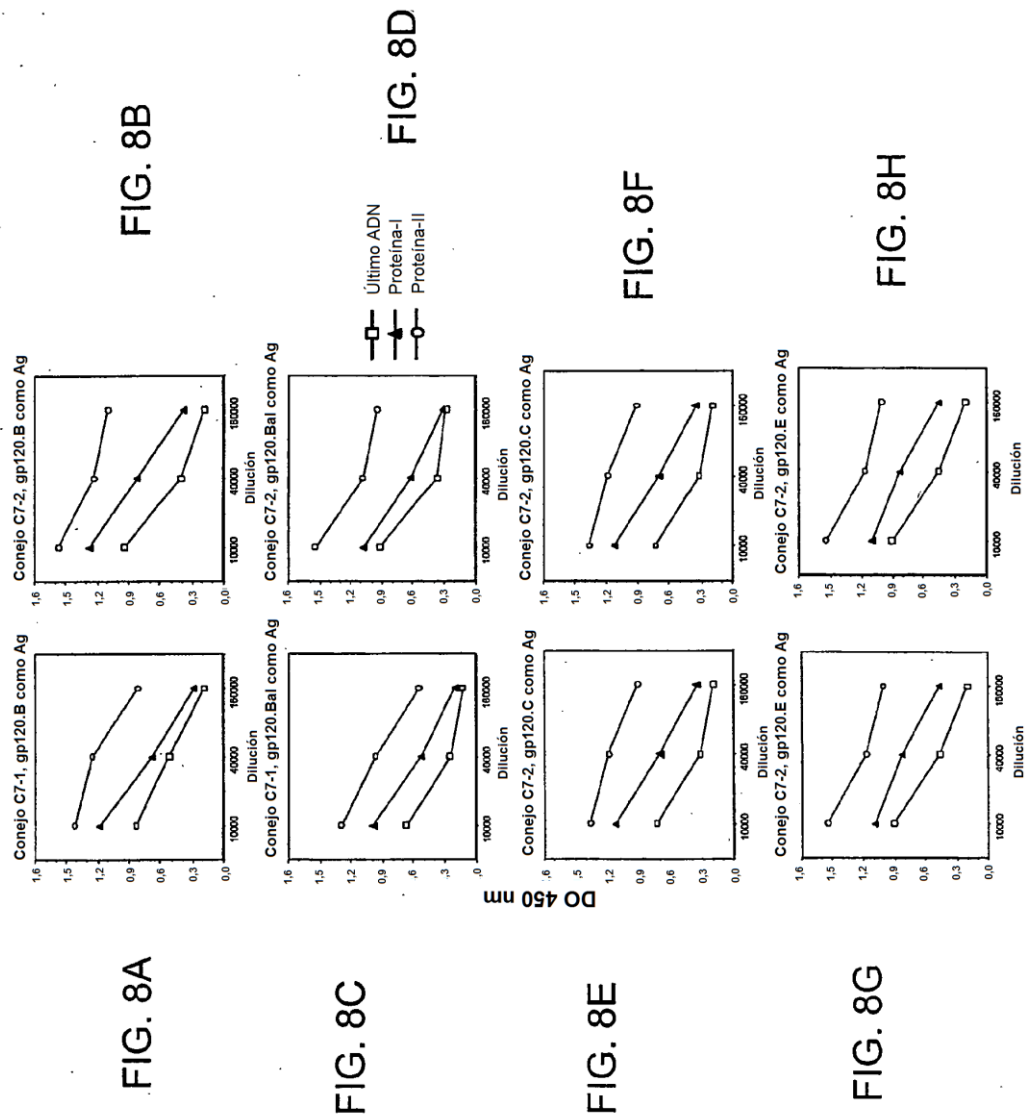
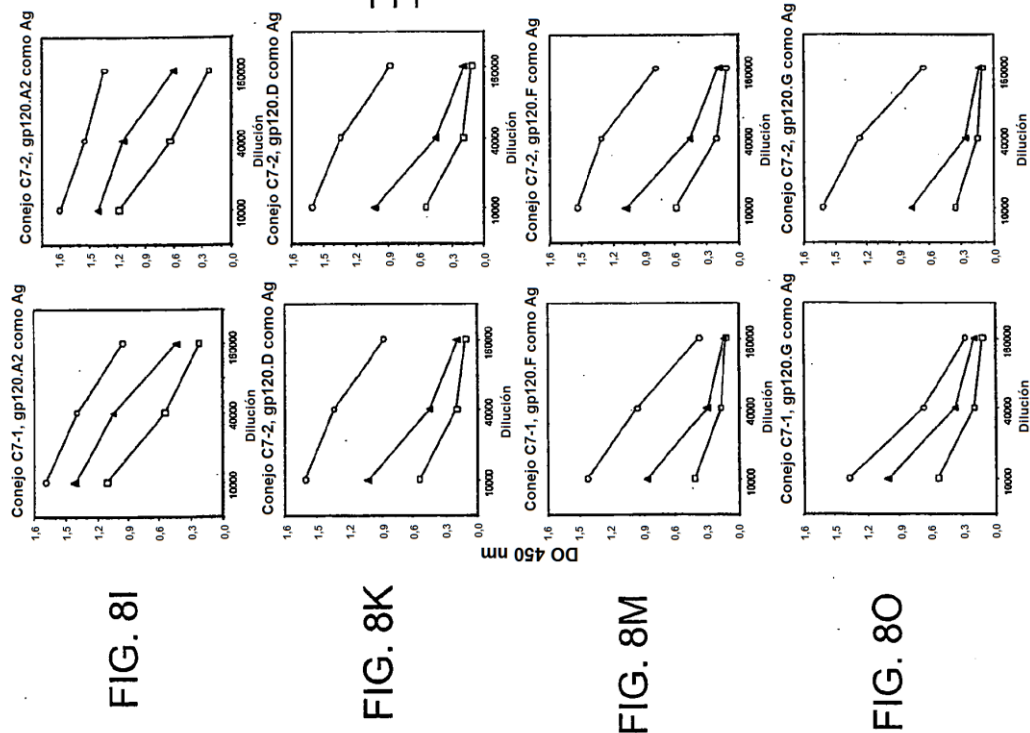


FIG. 6







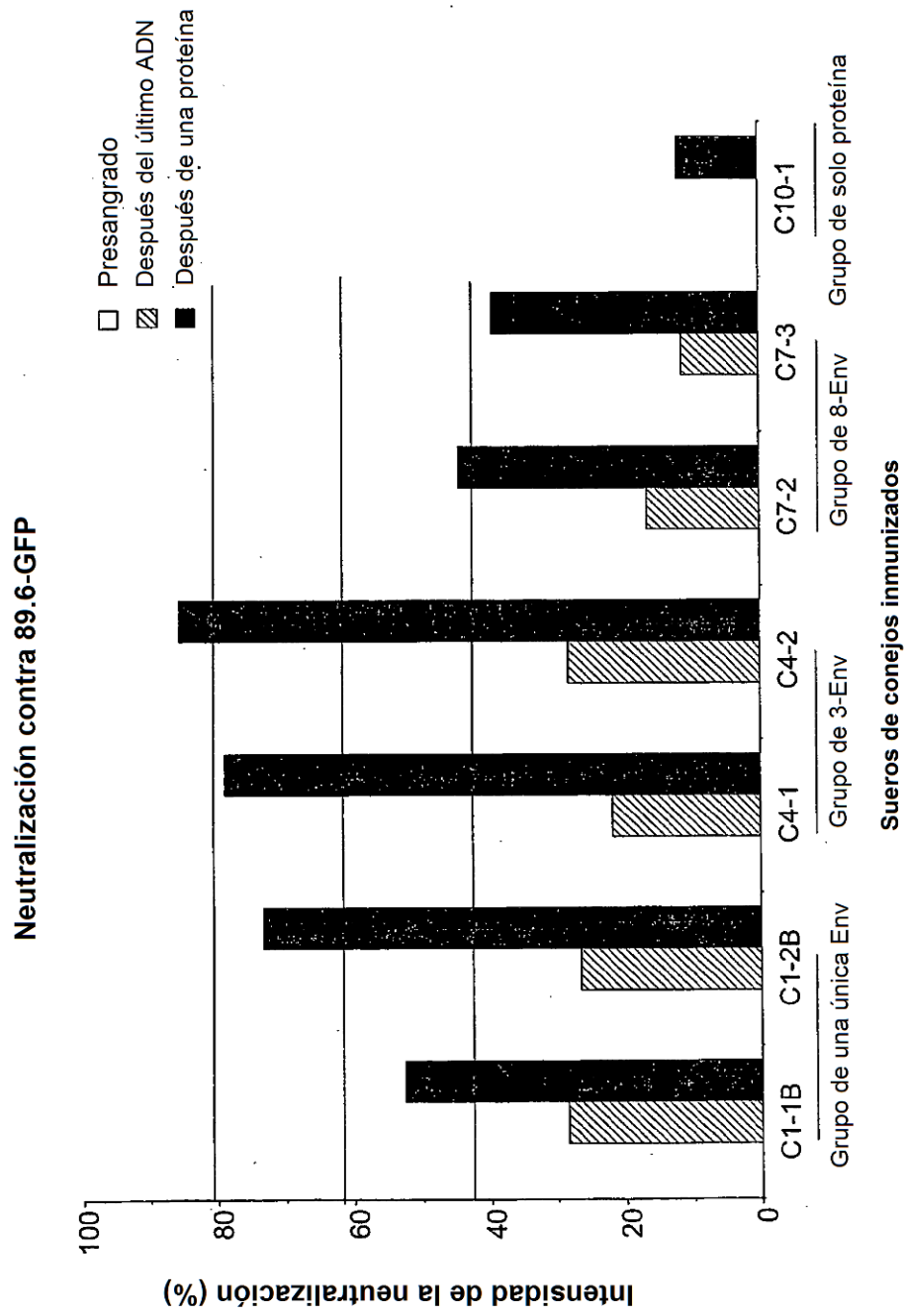


FIG. 9

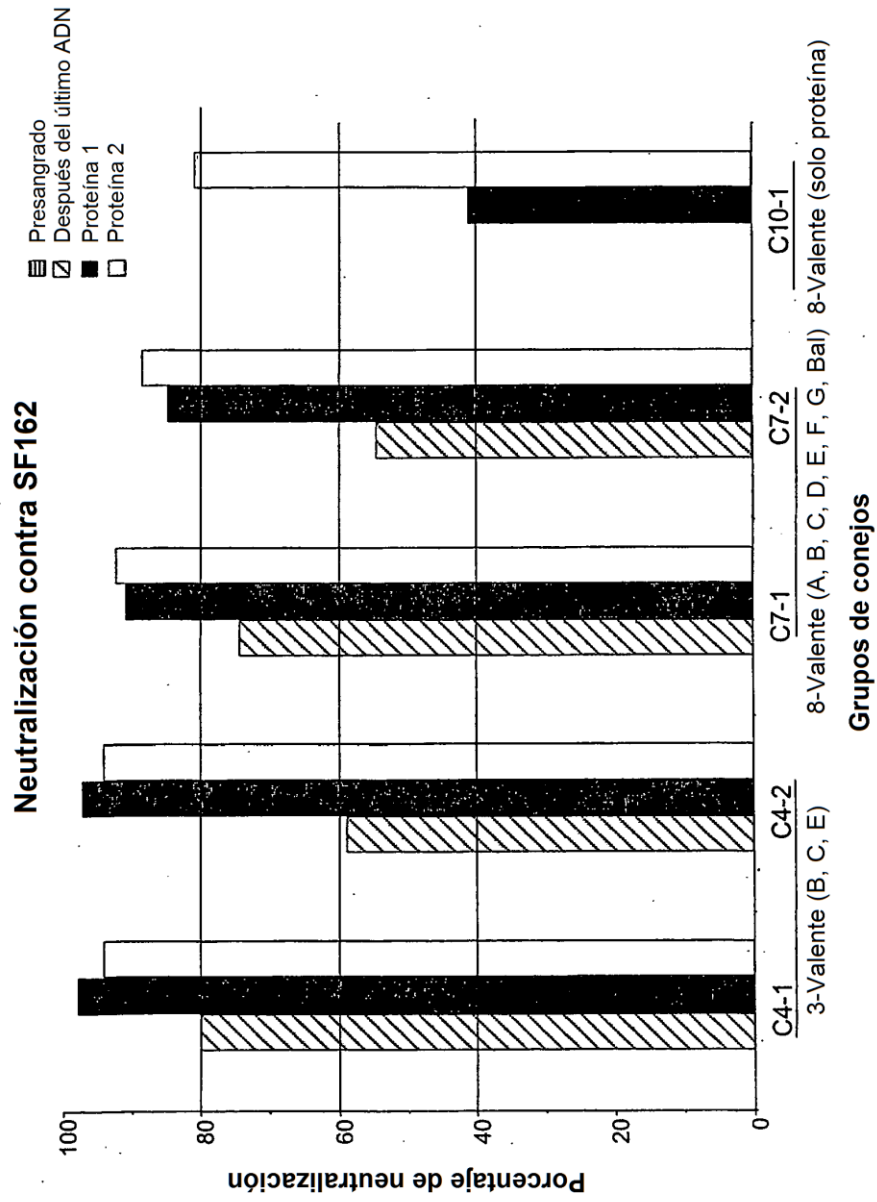


FIG. 10

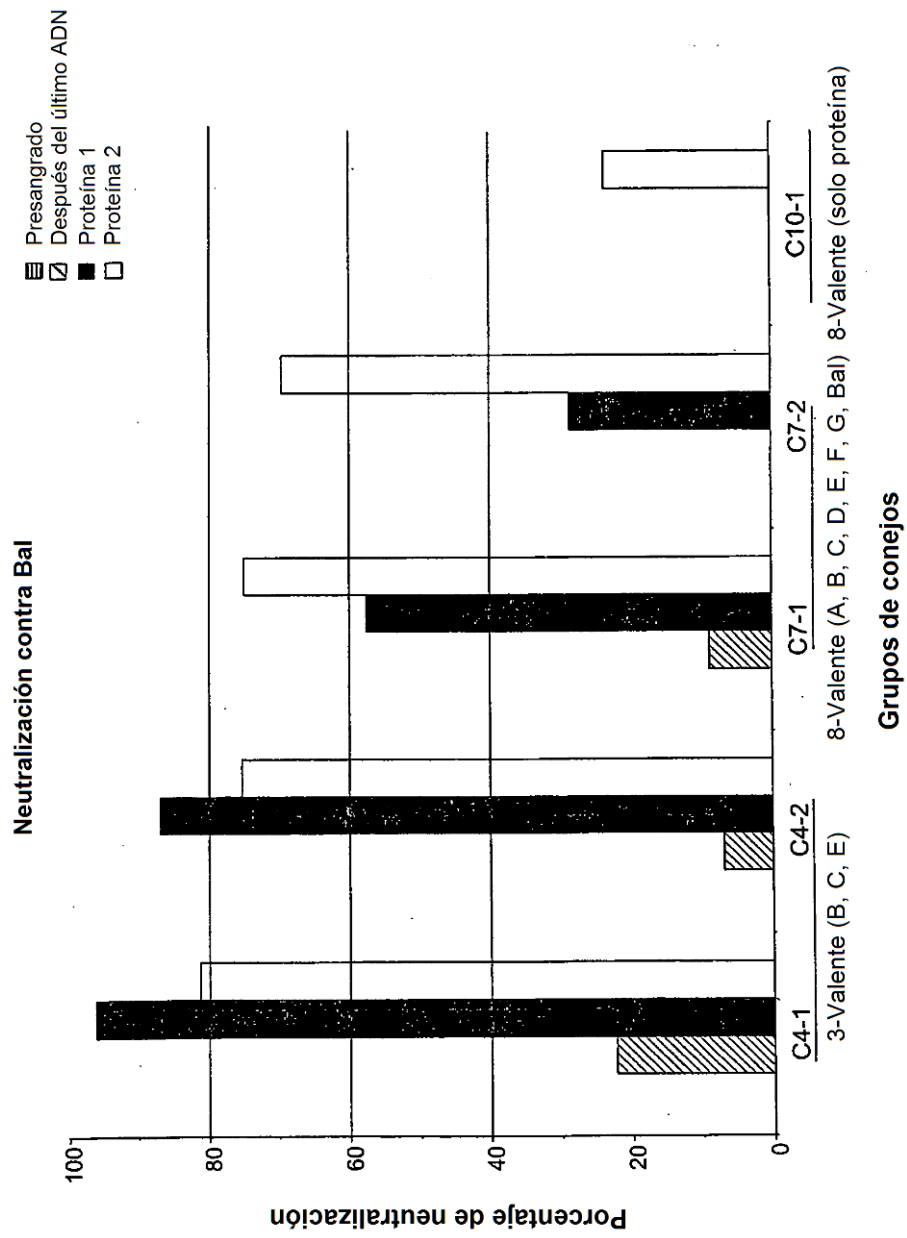


FIG. 11

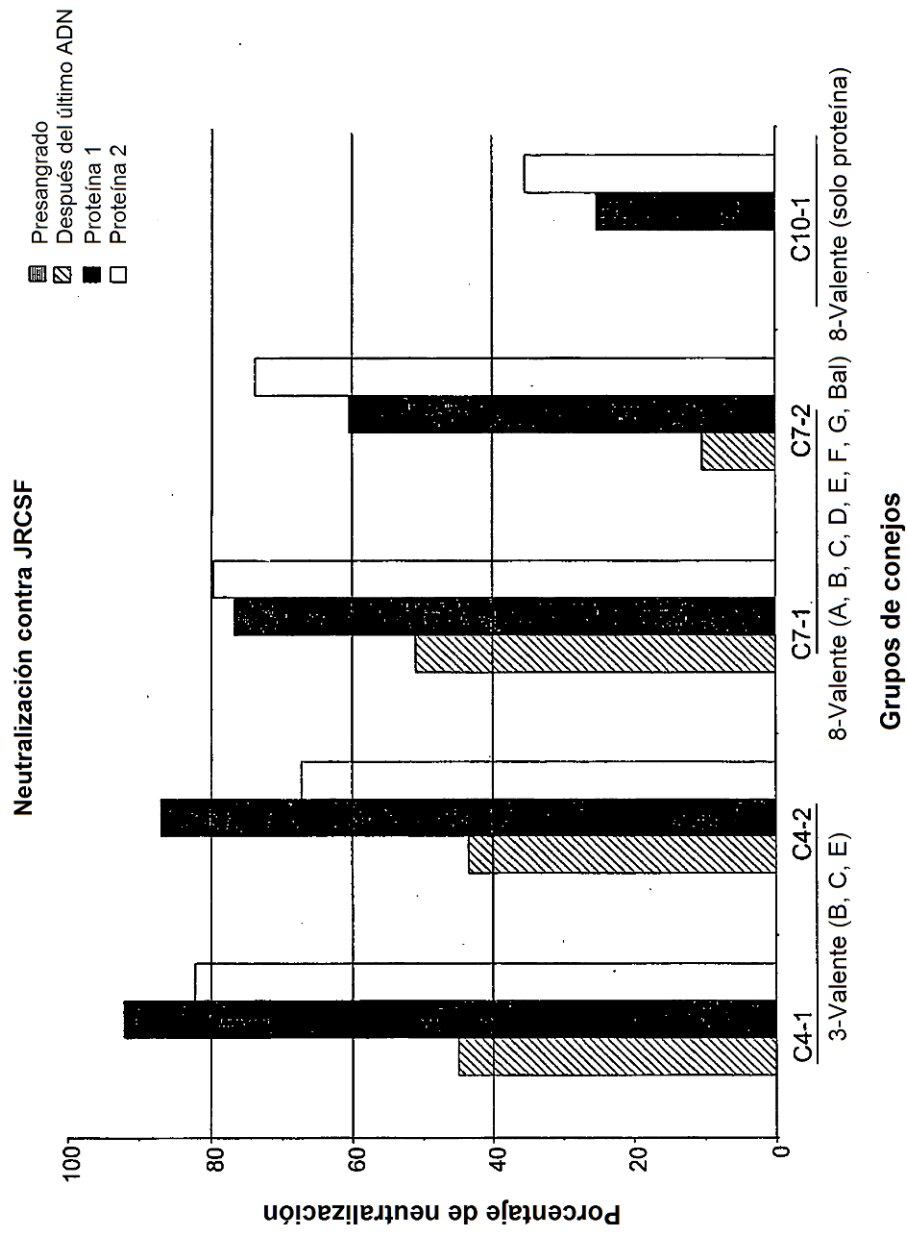


FIG. 12

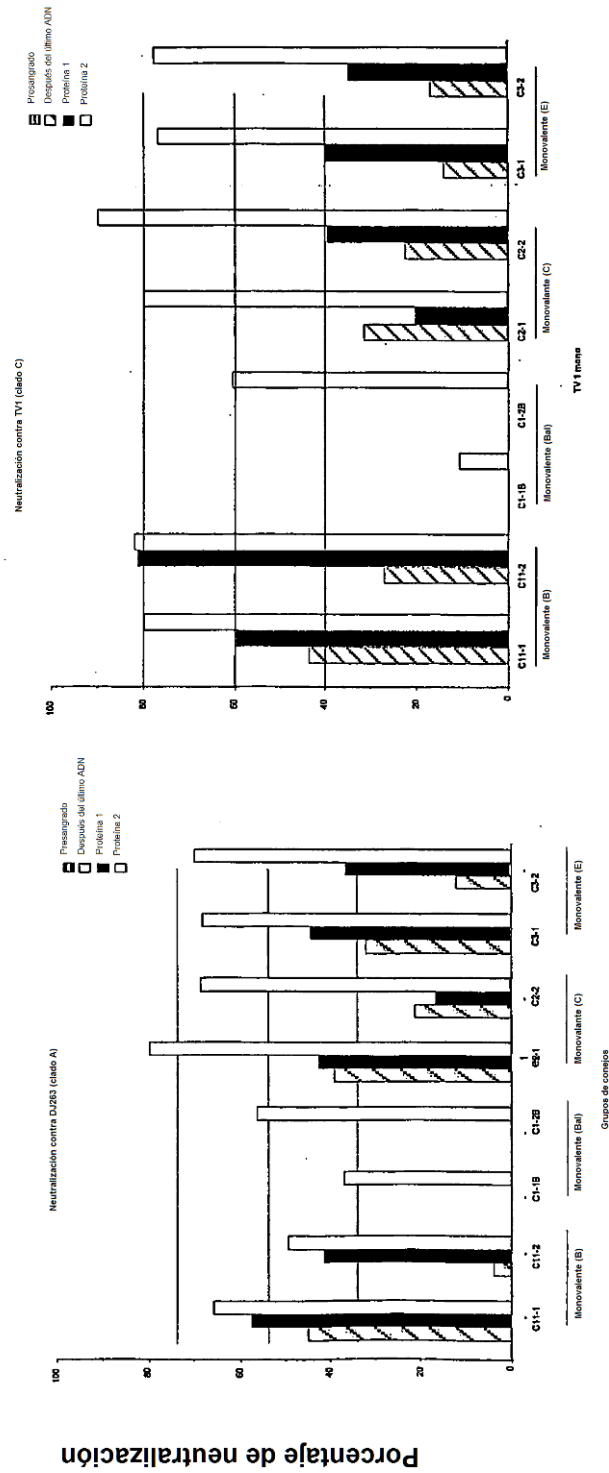


FIG. 13A

FIG. 13B

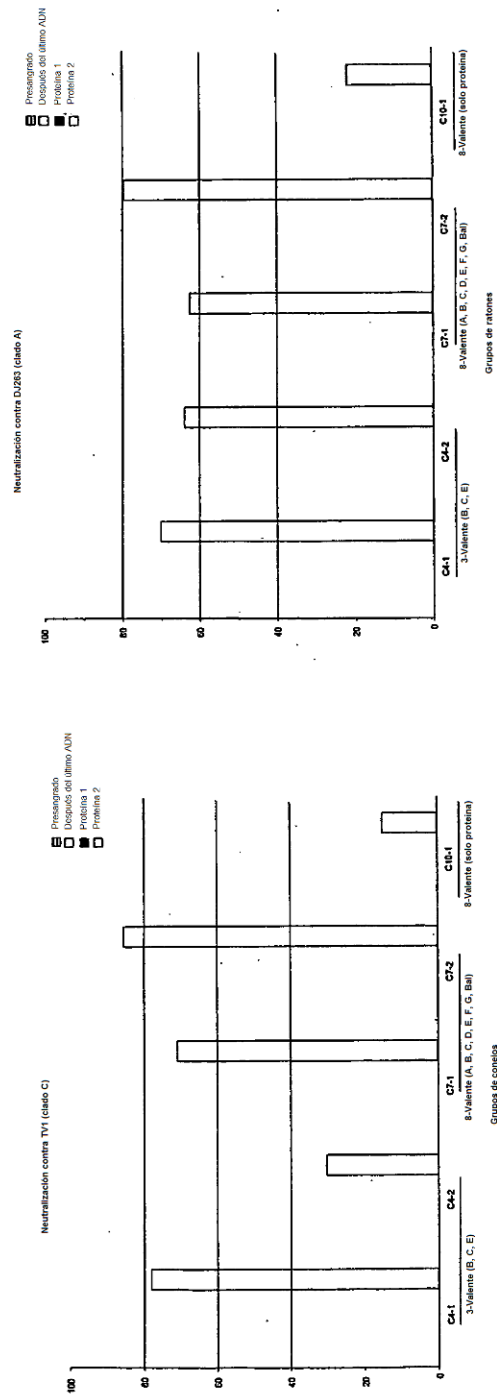


FIG. 13C

FIG. 13D

1	---	SLWTVVYGVVVKDA	TTFLCASDAKAYDTEVHNVAATHACVPTDNPQOII	EVNVTTEE	FNNKRNWVQOMHDI	11
1	---	SLWTVVYGVVVKDA	TTFLCASDAKAYDTEVHNVAATHACVPTDNPQOII	EVNVTTEE	FNNKRNWVQOMHDI	11
1	---	SLWTVVYGVVVKDA	TTFLCASDAKAYDTEVHNVAATHACVPTDNPQOII	EVNVTTEE	FNNKRNWVQOMHDI	11
1	---	SLWTVVYGVVVKDA	TTFLCASDAKAYDTEVHNVAATHACVPTDNPQOII	EVNVTTEE	FNNKRNWVQOMHDI	11
1	---	SLWTVVYGVVVKDA	TTFLCASDAKAYDTEVHNVAATHACVPTDNPQOII	EVNVTTEE	FNNKRNWVQOMHDI	11
78	SLWDQSLKPCVKLP	PLCVTL	CS	---	WYTH-NETNS	FNSSVMT
78	SLWDQSLKPCVKLP	PLCVTL	CS	---	WYTH-NETNS	FNSSVMT
78	SLWDQSLKPCVKLP	PLCVTL	CS	---	WYTH-NETNS	FNSSVMT
81	SLWDQSLKPCVKLP	PLCVTL	CS	---	WYTH-NETNS	FNSSVMT
78	SLWDQSLKPCVKLP	PLCVTL	CS	---	WYTH-NETNS	FNSSVMT
150	VOIN	---	NSS	YRLINCHTS	ILTOCPKVSEPI	PIHYCAPAGYALLKONDE
154	BA-L	gp120	---	NSS	YRLINCHTS	ILTOCPKVSEPI
155	BA-L	gp120	---	NSS	YRLINCHTS	ILTOCPKVSEPI
158	Czm	gp120	---	NSS	YRLINCHTS	ILTOCPKVSEPI
157	BA-L	gp120	---	NSS	YRLINCHTS	ILTOCPKVSEPI
225	WSTQALLNGSLA	EEV	IRS	NI	VOIN	NEV
227	WSTQALLNGSLA	EEV	IRS	NI	VOIN	NEV
227	WSTQALLNGSLA	EEV	IRS	NI	VOIN	NEV
238	WSTQALLNGSLA	EEV	IRS	NI	VOIN	NEV
227	WSTQALLNGSLA	EEV	IRS	NI	VOIN	NEV
305	GSQNR	EL	QV	RE	W	FT
307	BA-L	gp120	---	GSQNR	EL	QV
307	BA-L	gp120	---	GSQNR	EL	QV
313	RTW	KT	LR	V	K	RE
307	BA-L	gp120	---	GSQNR	EL	QV
383	IKOI	IN	W	Q	V	RE
387	IKOI	IN	W	Q	V	RE
385	IKOI	IN	W	Q	V	RE
393	IKOI	IN	W	Q	V	RE
382	IKOI	IN	W	Q	V	RE
459	WAPT	AKRRVQ	---	---	---	---
463	WAPT	AKRRVQ	---	---	---	---
463	WAPT	AKRRVQ	---	---	---	---
473	WAPT	AKRRVQ	---	---	---	---
458	WAPT	AKRRVQ	---	---	---	---

FIG. 14

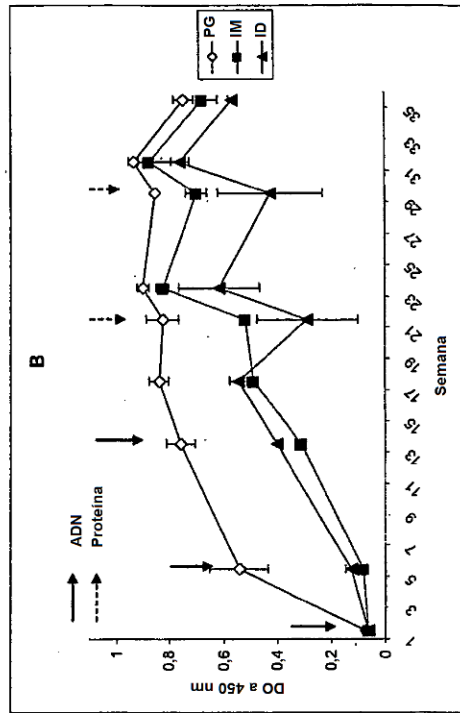


FIG. 15B

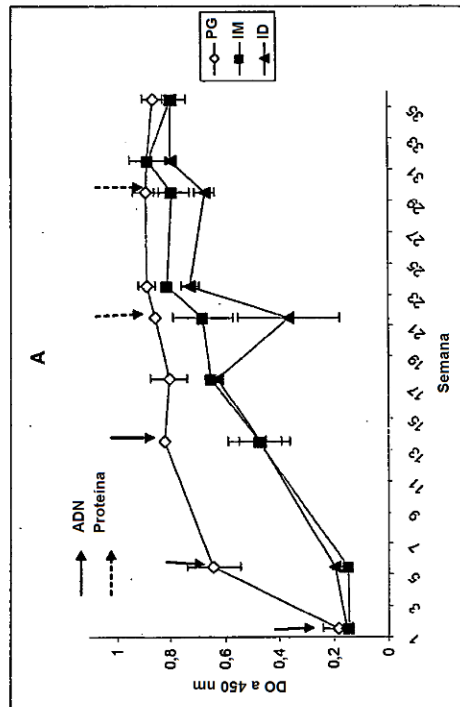


FIG. 15A

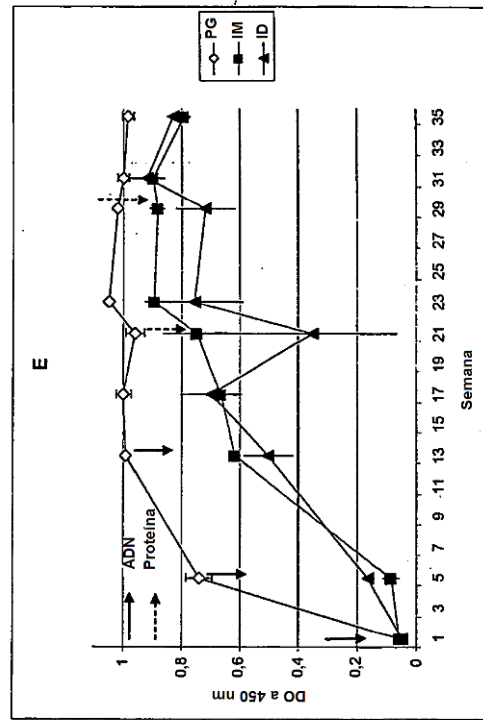


FIG. 15D

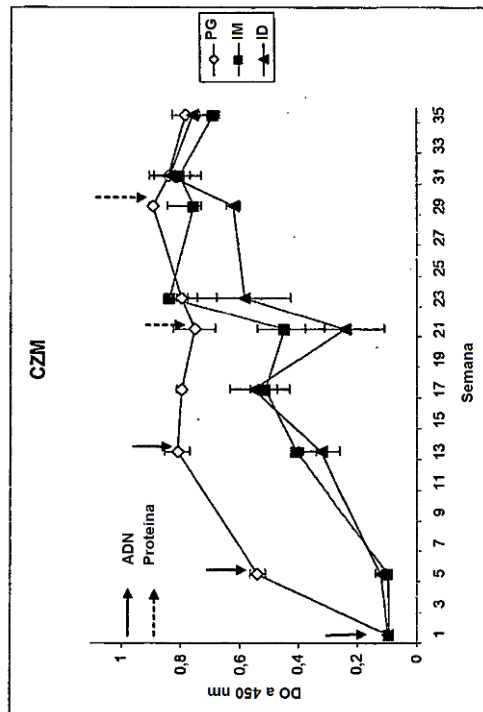


FIG. 15C

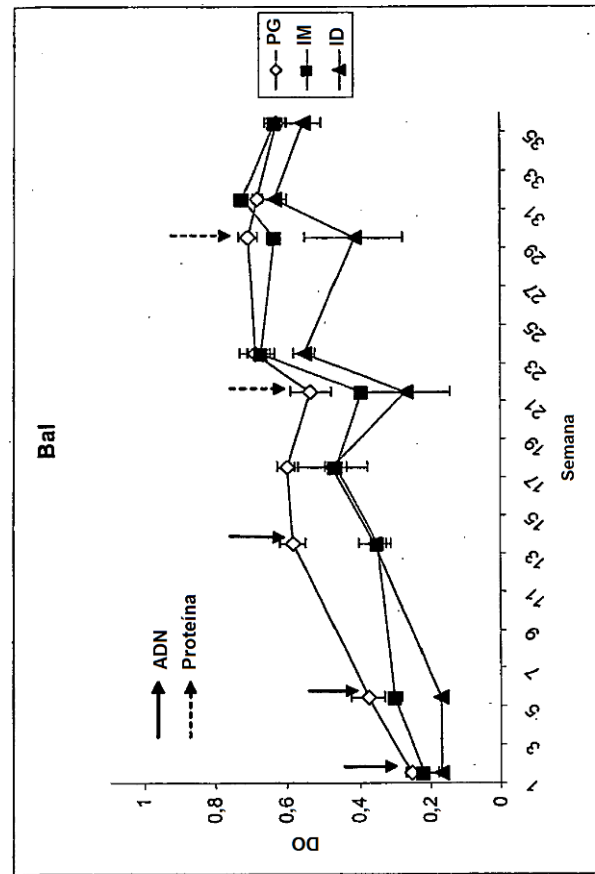
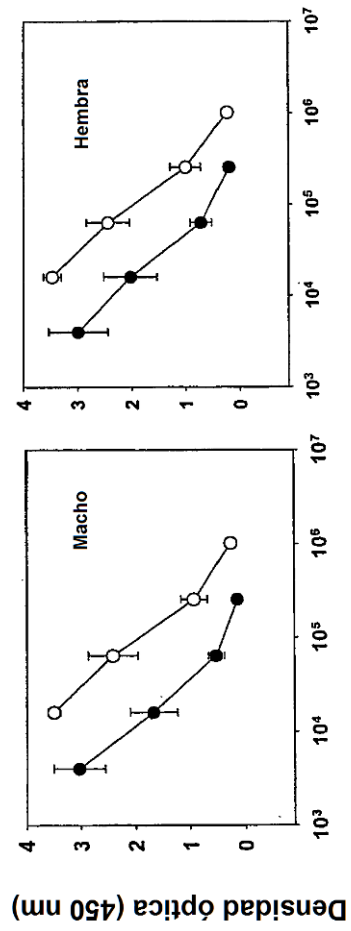


FIG. 15E

Respuesta anti-gp120 en conejos inmunizados intramuscularmente con DP6-001

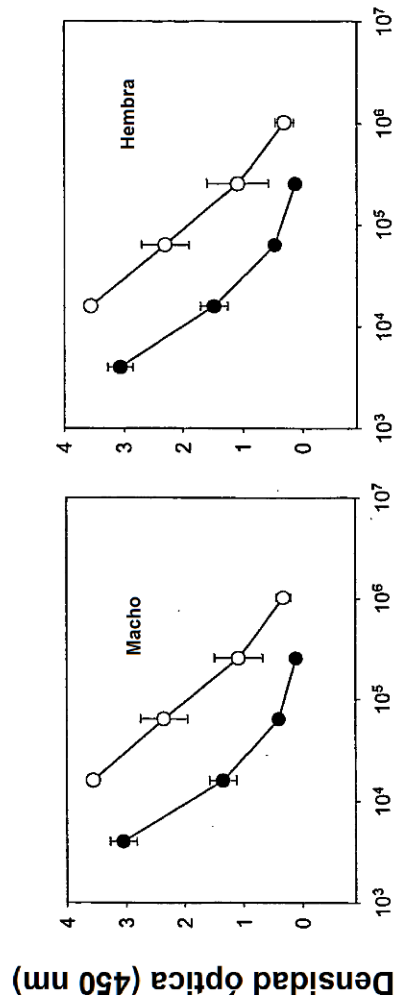


Dilución recíproca

FIG. 16A

FIG. 16B

Respuesta anti-gp120 en conejos inmunizados intradérmicamente con DP6-001

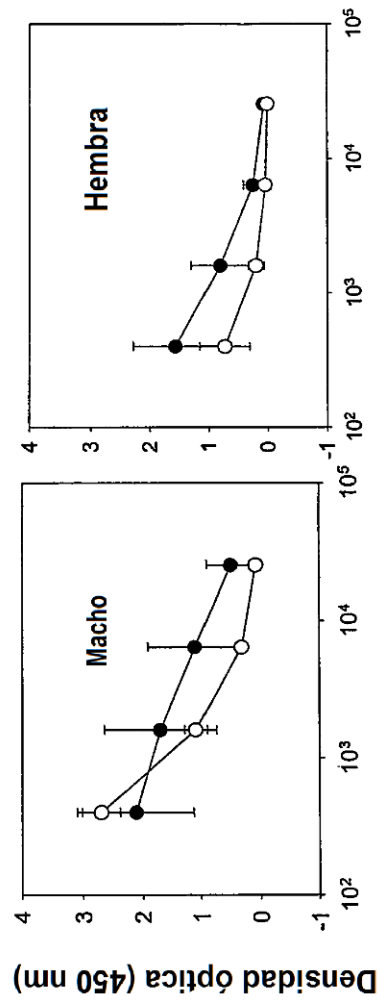


Dilución recíproca

FIG. 17A

FIG. 17B

Respuesta anti-gag en conejos inmunizados intramuscularmente con DP6-001



Dilución recíproca

FIG. 18A

FIG. 18B

Respuesta anti-gag en conejos inmunizados intradérmicamente con DP6-001

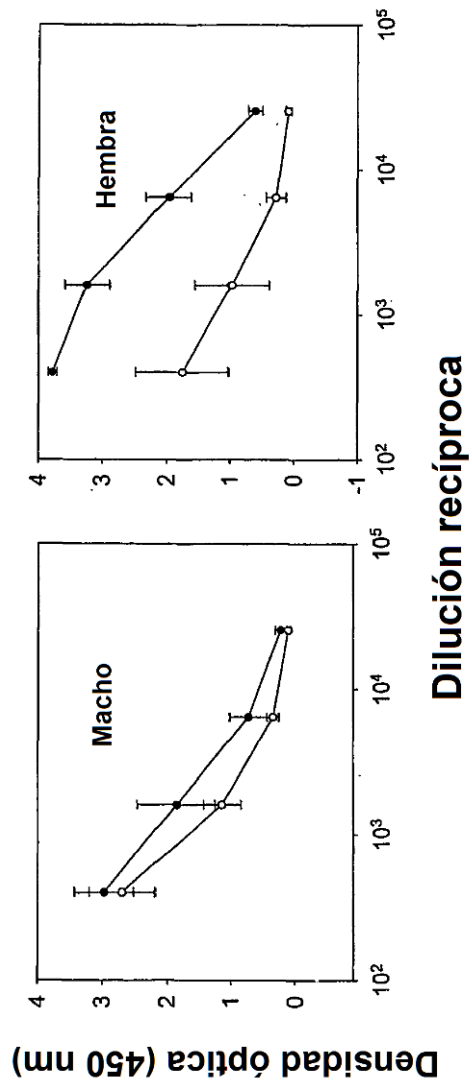


FIG. 19A

FIG. 19B

Títulos de anticuerpos en macacos inmunizados con ADN polivalente y proteína gp120

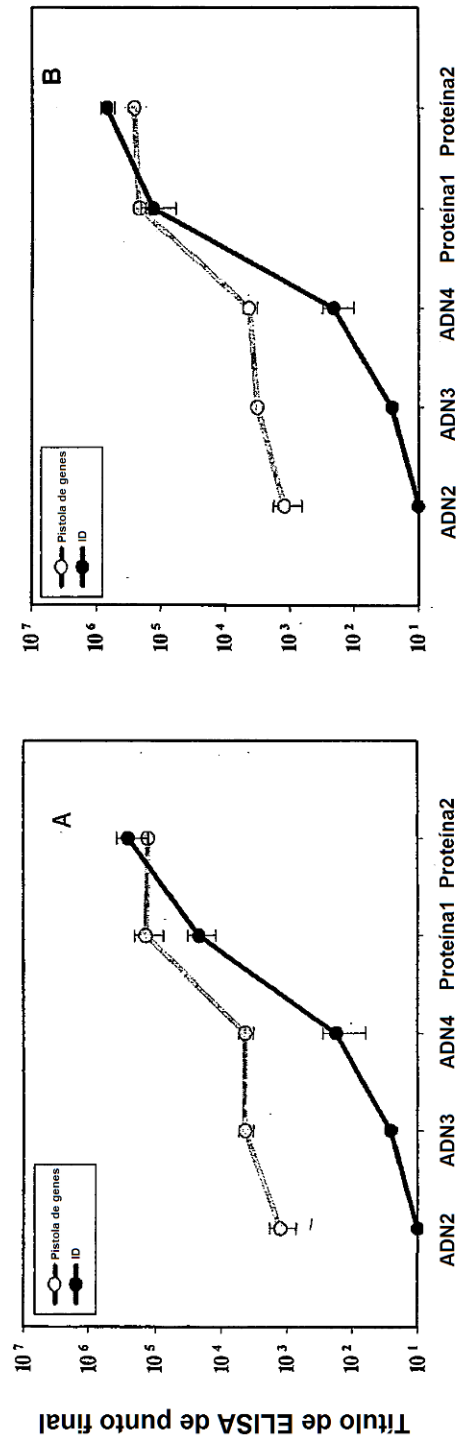


FIG. 20A

FIG. 20B

Títulos de anticuerpos en macacos inmunizados con ADN polivalente y proteína gp120

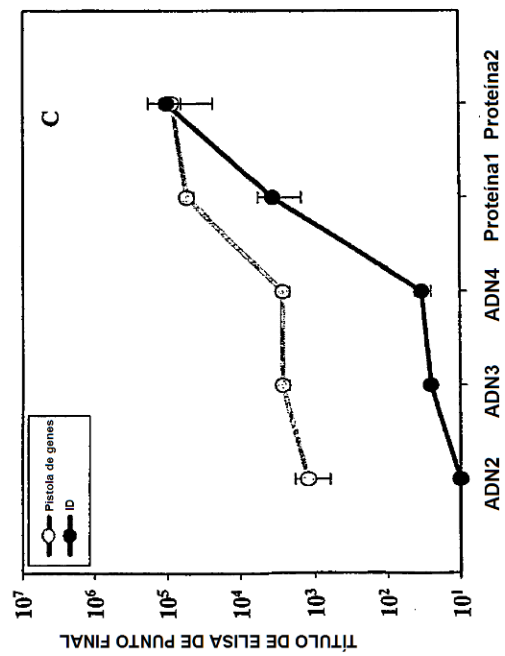


FIG. 20C

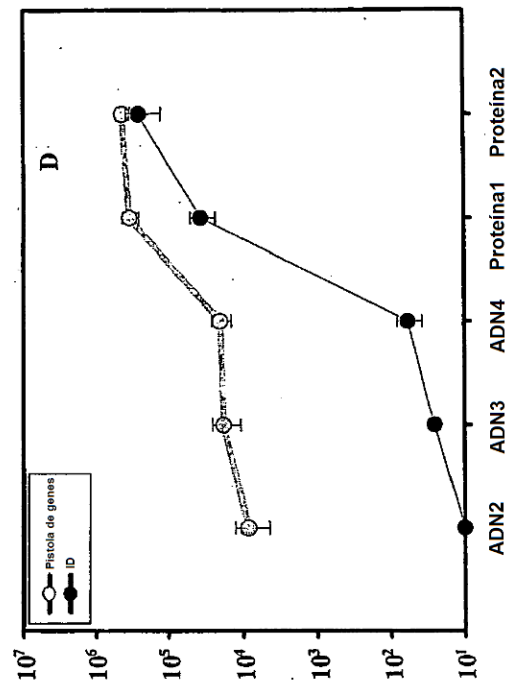


FIG. 20D

Títulos de anticuerpos en macacos inmunizados con ADN polivalente y proteína gp120

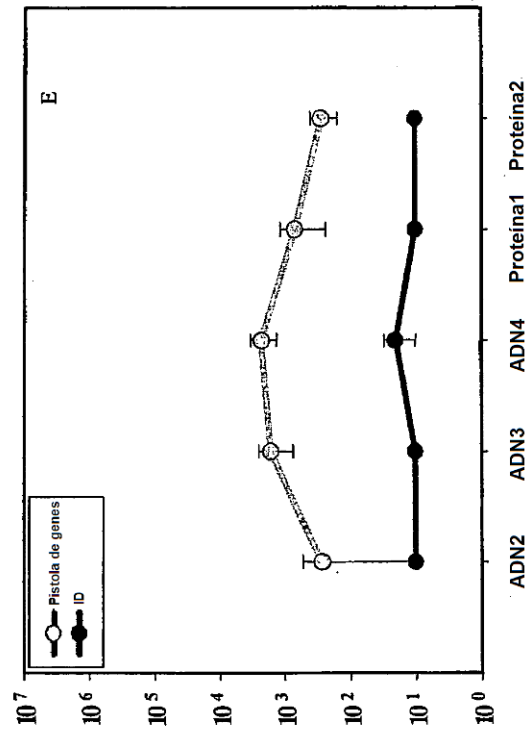


FIG. 20E

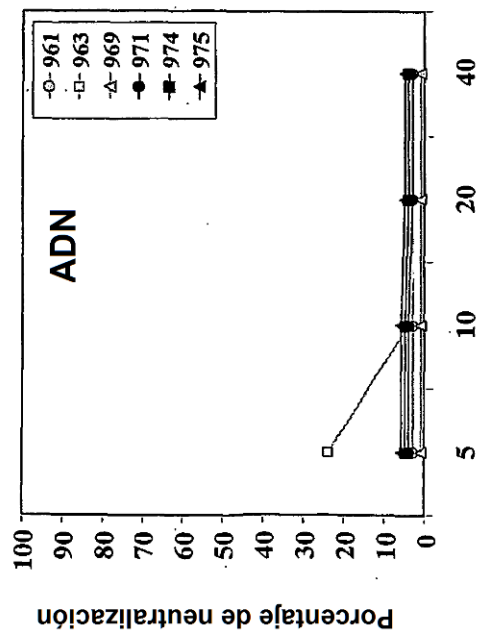
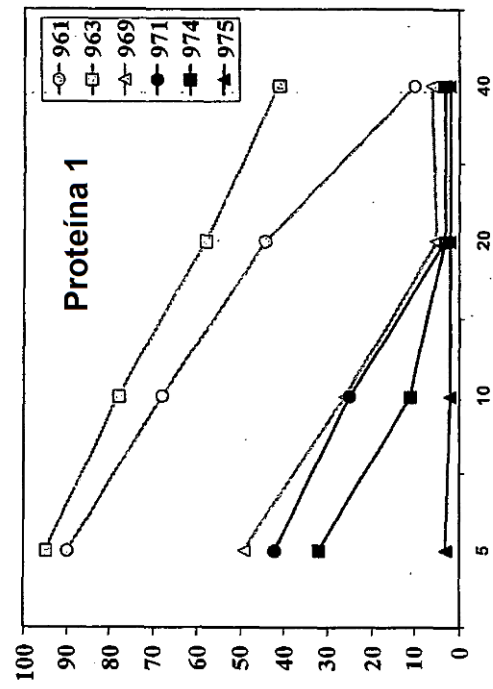


FIG. 21A



Dilución de suero recíproca

FIG. 21B

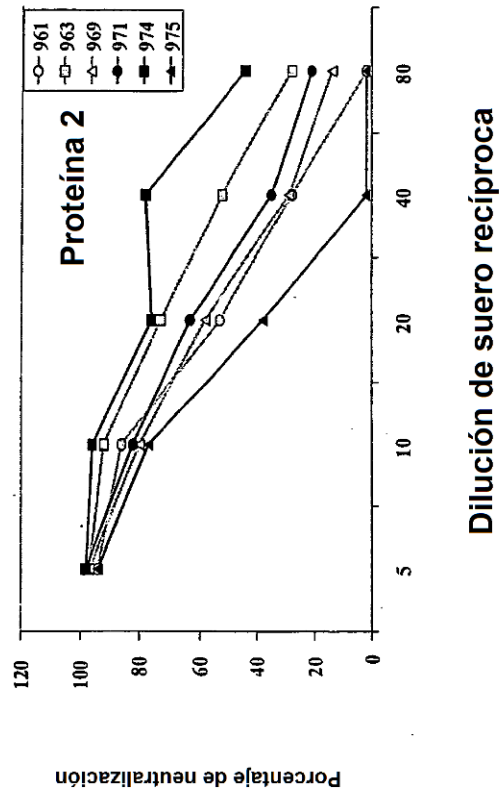


FIG. 21C

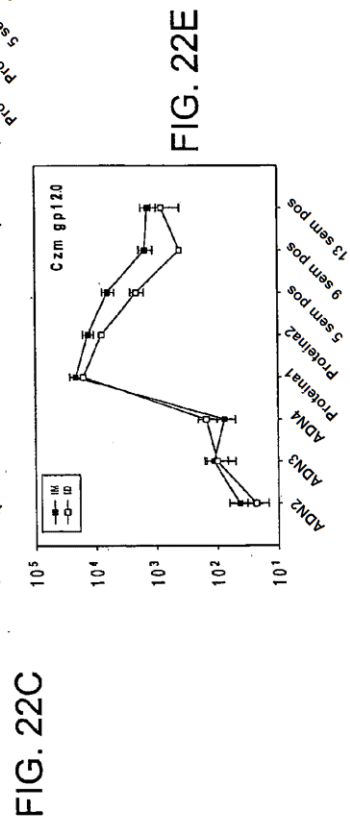
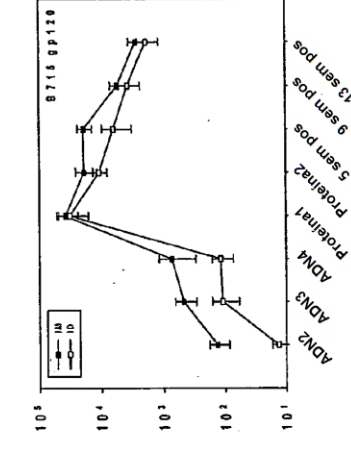
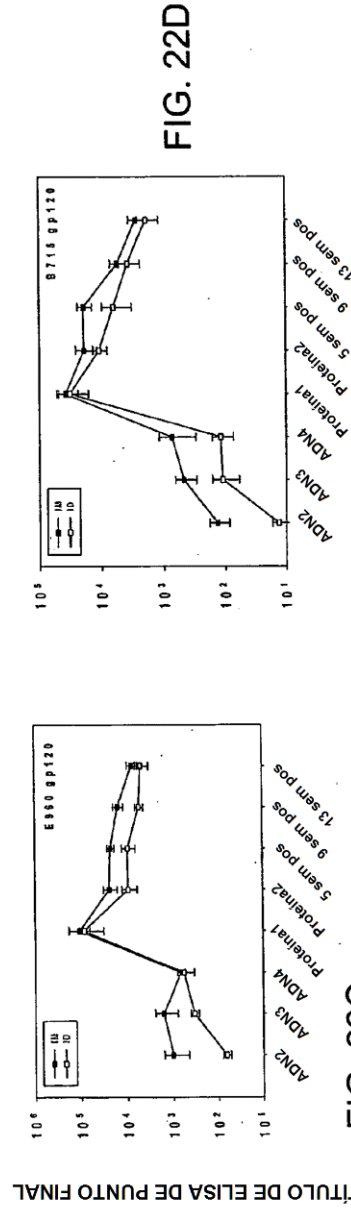
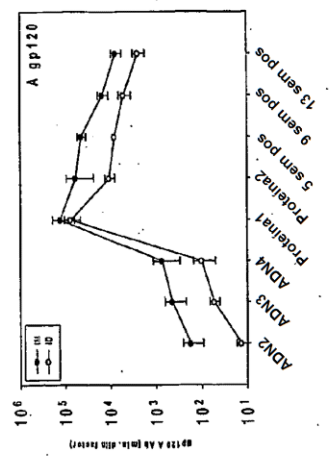
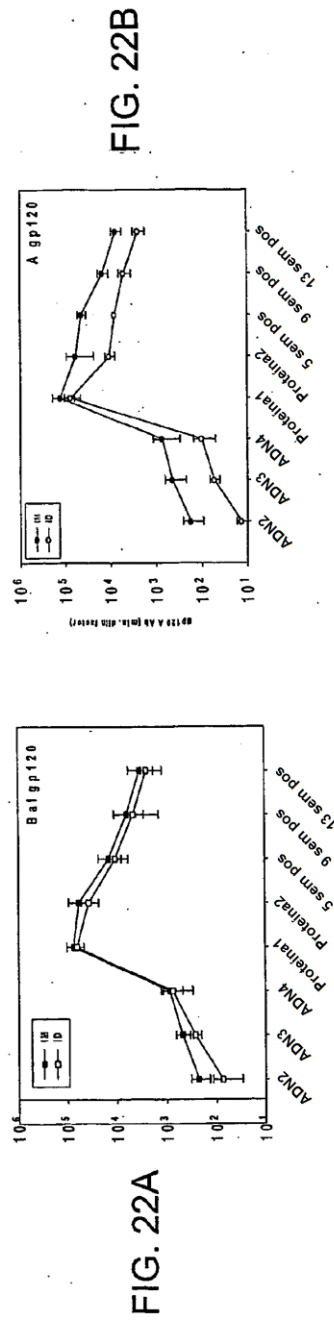


FIG. 23A

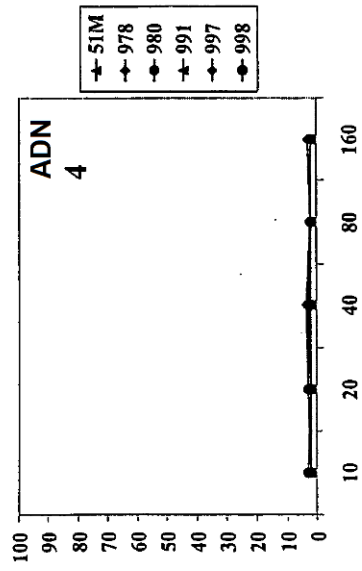


FIG. 23B

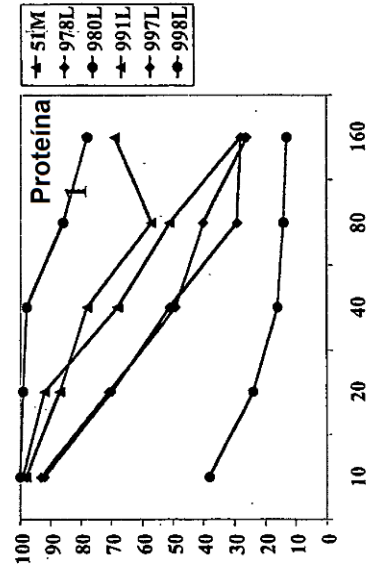
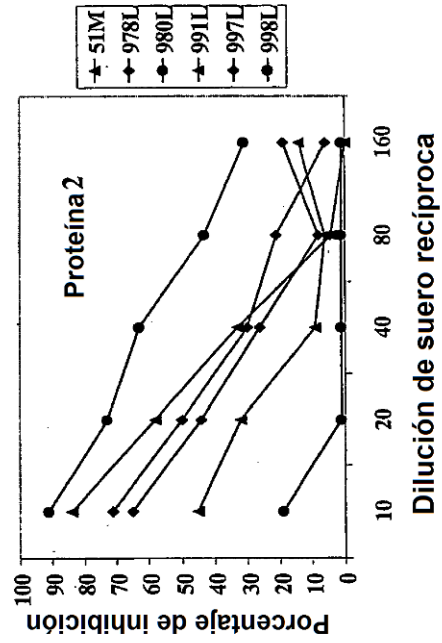


FIG. 23C



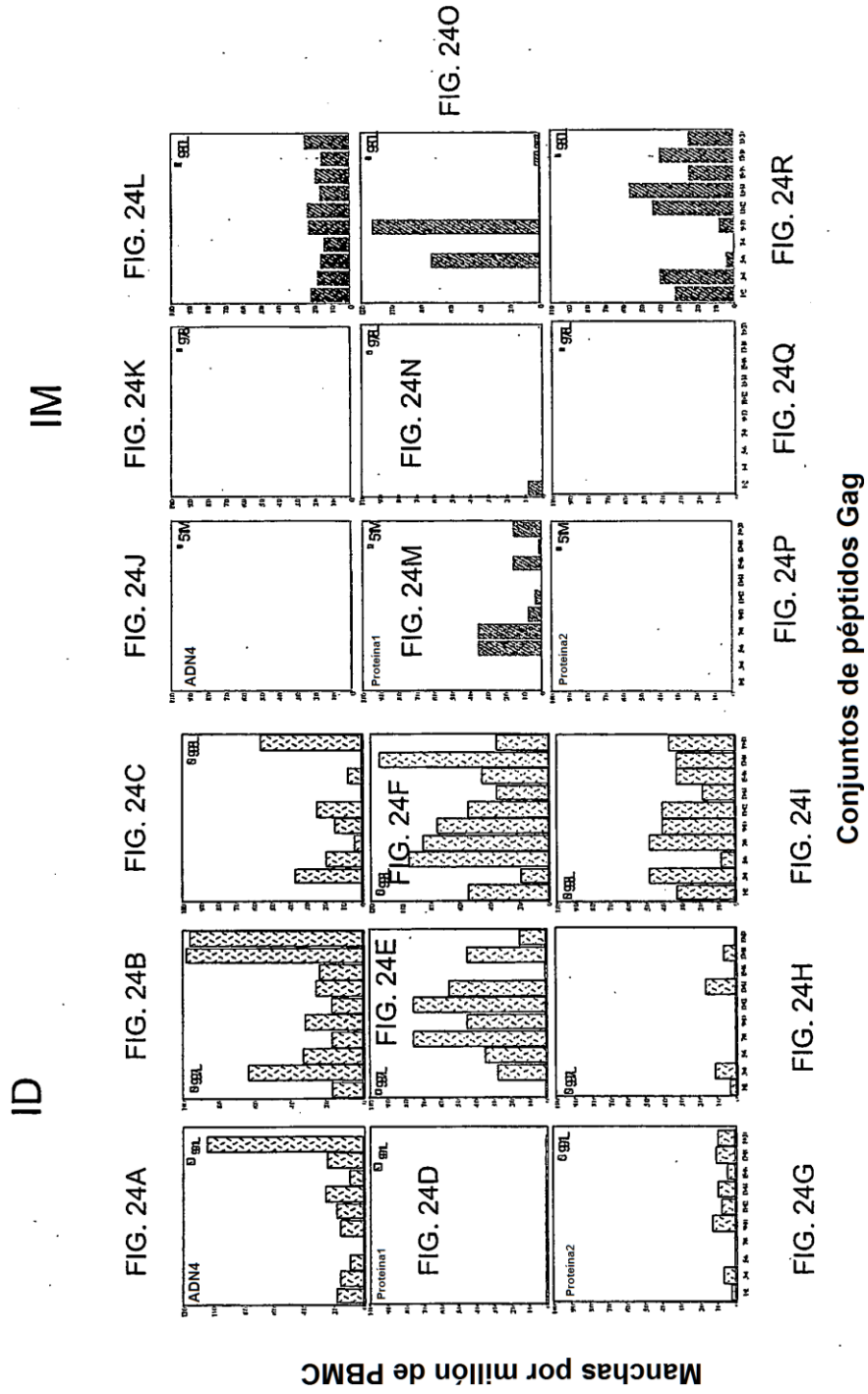


FIG. 25A

Estudio I: ADN natural

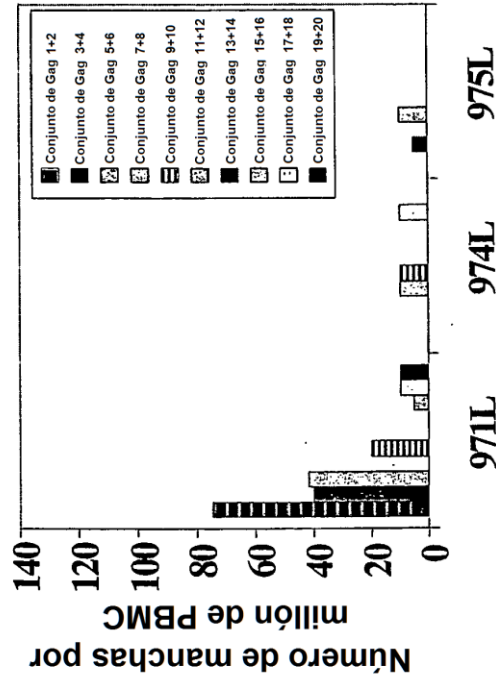


FIG. 25B

Estudio II: ADN de codón optimizado



Número de animales

FIG. 26B

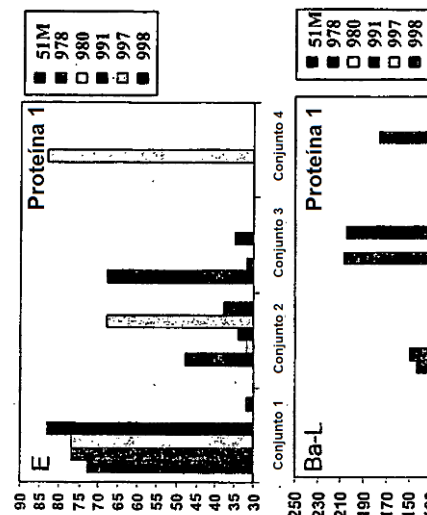
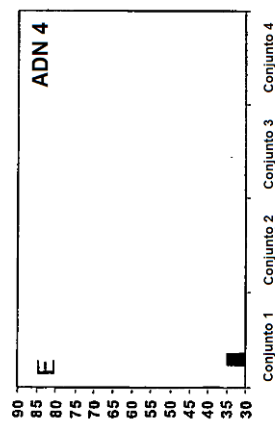


FIG. 26A



Manchas por millón de BMC

FIG. 26D

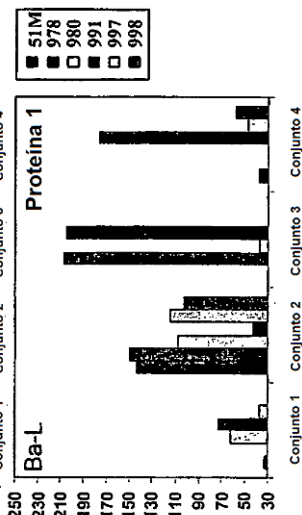
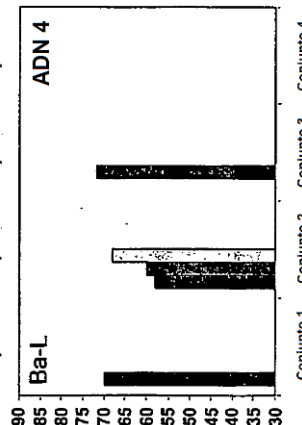


FIG. 26C



Conjunto de péptidos de la envoltura

Secuencia de ADN de Gag.Czm natural:

ATGGGTGGAGAGCGTCAATATTAGAGGGGGAAATTAGATAAATGGGAAAAAATTAGGCTAAGGCCAGGGGAAAGA
AACGCTATGTAAACACCTAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTGGAAAGATTTCGCTTAACCTTGCCCTTTTAGAAACAT
CAGAGGCTGTAAACAAATAATGAACACAGCTACAACAGCTCTTCAGACAGGAACGGAGGAACCTTAGATCATTTATACAA
CAGTAGCAACTCTCTATTGTGTACATGAAGGGTAGAGGTACGAGACACCAAGGAAGCCTTAGACAGGATAGAGGAAGAA
CAAAACAAATTTCAGCAAAATAACAGCAAAACACAGCAAGCGGCTGACGGAAAGGTCAAGTCAAAATTTATCCTATAGT
GCAGATCTCCAGGGCAATGGTACACCAAGAACTATCACCTAGAACTTTGAATGCATGGGTAAAGTAATAGAAGAAA
AAGCTTTAGCCAGAGGTAATACCCATGTTTACAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCCAAGATTAAACACCATGTTAAA
TACAGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAATGTTAAAGATACTATCAATGAGGAGGCTGCAGAAATGGGATAGATTAC
ATCCAGTGATGCAGGGCTATTGCACCAGGCCAAATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGATATAGCAGGAACCTACTAGTACCC
TCCAAGAACAGATAGCATGGATGACAAAGTAATCCCCCTATTCCAGTGGGAGACATCTATAAAGATGGATAATCTGGGGT
TAAATAAATAGTAAGAAATGTATAGCCCTGTACGCAATTTGGACATAAACAAGGCCAAAGGAACCTTTAGAGACTATG
TAGACCGGTTCTTCAAAACITTAAGAGCTGAACAGGCTACACAAGAAAGTAAAAAATTTGATGACAGACACCTTGTGTGTC
AAAATGCAAAACCCAGATTGCAAGACCATTTTAAAGCATTAGGACCAGGGGCTACATTAGAAAGAAATGATGACAGCATGTC
AAGGAGTGGGAGGACCTAGCCACAAAGCAAGAGTGTGGCTGAGGCAATGAGCCAAACAAATAGTGTAAACATACTGATG
CAGAAAAGCAATTTTAAAGGAAATAAAGAAATGGTTAAATGTTTTAACTGTGGTAAAGGAAGGGCACATAGCCAGAAATTGC
AGGGCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGAAGGAGGACACCAAAATGAAAGACTGTACTGAGAGGCAGGCTAA
TTTTTAGGGAAAATTTGGCCTTCCACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAACAGGCCAGGCCAACAGCCACC
AGCAGAGAGCTTCAGGTTTCGAGGAGACAAACCCCGCTCCGAAAGCAGGAGTGAAGACAGGGGAAGCCTTAACCTCCCTCAA
ATCACTCTTTGGCAGCGACCCCTTGTCTCAATAA (SEC ID N°: 5)

FIG. 27

Secuencia de ADN de Gag. Czm de codón optimizado:

ATGGGAGCCAGAGCCAGCATCTGAGAGGAGGGCAAACTGGACAAAGTGGGAGAAAGATTAGACTGCGG
 CCTGGAGGCAAGAAACGGTACATGATCAAGCACCTGGTGTGGGCCAGAGAGCTGGAGCGGTTCG
 CACTGAATCCTGGCCTCTGGAGACAGGAGGATGCAAAACAGATCATGAAGAGCTCCAAACCAGC
 TCTGAGACCCGGCACTGAGGAACTGAGAAACCTGTACAACACCGTGGCCACCCTGTACTGCGTGCAC
 GAGGCGTGGAAAGTGGGGACACCAAGGAGGCCCTGGACCGGATCGAGGAAGAGCAGAAACAAGATC
 CAGCAAAAGATCCAGCAAGAGACCAACAGGCCGCTGTGGAAAGGTGAGCCAGAACTACCCCATC
 GTCCAGAACCTCCAGGGCCAGATGGTGCACCAAGCTGAGCCCTGGACACTGAACGCTGGGTCA
 AGGTGATCGAAGAGAAAGGCTTCAGCCCTGAAGTGATCCCATGTTTACAGCTCTGAGCGAAGGCGC
 CACTCTCAGGACCTGAACACCATGCTGAACACCGTGGGAGGCCAACAAAGCTGCAATGCAGATGCTG
 AAGGACACCATCAACGAGGAAGCTGCCGAGTGGGACAGACTGCATCCAGTCCACGCCGGACCCATCG
 CTCCTGGCCAGATGCGGGAAACCTAGAGGAAGCGATATCGCTGGCACTACCTCCACCCTGCAAGAGCA
 GATCGCTTGGATGACCAAGCAACCCCTATCCCCGTGGCGACATCTACAAGCGGTGGATCATCTCTGG
 GCCTGAACAAGATCGTGAGAAATGTACAGCCCGTGAGCATCTCTGGACATCAAGCAAGGACCTAAGGA
 GCCCTTCAGAGACTACGTGACCGGTTCCTTAAGACTCTGAGAGCCGAGCAGGCAACCCAGGAGGTG
 AAGAACTGGATGACCGACACACTGTGTGTCAGAACGCCAACCCCGACTGCAAGACCATCTCTGAAGG
 CTCTGGGACCCGGGCCACACTGGAAGAGATGATGACAGCATGCCAGGGCGTCGGAGGCCAAGCCA
 CAAAGCAAGAGTGTGCGGAGGCCATGAGCCAGACCAACAGCGTGAATATCTGTATGCAGAAAGAGC
 AACTTCAAAGGCAACAAGCGGATGGTCAAGTGCTTCAACTGTGGCAAGGAAAGGACACATGGCACGGA
 ACTGCAGAGCTCCACGGAAAGAAAGGCTGTGGAAAGTGGGCAAGGAAAGGACACCAAGTGAAGGACT
 GCACAGCGGCAAGCAAACTTCTCGGAAAGATCTGGCCAAAGCCAAAGGGAAGACCCGGCAATTT
 CCTGCAGAACAGACCTGAGCCCAACCCGCCACCTGCTGAGAGCTTCGGTTTCGAAGAGACCCACCCC
 GCCCCAAGCAGGAGCAAGGACAGAGAAAGCACTGACCAAGCTGAAGAGCCTGAAGAGCCTGTTTCGGCAGCGAT
 CCCCTGAGCCAGTGA (SEC ID N°: 6)

FIG. 28

Secuencia de ADN de gp120. Bal natural:

TTGTGGGTACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAAGAAGCAACCAACCCTCTATTTTTGTGTCATCAGATGCTA
AAGCATATGATACAGAGGTACATAATGTTTGGGCCACACATGCCTGTGTACCCACAGACCCCAACCCACAAAGAAAG
TAGAATTGGAAAATGTGACAGAAAAATTTTAAACATGTGGAAAAATAACATGGTAGAACAGATGCATGAGGATATA
ATCAGTTTATGGGATCAAGCCCTAAAGCCATGTGTAAATTAACCTCCACTCTGTGTACTTTAAATTGCACGTGATT
GAGGAATGCTACTAATGGGAATGACACTAATACCACTAGTAGCAGGGAATGATGGGGGAGGAGAAATGA
AAAAATTGCTCTTTCAAAATCACCACAAAACATAAGAGGTAAGGTGCAGAAAAAATATGCACCTTTTATGAACTTG
ATATAGTACCAATAGATAATAATAGTAATAATAGATATAGTTGTGATAAGTTGTAAACCTCAGTCATTACACAGG
CCTGTCCAAAGATATCCTTTGAGCCAAATCCCATACATTTATTGTGCCCCGGCTGGTTTGGGATTCTAAAGTGTA
GATAAGAAATTCAATGGAAAGGACCATGTTCAATATGTCAGCACAGTACAAATGTACACATGGGATTAGGCCAGTA
GTATCAACTCAACTGCTGTAAATGGCAGTCTAGCAGAAAGAGGTAGTAATTAGATCCGAAAAATTTCCGGGAC
AATGCTAAAACCAATAATAGTACAGCTGAATGAATCTGTAGAAATTAATTGTACAAGACCCCAACAACAATACAAGA
AAAAGTATACATATAGGACCGCAGCAGCATTATATACAACAGGAGAAATAATAGGAGATATAAGACAAGCACA
TTGTAAACCTTAGTAGAGCAAAATGGAAATGACACTTTAAATAAGATAGTTATAAAATTAAAGAGAACAAATTTGGGAA
TAAACAAATAGTCTTTAAGCATTCCTCAGGAGGGACCCAGAAATTTGACGCACAGTTTAAATTGTGGAGGGGA
ATTTTCTACTGTAAATCAACACAACTGTTTAAATAGTACTTGGAAATGTTACTGAAGAGTCAAAATAACACTGTAGAA
AATAACAAATCACACTCCCATGCAGAAATAAAACAAATTAATAACATGTGGCAGAAAAGTAGGAAGAGCAATGTA
TGCCCTCCCATCAGAGGACAAATTAGATGTTTCATCAAAATTACAGGGCTGCTATTAAACAAGAGATGGTGGTCCA
GAGGCAAAACAAAGACCGAGGTCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAAATTGGAGAAAGTGAATTATATA
ATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCAATTAGGAGTAGCACCCCAACCAAGGCAAGAGAGTGGTGGAGTAA (SEC
ID N°: 7)

FIG. 29

Secuencia de ADN de gp120.Bal de codón optimizado:

CTGTGGGTGACCGTGTACTACGGCGTGCCCGTGTGGAAGGAGGCCACCACCAACCTGTGTTCTGGCCAGCGACCGCAAGGCCTACGA
CACCGAGGTGCACAACGTGTGGGCCACCCACGCCTGGTGCCCAACCGACCCCAACCCCAAGGAGGTGGAAGCTGAAGAAACGTGACC
GAGAACTTCAACATGTGAAGAACAACATGGTGAGCAGATGCACGAGGACATCATCAGCCTGTGGACCAAGAGCCTGAAGCCCT
GCGTGAAGCTGACCCCTGTGTGCGTGACCTGAACTGCACCGACCTGGCAACGCAACCAACCGCAACCGCAACCAACCACTAGT
AGCAGCCGCGGCATGGTGGGCGGCGGAGATGAAGAACTGCAGCTTCAACATCAACCAACATCCGCGGCAAGGTGCAGAAAGG
AGTACGCCCTGTTCTACAAAGCTGGACATGCCCCCAATCGACAACAACAGCAACAACCGCTACCGCTGATCAGCTGCAACACCAAGC
GTGATCACCCAGGCCTGCCCCAAGGTGAGCTTCGAGCCCATCCCCATCCACTACTGGCCCCCGCGCTTCGCCATCCTGAAAGTGC
AAGGACAAGAAAGTTCAACGGCAAGGGCCCTGCACCAACGTGAGCAACCGTGCAACCCACGGCATCCGCCCGTGGTGAGCA
CCCAGCTGCTGTGAACGGCAGCCTGGCCGAGGAGGAGGTGGTATCCGCAAGCCCAACCTTCGCCGACAACGCCAAGGTGATCAT
CGTGCAAGCTGAACGAGAGCGTGGAGATCAACTGCACCCGCCCCAACAAACAACCCGCAAGTCCATCCACATCGGCCCGGCGGC
GCCTTCTACACCAACCGCGAGATCATCGCGACATCCGCCAGGCCCACTGCAACCTGAGCGCGCCAAGTGGACGACACCCCTGAA
CAAGATCGTGATCAAGCTGCGGAGCAGTTTCGGCAACAAGACCATCGTGTCAAGCACAGCAGCGCGGCAACCCGAGATCGTG
ACCCACAGCTTCAAATTGCGGCGGCGAGTTTCTACTGCAACAGCAACCCAGCTGTTCAACAGCACCCTGGAACTGTGACCGGAGAG
CAACAACACCGTGGAGAACACCATCAACCTGCGCTGCCGATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGGAGGTGGGCCGCGCC
ATGTACGCCCCCCCCATCCGCGGCCAGATCCGCTGCAGTTTCGAACATCAACCGCCTGCTGCTGACCCGCAACCGGCGGCGGAGGA
CAACAAGACCGAGGTGTTCCGCCCGCGGCGGCGGAGACATGCGCGACAACTGGCGCAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAG
ATCGAGCCCCCTGGGCGTGGCCCCCAACAAAGGCCAAGCGCGCGTGGTGGAGTAA (SEC ID N°: 8)

FIG. 30

Secuencia de ADN de gp120.B natural:

TTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAAGAAAGCAACACCACTCTATTTTGTGCATCAGATGC
TAAAGCATATGATACAGAGGTACATAATGTTTGGGCCACACATGCCTGTGTACCCACAGACCCCGATCCACAAG
AAGTAGAATTGGAAATGTGACAGAAAATTTTAAACATGTGGAATAATAACATGGTAGAACAGATGCATGAGG
ATATAATTAGTTTATGGGATCAAGCCTAAAGCCTATGTGTAAATTAACCCCACTCTGTGTACTCTAAATTGC
ACCAATCTGAGGAATGATACTAATACCAAGGAATGCTACTAATACCAAGAGTAGTGAGACAAATGATGGAGG
AGGGAGAAATAAAAATTGCTCTTTCAATATCACCAAGCATAAGAGATAAGGTGCAAAAAGAAATTTGCACCT
TTTTATAAATCTTGATGTAGTACCAATAGAAAATGATACTACTAGCTATAGTTGATAAGTTGTAATACCTCAG
TCCTTACACAGGCTGCCCAAAGGTATCCTTTGAGCCAAATCCCATACATTTTGTGCCCGGTGGTTTGC
TTCTAAAGTGTAAAGATAAGAAAGTTCAATGGAAACAGGACCATGTACAAATGTCAGCACAGTACAAATGCACACA
TGGAAATTAAAGCCAGTAGTCAACTCAAATGCTGTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAAGAGGTAGTAATTAGG
TCCGCCAATCTCTCGGACAATGCTAAACCAATAATAGTACAGCTGAATGAATCTGTACAAATGAATTTGTACGAG
ACCCAACAACAAATACAAGAAAAGTATACATATAGGACCAAGCAGAGCATTTTATACAACAGGAGAAATAAT
AGGAGATATAAGACAAGCACATTTGTAACCTTAGTAGAACAAATGGAATGAACTTTAAAAAGGATAGTTATA
AAATTAAGAGAGCAATATGAGAAATAAACAATAGTCTTTAATCAATCCTCAGGAGGGACCCAGAAATTGTAA
TGCTCAGCTTTAATTGTGGAGGGGAATTTTCTACTGTAAATTCACAAACAACTGTTTAATAGTACTTGGAAATGGTA
CTGAGTCAATAACACAGGAGATGACCCCAATCGTACTCCCATGCAGAAATAAAACAAGTTATAAACATGTGGCA
AGAAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCCCTCCCATCAGAGGACAAATTAGATGCTCATCAAAATATTACAGGACTG
CTATTAAACAAGAGATGGTAAACAGTAACGAGACCAATACCAAGGAGATCTTCAGACCTGGGGGAGGAAATA
TGAAAGGACAAATTGGAGAAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAGAAATTGAACCATTAGGAATAGCACCCAC
CAGGGCAAAAGAGAGTGGTGGAGTAA (SEC ID N°: 9)

FIG. 31

Secuencia de ADN de gp120.B de codón optimizado:

CTGTGGGTGACCGTCTACTATGGGGTGCCCTGTGTGGAAAGGAGGCCAACACCACTCTGTCTGCGCTTCTGACGCTAAGGCCTACGAT
 ACOGAGGTGCACAAATGTGTGGGCCACCCACGCCCTGTGTGCCACCCGACCCCTCAGGAGGTGGAGCTGGAGAACTGGACCGA
 AAATTCAACATGTGGAAGAAATAACATGGTGGAGCAGATGCATGAGGATATCATTAAGCCTGTGGGACCAAGCCTAAAGCCCTGCC
 TGAAGCTGACCCCTGTGTGACTCTGAACTGCACCAACCTGAGGAATGATACTAACACCAAGGAAACGCCACTAATACGACCA
 GCAGCGAGACCATGATGGAGGGCGAGATCAAGAACTGCTTTTCAACATCACACGAGCATCAGAGACAAGGTGCAGAAAGGA
 GTTTGCCCTTTTCTATAAACTTGATGTGTGCCTATOGAGAAATGACACTACTAGCTACAGGCTGATCAGCTGCAACACCAAGCGTCTG
 ACACAGGCCCTGCCCAAGGTGTCTTTCGAGCCAAATGCCATCCACTTTTGTGCCCCGGCTGGTTTCGCCATTCTAAAGTGCAAGGATA
 AGAAGTTCAACGGCACCGGTCTTGTACCAATGTCAAGCACCGTACAATGCACCCACGGCATTAAAGCCCGTGGTGAGCACTCAGCTGC
 TGCTGAAACGGCAGCCTGGCCGAGGAAGAGGTGGTGATTCGCTCCGCCAACCTCTCTGACAAATGCTAAGACCATATATCGTGCAGCTGA
 ACGAGTCTGTGCAGATGAATGCACGAGGCCCAACAACAATACCAAGGAAGATATCCATATCGTCCCGCAGGGCATTTCTATACC
 ACCGGCGAGATCATCGCGGACATCAGGCAGGCCCACTGTAACTTACAGGACAAGTGGAACGAGACTCTGAAGAGATCGTGAT
 CAAGCTGAGGGAGCAGTACGAGAACAAAGACCATCGTCTTTAATCAATCCAGCGCGGGGACCCCTGAGATTGTGATGCTGAGCTTCA
 ACTGCGGTGGGAGTTCTTCTACTGTAACTCAACCAAGCTGTTAATAGCACTTGGAAACGGCACCTGAGTCTAACAAACCCGGTGATG
 ACCCATCGTGTGCCATGCAGGATCAAGCAGGTGATCAACATGTGGCAGGAAGTGGCAAGGGCCATGTATGCCCTCCCATCAGG
 GGTCAGATTAGGTGCAGCAGCAATATTACCGGCTGCTACTGACCCGCGACGGCGGTAAACGCAACGAGACCAACCAACCGGAGAT
 CTTCAGGCCCTGGGGCGGCAACATGAAGGACAAATTGGAGGAGCGAGTTATACAAATATAAGGTGTGAGGATTGAGCCCTCTGGGTA
 TCGCCCCCAACAGGGCCAAAGAGGAGGGTGTGCAGTAA (SEC ID N°: 10)

FIG. 32

Secuencia de ADN de gp120. Czm natural:

TTGTGGGTCAAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAAGAAAGCAAAAATACTACTCTATTCTGTGCATCAGATGCTA
AATCATATGAGAAAGAAAGTGTCATAATGTCTGGGCTACACATGCCTGTGTACCCACAGACCCCAACCCACAAGAAA
TAGTTTGGGAAATGTAACAGAAAAATTTAAACATGTGGAAAAATGACATGGTGATCAGATGCATGAGGATATAA
TCAGTTTATGGGATCAAGGCCTAAAGCCATGTGTAAAGTTGACCCCACTCTGTGTCACTTTAAATTTGTACAGAGGT
TAAATGTTACAGAAATGTTAATAATAGCGTGGTTAAATAACCAAAATGTTAATAATAGCATGAATGGAGACAT
GAAAAATTGCTCTTTCAACATAACCCACAGAACTAAAAGATAAGAAAAAGAAATGTGTATGCACCTTTTATAAACTT
GATATAGTATCACTTAATGAGACTGACGACTCTGAGACTCTGCAACTCTAGTAAATATTATAGATTAAATAAATTGTA
ATACCTCAGCCCTAACACAAAGCCTGTCCAAAGGTCTCTTTTGACCCCAATTCCTATACATTTATTGTGCTCCAGCTGGT
TATGCGATTCTAAAGTGAATAATAAGACATTCAATGGGACAGGACCAATGCCATAATGTCAGCACAGTACAATGT
ACACATGGAAATTAAAGCCAGTGGTATCAACTCAACTACTGTTTAAATGGTAGCCTAGCAGAAAGAAAGGATAATAAT
AGATCTGAAAAATCTGACAAACAATGTCAAAACAATAATAGTACATCTTAATAGATCTATAGAAATTTGTGTGTA
AGACCCAAACAATAATACAAAGACAAAGTATAAGAAATAGGACCAAGGACAAAAACAATTCATGCAACAGGAGACATAAT
AGGAGACATAAGACAAAGCACATTGTAAACATTAGTAGGACTAAGCTGGACTAAGACTTTACGAGAGGTAAAGGAACA
AATTAAAGAGAACACTTCCCTAATAAAACATAACATTTAAACCACTCCTCAGGAGGGGACCTAGAAATTACAAACAC
ATAGCTTTAATTGTAGAGGAGAAATTTTCTATTGCAATACATCGGGCCTGTTTAGTATAAATTATACAGAAAAATAA
TACAGATGGTACACCCATCACACTCCCATGCAGAAATAAGACAAATTTATAAATATGTGGCAGGAAAGTAGGACGAGC
AATGTACGCCCTCCCATTTGAAGGAAACATAGCATGTAATCAGATATCAGAGGCTACTATTGGTTCGGGATGG
AGGAAGCACAAATGATAGCAAAATAATAACAGAGATAATTCAGACCTGCAGGAGGAGATATGAGGGACAATT
GGAGGAGTGAATTGTATAAGTATAAAGTGGTAGAAATTAAGCCATTGGGAATAGCAACCACTGAGGGCAAAAAGG
AGAGTGGTGGAGTAA (SEC ID N°: 11)

FIG. 33

TGGGGCAA CCTGTGGGTGACCGGTGTA CTACGGCGTGCCCGTGTGGAAGGAGGCCAAGAACCCCTGTTCTTCGCGCCAGCG
ACGCCAAGAGCTACGAGAAGGAGGTGCACAACGTGTGGGCCACCAAGCTGCGTGCCCAACCGAACCCCAACCCCCAGGA
GATGCTGTGGGCAACGTGACCGAGAACTTCAAACATGT'GGAAGAA CGACATGTTGGACCA GATGCACGAGGACATCATC
AGCCTGTGGGACCA GAGCCTGAAGCCCTGGGTGAAGCTGACCCCTGTGCGTGAACCTGAACTGCAACCGAGGTGAACGT
GACCCGCAACGTGAACAACAACGCTGGTGAACAACACCAACCAACGTGAACAACAGCATGAACGGCGACA TGAAGAACA CTG
CAGCTTCAA CATCAACCAACGAGCTGAAGGACAA GAAGAAGAACTGTACGCGCTGTTCTACAAGCTGGACA TCGTGTAGC
CTGAA CGAGA CCGACGACGCGAGACGGCAACA GCAGCAAGTACTACCGCCTGATCAACTGCAACACCGAGCCCTGA
CCCAGCCTGCCCCAAGGTGAGCTTTCGACCCCCATCCCCATCCACTACTGCGCCCCCGCGGTACGCCATCTCTGAAAGTGC
AACAA CAAGA CCTTCAACGGCAACGGCCCCCTGCCAACAGTGAACACCGTGCAGTCCACCGCATCAAGCCCCGTGG
TGAGCAACCCAGCTGCTGTAACGGCAGCCTGGCCGAGGAGGCATCATCTATCGCAGCGAGAACCTGTGACCAACAACGCT
GAAGACCATCATCTGTGCACCTGAACCGCAGCATCGAGATCGTGTGCGTGCGCCCCAACAA CAACACCCGCCACAGCATC
CGCATCGGCCCGGCCAGACCTTCTACGCCACGGCGACATCATCGGGGACATCCGCCAGGCCCACTGCAACATCAGCCG
CACCAA CTGGA CCAAGACCTTCTGCGGAGGTGGCAACAA GCTGCGGAGCACTTCCCCAACAA GAACAATCACTTCAAG
CCCCAGACGGCGGCACTGGAGATCACCAACCAACAGTTCAACTGCGCGGCGAGTTCTTCTACTGCAACACCCAGCGG
CCTGTTACGATCAACTACCGAGAA CAACACCGACGGCAACCCCATCAACCTGCGCTGCCGATCCGCCAGATCATCA
ACATGTGGCAGGAGTGGCGCGGCCATGTACGCCCCCCCATCGAGGGCAACATCGCCTGCAAGAGCGACATCAACCGG
CCTGTGCTGTGCGCAGCGCGGACGACCAACAGCAGCAACCAACAACCAACCGAGATCTTCGCGCCCGCGCGGCGG
GACATGCGCGACAACCTGGCGCAGCAGCTGTACAAGTACAAGTGTGTGGAGATCAAGCCCCCTGGGCATCGCCCCCAACCG
AGGCCAAGCGCCCGCTGTGTGGAGCGCGAGAAGCGCTGA (SEC ID NO: 12)

Secuencia de ADN de gp120.E natural

TTGTGGGTACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAAGATGCAGATACCACCCTATTTTGTGCAATCAGATGCCAA
AGCAGATGAGACAGAAAGTGACAAATGTCTGGGCCACACATGCCTGTGTACCCACAGACCCCAACCCACAGAAATA
CACTGGAAAATGTAAACAGAAAATTTAACATGTGGAATAAATGATGAGCAGATGCAGGGATGTAATC
AGTTATGGGATCAAAGTCTAAAGCCATGTGTAAAGTTAACTCCTCTCTGCGTTACTTTGACTTGACCAATGCTACT
CTGAAATTGTACCAATTTGACCAATGGCAATAAGACAACTAATGTCTCTAACATAATAGGAAATCTAACAGATGAAG
TAAGAACTGTCTTTTCATATGACCACAGAACTAAGAGATAAGAACAGAAAGGTCTATGCACCTTTTATTAAGCTT
GATATAGTACAAAATTAATAGTAGTGAGTATAGGTATAAATAATGTAACTTCAGTCATTAAGCAGGCTTGTCCAAA
GATATCCTTTGATCCAAATTCCTATACATTATTGTACTCCAGCTGGTTATGCGAITTTAAAGTGTAAATGATAAGAAATTT
CAATGGGACAGGGCCATGTAAAATGTCAAGCTCAGTACATGCACACATGGAAATTAAGCCAGTGGTATCAACTCAA
TTGCTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAAGAGATAATAATCAGCTCTGAAAATCTCACAAACAATGCCAAAACCA
TAATAGTGCACCTTAATAAATCTGTAGAAATCAGTTGTACCAGACCTCCACCAATACAAGAACAAAGTATACGTAT
AGGACCGGACAAAGTATCTATAGAACAGGAGACATAACAGGAGATATAAGAAAAGCATATTGTGAGATTAAATGA
AACAAAATGGAAATGAAGCTTTAAACAGGTAGCTGGGAAATTAAGAAACAATTTAATAGACAATAATCTTTCAA
CCACCTCAGGAGGAGATCTAGAAATTAACAATGCATCAATTTAATTGTAGAGGGGAAATTTTCTATTGGGATACAAC
ACAACTGTTAATAGAACTTGGGAGAAAATGAACAGAGAGGGGCGTAATATCACACTTCCATGCAAGATAAA
GCAAAATGTAAACATGTGGCAGGGAGCAGGCAAGCAATGTATGCTCCTCCCATCAGTGGAAATAATTAAGTGTGA
TCAAAATTACAGGAATACTATTGACAAAGAGATGGTGGTCTAATAATTCGGCTAGTGAGACCTTCAGACCTGGAG
GAGGAAATATAAGGACAAATGGAGAAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTACAAATTGAACCACTAGGAATAG
CACCCACCGGCAAGAGAAAGATGGTGAGTAA (SEC ID N°: 13)

FIG. 35

Secuencia de ADN de gp120.E de codón optimizado:

CTGTGGGTGACCGTGTACTACGGGTGCCCGTGTGGAAGGACGCCGACACCAACCTGTCTTGCCACGCGAGCCAAAGG
 CCCACGAGACCGAGGTGCACAACGTGTGGGCCACCAACGCTGCGTGGCCACCGACCCCAACCCCAAGGAGATCCACCT
 GGAGAACGTGACCGAGAACTTCAACATGTGGAAAGAACAGATGGTGGAGCAGATGCGAGGAGGACGTGATCAGCCCTGT
 GGGACAGAGCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACCCCTGTGCGTGAACCTGACCTGACCTGACCAACCGCCACCTGAACTG
 CACCAACCTGACCAACGGCAACAAGACCAACGTGAGCAACATCATGGCAACCTGACCGACGAGGTGCGCAACTG
 CAGCTTCCACATGACCAACCGAGCTGCGGACAAAGAGCAAGGTGTACGCCCTGTTCTACAAGCTGGACATCGTGACG
 ATCAACAGCAGCGAGTACCGCTGATCAACTGCAACACCAACGCTGATCAAGCAGGCCCTGCCCAAGATCAGCTTCGAC
 CCATCCCCATCCACTACTGCAACCCCTGTGGTACGCCATCCTGAAGTGCAACGACAAAGAACTTCAACCGGACCCGGACC
 CTGCAAGAACGTGAGCAGCGTGCAACCCACCGGCATCAAGCCCTGGTGAGCAACCCAGCTGCTGCTGAACCGGCAG
 CCTGGCCGAGGAGGAGTCAATCATCAGCAGCGAGAACCTGACCAACAAACGCCAAAGACCATCATCGTGCACCTGAACAA
 GAGCGTGAGATCAGCTGCACTCGCCCCAGCAACCAACACCCGACCCAGCATCCGCATCGGACCTGGCCAGGCTGTCTAC
 CGCACCGGCGACATCACCGGCGACATCCGCAAGGCCCTACTGCGAGATCAACGAGACCAAGTGGAACGAGGCCCTGAAG
 CAGGTGGCCGGCAAGCTGAAGGACATTCACAAAGACCATCATCTCCAGCCTCCCAAGGGAGGGGACCTGGAGATC
 ACCATGCACCACTTCAACTGCAGAGGCGAGTTCTTCTACTGCGACACCAACCCAGCTGTTCACCCGACCTGGGGGAGA
 ACGAGACCGCGGAGGCAAGAAATCAACCTGCCCTGCAAGATCAAGCAGATCGTGAACATGTGGCAGGGAGCTGGCC
 AGGCCATGTACGCCCAACCCATCAGGGCATCATCAAGTGTGAGCAACATCACCGGCATCCTGCTGACCCGCGACGG
 CGGTGCCAAACAACGCGCCAGCGAGACCTTCAGGCCAGGCGGTGGCAACATCAAGGACAACTGGCGCAGCGAGCTGTA
 CAAGTACAAAGGTGTGAGATCGAGGCCCTGGGCAATCGCCCCCACTCGCGGCCAAGCGCCCGCTGGTGGAGTAA (SEC ID
 N°: 14)

FIG. 36

Secuencia de ADN de gr120.A natural:

TTGTGGGTCAAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAAGATGCAGAGACTACCTTATTTTGTGCATCAGA
TGCAGAAAGCATATGATACAGAAAGTGCAATAATGTCTGGGCTACGCATGCCTGTGTACCTACAGACCCCAAC
CCACAAGAAATATATATGGAAATGTGACAGAAAGAGTTTAAACATGTGGAAAAATAACATGGTAGAGCAG
ATGCATACAGATATAATCAGTCTATGGGACCAAGCCTAAACCATGTGTACAGTTAACCCCTCTCTGGGT
TACTTTAGATTGTAGCTATAACATCACCAATAATATCACCAATAGCATCACCAATAGCTCAGTTAACATGA
GAGAAGAAATAAAAACTGCTCTTTCAATATGACCAAGAAATTAAGGGATAAGAAATCGGAAGGTATATT
CACTTTTATAAACTTGTAGTACAAATTAAATAATGTGTAATAACAGTAGTAATCTGTATAGATTAAATA
AATTGTAATACCTCAGCCCTTACACAGGCTTGCCAAAGGTAAACCTTTGAGCCAAATCCCATACGTTATTG
TGCCCCAGCTGGTTATGCGATTCTAAATGTAATGATAAGGAGTTCAATGGAAACAGGGCTATGCCAAAAAT
GTCAGCACAGTGCATGCACACATGGAATCAGGCCAGTAGTATCAACTCAACTGCTGTTAAATGGCAGTT
TAGCAGAAAGGAAAGGTAATGATTAGATCTGAAATATCACAAACAATGTCAAAAACATAATAGTACAAAC
TTAACGAGACTGTAAACAATTAAATTGTACCAGACCTAACAAATACAAAGAAAAAGTGTACGTATAGGACC
AGGACAAAACATTCTATGCAACAGGTGATATAATAGGGGATATAAGACAAAGCACATTGTAATGTCAGTGG
GTCACAATGGAATAGAGCTTTACACAGGTAGTTGGACAAATTAAGAGAACTACTGGAACACAAACAATATC
TTTAAAAACTCCTCAGGAGGGGATTTAGAAATTACAAACATAGTTTTTAATTGTGGAGGAGAAATTTTCTA
TTGTAATACATCAGGCCTGTTTAATAGTAATTGGACACATAATGACACTGCCAGCATGAAACCAAATGAC
ACTATAACACTCCCATGACAGAAATAAGCAAATTATAAATATGTGGCAGAGAGTAGGACAAAGCAATATAT
GCCCCCTCCCATTCAGGAGTAAATAAGGTGTGAATCAAAACATTACAGGACTAATATTAAACAAAGAGATGGTG
GGGGTAAACATCAATGAAAGTCAAAATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAAATTGGAGAAAGTG
AATTATATAAGTATAAGGTAGTAAGAAATTGAACCACTAGGAGTAGCACCCCAAGGCAAGAGAGAAAGAG
TGGTGGAGTAA (SEC ID N°: 15)

FIG. 37

Secuencia de ADN de gp120.A de codón optimizado:

CTGTGGGTGACCGTGTACTACGGCGTGCCTGTGTGAAGGACCGGAGACCACCTGTTCTGGCCACGGACGCAAGGCC
TACGACACCGAGGTGCACAACGTGTGGGCCACCCACGCTGCGTGCCACCGACCCCAACCCCGAGGAGATCTACATGGAG
AACGTGACCGAGGAGTTCAACATGTGGAGAAACAACATGGTGGAGCAGATGCACACCGACATCATCAGCCTGTGGGACCA
GAGCCTGAAGCCCTGCGTGCACTGACCCCTGTGCGTGACCTGGACTGCAGCTACAACATCAACAAACATCACCAAC
AGCATCAACCAACAGCAGCGTGAAATGCGCGAGGAGATCAAGAACTGCAGCTTCAACATGACACCGAGCTGCGCGACAA
GAACCGCAAGGTGTACAGCTGTTCTACAAGCTGGACGTGTGTCAGATCAACAAACGGAACAAACGAGCAACCTGTACCG
CCTGATCAACTGCAACACACCGCGCCTGACCCAGCCTGCCCCAAAGGTGACCTTCGAGCCCCATCCCCATCCGCTACTGGCC
CCGCGGCTACGCCATCCTGAAGTGCACGACAGGAGTTCAAACGCAACCGCCTGTGCAAGAACGTGAGCACCGTGCAG
TGCAACCAACGGCATCCGCCCCGTGGTGAACGACAGGAGTCTGAAACGGCAGCTGACCGGACCGTGACCATCACTGCAACCCGCCAAC
AGCGAGAAACATCAACCAACAAACGTGAAGAACATCATCGTGCAGCTGAACGGCAGCTGACCGGACCGGACATCATCGGCCAG
AACAAACCCGCAAGAGCGTGCATCGGCCCGGCCAGACCTTCTACGCCACCGGACATCATCGGCCAGCTGCGGAGTACTGGAACACC
GCCACTGCAACGTGAGCGGCAGCCAGTGGAAACCGGCCCTGCACCCAGTGGTGGGCCAGCTGCAACTGCGGCGGAGTCTTCTACT
ACCATCATCTTCAAGAACAGCAGCGGCGGCGAACCTGGAGATCACCAACCAAGCTTCAACTGCGGCGGAGTCTTCTACT
GCAACACCAAGCGCTGTTCACAGCAACTGGACCCACAAACGACACCGCCAGCCATGAAAGCCCAACGACATCAACCTGC
CCTGCCGATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGCGCGTGGGCCAGGCCATCTACGCCCTCCCATCCAGGGCGGTGATCCG
CTGCGAGAGCAACATCACCGCCTGATCCTGACCCGCGACGGCGGGGCAACATCAACGAGAGCCAGATCTTCCGCCCCGG
CGGCGCGGACATGGCGACAACTGGCGCAGCGAGCTGTACAAGTACAAGTGTGCGCATCGAGCCCCCTGGGCGTGGCCCC
CACCAAGGCCAAGCGCCGCGTGGTGGAGTAA (SEC ID N°: 16)

FIG. 38