

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 507**

51 Int. Cl.:
C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09000063 .9**
96 Fecha de presentación: **15.06.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **2116605**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.11.2009**

54 Título: **Plásmido que tiene tres unidades transcripcionales completas y composiciones inmunogénicas para inducir una respuesta inmunitaria contra el VIH**

30 Prioridad:
17.06.2004 US 580438 P
03.11.2004 US 624983 P
16.03.2005 US 662275 P

73 Titular/es:
**WYETH LLC
FIVE GIRALDA FARMS
MADISON, NJ 07940, US**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.08.2012

72 Inventor/es:
**Sidhu, Maninder K.;
Eldridge, John H.;
Egan, Michael y
Israel, Zimra**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.08.2012

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 386 507 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

Plásmido que tiene tres unidades transcripcionales completas y composiciones inmunogénicas para inducir una respuesta inmunitaria contra el VIH

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a plásmidos, a composiciones inmunogénicas y a procedimientos para mejorar las respuestas inmunitarias profilácticas y terapéuticas contra antígenos.

Antecedentes de la invención

10 La inmunización usando composiciones inmunogénicas basadas en ADN plasmídico es una herramienta poderosa que es útil para desarrollar estrategias para prevenir o tratar enfermedades infecciosas o en el tratamiento de procesos de enfermedades en curso. La inmunización con ADN plasmídico se ha sometido ampliamente a ensayo en modelos animales donde se ha encontrado que es eficaz induciendo respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales contra una amplia diversidad de agentes infecciosos y antígenos tumorales. Véase Donnelly JJ, y col., Ann. Rev. Immunol.; 15: 617-48 (1997); Iwasaki A, y col., J Immunol 158 (10): 4591-601 (1997); Wayne, C. L y Bennett M., Crit. Rev. Immunol., 18: 449-484 (1998).

15 Una ventaja importante de la inmunización con ADN plasmídico es que los genes pueden clonarse, modificarse y situarse en un posible vector de expresión de ADN plasmídico de tal manera que permite realizar, de manera pertinente, modificaciones post-transcripcionales, niveles de expresión, tránsito intracelular y presentación de antígenos apropiados. Los vectores de ADN plasmídico, útiles para la inmunización con ADN, son similares a los empleados para la administración de genes indicadores o terapéuticos. La inmunización basada en ADN plasmídico
20 utiliza la maquinaria celular del sujeto para generar la proteína extraña y estimula el sistema inmunitario del sujeto para crear una respuesta inmunitaria frente al antígeno de proteína. Dichos vectores de ADN plasmídico generalmente contienen elementos reguladores transcripcionales eucariotas que son fuertes elementos promotores/potenciadores virales que dirigen altos niveles de expresión de genes en una amplia variedad de células huésped y una secuencia de poliadenilación para garantizar la terminación apropiada del ARNm expresado. Aunque
25 los elementos reguladores virales son ventajosos para su uso en vectores de ADN plasmídico, el uso de vectores virales no modificados para expresar los genes pertinentes puede provocar problemas de seguridad y técnicos no encontrados con el ADN plasmídico.

30 Sin embargo, los diseños actuales de ADN plasmídico, limitan la expresión de genes múltiples a partir de una estructura de vector en una sola célula diana. Por lo tanto, para transferir y expresar genes múltiples, se requiere la co-transfección de las células diana con distintos plásmidos. Cuando las células deben co-transfectarse con plásmidos múltiples, es difícil conseguir una expresión óptima de todos los genes codificados, especialmente cuando el plásmido va a usarse *in vivo*. Los intentos previos para superar estas limitaciones y expresar dos o más genes incluyen el uso de lo siguiente: vectores virales, transcritos de corte y empalme alternativamente múltiples de ADN proviral, fusión de genes, vectores bicistrónicos que contienen secuencias IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) de virus y plásmidos de expresión duales. Véase Conry R. M. y col., Gene Therapy. 3(1): 67-74, (1996);
35 Chen TT. y col., Journal of Immunology. 153(10): 4775-87, (1994); Ayyavoo V. y col., AIDS. 14(1): 1-9, (2000); Amara R. R. y col., Vaccine. 20(15): 1949-55, (2002); Singh G, y col., Vaccine 20: 1400-1411 (2002).

40 Ninguno de los diseños de plásmidos existentes han resuelto el problema de proporcionar un ADN plasmídico que sea adecuado para expresar más de dos fases de lectura abierta independientes en composiciones inmunogénicas humanas. En el caso de vectores bicistrónicos, en muchos casos, sólo se expresa con fuerza el primer gen transcrito aguas arriba del IRES bien desde un plásmido o bien desde un vector retroviral. Véase Sugimoto Y., y col., Hum. Gen. Ther. 6: 905-915 (1995); Mizoguchi H, y col., Mol. Ther. 1: 376-382 (2000). Por otro lado, los casetes de expresión dual, tienen mejor resultado. Por ejemplo, se ha observado que, cuando se compara con plásmidos individuales, la co-administración de ADNc para B7-1 y antígeno carcinoembrionario humano (ACH) con un solo plásmido que tiene dos casetes independientes da como resultado respuestas inmunitarias muy superiores. Véase
45 Conry R.M. y col., Gene Therapy. 3(1): 67-74, (1996). Sin embargo, en este caso los dos casetes independientes implicados consisten en secuencias homólogas promotoras del CMVH y de poli-adenilación de la hormona del crecimiento bovina (HCB). La presencia de secuencias homólogas dentro de un plásmido hace que el plásmido sea inadecuado para su uso en composiciones inmunogénicas basadas en ADN, porque la presencia de secuencias homólogas dentro de la estructura del plásmido aumenta la posibilidad de recombinación entre las secuencias repetidas y da como resultado la inestabilidad del vector.
50

Otra restricción que se afronta cuando se diseña un vector de ADN plasmídico para su uso en una composición inmunogénica humana tiene que ver con el tamaño y la organización del plásmido. Dado que se añaden unidades transcripcionales a un plásmido, puede surgir interferencia entre unidades transcripcionales, por ejemplo, en forma
55 de impedimento estérico. El complejo de transcripción de ARN de las células debe ser capaz de unirse a los sitios múltiples sobre un plásmido de unidad politranscripcional, desenrollar el ADN y transcribir eficazmente los genes. Simplemente haciendo que el plásmido sea mayor no es necesariamente la mejor solución por diversas razones que incluyen inestabilidad del plásmido, dificultad en la fabricación del plásmido y, lo que es más importante,

consideraciones de dosificación. Para diseñar un vector mejorado de unidad transcripcional múltiple de ADN plasmídico, ha de tenerse en cuenta la ubicación de los genes, la separación y el sentido de la transcripción de las fases de lectura abierta, los niveles de expresión, la facilidad de fabricación, la seguridad y la dosis final del vector necesaria para inmunizar al sujeto.

- 5 Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de diseños creativos de vectores no virales, de ADN plasmídico, para su uso en la expresión de proteínas múltiples a partir de patógenos complejos como el VIH, en el que se requiere una amplia respuesta inmunitaria contra muchas proteínas. Además, existe una necesidad de composiciones inmunogénicas polivalentes, basadas en ADN, que puedan dirigir la expresión de altos niveles de genes múltiples del VIH dentro de una sola célula.

10 **Sumario de la invención**

En una realización, la presente invención proporciona un plásmido de ADN que comprende: (a) una primera unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un primer promotor y una primera señal de poliadenilación; (b) una segunda unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un segundo promotor y una segunda señal de poliadenilación; (c) una tercera unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un tercer polipéptido unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un tercer promotor y una tercera señal de poliadenilación; en el que cada dicho primer, segundo y tercer promotor deriva de diferentes unidades transcripcionales; y en el que cada dicha primera, segunda y tercera señal de poliadenilación deriva de diferentes unidades transcripcionales. En otra realización de la invención, el primer, segundo y tercer polipéptido se expresa en una célula eucariota.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica para inducir una respuesta inmunitaria contra antígenos seleccionados en un huésped vertebrado, comprendiendo la composición inmunogénica: (a) un plásmido de ADN que comprende (i) una primera unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un primer promotor y una primera señal de poliadenilación; (ii) una segunda unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un segundo promotor y una segunda señal de poliadenilación; (iii) una tercera unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un tercer polipéptido unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un tercer promotor y una tercera señal de poliadenilación; en el que cada primer, segundo y tercer promotor deriva de diferentes unidades transcripcionales; en el que cada primera, segunda y tercera señal de poliadenilación deriva de diferentes unidades transcripcionales; y (b) al menos uno de un diluyente, un adyuvante, un transportador o un agente facilitador de la transfección, farmacéuticamente aceptable. En una realización particular de la invención, el agente facilitador de la transfección es la bupivacaína. En otra realización de la invención, el primer, segundo y tercer polipéptido se expresa en una célula eucariota.

En determinadas realizaciones de la invención, la composición inmunogénica se administra a un mamífero usando electroporación *in vivo*. En una realización particular, la electroporación implica estimular eléctricamente el músculo con una corriente eléctrica que tiene una intensidad de campo en el intervalo de desde aproximadamente 25 V/cm a aproximadamente 800 V/cm.

En otra realización más, la presente invención proporciona un procedimiento de inmunización de un huésped vertebrado contra antígenos seleccionados que comprende administrar al huésped vertebrado una composición inmunogénica que comprende: (a) un plásmido de ADN que comprende (i) una primera unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un primer promotor y una primera señal de poliadenilación; (ii) una segunda unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un segundo promotor y una segunda señal de poliadenilación; (iii) una tercera unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un tercer polipéptido unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un tercer promotor y una tercera señal de poliadenilación; en el que cada primer, segundo y tercer promotor deriva de diferentes unidades transcripcionales; y en el que cada primera, segunda y tercera señal de poliadenilación deriva de diferentes unidades transcripcionales; y (b) al menos uno de un diluyente, un adyuvante, un transportador o un agente facilitador de la transfección, farmacéuticamente aceptable. En otra realización de la invención, el primer, segundo y tercer polipéptido se expresa en una célula eucariota.

En otra realización de la invención, los antígenos seleccionados derivan del grupo que consiste en una bacteria, un virus, un alérgeno y un tumor. En una realización particular, los antígenos seleccionados son antígenos virales derivados de un virus seleccionado de un grupo que consiste en el virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la inmunodeficiencia de Simios, virus sincitial respiratorio, virus paragripal de tipo 1, virus paragripal de tipo 2, virus paragripal de tipo 3, virus gripal, virus del herpes simple, citomegalovirus humano, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, papilomavirus humano, poliovirus, rotavirus y coronavirus (SARS).

- En otra realización más de la invención, los antígenos seleccionados son antígenos bacterianos derivados de una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *Haemophilus influenzae* (tanto tipificable como no tipificable), *Haemophilus somnus*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Bordetella pertussis*, *Alloicoccus otiditis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium aviumMycobacterium intracellulare complex*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium tetani*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma gallisepticum*.
- En una realización de la invención, el huésped vertebrado se selecciona del grupo que consiste en mamíferos, aves y peces. En una determinada realización de la invención, el huésped vertebrado es un mamífero seleccionado del grupo que consiste en especies humana, bovina, ovina, porcina, equina, canina y felina.
- En una realización de la invención, el primer, segundo y tercer promotor son activos en células eucariotas. En otras realizaciones de la invención, el primer, segundo y tercer promotor se selecciona del grupo que consiste en el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMVH), el promotor del citomegalovirus de simio (CMVS), el promotor del citomegalovirus murino (CMVM), el promotor 1 asociado a latencia (LAP1) del virus del herpes simple (VHS), el promotor del virus de simio 40, el promotor del factor de elongación humano 1 alfa y el promotor de desmina específico de células musculares humanas.
- En determinadas realizaciones de la invención, la primera, segunda y tercera señal de poliadenilación se selecciona del grupo que consiste en la señal poli(A) de la beta-globina de conejo, poliA sintética, poli A de timidina quinasa del VHS, poli A de alfa globina humana, poli A del VS40, poli A de la beta-globina humana, poli A de poliomavirus y poli A de la hormona del crecimiento bovina.
- En una realización particular de la invención, la primera unidad transcripcional expresa una proteína de fusión gag-pol a partir de una fusión de los genes gag y pol del VIH. En una realización de la invención, la fusión de los genes gag y pol del VIH o gen *gag-pol* deriva del aislado HXB2 del VIH.
- En una realización determinada de la invención, la segunda unidad transcripcional expresa una proteína de envuelta a partir del gen de envuelta del VIH. En una realización particular de la invención, el gen de envuelta deriva de un aislado primario 6101 del VIH.
- En una realización específica de la invención, la tercera unidad transcripcional expresa una proteína de fusión nef, tat y vif (NTV) a partir de una fusión de los genes *nef*, *tat* y *vif* (*ntv*) del VIH. En una realización particular de la invención, la fusión de los genes *nef*, *tat* y *vif* del VIH o gen *ntv* deriva del aislado NL4-3 del VIH.
- En una realización específica de la invención, en un plásmido con tres unidades transcripcionales, el sentido de la transcripción para la primera unidad transcripcional está en sentido opuesto al sentido de la transcripción de la segunda unidad transcripcional. En otra realización de la invención, el sentido de la transcripción para la primera unidad transcripcional está en sentido opuesto al sentido de la transcripción de la tercera unidad transcripcional.
- En una determinada realización de la invención, la invención proporciona un plásmido con tres unidades transcripcionales, que adicionalmente comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación. En una realización, el marcador de selección se selecciona del grupo que consiste en genes de resistencia a kanamicina, genes de resistencia a ampicilina, genes de resistencia a tetraciclina, genes de resistencia a higromicina y genes de resistencia a cloranfenicol. En otra realización, la localización del marcador de selección se selecciona del grupo que consiste en región espaciadora 1, región espaciadora 2 y región espaciadora 3. En una realización específica, la localización del marcador de selección es la región espaciadora 2.
- En otra realización de la invención, la invención proporciona un plásmido con tres unidades transcripcionales, que adicionalmente comprende un origen de replicación bacteriano. En otra realización, la localización del origen de replicación se selecciona del grupo que consiste en la región espaciadora 1, región espaciadora 2 y región espaciadora 3. En una realización específica, la localización del marcador de selección es la región espaciadora 3. En una realización particular, el origen de replicación es el origen de replicación del pUC.
- En una realización de la invención, la invención proporciona un plásmido con tres unidades transcripcionales, en el que el plásmido tiene un tamaño total de menos de aproximadamente 15 pares de kilobases. En otra realización de la invención, la región espaciadora es menor de aproximadamente 400 pares de bases, la región espaciadora 2 es menor de aproximadamente 1100 pares de bases y la región espaciadora 3 es menor de aproximadamente 1100 pares de bases.
- En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica para inducir una respuesta inmunitaria contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en un huésped vertebrado, comprendiendo dicha composición inmunogénica: (a) un primer plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una

secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión gag-pol del VIH, en el que dicha única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (b) un segundo plásmido de ADN que comprende (i) una primera unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión nef-tat-vif del VIH unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un primer promotor y una primera señal de poliadenilación; (ii) una segunda unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de envuelta del VIH unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un segundo promotor y una segunda señal de poliadenilación; en el que cada dicho primer y segundo promotor deriva de diferentes unidades transcripcionales; y en el que cada dicha primera y segunda señal de poliadenilación deriva de diferentes unidades transcripcionales; y en el que el sentido de la transcripción de dicha primera unidad transcripcional está en sentido opuesto de la dirección de transcripción de dicha segunda unidad transcripcional; o en el que el sentido de la transcripción de dicha primera unidad transcripcional está en el mismo sentido de la dirección de la transcripción de dicha segunda unidad transcripcional y dicha primera y segunda unidad transcripcional están separadas por una región espaciadora de al menos un par de kilobases; y (c) al menos uno de un diluyente, un transportador o un agente facilitador de la transfección, farmacéuticamente aceptable. En una realización particular de la invención, el agente facilitador de la transfección es bupivacaína. En una realización particular, el promotor sobre el primer plásmido es el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMVH), la señal de poliadenilación sobre el primer plásmido es la señal de poliadenilación poli A de la hormona del crecimiento bovina y el primer plásmido de ADN codifica un polipéptido de fusión gag-pol del VIH, en el que la fusión de los genes gag-pol del VIH o gen gag-pol deriva del aislado HXB2 del VIH. En una determinada realización, el primer promotor sobre el segundo plásmido es el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMVH) y la primera señal de poliadenilación sobre el segundo plásmido es la señal de poliadenilación poli A del VS40 y el polipéptido es una proteína de fusión nef, tat y vif (NTV) expresada a partir de una fusión de los genes nef, tat y vif (ntv) derivados del aislado NL4-3 del VIH. En una realización particular, el segundo promotor sobre el segundo plásmido es el promotor del citomegalovirus simio (CMVS), la segunda señal de poliadenilación sobre el segundo plásmido es la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (HCB) que codifica el polipéptido de envuelta que deriva del aislado primario 6101 del VIH.

En otra realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para inmunizar a un huésped vertebrado contra antígenos seleccionados que comprende administrar a dicho huésped vertebrado una composición inmunogénica que comprende: (a) un primer plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión gag-pol del VIH, en el que dicha única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (b) un segundo plásmido de ADN que comprende (i) una primera unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión nef-tat-vif del VIH unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un primer promotor y una primera señal de poliadenilación; (ii) una segunda unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de envuelta del VIH unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un segundo promotor y una segunda señal de poliadenilación; en el que cada dicho primer y segundo promotor deriva de diferentes unidades transcripcionales; y en el que cada dicha primera y segunda señal de poliadenilación deriva de diferentes unidades transcripcionales; y en el que el sentido de la transcripción de dicha primera unidad transcripcional está en sentido opuesto al sentido de la transcripción de dicha segunda unidad transcripcional; o en el que el sentido de la transcripción de dicha primera unidad transcripcional está en el mismo sentido del sentido de la transcripción de dicha segunda unidad transcripcional y dicha primera y segunda unidad transcripcional están separadas por una región espaciadora de al menos un par de kilobases; y (c) al menos uno de un diluyente, un transportador o un agente facilitador de la transfección, farmacéuticamente aceptable. En una realización particular de la invención, el agente facilitador de la transfección es la bupivacaína. En una realización particular, el promotor sobre el primer plásmido es el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMVH), la señal de poliadenilación sobre el primer plásmido es la señal de poliadenilación poli A de la hormona del crecimiento bovina y el primer plásmido de ADN codifica un polipéptido de fusión gag-pol del VIH, en el que la fusión de los genes gag y pol del VIH o gen gag-pol deriva del aislado HXB2 del VIH. En una determinada realización, el primer promotor sobre el segundo plásmido es el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMVH) y la primera señal de poliadenilación sobre el segundo plásmido es la señal de poliadenilación poli A del VS40 y el polipéptido es una proteína de fusión nef, tat y vif (NTV) expresada a partir de una fusión de los genes nef, tat y vif (ntv) derivados del aislado NL4-3 del VIH. En una realización particular, el segundo promotor sobre el segundo plásmido es el promotor del citomegalovirus simio (CMVS), la segunda señal de poliadenilación sobre el segundo plásmido es la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (HCB) que codifica el polipéptido de envuelta que deriva del aislado primario 6101 del VIH. En una realización, la composición inmunogénica se administra a un mamífero usando electroporación *in vivo*. En una realización particular, la electroporación implica estimular eléctricamente el músculo con una corriente eléctrica que tiene una intensidad de campo en el intervalo de desde aproximadamente 25 V/cm a aproximadamente 800 V/cm. En una realización, el agente facilitador de la transfección es la bupivacaína.

En una realización, la invención proporciona una composición inmunogénica para inducir una respuesta inmunitaria contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en un huésped vertebrado, comprendiendo la composición inmunogénica: (a) un primer plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido gag del VIH, en el que dicha única unidad transcripcional está

unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (b) un segundo plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido pol del VIH, en que dicha única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (c) un tercer plásmido de ADN que comprende (i) una primera unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión nef-tat-vif del VIH unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un primer promotor y una primera señal de poliadenilación; (ii) una segunda unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de envuelta del VIH unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un segundo promotor y una segunda señal de poliadenilación; en el que cada dicho primer y segundo promotor deriva de diferentes unidades transcripcionales y en el que cada dicha primera y segunda señal de poliadenilación deriva de diferentes unidades transcripcionales y en el que el sentido de la transcripción de dicha primera unidad transcripcional está en sentido opuesto del sentido de la transcripción de dicha segunda unidad transcripcional; o en el que el sentido de la transcripción de dicha segunda unidad transcripcional está en el mismo sentido del sentido de la transcripción de dicha segunda unidad transcripcional y dicha primera y segunda unidad transcripcional están separadas por una región espaciadora de al menos un par de kilobases; y (d) un cuarto plásmido de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido adyuvante, en el que dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; y (e) al menos uno de un diluyente, un transportador o un agente facilitador de la transfección, farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento para inmunizar a un huésped vertebrado contra antígenos seleccionados que comprende administrar a dicho huésped vertebrado una composición inmunogénica que comprende: (a) un primer plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido gag del VIH, en el que dicha única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (b) un segundo plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido pol del VIH, en el que dicha única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (c) un tercer plásmido de ADN que comprende (i) una primera unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión nef-tat-vif del VIH unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un primer promotor y una primera señal de poliadenilación; (ii) una segunda unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de envuelta del VIH unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un segundo promotor y una segunda señal de poliadenilación; en el que cada dicho primer y segundo promotor deriva de diferentes unidades transcripcionales; y en el que cada dicha primera y segunda señal de poliadenilación deriva de diferentes unidades transcripcionales; y en el que el sentido de la transcripción de dicha primera unidad transcripcional está en sentido opuesto del sentido de la transcripción de dicha segunda unidad transcripcional; o en el que el sentido de la transcripción de dicha primera unidad transcripcional está en el mismo sentido del sentido de la transcripción de dicha segunda unidad transcripcional y dicha primera y segunda unidad transcripcional están separadas por una región espaciadora de al menos un par de kilobases; y (d) un cuarto plásmido de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido adyuvante, en el que dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; y (e) al menos uno de un diluyente, un transportador o un agente facilitador de la transfección, farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, la electroporación implica estimular eléctricamente el músculo con una corriente eléctrica que tiene una intensidad de campo en el intervalo de desde aproximadamente 25 V/cm a aproximadamente 800 V/cm. En una realización, el agente facilitador de la transfección es la bupivacaína.

En una realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica para inducir una respuesta inmunitaria contra el VIH en un huésped vertebrado, en el que la composición inmunogénica comprende: (a) un primer plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de envuelta del VIH, en el que la única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (b) un segundo plásmido de ADN que comprende una sola unidad de transcripción que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión gag-pol del VIH, en el que la única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (c) un tercer plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión nef-tat-vif del VIH, en el que la única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (d) un cuarto plásmido de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido adyuvante, en el que la secuencia de nucleótidos está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; y (e) al menos uno de un diluyente, un transportador o un agente facilitador de la transfección, farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el agente facilitador de la transfección es la bupivacaína. En otra realización, la composición inmunogénica que contiene bupivacaína se administra junto con electroporación. En una realización específica, los polipéptidos de envuelta, gag-pol, nef-tat-vif de VIH y adyuvantes se expresan en una célula eucariota. En una realización, el primer, segundo, tercer y cuarto plásmido contienen promotores que son activos en células eucariotas.

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para inmunizar un huésped vertebrado contra antígenos seleccionados que comprende administrar al huésped vertebrado una composición inmunogénica, en la que la composición inmunogénica comprende: (a) un primer plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de envuelta del VIH, en el que la única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (b) un segundo plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión gag-pol del VIH, en el que la única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (c) un tercer plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión nef-tat-vif del VIH, en el que la única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (d) un cuarto plásmido de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido adyuvante, en el que la secuencia de nucleótidos está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; y (e) al menos uno de un diluyente, un transportador o un agente facilitador de la transfección, farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el agente facilitador de la transfección es la bupivacaína. En otra realización, la composición inmunogénica que contiene bupivacaína se administra junto con electroporación. En una realización específica, los polipéptidos que expresan la envuelta del VIH, gag-pol, nef-tat-vif y adyuvante se expresan en una célula eucariota. En una realización, el primer, segundo, tercer y cuarto plásmido contienen promotores que son activos en células eucariotas.

En determinadas realizaciones de la invención, el primer, segundo, tercer y cuarto plásmido contienen promotores que se seleccionan del grupo que consiste en promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMVH), promotor de citomegalovirus simio (CMVS), promotor de citomegalovirus murino (CMVM), el promotor 1 asociado a latencia (LAP1) del virus del herpes simple (VHS), promotor del virus de Simio 40, promotor del factor de elongación humano 1 alfa y el promotor de desmina específico de células musculares humanas. En determinadas realizaciones de la invención, el primer, segundo, tercer y cuarto plásmido contienen señales de poliadenilación que se seleccionan del grupo que consiste en señal poli(A) de la beta-globina de conejo, poliA sintética, poli A de timidina quinasa del VHS, poli A de la alfa globina humana, poli A del VS40, poli A de la beta globina humana, poli A de poliomavirus y poli A de la hormona del crecimiento bovina.

En una realización particular, la presente invención proporciona una composición inmunogénica para inducir una respuesta inmunitaria contra el VIH en un huésped vertebrado, en el que, como se ha descrito anteriormente, la composición inmunogénica comprende cuatro plásmidos y en el que cada plásmido comprende adicionalmente un marcador de selección seleccionado del grupo que consiste en genes de resistencia a kanamicina, genes de resistencia a ampicilina, genes de resistencia a tetraciclina, genes de resistencia a higromicina y genes de resistencia a cloranfenicol. En otra realización, cada plásmido comprende adicionalmente un origen de replicación bacteriano. En otra realización adicional, el origen de replicación es el origen de replicación del pUC

La invención también proporciona una composición inmunogénica en la que el cuarto plásmido de ADN comprende una unidad transcripcional primaria y una unidad transcripcional secundaria que comprende dos secuencias de nucleótidos que codifican dos polipéptidos adyuvantes unidos operativamente a elementos reguladores. En una realización, la unidad transcripcional primaria comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido p35 de la IL-12 unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación. En otra realización, la unidad transcripcional secundaria comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido p40 de la IL-12 unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación.

En otra realización la presente invención proporciona una composición inmunogénica para inducir una respuesta inmunitaria contra el VIH en un huésped vertebrado, en el que la composición inmunogénica comprende: (a) un primer plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de envuelta del VIH, en el que la única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (b) un segundo plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido gag del VIH, en el que la única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (c) un tercer plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido pol del VIH, en el que la única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (d) un cuarto plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión nef-tat-vif del VIH, en el que dicha única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (e) un quinto plásmido de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido adyuvante, en el que dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; y (f) al menos uno de un diluyente, un transportador o un agente facilitador de la transfección, farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, el agente facilitador de la transfección es la bupivacaína. En otra realización, la composición inmunogénica que contiene bupivacaína se administra junto con electroporación. En una realización, los polipéptidos de envuelta, gag, pol, nef-tat-vif del VIH y adyuvante se expresan en una célula eucariota.

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento de inmunización de un huésped vertebrado contra antígenos seleccionados que comprende administrar a dicho huésped vertebrado una composición inmunogénica en el que la composición inmunogénica comprende: (a) un primer plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de envuelta del VIH, en el que la única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (b) un segundo plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido gag del VIH, en el que la única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (c) un tercer plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido pol del VIH en el que la única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (d) un cuarto plásmido de ADN que comprende una sola unidad transcripcional que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión nef-tat-vif del VIH en el que dicha única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; (e) un quinto plásmido de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido adyuvante, en el que dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación; y (f) al menos uno de un diluyente, un transportador o un agente facilitador de la transfección, farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, el agente facilitador de la transfección es la bupivacaína. En otra realización, la composición inmunogénica que contiene bupivacaína se administra junto con electroporación.

En una realización de la invención, el primer, segundo, tercer, cuarto y quinto plásmido contienen promotores que son activos en células eucariotas. En determinadas realizaciones, el primer, segundo, tercer, cuarto y quinto plásmido contienen promotores que se seleccionan del grupo que consiste en el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMVH), el promotor del citomegalovirus de simio (CMVS), el promotor del citomegalovirus murino (CMVM) y el promotor 1 asociado a latencia (LAP1) del virus del herpes simple (VHS), el promotor del virus de simio 40, el promotor del factor de elongación humano 1 alfa y el promotor de desmina específico de células musculares humanas. En otras realizaciones de la invención, el primer, segundo, tercer y cuarto plásmido contienen señales de poliadenilación que se seleccionan del grupo que consiste en señal poli(A) de beta-globina de conejo, poliA sintética, poli A de Timidina quinasa del VHS, poli A de alfa globina Humana, poli A de SV40, poli A de beta globina humana, poli A de poliomavirus y poli A de la hormona del crecimiento bovina.

En una realización particular, la presente invención proporciona una composición inmunogénica para inducir una respuesta inmunitaria contra el VIH en un huésped vertebrado, en el que la composición inmunogénica comprende cinco plásmidos como se ha descrito anteriormente y en el que cada plásmido comprende adicionalmente un marcador de selección seleccionado del grupo que consiste en genes de resistencia a kanamicina, genes de resistencia a ampicilina, genes de resistencia a tetraciclina, genes de resistencia a higromicina y genes de resistencia a cloranfenicol. En otra realización, cada plásmido comprende adicionalmente un origen de replicación bacteriano y en el que el origen de replicación es el origen de replicación de pUC.

La invención también proporciona una composición inmunogénica, y en el que el quinto plásmido de ADN comprende una unidad transcripcional primaria y una unidad transcripcional secundaria que comprende dos secuencias de nucleótidos que codifican dos polipéptidos adyuvantes unidos operativamente a elementos reguladores. En una realización, la unidad transcripcional primaria comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido p35 de IL-12 unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación. En otra realización, la unidad transcripcional secundaria comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido p40 de IL-12 unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación.

En la siguiente descripción se desvelan con detalle otros aspectos y la realización de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un diagrama esquemático circular de un plásmido de ADN ilustrativo con tres unidades transcripcionales preparado para expresar seis genes o una construcción génica del VIH en células eucariotas a partir de tres fases de lectura abierta distintas. La Figura 1 muestra un diagrama esquemático lineal aunque más detallado del mismo plásmido. Se usan las siguientes abreviaturas: CMVS: promotor del citomegalovirus simio, CMVH: promotor del citomegalovirus humano, HCBpoliA- señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina, kan: gen marcador de resistencia a kanamicina, VHSlap1: promotor 1 asociado a latencia del virus del herpes simple, SV40 poliA: señal de poliadenilación del virus de Simio 40, SV40sd/sa: donante y aceptor de corte y empalme del virus de Simio 40, gag-pol: fusión de gag-pol del VIH, ntv: fusión de nef-tat-vif del VIH, env: envuelta del VIH.

La Figura 2 muestra la expresión de gag del VIH en células 293. Células 293 se transfectaron con 2 µg del vector de expresión del ADN plasmídico indicado. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las proteínas del VIH asociadas a las células se visualizaron por transferencia de Western. A continuación se muestran los promotores y las fases de lectura abierta para un plásmido particular:

Plásmidos Transfectados

- 102: CMVH-gag
- 201: CMVH-pol, CMVS-gag
- 203: CMVH-gag/pol/nef/tat/vif, CMVS-env
- 5 302: CMVS-gag/pol, CMVH-, Lap1-nef/tat/vif
- 204: CMVH-gag/pol, CMVS-env
- 303: CMVS-gag/pol, CMVH-env, Lap1-nef/tat/vif
- 001: plásmido de control sin inserto

10 La Figura 3 muestra la expresión de pol del VIH en células 293. Células 293 se transfectaron con 2 µg del vector de expresión del ADN plasmídico indicado. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las proteínas del VIH asociadas a las células se visualizaron por transferencia de Western. A continuación se muestran los promotores y las fases de lectura abierta para un plásmido particular:

Plásmidos Transfectados

- 103: CMVH-pol
- 15 201: CMVH-pol, CMVS-gag
- 302: CMVS-gag/pol, CMVH-, Lap1-nef/tat/vif
- 203: CMVH-gag/pol/nef/tat/vif, CMVS-env
- 204: CMVH-gag/pol, CMVS-env
- 20 303: CMVS-gag/pol, CMVH-env, Lap1-nef/tat/vif
- 001: plásmido de control sin inserto

La Figura 4 muestra la expresión de nef/tat/vif (ntv) del VIH en células 293. Células 293 se transfectaron con 2 µg del vector de expresión del ADN plasmídico indicado. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las proteínas del VIH asociadas a las células se visualizaron por transferencia de Western. A continuación se muestran los promotores y las fases de lectura abierta para un plásmido particular:

25 Plásmidos Transfectados

- 104: CMVH-ntv
- 105: Lap1-ntv
- 202: CMVH-ntv, CMVS-env
- 203: CMVH-gag/pol/nef/tat/vif, CMVS-env
- 30 302: CMVS-gag/pol, CMVH-, Lap1-nef/tat/vif
- 303: CMVS-gag/pol, CMVH-env, Lap1-nef/tat/vif
- 001: plásmido de control sin inserto

35 La Figura 5 muestra la expresión de env del VIH en células 293. Células 293 se transfectaron con 2 µg del vector de expresión del ADN plasmídico indicado. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las proteínas del VIH asociadas a las células se visualizaron por transferencia de Western. A continuación se muestran los promotores y las fases de lectura abierta para un plásmido particular:

Plásmidos Transfectados

- 101: CMVH-env
- 202: CMVH-ntv, CMVS-env
- 40 203: CMVH-gag/pol/nef/tat/vif, CMVS-env
- 204: CMVH-gag/pol, CMVS-env
- 303: CMVS-gag/pol, CMVH-env, Lap1-nef/tat/vif
- 001: plásmido de control sin inserto

45 La Figura 6 muestra la expresión de gag del VIH en células 293. Células 293 se transfectaron con 1 µg de la combinación de ADN plasmídico indicada. Cuarenta y ocho horas después de las transfecciones, las proteínas del VIH asociadas a las células se visualizaron por transferencia de Western. A continuación se muestran los promotores y las fases de lectura abierta para un plásmido particular:

Carril	Combinaciones de Plásmidos Transfectados
1	301 (gag/pol) + 101 (env) + 104(ntv)
2	201 (gag, pol) + 202 (env, ntv)
3	203 (gag/pol/ntv, env)
4	303 (gag/pol, env, ntv)
5	101 (env) + 102(gag) + 103(pol) + 104(ntv)
6	001 (control)

ES 2 386 507 T3

La Figura 7 muestra la expresión de env del VIH en células 293. Células 293 se transfectaron con 1 µg de la combinación de ADN plasmídico indicada. Cuarenta y ocho horas después de las transfecciones, las proteínas del VIH asociadas a las células se visualizaron por transferencia de Western. A continuación se muestran los promotores y las fases de lectura abierta para un plásmido particular:

Carril	Combinaciones de Plásmidos Transfectados
1	152 (gag/pol) + 101 (env) + 104(ntv)
2	201 (gag, pol) + 202 (env, ntv)
3	203 (gag/pol/ntv, env)
4	303 (gag/pol, env, ntv)
5	101 (env) + 102(gag) + 103(pol) + 104(ntv)
6	001 (control)

5

La Figura 8 muestra la expresión de ntv del VIH en células 293. Células 293 se transfectaron con 1 µg de la combinación de ADN plasmídico indicada. Cuarenta y ocho horas después de las transfecciones, las proteínas del VIH asociadas a las células se visualizaron por transferencia de Western. A continuación se muestran los promotores y las fases de lectura abierta para un plásmido particular:

Carril	Combinaciones de Plásmidos Transfectados
1	152 (gag/pol) + 101 (env) + 104(ntv)
2	201 (gag, pol) + 202 (env, ntv)
3	203 (gag/pol/ntv, env)
4	303 (gag/pol, env, ntv)
5	101 (env) + 102(gag) + 103(pol) + 104(ntv)
6	001 (control)

10

La Figura 9 muestra la expresión de pol del VIH en células 293. Células 293 se transfectaron con la concentración y combinación de ADN plasmídico indicadas. Cuarenta y ocho horas después de las transfecciones, las proteínas del VIH asociadas a las células se visualizaron por transferencia de Western. A continuación se muestran los promotores y las fases de lectura abierta para un plásmido particular:

Carril	Combinaciones de Plásmidos Transfectados	Concentración de Plásmido Transfectado (microgramos)
1	001 (control)	2
2	201 (gag, pol) + 202(ntv, env)	1+1
3	204(gag/pol, env) + 104(ntv)	1+1
4	203(gag/pol/ntv, env)	2
5	302(gag/pol, ntv) + 101 (env)	1 +1
6	303((gag/pol, env, ntv)	2

15

La Figura 10 muestra la expresión de gag del VIH en células 293. Células 293 se transfectaron con la concentración y combinación de ADN plasmídico indicadas. Cuarenta y ocho horas después de las transfecciones, las proteínas del VIH asociadas a las células se visualizaron por transferencia de Western. A continuación se muestran los promotores y las fases de lectura abierta para un plásmido particular:

Carril	Combinaciones de Plásmidos Transfectados	Concentración de Plásmido Transfectado (microgramos)
1	001 (control)	2
2	201(gag, pol) + 202(ntv, env)	1+1
3	204(gag/pol, env) + 104(ntv)	1 +1
4	203(gag/pot/ntv, env)	2
5	302(gag/pol, ntv)+101(env)	1+1
6	303((gag/pol, env, ntv)	2

20

La Figura 11 muestra la expresión de env del VIH en células 293. Células 293 se transfectaron con la concentración y combinación de ADN plasmídico indicadas. Cuarenta y ocho horas después de las transfecciones, las proteínas del VIH asociadas a las células se visualizaron por transferencia de Western. A continuación se muestran los promotores y las fases de lectura abierta para un plásmido particular:

25

Carril	Combinaciones de Plásmidos Transfectados	Concentración de Plásmido Transfectado (microgramos)
1	001 (control)	2
2	201 (gag, pol) + 202(ntv, env)	1+1
3	204(gag/pol, env) + 104(ntv)	1+1
4	203(gag/pol/ntv, env)	2
5	302(gag/pol, ntv) + 101(env)	1+1
6	303((gag/pol, env, ntv)	2

5 La Figura 12 muestra la expresión de ntv del VIH en células 293. Células 293 se transfectaron con la concentración y combinación de ADN plasmídico indicadas. Cuarenta y ocho horas después de las transfecciones, las proteínas del VIH asociadas a las células se visualizaron por transferencia de Western. A continuación se muestran los promotores y las fases de lectura abierta para un plásmido particular:

Carril	Combinaciones de Plásmidos Transfectados	Concentración de Plásmido Transfectado (microgramos)
1	001 (control)	2
2	201 (gag, pol) + 202(ntv, env)	1+1
3	204(gag/pol, env) + 104(ntv)	1+1
4	203(gag/pot/ntv, env)	2
5	302(gag/pol, ntv) + 101(env)	1+1
6	303((gag/pol, env, ntv)	2

Descripción detallada de la invención

10 Las composiciones inmunogénicas basadas en ADN proporcionan una alternativa a las composiciones inmunogénicas tradicionales que comprenden la administración de antígenos de proteínas y un adyuvante, en cambio, las composiciones inmunogénicas basadas en ADN implican la introducción de ADN, que codifica el antígeno o antígenos, en el interior de los tejidos de un sujeto, en el que las células del tejido expresan los antígenos. Como se usa en el presente documento, tales composiciones inmunogénicas se denominan "composiciones inmunogénicas basadas en ADN" o "composiciones inmunogénicas basadas en ácido nucleico".
 15 Cuando para la generación de una respuesta inmunoprotectora se necesitan genes múltiples se da el problema de que tienen que usarse plásmidos múltiples para expresar los genes individualmente. Esto impone una sobrecarga en cuanto a fabricación y regulación. Las realizaciones de la presente invención proporcionan soluciones a este problema con un diseño de plásmido capaz de expresar tres fases de lectura abierta independientes en la misma célula. En determinadas realizaciones de la invención, se fusionan genes para constituir poliproteínas y, de esta manera, a partir de un solo plásmido pueden expresarse más proteínas. En una realización, un solo plásmido expresa seis proteínas.

25 En la expresión de genes de antígeno y/o en la inmunogenicidad de las composiciones inmunogénicas basadas en ADN puede influir una gran cantidad de factores. Los ejemplos de tales factores incluyen la construcción del vector plasmídico, el tamaño del vector plasmídico, la elección del promotor usado para conducir la expresión del gen de antígeno, la cantidad y el tamaño de las unidades transcripcionales en el plásmido, la estabilidad de los transcritos de ARN, la orientación de las unidades transcripcionales dentro del plásmido, la reproducibilidad de la inmunización y la estabilidad del gen insertado en el plásmido. Las realizaciones de la presente invención proporcionan diseños de plásmidos que optimizan muchos de estos parámetros clave.

30 El diseño y la optimización de vectores de ADN plasmídicos que tienen unidades transcripcionales múltiples es crítico. Para mejorar la dosis real de antígeno recibida por un sujeto inmunizado, el tamaño del plásmido debe minimizarse, al mismo tiempo que la cantidad de productos proteicos y la cantidad de proteínas producidas debe maximizarse. Para compensar estas cuestiones, deben tenerse en cuenta la situación de los genes; la separación de las unidades transcripcionales; el sentido de la transcripción de las fases de lectura abierta; los niveles de expresión; el tamaño, la orientación y la fuerza del promotor; el tamaño, la situación, la orientación y la fuerza del potenciador, el tamaño y la organización de la fase de lectura abierta; la facilidad de fabricación; la estabilidad del plásmido; la seguridad; y la dosis final del vector necesaria para inmunizar al sujeto.

40 Una cuestión importante con el uso de plásmidos de ADN para la inmunización es la fabricación del plásmido. Debido a posibles asuntos de seguridad, los procesos de fabricación y los productos finales deben someterse a un intenso escrutinio y ser objeto de un control de calidad exhaustivo. El resultado se refleja en altos costes para tales procedimientos. Como un resultado, cualquier inmunización con ADN, que requiera plásmidos múltiples, será proporcionalmente más costosa y probablemente será menos eficaz. Por lo tanto, en determinadas realizaciones de la presente invención, en las que el coste de fabricación necesite controlarse, se proporcionan composiciones

inmunogénicas que comprenden un solo plásmido por aplicación que es adecuado para inducir respuestas inmunitarias prácticamente en cualquier proceso de enfermedad.

En algunas situaciones, a pesar de los costes de preparación más altos, el uso de combinaciones de plásmidos conteniendo cada uno una sola unidad transcripcional o dos unidades transcripcionales puede conducir a una composición inmunogénica más eficaz. En tales casos, es importante diseñar la composición inmunogénica para que tenga la cantidad óptima de plásmidos que codifiquen todos los genes necesarios para inducir una respuesta inmunitaria eficaz. El uso de un plásmido que contenga tres unidades transcripcionales que expresen todos los genes necesarios en lugar de plásmidos múltiples conteniendo cada uno una sola unidad transcripcional debe compensarse con la inmunogenicidad de los antígenos particulares. Una ventaja de la estrategia de la combinación de plásmidos con una sola unidad transcripcional es que un mismo promotor fuerte puede conducir cada uno de los genes individuales. Por ejemplo, en cada plásmido, puede usarse el promotor del CMVH, en lugar de solo uno por plásmido, como es el caso en un plásmido de tres unidades transcripcionales. Por otro lado, cuando se usa un plásmido de tres unidades transcripcionales, el promotor del CMVH sólo puede usarse una vez para impedir la posibilidad de recombinación homóloga interna e inestabilidad del plásmido. Por ejemplo, en una composición que tenga dos plásmidos que expresen antígeno en la que un plásmido tenga una unidad transcripcional y el segundo tenga dos unidades transcripcionales. En una composición de este tipo, el promotor del CMVH puede usarse para conducir solo la expresión del antígeno o proteína de fusión en el plásmido con una unidad transcripcional y este puede usarse también para conducir la expresión de una de las proteínas o proteínas de fusión en el plásmido que tiene dos unidades transcripcionales.

En el caso en el que el patógeno es el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), las composiciones inmunogénicas se describen con cuatro plásmidos de una sola unidad transcripcional que contienen secuencias de nucleótidos que codifican, respectivamente, un polipéptido de envuelta del VIH, un polipéptido de fusión gag-pol del VIH, un polipéptido de fusión nef-tat-vif del VIH y un polipéptido adyuvante. Si se desea, pueden usarse dos plásmidos con una sola unidad transcripcional que contenga secuencias de nucleótidos que codifiquen, un polipéptido gag del VIH y un polipéptido de fusión pol del VIH, respectivamente, en lugar del plásmido con una sola unidad transcripcional que contenga una secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido de fusión gag-pol del VIH (por tanto, en ese aspecto, se usan cinco plásmidos).

En general, dependiendo de su origen, los promotores difieren en especificidad tisular y eficacia iniciando la síntesis del ARNm [Xiang y col., *Virology*, 209: 564-579 (1994); Chapman y col., *Nucle. Acids. Res.*, 19: 3979-3986 (1991)]. Hasta ahora, la mayoría de las composiciones inmunogénicas basadas en ADN en sistemas de mamíferos se habían basado en promotores virales derivados de citomegalovirus (CMV). El CMV puede ser de origen humano o simio. Estos gozan de una buena eficacia en cuanto a inmunización muscular y cutánea en diversas especies de mamíferos. Otro factor que se sabe que influye en la respuesta inmunitaria suscitada por inmunización con ADN es el procedimiento de la administración del ADN; las vías parenterales pueden producir bajas tasas de transferencia de genes y producir variabilidad de expresión de genes considerable. Véase Montgomery y col., *DNA Cell Bio.*, 12: 777-783 (1993). La inoculación de plásmidos a alta velocidad, usando biobalística, potenció la respuesta inmunitaria de ratones, presumiblemente debido a una mayor eficacia de transfección de ADN y a una presentación de antígenos más eficaz por las células dendríticas. Véase Fynan y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 11478-11482 (1993B); Eisenbraun y col., *DNA Cell Biol.*, 12: 791-797 (1993). Los vectores que contienen la composición inmunogénica basada en ácido nucleico de la invención también puede introducirse en el huésped deseado mediante otros procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, dextrano DEAE, precipitación en fosfato de calcio, lipofección (fusión de lisosomas), o un transportador vectorial de ADN. Véase, por ejemplo Wu y col., *J. Biol. Chem.* 267: 963-967 (1992); Wu y Wu, *J. Biol. Chem.* 263: 14621-14624 (1988); Hartmut y col., *Solicitud de Patente Canadiense N° 2.012.311*, presentada el 15 de marzo de 1990.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a plásmidos, a composiciones inmunogénicas y a procedimientos para la inmunización genética de vertebrados tales como mamíferos, aves y peces. Los plásmidos, las composiciones inmunogénicas y los procedimientos de la presente invención pueden ser particularmente útiles para sujetos mamíferos incluyendo la especie humana, bovina, ovina, porcina, equina, canina y felina. A continuación se describen con detalle los plásmidos, las composiciones inmunogénicas y los procedimientos y con referencia a los documentos citados que se incorporan por referencia para proporcionar detalles conocidos para un experto en la técnica.

A. Plásmidos, Vectores, Construcciones y Composiciones Inmunogénicas de ADN

El término plásmido, construcción y vector se usa a lo largo de la memoria descriptiva. Como se usa en el presente documento, el término "plásmido" se refiere a una molécula de ADN súper enrollada, circular, en la que se ensamblan diversas moléculas de ácido nucleico que codifican secuencias reguladoras, fases de lectura abierta, sitios de clonación, codones de terminación, regiones espaciadoras u otras secuencias seleccionadas para regiones estructurales o funcionales y se usan como un vector para expresar genes en un huésped vertebrado. Adicionalmente, como se usa en el presente documento, los "plásmidos" pueden replicarse en una cepa bacteriana. Como se usa en el presente documento, el término "construcción" se refiere a un vector o a un plásmido particular que tiene una disposición de genes y elementos reguladores específicos. Una secuencia de ácido nucleico puede

ser "exógena", lo que significa que es extraña para la célula en la que va a introducirse el vector, "heteróloga", lo que significa que deriva de una fuente genética diferente u "homóloga", lo que significa que la secuencia está estructuralmente relacionada con una secuencia en la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en el que la secuencia normalmente no se encuentra. Un experto en la técnica estaría bien equipado para construir un vector o modificar un plásmido de la invención a través de técnicas recombinantes convencionales, las cuales se describen, por ejemplo, en Sambrook y col, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, (1989) y referencias citadas en su interior, por ejemplo, en las páginas 3.18-3.26 y 16.17-16.27 y Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, Nueva York (1995) ambas incorporadas en el presente documento por referencia.

El término "vector" se usa para referirse a una molécula de ácido nucleico transportadora en la que puede insertarse una molécula de ácido nucleico diseñada que codifica un antígeno o antígenos para la introducción en una célula en la cual este puede expresarse. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus de animales y virus de plantas) y cromosomas artificiales (por ejemplo CAY, cromosomas artificiales de levaduras). La expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una parte de un producto génico que puede transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen después en una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de ARN de interferencia expresado (ARNie), ARN de interferencia corto (ARNic), moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una diversidad de "secuencias de control", que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente para la traducción de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Además de las secuencias de control que controlan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que también realizan otras funciones y que se describen a continuación.

Las expresiones "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se usan indistintamente para dar a entender nucleótidos múltiples (es decir moléculas que comprenden un azúcar (por ejemplo ribosa o desoxirribosa) unido a un grupo fosfato y a una base orgánica intercambiable, que es una pirimidina sustituida (por ejemplo citosina (C), timina (T) o uracilo (U)) o una purina sustituida (por ejemplo, adenina (A) o guanina (G)). Como se usa en el presente documento, los términos se refieren a oligorribonucleótidos así como a oligodesoxirribonucleótidos. Los términos incluirán también polinucleósidos (es decir un polinucleótido sin el fosfato) y cualquier otro polímero que contenga una base orgánica. Las moléculas de ácido nucleico pueden obtenerse a partir de fuentes de ácido nucleico existentes (por ejemplo ADN genómico o ADNc), pero pueden producirse sintéticamente (por ejemplo, producirse por síntesis de oligonucleótidos).

La frase "cada uno deriva de diferentes unidades transcripcionales", como se usa en el presente documento, significa que cada uno de los elementos de control reguladores de una función similar, tal como los promotores, tienen todos diferente origen y no son homólogos entre sí a un nivel tal que en el plásmido pueda surgir inestabilidad genética mediante recombinación. Véase Herrera y col., Biochem. Biophys. Res. Commun, 279: 548-551 (2000).

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención incluyen un plásmido de ADN de tres unidades transcripcionales que comprende una secuencia de ADN que codifica al menos tres antígenos seleccionados contra los que se desea una respuesta inmunitaria. En el plásmido, los antígenos seleccionados se encuentran bajo el control de secuencias reguladoras que dirigen la expresión de los mismos en una célula de mamífero o de vertebrado. Las composiciones inmunogénicas de la presente invención también incluyen combinaciones de plásmidos que codifican antígenos seleccionados. Tales combinaciones pueden estar formadas por dos, tres o cuatro plásmidos que codifican antígenos adicionales seleccionados. Dentro de la combinación puede haber una, dos o tres unidades transcripcionales en cualquier plásmido particular. Adicionalmente, en las composiciones inmunogénicas de la invención pueden incluirse plásmidos adicionales que codifiquen polipéptidos adyuvantes.

Los vectores plasmídicos, no virales, útiles en la presente invención que contienen secuencias de ADN aisladas y purificadas comprenden secuencias de ADN que codifican el inmunógeno y los antígenos seleccionados. La molécula de ADN que codifica los antígenos diana puede derivar de fuentes virales o no virales tales como especies bacterianas o antígenos tumorales que se han diseñado para codificar una secuencia de ácido nucleico exógena o heteróloga. Tales plásmidos o vectores pueden incluir secuencias de virus o fagos. En la técnica se conoce una diversidad de vectores no virales y puede incluir, sin limitación, plásmidos, vectores bacterianos, vectores bacteriófagos, ADN "desnudo", ADN condensado con lípidos o polímeros catiónicos, así como ADN formulado con otros agentes facilitadores de la transfección, por ejemplo el anestésico local tal como la bupibacaína, que se analiza más adelante.

Los componentes de los plásmidos de la presente invención pueden obtenerse a partir de vectores existentes. Los ejemplos de vectores bacterianos incluyen, pero sin limitación, secuencias derivadas del *bacilo* de *Calmette Guérin* (BCG), *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, y *Listeria*, entre otros. Los vectores plasmídicos adecuados para la obtención de componentes incluyen, por ejemplo pBR322, pBR325, pACYC177, pACYC184, pUC8, pUC9, pUC18, pUC19, pLG339, pR290, pK37, pKC101, pAC105, pVA51. pKH47, pUB110, pMB9, pBR325, Col E1, pSC101, pBR313, pML21, RSF2124, pCR1, RP4, pBAD18 y pBR328.

A partir de vectores de expresión inducibles pueden obtenerse otros componentes. Los ejemplos de vectores de expresión de *Escherichia coli* inducibles adecuados incluyen pTrc (Amann y col., Gene, 69: 301-315 (1988)), los vectores de expresión de arabinosa (por ejemplo, pBAD18, Guzman y col, J. Bacteriol., 177: 4121-4130 (1995)), y pET11d (Studier y col., Methods in Enzymology, 185: 60-89 (1990)). La expresión de genes diana a partir del vector pTrc depende de la transcripción de la ARN polimerasa huésped a partir de un promotor de fusión híbrido trp-lac. La expresión de genes diana a partir del vector pET11d depende de la transcripción de un promotor de fusión gn10-lac de T7 mediado por una polimerasa de ARN viral coexpresada de T7 gn I. Esta polimerasa viral la proporcionan las cepas huésped BL21 (DE3) o HMS 174(DE3) a partir de un profago que contiene un gen *gn1* de T7 bajo el control transcripcional del promotor *lacUV5*. El sistema pBAD depende del promotor de arabinosa inducible regulado por el gen *araC*. El promotor se induce en presencia de arabinosa.

Los componentes reguladores pueden obtenerse a partir de promotores inducibles que están regulados por compuestos administrados exógenamente, incluyendo, el promotor de metalotionina (MT) de oveja inducible por cinc, el promotor del virus del tumor mamario de ratón (VTMM) inducible por dexametasona (Dex), el sistema inducible por tetraciclina (Gossen y col, Science 268: 1766-1769 (1995) y el sistema inducible por rapamicina (Magari y col, J Clin Invest, 100: 2865-2872 (1997)).

Las señales de control transcripcionales en eucariotas constan de elementos promotores y potenciadores. Los "promotores" y "potenciadores", como se usa en el presente documento, se refieren a secuencias de ADN que interactúan específicamente con proteínas implicadas en la transcripción. Véase Maniatis, T., y col., Science 236: 1237 (1987). Como se ha descrito anteriormente, para potenciar la expresión de los antígenos seleccionados pueden combinarse regiones 5' no traducidas con promotores y potenciadores. El promotor, los potenciadores y otras secuencias reguladoras, que dirigen la expresión del antígeno en el sujeto mamífero o vertebrado deseado, pueden seleccionarse de manera similar a partir de un amplio listado de promotores que se sabe que son útiles para este fin. A continuación se desvelan diversos promotores de este tipo. En una realización de la composición inmunogénica con plásmido de ADN descrita a continuación, los promotores útiles son el promotor/potenciador del citomegalovirus humano (CMVH) (descrito, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.158.062 y 5.385.839, incorporadas en el presente documento por referencia), los promotores 1 y 2 asociados a latencia del virus del herpes simple (VHSLap1 y VHSLap2: a veces denominados "promotores 1 y 2 de latencia activos") y el potenciador promotor del citomegalovirus simio (CMVS). Véase Goins W. F. y col., J. Virology 68: 2239-2252 (1994); Soares, K. J. y col., Virology 70: 5384-5394; Goins W. F. y col., J. Virology 73: 519-532 (1999). También es adecuado para su uso el promotor de citomegalovirus murino (CMVM).

Otros elementos de control transcripcionales útiles incluyen elementos de control post-transcripcionales tales como los potenciadores de transporte constitutivo (PTC) o elementos similares a PTC tales como elementos de transporte de ARN (ETA), que ayudan a transportar al citoplasma el ARN no cortado ni empalmado o parcialmente cortado y empalmado. Véase la Patente de Estados Unidos N° 5.585.263 de Hammarskjold y col., y Zolotukhin y col., J. Virol.68: 944-7952 (1994)). Los PTC o ETA son deseables porque han demostrado mejorar la expresión y porque muchos genes requieren la presencia de elementos de control post-transcripcionales. Hay diversos tipos de PTC y elementos similares a PTC, que actúan usando diferentes rutas. Véase Tabemero y col., J. Virol. 71: Véase también la solicitud Internacional WO 99/61596, que describe un nuevo tipo de elemento de control post-transcripcional que puede reemplazar al PTC.

La expresión de genes también puede potenciarse por la inclusión de secuencias de polinucleótidos que actúan a nivel de soporte de acumulación de ARNm, aumentando la estabilidad del ARNm o a través de la facilitación de entrada a ribosoma de todos los mecanismos que producen niveles de traducción más elevados. En realizaciones particulares de la presente invención, determinadas regiones no traducidas 5' e intrones pueden combinarse con promotores y potenciadores para producir compuestos o promotores quiméricos capaces de dirigir niveles de expresión de genes más elevados.

Los ejemplos de regiones 5' no traducidas útiles para potenciar la expresión de genes incluyen la secuencia líder tripartita de adenovirus (Adtp) que puede insertarse aguas abajo de un promotor para aumentar la expresión de un gen o transgén potenciando la traducción, sin modificar la especificidad del promotor. Véase W. Sheay y col., Biotechniques 15(5): 856-62 (1993). La UTR (siglas en inglés que significa *región no traducida*) 5' de los ARNm del factor de elongación 1 alfa (EF-1 α) de chimpancé y de ratón contiene un intrón que se sabe que potencia la expresión génica aumentando la transcripción de ARN y/o la estabilidad de ARN. Véase S. Y. Kim y col., J Biotechnol. 14; 93(2): 183-7 (1993). La UTR 5' del ARNm que codifica el factor de iniciación eucariótico 4g (eIF4g) se caracteriza por la presencia de un supuesto sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, siglas en inglés) y desempeña una fuerte actividad promotora. Véase B. Han B. & J. T. Zhang Mol Cell Biol 22(21): 7372-84 (2002). Además, la UTR 5' del ARNm de la proteína de choque término humana 70 (Hsp70, siglas en inglés) contiene un elemento que aumenta la eficacia de la traducción del ARNm en condiciones normales de cultivo celular pero hasta un orden de magnitud. Véase S. Vivinus y col., Eur J Biochem. 268(7): 1908-17 (2001). La UTR 5' del Factor Represor de NF-kappaB actúa como un IRES potente y también funciona como un potenciador traduccional en el contexto de los ARNm monocistrónicos. Véase A. Oumard y col., Mol Cell Biol. 20(8): 2755-9 (2000). Cuando la UTR 5' del SV40 y la región R de Repetición Terminal Larga (SUR) del virus de la leucemia humana de linfocitos T (VLHT) de Tipo 1, se asocian y se añaden entre el CAP y el codón de inicio, aumenta la eficacia de la traducción posiblemente a través de la estabilización del ARNm. Véase Y. Takebe y col., Mol Cell Biol. 8(1): 466-472 (1988).

En realizaciones particulares de la invención, las secuencias reguladoras para la inclusión en una molécula de ácido nucleico, ADN o vector plasmídico de la presente invención incluyen, sin limitación, una secuencia promotora, una secuencia potenciadora, una secuencia de región no traducida 5', un intrón, PTC, ETA, una secuencia de poliadenilación, una secuencia donante de corte y empalme y una secuencia aceptora de corte y empalme, un sitio para el inicio y terminación de la transcripción colocados al inicio y al final, respectivamente, del gen que va a traducirse, un sitio de unión al ribosoma para la traducción en la región transcrita, una etiqueta epitópica, una secuencia de localización nuclear, un elemento de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), un elemento "TATA" Goldberg-Hogness, un sitio de escisión de enzimas de restricción, un marcador de selección y similar. Las secuencias potenciadoras incluyen, por ejemplo, la repetición en tándem de 72 pb del ADN del SV40 o las repeticiones terminales largas o LTR (siglas en inglés) retrovirales, etc. y se emplean para aumentar la eficacia transcripcional. Véase Wasylyk, y col., *Nucleic Acid Res.* 12: 5589-5608 (1984).

Estos otros componentes útiles en plásmidos de ADN, incluyendo, por ejemplo, orígenes de replicación, secuencias de poliadenilación (por ejemplo, poliA de la hormona de crecimiento bovina (HCB), poliA del virus simio 40 (SV40)), marcadores de resistencia a fármacos (por ejemplo de resistencia a kanamicina) y similares, también pueden seleccionarse de entre secuencias muy conocidas, incluyendo las descritas en los ejemplos descritos y mencionadas específicamente a continuación.

La selección de promotores individuales y de otros elementos comunes en plásmidos es convencional y muchas de estas secuencias con las que diseñan los plásmidos útiles en la presente invención se encuentran disponibles. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, (1989) y referencias citadas en su interior, por ejemplo, en las páginas 3.18-3.26 y 16.17-16.27 y Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1989). Un experto en la técnica puede seleccionar todos los componentes de los plásmidos útiles en la presente invención de entre materiales conocidos en la técnica y disponibles en la industria farmacéutica.

En el siguiente análisis se identifican ejemplos de genes adecuados, que expresan antígenos o polipéptidos. En una realización de los plásmidos y las composiciones inmunogénicas del presente documento, los antígenos seleccionados son antígenos del VIH-1, incluyendo los representados por los genes *gag*, *pol*, *env*, *nef*, *vpr*, *vpu*, *vif* y *tat*. En una realización; la secuencia codificante y no codificante y otros componentes del plásmido de ADN se optimizan, tal como seleccionando codones apropiados para el huésped deseado y eliminando cualquiera de las secuencias inhibitorias, también analizado a continuación con respecto a la preparación de antígenos.

De acuerdo con realizaciones de la presente invención, una composición contiene un plásmido que expresa al menos tres antígenos seleccionados. Como alternativa, la composición plasmídica también comprende un plásmido de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica al menos tres copias del mismo antígeno o polipéptido de interés seleccionado. En una realización de la presente invención, una composición puede contener un plásmido que exprese antígenos múltiples seleccionados de fases de lectura abierta múltiples. En otra realización, la composición plasmídica comprende un plásmido de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica copias múltiples de fases de lectura abierta similares que codifican antígenos múltiples seleccionados, por ejemplo genes *env* múltiples de diferentes clados.

En una realización particular de la invención, el uso de combinaciones de plásmidos, expresando cada uno un solo antígeno, puede conducir a una composición inmunogénica más eficaz. Por ejemplo, en una realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica en el que la composición inmunogénica contiene cuatro plásmidos, codificando cada uno un inmunógeno del VIH o un adyuvante. Una composición inmunogénica específica de este tipo contiene la siguiente combinación de cuatro plásmidos: (a) un primer plásmido de ADN que tiene una sola unidad transcripcional con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de envuelta del VIH; (b) un segundo plásmido de ADN que tiene una sola unidad transcripcional con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión *gag-pol* del VIH; (c) un tercer plásmido de ADN que tiene una sola unidad transcripcional con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión *nef-tat-vif* del VIH; (d) un cuarto plásmido de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido adyuvante y (e) al menos uno de un diluyente, un transportador o un agente facilitador de la transfección, farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, el promotor que conduce la expresión de cada uno de los genes del VIH es el promotor del CMVH y la secuencia poliA para cada uno de los genes del VIH es la poliA de la hormona del crecimiento bovina.

En una realización específica de la invención, cuando se desea el uso de combinaciones de plásmidos expresando cada uno un solo antígeno, puede ser ventajoso el uso de más plásmidos que contengan más genes individuales que codifiquen polipéptidos individuales y menos genes de fusión que codifiquen polipéptidos de fusión. Por ejemplo, en una realización la presente invención proporciona una composición inmunogénica en la que la composición inmunogénica contiene cinco plásmidos codificando cada uno un inmunógeno del VIH o un adyuvante. En esta realización, la composición inmunogénica comprende: (a) un primer plásmido de ADN que tiene una sola unidad transcripcional con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de envuelta del VIH; (b) un segundo plásmido de ADN que tiene una sola unidad transcripcional con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido *gag* del VIH; (c) un tercer plásmido de ADN que tiene una sola unidad transcripcional con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido *pol* del VIH; (d) un cuarto plásmido de ADN que tiene una sola unidad transcripcional con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión *nef-tat-vif* del VIH; (e) un

quinto plásmido de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido adyuvante. En una realización específica, el promotor que conduce la expresión de cada uno de los genes del VIH es el promotor del CMVH y la secuencia poliA para cada uno de los genes del VIH es la poliA de la hormona del crecimiento bovina.

5 En una realización adicional más, los plásmidos de ADN y las composiciones inmunogénicas pueden contener adicionalmente, como componente de plásmido de ADN individual o como parte del plásmido de ADN que contiene antígeno, una secuencia de nucleótidos que codifica una citocina, linfoquina u otro adyuvante genético deseable. A continuación se proporciona una descripción de tales adyuvantes adecuados para los cuales se encuentran disponibles secuencias de ácidos nucleicos. En las realizaciones ilustradas en la presente invención, una citocina deseable para la administración con la composición del plásmido de ADN de la presente invención es la interleucina-12.

10 La composición de plásmido de ADN puede administrarse en un diluyente, excipiente o transportador farmacéuticamente aceptable, tales como los descritos a continuación. Aunque la composición pueda administrarse mediante cualquier vía de administración seleccionada, en una realización un procedimiento de administración deseado es la coadministración por vía intramuscular de una composición que comprende las moléculas de plásmido con bupivacaína como agente facilitador de la transfección, descrito a continuación.

B. Disposición Física de Elementos dentro del Plásmido

Una cuestión práctica para diseñar una composición inmunogénica para vertebrados es la cantidad de ADN que puede administrarse eficazmente cuando se inmuniza a sujetos. Cuando se considera la dosis, la limitación del tamaño total del plásmido, maximizando simultáneamente al mismo tiempo el número de unidades transcripcionales completas dentro del plásmido, proporciona una estrategia para crear diseños de ADN plasmídicos. Las ventajas de minimizar el tamaño del plásmido y maximizar el número de genes expresados son que se potencia la dosis de la proteína inmunogénica administrada por microgramo de ADN inyectado. Además, se sabe que a medida que aumenta el tamaño del vector, también lo hace el potencial para la inestabilidad del vector. Véase Herrera y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 279: 548-551 (2000). Por lo tanto para conseguir este objetivo, se debe tener en cuenta el tamaño de los elementos de control reguladores individuales, tales como promotores y compensarse con la fuerza del promotor necesaria para un nivel de expresión determinado. De manera similar, el tamaño de las fases de lectura abierta contribuye al tamaño global del plásmido. Como se usa en el presente documento, las regiones de ADN que están entre las unidades transcripcionales, que están ocupadas por ADN que no tiene un papel regulador ni codifica antígenos seleccionados, se denominan en el presente documento "regiones espaciadoras". El tamaño de las regiones espaciadoras es importante para determinar el nivel de interferencia transcripcional entre unidades transcripcionales, el nivel de impedimento estérico y el tamaño total del plásmido. Por lo tanto, el tamaño de cada elemento, bien sea una región codificante de proteína, una región de control reguladora o una región espaciadora debe tenerse en cuenta cuidadosamente y limitarse a la menor cantidad eficaz de pares de bases.

35 Las realizaciones de la presente invención proporcionan un plásmido de ADN con tres unidades transcripcionales que tiene una longitud total menor o igual a aproximadamente 18 kilo pares de bases (kb) de ADN. En una realización alternativa, la presente invención proporciona un plásmido de ADN con tres unidades transcripcionales que tiene una longitud total menor o igual a aproximadamente 17 kb de ADN. Otra realización de la presente invención proporciona un plásmido de ADN con tres unidades transcripcionales que tiene una longitud total menor o igual a aproximadamente 16 kb de ADN. Una determinada realización de la presente invención proporciona un plásmido de ADN con tres unidades transcripcionales que tiene una longitud total menor o igual a aproximadamente 15 kb de ADN. Otra realización adicional de la presente invención proporciona un plásmido de ADN con tres unidades transcripcionales que tiene una longitud total menor o igual a aproximadamente 14 kb de ADN. Una realización específica de la presente invención proporciona un plásmido de ADN con tres unidades transcripcionales que tiene una longitud total menor o igual a aproximadamente 13 kb de ADN. Una realización particular de la presente invención proporciona un plásmido de ADN con tres unidades transcripcionales que tiene una longitud total menor o igual a aproximadamente 12 kb de ADN. Otra realización de la presente invención proporciona un plásmido de ADN con tres unidades transcripcionales que tiene una longitud total menor o igual a aproximadamente 11 kb de ADN.

50 Como se usa en el presente documento, "alrededor de" o "aproximadamente" generalmente significaría dentro del 20 por ciento de un valor o intervalo determinado.

Como se define en la Figura 1, la orientación del sentido de la transcripción entre las tres unidades transcripcionales es otro asunto a considerar para el diseño del plásmido de ADN. Un experto en la materia de biología molecular apreciaría que en un plásmido de ADN circular, hay sólo dos sentidos de la transcripción. Por lo tanto, en un plásmido con tres unidades transcripcionales, al menos dos de ellas avanzarán en el mismo sentido. En una determinada realización de la invención, el sentido de la transcripción de la primera unidad transcripcional es en sentido opuesto al sentido de expresión de la segunda unidad transcripcional. En otra realización de la invención, el sentido de la transcripción de la primera unidad transcripcional es en sentido opuesto al sentido de expresión de la segunda unidad transcripcional y el sentido de la transcripción de la tercera unidad transcripcional es en el mismo sentido al de la segunda unidad transcripcional. En otra realización adicional de la invención, el sentido de la transcripción de la primera unidad transcripcional es en sentido opuesto al sentido de expresión de la segunda

unidad transcripcional y el sentido de la transcripción de la tercera unidad transcripcional es en el mismo sentido al de la primera unidad transcripcional.

Un experto en la materia apreciará que la numeración de las unidades transcripcionales como “primera”, “segunda” y “tercera” es únicamente por comodidad. Las tres unidades transcripcionales pueden disponerse en cualquier orden alrededor del plásmido.

En un plásmido con dos unidades transcripcionales, existen diversas limitaciones con respecto al sentido de la transcripción de las dos unidades transcripcionales. Si los sentidos de la transcripción de las dos unidades transcripcionales son opuestos, entonces las dos unidades transcripcionales pueden separarse entre sí por una región espaciadora tan pequeña como 200 pb, como alternativa, por una región espaciadora tan pequeña como 300 pb o, como alternativa, por una región espaciadora tan pequeña como 400 pb.

En un plásmido con dos unidades transcripcionales, si los sentidos de la transcripción de las dos unidades transcripcionales son idénticos, entonces las dos unidades transcripcionales deben separarse entre sí por una región espaciadora de al menos aproximadamente 500 pb. En otra realización, las dos unidades transcripcionales deben separarse entre sí por una región espaciadora de al menos aproximadamente 600 pb. En otra realización adicional, las dos unidades transcripcionales deben separarse entre sí por una región espaciadora de al menos aproximadamente 700 pb. En una determinada realización, las dos unidades transcripcionales deben separarse entre sí por una región espaciadora de al menos aproximadamente 800 pb. En otra realización, las dos unidades transcripcionales deben separarse entre sí por una región espaciadora de al menos aproximadamente 900 pb. En otra realización más, las dos unidades transcripcionales deben separarse entre sí por una región espaciadora de al menos aproximadamente 1000 pb.

En otra realización de la invención, el sentido de la transcripción de la primera unidad transcripcional es el mismo que el de la segunda unidad transcripcional. En otra realización adicional de la invención, el sentido de la transcripción de la primera unidad transcripcional es el mismo que el de la segunda unidad transcripcional y el sentido de la transcripción de la tercera unidad transcripcional es el mismo que el de la segunda unidad transcripcional. En una realización particular de la invención, el sentido de la transcripción de la primera unidad transcripcional es el mismo que el de la expresión de la segunda unidad transcripcional y el sentido de la transcripción de la tercera unidad transcripcional es opuesto al de la primera unidad transcripcional.

El tamaño de las regiones espaciadoras es una variable que puede manipularse para liberar interferencia transcripcional entre unidades transcripcionales, disminuir el impedimento estérico y controlar el tamaño global del plásmido. En la realización mostrada en la Figura 1, hay una región espaciadora que separa las unidades transcripcionales 1 y 2 que se localiza entre los promotores del CMVS y CMVH. Como se usa en el presente documento, la región espaciadora que separa las unidades transcripcionales 1 y 2 se conoce como “región espaciadora 1”. En la realización mostrada en la Figura 1, hay una región espaciadora que separa las unidades transcripcionales 2 y 3 y se localiza entre la poli A de SV40 y el promotor Lap 1 del VHS. Como se usa en el presente documento, la región espaciadora que separa las unidades transcripcionales 2 y 3 se conoce como “región espaciadora 2”. En la realización mostrada en la Figura 1, hay una tercera región espaciadora que separa las unidades transcripcionales 3 y 1 que se localiza entre la poli A de la HCB y la poli A de la beta-globina de conejo. Como se usa en el presente documento, la región espaciadora que separa las unidades transcripcionales 3 y 1 se conoce como “región espaciadora 3”. Véase la figura 1.

Otra característica de la invención es que el tamaño global del plásmido puede minimizarse usando las regiones espaciadoras del plásmido eucariota para satisfacer las funciones del plásmido y/o del adyuvante. Por ejemplo, en la realización mostrada en la figura 1, la región espaciadora 3 también incluye el origen de replicación bacteriano. Además, en la realización mostrada en la figura 1, la región espaciadora 2 incluye el gen de kanamicina para el crecimiento en bacterias. En otras realizaciones, las regiones espaciadoras incluyen secuencias isla CpG para estimular la respuesta inmunitaria. En otra realización, las regiones espaciadoras incluyen secuencias PTC y o ETA para potenciar la expresión de antígenos. En otra realización adicional de la invención, la región espaciadora puede incluir secuencias potenciadoras. En otra realización de la invención, la región espaciadora puede incluir secuencias no traducidas que se sabe que son útiles potenciando la expresión.

En una realización de la invención, la región espaciadora 1 tiene un tamaño menor que aproximadamente 5 kb, como alternativa menor que aproximadamente 4 kb. En otra realización de la invención, la región espaciadora 1 tiene un tamaño menor que aproximadamente 3 kb, como alternativa menor que aproximadamente 2 kb. En una determinada realización de la invención, la región espaciadora 1 tiene un tamaño menor que aproximadamente 1 kb. En una realización particular de la invención, la región espaciadora 1 tiene un tamaño entre aproximadamente 800 pares de bases (pb) y aproximadamente 1000 pb. En una realización alternativa de la invención, la región espaciadora 1 tiene un tamaño de entre aproximadamente 600 pb y aproximadamente 800 pb. En una determinada realización de la invención, la región espaciadora 1 tiene un tamaño de entre aproximadamente 400 pb y aproximadamente 600 pb. En otra realización de la invención, la región espaciadora 1 tiene un tamaño de entre aproximadamente 300 pb y aproximadamente 400 pb. En otra realización de la invención, la región espaciadora 1 tiene un tamaño de menos de aproximadamente 400 pb. En una realización específica de la invención, la región espaciadora 1 tiene un tamaño de entre aproximadamente 200 pb y aproximadamente 300 pb. En una realización

particular de la invención, la región espaciadora 1 tiene un tamaño de entre aproximadamente 100 pb y aproximadamente 200 pb. En otra realización de la invención, la región espaciadora 1 tiene un tamaño de entre aproximadamente 10 pb y aproximadamente 100 pb.

5 En una realización de la invención, la región espaciadora 2 tiene un tamaño menor que aproximadamente 5 kb, como alternativa menor que aproximadamente 4 kb. En otra realización de la invención, la región espaciadora 2 tiene un tamaño menor que aproximadamente 3 kb, como alternativa menor que aproximadamente 2 kb. En una realización determinada de la invención, la región espaciadora 2 tiene un tamaño menor que aproximadamente 1 kb. En otra realización de la invención, la región espaciadora 2 tiene un tamaño menor que aproximadamente 1100 pb. En una realización particular de la invención, la región espaciadora 2 tiene un tamaño de entre aproximadamente 800 pares de bases (pb) y aproximadamente 1000 pb. En una realización alternativa de la invención, la región espaciadora 2 tiene un tamaño de entre aproximadamente 600 pb y aproximadamente 800 pb. En una realización determinada de la invención, la región espaciadora 2 tiene un tamaño de entre aproximadamente 400 pb y aproximadamente 600 pb. En otra realización de la invención, la región espaciadora 2 tiene un tamaño de entre aproximadamente 300 pb y aproximadamente 400 pb. En una realización específica de la invención, la región espaciadora 2 tiene un tamaño de entre aproximadamente 200 pb y aproximadamente 300 pb. En una realización particular de la invención, la región espaciadora 2 tiene un tamaño de entre aproximadamente 100 pb y aproximadamente 200 pb. En otra realización de la invención, la región espaciadora 1 tiene un tamaño de entre aproximadamente 10 pb y aproximadamente 100 pb.

20 En una realización de la invención, la región espaciadora 3 tiene un tamaño de menos de aproximadamente 5 kb, como alternativa menos de aproximadamente 4 kb. En otra realización de la invención, la región espaciadora 3 tiene un tamaño de menos de aproximadamente 3 kb, como alternativa menos de aproximadamente 2 kb. En una realización determinada de la invención, la región espaciadora 3 tiene un tamaño de menos de aproximadamente 1 kb de tamaño. En otra realización de la invención, la región espaciadora 3 tiene un tamaño de menos de aproximadamente 1100 pb. En una realización particular de la invención, la región espaciadora 3 tiene un tamaño de entre aproximadamente 800 pb y aproximadamente 1000 pb. En una realización alternativa de la invención, la región espaciadora 3 tiene un tamaño de entre aproximadamente 600 pb y aproximadamente 800 pb. En una realización determinada de la invención, la región espaciadora 3 tiene un tamaño de entre aproximadamente 400 pb y aproximadamente 600 pb. En otra realización de la invención, la región espaciadora 3 tiene un tamaño de entre aproximadamente 300 pb y aproximadamente 400 pb. En una realización específica de la presente invención, la región espaciadora 3 tiene un tamaño de entre aproximadamente 200 pb y aproximadamente 300 pb. En una realización particular de la invención, la región espaciadora 3 tiene un tamaño de entre aproximadamente 100 pb y aproximadamente 200 pb. En otra realización de la invención, la región espaciadora 3 tiene un tamaño de entre aproximadamente 10 pb y aproximadamente 100 pb.

C. Antígenos Expresados por las Composiciones Inmunogénicas de la Presente Invención

35 Como se usa en el presente documento, "polipéptido" se refiere a una proteína, glucoproteína, péptido u otros antígenos de proteína modificados seleccionados, que codifican los plásmidos y las composiciones inmunogénicas de la presente invención. Las realizaciones de la invención proporcionan plásmidos y composiciones inmunogénicas, que inducen una respuesta inmunitaria a "polipéptidos" en un huésped vertebrado contra un antígeno seleccionado. Como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno seleccionado" se refiere a estos polipéptidos. 40 Cuando el ADN plasmídico expresa los antígenos seleccionados, que comprenden los polipéptidos, pueden incluir una proteína, poliproteína, polipéptido, péptido, fragmento o una fusión de los mismos derivados de un virus, bacteria, hongo, parásito, prión o combinaciones de los mismos patógenos. Como alternativa, los antígenos seleccionados, pueden incluir una proteína, poliproteína, polipéptido, péptido, fragmento o fusión de los mismos derivados de una célula cancerosa o célula tumoral. En otra realización, los antígenos seleccionados pueden incluir una proteína, poliproteína, polipéptido, péptido, fragmento o fusión de los mismos derivados de un alérgeno para interferir con la producción de IgE para moderar respuestas alérgicas contra el alérgeno. En otra realización 45 adicional, los antígenos seleccionados pueden incluir una proteína, poliproteína, polipéptido, péptido, fragmento o fusión de los mismos derivados de una molécula o parte de la misma que representa los producidos por un huésped (una automolécula) de una manera, cantidad o localización no deseada, tal como las procedentes de la proteína precursora amiloide, para prevenir o tratar enfermedades caracterizadas por deposición amiloide en un huésped vertebrado. En una realización de la presente invención, los antígenos seleccionados pueden incluir una proteína, poliproteína, polipéptido, péptido o fragmento derivado del VIH-1. 50

Las realizaciones de la presente invención también se refieren a composiciones inmunogénicas que comprenden un plásmido que codifica los antígenos seleccionados (1) de un virus, bacteria, hongo o parásito patógeno para suscitar 55 una respuesta inmunitaria en un huésped vertebrado o (2) de un antígeno contra el cáncer o antígeno asociado a tumores de una célula cancerosa o célula tumoral para suscitar un efecto terapéutico o profiláctico anticanceroso en un sujeto mamífero o (3) de un alérgeno para interferir con la producción de IgE para moderar respuestas alérgicas contra el alérgeno o (4) de una molécula o parte de la misma que representa las producidas por un huésped (una automolécula) de una manera, cantidad o localización no deseada, para reducir tal efecto no deseado.

60 En otra realización, una composición inmunogénica deseable puede utilizar un plásmido con tres unidades transcripcionales de la presente invención, que codifica antígenos seleccionados para inducir una respuesta

5 inmunitaria dirigida a prevenir o a tratar una de las siguientes enfermedades virales: virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la inmunodeficiencia simia, virus sincitial respiratorio, virus paragripal de tipos 1-3, virus gripal, virus del herpes simple, citomegalovirus humano, virus de la Hepatitis A, virus de la Hepatitis B, virus de la Hepatitis C, papilomavirus humano, poliovirus, rotavirus, calicivirus, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la rubéola, adenovirus, virus de la rabia, virus del moquillo canino, virus de la peste bovina, metaneumovirus humano, neumovirus aviar (antiguamente virus de la rinotraqueitis de los pavos), virus Hendra, virus Nipah, coronavirus, parvovirus, virus de la rinotraqueitis infecciosa, virus de la leucemia felina, virus de la peritonitis infecciosa felina, virus de la bursitis infecciosa aviar, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la enfermedad de Marek, virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino, virus de la arteritis equina y diversos virus de la Encefalitis y Coronavirus, tales como virus del SARS.

10 En una realización particular, las composiciones inmunogénicas que comprenden los plásmidos con tres unidades transcripcionales de la presente invención incluyen las que codifican antígenos seleccionados de patógenos que causan enfermedades emergentes tales como el virus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS, siglas en inglés), virus del herpes humano 8 (VHH-8), Hantavirus, Vibrio cólera 0139, *Helicobacter pylori* y *Borrelia burgdorferi*.

15 En otra realización, las composiciones inmunogénicas que comprenden los plásmidos de la presente invención incluyen las dirigidos a la prevención y/o al tratamiento de enfermedades bacterianas causadas por, sin limitación, *Haemophilus influenzae* (tanto tipificable como no tipificable), *Haemophilus somnus*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Bordetella pertussis*, *Alloiococcus otiditis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium aviumMycobacterium intracellulare complex*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium tetani*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma gallisepticum*.

25 Las realizaciones de la presente invención también se refieren a composiciones inmunogénicas que comprenden un plásmido que codifica antígenos seleccionados de, sin limitación, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus* e *Histoplasma*. En determinadas realizaciones, tales composiciones inmunogénicas, que comprenden un plásmido que codifica antígenos seleccionados de hongos, se usan para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades fúngicas.

30 Otra realización de la presente invención también se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden un plásmido que codifica antígenos seleccionados de, sin limitación, *Leishmania major*, *Ascaris*, *Trichuris*, *Giardia*, *Schistosoma*, *Cryptosporidium*, *Trichomonas*, *Toxoplasma gondii* y *Pneumocystis carinii*. En realizaciones particulares, tales composiciones inmunogénicas que comprenden un plásmido que codifica antígenos seleccionados de parásitos se usan para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades parasitarias.

35 En una realización particular, la presente invención proporciona composiciones inmunogénicas para suscitar un efecto terapéutico o profiláctico anticanceroso en un huésped vertebrado, que comprende un plásmido que codifica un antígeno seleccionado tal como un antígeno contra el cáncer o un antígeno asociado con tumores, incluyendo, pero sin limitación, antígeno prostático específico, antígeno carcinoembrionario, MUC-1, Her2, CA-125 y MAGE-3. En algunas realizaciones, el mismo antígeno o variantes del antígeno puede situarse en unidades transcripcionales múltiples para potenciar la transcripción y la dosis final de un antígeno diana particular.

40 Las realizaciones de la presente invención también proporcionan composiciones inmunogénicas que comprenden plásmidos que codifican antígenos seleccionados que son alérgenos para su uso en la moderación de respuestas contra alérgenos en un huésped vertebrado, incluyendo aquellas que contienen un alérgeno o fragmento del mismo. Los ejemplos de tales alérgenos se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.830.877 y en la Publicación de Patente Internacional N° WO99/51259, que se incorporan en el presente documento por referencia. Tales alérgenos incluyen, sin limitación, polen, veneno de insectos, caspa de animales, esporas fúngicas y fármacos. Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden usarse para interferir con la producción de anticuerpos IgE, un motivo de reacciones alérgicas conocido.

45 Las realizaciones de la presente invención también se refieren a composiciones inmunogénicas que comprende un plásmido que codifica antígenos seleccionados para moderar respuestas contra automoléculas en un huésped vertebrado. Los antígenos seleccionados incluyen aquellos que contienen una automolécula o un fragmento de la misma. Los ejemplos de tales automoléculas incluyen la cadena β de insulina que está implicada en la diabetes, la molécula G17 implicada en la enfermedad del reflujo gastroesofágico, y antígenos que regulan positivamente respuestas autoinmunes en enfermedades tales como esclerosis múltiple, lupus y artritis reumatoide. También se incluye el péptido β -amiloide (denominado también péptido A β), que es un fragmento interno de 39-43 aminoácidos de la proteína precursora amiloide (PPA), que se genera procesando la PPA por las enzimas β y γ secretasa. El péptido A β 1-42 tiene la siguiente secuencia: Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala (SEC ID N°: 1).

Para diseñar los plásmidos de ADN de la presente invención, también es deseable, en la selección y uso de las secuencias que codifican los antígenos seleccionados, modificar el uso de codones de los antígenos seleccionados que codifican secuencias génicas, así como los plasmidos de ADN en los que se insertan, para aumentar la expresión de los antígenos y/o eliminar secuencias inhibitoras en su interior. La eliminación de secuencias inhibitoras puede conseguirse usando la tecnología analizada con detalle en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.965.726; 5.972.596; 6.174.666; 6.291.664; y 6.414.132; y en la Publicación de Patente Internacional N° WO01/46408, incorporada por referencia en el presente documento. Brevemente descrita, esta tecnología implica mutación de secuencias inhibitoras/de inestabilidad identificadas en el gen seleccionado, preferentemente con mutaciones puntuales múltiples.

- 10 Como una realización específica ilustrada a continuación, el plásmido de ADN y las composiciones inmunogénicas de la presente invención emplean deseablemente una o más secuencias optimizadas de genes del VIH-1, tales como gag, pol, env nef, tat, y vif.

El plásmido con tres unidades transcripcionales de la presente invención es también adecuado para su uso para transfectar, transformar o infectar una célula huésped para expresar tres o más proteínas de polipéptidos *in vitro*.

15 **D. Promotores Útiles en las Unidades Transcripcionales**

Los plásmidos de ADN de la presente invención comprenden una, dos o tres unidades transcripcionales. Cada unidad transcripcional comprende al menos un promotor. Por lo tanto, en determinadas realizaciones de la invención, el ácido nucleico que codifica un antígeno seleccionado está bajo el control transcripcional de un promotor. Un "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula o introducida en la maquinaria sintética, necesaria para iniciar la transcripción específica de un gen. La frase "bajo control transcripcional" significa que el promotor está en la localización y orientación correctas en relación con el ácido nucleico para controlar la iniciación de la ARN polimerasa y la transcripción del gen.

El término promotor como se usa en el presente documento se refiere a un grupo de módulos de control transcripcionales que se agrupan alrededor del sitio de iniciación para la ARN polimerasa. La mayoría del conocimiento sobre como se organizan los promotores deriva de análisis de diversos promotores virales, incluyendo aquellos para la timidina quinasa (tk) del VHS y las unidades de transcripción tempranas del SV40. Estos estudios, aumentados por trabajos más recientes, han demostrado que los promotores están compuestos por módulos funcionales individuales, consistiendo cada uno en aproximadamente 7-20 pb de ADN y contienen uno o más sitios de reconocimiento para la activación transcripcional o proteínas represoras.

30 En cada promotor funciona al menos un módulo para colocar el sitio de inicio para la síntesis de ARN. El mejor ejemplo conocido de esto es la caja TATA, pero en algunos promotores que carecen de una caja TATA, tal como el promotor del gen de la desoxinucleotidil transferasa terminal de mamíferos y el promotor de los genes tardíos de SV40, un elemento individual superpuesto en el propio sitio de inicio ayuda a fijar el lugar de iniciación.

Los promotores adecuados para su uso en cualquiera de las unidades transcripcionales incluyen todos los promotores activos en células eucariotas. Los ejemplos de promotores eucariotas adecuados incluyen el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMVH) (opcionalmente con el potenciador del CMVH) (véase, por ejemplo, Boshart y col, Cell, 41: 521-530 (1985)), el promotor de citomegalovirus simio (CMVS), el promotor del citomegalovirus murino (CMVM), el promotor LAP1 del virus del herpes simple (VHS), el promotor del virus de simio 40 (SV40), el promotor del factor de elongación humano 1 alfa, las repeticiones largas terminales (LTR) retrovirales, el promotor de desmina específico de células musculares o cualquier otro promotor activo en una célula presentadora de antígenos.

Además, los promotores eucariotas adecuados pueden caracterizarse por seleccionarse de entre promotores constitutivos, promotores inducibles, promotores específicos de tejido y otros. Los ejemplos de promotores constitutivos que son no específicos en cuanto a actividad y empleados en los plásmidos de ADN que codifican antígenos seleccionados incluyen, si limitación, el promotor retroviral del virus del sarcoma de Rous (VSR), el promotor retroviral de LTR (opcionalmente con el potenciador del VSR), el promotor de SV40, el promotor de la didihidrolato reductasa, el promotor de la β -actina, el promotor de la fosfoglicerol quinasa (PGK) y el promotor de EF1 α (Invitrogen). Los promotores inducibles regulados por compuestos proporcionados exógenamente, incluyen, sin limitación, el promotor de arabinosa, el promotor de metalotionina (MT) de oveja inducible por cinc, el promotor del virus tumoral mamario de ratón (VTMR) inducible por dexametasona (Dex), el sistema promotor de la polimerasa de T7 (documento WO 98110088); el promotor de ecdisona de insectos (No y col, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 3346-3351(1996)), el sistema represible por tetraciclina (Gossen y col, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551 (1992)), el sistema inducible por tetraciclina (Gossen y col, Science, 268: 1766-1769, (1995) véase también Harvey y col, Curr. Opin. Chem. Biol., 2: 512-518, (1998)), el sistema inducible por RU486 (Wang y col, Nat. Biotech., 15: 239-243, (1997) y Wang y col, Gene Ther., 4: 432-441, (1997)) y el sistema inducible por rapamicina (Magari y col, J. Clin. Invest., 100: 2865-2872, (1997)).

Otros tipos de promotores inducibles que pueden ser útiles en los plásmidos de ADN de la presente invención son los regulados por un estado fisiológico específico, por ejemplo, temperatura o fase aguda o en células replicantes

sólo. Los promotores específicos de tejido útiles incluyen los promotores de genes que codifican la β -actina esquelética, la cadena ligera de miosina 2A, distrofina, creatina quinasa de músculo, así como, promotores de músculo sintéticos con actividades superiores a las de los promotores de origen natural (véase Li y col., *Nat Biotech.*, 17: 241-245, (1999)). Los ejemplos de promotores que son específicos de tejidos se conocen para el hígado (albúmina, Miyatake y col. *J. Virol.*, 71: 5124-32 (1997); promotor del núcleo del virus de la hepatitis B, Sandig y col., *Gene Ther.*, 3: 1002-9, (1996); alfa-fetoproteína (AFP), Arbuthnot y col., *Hum. Gene Ther.*, 7: 1503-14, (1996)), hueso (osteocalcina, Stein y col., *Mol. Biol. Rep.*, 24: 185-96, (1997); sialoproteína ósea, Chen y col., *J. Bone Miner. Res.*, 11: 654-64, (1996)), linfocitos (CD2, Hansal y col., *J. Immunol.*, 161: 1063-8, (1988)); cadena pesada de inmunoglobulina; cadena α de receptores de linfocitos T), neuronales (promotor de enolasa específico de neurona (NSE), Andersen y col. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13: 503-15, (1993); el gen de cadena ligera de neurofilamentos, Piccioli y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5611-5, (1991); el gen *ngf* específico de neuronas, Piccioli y col., *Neuron*, 15: 373-84; (1995)); entre otros. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional N° WO00/55335 para un listado adicional de promotores conocidos útiles en este contexto.

E. Señales de poliadenilación útiles en las unidades de transcripción

Los plásmidos de ADN de la presente invención comprenden tres unidades transcripcionales y cada unidad transcripcional comprende al menos una señal de poliadenilación. Una "señal de poliadenilación", como se define en el presente documento, se refiere a una secuencia de terminación (o sitio de terminación) que termina la transcripción de una unidad transcripcional particular y garantiza que la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido se transcriba y traduzca adecuadamente. El sitio de terminación puede ser de origen sintético o natural. Los ejemplos de sitios de terminación incluyen, pero sin limitación, una señal de poliadenilación y un sitio de terminación transcripcional bidireccional sintético. Típicamente, el sitio de poliadenilación detiene la transcripción de secuencias de ADN.

Las señales de poliadenilación adecuadas para su uso en cualquiera de las unidades transcripcionales incluyen todas las señales de poliadenilación activas en células eucariotas. Los ejemplos de señales de poliadenilación eucariotas incluyen la señal poli(A) de la beta-globina de conejo, una señal que, en la bibliografía, se ha caracterizado como fuerte (Gil y Proudfoot, *Cell* 49: 399-406 (1987); Gil y Proudfoot, *Nature* 312: 473-474 (1984)). Una de sus características clave es la estructura de su elemento aguas abajo, que contiene dominios ricos en UG- y U-. Otras señales poliA incluyen poliA sintética, poli A de Timidina quinasa del VHS, (véase Cole, C. N. y T. P. Stacy, *Mol. Cell. Biol.* 5: 2104-2113 (1985)); poli A de la alfa-globina humana, poli A de SV40 (Véase Schek; N, Cooke, C., y J. C. Alwine, *Mol. Cell Biol.* 12: 5386-5393 (1992)); poli A de la beta-globina humana (Véase Gil, A., y N. J. Proudfoot, *Cell* 49: 399-406 (1987)); poli A de poliomavirus (véase Batt, D. B y G. G. Carmichael *Mol. Cell. Biol.* 15: 4783-4790 (1995); poli A de la hormona de crecimiento bovina (Gimmi, E. R, Reff, M. E., e I. C. Deckman, *Nucleic Acid Res.* (1989)). En la técnica se conocen muchas otras señales de poliadenilación y también serán útiles en realizaciones de la presente invención.

Las señales de poliadenilación tanto tempranas como tardías del SV40 son útiles en las diversas realizaciones de la presente invención. Véase Schek, y col., *Mol. Cell Biol.* 12: 5386-5393 (1992). Estas secuencias se codifican dentro del fragmento de 237 pares de bases entre el sitio BamHI en el nucleótido 2533 y el sitio BclI en el nucleótido 2770 del genoma del SV40 (Carswell y Alwine, *Mol. Cell. Biol.* 9: 4248; 1989). Carswell y Alwine llegaron a la conclusión de que de las dos señales de poliadenilación del SV40, la señal tardía era más eficaz, más probablemente porque comprende elementos de secuencia aguas abajo y aguas arriba que facilitan una escisión y poliadenilación eficaces.

Usando procedimientos conocidos en la materia pueden identificarse o construirse sitios de poliadenilación adicionales. Un sitio de poliadenilación mínimo se compone de AAUAAA y aproximadamente 30 nucleótidos aguas abajo se encuentra un segundo sitio de reconocimiento, generalmente una secuencia rica en G/U. Como se usa en el presente documento, para facilitar la preparación de ADN adecuados para la incorporación en vectores de expresión, las secuencias se presentan como ADN, en lugar de ARN. Cuando se presentan como ADN, el sitio de poliadenilación se compone de AATAAA, por ejemplo, con una región rica en G/T aguas abajo. Ambas secuencias deben estar presentes para formar un sitio de poliadenilación eficaz. La finalidad de estos sitios es incorporar proteínas de unión a ARN específicas para el ARN. El sitio AAUAAA se une al factor de especificidad de poliadenilación y escisión (CPSF; Murthy K. G., y Manley J. L. (1995), *Genes Dev* 9: 2672-2683) y el segundo sitio, frecuentemente una secuencia G/U, se une al factor estimulante de la escisión (CstF; Takagaki Y. y Manley J. L. (1997) *Mol Cell Biol* 17: 3907-3914). El factor estimulante de la escisión (CstF, siglas en inglés) se compone de varias proteínas, pero la proteína responsable de la unión del ARN es el CstF-64, un miembro de la familia de proteínas de dominio de ribonucleoproteínas (Takagaki y col. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1403-1407).

F. Transportadores, Diluyentes, Agentes Facilitadores, Adyuvantes y Formulaciones Útiles para las Composiciones de la Inmunogénicas de la Presente Invención

Los plásmidos de ADN y las composiciones inmunogénicas útiles en la presente invención, comprenden adicionalmente un diluyente, excipiente o un transportador farmacéuticamente aceptable. En una realización, dicho diluyente farmacéuticamente aceptable es agua estéril, solución salina isotónica estéril o un tampón biológico. Las composiciones antigénicas también pueden mezclarse con tales diluyentes o transportadores de una manera convencional. Como se usa en el presente documento la frase "transportador farmacéuticamente aceptable"

pretende incluir cualquier y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de absorción y similares, compatibles con la administración a seres humanos u otros huéspedes vertebrados. El transportador apropiado es obvio para los expertos en la materia y dependerá en gran parte de la vía de administración.

- 5 Otros excipientes adicionales que pueden estar presentes en las composiciones inmunogénicas de la presente invención son adyuvantes, agentes facilitadores, conservantes, agentes tensioactivos y estabilizantes químicos, agentes de suspensión o de dispersión. Típicamente, para determinar la mejor formulación para su eficacia en seres humanos o animales los estabilizantes, adyuvantes y conservantes se optimizan.

1. Adyuvantes

10 Un adyuvante es una sustancia que potencia la respuesta inmunitaria cuando se administra junto con un inmunógeno o un antígeno. Se ha demostrado que varias citocinas o linfocinas tienen actividad inmunomoduladora, y por tanto pueden usarse como adyuvantes, incluyendo, pero sin limitación, las interleucinas 1- α , 1- β , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes), los interferones- α , β y γ , el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.078.996 y el Número de entrada a la ATCC 39900), el factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF) y los factores α y β de necrosis tumoral (TNF). Otros adyuvantes adicionales útiles en la presente invención incluyen una quimiocina, incluyendo sin limitación, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES. También pueden ser útiles como adyuvantes moléculas de adhesión, tales como selectina, por ejemplo, L-selectina, P-selectina y E-selectina. Otros adyuvantes útiles adicionales incluyen, sin limitación, una molécula de tipo mucina, por ejemplo, CD34, GlyCAM-1 y MadCAM-1, un miembro de la familia de integrina tal como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95, un miembro de la superfamilia de inmunoglobulina tal como PECAM, ICAM, por ejemplo, ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, CD2 y LFA-3, moléculas coestimuladoras tales como CD40 y CD40L, factores de crecimiento que incluyen factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, B7.1, B7.2, PDGF, BL-1 y factor de crecimiento endotelial vascular, moléculas receptoras que incluyen Fas, el receptor del TNF, Fit, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2 y DR6. Otra molécula adyuvante adicional incluye Caspasa (ICE). Véanse, además las Publicaciones de Patente Internacional Nos WO98/177 y WO99/43839, incorporadas en el presente documento por referencia.

30 En una realización, el adyuvante deseado es la proteína IL-12, que se expresa a partir de un plásmido. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.457.038; 5.648.467; 5.723.127 y 6.168.923, incorporadas por referencia en el presente documento. En una realización, la citocina puede administrarse como una proteína. En una realización determinada, la IL-12 se expresa a partir de una o dos de las tres unidades transcripcionales del plásmido de ADN de la invención. Como alternativa, la IL-12 se expresa independientemente a partir de un plásmido distinto. En otra realización, se administra un plásmido que codifica y expresa la IL-15 en lugar de un plásmido que codifica y expresa la IL-12.

Los adyuvantes adecuados usados para potenciar una respuesta inmunitaria incluyen, sin limitación, MPLTM (monofosforil lípido A 3-O-desacilado; Corixa, Hamilton, MT), que se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 4.912.094, que se incorpora por referencia en el presente documento. También son adecuados para su uso como adyuvantes los análogos sintéticos del lípido A o los compuestos de aminoalquil glucosamina fosfato (AGP) o derivados o análogos de los mismos que se encuentran disponibles en Corixa (Hamilton, MT) y que se describen en la Patente de Estados Unidos Nº 6.113.918, que se incorpora por referencia en el presente documento. Una AGP de este tipo es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino] etil 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O[(R)3-tetradecanoil oxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoil oxitetradecanoil-amino]-b-D-glucopiranosido, que también se conoce como 529 (anteriormente conocido como RC529). Este adyuvante 529 se formula como una forma acuosa o como una emulsión estable.

Otros adyuvantes adicionales incluyen aceite mineral y emulsiones en agua, sales de aluminio (alumbre), tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, etc., Amfihigen, Avridina, L121/escualeno, D-lactida-poliilactida/glucósido, polioles plurónicos, muramil dipéptido, *Bordetella* inactivada, saponinas, tale como StimulonTM QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), descrito en la Patente de Estados Unidos Nº 5.057.540, que se incorpora en el presente documento por referencia, y partículas generadas de los mismos tales como ISCOMS (complejos inmunoestimulantes), *Mycobacterium tuberculosis*, lipopolisacáridos bacterianos, polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen un motivo CpG (Patente de Estados Unidos Nº 6.207.646, que se incorpora por referencia en el presente documento) una toxina toserínica (PT), o una toxina termolábil de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63, LT-R72, PT-K9/G129; véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente Internacional Nos WO 93/13302 y WO 92/19265, incorporadas en el presente documento por referencia.

También son útiles como adyuvantes las toxinas del cólera y sus mutantes, incluyendo las descritas en la Solicitud de Patente Internacional Publicada número WO 00/18434 (en la que el ácido glutámico en la posición del aminoácido 29 se sustituye por otro aminoácido (distinto del ácido aspártico), preferentemente una histidina). Toxinas CT o mutantes similares se describen en la Solicitud de Patente Internacional publicada número WO 02/098368 (en la que la isoleucina en la posición del aminoácido 16 se sustituye por otro aminoácido, tanto en

solitario como en combinación con la sustitución de la serina en la posición del aminoácido 68 por otro aminoácido; y/o en el que la valina en la posición de aminoácido 72 se sustituye por otro aminoácido). Otras toxinas CT se describen en la Solicitud de Patente Internacional publicada número WO 02/098369 (en el que la arginina en la posición del aminoácido 25 se sustituye por otro aminoácido; y/o se inserta un aminoácido en la posición 49; y/o se insertan dos aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 35 y 36).

En algunas realizaciones, el ADN plasmídico que codifica un adyuvante puede administrarse en una composición inmunogénica. En tales casos, un adyuvante cuyo ADN se inserta en un plásmido para inclusión en las composiciones inmunogénicas de la invención incluye, pero sin limitación, interleucina-1 (IL-1), IL-5, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- α , TNF- β y BL-1 (como se describe en la Solicitud de Patente Internacional publicada WO 98/17799); B7.2 (como se describe en la Solicitud de Patente Internacional publicada WO 00/51432); IL-8, RANTES, G-CSF, IL-4, IL-18 mutante, IL-7, TNF-R (como se describe en la Solicitud de Patente Internacional publicada WO 99/43839); y CD80 mutante (como se describe en la Solicitud de Patente Internacional publicada WO 00/66162). Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína de IL-12" significa que se refiere a una o a ambas subunidades de IL-12 humana incluyendo las proteínas monocatenarias de IL-12 en la que una sola secuencia codificante codifica las dos unidades y se expresa como una sola proteína que tiene una secuencia de engarce conectando las dos subunidades.

En una realización particular, la citocina se administra como una composición de ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que codifica la citocina bajo el control de secuencias reguladoras que dirigen su expresión en una célula de mamíferos. En otra realización adicional, en una composición inmunogénica el plásmido que expresa la citocina se administra con el plásmido de ADN que codifica los antígenos seleccionados. En otra realización adicional, la citocina se administra entre las administraciones de una composición inmunogénica de sensibilización y una composición inmunogénica de refuerzo. En otra realización adicional, la citocina se administra con la etapa de refuerzo. En otra realización adicional, la citocina se administra con las dos composiciones de sensibilización y de refuerzo.

En determinadas realizaciones de la invención, como adyuvante, en el plásmido puede incluirse ADN CpG. Como se usa en el presente documento, ADN CpG se refiere a un oligonucleótido que contiene al menos una molécula de ácido nucleico dinucleotídica CpG no metilada que contiene una secuencia dinucleotídica de citosina-guanina no metilada (es decir "ADN CpG") o ADN que contiene una citosina 5' seguido por guanosina 3' y unidas mediante un enlace fosfato) y activa el sistema inmunitario. Véase, la Patente de Estados Unidos 6.406.705 de Davis y col., y la Patente de Estados Unidos N° 6.207.646 de Krieg y col., que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. El ADN CpG de ADN bacteriano, pero no de ADN de vertebrado, tiene efectos inmunoestimuladores directos sobre células mononucleares de sangre periférica (CMSP) *in vitro*. Esta activación linfocítica se debe a dinucleótidos CpG no metilados, que están presentes a la frecuencia esperada en el ADN bacteriano (1/16), pero están infra-representados (supresión CpG, 1/50 a 1/60) y metilados en ADN de vertebrados. Se ha sugerido que la rápida inmunoactivación en respuesta a ADN CpG puede haber evolucionado como un componente de los mecanismos de defensa inmunitaria innatos que reconocen modelos estructurales específicos para moléculas microbianas. Véase la Patente de Estados Unidos 6.406.705 de Davis y col., y la Patente de Estados Unidos N° 6.207.646 de Krieg y col., que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

En determinadas realizaciones, al sujeto se le administra una combinación de adyuvantes, en el que la combinación de adyuvantes incluye al menos un oligonucleótido que contiene al menos un dinucleótido de ADN CpG no metilado y al menos un adyuvante de ácido nucleico tal como IL-12.

2. Agentes o coagentes facilitadores

Las composiciones inmunogénicas compuestas por moléculas de polinucleótidos contienen deseablemente excipientes opcionales tales como agentes o "coagentes" facilitadores de la transfección de polinucleótidos, tales como, un anestésico local, un péptido, un lípido que incluye lípidos catiónicos, un liposoma o partículas lipídicas, una polimerización tal como polilisina, una polimerización tridimensional ramificado tal como un dendrímero, un carbohidrato, una anfifilina catiónica, un detergente, un tensioactivo de bencilamonio u otro compuesto que facilita la transferencia de polinucleótidos a las células. Dicho agente facilitador incluye el anestésico local bupivacaína o tetracaína (véanse las Patentes de Estados Unidos N° 5.593.972; 5.817.637; 5.380.876; 5.981.505 y 6.383.512 y la Solicitud de Patente Internacional N° WO98/17799 que se incorporan en el presente documento por referencia). Otros ejemplos no exclusivos de tales agentes o coagentes facilitadores útiles en la presente invención se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 5.703.055; 5.739.118; 5.837.533; en la Publicación de Patente Internacional N° WO96/10038, publicada el 4 de abril, 1996; y la Publicación de Patente Internacional N° WO94/1673 publicada el 8 de agosto de 1994, que se incorporan en el presente documento por referencia.

Más preferentemente, el agente facilitador de la transfección está presente en una cantidad que forma uno o más complejos con las moléculas de ácido nucleico. Cuando el agente facilitador de la transfección se mezcla con moléculas de ácido nucleico o plásmidos de la presente invención, forma una diversidad de pequeños complejos o partículas que compactan el ADN y son homogéneas. Por tanto, en una realización de las composiciones inmunogénicas de la presente invención, los complejos se forman mezclando el agente facilitador de la transfección y al menos un plásmido de la presente invención.

En una realización particular, una composición inmunogénica de la presente invención puede comprender más de un tipo de plásmido. Como alternativa, en otra realización de las composiciones de la presente invención, el agente facilitador de la transfección puede mezclarse previamente con cada plásmido por separado. Las mezclas por separado se combinan después en una sola composición para garantizar que la proporción deseada de los plásmidos está presente en una sola composición inmunogénica, si todos los plásmidos deben administrarse en una sola administración en embolada. Como alternativa, el agente facilitador de la transfección y cada plásmido pueden mezclarse por separado y administrarse por separado para obtener la proporción deseada.

Cuando para definir esta realización de la composición inmunogénica en lo sucesivo en el presente documento, se usa el término "complejo" o la expresión "uno o más complejos" o "complejos" se entiende que el término abarca uno o más complejos. Cada complejo contiene un plásmido. Preferentemente, los complejos tienen un diámetro de entre aproximadamente 50 a aproximadamente 150 nm. Cuando el agente facilitador usado es un anestésico local, preferentemente la bupivacaína, se prefiere una cantidad de aproximadamente 0,1 por ciento en peso a aproximadamente 1,0 por ciento en peso basándose en el peso total de la composición de polinucleótido. Véase, también, la Publicación de Patente Internacional N° WO99/21591, que se incorpora en el presente documento por referencia y que enseña la incorporación de tensioactivos de bencilamonio como coagentes, preferentemente administrados en una cantidad de entre aproximadamente 0,001-0,03% en peso. De acuerdo con la presente invención, la cantidad de anestésico local está presente en una proporción con respecto a dichas moléculas de ácido nucleico de aproximadamente 0,01-2,5% p/v, de anestésico local a aproximadamente 1-10 µg/ml de ácido nucleico. Otro intervalo de este tipo es de aproximadamente 0,05-1,25% p/v de anestésico local a aproximadamente 100 µg/ml a 1 mg/ml de ácido nucleico.

3. Otros aditivos para las composiciones inmunogénicas

En las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden incluirse otros excipientes, incluyendo conservantes, principios estabilizantes, agentes tensioactivos y similares.

Los conservantes ejemplares adecuados incluyen clorobutanol, sorbato potásico, ácido sórbico, dióxido de azufre, propil galato, parabenos, etil vanilina, glicerina, fenol y paraclorofenol.

Los principios estabilizantes adecuados que pueden usarse incluyen, por ejemplo, casaminoácidos, sacarosa, gelatina, rojo de fenol, N-Z amina, difosfato monopotásico, lactosa, hidrolizado de lactalbúmina y leche deshidratada.

Las sustancias tensioactivas adecuadas incluyen, sin limitación, adyuvante incompleto de Freund, análogos de quinona, hexadecilamina, octadecilamina, ésteres de octadecil aminoácido, lisolecitina, bromuro de dimetildioctadecilamonio), metoxihexadecilglicerol y polioles plurónicos; poliaminas, por ejemplo, pirano, dextransulfato, poli IC, Carbopol; péptidos; por ejemplo péptido y dipéptido muramil, dimetilglicina, tuftsina; emulsiones de aceite; y geles minerales, por ejemplo fosfato de aluminio, etc. y complejos inmunoesimulantes (ISCOMS). Los plásmidos también pueden incorporarse en liposomas para su uso como una composición inmunogénica. Las composiciones inmunogénicas también pueden contener otros aditivos adecuados para el modo de administración de la composición inmunogénica seleccionado. La composición inmunogénica de la presente invención también puede implicar polinucleótidos liofilizados, que pueden usarse con otros excipientes farmacéuticamente aceptables para el desarrollo de formas de dosificación en polvo, líquidas o en suspensión. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Vol. 2, 19ª edición (1995), e.g., Capítulo 95 Aerosols; y la Publicación de Patente Internacional N° WO99/45966, cuyas enseñanzas se incorporan en el presente documento por referencia.

Estas composiciones inmunogénicas pueden contener aditivos adecuados para la administración mediante cualquier vía de administración convencional. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica de la invención se prepara para la administración a seres humanos en forma de, por ejemplo, líquidos, polvos, aerosoles, comprimidos, cápsulas, comprimidos o cápsulas o supositorios con recubrimiento entérico. Por tanto, las composiciones inmunogénicas también pueden incluir, pero sin limitación, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos, pastas y formulaciones biodegradables o de liberación sostenida implantables. En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas se preparan como una formulación para administración parenteral, el principio activo se proporciona en forma seca (*es decir*, en polvo o granular) para la reconstitución con un vehículo adecuado (*por ejemplo* agua pirógena estéril) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida. Otras formulaciones útiles que pueden administrarse por vía parenteral incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina, en una preparación liposomal, o como un componente de un sistema polimérico biodegradable. Las composiciones para liberación sostenida o para implantación pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero poco soluble, o una sal poco soluble.

La selección de transportadores, diluyentes y excipientes convencionales fisiológicamente aceptables, tales como disolventes, tampones, adyuvantes, agentes facilitadores u otros principios útiles en la preparaciones farmacéuticas de los tipos anteriormente descritos no limitan las composiciones inmunogénicas de la presente invención. La preparación de estas composiciones farmacéuticamente aceptables, a partir de los componentes descritos anteriormente, que poseen isotonicidad de pH, estabilidad y otras características convencionales se incluye en la experiencia de la técnica.

F. Dosificaciones y vías de administración, electroporación para composiciones inmunogénicas

En general, la selección de la "cantidad eficaz" o dosificación apropiada para los componentes de la composición (o composiciones) inmunogénica de la presente invención se basará también en la identidad de los antígenos seleccionados en la composición (o composiciones) inmunogénica empleada, así como en el estado físico del sujeto, incluyendo más especialmente la salud general, la edad y el peso del sujeto inmunizado. El procedimiento y vías de administración y la presencia de componentes adicionales en las composiciones inmunogénicas también pueden influir en las dosificaciones y cantidades de las composiciones del plásmido de ADN. Tal selección y ajuste ascendente o descendente de la dosis eficaz se incluye en la experiencia de la técnica. La cantidad de plásmido necesaria para inducir una respuesta inmunitaria, preferentemente una respuesta protectora, o producir un efecto exógeno en el paciente, sin efectos secundarios adversos significativos, varía dependiendo de estos factores. Las dosis adecuadas las determina fácilmente un experto en la materia.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención se administran a un ser humano o a un vertebrado no humano mediante una diversidad de vías incluyendo, pero sin limitación, intranasal, oral, vaginal, rectal, parenteral, intradérmica, intradérmica, transdérmica (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional N° WO 98/20734 que se incorpora en el presente documento por referencia), intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa e intraarterial. La vía apropiada se selecciona dependiendo de la naturaleza de la composición inmunogénica usada, y de una evaluación de la edad, peso, sexo y estado general del paciente y de los antígenos presentes en la composición inmunogénica y factores similares por un médico tratante.

El orden de la administración de la composición inmunogénica y los periodos de tiempo entre administraciones individuales los puede seleccionar el médico tratante o un experto en la materia basándose en las características físicas y respuestas exactas del huésped frente a la aplicación del procedimiento. Se espera que tal optimización se encuentre bien dentro del ámbito de la técnica.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para coexpresar una sola célula, *in vivo*, una, dos o tres fases de lectura abierta de productos génicos individuales, que comprende introducir entre aproximadamente 0,1 µg y aproximadamente 100 mg de un polinucleótido en el tejido del mamífero.

Las composiciones inmunogénicas pueden administrarse y la captación de los plásmidos potenciarse mediante el uso de electroporación en el momento de administración. Para realizar la electroporación, se colocan electrodos a una distancia de aproximadamente 1-4 mm, cerca del área en el que se inyecta el polinucleótido. La posición o diseño exacto de los electrodos puede variar siempre que se permita que pase la corriente a través de las fibras musculares perpendicular a su dirección en el área del polinucleótido inyectado. Véase la Patente de Estados Unidos N° 5.273.525 de G. A. Hofmann; la Patente de Estados Unidos N° 5.869.326 de G. A. Hofmann; la Patente de Estados Unidos N° 5.993.434 de S. B. Dev, y col.; la Patente de Estados Unidos N° 6.014.584 de G. A. Hofmann, y col.; la Patente de Estados Unidos N° 6.068.650 de G. A. Hofmann, y col.; la Patente de Estados Unidos N° 6.096.020 de G. A. Hofmann; la Patente de Estados Unidos N° 6.233.482 de G. A. Hofmann, y col.; la Patente de Estados Unidos N° 6.241.701 de G. A. Hofmann; la Patente de Estados Unidos N° 6.418.341 de G. A. Hofmann, y col.; la Patente de Estados Unidos N° 6.451.002 de S. B. Dev, y col.; la Patente de Estados Unidos N° 6.516.323 de G. A. Hofmann; la Patente de Estados Unidos N° 6.763.264 de G. A. Hofmann; la Patente de Estados Unidos N° 6.110.161 de I. Mathiesen, y col.; todas ellas incorporadas por referencia en su totalidad.

Una vez colocados los electrodos, el músculo se electropora o se estimula eléctricamente. La estimulación se administra mediante un impulso que tiene una amplitud y duración predeterminadas. Para optimizar la eficacia de la transfección, los parámetros de duración de impulso, voltaje, capacitancia, intensidad de campo, número, tipo de onda pueden variar y compararse las eficacias de transfección. Los impulsos eléctricos son campos eléctricos impulsados aplicados mediante electroporación. El impulso puede ser unipolar, bipolar, exponencial o en forma de onda cuadrada. Los voltajes varían de aproximadamente 0 a 1000 voltios; las duraciones del impulso varían de 5 microsegundos a 5 milisegundos; el número de impulsos varía desde un impulso sencillo a 30.000 impulsos y la frecuencia de impulso en las series varía de 0,5 Hz a 1000 Hz. Los intervalos útiles para la intensidad de campo se encuentran en el intervalo de desde aproximadamente 25 V/cm a aproximadamente 800 V/cm. Los impulsos eléctricos contemplados para su uso en la realización práctica de la presente invención incluyen aquellos impulsos de voltaje y duración suficientes para producir la electroporación. Véase Hofmann, G. A. Cells in electric fields. In E. Neumann, A. E. Sowers, & C. A. Jordan (Eds.), Electroporation and electrofusion in cell biology (pp. 389-407). Plenum Publishing Corporation (1989).

G. Componentes del kit

En otra realización adicional, la presente invención proporciona un kit farmacéutico para la administración fácil de un régimen inmunogénico, profiláctico o terapéutico para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades o afecciones indicadas anteriormente para las que se desea una respuesta inmunitaria contra un antígeno seleccionado. Este kit se diseña para su uso en un procedimiento para inducir un alto nivel de respuesta inmunitaria específica de antígeno en un mamífero o sujeto vertebrado. El kit contiene al menos una composición inmunogénica que comprende un plásmido de ADN que comprende tres unidades transcripcionales que codifican un conjunto de antígenos o péptidos seleccionados. En el kit pueden proporcionarse dosificaciones preenvasadas múltiples de las composiciones

inmunogénicas para administraciones múltiples.

5 Cuando las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente comprenden un plásmido de ADN que no sólo expresa una citocina u otro adyuvante, tal como IL-12, el kit también contiene opcionalmente una composición o dosificaciones preenvasadas múltiples de citocina/adyuvante distinta de la composición citocina/adyuvante para administraciones múltiples. Estas composiciones de citocina son generalmente composiciones de ácido nucleico que comprenden una secuencia de ADN que codifica la citocina seleccionada bajo el control de secuencias reguladoras que dirigen la expresión de las mismas en una célula de mamífero o de vertebrado. Otros adyuvantes pueden proporcionarse opcionalmente en un vial preenvasado bien como una solución, un líquido, o un sólido.

10 El kit también contiene instrucciones para usar las composiciones inmunogénicas en un procedimiento de sensibilización/refuerzo. Los kits también pueden incluir instrucciones para realizar determinados ensayos, diversos transportadores, excipientes, diluyentes, adyuvantes y similares anteriormente descritos, así como aparatos para la administración de las composiciones, tales como jeringas, dispositivos pulverizadores, etc. Otros componentes pueden incluir guantes desechables, instrucciones de descontaminación, barras o envases aplicadores, entre otras composiciones.

15 Para que esta invención se entienda mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Los ejemplos son con fines ilustrativos únicamente y no deben considerarse como limitantes del ámbito de la invención. Todos los documentos, publicaciones y patentes citadas en los siguientes ejemplos se incorporan por referencia en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplo 1. Selección y modificación de genes del VIH.

20 Un experto en la materia apreciaría que la información de secuencias de cualquier virus y bacteria se encuentra disponible en la técnica. Más particularmente, la información de secuencias puede usarse para clonar genes para su uso en la expresión de polipéptidos en plásmidos de la invención. La información sobre muchas secuencias del VIH y otros patógenos se encuentra disponible de la base de datos de secuencias del VIH en Los Alamos National Laboratory y en el National Center for Biotechnology Information en the United States National Library of Medicine, (8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894).

25 En una realización de la invención, se seleccionaron los siguientes genes del VIH para inclusión en un solo plásmido de ADN ejemplar que expresaba la mayor parte del genoma del VIH: el gen gag del aislado HXB2 y el gen pol del aislado HXB2. La secuencia completa de HXB2 se indica en la base de datos por ordenador del GenBank con el número de entrada K03455. Los genes nef, tat y vif derivaron del aislado NL4-3. La secuencia completa de NL4-3 se indica en la base de datos por ordenador del GenBank con el número de entrada M19921. El gen de envuelta del VIH derivó de un aislado primario 6101 obtenido a través del Dr. David Montefiore. La secuencia completa de la envuelta del VIH se indica en la base de datos por ordenador del GenBank con el número de entrada AY612855 y bankit625244.

30 Para permitir la inclusión de la mayor parte del genoma del VIH en un solo plásmido de expresión, se prepararon fusiones de genes usando genes gag-pol de longitud completa y genes nef-tat-vif de longitud casi completa. Además, se eliminó el sitio de escisión de proteasa entre los genes gag y pol. Todos los genes del VIH usados en las realizaciones de la presente invención se optimizaron con ARN (secuencia modificada) para la expresión de la proteína a alto nivel. Véanse las Patentes de Estados Unidos Nos 5.965.726; 5.972.596; 6.174.666; 6.291.664; y 6.414.132.

35 Como alternativa, los genes del VIH pueden optimizarse de acuerdo con los procedimientos proporcionados en la Solicitud de Estados Unidos Nº 60/576.819 presentada el 4 de junio del 2004. De acuerdo con este procedimiento, la expresión de los genes se potencia sustituyendo determinados codones de tipo silvestre con codones "sustitutos". La secuencia potenciada del polinucleótido se determina seleccionando codones sustitutos adecuados. Los codones sustitutos se seleccionan para modificar el contenido de A y T (o de A y U en el caso de ARN) del gen de origen natural (de tipo silvestre). Los codones sustitutos son aquellos que codifican los aminoácidos alanina, arginina, ácido glutámico, glicina, isoleucina, leucina, prolina, serina, treonina y valina. Por lo tanto, la secuencia de ácido nucleico modificada tiene codones sustitutos para cada uno de estos aminoácidos a lo largo de la secuencia. Para los 11 aminoácidos restantes, no se realizan modificaciones, por lo que los codones correspondientes de origen natural se dejan en su sitio.

40 Se emplearon técnicas convencionales para modificar los genes del VIH anteriores para mejorar su seguridad y para optimizar su expresión. Véase Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY. (1989). Por ejemplo, para potenciar la seguridad (es decir por inactivación de enzimas virales) y maximizar la amplitud de los genes del VIH incluidos en un vector posterior, se usaron las siguientes modificaciones genéticas:

55 1) Se crearon poliproteínas de fusión gag-pol del VIH-1 en una sola fase de lectura abierta eliminando el terminador gag y el iniciador pol de los genes respectivos y para eliminar la formación de dos proteínas individuales se introdujeron mutaciones en la región de desplazamiento de fase de tipo silvestre. En este

ejemplo de una construcción de fusión, la secuencia TTTTTT (SEC ID N°: 2) “deslizable” de desplazamiento de fase en gagpol de tipo silvestre se cambió por cTTCtG (SEC ID N°: 3). Para una información sobre la construcción de un gen de fusión gag-pol, véase Megede, J. Z. y col. *J. Virology* 77: 6197-6207 (2003), cuya descripción se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. La proteína de fusión gag-pol de tipo silvestre contiene un polipéptido de fase de lectura abierta de 56 aminoácidos sin función, que separa los genes gag y pol. Para minimizar el tamaño global de la presente construcción, la poliproteína gag, que tiene los cuatro restos finales de (Lys-Gly-Arg-Pro) (SEC ID N°: 4), se modificó a fin de continuar con una región intergénica de diez aminoácidos reducida (Asp-Arg-Gln-Gly-Thr-Val-Ser-Phe-Asn-Phe) (SEC ID N°: 5). Los cuatro primeros restos de la poliproteína pol conservan (Pro-Gln-Ile-Thr) (SEC ID N°: 6). Para facilitar la expresión dentro del plásmido de tres unidades transcripcionales no se realizaron desviaciones de la regiones codificantes de tipo silvestre de los genes gag y pol.

2) Toda la actividad proteolítica de la proteasa del VIH-1 se inactivó delecionando los nucleótidos que codificaban tres aminoácidos de sitio activo (Asp-Thr-Gly de 25-27). Véase Loeb y col. *Nature*, 340: 397 (1989); Wu y col. *J Virol*, 70: 3378 (1996).

3) La transcriptasa inversa (TI) se inactivó delecionando nucleótidos que codificaban los cuatro aminoácidos siguientes: Tyr 183, Met 184, Asp 185, Asp 186. Véase Larder y col., *Nature*, 327: 716-717 (1987); Larder y col. *PNAS*, 86: 4803-4807 (1989).

4) La actividad de la ARNsa se anuló delecionando los nucleótidos que codificaban un solo aminoácido: glu 478. Véase Davies y col., *Science*, 252: 88-95 (1991); Schatz y col. 1989, *FEBS lett.* 257: 311-314 (1989).

5) La función integrasa se anuló delecionando los nucleótidos que codificaban los tres siguientes aminoácidos: Asp 626, Asp 678 y Glu 714. Véase Wiskerchen y col. *J. Virol*, 69: 376-386 (1995); Leavitt y col. *J. Biol. Chem.*, 268: 2113-2119 (1993).

6) Se creó una sola fase de lectura abierta para los genes nef, tat y vif del VIH-1 fusionando en fase las siguientes regiones codificantes (los restos aminoácidos 4-206 de nef; los restos aminoácidos 2-80 de tat; los restos aminoácidos 2-192 de vif) que codifican una sola poliproteína. Esta poliproteína se denominó nef-tat-vif o ntv.

7) Como una precaución de seguridad las proteínas nef y tat se inactivaron eliminando la señal de miristilación (restos 1-3, MGG) de nef y por deleción de dos cisteínas (C30 y C34) de tat

Ejemplo 2. Construcción de plásmidos de una, dos y tres unidades transcripcionales.

Los plásmidos analizados en estos ejemplos se exponen en las Tablas 1 y 2.

Se construyó un casete de expresión de tres unidades transcripcionales usando una diversidad de componentes en un plásmido de ADN bicatenario circular. Véase la Figura 1. El primer componente era una primera unidad transcripcional para expresar los polipéptidos en células eucariotas, compuesta por el promotor del citomegalovirus de simio (CMVS), un sitio de clonación y una señal poliA de la hormona del crecimiento bovina (HCB). El segundo componente era una segunda unidad transcripcional para expresar polipéptidos en células eucariotas, que consistía en el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMVH), un sitio de clonación y la señal de poliadenilación (poliA) del SV40. Separando la primera y segunda unidad transcripcional se encontraba la región espaciadora 1. El tercer componente era una tercera unidad transcripcional para expresar polipéptidos en células eucariotas y estaba compuesto por el promotor Lap1 del virus del herpes simple, el donante/aceptor de corte y empalme del SV40, un sitio de clonación, y una señal poliA de la beta-globina de conejo. Véase Goins W. F. y col., *J. Virology* 68: 2239-2252 (1994); Soares, K. J. y col, *Virology* 70: 5384-5394; Goins W. F. y col., *J. Virology* 73: 519-532 (1999). Separando la segunda y tercera unidad transcripcional se encontraba la región espaciadora 2. Con la región espaciadora también se incluyó un gen quimérico bacteriano de resistencia a kanamicina (km^r), adenilil 4'-nucleotidil transferasa de tipo 1a. Véase Shaw KJ, y col., *Microbiol. Reviews* 57: 138-163 (1993) y Sadale, Y, y col., *J. Bacteriol.* 141: 1178-1182 (1980). Este gen se ha ideado para conferir resistencia a un número limitado de aminoglucósidos permitiendo a la vez la selección de las bacterias que contienen el plásmido. Separando la tercera y primera unidad transcripcional se encontraba la región espaciadora 3. La región espaciadora 3 incluía un origen de replicación bacteriano pUC que era necesario para la propagación del plásmido en las bacterias.

Ejemplo 3. Plásmido con tres unidades transcripcionales que contiene seis genes del VIH

Como una demostración del uso de los vectores de ADN plasmídicos con tres unidades transcripcionales, se creó un vector plasmídico capaz de coexpresar tres fases de lectura abierta eucariotas. El vector de ADN plasmídico de tres unidades transcripcionales se creó insertando los siguientes genes seleccionados que codificaban los antígenos del VIH-1 en el casete de expresión de tres unidades transcripcionales descrito en el Ejemplo 2. Todas las técnicas de clonación se realizaron siguiendo procedimientos convencionales (Sambrook y col. 1989).

En primer lugar, se insertó un gen de fusión gag-pol del VIH-1 en el sitio de clonación Pmel-XhoI entre los sitios poliA del CMVS y HCB de la primera unidad transcripcional. El gen gag derivó del aislado HXB2 y, de manera similar, el

gen pol también derivó del aislado HXB2. La secuencia completa de HXB2 se indica en la base de datos informática del GenBank con el número de entrada K03455. Un experto en la materia comprendería que podrían insertarse otros genes gag y pol del VIH de otros clados u otros genes virales o bacterianos de una manera similar. La información de secuencia del VIH y otros patógenos se encuentra disponible en la base de datos de secuencias del VIH en Los Alamos National Laboratory y en el National Center for Biotechnology Information en the United States National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894.

Después, se insertó un gen de envuelta de longitud completa (gp160) derivado de un aislado primario (6101) del VIH-1 en el sitio de clonación Mlul entre los sitios poli-A del CMVH y SV40 de la segunda unidad transcripcional eucariota. La secuencia de envuelta 6101 puede obtenerse en la base de datos informática del GenBank con los números de entrada AY612855 y bankit625244.

Finalmente, se insertó una construcción génica que codificaba una proteína de fusión nef-tat-vif (NTV) del VIH, que incluía los restos 4-206 de nef fusionados a los restos 2-80 de tat y fusionados a los restos 2-192 de vif en el sitio de clonación KpnI-EcoRV entre el promotor Lap1 del VHS y la señal poli A de la betaglobina de conejo. Los genes nef, tat y vif derivaron del aislado NL4-3 del VIH-1. La secuencia completa de NL4-3 del VIH-1 se indica en la base de datos informática del GenBank con el número de entrada M19921.

Por lo tanto, como se ha construido, en la primera unidad transcripcional, la fase de lectura abierta gag-pol se colocó bajo el control del promotor del CMVS y los sitios poli A de la HCB; la fase de lectura abierta de la envoltura se colocó bajo el control del promotor del CMVH y las señales poli-A del SV40 en la segunda unidad transcripcional eucariota y la fase de lectura abierta de la fusión nef-tat-vif se colocó bajo el control del intrón Lap1 del VHS/SV40 y las señales poli-A de la beta-globina de conejo en la tercera unidad transcripcional eucariota.

Ejemplo 4. Expresión de genes del VIH de plásmidos con una, dos, tres unidades transcripcionales.

Materiales y procedimientos: células y transfección

El plásmido que expresaba seis genes del VIH, descrito en el Ejemplo 3, se evaluó *in vitro* para determinar la capacidad de expresar las proteínas codificadas. Las células usadas en todos los estudios de expresión *in vitro* fueron células 293 y células RD que se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). El procedimiento para expresar las proteínas del VIH en estas células fue el siguiente: se sembraron en placa células 24 horas antes de la transfección a una densidad de 2×10^5 células por pocillo de 35 mm de diámetro y se transfectaron con ADN plasmídico purificado. Para la transfección se mezclaron 2 μ g de plásmido con reactivo de transfección Fugene (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) y se estratificaron sobre las células en un volumen total de 100 μ l. A continuación, las células se incubaron con 2 ml de medio DMEM (BRL) con FBS al 10% durante 48 horas. Finalmente, se recogieron los lisados celulares para análisis posterior.

Detección de proteínas expresadas

La detección específica de proteínas del VIH se consiguió usando un ensayo de transferencia de western. Por ejemplo, para cada una de las proteínas gag, pol, de envuelta y vif se realizó un ensayo de transferencia de western separando la mezcla de proteínas usando electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. A continuación, las proteínas separadas se transfirieron después sobre membranas PVDF (Invitrogen, Carlsbad, CA). Como patrones de tamaño y controles positivos se usaron marcadores de peso molecular previamente teñidos y las proteínas p24 (gag), p66 (pol), gp160 (env) y vif recombinantes del VIH-1, (Invitrogen) respectivamente. La detección de la expresión de gag, pol, env y vif se consiguió por inmunotinción. Las membranas PVDF que tenían las proteínas unidas y separadas se incubaron con anticuerpos específicos para las proteínas respectivas. Se usaron anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (Invitrogen) y usando el kit de detección cromogénico (Invitrogen) se realizó la detección del color.

Expresiones de genes del VIH de plásmidos con una, dos y tres unidades transcripcionales.

Se evaluó la expresión de genes del VIH a partir del plásmido con tres unidades transcripcionales y se comparó la expresión de los mismos genes procedentes de cada uno de los plásmidos con una unidad transcripcional y dos unidades transcripcionales. El plásmido con una unidad transcripcional tenía una sola unidad transcripcional eucariota que contenía, como elementos reguladores de la expresión, un promotor del CMVH y una señal poli-A de la HCB. Los plásmidos con una sola unidad transcripcional se enumeraron desde 101 hasta 105, y 100 y 111 como se muestra en la Tabla 1. Por ejemplo, el plásmido 101 contenía el gen env del VIH como la fase de lectura abierta en la única unidad transcripcional. De manera similar, el plásmido 102 contenía el gen gag del VIH como la fase de lectura abierta en la única unidad transcripcional. Además, el plásmido 103 contenía el gen pol del VIH como la fase de lectura abierta en la única unidad transcripcional y el plásmido 104 contenía la fusión de los genes nef-tat-vif (ntv) del VIH como la fase de lectura abierta en la única unidad transcripcional. El plásmido 101 también contenía la fusión de los genes nef-tat-vif (ntv) del VIH como la fase de lectura abierta en la única unidad transcripcional, excepto que esta se dirigía por el promotor Lap1 en lugar del promotor del CMVH como en el plásmido 104. Finalmente, el plásmido 110 contenía la fusión de los genes gag-pol-nef-tat-vif del VIH como la fase de lectura abierta en la única unidad transcripcional y el plásmido 111 contenía en la fusión de los genes gag-pol del VIH como la fase de lectura abierta en la única unidad transcripcional.

Los plásmidos con dos unidades transcripcionales tenían dos unidades transcripcionales eucariotas completas. Los plásmidos con dos unidades transcripcionales se enumeraron desde 201 a 204 y 212 como se muestra en la Tabla 1. Los elementos reguladores de la expresión para los plásmidos con dos unidades transcripcionales comprendían un promotor del CMVH acoplado con una poli-A del SV40 en la primera unidad transcripcional y un promotor del CMVS acoplado con una señal poli-A de la HCB en la segunda unidad transcripcional. En esta realización, el plásmido 201 contenía el gen pol del VIH en la primera unidad transcripcional y el gen gag del VIH en la segunda unidad transcripcional. El plásmido 202 contenía el gen de fusión de los genes nef-tat-vif del VIH en la primera unidad transcripcional y el gen env del VIH en la segunda unidad transcripcional. El plásmido 203 contenía un gen de fusión de los genes gag-pol-nef-tat-vif del VIH en la primera unidad transcripcional y el gen env del VIH en la segunda unidad transcripcional. El plásmido 204 contenía el gen de fusión de los genes gag-pol del VIH en la primera unidad transcripcional y el gen env del VIH en la segunda unidad transcripcional.

En algunas realizaciones se proporciona un adyuvante teniendo que expresarse a partir de un plásmido. En tales casos, el plásmido debe contener el número apropiado de unidades transcripcionales. Con objeto de claridad, y para diferenciar plásmidos antigénicos, se usará la terminología primaria, secundaria y terciaria para referirse a plásmidos adyuvantes que tienen una, dos o tres unidades transcripcionales. Por ejemplo, IL-12 es un adyuvante que está constituido por dos polipéptidos. Un plásmido apropiado es el plásmido 212, que contiene la subunidad p35 de la IL-12 expresada bajo el control del promotor temprano inmediato del CMVH y la señal de poliadenilación del SV40 en la unidad transcripcional primaria, y la subunidad p40 de la IL-12 se expresa bajo el control del promotor del CMV simio (CMVS) y la señal de poliadenilación de la HCB en la unidad transcripcional secundaria.

Los plásmidos con tres unidades transcripcionales tenían tres unidades transcripcionales eucariotas completas y se enumeraron 301, 302 y 303. Véase la Tabla 2. La diferencia entre los tres plásmidos estaba en el número de fases de lectura abierta del VIH que se insertaron. Los elementos reguladores de la expresión para los plásmidos de tres unidades transcripcionales comprendían un promotor del CMVS acoplado con una señal poli-A de la HCB en la primera unidad transcripcional, un promotor del CMVH acoplado con una señal poli-A del SV40 en la segunda unidad transcripcional y un promotor Lap1 del VHS acoplado con una señal poli-A de la beta-globina de conejo en la tercera unidad transcripcional. Como se muestra en la Tabla 2, el plásmido número 301 es un plásmido con tres unidades transcripcionales, pero sólo con una unidad transcripcional que tiene una fase de lectura abierta insertada. Específicamente, el plásmido 301 contiene la fase de lectura abierta del gen de fusión gag-pol en la primera unidad transcripcional. El plásmido 302 es el plásmido con tres unidades transcripcionales que tiene dos unidades transcripcionales con fases de lectura abierta insertadas, la gag-pol en la primera unidad transcripcional y una fase de lectura abierta de la fusión nef-tat-vif del VIH en la tercera unidad transcripcional (no se insertaron genes en la segunda unidad transcripcional). Finalmente, el plásmido número 303 es el plásmido con tres unidades transcripcionales que tiene las tres unidades transcripcionales con fases de lectura abierta insertadas, la fase de lectura abierta de fusión del gen gag-pol en la primera unidad transcripcional, la fase de lectura abierta del gen env en la segunda unidad transcripcional y la fase de lectura abierta del gen de fusión nef-tat-vif en la tercera unidad transcripcional.

Tabla 1. Plásmidos con una y dos unidades transcripcionales*

Plásmido Nº	Construcción de VIH	Tipo
001	Control vector vacío	Control/Sin UT
101	CMVH-env-HCB poliA	Una
102	CMVH-gag- HCB poliA	Una
103	CMVH-pol- HCB poliA	Una
104	CMVH-ntv- HCB poliA	Una
105	Lap1- ntv-poliA de la beta-globina de Conejo	Una
110	CMVH-gag-pol-ntv- HCB poliA	Una /fusión
111	CMVH-gag-pol- HCB poliA	Una /fusión
201	CMVH-pol-SV40 poliA, CMVS-gag- HCB poliA	Dos

(continuación)

Plásmido Nº	Construcción de VIH	Tipo
202	CMVH -ntv-SV40 poliA, CMVS-env- HCB poliA	Dos
203	CMVH-gag-pol-ntv-SV40 poliA, CMVS-env- HCB poliA	Dos
204	CMVH-gag-pol-SV40 poliA, CMVS-env- HCB poliA	Dos
212	**CMVH-m/L-12p35-SV40poliA, CMVS-mIL-12 p40-HCBH poliA	Adyuvante

*Se usan las siguientes abreviaturas: CMVS: promotor del citomegalovirus simio, CMVH: promotor del citomegalovirus humano, VHSlap1: promotor 1 asociado a latencia del virus del herpes simple, gag-pol: fusión gag-pol del VIH, ntv: fusión de nef-tat-vif del VIH, env: envuelta del VIH, mIL-12: interleucina-12 murina.

Tabla 2. Plásmidos con tres unidades transcripcionales*

Plásmido Nº	Construcción de VIH	Nº de FLA
301	CMVS-gag-pol-HCB poliA, CMVH-[ninguna], Lap1-[ninguna]	una
302	CMVS-gag-pol-HCB poliA, CMVH-[ninguna], Lap1:ntv-poliA beta-globina de conejo	dos
303	CMVS-gag-pol-HCB poliA, CMVH-env-SV40 poliA, Lap1:ntv-poliA beta-globina de conejo	tres

* Se usaron las siguientes abreviaturas: CMVS: promotor del citomegalovirus simio, CMVH: promotor del citomegalovirus humano, SVHlap1: promotor 1 asociado a latencia del virus del herpes simple, gag-pol: fusión gag-pol del VIH, ntv: fusión de nef-tat-vif del VIH, env: envuelta del VIH, CMVH-[ninguna]-Lap1[ninguna] indica que las unidades transcripcionales no contienen una fase de lectura abierta (véase el plásmido 301): **IL-12 puede ser tanto murina como de macaco rhesus o de ser humano

5 Como se ha descrito anteriormente, se construyeron plásmidos múltiples con una y dos unidades transcripcionales para usar en la comparación con la expresión de los plásmidos con tres unidades transcripcionales. Véanse las Tablas 1 y 2. Los modelos de expresión de estas construcciones que contenían gag, pol, env, nef-tat-vif, gag-pol y gag-pol-nef-tat-vif se evaluaron transfecando transitoriamente células 293 y/o RD con los plásmidos de una, dos y tres unidades transcripcionales y analizando los lisados celulares por trasferencias de Western usando anticuerpos apropiados.

10 Se realizó la expresión *in vitro* de gag en los lisados celulares de diversas construcciones y los resultados se detectaron usando trasferencias de Western. Véase la Figura 2 y la Tabla 1. Las proteínas gag y pol se detectaron con suero policlonal humano y monoclonal anti gag de ratón respectivamente. Los marcadores de peso molecular y p24 del VIH se incluyeron como patrones en los dos primeros carriles. El plásmido 102 con una sola unidad transcripcional, que expresaba gag, se procesó en el primer carril de muestra. Los plásmidos que tenían dos unidades transcripcionales y dos unidades transcripcionales con una fase de lectura abierta insertada eran los plásmidos 201, 203 y 204 produciendo todas cantidades significativas de gag o de poliproteínas que contenían gag tales como gag-pol-nef-tat-vif, o gag-pol. En las construcciones de fusión gag-pol, las secuencias de desplazamiento de fase entre gag y pol se mutaron para permitir la expresión de gag y de pol desde la misma fase de lectura abierta.

15 Los plásmidos 201, 203 y 204 con dos unidades transcripcionales produjeron menos gag que el plásmido 102 con una sola unidad transcripcional. Los plásmidos con dos o tres unidades transcripcionales, que codificaban las fusiones de gag-pol, expresaron cantidades equivalentes de poliproteína gag-pol que migraron con un tamaño esperado de -180 kd. La expresión de gag del plásmido 203 que codifica una poliproteína grande gag-pol-ntv también se detectó en los lisados celulares de células transfecadas y la proteína migró a un tamaño esperado de -220 kd. Sin embargo, la expresión de esta fusión grande (plásmido 203), fue menor que la de los plásmidos 302 y 303 que codifican gag-pol. El plásmido 303 con tres unidades transcripcionales también produjo cantidades significativas de gag en forma de poliproteína gag-pol pero menos gag que el unitario y aproximadamente

equivalente al nivel producido a partir de plásmidos con dos unidades transcripcionales. El plásmido 302 con tres unidades transcripcionales, que tenía dos fases de lectura abierta insertadas y una unidad transcripcional sin una fase de lectura abierta produjo gag aproximadamente al mismo nivel que el de los plásmidos con dos unidades transcripcionales. Véase la Figura 2.

5 Se realizó el perfil de expresión *in vitro* de pol en los lisados celulares de diversas construcciones y los resultados se detectaron usando transferencias de Western seguido de un modelo similar al observado en el caso de gag. Véase la Figura 3 y la Tabla 1. En este caso, las proteínas pol se detectaron con suero policlonal humano. Los marcadores de peso molecular y la transcriptasa inversa del VIH se incluyeron como patrones en los dos primeros carriles. El plásmido 103, con una unidad transcripcional, que expresaba pol, se procesó en el primer carril de muestra. Después, los plásmidos 201, 203 y 204 que tenían dos unidades transcripcionales y dos unidades transcripcionales con una fase de lectura abierta insertada produjeron cantidades significativas de pol, o de poliproteína que contenía pol tal como gag-pol-nef-tat-vif, o gag-pol. A diferencia de la situación con gag, los plásmidos con dos unidades transcripcionales, 201, 203 y 204, produjeron aproximadamente el mismo nivel de pol que el plásmido 103 con una sola unidad transcripcional. La poliproteína pol expresó pol y las fusiones gag-pol, que migraron con tamaños esperados de aproximadamente 110 kD para pol, aproximadamente 180 kD para gag-pol y aproximadamente 250 kD para gag-pol-nef-tat-vif. El plásmido 303 con tres unidades transcripcionales también produjo pol en forma de poliproteína gag-pol pero menos pol que los plásmidos con una y dos unidades transcripcionales. De nuevo, el plásmido 302, con tres unidades transcripcionales, que tenía dos fases de lectura abierta insertadas y una unidad transcripcional sin una fase de lectura abierta expresó pol en forma de una poliproteína gag-pol aproximadamente al mismo nivel que los plásmidos 201 y 202 con dos unidades transcripcionales. Véase la Figura 3. En este ejemplo, el plásmido 204 expresó mayores niveles de pol que los otros plásmidos 201 y 202 con dos unidades transcripcionales. Véase la Figura 3.

Se realizó un análisis similar para la expresión *in vitro* en los lisados celulares de la fusión de proteínas reguladoras del VIH conocidas como nef-tat-vif o NTV. Véase la Figura 4 y la Tabla 1. La proteína NTV se detectó con anticuerpo monoclonal anti-vif de ratón. Los marcadores de peso molecular y p23 vif del VIH recombinante se incluyeron, como patrones, en los dos primeros carriles, respectivamente. Se procesaron dos plásmidos con una sola unidad transcripcional, 104 y 105, que expresaban NTV de cada uno de los promotores del CMVH o Lap 1 respectivamente, en los dos primeros carriles de muestra. Véase la Figura 4. El nivel de expresión de nef-tat-vif fue aproximadamente el mismo para ambos plásmidos. Después, los dos plásmidos que tenían dos unidades transcripcionales completas con una fase de lectura abierta insertada (plásmidos 202 y 203) produjeron cantidades significativas de poliproteína nef-tat-vif. El nivel de expresión de proteína nef-tat-vif pareció menor para el plásmido 203, pero esto se esperaba porque la proteína que se expresaba era demasiado grande (gag-pol-nef-tat-vif ~220 kD). El plásmido 302, con tres unidades transcripcionales, que tenía dos fases de lectura abierta insertadas y una unidad transcripcional sin una fase de lectura abierta, produjo nef-tat-vif aproximadamente al mismo nivel que el plásmido con una sola unidad transcripcional. Véase la Figura 4. El plásmido 303 con tres unidades transcripcionales, que tenían tres fases de lectura abierta insertadas, también produjo cantidades significativas de poliproteína nef-tat-vif. Específicamente, el plásmido 303 con tres unidades transcripcionales produjo menos nef-tat-vif que los plásmidos con una sola unidad transcripcional (104 y 105) y aproximadamente equivalente a o mejor que el nivel de poliproteína nef-tat-vif producida a partir de los plásmidos con dos unidades transcripcionales (202 y 203). Véase la Figura 4.

Se evaluó la capacidad de los diversos plásmidos con una, dos y tres unidades transcripcionales para expresar el gen de envuelta del VIH en lisados celulares. Véase la Figura 5 y la Tabla 1. La proteína de envuelta se detectó con anticuerpo monoclonal anti-env de ratón. Los marcadores de peso molecular y gp 120 del VIH recombinante se incluyeron, como patrones, en los dos primeros canales, respectivamente. El primer carril de muestra contenía la proteína expresada a partir del plásmido 101 de una sola unidad transcripcional, que expresó env a partir del promotor del CMVH. Véase la Figura 5. Se expresaron cantidades significativas de glucoproteína de envuelta. A continuación, tres plásmidos que tenían dos unidades transcripcionales completas con dos fases de lectura abierta insertadas (plásmidos 202, 203 y 204) produjeron cantidades significativas de glucoproteína de envuelta. En cada caso, el promotor del CMVH controló el gen de envuelta. El plásmido 303 con tres unidades transcripcionales también produjo cantidades significativas de glucoproteína env, pero el nivel de expresión se redujo 2-3 veces, cuando se comparó con los plásmidos de una y dos unidades transcripcionales (101, 202, 203 y 204). Véase la Figura 5.

Conclusión

Basándose en análisis de expresión *in vitro* semicuantitativo, los datos indican que todos los genes del VIH insertados, incluyendo *gag-pol*, *env* y *ntv*, se expresaron a niveles significativos a partir del plásmido con tres promotores que llevaba tres unidades transcripcionales independientes.

55 Ejemplo 5: Expresión de Genes Múltiples mediante Plásmidos Múltiples o mediante un solo plásmido a una concentración de ADN constante por Plásmido.

A continuación, se comparó la expresión de un solo plásmido con tres unidades transcripcionales que codificaba genes múltiples con plásmidos múltiples, expresando cada uno un solo gen de la misma serie de genes, en el que el ADN por plásmido se mantuvo constante a 1 µg. En cada caso, la cantidad total de ADN también se mantuvo constante a 4 µg complementando con ADN plasmídico sin inserto de fase de lectura abierta. La expresión de gag del VIH se evaluó

usando células cultivadas que se transfectaron transitoriamente con 1 µg de cada plásmido y los lisados celulares se analizaron por transferencia de Western. Como se muestra en la Figura 6, la expresión de gag del VIH se detectó fácilmente en el carril 2 (dos plásmidos), carril 3 (un plásmido), carril 4 (un plásmido), y carril 5 (4 plásmidos). La expresión de gag del VIH fue baja en el carril 1 (tres plásmidos). El plásmido 303 con tres unidades transcripcionales de nuevo produjo cantidades significativas de proteína gag, aunque menos que las combinaciones que contenían más plásmidos.

Se evaluó la expresión de env del VIH de plásmidos sencillos o múltiples y los resultados se muestran en la Figura 7. De nuevo, se transfectó transitoriamente 1 µg de cada plásmido en células cultivadas y los lisados celulares se analizaron por transferencia de Western. Los resultados demuestran que la expresión de env del VIH se detectó fácilmente en el carril 1 (3 plásmidos), carril 2 (dos plásmidos), carril 3 (un plásmido), carril 4 (un plásmido), y carril 5 (4 plásmidos). En cada caso la cantidad total de ADN se mantuvo constante a 4 µg complementando con ADN plasmídico sin inserto de fase de lectura abierta para constituir la cantidad total de ADN igual a 4 µg. El plásmido 303 con tres unidades transcripcionales de nuevo produjo cantidades significativas de glucoproteína env. Véase la Figura 7. En este caso, solo el plásmido 303 con tres unidades transcripcionales produjo cantidades comparables de glucoproteína env a las producidas en el carril 5 en la que se usaron 4 plásmidos.

Como se muestra en la Figura 8, se evaluó la expresión de nef-tat-vif del VIH de plásmidos sencillos o múltiples usando 1 µg de cada plásmido transfectado transitoriamente en células cultivadas y los lisados celulares se analizaron por transferencia de Western. Véase la Figura 8. Los resultados demuestran que la expresión de nef-tat-vif del VIH se detectó en el carril 1 (3 plásmidos), carril 2 (2 plásmidos), carril 3 (un plásmido), carril 4 (un plásmido con tres unidades transcripcionales), y carril 5 (4 plásmidos). Véase la Figura 8. La cantidad total de ADN se mantuvo constante a 4 µg. El plásmido 303 con tres unidades transcripcionales produjo cantidades significativas de proteína nef-tat-vif aunque, menos que la combinación que contenía dos plásmidos.

Conclusión

Como se muestra en las Figuras 6, 7 y 8, usando el plásmido con tres unidades transcripcionales (303), las tres fases de lectura abierta que codifican las proteínas gag-pol, env y ntv se expresaron simultáneamente a niveles similares, confirmando por tanto la funcionalidad de este plásmido.

Ejemplo 6: Expresión de Genes Múltiples mediante dos Plásmidos o mediante un solo Plásmido a una concentración de ADN total constante.

La expresión de los genes gag, pol, env y nef-tat-vif del VIH se comparó entre el plásmido con tres unidades transcripcionales a una concentración de 2 µg y combinaciones de dos plásmidos cada uno a una concentración de ADN de un 1 µg. La concentración de ADN total se mantuvo constante a 2 µg, como se indica en la Figuras 9, 10, 11 y 12.

La Figura 9 muestra que la expresión de la proteína pol fue similar a la de cualquiera de las dos combinaciones de plásmidos o del plásmido con tres unidades transcripcionales. El carril 2 muestra transferencias de Western de la proteína pol expresada a partir de la combinación de los plásmidos 201 y 202, dos plásmidos con dos unidades transcripcionales construidos para expresar toda la serie de genes gag, pol, nef-tat-vif y env del VIH. A continuación, se evaluó la expresión de la proteína pol procedente de dos combinaciones de un plásmido con dos unidades transcripcionales y un plásmido con una sola unidad transcripcional, que expresaban gag, pol, env y nef-tat-vif en diversas configuraciones, usando transferencias de Western de la proteína pol. Véase la Figura 9, carril 3 (plásmidos 204 y 104) y carril 5 (plásmidos 302 y 101). En cada caso existe expresión de pol detectable. El carril 4 contiene transferencias de Western de la proteína pol expresada a partir del plásmido 203, que es un plásmido con dos unidades transcripcionales que expresa toda la serie de genes, gag-pol-nef-tat-vif y env del VIH. Véase la Figura 9. El carril 6 contiene transferencias de Western de la proteína pol expresada a partir del plásmido 303, que es un ejemplo de un plásmido con tres unidades transcripcionales que expresa toda la serie de genes, gag-pol env y nef-tat-vif del VIH, como se describe en los Ejemplos 2 y 3. Véase la Figura 9.

Las Figuras 10 y 11 comparan la expresión de la proteína gag y de envuelta a partir de las combinaciones de dos plásmidos con expresión de proteína del plásmido de tres unidades transcripcionales. El carril 2 muestra las transferencias de Western de las proteínas gag y env expresadas a partir de la combinación de plásmidos los 201 y 202, que eran plásmidos con dos unidades transcripcionales construidos para expresar toda la serie de genes, gag, pol, nef-tat-vif y env del VIH. A continuación, se evaluó la expresión de las proteínas gag y env a partir de combinaciones de un plásmido con dos unidades transcripcionales y un plásmido con una sola unidad transcripcional usando transferencias de Western. Véanse las Figuras 10 y 11: carril 3 (plásmidos 204 y 104) y carril 5 (plásmidos 302 y 101). El plásmido 302 es un plásmido con tres unidades transcripcionales que funciona como un plásmido con dos unidades transcripcionales porque solo tiene dos fases de lectura abierta insertadas. Véase la Tabla 2. En cada caso hubo expresión detectable de gag y de env. Véase la Figura 10. El carril 4 ilustra transferencias de Western de las proteínas gag y env expresadas a partir de plásmido 203, que era un plásmido con dos unidades transcripcionales que expresaba toda la serie de genes gag-pol-nef-tat-vif y env del VIH. Véase las Figuras 10 y 11. El carril 6 contiene transferencias de Western de las proteínas gag y env expresadas a partir del plásmido 303 de tres unidades transcripcionales, descrito en los Ejemplos 2 y 3. Véanse las Figuras 10 y 11. La expresión de las proteínas gag y env

a partir del plásmido 303 de tres unidades transcripcionales fue comparable a la de las combinaciones de plásmidos.

La Figura 12 compara la expresión de la poliproteína nef-tat-vif de diferentes combinaciones de plásmidos con la expresión de la proteína a partir del plásmido con tres unidades transcripcionales usando detección por transferencia de Western. El carril 2 muestra transferencias de Western de la poliproteína nef-tat-vif expresada a partir de la combinación de plásmidos 201 y 202, dos plásmidos con dos unidades transcripcionales diseñados para expresar los genes gag, pol, nef-tat-vif y env del VIH. Los carriles 3 y 5 muestran expresión, según se detecta usando transferencias de Western, de la poliproteína nef-tat-vif de dos combinaciones diferentes de plásmidos con dos unidades transcripcionales y un plásmido con una sola unidad transcripcional. Véase la Figura 12: carril 3 (plásmidos 204 y 104) y carril 5 (plásmidos 302 y 101). Como se ha indicado anteriormente, el plásmido 302 es un plásmido de tres unidades transcripcionales que funciona como un plásmido de dos unidades transcripcionales porque solo tiene dos fases de lectura abierta insertadas. Véase la Tabla 2. En este caso, la expresión de la proteína nef-tat-vif a partir del plásmido 302, observada en el carril 5, fue de un nivel inferior a la de las combinaciones de los plásmidos 201 y 202 (carril 2) o 204 y 104 (carril 3). Véase la Figura 12. El carril 4 representa la poliproteína nef-tat-vif expresada a partir del plásmido 203, que era un plásmido con dos unidades transcripcionales que expresaba toda la serie de proteínas, gag-pol-nef-tat-vif y env, del VIH. Véase la Figura 12. El carril 6 representa la poliproteína nef-tat-vif expresada a partir del plásmido 303 con tres unidades transcripcionales. Véase la Figura 12. La expresión de 303 de nef-tat-vif fue significativamente superior que la del plásmido 302. Visiblemente, la expresión de un plásmido con dos unidades transcripcionales (203) que expresaba una poliproteína gag-pol-nef-tat-vif grande a partir de un promotor y la proteína env del otro fue sustancialmente menor que la del plásmido 303 que codificaba los mismos genes a partir de tres unidades transcripcionales independientes.

En resumen, usando el plásmido con tres unidades transcripcionales, pueden expresarse tres fases de lectura abierta simultáneamente a niveles aproximadamente equivalentes y los niveles globales eran comparables a las construcciones con promotor sencillo y doble que codifican estos genes. Los datos de expresión de genes *in vitro* sugieren una ausencia de interferencia de promotores significativa cuando se expresan genes múltiples del VIH a partir de un plásmido con tres unidades transcripcionales. Por lo tanto, las unidades transcripcionales individuales se colocan aproximadamente en el vector.

Ejemplo 7: Expresión de Genes Múltiples mediante Plásmidos Múltiples o mediante un solo Plásmido sin mantener constante la concentración de ADN total.

La expresión de un solo plásmido con tres unidades transcripcionales que codifica genes múltiples se comparó con plásmidos múltiples, que expresaban la misma serie de genes, en el que el ADN por plásmido se mantuvo constante a 1 µg. A diferencia del Ejemplo 5, la cantidad total de ADN no se complementó con ADN plasmídico sin un inserto de fase de lectura abierta para constituir la cantidad total de ADN. Los datos no se muestran aunque se resumen más adelante.

En este ejemplo, la expresión de gag, pol, env y ntv del VIH se evaluó usando células 293 cultivadas que se transfectaron transitoriamente con 1 µg de cada plásmido y los lisados celulares se analizaron por transferencia de Western. La expresión de gag del VIH se detectó a partir de transfecciones con combinaciones con tres plásmidos (101, 104, 301), dos plásmidos (201 y 202), un plásmido (203), un plásmido (303), y cuatro plásmidos (101, 102, 103, 104). El plásmido 303 con tres unidades transcripcionales produjo cantidades significativas de proteína gag en comparación con combinaciones que requerían más plásmidos. Específicamente, el plásmido 303 con tres unidades transcripcionales produjo más poliproteína gag que el plásmido 203 con dos unidades transcripcionales que tenía los seis genes del VIH y ligeramente menor que la combinación de los plásmidos 201 y 202 con dos unidades transcripcionales que tenían los seis genes del VIH. La expresión de gag a partir de la combinación de tres plásmidos (101, 104, 301) fue débil cuando gag se expresó como una fusión gag-pol conducida por el promotor del CMVS.

También se evaluó la expresión de env del VIH a partir de plásmidos sencillos o múltiples. Los resultados demuestran que la expresión de env del VIH se detectaba fácilmente a partir de combinaciones con tres plásmidos (301, 101 y 104), dos plásmidos (201 y 202), un plásmido (203), un plásmido (303), y cuatro plásmidos (101, 102, 103 y 104). La cantidad total de ADN dependiente del número de plásmidos a usar, con 1 µg de ADN transfectado por plásmido. En este caso, el plásmido 303 de tres unidades transcripcionales produjo más glucoproteína env que cualquier otro plásmido o combinación plasmídica.

Se evaluó la expresión de nef-tat-vif del VIH a partir de plásmidos sencillos o múltiples usando 1 µg de cada plásmido transfectado transitoriamente en células cultivadas y los lisados celulares se analizaron por transferencia de Western. La expresión de nef-tat-vif del VIH se detectó a partir de combinaciones con tres plásmidos (301, 101 y 104), dos plásmidos (201 y 202), un plásmido (203), un plásmido (303), y cuatro plásmidos (101, 102, 103 y 104). El plásmido 303 de tres unidades transcripcionales produjo cantidades significativas de proteína nef-tat-vif.

Conclusión

Se diseñó y construyó un plásmido con tres unidades transcripcionales que codificaba genes múltiples del VIH que expresaba altos niveles de proteínas específicas de una manera inversa independiente, que confirmó que una sola

construcción plasmídica expresaba independiente y eficazmente tres transcritos. En este ejemplo, la expresión de genes del VIH a partir del plásmido de tres unidades transcripcionales se comparó con la expresión de los mismos genes a partir de construcciones de una o dos unidades transcripcionales. Los datos indican que la expresión de genes a partir de un plásmido con tres unidades transcripcionales triple fue menor cuando se comparó con la de los que expresaban casetes de expresión sencillos o dobles. Sin embargo, en el ejemplo anterior, se observó que la expresión de genes conducida por el promotor del CMVH era mayor que la del promotor del CMVS, seguido de la del promotor 1 asociado a latencia (lap) del virus del herpes simple (VHS). Esta diferencia en cuanto a fuerza de los promotores en la construcción de tres unidades transcripcionales debe tenerse en cuenta en el plásmido cuando se colocan genes para expresar antígenos de mayor a menor inmunogenicidad.

Ejemplo 8. Estudios de inmunización Murina con vectores plasmídicos que contienen una, dos o tres unidades transcripcionales completas.

Se realizaron estudios murinos para establecer y comparar la funcionalidad inmunogénica del vector plasmídico con tres unidades transcripcionales que expresaban proteínas de seis genes del VIH, incluyendo *gag*, *pol*, *env*, *nef*, *tat* y *vif*. Específicamente, en ratones Balb/c se comparó la capacidad relativa de diversas composiciones inmunogénicas, basadas en ADN de plásmidos sencillos, dobles y triples, para suscitar respuestas inmunitarias mediadas por células específicas de antígenos múltiples.

Se inmunizaron ratones Balb/c por vía intramuscular con dosis de ADN de 100 µg total, como se indica en la Tabla 3. En todos los casos, las composiciones inmunogénicas se formularon con bupivacaína al 0,25% y se inyectaron en el cuadriceps en un volumen de 100 µl. Diez días después de la segunda inmunización, los animales se sacrificaron y el suero y los bazos se aislaron para realizar ensayos inmunitarios. Los sueros de los ratones inmunizados se analizaron para determinar las titulaciones de los anticuerpos específicos anti-gag y anti-env. Los bazos se usaron para medir células secretoras de IFN-gamma específicas de antígeno usando ensayos ELISPOT como se describe más adelante.

Animales

Para estos estudios, se usaron ratones Balb/c hembra de 4-6 semanas de vida. Los ratones se mantuvieron de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (National Research Council, National Academic Press, Washington, DC, 1996). Además, los procedimientos para el uso y cuidado de los ratones fueron aprobados por el Wyeth Research's Institutional Animal Care y Use Committee.

Composiciones inmunogénicas e inmunización.

Como composiciones inmunogénicas experimentales se usaron diversos vectores de expresión de ADN plasmídicos que codificaban gp160 env, p55 gag, pol, o una proteína de fusión nef-tat-vif del VIH y la estructura vacía del vector de expresión se usó como un vector de composición inmunogénica de control. Véase la siguiente Tabla 3 para el diseño del estudio. La expresión de genes del VIH por los diversos vectores de expresión se confirmó por transferencia de Western después de transfección transitoria de células de rabdosarcoma (RD) humanas. Véanse los Ejemplos 4-7.

El adyuvante usado para estos estudios también se administró mediante un plásmido de ADN. En este ejemplo, todos animales se co-inyectaron con 25 µg de plásmido nº 212 que expresaba 11-12. Este plásmido adyuvante era un plásmido de expresión de dos unidades transcripcionales (plásmido nº 212 en la Tabla 1) que codificaba los genes p35 y p40 de la IL-12 murina. Véase la Tabla 1. La subunidad p35 de la IL-12 se expresó bajo el control del promotor temprano inmediato del CMVH y la señal de poliadenilación de SV40, mientras que la subunidad p40 de la IL-12 se expresó bajo el control del promotor del CMV simio (CMVS) y la señal de poliadenilación de la HCB. La producción de la IL-12 murina se confirmó después de transfección transitoria de células RD por exploración de sobrenadantes celulares usando un ELISA de captura de p70 anti IL-12 de ratón (Endogen, Woburn, MA) (datos no mostrados).

Tabla 3. Diseño de estudio murino con dos inmunizaciones

Grupo Nº.	Plásmido Nº.	Descripción del plásmido	ADN Total (µg)	Nº de ratón	Pauta de Inmunización (semanal)
1	303	CMVH-env; CMVS-gag/pol; lap-ntv	100	9	0 - 3
1a	203	CMVH- gag/pol; CMVS-env;	100	9	0 - 3

(continuación)

Grupo Nº.	Plásmido Nº.	Descripción del plásmido	ADN Total (µg)	Nº de ratón	Pauta de Inmunización (semanal)
2b	101 +	CMVH-env	50	9	0 - 3
	110	CMVH-gag-pol-ntv	50		
2c	104 +	CMVH-ntv	50	9	0 - 3
	204	CMVH-gag-pol, CMVS-env	50		
2d	111 +	CMVH-gag-pol	50	9	0 - 3
	202	CMVH-ntv, CMVS-env	50		
2e	201 +	CMVH-pol, CMVS-gag	50	9	0 - 3
	202	CMVH-ntv, CMVS-env	50		
3a	111	CMVH-gag/pol	33	9	0 - 3
	101	CMVH-env	33		
	104	CMVH-ntv	33		
3b	101	CMVH-env	33	9	0 - 3
	104	CMVH-ntv	33		
	201	CMVH-pol, CMVS-gag	33		
3c	102	CMVH-gag	33	9	0 - 3
	103	CMVH-pol	33		
	202	CMVH-ntv, CMVS-env	33		
4	001	Control vectorial	100	6	0 - 3

5 Para la inmunización, los plásmidos de expresión se produjeron en Puresyn, Inc. (Malvern, PA). Los plásmidos se propagaron en *E. coli*, aislados de células por lisis alcalina, se purificaron por cromatografía en columna y se formularon individualmente a una concentración de 2,5 mg/ml en tampón citrato isotónico (citrato de sodio 29,3 mM, ácido cítrico 0,67 mM, NaCl 150mM, EDTA 0,34 mM, pH = 6,4 - 6,7) que contenía, como agente facilitador, bupivacaína al 0,25% para permitir la formación de complejos ADN: bupivacaína. Para todos los grupos, como parte de la composición inmunogénica, el plásmido adyuvante se mezcló con los plásmidos que expresaban el antígeno.

10 Se demostró que las preparaciones plasmídicas finales consistían en >90 % de ADN plasmídico súper enrollado y se observó que la endotoxina residual era <30 UE/mg de DNA (datos no mostrados). Inmediatamente antes de la inmunización, las composiciones inmunogénicas se prepararon mezclando las formulaciones apropiadas de los vectores de expresión plasmídicos. Las composiciones inmunogénicas resultantes se administraron por inyección intramuscular en ambos cuadriceps (volumen de inyección total 0,1 cm³, con 0,05 cm³ por sitio) usando una aguja de calibre 18 y una jeringa de 0,3 ml.

15 Ensayo murino ELISPOT de IFN- γ

Originalmente, ELISPOT (o ElisaSpot, abreviatura en inglés de Ensayo Inmunológico de Mancha Ligado a Enzimas) se desarrolló como un procedimiento para detectar linfocitos B secretores de anticuerpos. El procedimiento se había adaptado ahora para determinar reacciones de linfocitos T contra un antígeno específico, normalmente representado como número de células activadas por millón. En el ejemplo de la presente invención, se usó la producción de Interferón gamma (INF-gamma) como una lectura para la activación de células sencillas.

20

En este análisis, el ELISPOT sirvió para determinar la actividad de linfocitos de citotóxicos suscitados por las composiciones inmunogénicas que expresaban antígenos específicos contra el VIH. Para la determinación de

respuestas ELISPOT del INF- γ , se usó un kit ELISPOT para INF- γ de ratón (material numero 551083, BD Biosciences, San Diego CA). Los ensayos ELISPOT se realizaron en placas de microtitulación de noventa y seis pocillos con una membrana en la parte inferior de cada pocillo. Específicamente, las placas ELISPOT de fondo plano de noventa y seis pocillos (ImmunoSpot, Cellular Technology Limited, Clevely Ohio) se revistieron durante una noche con un anticuerpo monoclonal anti γ -interferón de ratón purificado (mIFN- γ) (Material N° 51-2525KC, BD-Biosciences, San Diego CA) a una concentración de 10 mcg/ml, después de lo cual las placas se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato estéril 1 x (1 x PBS) y después se bloqueó durante 2 horas con medio de cultivo completo R10 (RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal (SBF) termoinactivado (TI) al 10 % y L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, sulfato de estreptomina 100 mcg/ml, piruvato sódico 1 mM, HEPES 1 mM, aminoácidos no esenciales 100 mcM). En primer lugar se procesaron bazos de ratón triturando los bazos entre extremos congelados de dos portaobjetos de microscopio estériles. El homogeneizado resultante se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo R05 completo (medio RPMI 1640 complementado con SBF al 5 %, L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 mcg/ml de sulfato de estreptomina, piruvato sódico 1 mM, HEPES 1 mM, aminoácidos no esenciales 100 mcM) y los esplenocitos se aislaron posteriormente por centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque y se resuspendieron en medio de cultivo R10 completo que contenía Con-A 2 mcg/ml (Sigma), grupos de péptidos (15 oligómeros solapando por 11 aminoácidos; concentración final de cada péptido 2,5 mcM) abarcando p55 gag del VIH, gp160 env 61 6101 del VIH-1, pol, nef, tat, vif, o solo medio. La cantidad de células de entrada fue de 4×10^5 esplenocitos por pocillo (4×10^6 esplenocitos/ml) y se sometieron a ensayo en pocillos por duplicado. Los esplenocitos se incubaron durante 22-24 horas a 37 °C y después se retiraron de la placa ELISPOT lavando primero 3 veces con agua desionizada e incubando sobre hielo durante 10-20 minutos. Después las placas se lavaron 6 veces con PBS 1 x que contenía Tween-20 al 0,1 %. Después de esto, las placas se trataron con un anticuerpo de detección biotililado anti-IFN- γ de ratón (5,0 mcg/ml, Material N°. 51-1818KZ, BD- Biosciences, San Diego CA) diluido con R10 y se incubó durante una noche a 4 °C. Después las placas ELISPOT se lavaron 10 veces con PBS 1x que contenía Tween-20 al 0,1 % y se trataron con 100 mcl por pocillo de conjugado de peroxidasa de rábano picante-estreptavidina (Catalogo N°. 51-9000209, BD-Biosciences, San Diego CA) diluido 1:100 con R10 y se incubó 1 hora más a temperatura ambiente. El conjugado de peroxidasa de rábano picante-estreptavidina no unido se eliminó aclarando la placa 6 veces con PBS 1x que contenía Tween-20 al 0,1 % y 3 veces con PBS 1x. Después, el sustrato de peroxidasa se preparó diluyendo 20 mcl/ml de cromógeno AEC en solución de sustrato AEC (N° de catalogo 551951, BD-Biosciences, San Diego CA). El desarrollo del color se inicio añadiendo 100 mcl/pocillo de solución de sustrato durante 3-5 minutos. Finalmente, las placas se aclararon con agua y se secaron al aire. Los resultados se determinaron usando un analizador ELISPOT o un dispositivo de formación de imágenes que toma una imagen de un solo pocillo de la placa ELISPOT y después se realizó el recuento de las manchas.. En este caso, las manchas resultantes se contaron usando un lector Immunospot (CTL Inc., Clevely, OH). Las respuestas ELISPOT del IFN- γ específicas de péptidos se consideraron positivas si la respuesta (fondo menos medio) era ≥ 3 veces por encima de la respuesta media y ≥ 50 de células formadoras de manchas que excretan interferón gamma por 10^6 esplenocitos (número de CFM/ 10^6 esplenocitos).

Como se muestra en la Tabla 4, después de dos inmunizaciones con las composiciones inmunogénicas constituidas con los plásmidos mostrados en la Tabla 3, se midieron las respuestas totales ELISPOT de IFN gamma específicas de VIH-1 y de antígeno VIH individuales en ratones después de inmunizaciones con ADN multiplasmídico.

40 **Tabla 4. Respuestas inmunitarias murinas después de dos inmunizaciones**

Grupo ID	Respuesta específica de gag*	Respuesta específica de pol	Respuesta específica de env	Respuesta específica de ntv#	Respuesta específica de VIH Total
Control	2	0	3	0	5
1a	46	43	238	4	331
2e	29	138	181	12	360
2c	102	118	203	44	467
1	20	39	468	2	529
3b	16	109	404	20	548
2d	188	185	251	8	632
2b	43	65	548	6	662
3a	139	105	802	18	1064
3c	174	378	616	11	1179

*Las respuestas ELISPOT de IFN-gamma específicas de antígeno se indican como Células Formadoras de Manchas (numero de CFM/ 10^6 esplenocitos) que excretan interferón gamma por 10^6 esplenocitos. ntv #, proteína de fusión nef-tat-vif .

En todos los casos, las respuestas específicas de nef-tat-vif fueron relativamente bajas. Fue más baja en los ratones del grupo 1 en los que nef-tat-vif estaba bajo el control del promotor lap1. Sin embargo, en los ejemplos 4-7 anteriores se observó que la expresión de genes conducida por el promotor del CMVH era mayor que con el promotor del CMVS, y la expresión de genes conducida por el promotor del CMVS era mayor que con el promotor lap1 del VHS. Esta diferencia en cuanto a fuerza de los promotores que se utiliza en la construcción de promotores triples puede ser responsable de las respuesta inmunitarias inducidas más bajas observada cuando se usa esta construcción en una composición inmunogénica.

Con respecto al uso de proteínas de fusión, comparando la respuesta de ELISPOT hacia pol del VIH en 3a y 3c, parece que existe cierta inmunogenicidad reducida cuando se usan polipéptidos de fusión en lugar de polipéptidos sencillos.

Otra consideración es la inmunogenicidad relativa de la proteína que se está examinando. Por ejemplo, examinando 3b frente a 3c (en el que la expresión de genes conducida por el promotor del CMVH conduce cada uno de los genes, env, gag, pol y nef-tat-vif, en un solo plásmido que contiene una sola unidad de transcripción), todavía persiste una jerarquía de inmunogenicidad que es aproximadamente env > pol > gag > nef-tat-vif. Como se ha indicado anteriormente, en el diseño de plásmidos individuales y de combinaciones de plásmidos, para su uso en las composiciones inmunogénicas, debe tenerse en cuenta la fuerza del promotor y la inmunogenicidad relativa.

Después, se realizó otro estudio para evaluar el efecto sobre las respuestas inmunitarias cuando tres inmunizaciones usan una, dos y tres composiciones inmunogénicas plasmídicas. Véase la Tabla 5. Como se ha descrito anteriormente se inmunizaron grupos de seis ratones, con la excepción de que se inmunizaron tres veces a intervalos de tres semanas en lugar de dos veces a intervalos de tres semanas. Véase la Tabla 5. Los grupos 1, 2e y 3a utilizan las mismas composiciones inmunogénicas que las de las de la Tabla 3. Además, en el estudio usando tres inmunizaciones, se construyó un nuevo plásmido, denominado 301, para comparar directamente la expresión génica conducida por el promotor del CMVH de una proteína de fusión gag/pol con la expresión génica conducida por el promotor del CMVS de una proteína de fusión gag/pol. Los grupos 3a y 4b se comparan en las Tablas 5 y 6. Este plásmido también permitió la comparación del potencial inmunogénico de la fusión gag-pol que se expresaba a partir de un plásmido con tres unidades transcripcionales con la fusión gag-pol y los genes env que se expresaban a partir de tres plásmidos con una sola unidad transcripcional conducidos por promotores similares. Los grupos 1 y 4b se comparan en las Tablas 5 y 6. Se recogió tejido de bazo 17 días después del refuerzo final y se analizó para determinar respuestas ELISPOT específicas de antígeno con respecto a proteínas del VIH individuales.

Tabla 5. Diseño de estudio murino con tres inmunizaciones

¹ Grupo N°	Plásmido N°.	Descripción del plásmido	ADN Total (ug)	N°. de ratón	Pauta de inmunización (semanal)
1	303	CMVH-env; CMVS-gag/pol; lap-ntv	100	9	0 - 3 - 6
2e	201 +	CMVH -pol, CMVS -gag	50	9	0 - 3 - 6
	202	CMVH -ntv, CMVS -env	50		
3a	111	CMVH -gag/pol	33	9	0 - 3 - 6
	101	CMVH -env	33		
	104	CMVH -ntv	33		
4b	101	CMVH -env	33	9	0 - 3 - 6
	104	CMVH -ntv	33		
	301	CMVS -gag/pol, CMVH -[ninguna] Lap1-[ninguna]	33		
control	001	Control vectorial	100	6	0 - 3 - 6

¹ Los grupos 1, 2e y 3a utilizan las mismas composiciones inmunogénicas que las de las de la Tabla 3, con la excepción de que se realizaron tres inmunizaciones.

Las respuestas inmunitarias celulares inducidas totales de los plásmidos con tres unidades transcripcionales fueron aproximadamente iguales o mayores que las respuestas inmunitarias celulares inducidas por las composiciones inmunogénicas que contenían plásmidos con una y dos unidades transcripcionales. Véase la Tabla 6.

Tabla 6. Respuestas inmunitarias celulares murinas con tres inmunizaciones

Grupo ID	Respuesta específica de gag*	Respuesta específica de pol	Respuesta específica de env	Respuesta específica de ntv#	Respuesta específica de VIH Total
1	34	58	986	1	1077
2e	32	363	431	69	895
3a	174	162	713	82	1131
4b	47	35	722	79	883
control	0	0	3	2	5

* Las respuestas ELISPOT de IFN-gamma específicas de antígeno se indicaron como número de CFM/10⁶ esplenocitos. ntv #, proteína de fusión nef-tat-vif .

5

Los resultados ELISPOT después de tres inmunizaciones de las composiciones inmunogénicas indicaron que las respuestas inmunitarias celulares contra el VIH después de tres inmunizaciones con la composición inmunogénica basada en plásmidos con tres unidades transcripcionales aumentaron al 100% después de la tercera inmunización. Sin embargo, el equilibrio de la respuesta todavía puede variar dependiendo de la fuerza de los promotores implicados y de la inmunogenicidad relativa de los antígenos. Claramente, en algunas situaciones en las que es necesaria una ventaja de fabricación, el plásmido con tres unidades transcripcionales será un buen vehículo para administrar tres o más genes en una composición inmunogénica.

10

Por tanto, hasta ahora, todos los diseños de los plásmidos sometidos a ensayo en las composiciones inmunogénicas se ha observado que expresan correctamente los antígenos y son inmunogénicos, activando respuestas inmunitarias celulares después de tres inmunizaciones. Sin embargo, no se detectaron respuestas específicas para nef-tat-vif cuando se pusieron bajo el control del promotor Lap1 del VHS en la construcción del promotor triple.

15

En algunos casos, serían preferibles composiciones inmunogénicas que indujesen respuestas inmunitarias celulares más amplias y equilibradas contra una serie de antígenos. En este caso, los diseños de composiciones inmunogénicas con dos y tres ADNp (2d, 3a y 3c), como se muestra en las Tablas 3 y 4, parecen capaces de suscitar respuestas ELISPOT específicas contra el VIH, equilibradas, fuertes (>600 CFM/10⁶ células), y se seleccionaron para ensayo posterior en primates no humanos. Véase el Ejemplo 9.

20

Ejemplo 9. Estudios de inmunización en Macacos con vectores plasmídicos que contienen una o dos unidades transcripcionales completas.

En el Ejemplo 8, Tablas 3 y 4, tres composiciones inmunogénicas ADNp, particularmente las composiciones inmunogénicas usadas en los grupos 2d, 3a y 3c, parecieron capaces de suscitar respuestas ELISPOT específicas contra el VIH, equilibradas, potentes (>600 CFM/10⁶ células) contra las seis proteínas del VIH y se seleccionaron para ensayo posterior en primates no humanos.

25

Diseño experimental

Para este estudio, se usó un total de 30 macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) macho, de origen indio, criados en cautividad, negativos a Mamu-A*01. Los macacos se instalaron en el New Iberia Research Center (New Iberia, LA) y se mantuvieron de acuerdo con the Guide for the Care y Use of Laboratory Animals (National Research Council, National Academic Press, Washington, DC, 1996). Además, los procedimientos para el uso y cuidado de los macacos fueron aprobados por Wyeth Research's Institutional Animal Care y Use Committee.

30

Inmunizaciones:

Para la inmunización se produjeron plásmidos de expresión en Puresyn, Inc. (Malvern, PA). Los plásmidos se propagaron en *E. coli*, aislados de células por lisis alcalina y se purificaron por cromatografía de columna. Después los plásmidos se formularon individualmente a una concentración de 2,5 mg/ml en tampón citrato isotónico (citrato sódico 29,3 mM, ácido cítrico 0,67 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0,34 mM, pH = 6,4-6,7) que contenía bupivacaína al 0,25% para permitir la formación de complejos ADN:bupivacaína. Se demostró que las preparaciones de plásmido finales consistían en ADN plasmídico súper enrollado >90% y se demostró que la endotoxina residual era <30 UE/mg de ADN (datos no mostrados).

35

40

5 El adyuvante usado para los estudios con los macacos Rhesus fue un plásmido de ADN que se administró como parte de la composición inmunogénica. Este plásmido adyuvante es un plásmido de expresión con dos unidades transcripcionales (plásmido n°. 212 en la Tabla 1) que codifica los genes p35 y p40 de la IL-12 de Rhesus. Véase la Tabla 7. La subunidad p35 de IL-12 se expresó bajo el control del promotor temprano inmediato del CMVH y señal de poliadenilación de SV40, mientras que la subunidad p40 de la IL-12 se expresó bajo el control del promotor del CMV simio (CMVS) y la señal de poliadenilación de la HCB. La bioactividad de la IL-12 de Rhesus expresada por el plásmido se confirmó ensayando los sobrenadantes a partir de células RD transfectadas de manera transitoria para determinar su capacidad de inducir secreción de IFN- γ en linfocitos de sangre periférica (LSP; datos no mostrados) de Rhesus en reposo.

10

Tabla 7. Diseño de estudio en Macacos

Grupo N°	Plásmido N°	¹ Descripción del plásmido	ADN total (ug)	N° de animal
2d	111 + 202 212	CMVH-gag-pol CMVH -ntv, SCMV-env CMVH -IL-12 p35, CMVS-IL-12 p40	4,25 4,25 1,5	6
3a	111 101 104 212	CMVH-ag/pol CMVH -env CMVH -ntv CMVH -IL-12 p35, CMVS-IL-12 p40	2,8 2,8 2,8 1,5	6
3c	102 103 202 212	CMVH -gag CMVH -pol CMVH -ntv, SCMV-env CMVH -IL-12 p35, CMVS-IL-12 p40	2,8 2,8 2,8 1,5	6
3cE ²	102 103 202 212	CMVH-gag CMVH -pol CMVH -ntv, CMVS-env CMVH -IL-12 p35, CMVS -IL-12 p40	0,56 0,56 0,56 0,30	6
4a ³	102 101 103 104 212	CMVH -gag CMVH -env CMVH -pol CMVH -ntv CMVH -IL-12 p35, CMVS-IL-12 p40	2,1 2,1 2,1 2,1 1,5	6
4 -control	001 212	control vectorial CMVH-IL-12 p35, CMVS-IL-12 p40	8,5 1,5	6
¹ Todos los grupos recibieron 1,5 mg de plásmido n°. 212 (CMVH-IL-12 p35, CMVS-IL-12 p40) que, como coadyuvante, codifica la IL-12 de macaco Rhesus (rIL-12). ² Se incluyó un segundo grupo de 3c en el que al protocolo de administración se añadió electroporación ³ Se añadió un grupo adicional (4a) al estudio de macacos en un último momento para determinar la inmunogenicidad del diseño de vacuna de vector 4 indicado.				

Todos los macacos se inmunizaron sobre una pauta de 0, 4 y 8 semanas. Inmediatamente antes de la inmunización, las formulaciones apropiadas del vector de expresión plasmídico se mezclaron para crear composiciones inmunogénicas y se administraron por inyección intramuscular (grupos 2d, 3a, 3c y controles) en ambos deltoides y

cuadriceps (volumen de inyección de 1 ml, 2,5 mg de ADN por sitio) usando una aguja de calibre 18 y una jeringa de 3 ml.

5 El grupo de macacos 3cE se inmunizó con ADNp por inyección intramuscular en ambos deltoides y cuadriceps usando jeringas convencionales de 1 ml con agujas de calibre 21 (Braun) colocadas a una distancia de 8,0 mm y, seguido inmediatamente de electroestimulación (es decir, electroporación). El volumen de inyección fue de 0,2 ml proporcionando 0,5 mg de ADN plasmídico por sitio por inyección para un total de 2 mg de ADN total. Por lo tanto, el grupo de electroporación (3cE) recibió 1/5 de ADN total administrado a los otros grupos.

En este ejemplo, las condiciones de electroporación fueron las siguientes: seis impulsos unipolares de 20 ms a 250 mA y aproximadamente 100 V/cm. Hubo una pausa de 250 ms entre cada impulso.

10 En ausencia de electroporación, los resultados mostrados en la Tabla 8 indican que las composiciones inmunogénicas basadas en una combinación de plásmidos que poseen una sola unidad transcripcional (grupo 3a) producen la mayor respuesta inmunitaria celular total después de diez o dieciséis semanas en comparación con las composiciones inmunogénicas basadas en una combinación de plásmidos que contienen al menos un plásmido con más de una unidad transcripcional. Compárese 3a con 2d y 3c.

15 **Tabla 8. Respuestas ELISPOT IFN-Gamma específicas contra el VIH a lo largo del tiempo después de vacunación con ADN multiplasmídico**

* Respuestas totales ELISpot IFN-gamma específicas contra el VIH							
Grupo ID	Línea basal	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
2d	43,8 ± 10,5	286,5 ± 234,9	278,7 ± 104,5	403,1 ± 89,9	348,3 ± 108,8	769,9 ± 340,4	407,5 ± 82,2
3a	29,5 ± 12,8	61,5 ± 23,2	204,8 ± 26,4	635,0 ± 230,5	365,8 ± 47,1	1652,5 ± 563,3	1015,3 ± 584,8
3c	35,5 ± 9,0	56,5 ± 12,3	138,3 ± 32,5	892,5 ± 277,5	300,0 ± 95,9	786,7 ± 213,1	816,3 ± 330,6
3cE	41,5 ± 13,6	1405,0 ± 422,0	346,3 ± 72,7	1287,9 ± 365,6	3349,6 ± 1575,9	3637,8 ± 863,7	8140,8 ± 1819,0
4a	18,8 ± 8,2	52,1 ± 13,3	43,3 ± 16,6	272,9 ± 60,0	230,0 ± 40,5	190,6 ± 38,9	¹ nr
control	32,0 ± 12,5	10,2 ± 2,7	33,2 ± 12,0	24,2 ± 9,3	16,7 ± 4,0	12,1 ± 4,1	47,1 ± 13,7

* Las respuestas totales ELISPOT IFN gamma específicas contra el VIH se indican como la media del número de CFM/10⁶ LSP ± error típico.
¹ nr, no realizado

20 Un resultado sorprendente fue que la electroporación potenció las respuestas inmunitarias celulares totales más del 450 % a las diez semanas y más del 990 % a las dieciséis semanas. Compárese 3cE con 3c. Los resultados mostrados en la Tabla 8 indican que cuando las composiciones inmunogénicas basadas en una combinación de plásmidos que contienen al menos un plásmido con más de una unidad transcripcional se combinan con electroporación producen respuestas inmunitarias celulares totales más altas después de diez o dieciséis semanas en comparación con las composiciones inmunogénicas basadas en una combinación de plásmidos que tienen una sola unidad transcripcional. Compárese el grupo 3c y el grupo 3a.

25 En el estudio en macacos, excluyendo el uso de electroporación, el grupo 3a desarrolló la mayor respuesta ELISPOT específica de antígeno VIH total a las diez o dieciséis semanas (1652 y 1015 CFM/10⁶ células). Esta respuesta no fue estadísticamente diferente con respecto al grupo 2d (770 CFM/10⁶ células) o grupo 3c (787 CFM/10⁶ células). Véase la Tabla 8. Sin embargo, la mayor respuesta ELISPOT se consiguió con el uso de electroporación. Véase el grupo 3cE en la Tabla 8.

30 De manera interesante, la respuesta inmunitaria máxima después de inmunizaciones de refuerzo en las que se usó electroporación fue más tardía para los grupos no sometidos a electroporación. Por ejemplo, la respuesta ELISPOT IFN-gamma específica contra el VIH total para el grupo de animales 3a alcanzó un máximo aproximadamente seis

semanas después la inmunización o refuerzo en la semana 4. Véase la Tabla 8. En cambio, para el grupo sometido a electroporación, el máximo estuvo más próximo en la semana 10. Véase la Tabla 8.

La respuesta inmunitaria celular se analizó posteriormente como respuestas ELISPOT IFN-gamma con respecto a seis proteínas del VIH. La Tabla 9 muestra las respuestas ELISPOT IFN-gamma para env, gag, pol y una proteína de fusión de las proteínas nef-tat-vif. En el estudio en macacos, de nuevo se excluye el uso de electroporación, el grupo 3a desarrolló las respuestas ELISPOT más elevadas específicas contra el antígeno del VIH a las diez semanas contra env y nef-tat-vif. Véase la Tabla 9. El grupo de animales 3c desarrolló la respuesta ELISPOT más elevada contra gag y el grupo 2d desarrolló la respuesta ELISPOT más elevada contra la proteína pol. Compárese 3a con 2d y 3c en la Tabla 9. Con una gran diferencia la respuesta ELISPOT más elevada se consiguió con el uso de electroporación. Véase el grupo 3cE en la Tabla 9.

Tabla 9. Respuestas ELISPOT IFN-Gamma específicas de antígeno VIH individuales a las 10 semanas después de vacunación con ADN multiplasmídico

* Respuesta ELISPOT IFN-gamma específica de antígeno					
Grupo ID	Env	Gag	Pol	ntv	total
2d	360,4 ± 111,8	107,9 ± 45,2	204,0 ± 182,6	97,6 ± 67,6	769,9 ± 340,4
3a	1170,4 ¹ ± 427,0	43,8 ± 17,5	173,8 ± 97,7	264,6 ³ ± 113,8	1652,5 ± 563,3
3c	412,1 ± 131,7	246,3 ² ± 59,7	106,7 ± 60,5,	21,7 ± 8,9	786,7 ± 213,1
3cE	861,1 ± 292,5	1147,9 ± 356,9	1023,1 ± 384,0	605,7 ± 159,3	3637,8 ± 863,7
4a	132,9 ± 33,9	29,4 ± 6,5	9,1 ± 5,4	19,2 ± 7,9	190,6 ± 38,9
control	7,1 ± 3,4	1,7 ± 0,8	2,5 ± 1,1	0,8 ± 0,5	12,1 ± 4,1

* Las respuestas ELISPOT IFN-gamma específicas de antígeno VIH individuales se indican como la media del número de CFM/ 10⁶ LSP ± error típico.
¹ Respuesta ELISPOT específica de env estadísticamente más alta para el grupo 2d (p < 0,05).
² Respuesta ELISPOT específica para gag estadísticamente más alta con respecto al grupo 3a (p < 0,05).
³ Respuesta ELISPOT específica para ntv estadísticamente más alta con respecto al grupo 3c (p < 0,05).

La Tabla diez muestra respuestas ELISPOT IFN-gamma con respecto a env, gag, pol y una proteína de fusión de las proteínas nef-tat-vif del VIH a las dieciséis semanas, 8 semanas después de la última inmunización. Excluyendo el uso de electroporación, el grupo 3a desarrolló las respuestas ELISPOT más elevadas específicas de antígeno VIH a las dieciséis semanas para env y nef-tat-vif, mientras que el grupo 3c desarrolló las respuestas ELISPOT más elevadas específica de antígeno VIH a las diez semanas para gag y pol. La respuesta ELISPOT más elevada se consiguió con el uso de electroporación. Véase el grupo 3cE en Tabla 10.

Las Tablas 9 y 10 muestran que aumentando de 3 a 4 el número de plásmidos que expresan el antígeno en la composición inmunogénica disminuye la respuesta inmunitaria contra todas las proteínas del VIH. Véase Tablas 9 y 10.

Las Tablas 9 y 10 también muestran que los plásmidos en el grupo 2d, con dos plásmidos que expresan el antígeno en la composición inmunogénica, en el que un plásmido tiene dos unidades transcripcionales, inducen la respuesta inmunitaria más amplia y más equilibrada contra todas las proteínas del VIH. Véanse Tablas 9 y 10.

Tabla 10. Respuestas ELISPOT IFN-Gamma específicas de antígeno VIH individuales a las 16 semanas después de la vacunación con ADN multiplasmídico

* Respuesta ELISPOT IFN-gamma específica de antígeno					
Grupo ID	Env	Gag	Pol	ntv	total
2d	217,5 ± 33,3	76,3 ± 25,8	81,3 ± 32,2	32,5 ± 14,3	407,5 ± 82,2
3a	831,0 ± 457,8	39,7 ± 35,6	80,2 ± 68,7	64,3 ± 25,6	1015,3 ± 584,8
3c	437,5 ± 187,9	250,0 ± 88,2	96,3 ± 68,0	32,5 ± 10,7	816,3 ± 330,6
3cE	1984,7 ± 698,1	1975,3 ± 567,2	2305,6 ± 786,2	1875,3 ± 624,4	8140,8 ± 1819,0
4a	nd ¹	nr	nr	nr	nr

(continuación)

* Respuesta ELISPOT IFN-gamma especifica de antígeno					
Grupo ID	Env	Gag	Pol	ntv	total
control	22,5 ± 7,2	5,0 ± 2,3	9,2 ± 3,6	10,4 ± 4,4	47,1 ± 13,7

* Las respuestas ELISPOT IFN-gamma especificas de antígeno VIH individuales se indican como la media del número de CFM/ 10⁶ LSP ± error típico,
¹ nr, no realizado.

5 **La Tabla 11** muestra respuestas ELISPOT IFN-gamma con respecto a env, gag, pol y una proteína de fusión de las proteínas nef-tat-vif del VIH a las treinta semanas, 22 semanas después de la última inmunización, En el estudio realizado en macacos, de nuevo excluyendo el uso de electroporación, el grupo 3a desarrolló las respuestas ELISPOT más elevadas específicas de antígeno VIH para env, pol y nef-tat-vif, Véase la Tabla 11. El grupo de animales 3c desarrolló la respuesta ELISPOT más elevada para gag, En la Tabla 11 se compara 3a con 2d y 3c. Se consiguió la mayor respuesta ELISPOT con el uso de electroporación, Véase el grupo 3cE en Tabla 11,

10 En los estudios realizados tanto en ratones como en macacos, las respuestas ELISPOT específicas de antígeno fueron generalmente más elevadas en cada uno de los grupos que recibieron genes individuales mediante el propio control del promotor del CMVH, En el estudio realizado en macacos, la electroporación fue un factor más importante en la producción de respuestas inmunitarias que si la composición inmunogénica contenía plásmidos que tenían una unidad transcripcional frente a dos completas o si se usaban proteínas de fusión.

15 **Tabla 11. Respuestas ELISPOT IFN-Gamma especificas de antígeno VIH individuales a las 30 semanas después de la vacunación con ADN multiplasmídico**

* Respuesta ELISPOT IFN-gamma especifica de antígeno					
Grupo ID	Env	Gag	Pol	ntv	total
2d	44,2 ± 11,6	6,7 ± 3,1	8,8 ± 6,3	4,6 ± 3,6	64,2 ± 16,0
3a	184,0 ± 105,4	5,6 ± 3,7	14,0 ± 6,9	10,2 ± 4,7	213,9 ± 119,1
3c	52,5 ± 11,7	25,4 ± 6,6	2,9 ± 2,0	0,8 ± 0,8	81,7 ± 19,6
3cE	831,3 ± 339,1	768,9 ± 216,7	907,4 ± 476,5	886,4 ± 371,8	3,393,9 ± 920,4
4a ¹ ,	¹ nr	nr	nr	nr	nr
control	9,6 ± 4,8	0,0 ± 0,0	1,6 ± 1,2	0,0 ± 0,0	11,3 ± 5,8

* Las respuestas ELISPOT IFN-gamma especificas de antígeno VIH individuales se indican como la media del número de CFM/ 10⁶ LSP ± error típico,
¹ nr, no realizado.

Respuesta inmunitarias celular contra proteínas individuales del VIH a lo largo del tiempo

20 Las respuestas ELISPOT IFN-gamma se midieron a las semanas 2, 4, 6, 8, 10 y 16 con respecto a proteínas individuales env, gag, pol, nef, tat, y vif del VIH después de inmunización con los plásmidos descritos en la Tabla 7. Los resultados se presentan en las Tablas 12-17.

Tabla 12: Respuestas ELISPOT IFN-gamma especificas de env del VIH a lo largo del tiempo después de vacunación con ADN multiplasmídico

* Respuesta ELISPOT IFN-gamma especifica de env del VIH							
Grupo ID	Línea basal	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
2d	17,7 ± 4,5	204,0 ± 162,8	182,3 ± 64,8	295,1 ± 60,9	209,6 ± 66,1	360,4 ± 111,8	217,5 ± 33,3

(continuación)

* Respuesta ELISPOT IFN-gamma especifica de env del VIH							
Grupo ID	Línea basal	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
3a	5,3 ± 2,2	43,8 ± 19,6	165,3 ± 20,6	577,9 ± 224,5	308,8 ± 38,6	1170,4 ± 427,0	831,0 ± 457,8
3c	21,0 ± 8,4	26,3 ± 7,1	84,8 ± 20,2	538,3 ± 174,2	192,1 ± 71,1	412,1 ± 131,7	437,5 ± 187,9
3cE	23,2 ± 9,5	598,3 ± 203,9	144,2 ± 30,9	382,9 ± 387,2	1165,8 ± 647,7	861,1 ± 292,5	1984,7 ± 698,1
4a	14,6 ± 8,7	24,2 ± 10,1	22,1 ± 9,6	254,2 ± 57,5	169,2 ± 33,5	132,9 ± 33,9	¹ nr
control	13,7 ± 5,4	3,0 ± 1,6	17,2 ± 9,0	17,1 ± 6,0	9,2 ± 2,6	7,1 ± 3,4	22,5 ± 7,2

* Las respuestas ELISPOT IFN-gamma especificas de env del VIH se indican como la media del número de CFM/ 10⁶ LSP ± error típico,
¹ nr, no realizado

Tabla 13: Respuestas ELISPOT IFN-gamma especificas de gag del VIH a lo largo del tiempo después de vacunación con ADN multiplasmídico

* Respuesta ELISPOT IFN gamma especifica de gag del VIH							
Grupo ID	Línea basal	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
2d	6,8 ± 1,5	23,5 ± 16,7	36,0 ± 18,3	28,1 ± 5,7	59,6 ± 31,2	107,9 ± 45,2	76,3 ± 25,8
3a	2,2 ± 1,0	9,0 ± 3,4	21,5 ± 4,9	17,5 ± 11,5	10,0 ± 2,7	43,8 ± 17,5	39,7 ± 35,6
3c	4,5 ± 2,1	19,0 ± 6,7	51,7 ± 15,6	229,6 ± 67,0	86,7 ± 21,8	246,3 ± 59,7	250,0 ± 88,2
3cE	4,8 ± 2,9	709,6 ± 244,1	161,3 ± 38,3	381,7 ± 78,5	1169,6 ± 551,6	1147,9 ± 356,9	1975,3 ± 567,2
4a	2,1 ± 8,7	12,4 ± 3,7	5,4 ± 2,4	10,0 ± 4,0	27,5 ± 6,2	29,4 ± 6,5	¹ nr
control	3,2 ± 2,2	1,0 ± 0,6	7,7 ± 4,5	1,7 ± 0,8	2,1 ± 1,2	1,7 ± 0,8	5,0 ± 2,3

* Las respuestas ELISPOT IFN-gamma especificas de gag del VIH se indican como la media del número de CFM/ 10⁶ LSP ± error típico,
¹ nr, no realizado

5

Tabla 14: Respuestas ELISPOT IFN-gamma especificas de pol del VIH a lo largo del tiempo después de vacunación con ADN multiplasmídico.

*Respuesta ELISPOT IFN-gamma especifica de pol del VIH							
Grupo ID	Línea basal	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
2d	12,2 ± 4,3	33,8 ± 31,3	27,7 ± 7,6	53,3 ± 32,3	41,7 ± 25,1	204,0 ± 182,6	81,3 ± 32,2
3a	7,3 ± 4,1	1,8 ± 0,9	7,3 ± 2,9	17,5 ± 7,9	15,0 ± 4,5	173,8 ± 97,7	80,2 ± 68,7

(continuación)

*Respuesta ELISPOT IFN-gamma especifica de pol del VIH							
Grupo ID	Línea basal	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
3c	6,5 ± 3,4	3,5 ± 2,1	1,8 ± 1,3	102,1 ± 42,3	17,1 ± 6,8	106,7 ± 60,5	96,3 ± 68,0
3cE	3,7 ± 2,4	54,6 ± 30,5	22,1 ± 9,1	316,3 ± 215,8	497,9 ± 179,7	1023,1 ± 384,0	2305,6 ± 786,2
4a	1,7 ± 1,1	9,3 ± 6,8	2,5 ± 1,3	5,4 ± 2,0	13,8 ± 4,8	9,1 ± 5,4	¹ nr
control	10,7 ± 4,4	3,2 ± 2,8	4,7 ± 3,0	2,1 ± 1,6	4,2 ± 2,7	2,5 ± 1,1	9,2 ± 3,6

* Las respuestas ELISPOT IFN-gamma especificas de pol del VIH se indican como la media del número de CFM/10⁶ LSP ± error típico.
¹ nr, no realizado

Tabla 15: Respuestas ELISPOT IFN-gamma especificas de nef del VIH a lo largo del tiempo después de vacunación con ADN multiplasmídico.

*Respuesta ELISPOT IFN-gamma especifica de nef del VIH							
Grupo ID	Línea basal	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
2d	4,8 ± 3,2	16,3 ± 16,3	22,5 ± 16,7	12,4 ± 6,0	32,9 ± 14,4	43,7 ± 27,6	24,6 ± 12,3
3a	20,1 ± 9,8	2,5 ± 2,0	7,9 ± 3,6	13,8 ± 5,2	22,5 ± 9,8	192,1 ± 76,7	54,8 ± 25,4
3c	4,2 ± 4,2	0,4 ± 0,4	0,0 ± 0,0	10,4 ± 7,5	3,3 ± 2,5	10,0 ± 8,1	18,3 ± 9,6
3cE	5,1 ± 3,4	11,9 ± 7,2	11,7 ± 7,7	67,1 ± 56,6	281,7 ± 207,0	403,2 ± 158,3	1276,2 ± 516,3
4a	0,4 ± 0,4	1,7 ± 1,4	5,4 ± 3,1	2,1 ± 2,1	10,4 ± 5,0	8,3 ± 4,4	¹ nr
control	3,6 0,8 ± 2,8	± 0,8	0,8 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,9 ± 1,5

* Las respuestas ELISPOT IFN-gamma especificas de nef del VIH se indican como la media del número de CFM/10⁶ LSP ± error típico.
¹ nr, no realizado

5 **Tabla 16: Respuestas ELISPOT IFN-gamma especificas de tat del VIH a lo largo del tiempo después de vacunación con ADN multiplasmídico.**

*Respuesta ELISPOT IFN-gamma especifica de tat del VIH							
Grupo ID	Línea basal	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
2d	7,1 ± 3,3	0,8 ± 0,5	7,1 ± 4,2	8,5 ± 3,3	2,9 ± 2,1	4,6 ± 2,1	3,8 ± 1,4
3a	10,0 ± 5,3	3,8 ± 2,3	2,9 ± 1,2	4,2 ± 2,0	8,8 ± 7,3	14,6 ± 8,2	1,7 ± 1,2
3c	6,2 ± 4,5	6,3 ± 2,9	0,4 ± 0,4	8,3 ± 3,5	0,4 ± 0,4	1,3 ± 1,3	2,9 ± 1,2
3cE	7,6 ± 5,2	22,4 ± 13,8	2,1 ± 1,0	25,0 ± 17,8	75,0 ± 42,4	29,3 ± 19,9	190,0 ± 88,4
4a	0,0 ± 0,0	1,8 ± 1,5	5,8 ± 2,9	1,3 ± 1,3	5,8 ± 3,7	10,3 ± 6,1	nr ¹
control	5,1 ± 4,5	0,8 ± 0,5	2,1 ± 1,6	3,3 ± 1,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,1 ± 1,2

* Las respuestas ELISPOT IFN-gamma especificas de tat del VIH se indican como la media del número de CFM/10⁶ LSP ± error típico.
¹ nr, no realizado

Tabla 17: Respuestas ELISPOT IFN-gamma específicas de víf del VIH a lo largo del tiempo después de vacunación con ADN multiplasmídico

*Respuesta ELISPOT IFN-gamma específica de víf del VIH							
Grupo ID	Línea basal	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
2d	9,4 ± 3,9	7,9 ± 7,9	3,3 ± 2,9	5,8 ± 2,7	1,7 ± 1,2	8,7 ± 8,1	4,2 ± 1,9
3a	12,9 ± 8,5	0,4 ± 0,4	0,4 ± 0,4	4,2 ± 2,3	0,8 ± 0,8	12,1 ± 12,1	7,8 ± 2,7
3c	6,4 ± 4,8	0,8 ± 0,5	0,0 ± 0,0	3,8 ± 2,0	0,4 ± 0,4	2,5 ± 2,5	11,3 ± 3,3
3cE	8,9 ± 5,9	8,2 ± 5,1	5,0 ± 2,6	115,0 ± 51,6	159,6 ± 64,8	173,2 ± 103,6	409,1 ± 129,9
4a	0,0 ± 0,0	2,8 ± 1,8	2,1 ± 0,8	0,0 ± 0,0	3,3 ± 1,1	0,6 ± 0,2	¹ nr
control	6,8 ± 2,2	1,2 ± 0,8	0,8 ± 0,8	0,0 ± 0,0	1,3 ± 1,3	0,0 ± 0,0	5,4 ± 3,1

* Las respuestas ELISPOT IFN-gamma específicas de víf del VIH se indican como la media del número de CFM/10⁶ LSP ± error típico.
¹ nr, no realizado

5 **Las Tablas 12-17**, que muestran respuestas inmunitarias contra proteínas individuales a lo largo del tiempo indican que aumentando de 3 a 4 el número de plásmidos que expresan antígenos, en la composición inmunogénica, da como resultado una disminución de la respuesta inmunitaria contra todas las proteínas del VIH a esta concentración dada de ADN administrada. Véanse las Tablas 12-17.

Ejemplo 10: Cálculo del porcentaje de LTC y células auxiliares específicas del VIH

10 Las cantidades relativas de LTC y células auxiliares específicas del VIH se calcularon empobreciendo en primer lugar linfocitos de sangre periférica (LSP) no fraccionados de células CD4+ o CD8+ antes de medir las respuestas ELISPOT IFN-gamma específicas del VIH totales a las semanas 10 y 16.

Preparación de perlas con LSP empobrecidos

15 Se empobrecieron células CD4+ o CD8+ a partir de LSP no fraccionados usando perlas de poliestireno magnéticas revestidas con anticuerpos monoclonales anti-ratón específicos de CD4- o CD8- humanos, siguiendo las instrucciones del fabricante (Dynal Biotech, Oslo, Noruega). En resumen, los LSP de Rhesus recién aislados se lavaron y se resuspendieron a una concentración final de 2×10^6 células/ml en PBS 1x enfriado con hielo que contenía SBF al 2%. Las microperlas Dynal revestidas con anticuerpos monoclonales anti-ratón específicos de CD4- o CD8 humanos se lavaron tres veces con PBS 1x que contenía SBF al 2% se añadieron después a los LSP no fraccionados a una proporción de perla con respecto a célula de 5:1, y se incubó durante una hora a 4°C en un aparato giratorio/basculante. Después de incubación, la suspensión perla/célula se colocó en una columna magnética y se recogió el flujo de paso que contenía los LSP empobrecidos de células CD4+ o CD8+. Las células se lavaron una vez con medio de cultivo completo complementado con SBF al 5% y se resuspendieron hasta el volumen original con medio de cultivo completo complementado con SBF al 5%. En el ensayo ELISpot se usaron directamente los mismos volúmenes de LSP no fraccionados y de perlas con LSP empobrecidos.

25 La eficacia del empobrecimiento del subconjunto de células CD4+ y CD8+ y la cantidad exacta de células CD4+ y CD8+ añadida a la placa ELISpot se cuantificó posteriormente por citometría de flujo. Brevemente, las perlas con los LSP empobrecidos se lavaron una vez con PBS 1x que contenía SBF al 2% y se tiñeron durante 15 minutos a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD3 de macaco Rhesus conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, clon SP34; BD Pharmingen, San Jose, CA); anti-CD4 humano conjugado con ficoeritrina (FE, clon M-T477; BD Pharmingen, San Jose, CA); anti-CD8 humano conjugado con proteína clorofila peridinina (PerCP; clon SK1; BD Pharmingen, San Jose, CA); y anti-CD20 humano conjugado con alofocianina (AFC, clon L27; BD Pharmingen, San Jose, CA). Después las células se lavaron una vez con PBS 1x que contenía SBF al 2%, azida al 0,02% y se resuspendieron en PBS 1x que contenía paraformaldeído al 1%. Se realizó análisis FACS sobre un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y se analizó usando un programa informático CellQuest. El porcentaje de empobrecimiento de células CD4+ o CD8+ fue rutinariamente > 95% (datos no mostrados).

Tabla 18: Respuestas ELISPOT IFN-gamma específicas del VIH totales a las 10 y 16 semanas en LSP empobrecidos de CD4+ o CD8+

Grupo ID	No fracc.	Semana 10		No fracc.	Semana 16	
		empobrecido de CD4	empobrecido de CD8		empobrecido de CD4	empobrecido de CD8
2d	1,501 ± 632	1,494 ± 801	364 ± 77	902 ± 173	758 ± 141	431 ± 93
3a	2,524 ± 789	1.239 ± 662	997 ± 222	1,821 ± 906	1,059 539 ± 689	± 175
3c	1,484 ± 359	908 ± 268	536 ± 147	1,532 ± 556	856 ± 308	607 ± 203
3cE	6,651 ± 1,326	10,563 ± 3,388	1,921 ± 274	13,361 ± 2,770	21,051 ± 7,067	2,754 ± 543
4a	1,591 ± 281	688 ± 119	954 ± 248	nr	nr	nr
control	6 ± 2	31 ± 10	34 ± 15	187 ± 12	107 ± 31	118 ± 24

* Las respuestas ELISPOT IFN-gamma específicas de VIH totales se indican como la media del número de CFM/10⁶ LSP no fraccionados, empobrecidos de CD4+ o CD8+ ± error típico.
¹ nr, no realizado

5 Los resultados mostrados en la Tabla 18 proporcionan un cálculo del porcentaje relativo de LTC frente a células
 10 auxiliares específicos del VIH que participan en una respuesta inmunitaria inducida particular. A partir de los datos
 pueden extraerse pocas observaciones generales. Los primeros grupos 2d, 3a y 3c suscitan magnitudes similares
 de respuesta inmunitaria celular frente al VIH. El grupo 3a parece inducir un mayor nivel de respuesta inmunitaria,
 pero la cantidad de variación en el ensayo es también mayor con este grupo. Cuando se usó electroporación junto
 con inmunización, la magnitud de la respuesta inmunitaria hacia los plásmidos en el grupo 3c se potenció
 aproximadamente de 5 veces a aproximadamente 10 veces. Véase la Tabla 18, que compara 3cE y 3c. También
 merece la pena observar que muchas más células participaban en la respuesta inmunitaria como resultado del uso
 de electroporación con la inmunización.

Ejemplo 11: Títulos de anticuerpos específicos contra el VIH inducidos por inmunización multiplasmídica

15 Una composición inmunogénica (CI) que contiene ADN plasmídicos proporciona diversas ventajas sobre otros tipos
 de tecnologías actualmente en uso basadas en composiciones inmunogénicas. Por ejemplo, las CI basadas en
 ADN, a diferencia de las CI subunitarias convencionales basadas en proteínas, permite que los antígenos
 codificados se procesen y se presenten más eficazmente por la ruta de procesamiento de antígenos de clase I del
 complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). La ruta de procesamiento de antígenos de clase I es crítica para la
 inducción de respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T CD8+. Sin embargo, las CI subunitarias
 20 convencionales basadas en proteínas típicamente funcionan mejor que las CI basadas en ADN en cuanto a su
 capacidad para suscitar respuestas contra anticuerpos específicas de antígenos.

Para la determinación de títulos de anticuerpos específicos de lisados virales del VIH, se revistieron placas ELISA
 durante 18 horas a 4° C con VIH-1_{MN} modificado con detergente a 20 ng/pocillo (Advanced Biotechnologies,
 Columbia, MD). El VIH-1_{MN} modificado con detergente se diluyó en tampón carbonato/bicarbonato (Na₂CO₃ 15 mM,
 NaHCO₃ 35 mM, pH 9,6). Para la determinación de títulos de anticuerpos específicos de env del VIH, las placas
 25 ELISA se revistieron con gp120 6101 del VIH-1 purificada (proporcionado amablemente por Larry Liao, Duke
 University, 20 ng /pocillo) diluido en PBS 1x. Después de 18 horas de incubación con proteínas del VIH, las placas
 ELISA se lavaron después cinco veces con PBS 1x que contenía Tween 20 al 0,1 % y se bloqueó durante 2 horas a
 temperatura ambiente con PBS 1x que contenía Tween 20 al 0,1 % y BSA al 3 %. Las muestras de suero de los
 30 animales inmunizados y de control se diluyeron con PBS 1x que contenía BSA al 1 % y Tween-20 al 0,1 %, se
 añadieron a las placas ELISA a una dilución de partida de 1:100 y después se diluyeron 3 veces más a través de las
 placas. Las muestras de suero diluidas se incubaron durante una noche a 4° C con las placas recubiertas con la
 proteína. La detección de inmunoglobulina específica de antígenos se consiguió incubando un anticuerpo primario
 conjugado con biotina específico para IgG de primate durante 2 horas a temperatura ambiente. Este anticuerpo se
 35 diluyó 1:30.000 con PBS 1x complementado con Tween-20 al 0,1 %, BSA al 1 %, Accurate Scientific, Westbury, NY.
 Después, el anticuerpo primario se retiró con lavado y continuó con una incubación a temperatura ambiente durante
 1 hora de anticuerpo secundario anti-biotina conjugado con peroxidasa de rábano picante-estreptavidina (reserva de
 500 unidades/ml, diluido 1:10.000 con PBS 1x complementado con Tween-20 al 0,1 %, BSA al 1 %, Roche
 Immunochemical, Indianapolis, IN). Finalmente, se desarrolló el color añadiendo 100 mcl/pocillo de TMB (3,3', 5,5'-
 40 tetrametil benzidina, Sigma). Los títulos de los anticuerpos específicos contra antígenos se definieron como la
 dilución recíproca del último suero que proporciona una D.O₄₅₀ mayor que la del mismo suero sin tratar de los
 animales (es decir semana 0) + 3 desviaciones típicas.

5 Se determinaron los títulos de la envuelta del VIH durante determinados puntos de tiempo a lo largo de las 16 primeras semanas de inmunizaciones con ADN multiplasmídico y se muestran en la Tabla 19. Los títulos por ELISA de gp 120 de env 6101 del VIH-1 se calcularon como la dilución recíproca del último suero que proporciona una D.O₄₅₀ mayor que la del mismo suero sin tratar de los animales (es decir semana 0) + 3 desviaciones típicas. Los datos en la Tabla 19 (así como en la Tabla 20 a continuación) se presentan como el título medio log₁₀ ± error típico de la media. En este caso, los títulos de env del VIH-1 ≤2,00 representan un título de punto final de menos de 1:100 y estaban por debajo del límite de detección.

Tabla 19: Títulos de anticuerpos por ELISA específicos de gp120 de env 6101 del VIH-1 a lo largo del tiempo después de inmunización con ADN multiplasmídico.

* Títulos por ELISA de env del VIH-1						
¹ Grupo ID	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
2d	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,08 ± ,035	2,43 ± 0,21	2,73 ± 0,27	2,59 ± 0,20
3a	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,16 ± 0,10	2,64 ± 0,32	2,95 ± 0,28	2,56 ± 0,29
3c	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,16 ± 0,16	2,48 ± 0,21	2,80 ± 0,32	2,95 ± 0,37
3cE	2,16 ± 0,16	2,72 ± 0,16	4,39 ± 0,49	3,67 ± 0,44	5,18 ± 0,20	4,78 ± 0,23
4a	¹ nr	nr	nr	nr	nr	nr
control	2,00 ± 0,00	2,08 ± 0,08	2,00 ± 0,00	2,16 ± 0,10	2,16 ± 0,16	2,32 ± 0,16

*Los datos se indicaron como el título medio log₁₀ ± error típico de la media. Los títulos de env del VIH-1 ≤2,00 representan un título de punto final de menos de 1:100 y estaban por debajo del límite de detección
¹ nr indica no realizado.

10 Como se observa en la Tabla 19, los animales del grupo 3c inmunizados con las composiciones inmunogénicas basadas en una combinación de plásmidos que contenía al menos un plásmido con más de una unidad transcripcional consiguieron los títulos más elevados sin electroporación a la semana 16. Sin embargo, los resultados para los grupos 2d y 3a fueron algo similares, pero los animales del grupo 3a mostraron los títulos más elevados a las semanas 8 y 10. Véase la Tabla 19, que compara 3a con 2d y 3c. Una composición inmunogénica basada en una combinación de plásmidos que contiene al menos un plásmido con más de una unidad transcripcional y que recibe electroestimulación por electroporación con inmunización desarrolla con mucho los títulos más elevados contra la proteína de envuelta del VIH. Véase la Tabla 19, que compara 3c con 3cE.

20 En la Tabla 20 se muestran los títulos del VIH totales para el lisado de virus completo determinados durante las semanas 2, 4, 6, 8, 10, y 16 de inmunizaciones de ADN de multiplasmídico. Los títulos por ELISA específicos de lisado viral para el VIH-1_{MN} se determinaron como la dilución recíproca del último suero que proporciona una D.O₄₅₀ mayor que la del mismo suero sin tratar de los macacos (es decir pre-inmune) + 3 desviaciones típicas. En esta tabla, los datos se presentaron como el título medio log₁₀ ± error típico de la media. Obsérvese que los títulos del anticuerpo ≤1,70 representan un título de punto final de menos de 1:50 y estaban por debajo del límite de detección. Los resultados en la Tabla 20 en la semana 16 fueron similares a los presentados en la Tabla 19.

25 **Tabla 20: Títulos totales de anticuerpos por ELISA específicos del VIH-1 a lo largo del tiempo después de vacunación con ADN multiplasmídico**

* Títulos totales por ELISA del VIH-1						
Grupo ID	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 16
2d	1,70 ± 0,00	1,70 ± 0,00	1,75 ± 0,05	1,75 ± 0,05	2,04 ± 0,28	1,70 ± 0,00
3a	1,75 ± 0,05	1,75 ± 0,05	1,70 ± 0,00	1,70 ± 0,00	1,70 ± 0,00	1,70 ± 0,00
3c	2,06 ± 0,19	2,11 ± 0,18	1,75 ± 0,05	1,88 ± 0,13	1,85 ± 0,07	1,90 ± 0,06
3cE	1,88 ± 0,13	1,88 ± 0,13	3,46 ± 0,53	2,38 ± 0,34	4,36 ± 0,16	3,75 ± 0,29
4a	¹ nr	nr	nr	nr	nr	nr
control	1,70 ± 0,00	1,75 ± 0,05	1,70 ± 0,00	1,70 ± 0,00	1,91 ± 0,21	1,91 ± 0,21

*Los datos se indicaron como el título medio log₁₀ ± error típico de la media. Los títulos de los anticuerpos ≤ 1,70 representan un título de punto final de menos de 1:50 y estaban por debajo del límite de detección
¹ nr indica no realizado

Ejemplo 12: Efecto de inmunización multiplasmídica sobre diversos parámetros serológicos y peso corporal en macacos.

Los recuentos de glóbulos blancos (WBC por las siglas en inglés) de sangre periférica en los macacos usados en el estudio se determinaron a lo largo del tiempo por análisis de recuento de sangre completa y se indicaron como media WBC (x1000/ml) ± error típico. Véase la Tabla 21.

5

Tabla 21: Recuentos totales de WBC (x1000) en macacos inmunizados con vacunas de ADN plasmídico con y sin electroporación

Semana								
Grupo ID	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	10,3 ± 1,1	8,8 ± 1,4	8,1 ± 1,0	7,2 ± 0,7	7,1 ± 1,0	8,6 ± 0,7	6,9 ± 0,9	6,6 ± 0,4
3a	8,6 ± 1,4	5,5 ± 0,8	7,9 ± 1,3	6,0 ± 0,9	6,3 ± 1,0	7,3 ± 1,1	7,8 ± 1,1	8,0 ± 1,6
3c	9,4 ± 1,4	6,3 ± 0,6	8,0 ± 0,8	7,0 ± 0,8	7,3 ± 0,9	9,9 ± 0,9	8,4 ± 1,4	7,8 ± 1,2
3cE	11,0 ± 1,7	12,1 ± 1,5	8,2 ± 1,1	18,4 ± 2,0	11,0 ± 1,3	13,1 ± 1,3	9,3 ± 0,9	7,9 ± 0,5
4a	11,6 ± 0,8	10,3 ± 1,4	8,9 ± 0,8	8,0 ± 0,8	8,2 ± 0,5	7,9 ± 0,5	8,3 ± 0,7	¹ nr
control	7,6 ± 0,9	5,6 ± 0,7	7,1 ± 0,9	5,7 ± 0,6	5,9 ± 0,7	7,6 ± 1,3	5,6 ± 0,5	6,6 ± 0,7

* Los recuentos de glóbulos blancos (WBC) de sangre periférica se determinaron mediante análisis de recuento de sangre completa y se indicaron como la media WBC (x1000/ml) ± error típico.
¹ nr, no realizado

Los recuentos de glóbulos rojos (RBC, por las siglas en inglés) de sangre periférica en los animales usados en el estudio se determinaron a lo largo del tiempo por análisis de recuento de sangre completa y se indicaron como media RBC (x10⁸/ml) ± error típico. Véase la Tabla 22.

10

Los niveles de hemoglobina de sangre periférica (g/dl) en los animales usados en el estudio se determinaron a lo largo del tiempo por análisis de recuento de sangre completa y se indicaron como el nivel de hemoglobina medio ± error típico. Véase la Tabla 23.

La inmunización multiplasmídica con los plásmidos y las composiciones inmunogénicas descritos en la Tabla 7 no produjeron ningún efecto adverso sobre los WBC, RBC y niveles de hemoglobina en los animales usados en este estudio. Véanse las Tablas 21-23. Se detectó un efecto considerado positivo cuando se usó electroporación con las composiciones inmunogénicas usadas para inmunizar al grupo 3cE. En este grupo, el número de WBC fue significativamente elevado durante todo el desarrollo del estudio. Véase la Tabla 21.

15

Tabla 22: Recuentos de RBC totales (x10⁶) en macacos inmunizados con vacunas de ADN plasmídico con y sin electroporación

20

Semana								
Grupo ID	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	5,60 ± 0,12	5,64 ± 0,03	5,62 ± 0,08	5,69 ± 0,09	5,70 ± 0,11	5,67 ± 0,11	5,74 ± 0,06	5,91 ± 0,08
3a	5,61 ± 0,19	5,36 ± 0,17	5,39 ± 0,17	5,40 ± 0,13	5,39 ± 0,15	5,53 ± 0,18	5,32 ± 0,14	5,70 ± 0,16
3c	5,39 ± 0,13	5,32 ± 0,14	5,43 ± 0,09	5,46 ± 0,13	5,38 ± 0,14	5,45 ± 0,10	5,52 ± 0,13	5,69 ± 0,09
3cE	5,63 ± 0,15	5,91 ± 0,09	5,80 ± 0,07	5,60 ± 0,21	5,87 ± 0,10	5,57 ± 0,13	5,70 ± 0,07	5,75 ± 0,11
4a	5,99 ± 0,11	5,68 ± 0,09	5,97 ± 0,08	5,77 ± 0,11	5,84 ± 0,07	5,79 ± 0,12	5,54 ± 0,10	¹ nr
control	5,69 ± 0,18	5,49 ± 0,13	5,57 ± 0,09	5,63 ± 0,09	5,61 ± 0,08	5,66 ± 0,09	5,73 ± 0,12	5,94 ± 0,13

* Los recuentos de glóbulos rojos (RBC) de sangre periférica se determinaron mediante análisis de recuento de sangre completa y se indicaron como la media RBC (x10⁸/ml) ± error típico.
¹ nr, no realizado

Tabla 23: Niveles de hemoglobina total en macacos inmunizados con vacunas de ADN plasmídico con y sin electroporación

Semana								
Grupo ID	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	12,5 ± 0,3	12,7 ± 0,2	12,5 ± 0,2	12,6 ± 0,2	12,5 ± 0,1	12,6 ± 0,2	12,9 ± 0,2	13,1 ± 0,2
3a	13,1 ± 0,3	12,6 ± 0,3	12,6 ± 0,3	12,5 ± 0,3	12,6 ± 0,3	13,0 ± 0,3	12,8 ± 0,4	13,4 ± 0,2
3c	12,7 ± 0,3	12,6 ± 0,2	12,7 ± 0,2	12,7 ± 0,2	12,6 ± 0,4	13,0 ± 0,3	13,2 ± 0,3	13,5 ± 0,3
3cE	12,8 ± 0,3	13,4 ± 0,2	13,0 ± 0,2	13,1 ± 0,3	13,4 ± 0,2	12,9 ± 0,2	13,0 ± 0,1	13,3 ± 0,2
4a	13,5 ± 0,3	13,1 ± 0,2	13,5 ± 0,2	13,1 ± 0,2	13,2 ± 0,2	13,1 ± 0,2	12,5 ± 0,2	¹ nr
control	13,3 ± 0,3	12,8 ± 0,3	13,0 ± 0,2	12,9 ± 0,2	13,0 ± 0,2	13,2 ± 0,1	13,6 ± 0,3	13,9 ± 0,3

* Los niveles de hemoglobina de sangre periférica (g/dl) se determinaron mediante análisis de recuento de sangre completa y se indicaron como el nivel de hemoglobina medio ± error típico.
¹ nr, no realizado

5 Los niveles de plaquetas en sangre periférica se determinaron en los animales usados en el estudio a lo largo del tiempo por análisis de recuento de sangre completa y se indicaron como el nivel plaquetario medio (x1000) ± error típico. Véase la Tabla 24.

Los niveles porcentuales hematocritos en los animales usados en el estudio se determinaron a lo largo del tiempo por análisis de recuento de sangre completa y se indicaron como el nivel porcentual hematocrito medio ± error típico. Véase la Tabla 25.

10 El número total de linfocitos de sangre periférica se determinó en los animales usados en el estudio a lo largo del tiempo mediante análisis de recuento de sangre completa y se indicaron como el número total medio de linfocitos ± error típico. Véase la Tabla 26.

El número total de linfocitos T CD3* en sangre periférica en los animales usados en el estudio se determinó a lo largo del tiempo mediante análisis de recuento de sangre completa y se indicó como la media total del número de linfocitos T CD3* ± error típico. Véase la Tabla 27.

15 El número total de linfocitos Th CD3⁺CD4⁺ de sangre periférica en los animales usados en el estudio se determinó a lo largo del tiempo mediante análisis de recuento de sangre completa y se indicó como el número total medio de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ ± error típico. Véase la Tabla 28.

20 El número total de linfocitos Th CD3⁺CD8⁺ total de sangre periférica en los animales usados en el estudio se determinó a lo largo del tiempo mediante análisis de recuento de sangre completa y se indicó como el número total medio de linfocitos T CD3⁺CD8⁺ ± error típico. Véase la Tabla 29.

El número total de linfocitos CD20⁺ de sangre periférica en los animales usados en el estudio se determinó a lo largo del tiempo mediante análisis de recuento de sangre completa y se indicó como el número total medio de linfocitos CD20⁺ ± error típico. Véase la Tabla 30.

25 **Tabla 24: Recuento total de plaquetas (x1000) en macaco inmunizados con vacunas de ADN plasmídico con y sin electroporación**

Semana								
Grupo ID	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	404 ± 42	433 ± 19	399 ± 21	411 ± 16	392 ± 30	420 ± 13	448 ± 17	394 ± 21
3a	419 ± 41	418 ± 31	399 ± 28	441 ± 25	402 ± 30	411 ± 20	450 ± 35	380 ± 17
3c	454 ± 19	404 ± 13	418 ± 21	405 ± 19	391 ± 13	423 ± 41	381 ± 23	381 ± 27

(continuación)

Semana								
Grupo ID	-2	0	2	4	6	8	10	16
3cE	384 ± 29	389 ± 30	414 ± 31	389 ± 33	431 ± 33	315 ± 33	400 ± 24	347 ± 24
4a	364 ± 21	373 ± 9	339 ± 16	368 ± 15	355 ± 16	357 ± 16	360 ± 19	¹ nr
control	458 ± 39	412 ± 33	386 ± 47	383 ± 14	386 ± 43	414 ± 35	409 ± 27	378 ± 34

* Los niveles de plaquetas en sangre periférica se determinaron mediante análisis de recuento de sangre completa y se indicaron como el nivel plaquetario medio (x1000) ± error típico.
¹ nr, no realizado

Tabla 25: Hematocrito porcentual en macacos inmunizados con vacunas de ADN plasmídico con y sin electroporación

Semana								
Grupo ID	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	38,3 ± 0,9	38,5 ± 0,5	37,8 ± 0,6	38,6 ± 0,4	38,4 ± 0,4	38,6 ± 0,5	38,9 ± 0,4	40,2 ± 0,5
3a	39,9 ± 1,0	37,7 ± 0,8	38,4 ± 1,1	38,3 ± 0,9	38,0 ± 0,8	39,7 ± 1,1	38,3 ± 1,1	40,7 ± 0,7
3c	38,9 ± 0,8	37,8 ± 0,8	38,7 ± 0,5	38,8 ± 1,1	38,4 ± 1,1	39,3 ± 0,9	39,7 ± 0,9	40,6 ± 0,8
3cE	39,1 ± 0,9	40,6 ± 0,5	39,7 ± 0,6	39,6 ± 0,9	40,9 ± 0,5	39,0 ± 0,6	40,0 ± 0,3	39,9 ± 0,5
4a	41,3 ± 0,8	38,8 ± 0,6	40,8 ± 0,5	39,6 ± 0,4	40,1 ± 0,6	39,8 ± 0,6	37,9 ± 0,5	¹ nr
control	40,3 ± 1,0	38,5 ± 0,6	39,3 ± 0,4	39,4 ± 0,4	39,6 ± 0,5	40,3 ± 0,5	40,8 ± 0,7	41,8 ± 0,7

* Los niveles porcentuales hematocritos se determinaron mediante análisis de recuento de sangre completa y se indicaron como el nivel porcentual hematocrito medio ± desviación típica.
¹ nr, no realizado

5

Tabla 26: Número total de linfocitos en macacos inmunizados con vacunas de ADN plasmídico con y sin electroporación

Semana								
Grupo ID	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	3444 ± 554	4399 ± 521	3952 ± 578	4038 ± 462	3646 ± 677	4631 ± 574	3600 ± 581	3018 ± 422
3a	2955 ± 613	2901 ± 452	2706 ± 405	2910 ± 434	2804 ± 459	3631 ± 714	3186 ± 775	3814 ± 736
3c	3213 ± 448	3097 ± 369	3192 ± 407	3343 ± 559	3417 ± 699	4268 ± 667	3098 ± 678	3925 ± 805
3cE	3157 ± 331	3737 ± 718	4441 ± 608	2737 ± 383	4835 ± 822	5286 ± 987	4927 ± 575	4385 ± 612

(continuación)

Semana								
Grupo ID	-2	0	2	4	6	8	10	16
4a	4850 ± 348	3763 ± 381	4268 ± 339	3471 ± 149	4544 ± 363	3494 ± 248	3408 ± 248	¹ nr
control	2638 ± 230	3685 ± 784	3280 ± 349	3037 ± 334	3828 ± 456	4392 ± 465	3451 ± 358	3470 ± 220

* El número total de linfocitos en sangre periférica determinado por análisis de recuento de sangre completa se indicó como el número de linfocitos total medio ± error típico.

¹ nr, no realizado

Tabla 27: Número total de linfocitos T CD3⁺ en macacos inmunizados con vacunas de ADN plasmídico con y sin electroporación

Semana								
Grupo ID	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	1778 ± 356	2469 ± 265	2167 ± 306	2299 ± 257	2051 ± 356	2917 ± 313	2261 ± 318	1852 ± 218
3a	1697 ± 291	1796 ± 269	1681 ± 255	1910 ± 327	1822 ± 322	2536 ± 450	2344 ± 619	2772 ± 523
3c	1862 ± 215	1815 ± 175	1862 ± 187	1949 ± 279	2080 ± 341	2679 ± 313	2019 ± 385	2458 ± 426
3cE	1716 ± 223	1926 ± 421	2718 ± 427	1417 ± 241	3139 ± 560	3437 ± 680	3229 ± 360	2928 ± 457
4a	2848 ± 240	2141 ± 263	2481 ± 265	1881 ± 95	2851 ± 328	2153 ± 212	2141 ± 224	¹ nr
control	1455 ± 85	2188 ± 484	1883 ± 218	1749 ± 258	2334 ± 382	2789 ± 334	2352 ± 341	2291 ± 197

* El número de linfocitos T CD3⁺ total en sangre periférica determinado por análisis de recuento de sangre completa se indica como el número de linfocitos T CD3⁺ total medio ± error típico.

¹ nr, no realizado

5

Tabla 28: Número total de linfocitos Th CD3⁺CD4⁺ en macacos inmunizados con vacunas de ADN plasmídico con y sin electroporación

Semana								
Grupo ID	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	1117 ± 226	1463 ± 197	1348 ± 219	1371 ± 190	1317 ± 225	1770 ± 208	1435 ± 225	1457 ± 266
3a	934 ± 143	1007 ± 158	986 ± 156	1084 ± 191	1078 ± 198	1425 ± 242	1291 ± 322	1535 ± 287
3c	1132 ± 167	1108 ± 130	1178 ± 129	1195 ± 176	1283 ± 209	1598 ± 208	1229 ± 224	1480 ± 256
3cE	1034 ± 155	1115 ± 194	1622 ± 267	827 ± 124	1752 ± 271	1917 ± 347	1673 ± 165	1628 ± 165

(continuación)

Semana								
Grupo ID	-2	0	2	4	6	8	10	16
4a	1774 ± 220	1362 ± 202	1528 ± 202	1171 ± 91	1743 ± 247	1363 ± 163	1360 ± 174	¹ nr
control	877 ± 79	1292 ± 259	1162 ± 117	1109 ± 155	1430 ± 239	1659 ± 226	1437 ± 178	1353 ± 139

* El número total de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ en sangre periférica determinado por análisis de recuento de sangre completa se indica como el número de linfocitos Th CD3⁺CD4⁺ total medio ± error típico.
¹ nr, no realizado

Tabla 29: Número total de linfocitos T CD3⁺ CD8⁺ en macacos inmunizados con vacunas de ADN plasmídico con y sin electroporación

Semana								
Grupo ID	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	627 ± 141	1008 ± 105	807 ± 96	908 ± 87	729 ± 147	1137 ± 131	811 ± 103	678 ± 92
3a	729 ± 159	778 ± 118	691 ± 94	823 ± 139	729 ± 120	1111 ± 224	1041 ± 285	1254 ± 251
3c	663 ± 61	661 ± 69	635 ± 61	709 ± 102	744 ± 122	1023 ± 111	712 ± 151	884 ± 149
3cE	626 ± 78	774 ± 229	1067 ± 169	542 ± 114	1409 ± 334	1431 ± 348	1528 ± 206	1270 ± 294
4a	1005 ± 47	721 ± 70	901 ± 74	628 ± 53	994 ± 95	699 ± 64	718 ± 58	¹ nr
control	540 ± 92	876 ± 252	695 ± 151	625 ± 141	870 ± 172	1104 ± 184	872 ± 215	880 ± 131

* El número total de linfocitos T CD3⁺CD8⁺ en sangre periférica determinado por análisis de recuento en sangre completa se indica como el número de linfocitos T CD3⁺CD8⁺ total medio ± error típico.
¹ nr, no realizado

5

Tabla 30: Número total de linfocitos T CD20⁺ en macacos inmunizados con vacunas de ADN multiplasmídico con y sin electroporación

Semana								
Grupo ID	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	1468 ± 309	1287 ± 347	1369 ± 403	1131 ± 328	1337 ± 391	1300 ± 331	993 ± 301	918 ± 275
3a	1071 ± 296	857 ± 204	859 ± 218	767 ± 175	782 ± 195	799 ± 229	575 ± 115	746 ± 189
3c	1143 ± 269	994 ± 205	1155 ± 264	1089 ± 283	1083 ± 340	1322 ± 380	902 ± 295	1175 ± 356
3cE	1081 ± 140	968 ± 139	1221 ± 156	923 ± 125	1147 ± 201	1080 ± 173	1006 ± 138	966 ± 118
4a	1332 ± 186	1127 ± 162	1247 ± 113	1255 ± 148	1051 ± 104	938 ± 100	987 ± 91	¹ nr

(continuación)

Semana								
Grupo ID	-2	0	2	4	6	8	10	16
control	984 ± 161	1134 ± 296	1171 ± 169	1027 ± 183	1206 ± 221	1223 ± 204	912 ± 144	945 ± 164

* El número total de linfocitos CD20⁺ en sangre periférica determinado por análisis de recuento de sangre completa se indica como el número de linfocitos CD20⁺ total medio ± error típico.
¹nr, no realizado

5 La inmunización multiplasmídica con los plásmidos y las composiciones inmunogénicas descritas en la Tabla 7 tampoco produjeron ningún efecto adverso sobre los recuentos de plaquetas (Tabla 24), hematocrito porcentual (Tabla 25), número total de linfocitos (Tabla 26), número total de linfocitos T CD3+ (Tabla 27), número total de linfocitos Th CD3+CD4+ (Tabla 28), número total de linfocitos T CD3+CD8+ (Tabla 29), y número total de linfocitos T CD20+ (Tabla 30), en los animales usados en este estudio. De nuevo, en estos análisis se detectó un efecto positivo sobre el número total de linfocitos (Tabla 26), número total de linfocitos T CD3+ (Tabla 27), número total de linfocitos Th CD3+CD4+ total (Tabla 28) y número total de linfocitos T CD3+CD8+ (Tabla 29), cuando se usó electroporación junto con la composición inmunogénica formulada con bupivacaína para inmunizar al grupo 3cE. En este grupo, el número de linfocitos en cada una de estas categorías fue significativamente elevado durante todo el desarrollo del estudio.

Los pesos corporales de los animales usados en el estudio se controló semanalmente. Los pesos corporales (kg) se indicaron como el peso corporal medio ± error típico, Véase la Tabla 31,

15 **Tabla 31: Peso corporal (kg) de los macacos inmunizados con vacunas de ADN multiplasmídico con y sin electroporación**

Semana								
Grupo ID	-2	0	2	4	6	8	10	16
2d	3,74 ± 0,27	3,63 ± 0,27	3,84 ± 0,29	3,93 ± 0,28	3,98 ± 0,29	4,16 ± 0,29	4,00 ± 0,28	4,05 ± 0,28
3a	3,63 ± 0,19	3,56 ± 0,19	3,74 ± 0,22	3,75 ± 0,22	3,83 ± 0,25	3,98 ± 0,23	3,85 ± 0,25	3,96 ± 0,25
3c	3,70 ± 0,23	3,65 ± 0,20	3,87 ± 0,24	3,97 ± 0,25	4,16 ± 0,25	4,26 ± 0,29	4,14 ± 0,26	4,28 ± 0,30
3cE	3,67 ± 0,23	3,91 ± 0,23	4,03 ± 0,28	3,99 ± 0,26	4,04 ± 0,28	4,12 ± 0,25	4,06 ± 0,27	4,14 ± 0,30
4a	3,67 ± 0,19	3,72 ± 0,21	3,83 ± 0,22	3,77 ± 0,19	3,85 ± 0,18	3,71 ± 0,18	3,72 ± 0,14	¹ nr
control	3,61 ± 0,23	3,66 ± 0,20	3,91 ± 0,18	4,03 ± 0,19	4,15 ± 0,18	4,24 ± 0,19	4,21 ± 0,20	4,29 ± 0,21

* Los pesos corporales (kg) se indican como peso corporal medio ± error típico.
¹nr, no realizado

20 Finalmente, este análisis indica que la inmunización multiplasmídica con los plásmidos y las composiciones inmunogénicas descritos en la Tabla 7 tampoco produjo ningún efecto adverso sobre el peso corporal (Tabla 31) de los animales usados en este estudio.

Ejemplo 13. Estudios de inmunización Murina usando las composiciones inmunogénicas que comprenden cuatro plásmidos cada uno con una sola unidad transcripcional.

25 Los ejemplos anteriores sugieren que en situaciones en las que la respuesta inmunitaria total debe maximizarse entonces puede ser ventajoso el uso de una composición inmunogénica basada en una combinación de plásmidos que tienen una sola unidad transcripcional que expresa un solo antígeno por plásmido. En este ejemplo, se realizaron estudios de inmunización murina para comparar la funcionalidad inmunogénica de las composiciones

5 inmunogénicas basadas en cuatro plásmidos con composiciones inmunogénicas basadas en tres plásmidos. Mas particularmente, la funcionalidad inmunogénica de una composición inmunogénica basada en cuatro plásmidos individuales, que dirigían la expresión de seis genes del VIH-1, incluyendo gag, pol, env, y solo una fusión de genes nef-tat-vif, se comparó con las composiciones inmunogénicas basadas en tres plásmidos individuales que dirigían la expresión de seis genes del VIH-1 incluyendo env, una fusión de genes gag-pol y una segunda fusión de genes nef-tat-vif. La funcionalidad inmunogénica se evaluó como la capacidad relativa de las diversas composiciones inmunogénicas basadas en ADN de tres y cuatro plásmidos para suscitar respuestas inmunitarias mediadas por células específicas de antígenos múltiples en ratones Balb/c. Los genes y las secuencias del VIH se describen en el Ejemplo 1. Las composiciones inmunogénicas de tres plásmidos de los grupos 3a y 3c fueron las mismas que las descritas en los Ejemplos 8 y 9. Véanse las Tablas 1 y 32.

Composiciones inmunogénicas e inmunización.

15 Los vectores de expresión de ADN plasmídico que codifican gp160 de env, p55 de gag, pol (o una fusión gag-pol), o una proteína de función nef-tat-vif del VIH se usaron como composiciones inmunogénicas experimentales, y la estructura vacía del vector de expresión se usó como un vector de composición inmunogénica de control. Véase la Tabla 32 a continuación para el diseño del estudio. La expresión de los genes del VIH por los diversos vectores de expresión se confirmó por transferencia de Western después de transfección transitoria de células de rabdosarcoma (RD) humano. Véanse los Ejemplos 4-7.

20 El grupo 3a tiene tres plásmidos cada uno con una sola unidad transcripcional pero en la que dos de los antígenos son proteínas de fusión (gag-pol y nef-tat-vif). El grupo 3c también tiene tres plásmidos pero en el que dos de los plásmidos tiene una sola unidad transcripcional y el tercer plásmido tiene dos unidades transcripcionales completas. Véase la Tabla 32. Solamente uno de los antígenos se expresa como una proteína de fusión (nef-tat-vif). El grupo 4a tiene cuatro plásmidos cada uno con una sola unidad transcripcional, pero en el que solo uno de los antígenos era una proteína de fusión (nef-tat-vif).

25 El adyuvante usado para estos estudios también se administró mediante un ADN plasmídico. En este ejemplo, todos los animales se co-inyectaron con 25 µg del plásmido nº 212 que codifica los genes p35 y p40 de la IL-12 murina y que expresa la IL-12 murina. Véase la Tabla 1.

30 Los ratones Balb/c se inmunizaron por vía intramuscular con dosis de ADN de 100 µg total como se indica en la Tabla 32. En todos los casos, las composiciones inmunogénicas se formularon con bupivacaina al 0,25 % y se inyectaron en los músculos del cuadriceps en un volumen de 100 µl. Diez días después de la segunda inmunización, los animales se sacrificaron y el suero y los bazos se aislaron para inmunoensayos. Los bazos se usaron para medir las células secretoras de IFN-gamma específicas de antígeno usando ensayos ELISPOT como se describe a continuación.

Animales

35 Para estos estudios se usaron ratones hembra Balb/c de 4/6 semanas de vida. Los ratones se mantuvieron de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (National Research Council, National Academic Press, Washington, DC, 1996). Además, los procedimientos para el uso y cuidado de los ratones se aprobaron por Wyeth Research's Institutional Animal Care and Use Committee.

Tabla 32. Diseño de estudio Murino – dos inmunizaciones

¹ Grupo N°	Plásmido N°	Descripción del plásmido	ADN Total (ug)	N° de ratón	Pauta de inmunización (semana)
3a	111	CMVH-gag/pol	33	8	0 - 3
	104	CMVH -ntv	33		
	101	CMVH -env	33		
3c	102	CMVH -gag	33	8	0 - 3
	103	CMVH -pol	33		
	202	CMVH -ntv, CMVS-env	33		

(continuación)

Grupo N°	Plásmido N°	Descripción del plásmido	ADN Total (ug)	N° de ratón	Pauta de inmunización (semana)
4a	101	CMVH-env	25	8	0 - 3
	102	CMVH -gag	25		
	103	CMVH -pol	25		
	104	CMVH -ntv	25		
5	001	control vectorial	100	4	0 - 3

¹Los grupos 3a y 3c utilizan las mismas composiciones inmunogénicas que las de la Tabla 33.

Los datos mostrados en la Tabla 33 indican que aumentando de 3 a 4 el número de plásmidos que expresan antígenos en la composición inmunogénica no se produce ningún aumento drástico en la respuesta inmunitaria contra proteínas del VIH. Véase la Tabla 33.

5

Tabla 33. Respuestas inmunitarias Murinas después de dos inmunizaciones

Grupo ID	Respuesta específica de gag*	Respuesta específica de pol	Respuesta específica de env	Respuesta específica de ntv#	Respuesta específica de VIH Total
Control	3	0	9	1	13
3a	163	247	1564	116	2090
3c	436	1155	671	83	2345
4a	294	662	1150	123	2229

*Las respuestas ELISPOT de IFN-gamma específicas de antígeno se indican como las células formadoras de manchas (numero de CFM/10⁶ esplenocitos) que excretan interferón gamma por 10⁶ esplenocitos.

ntv #, proteína de fusión nef-tat-vif

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Wyeth Sidhu, Maninder K. Egan, Michael 1 Israel, zimra Eldridge, John
- <120> PLÁSMIDO QUE TIENE TRES UNIDADES TRANSCRIPCIONALES COMPLETAS Y COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS PARA INDUCIR UNA RESPUESTA INMUNITARIA CONTRA EL VIH
- 15 <130> AM101565
- <160> 6
- 20 <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- <211> 42
- <212> PRT
- 25 <213> Homo sapiens
- <400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

5 <210> 2
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

10 <400> 2
 ttttt 6
 <210> 3
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

15 <220>
 <221> misc_difference
 <222> (1)..(1)
 <223> Mutación a través de la cual se permite la lectura

20 <220>
 <221> misc_difference
 <222> (4)..(4)
 <223> Mutación a través de la cual se permite la lectura

25 <220>
 <221> misc_difference
 <222> (6)..(6)
 <223> Mutación a través de la cual se permite la lectura

30 <400> 3
 ctctg 6

35 <210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

40 <400> 4

Lys Gly Arg Pro
 1

45 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <400> 5

50 Asp Arg Gln Gly Thr Val Ser Phe Asn Phe
 1 5 10

<210> 6
 <211> 4

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

<400> 6

5

Pro Gln Ile Thr
1

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica para su uso en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en un huésped vertebrado, consistiendo dicha composición inmunogénica en:
 - 5 (a) un primer plásmido de ADN que consiste en una sola unidad transcripcional que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión gag-pol del VIH, en la que dicha única unidad transcripcional está unida operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación;
 - (b) un segundo plásmido de ADN que consiste en:
 - 10 (i) una primera unidad transcripcional que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión nef-tat-vif del VIH unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un primer promotor y una primera señal de poliadenilación;
 - (ii) una segunda unidad transcripcional que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de envuelta del VIH unido operativamente a elementos reguladores que incluyen un segundo promotor y una segunda señal de poliadenilación; en la que cada uno de dichos primer y segundo promotores derivan de diferentes unidades transcripcionales; y en la que cada una de dichas primera y segunda señales de poliadenilación derivan de diferentes unidades transcripcionales; y en la que el sentido de la transcripción de dicha primera unidad transcripcional está en el sentido opuesto al sentido de la transcripción de dicha segunda unidad transcripcional; o en la que el sentido de la transcripción de dicha primera unidad transcripcional está en el mismo sentido que el sentido de la transcripción de dicha segunda unidad transcripcional y dichas primera y segunda unidades transcripcionales están separadas por una región espaciadora de al menos un par de kilobases;
 - (c) un tercer plásmido de ADN que consiste en un ADN plasmídico que codifica un adyuvante; y
 - 25 (d) al menos uno de un diluyente, vehículo o agente facilitador de la transfección farmacéuticamente aceptables.
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que dicho agente facilitador de la transfección es la bupivacaina.
3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que dichos promotores se seleccionan del grupo que consiste en el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMVH), el promotor del citomegalovirus simio (CMVS), el promotor de citomegalovirus murino (CMVM), el promotor 1 asociado a latencia (LAP1) del virus del herpes simple (VHS), el promotor del virus simio 40, el promotor del factor de elongación humano 1 alfa y el promotor de desmina específico de células musculares humanas.
4. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que dichas señales de poliadenilación se seleccionan del grupo constituido por la señal poli(A) de la beta-globina de conejo, la poliA sintética, la poliA de la timidina quinasa del VHS, la poliA de la alfa-globina humana, la poliA de SV40, la poliA de la beta-globina humana, la poliA del poliomavirus y la poliA de la hormona del crecimiento bovina.
- 35 5. La composición inmunogénica de la reivindicación 3, en la que dicho promotor sobre dicho primer plásmido es el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMVH).
6. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, en la que dicha señal de poliadenilación sobre dicho primer plásmido es la señal de poliadenilación poliA de la hormona del crecimiento bovina.
- 40 7. La composición inmunogénica de la reivindicación 3, en la que dicho promotor sobre dicho segundo plásmido es el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMVH).
8. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, en la que dicha primera señal de poliadenilación sobre dicho segundo plásmido es la señal de poliadenilación poliA de SV40.
- 45 9. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que dicho polipéptido de fusión nef-tat-vif del VIH es una proteína de fusión nef, tat, y vif (NTV) expresada a partir de una fusión de los genes nef, tat y vif (ntv) del VIH.
10. La composición inmunogénica de la reivindicación 3, en la que dicho segundo promotor sobre dicho segundo plásmido es el promotor del citomegalovirus simio (CMVS).
- 50 11. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, en la que dicha segunda señal de poliadenilación sobre dicho segundo plásmido es la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (HCB).
12. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que dicho tercer plásmido de ADN codifica un adyuvante de IL-12.

13. El uso de una composición inmunogénica, como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la preparación de un medicamento para inmunizar a un huésped vertebrado contra antígenos seleccionados.

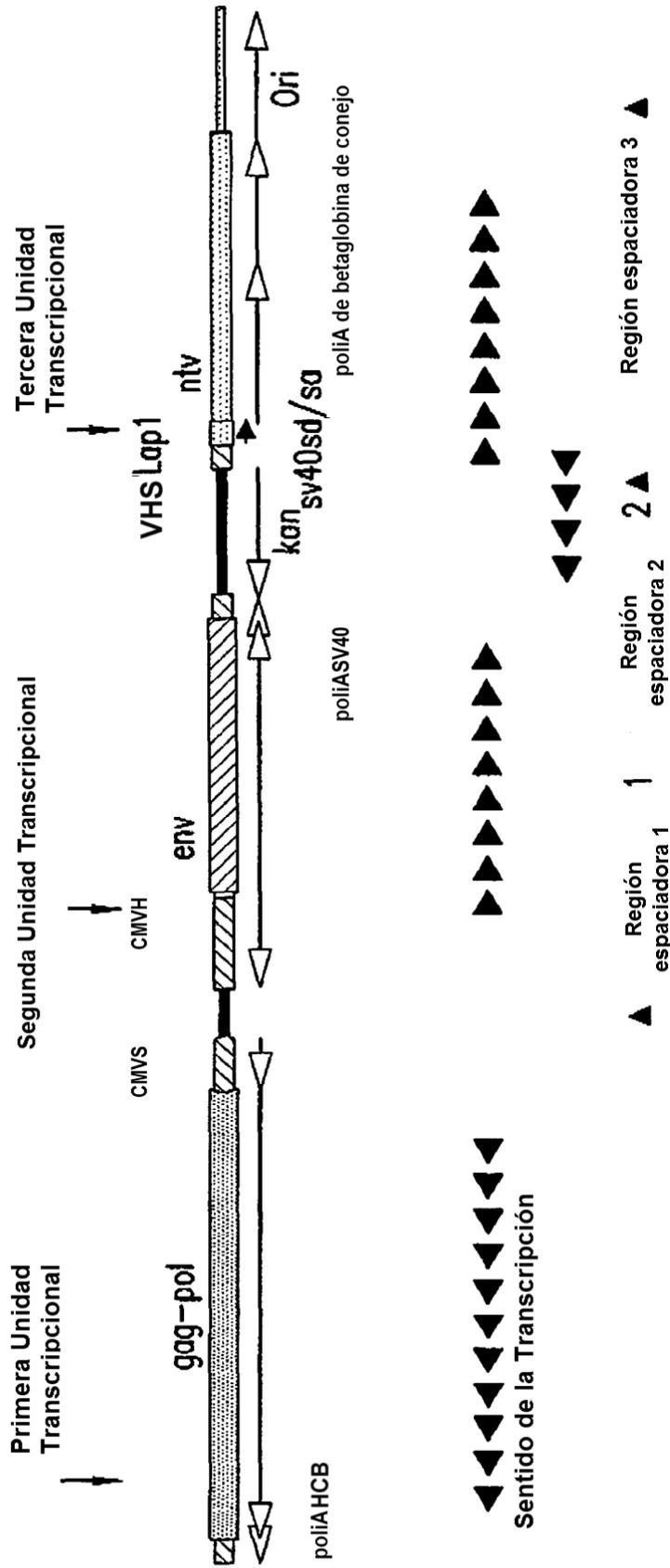


FIG.1

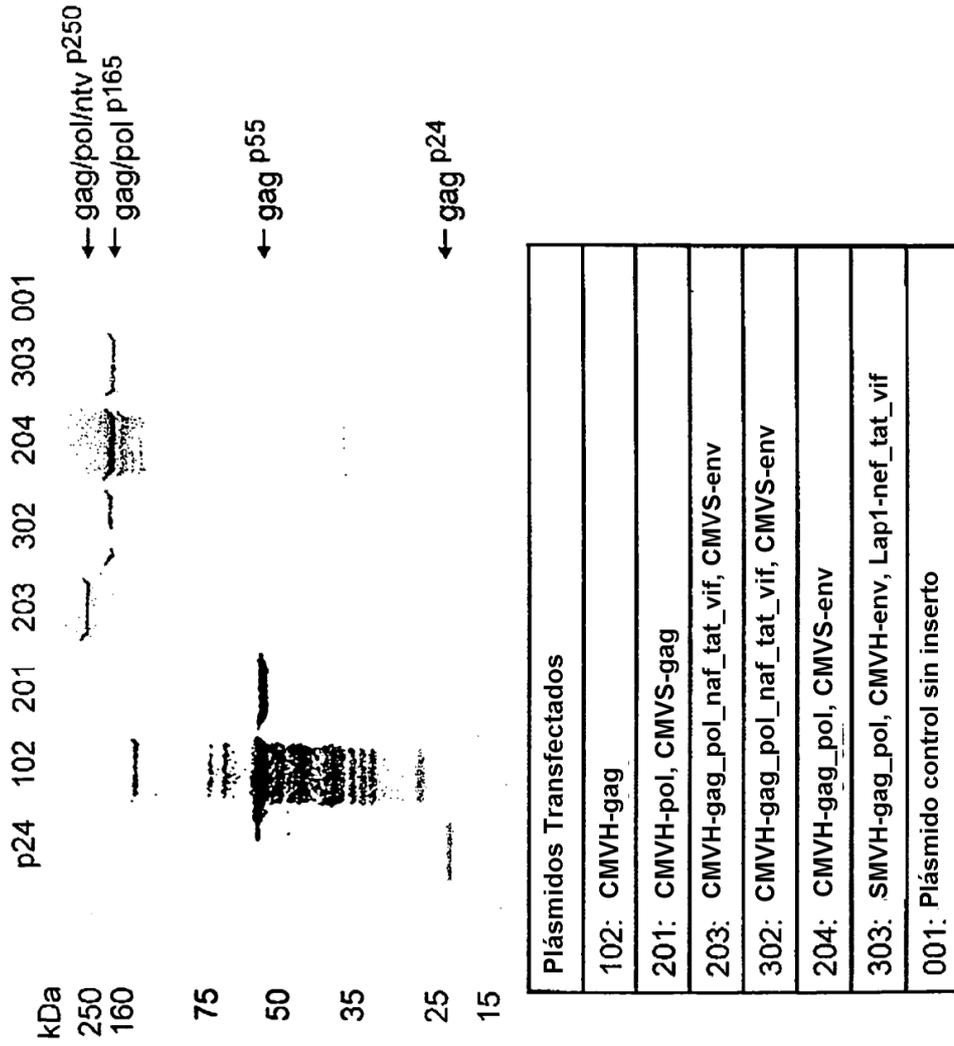


FIG.2

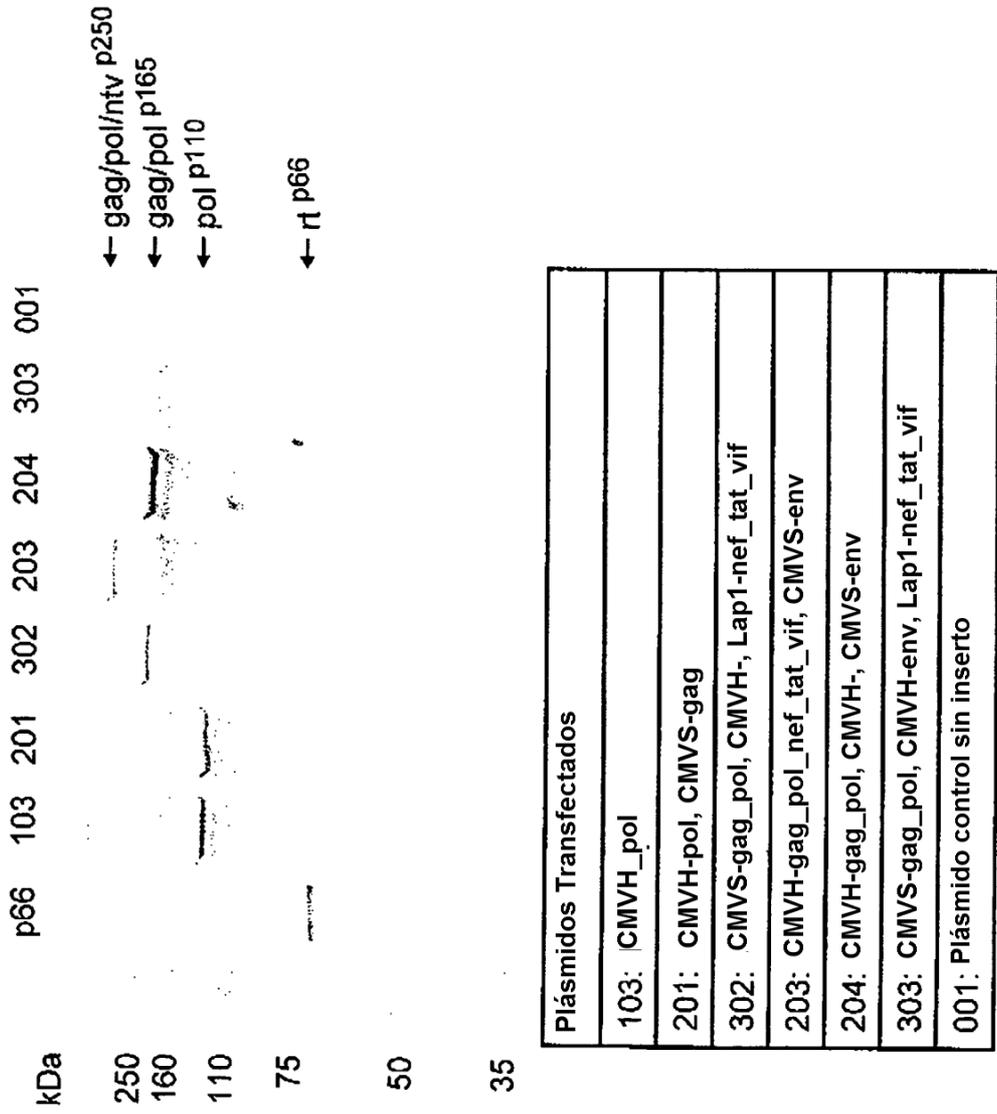
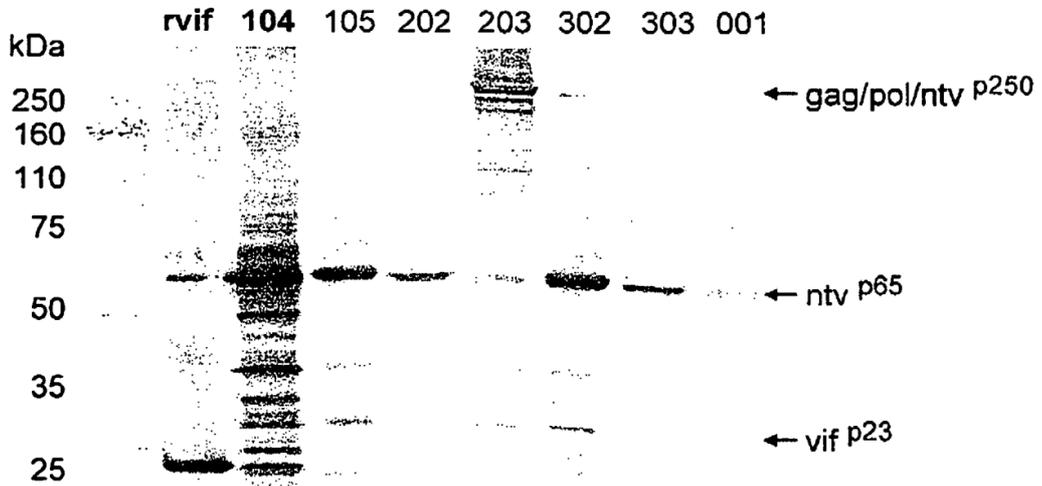
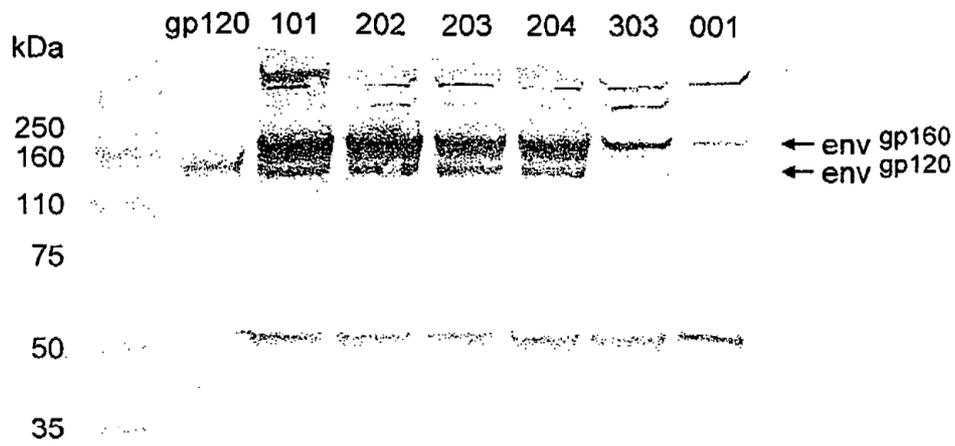


FIG.3



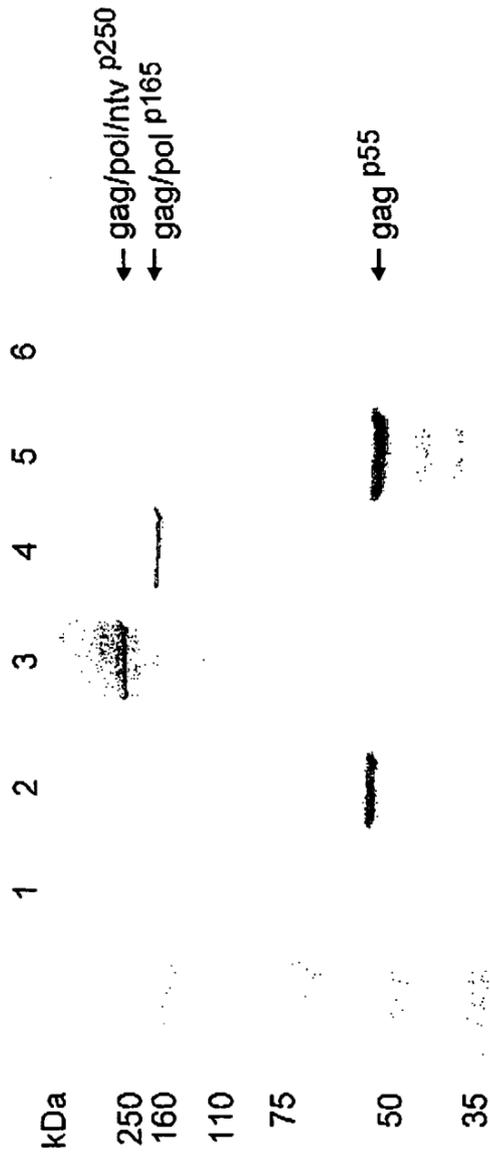
Plásmidos Transfectados
104: CMVH-ntv
105: Lap1-ntv
202: CMVH-ntv, CMVS-env
203: CMVH-gag/pol/nef/tat/vif, CMVS-env
302: CMVS-gag/pol, CMVH-, Lap1-nef/tat/vif
303: CMVS-gag/pol, CMVH-env, Lap1-nef/tat/vif
001: Plásmido control sin inserto

FIG.4



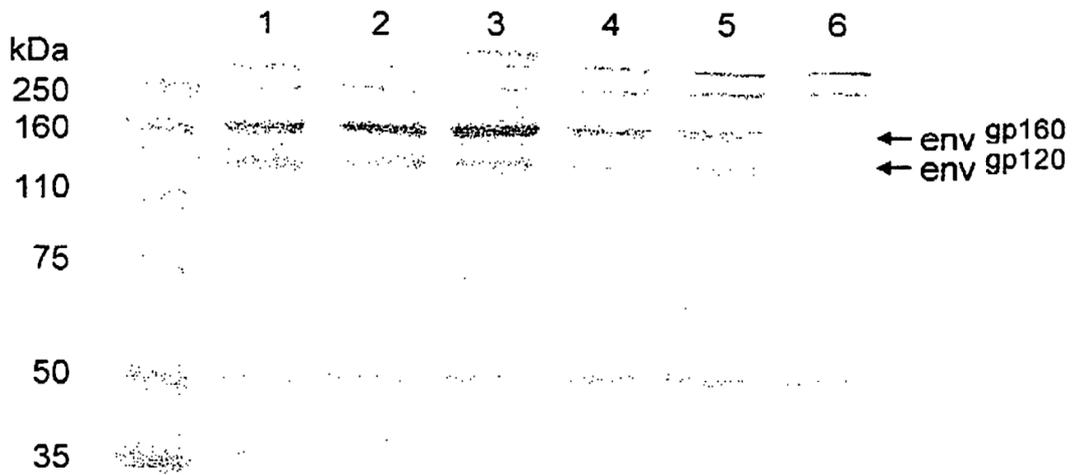
Plásmidos Transfectados
101: CMVH-env
202: CMVH-ntv, CMVS-env
203: CMVH-gag/pol/nef/tat/vif, CMVS-env
204: CMVH-gag/pol, CMVS-env
303: CMVS-gag/pol, CMVH-env, Lap1-nef/tat/vif
001: Plásmido control sin inserto

FIG.5



Carril	Combinaciones de Plásmidos Transfectados
1	205(gag/pol) + 101(env) + 104(ntv)
2	201(gag/pol) + 202(env, ntv)
3	203(gag/pol/ntv, env)
4	303(gag/pol, env, ntv)
5	101(env) + 102(gag) + 103(pol) + 104(ntv)
6	001(control)

FIG.6



Carril	Combinaciones de Plásmidos
1	205(gag/pol) + 101(env) + 104(ntv)
2	201(gag/pol) + 202(env, ntv)
3	203(gag/pol/ntv, env)
4	303(gag/pol, env, ntv)
5	101(env) + 102(gag) + 103(pol) + 104(ntv)
6	001(control)

FIG.7

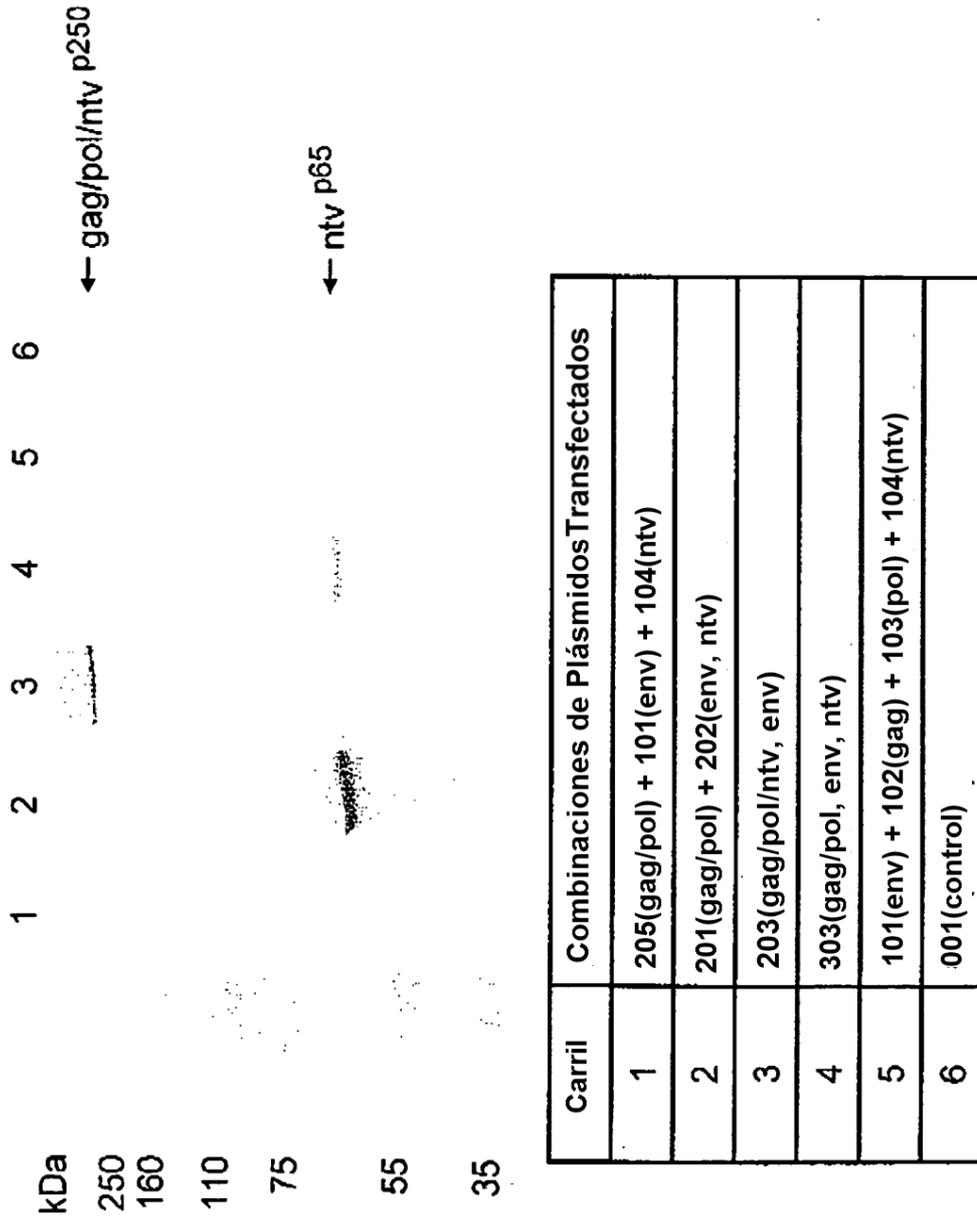


FIG.8

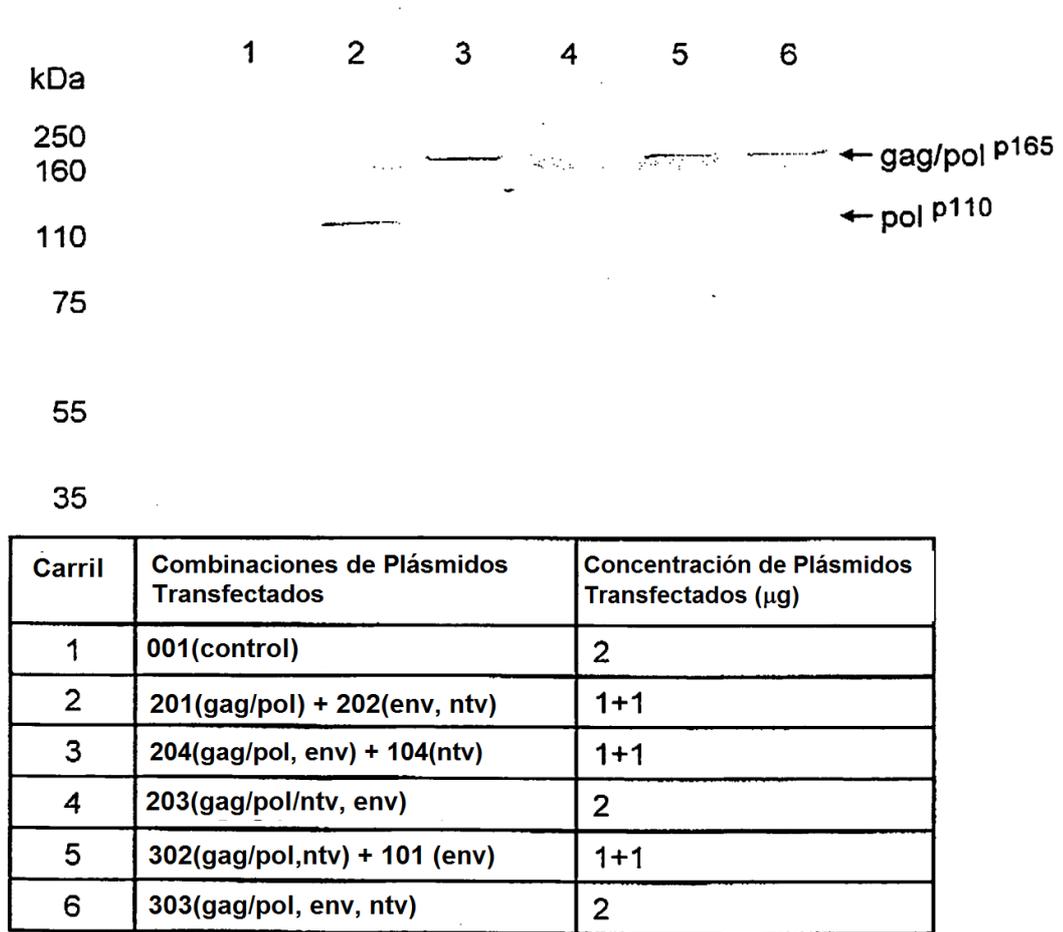


FIG.9

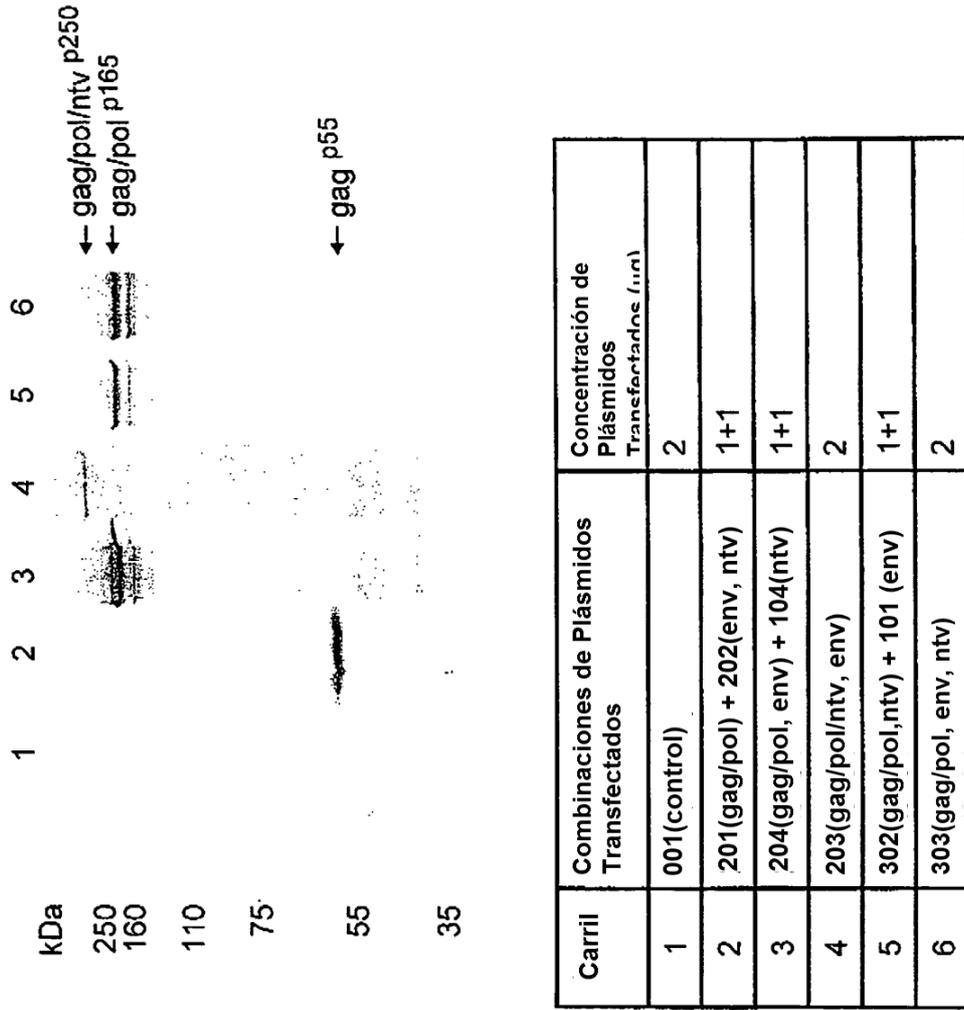
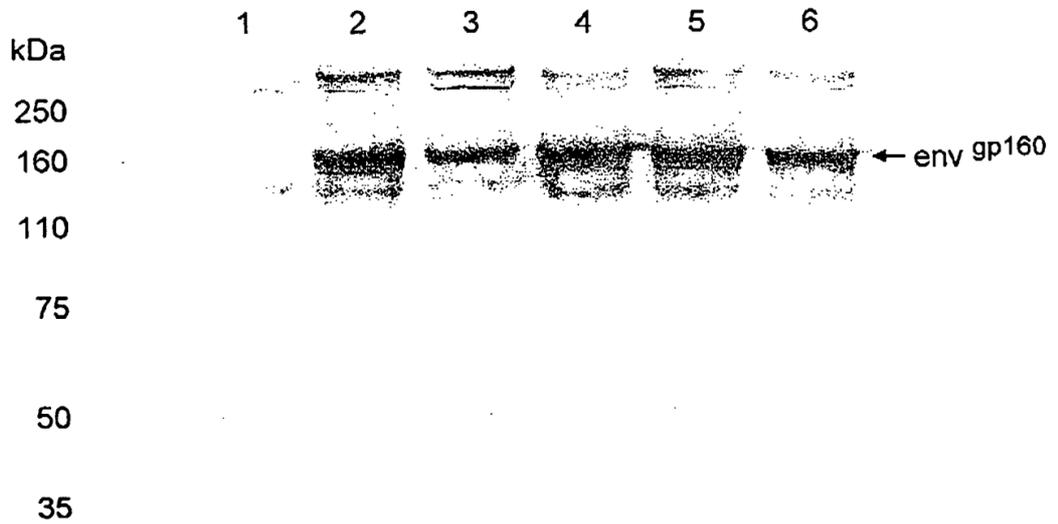
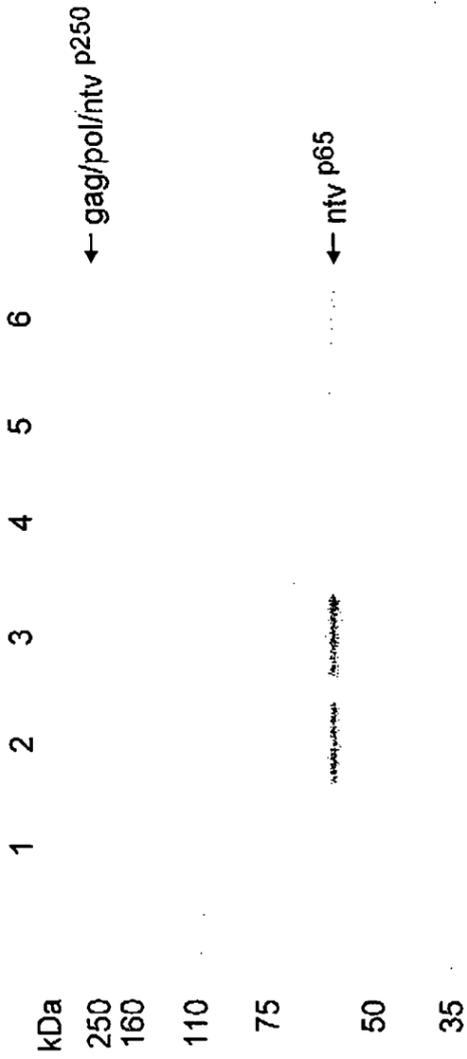


FIG.10



Carril	Combinaciones de Plásmidos Transfectados	Concentración de Plásmidos Transfectados (μg)
1	001(control)	2
2	201(gag/pol) + 202(env, ntv)	1+1
3	204(gag/pol, env) + 104(ntv)	1+1
4	203(gag/pol/ntv, env)	2
5	302(gag/pol,ntv) + 101 (env)	1+1
6	303(gag/pol, env, ntv)	2

FIG. 11



Carril	Combinaciones de Plásmidos Transfectados	Concentración de Plásmidos Transfectados (µM)
1	001(control)	2
2	201(gag/pol) + 202(env, ntv)	1+1
3	204(gag/pol, env) + 104(ntv)	1+1
4	203(gag/pol/ntv, env)	2
5	302(gag/pol,ntv) + 101 (env)	1+1
6	303(gag/pol, env, ntv)	2

FIG.12