



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 354 830**

51 Int. Cl.:

C12N 7/01 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06727538 .8**

96 Fecha de presentación : **24.02.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1877549**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2008**

54 Título: **Vacuna de VIH.**

30 Prioridad: **15.04.2005 US 107364**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.03.2011

73 Titular/es: **The University of Western Ontario
2-1151 Richmond Street
London, Ontario N6A 5B8, CA**

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

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 354 830 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna de VIH.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a una vacuna novedosa para uso en la prevención y/o el tratamiento del SIDA. Más particularmente, la invención se refiere a la producción del virus del SIDA en grandes cantidades para la formulación de una vacuna de VIH/SIDA que es no citolítica y avirulenta.

10 **Antecedentes de la invención**

A pesar de los recientes avances en la terapia antivírica, no hay una cura permanente para el SIDA o la infección por VIH. La terapia farmacológica es un escenario prometedor de investigación en términos de proporcionar una terapia eficaz, sin embargo, debido a los efectos secundarios, cumplimiento y gastos, la progresión no ha sido rápida. Agravando estas dificultades está el hecho de que la disponibilidad de dichos fármacos es limitada en los países en desarrollo, donde se estima que ocurrirán la gran mayoría de infecciones por VIH.

Debido al éxito que han tenido las vacunas de enfermedades infecciosas, siendo el más notable contra la viruela y la polio, continúa la búsqueda de una vacuna eficaz contra el SIDA. Se han intentado una variedad de enfoques. Es más, la mayoría del desarrollo de vacuna de VIH-1 se ha concentrado en vacunas de subunidades. La dificultad con el enfoque de vacuna de subunidades ha sido la capacidad de producir una inmunidad óptima. Actualmente, no es conocido exactamente cuáles componentes del antígeno o antígenos de VIH y del sistema inmunitario son necesarios para protección de la infección natural.

La vía preferida para el desarrollo de vacunas en general es usar virus enteros, inactivados o atenuados, tales como la vacuna del virus de la polio inactivado, o vacunas de virus vivos atenuados, tales como la vacuna oral de la polio. Desgraciadamente, este enfoque puede ser problemático como se muestra por el "incidente Cutter", en el que una inactivación inadecuada de la vacuna de la polio dio como resultado la transmisión de polio clínica mediada por vacuna.

Los ensayos de vacuna anteriores han buscado inmunógenos basados en proteína de subunidades recombinante, tales como la glucoproteína 120 (gp120) de cubierta de VIH-1. La mayoría de resultados de este enfoque han sido decepcionantes, aunque pautas de inmunización que emplean tanto virus recombinantes vivos como proteína de subunidades han desencadenado en ciertos individuos tanto CTL CD8+ específicos de cubierta como neutralizantes de cubierta de VIH-1 (Cooney, E. L. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1882-86 (1993); McElrath, M. J. *et al. J. Infect. Dis.* 69: 41-47 (1994); Graham, B. S. *et al. J. Infect. Dis.* 166: 244-52 (1992) y Graham, B. S. *et al. J. Infect. Dis.* 167: 533-37 (1993)).

De forma interesante, se ha encontrado que la secuencia señal de gp120 de VIH-1, que se designa como NSS (secuencia señal natural), que está asociada con la extensión de la secreción de gp120. Se ha mostrado que la sustitución de NSS por secuencia señal de melitina de abeja melífera o de interleucina 3 de murina (IL-3), produce un alto nivel de producción y una secreción eficaz de gp120 (Li, Y. *et al. Virology* 204: 266-278 (1994) y Li, Y. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 9606-9611 (1996)). Sin embargo, no es conocido si la secuencia señal de gp120 de VIH-1 tiene un papel en la patogenicidad del virus. El documento WO 00/09703 da a conocer un retrovirus recombinante en el que la secuencia señal natural de la glucoproteína gp120 de cubierta de VIH-1 se ha reemplazado por la secuencia señal de melitina.

Con respecto a las vacunas de VIH, se ha mostrado que la delección del gen *nef* de VIH atenúa el virus. Desrosiers y sus asociados han demostrado que la vacunación de macacos *Rhesus* con VIS con delección de *nef* protegía de la exposición a VIS de tipo silvestre (Daniels, M. D. *et al. Science* 258:1938 (1992); Desrosiers, R. C. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6353 (1989)) y otros han demostrado que el gen *nef* es indispensable para la replicación de VIS y VIH (Daniels, M. D. *et al. Science* 258: 1938 (1992); Gibbs, J. S., *et al. AIDS Res. and Human Retroviruses* 10:343 (1994); Igarashi, T. *et al. J. Gen. Virol.* 78:985 (1997); Kestler III, H. W. *et al. Cell* 65:651 (1991)). Además, se ha encontrado que la delección del gen *nef* vuelve al virus no patógeno en un hospedador normalmente susceptible (Daniels, M. D. *et al. Science* 258:1938 (1992)). Sin embargo, no se ha encontrado que esta delección proporcione una forma del virus que pueda producirse en grandes cantidades.

En consecuencia, es necesaria una vacuna que sea avirulenta y que pueda producirse en grandes cantidades.

60 **Sumario de la invención**

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un lentivirus recombinante que tiene un péptido señal de glucoproteína gp120, en el que dicho péptido señal de glucoproteína 120 se selecciona del grupo constituido por las secuencias polipeptídicas enumeradas en las SEC ID N° 3-6.

65 El virus puede volverse avirulento mediante la delección de una cantidad suficiente del gen *nef*. El lentivirus recombinante puede un virus de inmunodeficiencia humana recombinante, tal como VIH-1.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una vacuna que comprende un lentivirus recombinante del primer aspecto. En ciertas realizaciones, la vacuna comprende adicionalmente un coadyuvante. La invención caracteriza también una vacuna del segundo aspecto para uso en la prevención o el tratamiento de una infección lentivírica en un paciente necesitado de ello.

Resultarán evidentes rasgos y ventajas adicionales de la presente invención a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 contiene fotografías de exámenes microscópicos con contraste de fase de células del insecto *S. frugiperda* (SF21) infectadas con baculovirus de tipo silvestre y recombinante. El *panel A* exhibe células infectadas con el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographica californica* (AcNPV) de tipo silvestre, en el que se observan células intactas; el *panel B* exhibe células infectadas con AcNPV recombinante que expresa la glucoproteína 120 de cubierta de virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) con su secuencia señal natural (vAc-gp120-NS), en el que se observa lisis celular; el *panel C* exhibe células infectadas con AcNPV recombinante que expresa gp120 de cubierta de VIH-1 sin su secuencia señal natural (vAc-gp120-ΔS), en el que se observan células intactas; el *panel D* exhibe células infectadas con AcNPV recombinante que expresa gp120 de cubierta de VIH-1 en el que la secuencia señal natural está reemplazada por una secuencia señal de melitina (vAc-gp120-MS), en el que se observan células intactas; el *panel E* exhibe células infectadas con AcNPV recombinante que expresa glucoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (vAc-VSV-G), en el que se observan células intactas; el *panel F* exhibe células infectadas con AcNPV recombinante que expresa glucoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) con la secuencia señal natural de la glucoproteína gp120 de VIH-1 adjunta (vAcVSV-G-NS), en el que se observa lisis celular.

La Figura 2 proporciona gráficas que ilustran los efectos de la secuencia señal de glucoproteína 120 (gp120) de cubierta de VIH-1 sobre la muerte celular. La Figura 2A exhibe el porcentaje de células permeabilizadas con azul de tripano (células muertas) después de expresar una glucoproteína recombinante (rgp120) o la proteína glucoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) con diferentes secuencias señal. La Figura 2B exhibe los resultados de un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) (kit de detección de citotoxicidad de Boehringer Mannheim). Se midieron las cantidades de LDH liberadas de células SF21 infectadas con virus recombinantes que expresan rgp120 o VSV-G con secuencias señal diferentes cuantificando el tinte de formazano formado en placas ELISA leídas a 490 nm.

La Figura 3 exhibe resultados de electroforesis en gel que proporcionan un análisis de la fragmentación del ADN de células del insecto *S. frugiperda* (SF21) infectadas con un virus de la poliedrosis nuclear de *Autographica californica* (AcNPV) que expresa glucoproteína 120 de cubierta de VIH-1 con diferentes secuencias señal. Se extrajo el ADN celular total (A) o el ADN de bajo peso molecular (B) a las 48 horas después de la infección y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en presencia de bromuro de etidio; carriles M: marcador de ADN; carriles WT: células infectadas con AcNPV; carriles ΔS: células infectadas con un AcNPV recombinante que expresa una glucoproteína 120 de cubierta de VIH-1 con su secuencia señal natural eliminada (vAc-gp120-ΔS); carril NS: células infectadas con un AcNPV recombinante que expresa una glucoproteína 120 de VIH-1 con su secuencia señal natural intacta (vAc-gp120-NS); carriles MS: exhiben células infectadas con un AcNPV recombinante que expresa una glucoproteína 120 de cubierta de VIH-1 con su secuencia señal natural reemplazada por una secuencia señal de melitina de abeja melífera (vAc-gp120-MS).

La Figura 4 exhibe resultados de electroforesis en gel de agarosa que proporcionan un análisis de la fragmentación de ADN de células del insecto *S. frugiperda* (SF21) infectadas con virus de la poliedrosis nuclear de *Autographica californica* (AcNPV) recombinante que expresan la glucoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) con o sin la secuencia señal natural de la glucoproteína 120 (gp120) de cubierta de VIH-1. Se extrajo el ADN celular total (A) o el ADN de bajo peso molecular (B) a las 48 horas después de la infección y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en presencia de bromuro de etidio; carriles M: marcador de ADN; carriles VSV-G: células infectadas con un AcNPV recombinante que expresa una glucoproteína G del virus de la estomatitis vesicular no modificada; carriles VSV-G-NS: células infectadas con un AcNPV recombinante que expresa una glucoproteína G del virus de la estomatitis vesicular, modificada para contener la secuencia señal natural de gp120 de cubierta de VIH-1 (vAcVSV-G-NS).

La Figura 5 exhibe la construcción de clones províricos de VIH-1 modificados genéticamente. Usando el provirus de clado B de VIH-1, pNL4-3, como vector basal, se prepararon tres formas modificadas genéticamente del virus. Estas incluyen pNL4-3^{nef-}, que contiene una delección orientada del gen *nef*, pNL4-3^{SSR}, en el que se ha reemplazado la secuencia señal de glucoproteína Env natural por la secuencia señal de melitina de abeja melífera y pNL4-3^{nef-/SSR}, que contiene una combinación de ambas mutaciones de delección de *nef* y de reemplazo de secuencia señal. El plásmido pNL4-3^{WT} representa el provirus original de tipo silvestre.

La Figura 6 exhibe una gráfica que muestra que una supervivencia celular prolongada conduce a un rendimiento vírico aumentado en células A3.01. Los virus de clado B de VIH-1 modificados genéticamente incluyen NL4-3^{nef-}, que contiene una delección orientada del gen *nef*, NL4-3^{SSR}, en el que se ha reemplazado la secuencia señal de glucoproteína Env natural por la secuencia señal de melitina de abeja melífera, NL4-3^{nef-/SSR}, que contiene una combinación de ambas

mutaciones de delección de *nef* y reemplazo de secuencia señal y NL4-3^{WT}, que representa el provirus original de tipo silvestre.

La Figura 7 exhibe la infectividad de mutantes de NL4-3 de VIH-1 en células A3.01 y H9 usando el ensayo MAG1. Los virus de clado B de VIH-1 modificados genéticamente incluyen NL4-3^{nef-}, que contiene una delección orientada del gen *nef*, NL4-3^{SSR}, en que se ha reemplazado la secuencia señal de glucoproteína Env natural por la secuencia señal de melitina de abeja melífera, NL4-3^{nef-/SSR}, que contiene una combinación de ambas mutaciones de delección de *nef* y reemplazo de secuencia señal y NL4-3^{WT}, que representa el provirus original de tipo silvestre.

La Figura 8 exhibe la inducción del efecto citopático (formación de sincitio) por VIH-1_{NL4-3} en células infectadas H9. Los virus de clado B de VIH-1 modificados genéticamente incluyen NL4-3^{nef-}, que contiene una delección orientada del gen *nef*, NL4-3^{SSR}, en que se ha reemplazado la secuencia señal de glucoproteína Env natural por la secuencia señal de melitina de abeja melífera, NL4-3^{nef-/SSR}, que contiene una combinación de ambas mutaciones de delección de *nef* y reemplazo de secuencia señal y NL4-3^{WT}, que representa el provirus original de tipo silvestre.

La Figura 9 exhibe la construcción de genes quiméricos *gag*-NE que portarán el gen *gag* de VIH con varias secuencias de codificación de V3 distintas con o sin epítomos neutralizantes conservados de los clados de VIH-1 mayoritarios. La Figura 9a consiste en el gen *gag* de VIH-2 con dominios V3 de VIH-1 de clados B, C y E, y la Figura 9b consiste en el gen *gag* de VIH-2 con dominios V3 de VIH-1 de clados A, D, F y G. En la Figura 9c, se han seleccionado los epítomos de gp120 que representan una región constante, C3, de los clados B, C y E, así como el epítomo neutralizante conservado (CNE) de gp41 representado por 6 aminoácidos (Muster, *et al.*, *J. Virol.* 67: 6642, 1993), para preparar anticuerpos neutralizantes que reaccionarán de forma cruzada con la mayoría de aislamientos de VIH-1.

La Figura 10 exhibe la construcción de un gen quimérico *gag*-TCE con múltiples epítomos de linfocitos T citotóxicos (TCE) de proteínas gp41, Nef, gp120, transcriptasa inversa (RT), Tat y Rev del clado B de VIH-1.

Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

Por conveniencia, se proporciona a continuación el significado de ciertos términos y frases empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Los artículos “un” y “una” se usan en la presente memoria para designar a uno o más de uno (concretamente, al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo.

El término “aminoácido” es conocido en la técnica. En general, las abreviaturas usadas en la presente memoria para designar los aminoácidos y los grupos protectores están basadas en las recomendaciones de la Comisión sobre nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB (véase *Biochemistry* (1972) 11:1726-1732). En ciertas realizaciones, los aminoácidos usados en las aplicaciones de esta invención son aquellos aminoácidos de origen natural encontrados en proteínas, o los productos anabólicos o catabólicos de origen natural de dichos aminoácidos que contienen grupos amino y carboxilo. Las cadenas laterales de aminoácidos particularmente adecuadas incluyen cadenas laterales seleccionadas de los siguientes aminoácidos: glicina, alanina, valina, cisteína, leucina, isoleucina, serina, treonina, metionina, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, asparagina, lisina, arginina, prolina, histidina, fenilalanina, tirosina y triptófano.

El término “aminoácido” incluye adicionalmente análogos, derivados y congéneres de cualquier aminoácido específico designado en la presente memoria, así como derivados aminoácidos protegidos C-terminales o N-terminales (por ejemplo, modificados con un grupo protector N-terminal o C-terminal). Por ejemplo, la presente invención contempla el uso de análogos de aminoácidos en los que una cadena lateral se alarga o acorta mientras que sigue proporcionando un carboxilo, amino u otro grupo funcional precursor reactivo para ciclación, así como análogos de aminoácidos que tienen cadenas laterales variantes con grupos funcionales apropiados. Por ejemplo, el compuesto en cuestión puede incluir un análogo de aminoácido tal como, por ejemplo, cianoalanina, canavanina, ácido yencólico, norleucina, 3-fosfoserina, homoserina, dihidroxifenilalanina, 5-hidroxitriptófano, 1-metilhistidina, 3-metilhistidina, ácido diaminopimélico, ornitina o ácido diaminobutírico. Se reconocerán por los expertos en la técnica otros metabolitos o precursores de aminoácido de origen natural que tienen cadenas laterales que son adecuadas en la presente memoria, y están incluidos en el alcance de la presente invención.

Se incluyen también los estereoisómeros (d) y (l) de dichos aminoácidos cuando la estructura de los aminoácidos admita formas estereoisoméricas. La configuración de los aminoácidos y residuos de aminoácidos de la presente memoria se designa por los símbolos apropiados (d), (l) o (dl), además, cuando no se designa la configuración, el aminoácido o residuo puede tener la configuración (d), (l) o (dl). Ha de entenderse en consecuencia que los isómeros que surgen de dicha asimetría están incluidos dentro del alcance de esta invención. Dichos isómeros pueden obtenerse en forma sustancialmente pura mediante técnicas de separación clásicas y mediante síntesis controlada estéricamente.

Con los fines de esta solicitud, a menos que se observe expresamente lo contrario, se considerará que un aminoácido dado incluye ambos estereoisómeros (d) o (l).

El término “anticuerpo” como se usa en la presente memoria se pretende que incluya anticuerpos enteros, por ejemplo, de cualquier isotipo (IgG, IgA, IgM, IgE, etc), incluyendo anticuerpos policlonales, monoclonales, recombinantes y humanizados y fragmentos de los mismos que reconocen específicamente y son capaces de unirse a un epítipo de una proteína. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y cribarse la utilidad en los fragmentos de la misma manera. Por tanto, el término incluye segmentos de porciones escindidas proteolíticamente o preparadas recombinantemente de una molécula de anticuerpo que son capaces de reaccionar selectivamente con una cierta proteína. Los ejemplos no limitantes de dichos fragmentos proteolíticos y/o recombinantes incluyen Fab, F(ab')₂, Fab', Fv y anticuerpos monocatenarios (scFv) que contienen un dominio V[L] y/o V[H] unido por un ligador peptídico. Los scFv pueden estar ligados covalente o no covalentemente formando anticuerpos que tienen dos o más sitios de unión.

El término “sustituciones conservativas” designa cambios entre aminoácidos de propiedades moleculares ampliamente similares. Por ejemplo, los intercambios en el grupo alifático de alanina, valina, leucina e isoleucina pueden considerarse como conservativos. A veces, la sustitución de glicina por uno de estos puede considerarse también conservativa. Otros intercambios conservativos incluyen aquellos en el grupo alifático de aspartato y glutamato, en el grupo de amida de asparagina y glutamina, en el grupo de hidroxilo de serina y treonina, en el grupo aromático de fenilalanina, tirosina y triptófano, en el grupo básico de lisina, arginina e histidina, y en el grupo que contiene azufre de metionina y cisteína. A veces, la sustitución en el grupo de metionina y leucina puede considerarse también conservativa. Los grupos de sustitución conservativa preferidos son aspartato-glutamato; asparagina-glutamina; valina-leucina-isoleucina; alanina-valina; valina-leucina-isoleucina-metionina; fenilalanina-tirosina; fenilalanina-tirosina-triptófano; lisina-arginina e histidina-lisina-arginina.

El término “esencialmente no citolítico” como se usa en la presente memoria significa que el retrovirus no daña significativamente ni mata las células que infecta.

“Equivalente” cuando se usa para describir ácidos nucleicos o secuencias nucleotídicas designa secuencia nucleotídica que codifican polipéptidos funcionalmente equivalentes. Las secuencias nucleotídicas equivalentes incluirán secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o deleciones nucleotídicas, tales como una variante alélica; y por lo tanto, incluirán secuencias que difieren debido a la degeneración del código genético. Por ejemplo, las variantes de ácido nucleico pueden incluir aquellas producidas por sustituciones, deleciones o adiciones nucleotídicas. Las sustituciones, deleciones o adiciones pueden implicar uno o más nucleótidos. Las variantes pueden estar alteradas en regiones codificantes, regiones no codificantes o ambas. Las alteraciones en las regiones codificantes pueden producir sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos conservativas o no conservativas.

Los péptidos variantes pueden prepararse covalentemente mediante síntesis química directa usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Las variantes pueden incluir adicionalmente, por ejemplo, deleciones, inserciones o sustituciones de residuos en la secuencia de aminoácido. Puede prepararse también cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar al constructo final, a condición de que el constructo final posea la actividad deseada. Estas variantes pueden prepararse mediante mutagénesis dirigida a sitio (como se ejemplifica por Adelman *et al.*, *DNA* 2: 183 (1983)) de los nucleótidos en el ADN que codifica la molécula peptídica, produciendo así ADN que codifica la variante, y después de ello, expresando el ADN en cultivo de células recombinantes. Las variantes exhiben típicamente la misma actividad biológica cualitativa que los polipéptidos de tipo silvestre. Es conocido en la técnica que pueden sintetizarse también todas las sustituciones de aminoácidos individuales posibles de un polipéptido conocido (Geysen *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 18:3998-4002 (1984)). Aunque los efectos de sustituciones diferentes no son siempre aditivos, es razonable esperar que dos sustituciones individuales favorables o neutras en diferentes posiciones de residuo de un polipéptido puedan combinarse con seguridad sin perder actividad proteica. Son procedimientos para la preparación de polipéptidos degenerados los descritos en Rutter, patente de EE.UU. n° 5.010.175; Haughter *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 82: 5131-5135 (1985); Geysen *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 18:3998-4002 (1984); WO86/06487 y WO86/00991.

Al idear una estrategia de sustitución, un experto en la técnica determinaría cuáles residuos variar y cuáles aminoácidos o clases de aminoácidos son reemplazos adecuados. También pueden tenerse en cuenta estudios de variaciones de secuencia en familias de proteínas homólogas de origen natural. Ciertas sustituciones de aminoácidos son toleradas más a menudo que otras, y estas a menudo están correlacionadas con similitudes de tamaño, carga, etc. entre el aminoácido original y su reemplazo. Pueden hacerse también inserciones o deleciones de aminoácidos, como se describe anteriormente. Las sustituciones son preferiblemente conservativas, véanse, por ejemplo, Schulz *et al.*, “Principle of Protein Structure” (Springer-Verlag, Nueva York (1978)) y Creighton, “Proteins: Structure and Molecular Properties” (W.H. Freeman & Co., San Francisco (1983)); ambas incorporadas a la presente como referencia en su totalidad.

Un fragmento “funcional” de un ácido nucleico como se usa en la presente memoria es un fragmento de ácido nucleico capaz de codificar una secuencia señal de un gen ligado al fragmento. Por tanto, un “fragmento funcional” de un ácido nucleico se pretende que incluya ácidos nucleicos capaces de codificar una secuencia señal en condiciones apropiadas.

El término “VIH” es conocido por el experto en la técnica y designa el virus de la inmunodeficiencia humana. Hay dos tipos de VIH: VIH-1 y VIH-2. Hay muchas cepas diferentes de VIH-1. Las cepas de VIH-1 pueden clasificarse en tres grupos: el grupo “principal” M, el grupo “marginal” O y el grupo “nuevo” N. Estos tres grupos pueden representar tres introducciones separadas del virus de inmunodeficiencia de simios en seres humanos. En el grupo M, hay al menos diez subtipos o clados: por ejemplo, clados A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y K. Un “clado” es un grupo de organismos, tal como una especie, cuyos miembros comparten rasgos homólogos derivados de un antecesor común. Cualquier referencia a VIH-1 en esta solicitud incluye todas estas cepas.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan intercambiabilmente para designar una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: regiones codificantes o no codificantes de un gen o fragmento génico, loci (locus) definidos a partir de análisis de ligamiento, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN transferente (ARNt), ARN ribosómico (ARNr), ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados tales como nucleótidos metilados y análogos nucleotídicos. Si están presentes, las modificaciones en la estructura nucleotídica pueden conferirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente marcador. El término polinucleótido “recombinante” significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, semisintético o sintético que no aparece en la naturaleza o está ligado a otro polinucleótido en una disposición no natural. Un “oligonucleótido” designa un polinucleótido monocatenario que tiene menos de aproximadamente 100 nucleótidos, menos de aproximadamente, por ejemplo, 75, 50, 25, o 10 nucleótidos.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” (si es monocatenaria) se usan intercambiabilmente en la presente memoria para designar polímeros de aminoácidos. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede interrumpirse por no aminoácidos. Los términos comprenden también un polímero de aminoácido que se ha modificado, por ejemplo, por formación de enlace disulfuro, glucosilación, lapidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación, tal como conjugación con un componente marcador.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de la invención pueden sintetizarse químicamente, por ribosomas en un sistema exento de células o por ribosomas en una célula. La síntesis química de polipéptidos de la invención puede llevarse a cabo usando una variedad de procedimientos reconocidos en la técnica, incluyen la síntesis en fase sólida por etapas, la semisíntesis mediante religación auxiliada conformacionalmente de fragmentos peptídicos, ligación enzimática de segmentos peptídicos clonados o sintéticos y ligación química. La ligación química nativa emplea una reacción quimiosselectiva de dos segmentos peptídicos no protegidos para producir un intermedio ligado por tioéster transitorio. El intermedio ligado por tioéster transitorio experimenta espontáneamente entonces una transposición, proporcionando el producto de ligación completo que tiene un enlace peptídico nativo en el sitio de ligación. Los productos de ligación completos son químicamente idénticos a las proteínas producidas mediante síntesis exenta de células. Los productos de ligación completos pueden replegarse y/u oxidarse, según se permita, formando moléculas de proteína que contienen disulfuro nativas (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 6.184.344 y 6.174.530 y T. W. Muir *et al.*, *Curr. Opin. Biotech.* (1993): vol. 4, p. 420; M. Miller, *et al.*, *Science* (1989): vol. 246, p. 1149; A. Wlodawer, *et al.*, *Science* (1989): vol. 245, p. 616; L. H. Huang, *et al.*, *Biochemistry* (1991): vol. 30, p. 7402; M. Schnolzer, *et al.*, *Int. J. Pept. Prot. Res.* (1992): vol. 40, p. 180-193; K. Rajarathnam, *et al.*, *Science* (1994): vol. 264, p. 90; R. E. Offord, “Chemical Approaches to Protein Engineering”, en “Protein Design and the Development of New therapeutics and Vaccines”, J. B. Hook, G. Poste, Eds., (Plenum Press, Nueva York, 1990) p. 253-282; C. J. A. Wallace, *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1992): vol. 267, p. 3852; L. Abrahmsen, *et al.*, *Biochemistry* (1991): vol. 30, p. 4151; T. K. Chang, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91: 12544-12548; M. Schnolzer, *et al.*, *Science* (1992): vol., 3256, p. 221 y K. Akaji, *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) (1985) 33: 184).

Como es conocido por un experto en la técnica “retrovirus” son virus de ARN de cadena positiva diploides que se replican mediante un intermedio de ADN integrado (ADN provírico). En particular, tras la infección por el virus de ARN, se transcribe de forma inversa el genoma lentivírico en el ADN mediante una transcriptasa inversa codificada en el virus que se porta como proteína en cada retrovirus. Se integra entonces pseudoaleatoriamente el ADN vírico en el genoma de la célula hospedadora, formando un “provirus” que se hereda por las células descendientes. El genoma retrovírico contiene al menos tres genes: *gag* codifica las proteínas del núcleo y estructurales del virus; *pol* codifica transcriptasa inversa, proteasa e integrasa y *env* codifica las proteínas de superficie del virus. En la familia retrovírica, el VIH se clasifica como un lentivirus, al tener similitudes genéticas y morfológicas con lentivirus animales tales como los que infectan a gatos (virus de la inmunodeficiencia felina), ovejas (virus visna), cabras (virus de la artritis-encefalitis caprina) y primates no humanos (virus de la inmunodeficiencia de simios).

Como se usa en la presente memoria, “delección suficiente” significa la delección de suficiente secuencia de ácido nucleico para evitar la transcripción y así la producción del correspondiente producto proteico.

65 2. Visión general

La presente invención está basada al menos en parte en el sorprendente descubrimiento de que el reemplazo de la secuencia señal natural (NSS) de la glucoproteína gp120 de cubierta de VIH-1 por una secuencia señal que no

contiene más de un aminoácido cargado positivamente da como resultado un VIH-1 modificado que es no citolítico y como tal es capaz de síntesis, glucosilación y secreción de alta eficacia de gp120. En particular, se observó que la alteración de los residuos de aminoácidos cargados positivamente en la secuencia señal de gp120 no solo aumentaba el nivel de expresión, sino también el nivel de secreción. El nivel de secreción aumentaba a medida que se reducía la cantidad de carga positiva. En contraposición, la retirada de los cinco residuos de aminoácidos cargados positivamente en la secuencia señal de gp120 de clado B de VIH-1 dio como resultado la acumulación en las células de grandes cantidades de la forma no glucosilada de gp120. Este resultado indicaba que es necesario un número mínimo de residuos de aminoácidos cargados positivamente para una translocación eficaz de la proteína a través de la membrana del RE.

3. *Lentivirus recombinantes*

En una realización, la presente invención proporciona un VIH-1 recombinante esencialmente no citolítico capaz de replicación de alta eficacia en el que la NSS de la glucoproteína de cubierta del virus se reemplaza por una secuencia señal de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 aminoácidos de longitud en la que dicha secuencia señal no contiene más de un (1) aminoácido cargado positivamente.

La secuencia señal de gp120 modificada de la invención puede prepararse sustituyendo aminoácidos neutros por aminoácidos cargados positivamente en la secuencia señal natural (MRVKEKKTQHLWRWGWWTMLLGML MIGSA; SEC ID N° 1); dichas modificaciones pueden representarse como: $MX_1VX_2EX_3KTQHLWX_4WGWX_5WGT$ MLLGMLMICAS (SEC ID N° 2) en la que X_1 , X_2 , X_3 , X_4 y X_5 son aminoácidos neutros. Los residuos cargados positivamente se muestran en negrita y subrayados.

Las secuencias señal modificadas según la invención incluyen:

MRVAEIKKTQHLWRWGWRWTMLLGMLMICSA (YL-1; SEC ID N° 3),

MIVKEKKTQHLWIWGWIWGTMLLGMLMIGSA (YL-2; SEC ID N° 4),

MRVVEIKKTQHLWIWGWIWGTMLLGMLMIGSA (YL-3; SEC ID N° 5),

MIVAEIKKTQHLWIWGWIWGTMLLGMLMIGSA (YL-4; SEQ ID NO: 6).

Las siguientes secuencias señal no entran dentro del alcance de la invención:

MKFLVNVALVFMVVYISYIYADPINM (péptido señal de melitina modificado, la secuencia subrayada es el resultado de la inserción de un ligador e indica cinco aminoácidos entre la secuencia señal y la proteína gp120 madura; SEC ID N° 7),

MLLLLLMLFHLGLQASISGRDPINM (péptido señal de interleucina 3 modificado, la secuencia subrayada es el resultado de la inserción de un ligador e indica siete aminoácidos entre la secuencia señal y la proteína gp120 madura; SEC ID N° 8).

4. *Vacunas de la invención*

La presente invención caracteriza adicionalmente vacunas que comprenden una cantidad eficaz de un lentivirus recombinante de la invención como se describe anteriormente.

Las composiciones de vacuna de la invención son adecuadas para administración a sujetos en forma biológicamente compatible *in vivo*. La expresión “forma biológicamente compatible *in vivo*” como se usa en la presente memoria significa una forma de administrar la sustancia en la que los efectos tóxicos estén compensados por los efectos terapéuticos. Las sustancias pueden administrarse a cualquier animal, preferiblemente seres humanos.

Las vacunas de la presente invención pueden contener adicionalmente diluyentes, adyuvantes y/o vehículos adecuados. Preferiblemente, las vacunas contienen un coadyuvante que puede potenciar la inmunogenicidad de la vacuna *in vivo*. El coadyuvante puede seleccionarse de muchos adyuvantes conocidos en la técnica incluyendo la porción de lípido A de endotoxina de bacterias gramnegativas, dimicolato de trehalosa de micobacterias, el fosfolípido liso-lectina, bromuro de dimetilditadecilamonio (DDA), ciertos polímeros en bloque de polioxipropileno-polioxietileno (POP-POE), hidróxido de aluminio, liposomas y polímeros de CpG (citocina-fosfato-guanidina). Las vacunas pueden incluir también citocinas que son conocidas por potenciar la respuesta inmunitaria, incluyendo GM-CSF, IL-2, IL-12, TNF e IFN- γ .

La dosis de vacuna puede variar según factores tales como el estado patológico, la edad, sexo y peso del individuo y la capacidad del anticuerpo de desencadenar una respuesta inmunitaria en el individuo. La pauta de dosificación

puede ajustarse para proporcionar una respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas diariamente o la dosis puede reducirse proporcionalmente como se indique por las exigencias de la situación terapéutica. La dosis de vacuna puede variarse también para proporcionar una respuesta a la dosis preventiva óptima dependiendo de las circunstancias.

Las vacunas de la presente invención pueden formularse e introducirse como vacuna por vía oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal e intravaginal, o cualquier otra vía estándar de inmunización.

En formulaciones de las vacunas en cuestión, pueden estar presentes en los agentes formulados agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

Las composiciones en cuestión pueden ser adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal, por aerosol y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de composición que puede combinarse con un material portador para producir una dosis individual puede variar dependiendo del sujeto que se esté tratando y del modo de administración particular.

Los procedimientos de preparación de estas formulaciones incluyen la etapa de poner en asociación composiciones de la presente invención con el vehículo y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntima los agentes con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y entonces, si es necesario, conformando el producto.

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas masticables (usando una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto), polvos, gránulos o como solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como emulsión de aceite en agua o agua en aceite, o como elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica), que contienen cada uno una cantidad predeterminada de una composición en cuestión de la misma como ingrediente activo. Las composiciones de la presente invención pueden administrarse también como bolo, electuario o pasta.

En las formas farmacéuticas sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), se mezcla la composición en cuestión con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o extensores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábica; (3) humectantes tales como glicerol; (4) agentes disgregantes tales como agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la solución tales como parafina; (6) acelerantes de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol acetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones pueden comprender también agentes de tamponación. Pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Puede prepararse un comprimido mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos por compresión pueden prepararse usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa de sodio reticulada), agentes tensioactivos o dispersantes. Los comprimidos por moldeo pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla de la composición en cuestión humedecida con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos y otras formas farmacéuticas sólidas tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden ranurarse opcionalmente o prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica.

Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de la composición en cuestión, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, germen de maíz, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán, y mezclas de los mismos.

Las suspensiones, además de la composición en cuestión, pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxitilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

Las formulaciones para administración rectal o vaginal pueden presentarse como supositorios, que pueden prepararse mezclando una composición en cuestión con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de supositorio o un salicilato, y que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y, por lo tanto, se fundirán en la cavidad corporal liberando el agente activo. Las formulaciones que son adecuadas para administración vaginal incluyen también pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen vehículos tales que son conocidos en la técnica por ser apropiados.

Las formas farmacéuticas para administración transdérmica de una composición en cuestión incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, disoluciones, parches e inhalantes. El componente activo puede mezclarse en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propelente que pueda ser necesario.

Los pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de la composición en cuestión, excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.

Los polvos y pulverizaciones pueden contener, además de la composición en cuestión, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y poliamida en polvo, o mezclas de estas sustancias. Las pulverizaciones pueden contener adicionalmente propulsores corrientes tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos no sustituidos volátiles tales como butano y propano.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse como alternativa por aerosol. Esto se consigue preparando un aerosol acuoso, preparación liposómica o partículas sólidas que contienen el compuesto. Podría usarse una suspensión no acuosa (por ejemplo, propelente de fluorocarbono). Pueden usarse nebulizadores sónicos porque minimizan la exposición del agente al cizallamiento, que puede dar como resultado la degradación de los compuestos contenidos en las composiciones en cuestión.

Normalmente, se prepara un aerosol acuoso formulando una solución o suspensión acuosa de una composición en cuestión con vehículos y estabilizantes farmacéuticamente convencionales. Los vehículos y estabilizantes varían con los requisitos de la composición en cuestión particular, pero incluyen típicamente tensioactivos no iónicos (Tween, Pluronic o polietilenglicol), proteínas inocuas como seroalbúmina, ésteres de sorbitán, ácido oleico, lecitina, aminoácidos tales como glicina, tampones, sales, azúcares o alcoholes de azúcar. Los aerosoles se preparan generalmente a partir de disoluciones isotónicas.

Además, las vacunas pueden administrarse por vía parenteral como inyecciones (intravenosa, intramuscular o subcutánea). Las composiciones de vacuna de la presente invención pueden contener opcionalmente uno o más adyuvantes. Puede usarse cualquier coadyuvante adecuado, tal como polímeros de CpG, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, aceites vegetales y animales y similares, dependiendo la cantidad de coadyuvante de la naturaleza del coadyuvante particular empleado. Además, las composiciones de vacuna antiinfecciosa pueden contener también al menos un estabilizante, tal como carbohidratos tales como sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, dextrina y glucosa, así como proteínas tales como albúmina o caseína, y tampones tales como fosfatos de metal alcalino y similares.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención adecuadas para administración parenteral comprenden una composición en cuestión en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en disoluciones o dispersiones inyectables justo antes del uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos, solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido, o agentes de suspensión o espesantes.

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Adicionalmente, los lentivirus recombinantes no citolíticos de la presente invención pueden encapsularse en liposomas y administrarse mediante infección. Los sistemas de suministro de liposomas comercialmente disponibles están disponibles en Novavax, Inc. de Rockville, Md., disponibles comercialmente con el nombre Novasomes™. Estos liposomas se formulan específicamente para suministro de inmunógeno o anticuerpo. En una realización de la invención, pueden usarse Novasomes™ que contienen péptidos o moléculas de anticuerpo unidas a la superficie de estos liposomas cargados positivamente no fosfolipídicos.

5. Uso de vacuna

Puede prevenirse o tratarse una infección lentivírica en un sujeto administrando al sujeto una cantidad eficaz de una vacuna de la presente invención.

Los lentivirus recombinantes de la presente invención pueden prepararse usando técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el lentivirus puede introducirse en una célula hospedadora en condiciones adecuadas para la replicación y expresión del lentivirus en el hospedador. En consecuencia, la presente invención proporciona también una célula transfectada con un lentivirus recombinante de la invención.

La célula es preferiblemente un linfocito T, más preferiblemente un linfocito T que no deriva de una línea celular transformada.

El término “cantidad eficaz” como se usa en la presente memoria significa una cantidad eficaz y a dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado deseado. El término “animal” como se usa en la presente memoria incluye todos los miembros del reino animal, incluyendo mamíferos, preferiblemente seres humanos.

Un procedimiento para matar o destruir células diana, preferiblemente células cancerosas, puede comprender administrar a la célula o células una cantidad eficaz de un virus recombinante, preferiblemente virus de la estomatitis vesicular (VSV) o cualquier otro virus de ARN portador específico de las células diana, preferiblemente NSS de VIH-1.

Preferiblemente, las células están en un animal necesitado de ello, lo más preferiblemente en seres humanos. Las células que están infectadas o son cancerosas expresan marcadores celulares específicos para los que puede incorporarse un sitio de reconocimiento complementario en un vector adecuado en el que se ha incorporado NSS de VIH-1. Se ha tomado este enfoque con el virus de la estomatitis vesicular (VSV), que se ha modificado por ingeniería genética para incorporar los genes de CD4 y CXCR4, orientando así al VSV modificado a infectar células infectadas con VIH-1 (Schnell, M. J. *et al. Cell* 90:849-857 (1997)). En consecuencia, la presente invención proporciona un procedimiento para matar células diana, tales como células cancerosas, que comprende administrar un virus recombinante que contiene NSS y un sitio de reconocimiento específico de las células diana a un animal necesitado de ello. La NSS de VIH-1 puede incorporarse a un vector de tipo VSV modificado que se ha orientado a un tipo de célula cancerosa específica basándose en un antígeno de superficie de célula cancerosa particular, proporcionando así al VSV la capacidad de inducir la apoptosis en las células cancerosas diana.

Ejemplificación

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente invención.

Ejemplo 1a

Construcción de baculovirus recombinantes

Se ha descrito anteriormente la construcción de baculovirus recombinantes que expresan la glucoproteína 120 del virus de la inmunodeficiencia humana 1 con su secuencia señal natural (gp120-NSS), con su secuencia señal natural reemplazada por una secuencia señal de melitina de abeja melífera (gp120-MSS), y con su secuencia señal natural retirada (gp120-ΔS) por Li *et al. (Virology* 204:266-278 (1994)). Se ha descrito anteriormente la construcción de baculovirus recombinantes que expresan la glucoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV_{Ind}G) por Bailey *et al. (Virology* 169:323-331 (1989)).

Se describe a continuación la construcción de baculovirus recombinantes que expresan proteína G de VSV_{Ind} con la secuencia señal de la glucoproteína gp120 de cubierta de VIH-1 (VSV-G-NSS).

Para reemplazar la secuencia señal de la proteína VSV-G, los presentes inventores construyeron en primer lugar VSV-G-ΔS (glucoproteína G del virus de la estomatitis vesicular sin su secuencia señal) mediante PCR con dos cebadores:

cebador n° 1:

5'-GGC GGA TCC GGA TCA ACG TTC ACC ATA GTT-3' (SEC ID N° 9) (cebador 5')

BamHI SphI +1VSV-G

cebador n° 2:

5'-GGC GGA TCC TTA CTT TCC AAG TCG-3' (SEC ID N° 10) (cebador 3')

BamHI codón de terminación

ES 2 354 830 T3

El cebador nº 2 es complementario del gen de VSV-G C-terminal.

Se usó como molde el plásmido pwKI (que contiene el gen G completo de VSV_{Ind}, y proporcionado amablemente por el Dr. Robert R. Wagner, University of Virginia, EE.UU.), y se amplificó con el kit Geneamp mediante 30 ciclos de PCR en un termociclador de Perkin Elmer Cetus (los ciclos fueron 94°C 1 min, 45°C 2 min, 72°C 3 min) a partir de 20 ng de pwKI como molde y 1,0 µM de cada cebador.

Todos los cebadores tenían sitios BamHI en su extremo 5', de modo que el fragmento de ADN de VSV-G-ΔS amplificado podía insertarse en el sitio BamHI del plásmido pBluescript SK VECTOR (Stratagene), el clon en que se seleccionó el extremo 5' de VSV-G-ΔS hacia el promotor T7 y se digirió con las enzimas de restricción SphI+XhoI.

Ejemplo 1b

Mutagénesis específica de sitio por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para cambiar los aminoácidos cargados positivamente localizados en la secuencia señal de gp120 de cubierta de VIH-1 a aminoácidos apolares, se efectuó una mutagénesis dirigida a oligonucleótido mediante PCR en un termociclador de Perkin-Elmer Cetus. Los cuatro cebadores oligonucleotídicos mutantes que se diseñaron para generar una serie de mutaciones (YL-1, YL-2, YL-3 e YL-4) en la región de codificación de la secuencia señal de gp120 de cubierta de VIH-1 son:

YL-1 5'-ATT TCG GAT CCT ATA AAT ATG AGA GTC GCG GAG ATA TAT CAT
CAC-3' (SEC ID Nº 11)

YL-2 5'- ATT TCG GAT CCT ATA AAT ATG ATA GTC AAG GAG AAA TAT CAG
CAC TTG TGG ATA TGG GGG TGG ATA TGG GGC-3' (SEC ID Nº 12)

YL-3 5'- ATT TCG GAT CCT ATA AAT ATG AGA GTC GTG GAG ATA TAT CAG
CAC TTG TGG ATA TGG GGC-3' (SEC ID Nº 13)

YL-4 5'- ATT TCG GAT CCT ATA AAT ATG ATA GTG GCG GAG ATA TAT CAG
CAC TTG TGG ATA TGG GGG TGG ATA TGG GGC-3' (SEC ID Nº 14)

Los nucleótidos subrayados son los alterados.

Además, se usó un cebador universal (YL-5; 5'-AGC TTG GAT CCT TAT CTT TTT TCT CTC TGC TGC ACC-3' (SEC ID Nº 15)) complementario del extremo C del gen de gp120, para obtener los clones de gp120 mutantes completos. Se amplificó la secuencia de codificación de gp120 con el kit Geneamp mediante 30 ciclos de PCR (los ciclos fueron 94°C 1 min, 45°C 2 min, 72°C 3 min) a partir de 20 ng de pUC19-gp120-NSS linealizado con HindIII como molde y 1,0 µM de cada cebador mutante y el cebador universal. Todos los cebadores tenían sitios BamHI en su extremo 5', de modo que el fragmento de ADN de gp120 amplificado podía insertarse en el sitio BamHI de pAcYM1. Todos los mutantes construidos tienen las mutaciones esperadas verificadas mediante secuenciación de terminación de cadena didesoxi.

Ejemplo 1c

Amplificación de la secuencia señal de VIH-1

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

cebador n° 1:

10 **5'-AAT ACG ACT CAC TAT-3'** (SEC ID N° 16) (cebador de T7)

cebador n° 2:

15 **5'-GGC GCA TGC ACT ACA GAT CAT-3'** (SEC ID N° 17)

SphI

(SphI complementario del extremo C del gen de secuencia señal de VIH-1)

- 20 Se digirió el fragmento de ADN amplificado que contenía la secuencia señal de VIH-1 con las enzimas de restricción XhoI más SphI y se insertó en un vector pBluescript VSV-G-ΔS digerido con XhoI y SphI. El plásmido resultante se designa como pBSK VSV-G-NSS, y el constructo se confirmó adicionalmente mediante secuenciación de ADN.

- 25 Se insertó el fragmento BamHI de VSV-G-NSS en el sitio BamHI de un pAcYM1 de baculovirus (Li, Y. *et al. Virology* 204:266-278 (1994)), y se generó un baculovirus recombinante que expresa VSV-G-NSS mediante un procedimiento de transfección estándar (Li, Y. *et al. Virology* 204:266-278 (1994)).

30 Ejemplo 2

Examen microscópico de células infectadas con baculovirus recombinantes

- 35 Se infectaron células SF21 con AcNPV recombinante a una MOI de 5 UFP/célula y se incubaron a 27°C durante 48 horas. Se examinaron las células infectadas mediante microscopio de contraste de fases. Se muestran los resultados en la Figura 1. Estos resultados demuestran que la secuencia señal de *env* de VIH-1 mata rápidamente las células.

Ejemplo 3

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

- I. *Ensayo de azul de tripano*: Se infectaron células SF21 con AcNPV recombinante a una MOI de 5 UFP/célula durante 1 h, se retiró el inóculo y se incubó con el medio completo TNM-FH que contiene 10% de suero fetal bovino (FBS). A las 24, 48 y 72 horas después de la infección, se tiñeron las células con azul de tripano (GIBCO, BRL) durante 5 min, se contaron las células por el microscopio y se determinó el porcentaje de células muertas usando la siguiente fórmula:

50
$$\frac{\text{células muertas (teñidas)}}{\text{células viables (no teñidas) + células muertas}} \times 100 = \% \text{ de células muertas}$$

- 55 II. *Ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDRA)*: Se efectuó el LDRA según las instrucciones del fabricante (kit de detección de citotoxicidad de Boehringer Mannheim). Se infectaron células SF21 con AcNPV recombinante a una MOI de 5 UFP/célula durante 1 hora, se retiró el inóculo y se incubó con medio completo a 27°C, se recogió medio de cultivo a intervalos regulares de 12 h y se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 min. Se diluyó el sobrenadante de cultivo 10 veces y se incubaron 100 μl del sobrenadante con 100 μl de mezcla de reacción (kit de detección de citotoxicidad) durante 30 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia de las muestras a 490 nm cuantificando el tinte de formazeno usando un lector de microplacas (ELISA) (Bio-Rad 550). Los resultados de los ensayos de azul de tripano y de liberación de lactato deshidrogenasa se ilustran en las Figuras 2A y 2B, respectivamente.

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

Ejemplo 4

Examen de la apoptosis

- 5 I. *Procedimiento de extracción de ADN total*: Se infectaron células SF21 (3×10^6) con AcNPV recombinante a una MOI de 5 UFP/célula durante 1 h. Se retiró el inóculo y se incubó con medio completo a 27°C durante 48 h. Se sedimentaron las células a 2500 rpm durante 10 min y se extrajeron con TSE (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, 1% de SDS, al que se añadió proteinasa K a una concentración final de 70 $\mu\text{g/ml}$). Se incubaron entonces las muestras durante 2 h a 37°C y al final de la incubación se añadió NaCl a una concentración final 1 M, y se incubaron entonces las muestras a 4°C durante una noche. Se extrajo el ADN con fenol:cloroformo (1:1) y con cloroformo. Finalmente, se añadió etanol (al 100%) para precipitar el ADN (15 min a 80°C) y se sedimentó el precipitado de ADN mediante microcentrifugación a 12.000 rpm durante 15 min. Se lavó el sedimento de ADN una vez con etanol al 70%, se resuspendió en TE (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) con ARNasa A (50 $\mu\text{g/ml}$), se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y se tiñó con bromuro de etidio (N. Chejanovsky y E. Gershburg, *Virology* 209:519-525 (1995)). Los resultados se ilustran en la Figura 3. Los resultados anteriores demuestran que la secuencia señal de *env* de VIH-1 natural induce la apoptosis.

- 10 II. *Extracción de ADN fragmentado*: Se infectaron células SF21 con vAc-VSV-G (VSV-G) o vAc-VSV-G-NSS (VSV-G-NSS) a una MOI de 5 UFP/célula y se incubaron a 27°C durante 48 horas. A las 48 horas después de la infección, se sedimentaron estas células (3×10^6) a 2.500 rpm durante 5 min y se lisaron en una solución que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM y 0,5% de Triton X-100, y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 25 min en una microcentrífuga Eppendorf para sedimentar el ADN cromosómico. Se digirió el sobrenadante con 0,1 mg de ARNasa A por ml a 37°C durante 1 h, y entonces durante 2 h con 1 mg de proteinasa K por ml a 50°C en presencia de 1% de SDS, se extrajo con fenol y cloroformo y se precipitó con etanol frío. Se resuspendió el precipitado en TE y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 11,5% que contenía 5 μg de bromuro de etidio por ml. Se visualizó el ADN mediante transiluminación UV (Rosario Leopardi y Bernard Roizman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9583-9587 (1996)). Los resultados se muestran en la Figura 4.

Ejemplo 5

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

- 35 I. *Construcción del plásmido pNL4-3 que contiene la sustitución de NSS (por secuencia señal de MSS, IL-3 o cualquier otra) y la delección de vpu*: Un clon de ADN provírico de VIH-1 infeccioso, pNL4-3 (proporcionado por el Dr. Malcolm Martin a través del programa AIDS Research and Reference Reagent, Division of AIDS, NIAID, NIH; Adachi, *et al. J. Virol.* 59:284-291 (1986)) contiene dos sitios únicos de enzima de restricción: EcoRI (posición 5744) y BamHI (posición 8466). La región de codificación del gen *env* parte de la posición 6221 y termina en la posición 8785. Para reemplazar la secuencia señal natural de *env* de VIH-1 por la de melitina, IL-3 o cualquier otra secuencia señal de proteína secretora, se aísla el fragmento EcoRI-BamHI de pNL4-3 del gel de agarosa y se subclona en el sitio EcoRI-BamHI del vector pBluescript SK (pBSK). A partir de este producto, se diseñan cuatro cebadores como sigue:

45 cebador n° 1 (directo):

5'- GGC GAA TTC TGC AAC AAC TGC TG - 3' (SEC ID N° 18)

EcoRI

50 cebador n° 2 (inverso):

5'-GGC CTG CAG TCA TTA GGC ACT GTC TTC TGC TCT TTC-3' (SEC ID N° 19)

PstI codones de terminación

55 cebador n° 3 (directo):

5'-GGC CTG CAG CCA TGG ACA GAA AAA TTG TTG GTC ACA GTC-3' (SEC ID N° 20)

PstI NcoI

65 cebador n° 4 (inverso):

5'-GGC GGA TCC GTT CAC TAA TCG AAT GG-3' (SEC ID N° 21)

BamHI

ES 2 354 830 T3

Se usan pBSK-*env* como molde más los cebadores nº 1 y nº 2 y se efectúa la PCR para amplificar la porción izquierda de la región *env*, fragmento de 477 pb. De forma similar, se emplean los cebadores nº 3 y nº 4 para amplificar la porción derecha de *env*, 2245 pb. Se digirió el producto de PCR EcoRI-PstI (fragmento de 477 pb) con EcoRI+PstI, mientras que se cortó el producto de PCR PstI-BamHI (fragmento de 2245 pb) con PstI+BamHI. Se clonó entonces el
5 fragmento de 2245 pb digerido con PstI-BamHI en los sitios PstI+BamHI del vector pBSK.

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

10 Se digirió el plásmido pBSK-*env*-ΔS con PstI+NcoI y se ligó entonces con el oligonucleótido sintético que codifica secuencia señal de MSS, secuencia señal de IL-3, secuencias señal naturales mutadas o cualquier otra secuencia señal deseada. Este oligonucleótido sintético contiene un sitio PstI en el extremo 5' y un sitio NcoI en el extremo 3'. Antes de la ligación en el vector, se digirieron en primer lugar estos oligonucleótidos bicatenarios con PstI+NcoI.
15

Oligonucleótido sintético que codifica la secuencia señal de melitina (solo se muestra el sentido positivo):

20
PstI
5'-GGC CTG CAG ATG AAA TTC TTA GTC AAC GTT GCC CTT GTT TTT ATG GTC
25 GTG TAC ATT TCT TAC ATC TAT GCG GAT CCA TGG GCC-3' (SEC ID Nº 22)
NcoI

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

35
PstI
5'-GGC CTG CAG ATG CTG CTC CTG CTC CTG ATG CTC TTC CAC GGA CTC
40 CAA
GCT TCA ATC AGT GGC GAT CCA TGG GCC-3' (SEC ID Nº 23)
NcoI

45 Después de secuenciar para verificar la correcta modificación, se digirió el plásmido con EcoRI+BamHI para aislar el fragmento EcoRI-BamHI, que se reclonó en los sitios EcoRI-BamHI del vector de ADN provírico pNL4-3. El plásmido resultante se designa pHIV-1-MSS (o pHIV-1-IL3SS).
50

Además, durante la construcción anterior, no solo se sustituye la NSS por secuencia señal de MSS o de IL-3, sino que se crea también una delección parcial del gen *vpu*. El *vpu* codifica 82 aminoácidos y su extremo 3' se superpone con la secuencia señal del gen *env* de VIH-1, aproximadamente 28 aminoácidos. Sin embargo, está en un marco de lectura diferente (marco de lectura -1). Los estudios han mostrado que la delección de los genes *vpu* o *nef* no alteraba la replicación vírica en PBMC de chimpancé, PBMC humanos o en la línea celular híbrida B/T CEMx174 (James, *et al. AIDS Res. Human Retrovirus* 10:343-350 (1994)). Por lo tanto, durante la amplificación por PCR del fragmento de 455 pb de la porción izquierda de *env* con los cebadores nº 1 y nº 2, se añadieron dos codones de terminación justo delante del codón de inicio de los genes *env*, que da como resultado la delección de 28 aminoácidos de *vpu* (véase el cebador nº 2).
60

65 II. Construcción de un plásmido que contiene la delección de *nef*: La secuencia de codificación del gen *nef* parte de la posición 8787 y termina en la posición 9407 en el clon de ADN provírico pNL4-3. Hay también dos únicos sitios de enzima de restricción: el sitio BamHI en posición 8466 del gen *env* y el sitio XhoI en posición 8887 del gen *nef*. Para preparar la delección del gen *nef*, se digirió el plásmido pHIV-MSS (o IL-3SS) con BamHI y XhoI. Se aislaron las 421 pb resultantes del fragmento BamHI-XhoI y se subclonaron en los sitios BamHI-XhoI del vector pBSK.

Se diseñaron dos cebadores:

BamHI

cebador nº 5: 5'- GGC GGA TCC TTA GCA CTT ATC TGG-3' (SEC ID Nº 24)
(directo)

XhoI

cebador nº 6: 5' - GCC CTC GAG TCA TTA ATA CTG CTC CCA CCC-3' (SEC ID Nº 25)

codones de terminación

El gen *nef* codifica 26 aminoácidos según el presente diseño. Se insertaron dos codones de terminación en el sitio XhoI que dan como resultado que *nef* codifique solo 33 aminoácidos. Después de la amplificación por PCR y digestión con BamHI+XhoI, se clonó de nuevo este fragmento de ADN de PCR de 421 pb al vector BamHI-XhoI pHIV-1-MSS (o IL-3SS). El plásmido recombinante resultante contiene la sustitución de NSS y la delección parcial de *vpu* y *nef*, que se usa para el ensayo de vacuna.

Ejemplo 6

Medidas de la producción vírica

Se sembraron inicialmente células A3.01 en placas de 6 pocillos a una densidad de 1×10^6 células/pocillo y se transfectaron con 10 μ g de ADN provírico. A los 3 días después de la transfección, y cada 2 días después, se recogieron los cultivos y se dividieron las células 1:2 en medio fresco sin la adición de células suplementarias no infectadas. Se reunieron los sobrenadantes de cultivo recogidos en cada punto temporal mostrado y se analizó la presencia de p24 por ELISA como indicador de la producción vírica. Las células infectadas con el virus NL4-3^{WT} o NL4-3^{nef-} mostraron una producción vírica máxima a los 13 días después de la transfección, sin embargo las células mostraron altos niveles de CPE y los números de células bajaron rápidamente, terminándose los cultivos a los 17 días después de la transfección. Sin embargo, las células infectadas con virus NL4-3^{SSR} o NL4-3^{nef-/SSR} mostraron un CPE mínimo y permanecieron infectadas persistentemente hasta 29 días después de la transfección, en cuyo punto las células sucumbieron eventualmente al CPE inducido por virus y se terminaron los cultivos. Los cultivos de virus NL4-3^{WT} o NL4-3^{nef-} producían un máximo de 1×10^2 μ g de p24, mientras que los virus NL4-3^{SSR} o NL4-3^{nef-/SSR} producían más de 1×10^6 μ g de p24 en una sola recogida. Los resultados se muestran en la Figura 6.

Ejemplo 7

Medida de la infectividad

Después de la transfección de ADN provírico, se dividieron las células cada dos días, se recogieron muestras del sobrenadante de cultivo y se analizaron mediante ELISA de p24 para controlar la replicación vírica. Para valorar la infectividad de las partículas víricas que se están produciendo, se analizaron adicionalmente muestras mediante el ensayo MAGI a los 8 días después de la transfección tanto en células A3.01 como H9, y los resultados se estandarizaron para representar el número de partículas víricas infecciosas presentes por ng de proteína p24. Como se muestra anteriormente, el mutante de reemplazo de la secuencia señal de Env (NL4-3^{SSR}) y el mutante combinación de delección de *nef*/reemplazo de secuencia señal de Env (NL4-3^{nef-/SSR}) poseen ambos una infectividad sustancialmente reducida, siendo el mutante de reemplazo aproximadamente 2 veces a 3 veces menos infeccioso que el virus natural (NL4-3^{WT}), y exhibiendo el mutante de combinación del orden de 50 veces de aumento de infectividad en comparación con el natural. Los resultados se muestran en la Figura 7.

Ejemplo 8

Inducción del efecto citopático

Se infectaron células H9 a una multiplicidad de infección de 3 con cada uno de los virus indicados. Se dejaron proceder las infecciones, dividiendo los cultivos 1:2 cada dos días. A los 6 días después de la infección, se examinaron las células por microscopio óptico y se observó el efecto citopático (CPE). Véase la Figura 8. Como se muestra, las células H9 infectadas con los virus NL4-3^{WT} o NL4-3^{nef-} (ambos contienen la secuencia señal de Env natural) exhibían un inicio rápido del CPE incluyendo muerte celular y formación de sincitios grandes (flecha negras). En

contraposición, las células infectadas con virus NL4-3^{SSR} o NL4-3^{nef-/SSR} (que contienen la secuencia señal de melitina en lugar de la secuencia señal de Env natural) mostraron muy poca señal de CPE a pesar de la replicación de VIH activa (como se mide mediante ELISA de p24 de VIH-1, no mostrado).

5 Ejemplo 9

Construcción de genes quiméricos gag-NE

10 Hemos construido genes quiméricos de *gag* con una selección de secuencias V3 y C3 de todos los clados principales de VIH-1. Se teoriza que los anticuerpos preparados contra estos epítomos lineales múltiples serán capaces de interaccionar no solo con las regiones V3 originales, sino también con cualquier variante menor que pueda haberse generado por infección natural o aquellas que están presentes en VIH, que se transmiten de forma natural por la pobla-
15 ción. Ambas regiones V3 de las proteínas gp120 y Gag contienen los epítomos neutralizantes (NE) así como epítomos de linfocitos T citotóxicos (TCE). Estos epítomos pueden ser capaces de funcionar independientemente como inmu-
nógenos. Se han ligado múltiples secuencias de bucle de V3 a una secuencia de *gag* de VIH-2 para proporcionar un antígeno mayor para expresión y para formar partículas de tipo vírico (VLP) para aumentar el potencial de inducción de efectores citotóxicos. La estrategia de ligar múltiples epítomos de V3 se ilustra en las Figuras 9a y 9b.

20 Hemos construido adenovirus humanos 5 recombinantes defectivos de replicación (rAd) insertando los genes quiméricos gag-V3 y gag-TCE en la región E1a de Ad5. Se amplificaron estos Ad5 recombinantes en células 2P3 humanas que expresan constitutivamente proteínas E1a (véase el Ejemplo 11).

Se ha mostrado que los anticuerpos neutralizantes están dirigidos no solo a los dominios V3, sino también a otras
25 regiones de VIH-1 (Luo *et al.*, *Virology* 179: 874, 1990). De forma interesante, el análisis de neutralización cruzada de diferentes aislamientos víricos sugiere que pueden existir patrones conservados de neutralización entre subtipos de VIH-1. Por ejemplo, algunos sueros de un tipo de individuos infectados con VIH-1 neutralizan todos los subtipos de VIH-1, independientemente de sus clados. Esta demostración de neutralización es el resultado de los epítomos de neutralización conservados tales como los presentes en gp41 (Muster, *et al.*, *J. Virol.* 67: 6642, 1993), o de aquellos
30 epítomos correspondientes al sitio de unión a CD4 en gp120 (Thali, M. *et al.*, *J. Virol.* 66: 5635, 1992). Una presión de selección diferencial, relacionada con la emergencia de variantes de VIH-1, está asociada a la no progresión a largo plazo. Por tanto, la presencia de estas regiones C3 en gp120 es probable que proporcione protección adicional (Wang, W -K. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 6693, 1996). Véase la Figura 9c.

35 Ejemplo 10

Construcción de un gen quimérico gag-TCE

40 Se cree que los CTL específicos de VIH ejercen una presión de selección inmunológica en personas infectadas con VIH. Sin embargo, solo están disponibles unos pocos fragmentos de datos respecto a los efectos de esta limitación sobre la variación de secuencia vírica *in vivo*. Se han seleccionado los epítomos de linfocitos T citotóxicos (TCE) principales de gp120, gp41, Nef, RT y Rev de VIH-1 y se han ligado al gen *gag* de VIH-1, para crear un gen *gag-TCE* quimérico que puede expresarse por un adenovirus recombinante. La Figura 10a muestra la construcción del gen *gag*
45 de VIH-1 con dos TCE diferentes a partir de gp120, dos TCE diferentes de Nef y un TCE de gp41 de la cepa VIH-1_{HXB2}. Además, se ha construido también otro gen quimérico *gag-TCE* de VIH-1 que expresará TCE de proteínas RT, Tat y Rev de VIH-1_{HXB2}. Se han construido adenovirus humanos recombinantes (rAd) defectivos de replicación que portan estos *gag-NE* de VIH-2 y *gag-TCE* de VIH-1 como parte de una vacuna de VIH/SIDA.

50 Ejemplo 11

Generación de adenovirus recombinantes defectivos de replicación que contienen gag-NE de VIH-2 y gag-TCE de VIH-1 como parte de una vacuna de VIH/SIDA

55 Hemos modificado las secuencias de ADN terminal de los módulos génicos que contienen las secuencias de co-dificación de *gag-NE* de VIH-2 y *gag-TCE* de VIH-1 flanqueados por el sitio de restricción BamHI para insertar estos genes en un vector adenovírico. Los protocolos generales a usar para la manipulación de vectores adenovíricos se han descrito anteriormente (Graham, *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36: 59, 1977). Se ha usado el sistema simplificado para generar
60 adenovirus recombinantes según Graham y colaboradores (He, T. -C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 2509, 1998). Esta nueva técnica requiere una manipulación enzimática mínima, al usar recombinación homóloga en bacterias en lugar de en células eucarióticas. Se ha adaptado esta nueva estrategia y se ha encontrado que es un sistema extremadamente eficaz para generar adenovirus recombinantes. Se han construido vectores adenovíricos defectivos de replicación con insertos de genes quiméricos *gag-NE* de VIH-2 o *gag-TCE* de VIH-1 en la región E1a de adenovirus
65 humanos (Ad5) usando técnicas que se habían empleado previamente. Se han generado exitosamente tres adenovirus recombinantes defectivos de replicación con *gag-NE* de VIH-2 y dos adenovirus recombinantes defectivos de replicación con *gag-TCE* de VIH-1. Se ha identificado la expresión de la proteína quimérica Gag-NE de VIH-2 y la formación de partículas de tipo virus de Gag-NE mediante análisis de inmunoprecipitación y transferencia Western usando el an-

ES 2 354 830 T3

ticuerpo anti-Gag (Luo, L, Li, Y y Kang C. Y. "Budding and secretion of HIV Gag-Env virus-like particles from recombinant human adenovirus infected cells", *Virus Research* 92: 75-82, 2003).

Se propagaron los adenovirus recombinantes defectivos de replicación que portan los genes quiméricos *gag-NE* de VIH-2 o *gag-TCE* de VIH-1 en la región E1a de adenovirus humano 5 en células 293 que expresan la proteína E1a constitutivamente. Estos adenovirus recombinantes se replican bien en células 293 y fue fácil preparar 10^{12} unidades de formación de placa (UFP) después de purificar por CsCl.

10 Ejemplo 12

Protocolo de vacunación preventiva para el ensayo de una vacuna de VIH-1/SIDA de sensibilización-refuerzo novedosa

15 Los sujetos de ensayo para este estudio de vacuna serán 18 macacos *Rhesus* macho (*Macaca mulatto*).

I. *Antígeno y coadyuvante*: Se usan los siguientes antígenos y adyuvantes.

20 1. *Antígeno de virus entero inactivado*: Se producirá un VIH-1 de clado B modificado genéticamente (NL4-3^{nef-/SSR}), se purificará y experimentará inactivación por AT-2. Para inmunización, animales específicos recibirán 500 μ g de antígeno suspendido en 500 μ l de PBS (formulado con 500 μ l de coadyuvante oligodesoxinucleótido de CpG (ODN)).

25 2. *Adenovirus recombinante defectivo de replicación (rAd)*: Se prepararán y purificarán disoluciones madre de alto título de cinco vectores adenovíricos recombinantes que expresan el gen *gag* de VIH-1 en asociación con una serie de epítomos neutralizantes y de linfocitos T seleccionados. Para inmunizar, animales específicos recibirán 10^9 ufp de cada virus recombinante (1×10^9 ufp x 5 virus recombinantes = 5×10^9 ufp) en un volumen total de 500 μ l (formulado con 500 μ l de coadyuvante).

30 3. *Coadyuvante de oligodesoxinucleótido de CpG (ODN)*: Se adquirieron oligodesoxinucleótidos de fosforotioato purificados de secuencia 5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3' (SEC ID N° 26, secuencia sujeta a cambio). Se suspenderán 500 μ g de este ODN en un volumen total de 500 μ l de PBS para formulación con cada antígeno descrito anteriormente.

35 II. *Inmunización*: Se dividirán los animales en 3 grupos (designados grupos 1-3), conteniendo cada grupo un total de 6 macacos *Rhesus*. Se enumera a continuación el programa de inmunización para cada grupo de animales, incluyendo momento de inoculación, tipo y cantidad de antígeno/coadyuvante y vía de inmunización intramuscular (im).

40 Grupo 1

Semana 0- 500 μ l de antígeno de virus completo inactivado con 500 μ l de coadyuvante CpG i.m.

Semana 4- 500 μ l de antígeno de rAd con 500 μ l de coadyuvante CpG i.m.

45

Semana 8- 500 μ l de antígeno de rAd con con 500 μ l de coadyuvante CpG i.m.

Semana 16- 500 μ l de antígeno de rAd con 500 μ l de coadyuvante CpG i.m.

50 Grupo 2

Semana 0- 500 μ l de antígeno de rAd con 500 μ l de coadyuvante CpG i.m.

Semana 4- 500 μ l de antígeno de rAd con 500 μ l de coadyuvante CpG i.m.

55

Semana 8- 500 μ l de antígeno de rAd con con 500 μ l de coadyuvante CpG i.m.

Semana 16- 500 μ l de antígeno de virus completo inactivado con 500 μ l de coadyuvante CpG i.m.

60 Grupo 3

El grupo 3 actuará como grupo de control no inmunizado con los fines de estos experimentos.

65 III. *Exposición*: A las 24 semanas después de la inmunización, se expondrán todos los animales a una mezcla de 100 TCID₅₀ de VIHS^{SF162-P4} y 100 TCID₅₀ de VIHS^{89,6} mediante inyección untravenosa.

IV. *Recogida de muestras*: Las semanas -1, 0, 4, 6, 8, 10, 16, 18 y 20 después de la inmunización (p.i.), se recogerá sangre y se analizará la respuesta inmunitaria. Las semanas 1, 2 y 5 después de la exposición (p.c.), y mensualmente

ES 2 354 830 T3

después de ello, se recogerá sangre y se almacenará para estudios de carga vírica y respuesta inmunitaria. A las 24 semanas p.c., se sacrificarán los animales y se recogerán sangre y tejidos para la determinación de la carga vírica y los anticuerpos neutralizantes.

5 V. *Análisis de la respuesta inmunitaria*: Para valorar la respuesta inmunitaria generada por ambas vacunaciones y durante el periodo de exposición, se ensayará en todas las muestras lo siguiente:

1. *Producción de anticuerpo anti-VIH*: Se analizará en muestras de suero el nivel de anticuerpos anti-Env y Gag de VIH-1 mediante ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA).

10 2. *Proliferación de linfocitos T específicos de VIH*: Se medirán las respuestas proliferativas de linfocitos T específicos de VIH-1 usando VIH-1 completo inactivo como estimulante antigénico.

15 3. *Ensayo de linfocitos T citotóxicos*: Se valorará en los PBMC efectores estimulados por antígeno la actividad citotóxica específica de VIH-1/VHIS.

VI. *Análisis del efecto protector de la vacunación*: Para valorar la capacidad del protocolo de vacunación de proteger frente a la exposición vírica, se ensayará adicionalmente en todas las muestras tomadas p.c. lo siguiente:

20 1. *Carga vírica (ARNv)*: Se analizarán en las muestras de plasma los niveles de ARNv mediante un ensayo de ADN ramificado cuantitativo.

25 2. *Relación de linfocitos T CD4:CD8*: Se controlarán los niveles de linfocitos T tanto CD4 como CD8 p.c. como marcador potencial de SIDA.

3. *Ensayo de neutralización de anticuerpos*: Se ensayará en muestras de suero termoinactivado su capacidad de inhibir la entrada del virus de exposición en la línea celular informadora sMAGI.

30 4. *Secreción de IFN- γ* : Se determinará el número de células secretoras de IFN- γ mediante ensayo ELISPOT.

5. *Producción de citocinas*: Se controlará la inducción de la expresión de ARNm de citocina mediante PCR por transcriptasa inversa instantánea. Se valorará la presencia de las citocinas IFN- α , IFN- β , Mx, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-12, IL-6, TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 β y MDC.

35 *Equivalentes*

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

REIVINDICACIONES

1. Un lentivirus recombinante que tiene un péptido señal de glucoproteína gp120, en el que dicho péptido señal de glucoproteína 120 se selecciona del grupo constituido por las secuencias polipeptídicas enumeradas como SEC ID N° 3-6.

2. El lentivirus recombinante de la reivindicación 1, lentivirus recombinante que se vuelve avirulento mediante la delección de una cantidad suficiente del gen *nef*.

3. El lentivirus recombinante de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que es un virus de la inmunodeficiencia humana recombinante.

4. El lentivirus recombinante de la reivindicación 3, siendo dicho virus de la inmunodeficiencia humana recombinante es VIH-1.

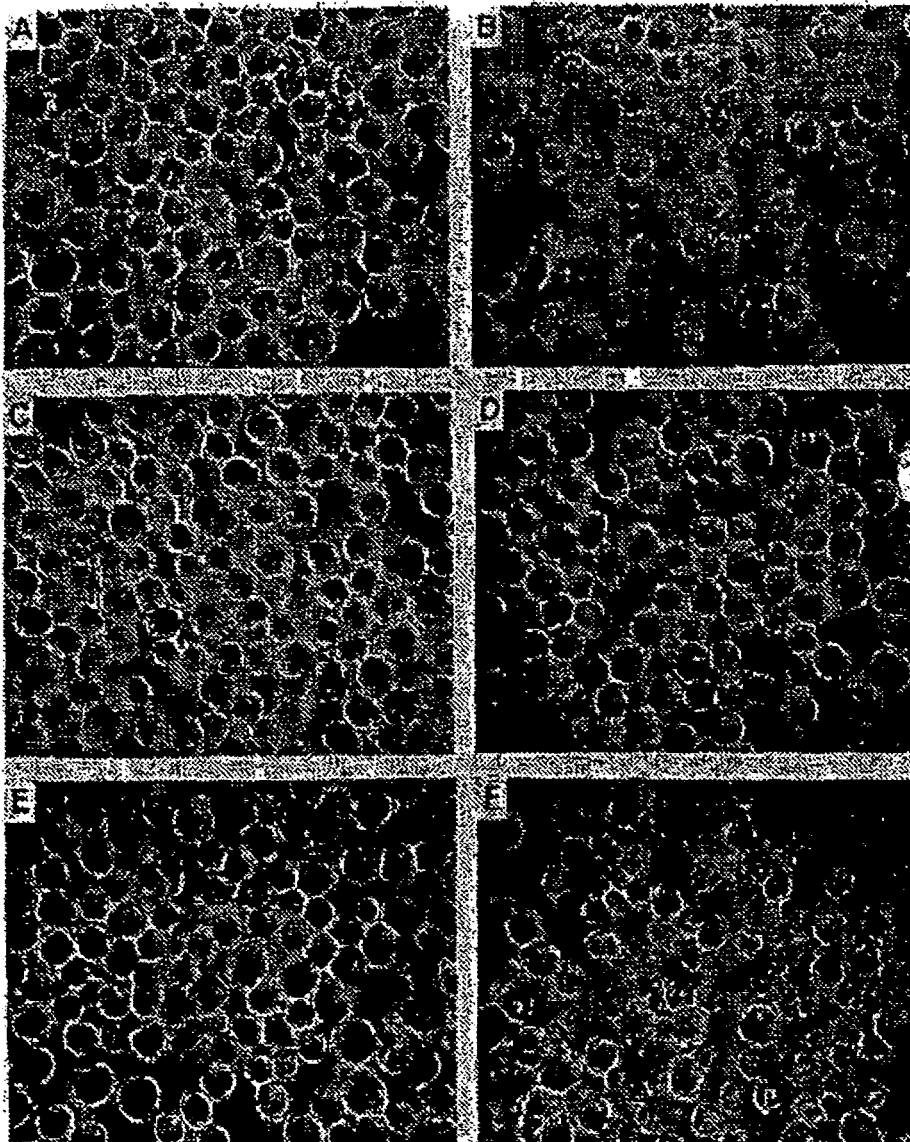
5. El lentivirus recombinante de la reivindicación 3, lentivirus recombinante que es VIH-1 vuelto avirulento mediante la delección de una cantidad suficiente del gen *nef*.

6. Una vacuna que comprende un lentivirus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

7. La vacuna de la reivindicación 6, comprendiendo dicha vacuna adicionalmente un coadyuvante.

8. La vacuna de la reivindicación 6 o la reivindicación 7 para uso en la prevención o el tratamiento de una infección lentivírica en un paciente necesitado de ello.

FIGURA 1



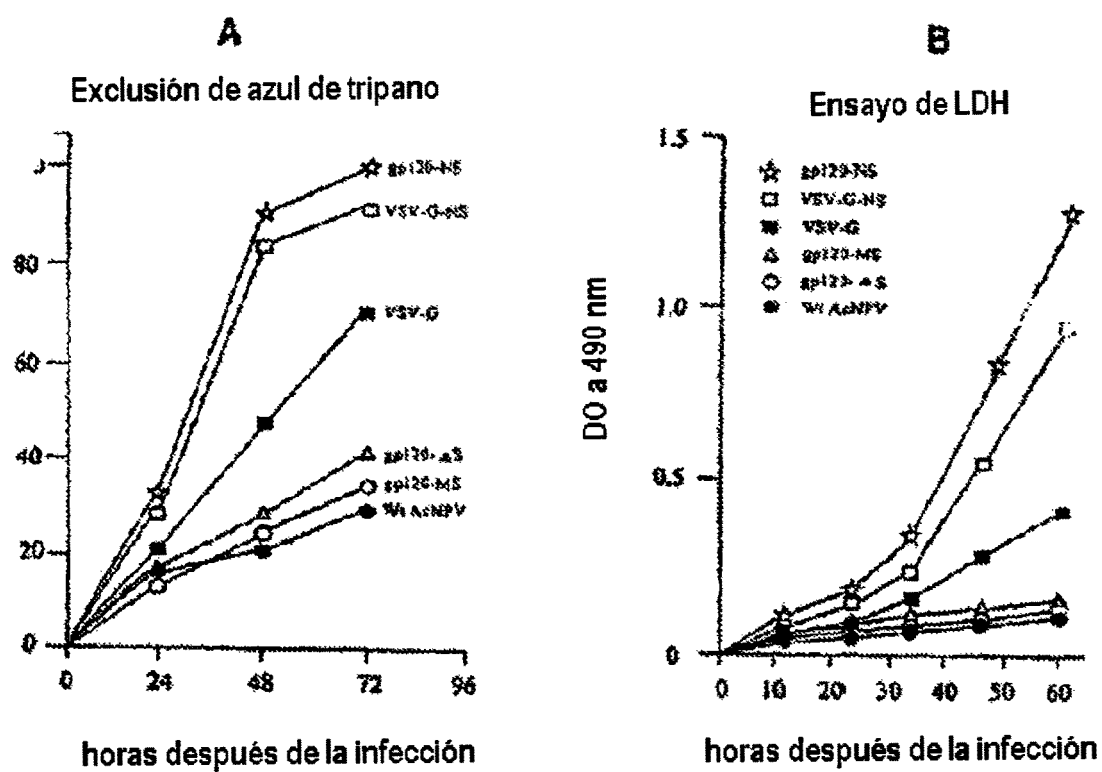


FIGURA 2

FIGURA 3

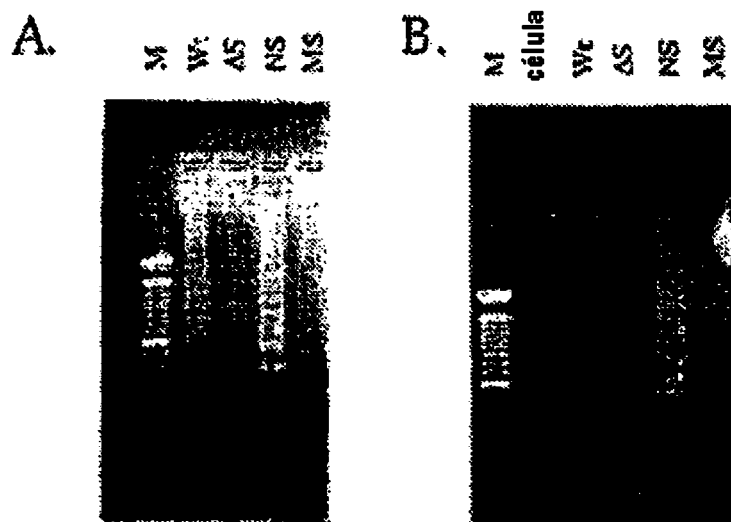


FIGURA 4

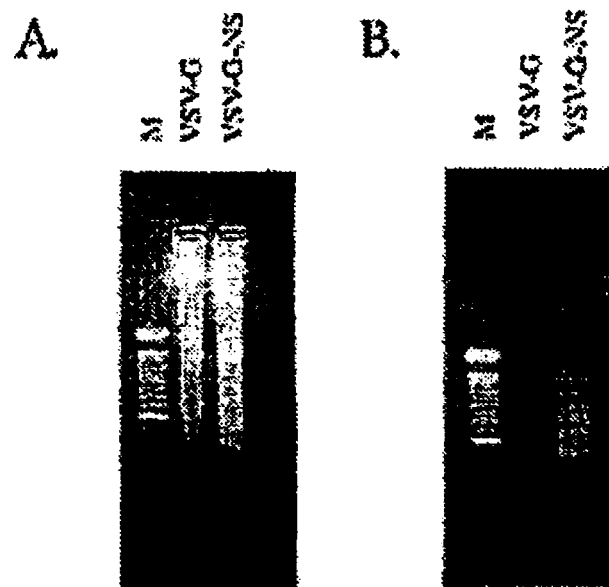


FIGURA 5

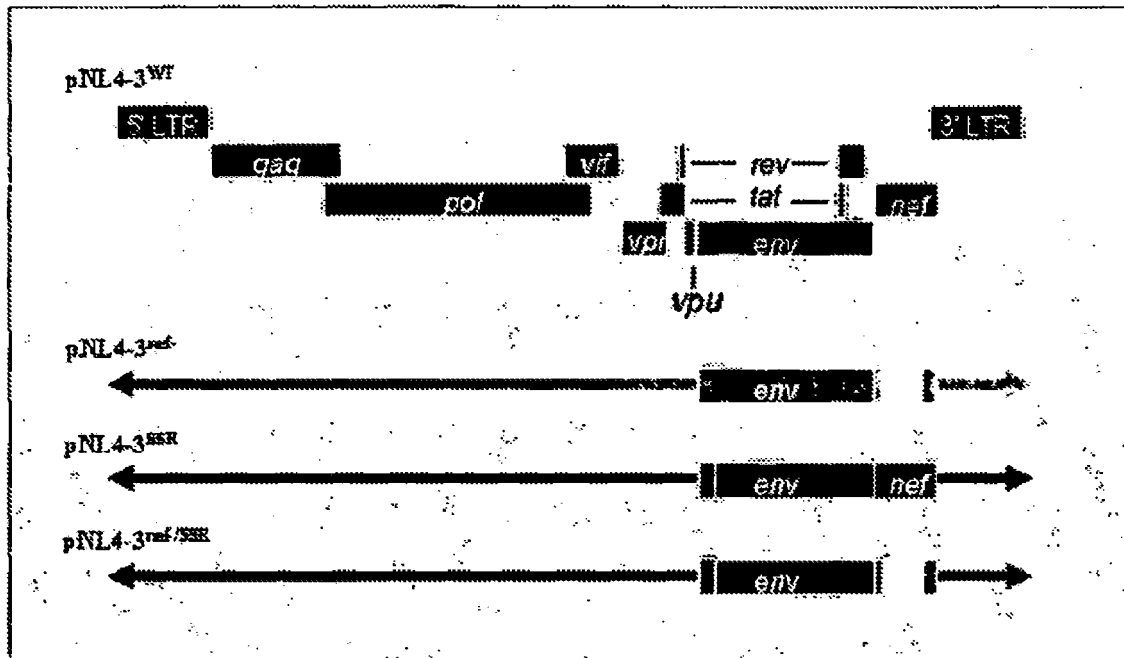


FIGURA 6

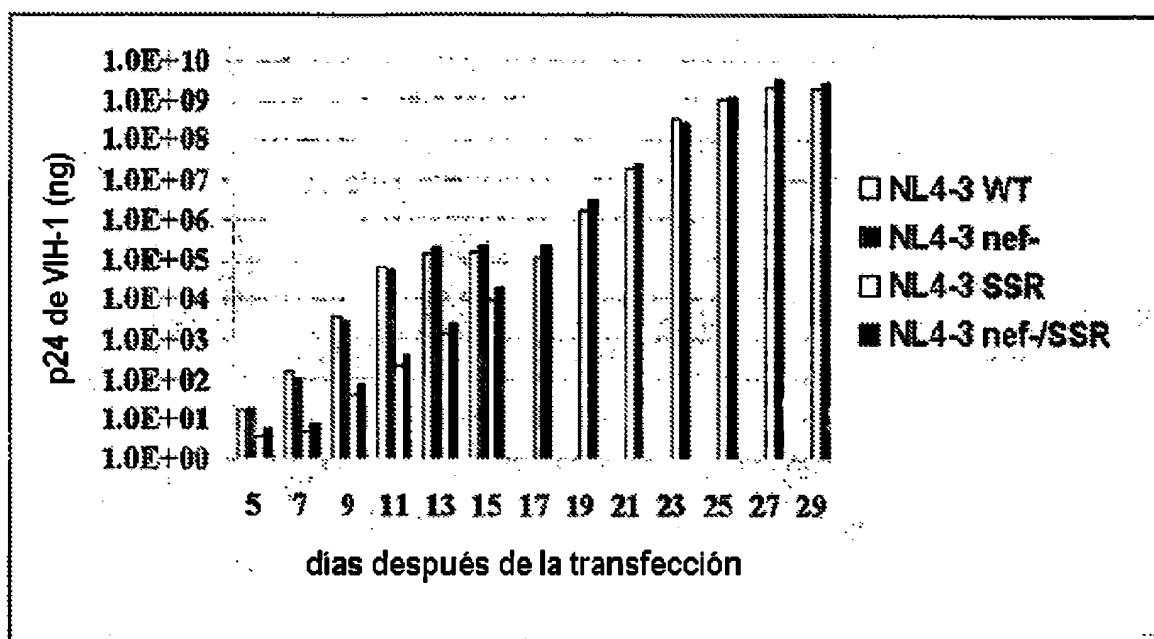
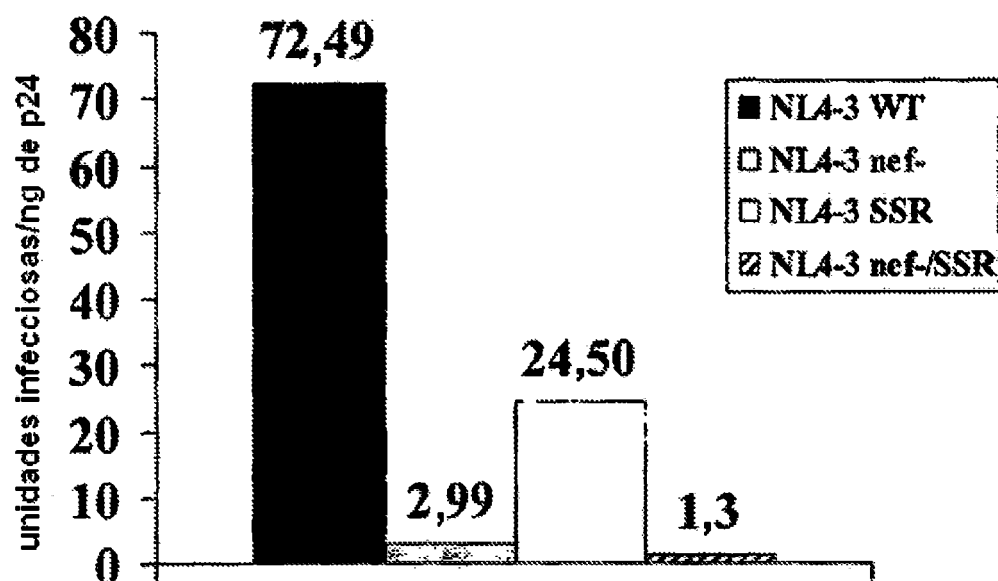


FIGURA 7

Células A3.01



Células H9

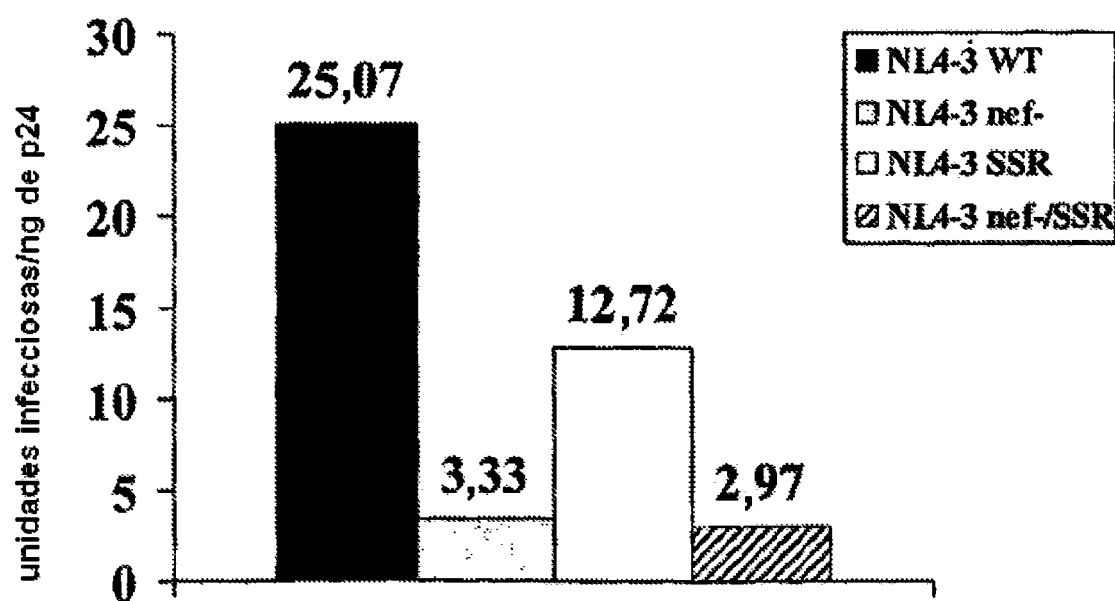


FIGURA 8

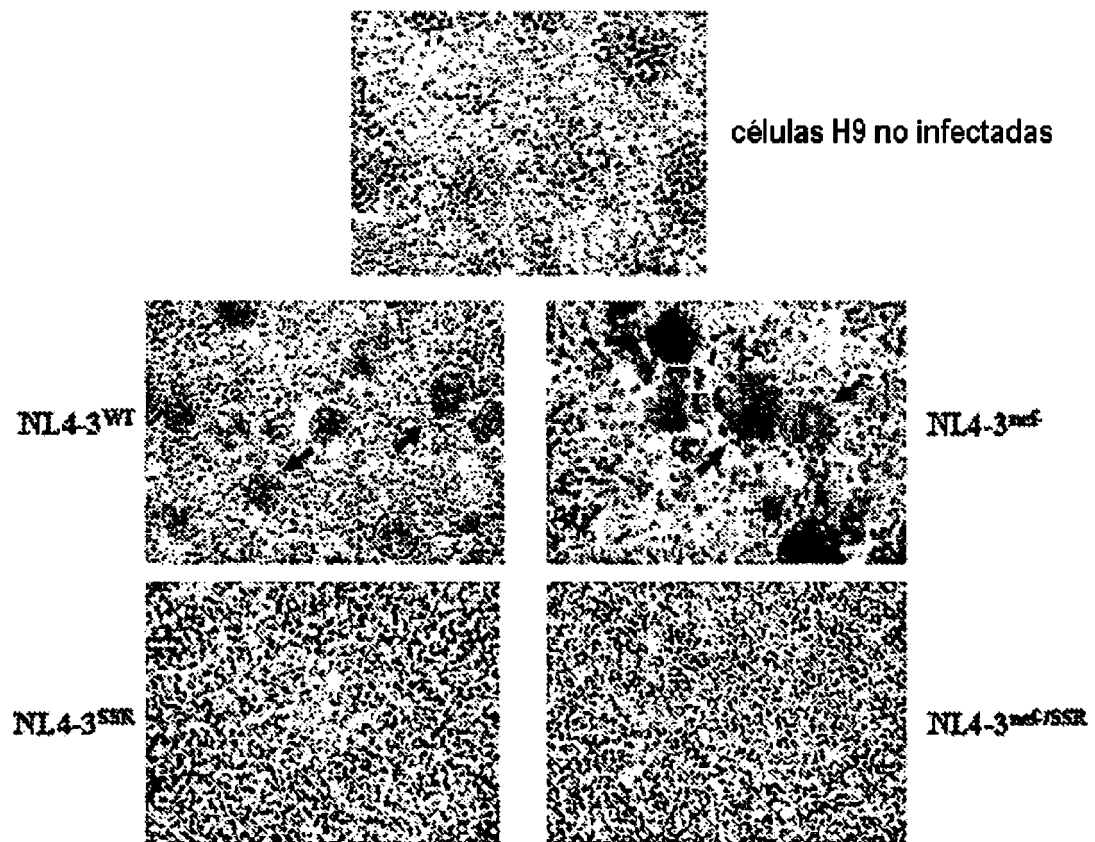
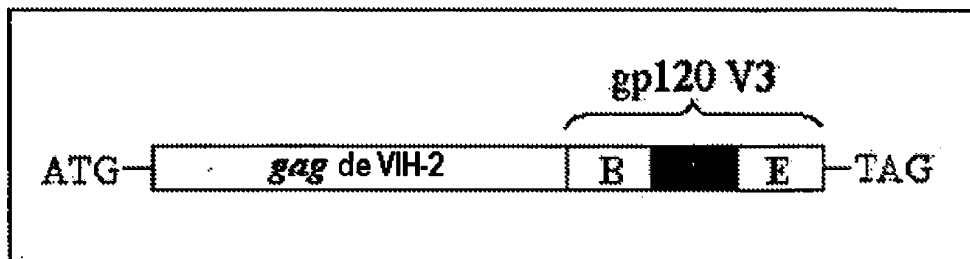


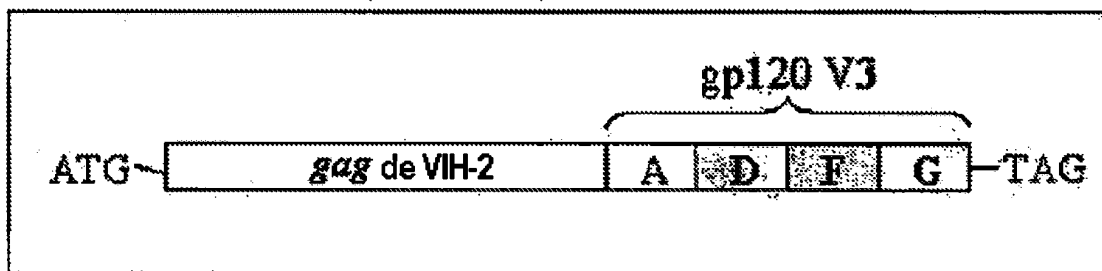
FIGURA 9



[a] VLP quimérica de *gag*-V3 (BCE) de VIH-2

clado B: SIPIGPGRAFYATGD (SEC ID N° 27), clado C: SVRIGPGQTFYATGA (SEC ID N° 28),

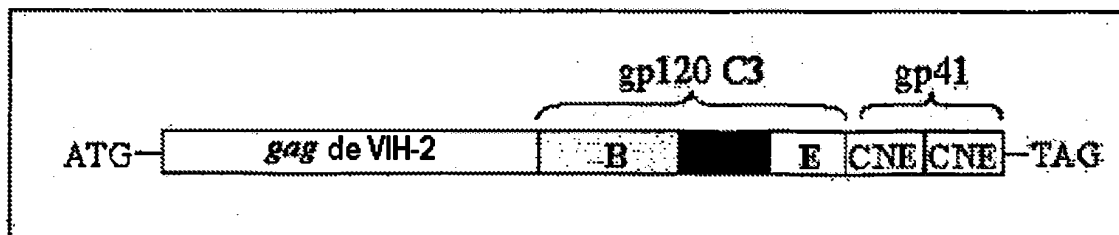
clado E: SIRIGPGQVFYRTGD (SEC ID N° 29)



[b] VLP quimérica de *gag*-V3 (ADFG) de VIH-2

clado A: SVRIGPGQTFYATGD (SEC ID N° 30), clado D: RTPIGLGQALYTTRD (SEC ID N° 31),

clado F: RISLGPGRVFTAGE (SEC ID N° 32), clado G: SINLGPGQAIYATGA (SEC ID N° 33)



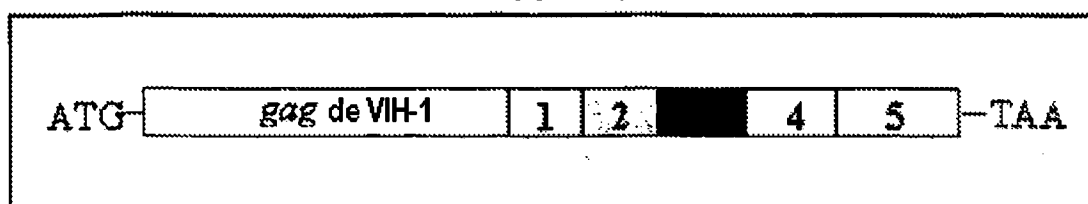
[c] VLP quimérica de *gag*-C3 (BCE)CNE de VIH-2

clado B: PCRIKQIVNMWQEVGKAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLTRD (SEC ID N° 34), clado C:

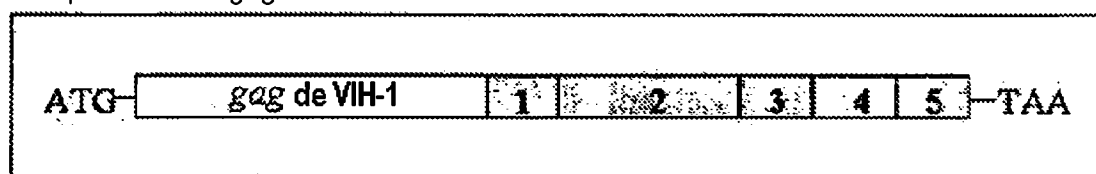
RAMYAPPIAGNITCKSNIRS (SEC ID N° 35), clado E: QAMYAPPISGKIN (SEC ID N° 36),

epítipo neutralizante conservado (CNE) de gp41: ELDKWA (SEC ID N° 37)

FIGURA 10

[a] VLP quimérica de *gag-TCE* de VIH-1

n° 1: gp41HXB2	(337-345)	IPRRIRQGL (SEC ID N° 38)
n° 2: NefHXB2	(92-100)	KEKGGLDGL (SEC ID N° 39)
n° 3: NefHXB2	(128-137)	TPGPGVRYPL (SEC ID N° 40)
n° 4: gp120HXB2	(584-592)	ERYLKDQQLL (SEC ID N° 41)
n° 5: gp120HXB2	(30-46)	AAENLWVTVYYGVPVWK (SEC ID N° 42)

[b] VLP quimérica de *gag-TCE* de VIH-1

n° 1: RTHXB2	(309-317)	ILKEPVHGV (SEC ID N° 43)
n° 2: RTHXB2	(171-190)	FRKQNPDIYIYQYMDDLYVG (SEC ID N° 44)
n° 3: RTHXB2	(156-166)	AIFQSSMTK (SEC ID N° 45)
n° 4: TatHXB2	(2-11)	EPVDPRLEPW (SEC ID N° 46)
n° 5: RevHXB2	(69-77)	PAEPVPLQL (SEC ID N° 47)