

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 096**

21 Número de solicitud: 201490077

51 Int. Cl.:

C12N 5/0784 (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

18.01.2013

30 Prioridad:

20.01.2012 EP 12382016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.06.2015

71 Solicitantes:

LABORATORIOS DEL DR. ESTEVE, S.A. (50.0%)

Avda. Mare de Déu de Montserrat, 221

08041 Barcelona ES y

FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT DE RECERCA DE

LA SIDA - CAIXA (50.0%)

72 Inventor/es:

BUZÓN, M^a José y

MARTÍNEZ PICADO, Javier

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **INMUNÓGENOS DE VIH-1 DEFICIENTES EN INTEGRASA Y MÉTODOS PARA CARGAR CÉLULAS DENDRÍTICAS CON DICHS INMUNÓGENOS**

57 Resumen:

Inmunógenos de VIH-1 deficientes en integrasa y métodos para cargar células dendríticas con dichos inmunógenos.

La presente invención se refiere a un método para obtener una célula dendrítica cargada con antígeno *in vitro* que comprende poner en contacto una célula dendrítica inmadura con un inmunógeno, preferiblemente un inmunógeno de VIH, y simultáneamente, durante al menos parte de dicho paso, colocar dicha célula dendrítica inmadura en condiciones adecuadas para la maduración que comprenden la incubación de dicha célula dendrítica con un medio que comprende un agente de maduración de células dendríticas seleccionado entre el ligando de TLR4, LPS, y una mezcla de citocinas proinflamatorias seleccionadas entre IL-1 β , IL-6, TNF. TNF- α , IL-18, IL-11, IL-27, IL-1, gp130 e INF- α . La invención se refiere también a inmunógenos de VIH-1 que carecen de una proteína integrasa funcional.

ES 2 537 096 A2

DESCRIPCIÓN

INMUNÓGENOS DE VIH-1 DEFICIENTES EN INTEGRASA Y MÉTODOS PARA CARGAR CÉLULAS DENDRÍTICAS CON DICHOS INMUNÓGENOS

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere a métodos para obtener una célula presentadora de antígeno cargada con antígeno, en particular una célula dendrítica cargada con un inmunógeno de VIH-1. La invención también se refiere a inmunógenos de VIH-1 que carecen de una proteína integrasa funcional y a los usos de los mismos.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las células dendríticas (CD) son las células presentadoras de antígeno más potentes en el sistema inmune, que unen la inmunidad innata y adaptativa. Capturan patógenos en la mucosa y después migran al tejido linfoide secundario, donde adquieren el fenotipo maduro requerido para inducir eficazmente respuestas inmunes adaptativas. Después de alcanzar las áreas de células T de los ganglios linfáticos, las CD maduras pueden presentar péptidos derivados de patógenos en asociación con moléculas del sistema de antígeno leucocítico humano (HLA) a células T indiferenciadas. El sistema HLA es el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en seres humanos. Este proceso inicia una respuesta inmune celular que implica células auxiliares T CD4+, linfocitos T citotóxicos CD8+ (LTC) y una respuesta inmune humoral con la activación de células B. No obstante, también se ha propuesto que las CD contribuyen a la propagación de VIH-1 durante la exposición a VIH-1 *in vivo*. Las CD están entre las primeras células diana que encuentran y son infectadas por VIH-1, ya que son abundantes en los sitios más comunes para la entrada del virus tal como las mucosas genital y anal. Desde aquí se mueven a los tejidos linfoides donde interaccionan e infectan células T CD4+, la diana principal de VIH-1. Véase, Granelli-Piperno A, *et al.*, J. Virol. 1998; 72:2733-2737.

Varios trabajos han demostrado que tras la maduración, las CD mejoran su eficacia para transmitir VIH-1 mediante *trans*-infección, un proceso donde las CD retienen y transfieren viriones infecciosos sin llegar a infectarse ellas mismas. En general, todas las señales de maduración aumentan los marcadores fenotípicos para moléculas de HLA y coestimuladoras, pero la capacidad funcional de las CD maduras resultantes varía. Por

consiguiente, dependiendo de su estado de maduración cualitativo, las CD son capaces de polarizar varias respuestas de células T.

La capacidad de CD maduras de transferir VIH también está muy influida por los estímulos de maduración y los subconjuntos de CD resultantes. Sin embargo, estudios previos
5 han observado que las CD maduras con lipopolisacárido (LPS), tanto CD derivadas de monocitos (CDm) como CD mieloides derivadas de sangre, capturan cantidades mayores de VIH-1 comparadas con CD derivadas de monocitos inmaduras (CDi) o CD mieloides inmaduras. También se ha encontrado que esto se correlaciona con una mayor capacidad para transferir VIH-1 a células diana susceptibles.

10 La maduración con LPS de CD también aumenta la captura de exosomas, vesículas celulares secretadas de origen endocítico con un papel importante en comunicación intercelular. Los exosomas y VIH-1 están bioquímicamente relacionados, con similitudes en tamaño, composición, biogénesis y liberación celular. Además, se ha descrito que los exosomas y VIH-1 usan una ruta de entrada idéntica en CD maduras con LPS,
15 colocándose en el mismo compartimento intracelular CD81+. Por tanto, varias líneas de evidencia sugieren que las partículas de VIH-1 pueden explotar la ruta de diseminación exosoma-antígeno intrínseca para que CD maduras medien la *trans*-infección de linfocitos T. También se ha mostrado que los exosomas contribuyen al intercambio de antígeno y activación de células T.

20 Las CD pueden desempeñar un papel dual en la infección de VIH-1: aumentan la diseminación de VIH-1 al tiempo que desencadenan una respuesta adaptativa contra la infección vírica. Aunque está bien documentado que la mayor captura vírica por las CD maduras con LPS produce una *trans*-infección aumentada a células diana, se sabe poco sobre las capacidades presentadoras de antígeno de este subconjunto de CD.

25 A pesar de lo anterior, existe una necesidad larga y continua en la técnica para inmunógenos de VIH y métodos más eficaces para cargar células dendríticas con inmunógenos, particularmente con inmunógenos de VIH, que pueda apoyar mejor la preparación de vacunas terapéuticas de VIH autólogas más seguras y más eficaces.

30 RESUMEN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método, de aquí en adelante denominado el “primer método de la invención”, para obtener una célula presentadora de antígeno cargada con antígeno *in vitro* que comprende poner en contacto una célula dendrítica

inmadura con un inmunógeno que comprende dicho antígeno en condiciones adecuadas para el procesamiento del inmunógeno y presentación por la célula presentadora de antígeno.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a una célula presentadora de antígeno cargada con antígeno obtenible por el método según el primer aspecto de la invención.

5 En aspectos adicionales, la invención se refiere a una célula presentadora de antígeno según la invención para su uso en medicina así como para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad que requiere una respuesta inmune contra el antígeno que está cargado en la célula presentadora de antígeno.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica o una vacuna que comprende una célula presentadora de antígeno según la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a una partícula vírica de VIH-1 que carece de una proteína integrasa funcional que contiene una deleción en la proteína integrasa o carece de la proteína integrasa.

15 En aspectos adicionales, la invención se refiere a un genoma vírico de VIH-1 caracterizado por carecer parcial o completamente de la región codificante de integrasa, un vector que comprende el genoma vírico de VIH-1 caracterizado por carecer parcial o completamente la región codificante de integrasa o una célula que comprende un genoma vírico de VIH-1 caracterizado por carecer parcial o completamente de la región codificante de integrasa o un vector que comprende un genoma vírico de VIH-1 caracterizado por carecer
20 parcial o completamente de la región codificante de integrasa para su uso en medicina así como para su uso en el tratamiento o prevención de una infección por VIH o una enfermedad asociada con una infección por VIH.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a un método (de aquí en adelante denominado “segundo método de la invención”) para obtener una célula dendrítica cargada con un inmunógeno de VIH-1 *in vitro* que comprende cargar una célula dendrítica con una partícula vírica de VIH que carece de una proteína integrasa funcional.

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula dendrítica cargada con una partícula vírica de VIH-1 que carece de una proteína integrasa funcional obtenible por el segundo método de la invención.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a una célula dendrítica según la invención para su uso en medicina así como para su uso en el tratamiento o prevención de una infección por VIH o una enfermedad asociada con una infección por VIH.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica o una vacuna que comprende una célula dendrítica según la invención.

DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS

5

El plásmido pNL4-3 Δ IN (pNL4-3-Delta-Integrasa) se depositó el 22 de julio, 2010, con el número de acceso DSM 23817 en la DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH), Inhoffenstraße 7 B, D-38124 Braunschweig, República Federal de Alemania.

10

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Captura vírica y transmisión vírica de VIH_{NL4-3} y VIH_{NL4-3 Δ IN} en diferentes condiciones celulares. Panel izquierdo: Protocolo para el ensayo de captura de VIH-1 de células dendríticas (CD) completamente maduras que se maduraron con LPS (CDm LPS) o con ITIP (CDm ITIP) durante 48 horas antes de la incubación vírica; y para CD inmaduras (CDi) y CDi que se maduraron con LPS (CDi+LPS) o con ITIP (CDi+ITIP) durante la incubación vírica. Panel medio: Captura comparativa de VIH_{NL4-3} y VIH_{NL4-3 Δ IN} por cada condición celular descrita en el panel izquierdo. La determinación de VIH-1 asociado a CD por ELISA de p24^{Gag} se realizó después de 6 horas de incubación vírica a 37°C. Panel derecho: Transmisión de VIH_{NL4-3} y VIH_{NL4-3 Δ IN} capturado por cada condición celular a una línea celular indicadora TZM-bl. Los datos muestran valores medios y error estándar de la media (EEM) para tres experimentos independientes incluyendo células de al menos siete donantes diferentes. LPS: lipopolisacárido; ITIP: IL-1 β , TNF- α , IL-6 y PGE₂; RLU: unidades de luz relativas.

Figura 2. Análisis comparativo de la producción de interferón gamma (IFN- γ) por el clon de células T CD8⁺ VIH p17^{Gag}SL9 EM40-F21 y el clon de células T CD4⁺ VIH p24^{Gag} N2 en ensayos de presentación de antígeno en cada condición de células dendríticas (CD) probada en la figura 1. Panel izquierdo: Protocolo para ensayos de presentación de antígeno de HLA-I y HLA-II de CD inmaduras (CDi), CDi cultivadas con ITIP (CDi+ITIP) o con LPS (CDi+LPS) durante la incubación vírica, y CD completamente maduras cultivadas con ITIP (CDm ITIP) o con LPS (CDm LPS) durante 48 horas antes de la incubación vírica. Panel medio: Activación comparativa de CD8⁺ específicas de VIH por cada condición celular

descrita en el panel izquierdo. Panel derecho: Activación comparativa de CD4⁺ específicas de VIH por cada condición celular descrita en el panel izquierdo. Los experimentos se realizaron en triplicados y a tres relaciones diana-efector diferentes. Los paneles muestran un experimento representativo de tres que produjeron resultados similares. Los datos muestran valores medios y EEM. HLA: Antígeno leucocítico humano; LPS: lipopolisacárido; ITIP: IL-1 β , TNF- α , IL-6 y PGE₂.

Figura 3. Análisis comparativo de la producción de interferón gamma (IFN- γ) por el clon de células T CD8⁺ EM40-F21 (A) y el clon de células T CD4⁺ N2 (B) en ensayos de presentación de antígenos y el contenido intracelular de p24^{Gag} VIH_{NL4-3} en cada condición de célula dendrítica (CD) probada en la figura 2 antes de lanzar el ensayo ELISPOT. Relación entre la producción de IFN- γ por el clon de células T CD8⁺ EM40-F21 (C) y el clon de células T CD4⁺ N2 (D) en ensayos de presentación de antígenos y la expresión de HLA de clase I (C) y HLA-DR (D) en cada condición de CD probada en la figura 2 antes de lanzar el ensayo ELISPOT. Los experimentos se realizaron por triplicado para VIH_{NL4-3} y en tres relaciones diana-efector diferentes. Los paneles muestran un experimento representativo de tres que produjeron resultados similares. Los datos de la secreción de IFN- γ se tomaron de la figura 2 y muestran valores medios y EEM. Se obtuvieron resultados similares para VIH_{NL4-3 Δ IN} (datos no mostrados). HLA: Antígeno leucocítico humano.

Figura 4. Determinación del inmunofenotipo de células dendríticas inmaduras (CDi) y células dendríticas completamente maduras maduradas durante 48 horas con ITIP (CDm ITIP) o con LPS (CDm LPS). Ambos estímulos de maduración confirieron un fenotipo maduro a las CD, aumentando las moléculas de HLA de clase I y clase II (HLA-A, B, C, HLA-DR) en la superficie celular así como moléculas coestimuladoras (CD80, CD83, CD86). LPS: lipopolisacárido; ITIP: IL-1 β , TNF- α , IL-6 y PGE₂.

Figura 5. (A) Ensayo de fusión vírica de VIH_{NL4-3} y VIH_{NL4-3 Δ IN} en la línea de células T Jurkat usando viriones de VIH-1 que contenían proteína quimérica β -lactamasa-Vpr. Los experimentos se realizaron en presencia o ausencia del inhibidor de fusión C34. **(B)** Imágenes comparativas de microscopía electrónica de células dendríticas completamente maduras cultivadas con LPS (CDm LPS) expuestas a VIH_{NL4-3} (panel izquierdo) o VIH_{NL4-3 Δ IN} (panel derecho), que muestran localización de vesículas grandes similar. Las estrellas indican partículas capturadas, con la estructura densa a los electrones característica del núcleo de VIH-1.

Figura 6. Análisis comparativo de la producción de interferón gamma (IFN- γ) por el clon de células T CD8⁺ EM40-F21 cuando se estimula con células dendríticas (CD) pulsadas con VIH_{NL4-3} (A) o VIH_{NL4-3 Δ IN} (B) que expresan la variante óptima (SLYNTVATL) o de escape (SLENTIAVL) del epítipo SL9.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un método para obtener una célula presentadora de antígeno cargada con antígeno basado en cargar una célula dendrítica inmadura con un
 10 inmunógeno, preferiblemente un inmunógeno de VIH-1 deficiente en integrasa. Más preferiblemente, dicha célula se coloca simultáneamente en condiciones adecuadas para la maduración. Este método permite obtener células presentadoras de antígeno que tienen mayores capacidades de presentación de antígenos que las células obtenidas cuando el antígeno se carga en células dendríticas completamente maduras. La figura 2 muestra que las
 15 células presentadoras de antígeno de la invención producen una mayor activación de células T CD8⁺ específicas de VIH o células T CD4⁺ específicas de VIH que las células presentadoras de antígeno obtenidas por otros métodos.

La presente invención también se refiere a un inmunógeno de VIH-1 deficiente en integrasa para cargar células dendríticas. Este inmunógeno es más seguro que otros
 20 inmunógenos de VIH-1 conocidos, tal como VIH-1 inactivado completo. El uso de vacunas inactivadas de VIH se ha limitado por preocupaciones de seguridad sobre la potencial infectividad residual en el producto debido a la inactivación incompleta. Sin embargo, los inmunógenos de VIH-1 deficientes en integrasa de la invención tienen la ventaja de son incapaces de replicarse. Los ejemplos de la presente invención muestran que el inmunógeno
 25 de VIH-1 deficiente en integrasa VIH_{NL4-3 Δ IN} es capturado por CD y presentado de forma eficaz a células T CD4⁺ y CD8⁺, con la ventaja añadida de que no se produce diseminación vírica.

1. Definiciones de términos y expresiones generales

30

El término “SIDA”, como se usa en el presente documento, se refiere a la fase sintomática de la infección por VIH, e incluye tanto el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (comúnmente conocido como SIDA) como “ARC”, o complejo relacionado con

SIDA. Véase, Adler M, *et al.*, Brit. Med. J. 1987; 294: 1145-1147. Las manifestaciones inmunológicas y clínicas del SIDA se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, infecciones oportunistas y cánceres resultantes de la inmunodeficiencia.

El término “agonista del receptor de IL-1”, como se usa en el presente documento, se refiere a una citocina que actúa como un agonista del receptor de interleuquina-1 (IL-1R). Los agonistas del receptor de IL-1 incluyen, sin limitación, IL-1 α e IL-1 β .

El término “antígeno”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula o fragmento molecular que, cuando se introduce en el cuerpo, induce una respuesta inmune específica (es decir, humoral o celular) por el sistema inmune. Los antígenos tienen la capacidad de unirse al sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Los antígenos habitualmente son proteínas o polisacáridos. Los antígenos adecuados para la presente invención son partes de bacterias, virus, parásitos y otros microorganismos tales como cubiertas, cápsulas, paredes celulares, flagelos, fimbrias y toxinas. Los ejemplos de antígenos según la invención incluyen antígenos de picornavirus, coronavirus, togavirus, flavivirus, rhabdovirus, paramixovirus, ortomixovirus, bunyavirus, arenavirus, reovirus, retrovirus, papilomavirus, parvovirus, herpesvirus, poxvirus, hepadnavirus y familias de virus espongiiformes; o de otros patógenos tales como tripanosomas, gusanos planos, gusanos redondos, helmintos o malaria. Los ejemplos de antígenos víricos adecuados son, sin limitación: antígenos retrovíricos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) incluyendo los productos génicos de los genes *gag*, *pol*, *env* y *nef*, y otros componentes de VIH; antígenos víricos de hepatitis, tales como las proteínas S, M y L del virus de la hepatitis B, el antígeno pre-S del virus de la hepatitis B y otras hepatitis (por ejemplo, hepatitis A, B y C, componentes víricos tal como el ARN vírico de la hepatitis C); antígenos víricos de la gripe, tal como hemaglutinina y neuraminidasa y otros componentes víricos de la gripe; antígenos víricos del sarampión, tal como la proteína de fusión del virus del sarampión y otros componentes del virus del sarampión; antígenos víricos de la rubeola, tales como las proteínas E1 y E2 y otros componentes del virus de la rubeola; antígenos rotavíricos, tal como VP7sc y otros componentes rotavíricos; antígenos de citomegalovirus, tal como la glicoproteína B de la envuelta y otros componentes antigénicos de citomegalovirus; antígenos del virus respiratorio sincitial, tal como la proteína de fusión RSV, la proteína M2 y otros componentes antigénicos del virus respiratorio sincitial; antígenos víricos del herpes simple, tales como proteínas inmediatas tempranas, glicoproteína D y otros componentes antigénicos del virus del herpes simple; antígenos víricos varicela zoster, tales como gpI, gpII y otros componentes

antigénicos víricos de varicela zoster; antígenos víricos de la encefalitis japonesa, tales como las proteínas E, M-E, M-E-NS1, NS1, NS1-NS2A, 80 por ciento de E y otros componentes antigénicos víricos de la encefalitis japonesa; antígenos víricos de la rabia, tal como la glicoproteína de la rabia, nucleoproteína de la rabia y otros componentes antigénicos víricos de la rabia. Véase, Fields B, Knipe D, Eds., “Fundamental Virology”, 2ª Ed. (Raven Press, Nueva York, NY, EE UU, 1991) para ejemplos adicionales de antígenos víricos.

El término “célula presentadora de antígeno cargada con antígeno”, como se usa en el presente documento, se refiere a una célula dendrítica con la capacidad para presentar un antígeno que ha sido procesado por dicha célula.

El término “terapia antirretroviral” o “ART”, como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de uno o más fármacos antirretrovirales para inhibir la replicación del VIH. Típicamente, ART implica la administración de al menos un agente antirretroviral (o, comúnmente, una mezcla de antirretrovirales) tales como inhibidor de la transcriptasa inversa nucleosídico (por ejemplo, zidovudina (AZT), lamivudina (3TC) y abacavir), inhibidor de transcriptasa inversa no nucleosídico (por ejemplo, nevirapina y efavirenz) e inhibidor de proteasa (por ejemplo, indinavir, ritonavir y lopinavir). El término terapia antirretroviral altamente activa (“HAART”) se refiere a pautas de tratamiento diseñadas para suprimir agresivamente la replicación vírica y evolución de la enfermedad de VIH, que consisten habitualmente en tres o más fármacos diferentes, tal como, por ejemplo, dos inhibidores de transcriptasa inversa nucleosídicos y un inhibidor de proteasa.

El término “autólogo”, como se usa en el presente documento, significa que el donante y receptor de la partícula vírica de VIH-1 y la célula dendrítica es el mismo sujeto.

El término “célula”, como se usa en el presente documento, es equivalente a “célula huésped” y se pretende que se refiera a una célula en la que se ha introducido un genoma vírico, un vector o una partícula vírica de VIH-1 de la invención. Se debe entender que tales términos se refieren no solo a la célula sujeto particular sino a la progenie, o potencial progenie, de tal célula. Puesto que se pueden producir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias medioambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero se puede incluir todavía en el ámbito del término como se usa en el presente documento.

El término “comprender” o “comprende”, como se usa en el presente documento, divulga también “consistir en” según la práctica de patente generalmente aceptada.

La expresión “condiciones adecuadas para la maduración”, como se usa en el presente documento, se refiere a cultivar una célula dendrítica inmadura en condiciones adecuadas para alcanzar la maduración de dicha célula. Las condiciones adecuadas para la maduración las conoce bien el experto en la materia. Se pueden preparar células dendríticas maduras (es decir, maduras) poniendo en contacto las células dendríticas inmaduras con cantidades o concentraciones eficaces de un agente de maduración de células dendríticas. Los agentes de maduración de células dendríticas pueden incluir, por ejemplo, BCG, IFN γ , LPS, monofosforil lípido A (MPL), eritoran (CAS no. 185955-34-4), TNF α y sus análogos. Las cantidades eficaces de BCG típicamente varían desde aproximadamente 10⁵ a 10⁷ ufc por mililitro de medio de cultivo. Las cantidades eficaces de IFN γ típicamente varían desde aproximadamente 100-1000 U por mililitro de medio de cultivo. El bacilo de Calmette-Guerin (BCG) es una cepa avirulenta de *M. bovis*. Como se usa en el presente documento, BCG se refiere al BCG completo así como a constituyentes de la pared celular, lipoarabidomananos derivados de BCG y otros componentes de BCG que se asocian con la inducción de una respuesta inmune de tipo 2. El BCG opcionalmente está inactivado, tal como BCG inactivado por calor, BCG tratado con formalina, y similares. Las CD inmaduras típicamente se ponen en contacto con cantidades eficaces de BCG e IFN γ durante aproximadamente una hora hasta aproximadamente 48 horas. Los medios de cultivo adecuados incluyen AIM-V®, RPMI 1640, DMEM o X-VIVO 15™. Los medios de cultivo se pueden suplementar con aminoácidos, vitaminas, citocinas (por ejemplo, GM-CSF) o cationes divalentes, para fomentar la maduración de las células. Típicamente se usan aproximadamente 500 unidades/ml de GM-CSF.

La expresión “condiciones adecuadas para el procesamiento del inmunógeno y presentación por la célula presentadora de antígeno”, como se usa en el presente documento, se refiere a la incubación de la célula dendrítica en un medio adecuado para permitir la captura del inmunógeno y el procesamiento y presentación de dicho inmunógeno a otras células del sistema inmune.

El término “poner en contacto”, como se usa en el presente documento, se refiere a la incubación de una célula dendrítica inmadura en presencia del inmunógeno destinado para cargar en la célula dendrítica. Las CD inmaduras son capaces de capturar e internalizar dichos inmunógenos volviéndose así una célula dendrítica cargada con antígeno (también llamada célula dendrítica pulsada con antígeno). La captura de antígeno por las CD inmaduras está mediada por macropinocitosis, captura de antígeno mediada por receptor y englobe de

cuerpos apoptóticos. Preferiblemente, dicha incubación se realiza a 37°C durante 6 horas. El éxito del paso de carga del antígeno o pulso se puede ensayar lavando las células dendríticas pulsadas para eliminar los inmunógenos no capturados y lisando dichas células dendríticas pulsadas para medir el contenido intracelular de antígeno mediante un ensayo ELISA. Por ejemplo, cuando el inmunógeno es una partícula vírica de VIH, se puede ensayar el contenido intracelular en antígeno p24^{Gag}, presente en la superficie de la cápside de las partículas víricas.

El término “célula dendrítica”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier miembro de una población diversa de tipos celulares morfológicamente similares encontradas en tejidos linfoides o no linfoides. Las células dendríticas con una clase de células presentadoras de antígeno “profesionales”, y tienen una gran capacidad para sensibilizar células T restringidas en HLA. Específicamente, las células dendríticas incluyen, por ejemplo, células dendríticas linfocíticas (incluyendo células que inducen Th2 o tolerancia inmune), células dendríticas de médula ósea (generalmente células dendríticas usadas, incluyendo células dendríticas inmaduras y maduras), células de Langerhans (células dendríticas importantes como células presentadoras de antígeno en la piel), células interdigitales (distribuidas en los ganglios linfáticos y región de células T del bazo, y que se cree que funcionan en la presentación de antígeno a células T) y células dendríticas foliculares (importantes como células presentadoras de antígeno para células B). Las células dendríticas se pueden reconocer por la función, o por el fenotipo, particularmente por el fenotipo de superficie celular. Estas células se caracterizan por su morfología distintiva (tienen proyecciones como velos en la superficie celular), niveles de expresión de intermedios a altos de HLA de clase II en superficie y capacidad de presentar antígeno a células T, particularmente a células T indiferenciadas. Véase, Steinman R, *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 1991; 9:271-196. La superficie celular de las células dendríticas se caracteriza por la expresión de los marcadores de superficie celular CD1a+, CD4+, CD86+ o HLA-DR+.

El término “agente de maduración de células dendríticas”, como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto capaz de producir la maduración de la célula dendrítica cuando la célula dendrítica se incuba con dicho compuesto.

El término “precursor de célula dendrítica”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier célula capaz de diferenciarse a una célula dendrítica inmadura en presencia de una citocina apropiada (es decir, G-CSF, GM-CSF, TNF α , IL-4, IL-13, SCF (ligando de c-kit), ligando de Flt-3, o una combinación de las mismas). Ejemplos de células precursoras dendríticas incluyen, pero no están limitados a, células precursoras dendríticas mieloides,

células precursoras dendríticas linfoides y células precursoras dendríticas plasmacitoides. Los marcadores de superficie fenotípicos expresados por los varios subconjuntos de células precursoras dendríticas se conocen bien en la técnica y se puede usar para los fines de identificación, por ejemplo, por citometría de flujo o usando técnicas inmunohistoquímicas.

5 La expresión “enfermedad asociada con una infección por VIH”, como se usa en el presente documento, incluye un estado en el que el sujeto ha desarrollado SIDA, pero también incluye un estado en el que el sujeto infectado con VIH no ha mostrado ningún signo o síntoma de la enfermedad.

10 La expresión “enfermedad que requiere una respuesta inmune contra el antígeno que se carga en la célula presentadora de antígeno”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier enfermedad susceptible de que se prevenga o trate con la administración de un antígeno. Las enfermedades adecuadas incluyen, sin limitación, enfermedades infecciosas (por ejemplo, VIH) y cáncer.

15 El término “gen *gag-pol*”, como se usa en el presente documento, se refiere a un gen (gen ID: 155348) que codifica las poliproteínas Gag y Pol. La poliproteína Gag se procesa durante la maduración a MA (proteína de matriz, p17); CA (proteína de cápside, p24); SP1 (péptido espaciador 1, p2); NC (proteína de nucleocápside, p7); SP2 (péptido espaciador 2, p1) y p6. La poliproteína Pol se procesa durante la maduración a transcriptasa inversa, integrasa y proteasa de VIH. Las secuencias de los genes *gag* y *pol* encontradas en aislados de
20 VIH se pueden encontrar fácilmente (por ejemplo, bases de datos de VIH GenBank y Los Alamos).

El término “citocina que utiliza gp130”, como se usa en el presente documento, se refiere a una citocina que señala a través de receptores que contienen gp130. El componente transductor de señal glicoproteína gp130 (gp130), también llamado CD130, es una proteína
25 transmembrana que forma una subunidad de receptores de citocina de tipo I en la familia de receptores de IL-6. Las citocinas que utilizan gp130 (también conocidas como citocinas similares a IL-6) útiles en la presente invención incluyen, interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 11 (IL-11), interleuquina 27 (IL-27), factor neurotrófico ciliar (CNTF), cardiotrofina-1 (CT-1), citocina similar a cardiotrofina (CLC), factor inhibidor de leucemia (LIF), oncostatina M
30 (OSM) y proteína similar a interleuquina 6 de herpesvirus asociada a sarcoma de Kaposi (KSHV-IL6).

El término “inmunógeno de VIH”, como se usa en el presente documento, se refiere a un antígeno proteico o peptídico derivado de VIH que es capaz de generar una respuesta

inmune en un sujeto y también se refiere a una partícula vírica de VIH, dicha partícula vírica es una partícula vírica completa o una partícula vírica que carece de uno o más componentes víricos pero que mantiene la capacidad de generar una respuesta inmune. Los inmunógenos de VIH para su uso según la presente invención se pueden seleccionar de cualquier aislado de VIH (por ejemplo, cualquier aislado, cepa o clado de VIH-1, VIH-2 o VIH-3). Los aislados de VIH se clasifican ahora en subtipos genéticos discretos. Se sabe que VIH-1 comprende al menos diez subtipos (A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, PL F2, G, H, J y K). Véase, Taylor B, *et al.*, New Engl. J. Med 2008; 359(18):1965-1966. Se sabe que VIH-2 incluye al menos cinco subtipos (A, B, C, D y E). El subtipo B se ha asociado con la epidemia de VIH en hombres homosexuales y adictos de drogas intravenosas en el mundo. La mayoría de los inmunógenos de VIH-1, aislados adaptados al laboratorio, reactivos y epítomos mapeados pertenecen al subtipo B. En África subsahariana, India y China, áreas donde la incidencia de nuevas infecciones por VIH es alta, el subtipo B de VIH-1 representa solo una pequeña minoría de las infecciones, y el subtipo C de VIH-1 parece ser el subtipo infectante más común. Por tanto, en ciertas formas de realización, puede ser preferible seleccionar inmunógenos de subtipos particulares (por ejemplo, subtipo B o C de VIH-1). Puede ser deseable incluir inmunógenos de múltiples subtipos de VIH (por ejemplo, subtipos B y C de VIH-1, subtipos A y B de VIH-2, o una combinación de subtipos de VIH-1, VIH-2 o VIH-3) en una única composición inmunológica.

El término “genoma vírico de VIH-1”, como se usa en el presente documento, se refiere a la totalidad de la información hereditaria de virus VIH-1. El genoma vírico de VIH-1 está flanqueado por dos LTR y está compuesto de dos copias de ARN monocatenario positivo que codifica los nueve genes del virus. El genoma ARN de VIH-1 consiste en al menos siete marcas estructurales (LTR, TAR, RRE, PE, SLIP, CRS e INS), y nueve genes (*gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*, y algunas veces un décimo *tev*), que codifica 19 proteínas. El genoma vírico de VIH-1 comprende los siguientes genes:

- 1) *gag* (antígeno específico de grupo): codifica la poliproteína Gag, que se procesa durante la maduración a MA (proteína de matriz, p17); CA (proteína de cápside, p24); SP1 (péptido espaciador 1, p2); NC (proteína de nucleocápside, p7); SP2 (péptido espaciador 2, p1) y p6.
- 2) *pol*: codifica las enzimas víricas transcriptasa inversa, integrasa y proteasa de VIH.

- 3) *env* (de “envuelta”): codifica gp160, el precursor de gp120 y gp41, proteínas embebidas en la envuelta vírica que permiten que el virus se una a y se fusione con células diana.
- 4) Transactivadores: *tat* (por trans-activador), *rev* (por regulador de la expresión de proteína de virión), *vpr* (por proteína vírica R).
- 5) Otros reguladores: *vif* (por infectividad de virión), *nef* (por factor negativo), *vpu* (por proteína vírica U).
- 6) *tev*: este gen solo está presente en unos pocos aislados de VIH-1. Es una fusión de partes de los genes *tat*, *env* y *rev*, y codifica una proteína con algunas propiedades de *tat*, pero pocas o ninguna de las propiedades de *rev*.

El término “partícula vírica de VIH-1”, como se usa en el presente documento, se refiere a una estructura aproximadamente esférica con un diámetro de alrededor de 120 nm compuesto de dos copias de ARN monocatenario positivo que codifica los nueve genes del virus englobado por una cápside cónica compuesta de 2.000 copias de la proteína vírica p24. El ARN monocatenario está estrechamente unido a las proteínas de la nucleocápside, p7, y las enzimas necesarias para el desarrollo del virión tales como transcriptasa inversa, proteasas, ribonucleasa e integrasa. Una matriz compuesta de la proteína vírica p17 rodea la cápside asegurando la integridad de la partícula del virión. Esta está, a su vez, rodeada por la envuelta vírica que está compuesta de dos capas de moléculas grasas llamadas fosfolípidos tomadas de la membrana de una célula humana cuando una partícula de virus recién formada gema de la célula. Embebidas en la envuelta vírica hay proteínas de la célula huésped y aproximadamente 70 copias de un complejo de proteínas de VIH que sobresale a través de la superficie de la partícula vírica. Esta proteína, conocida como Env, consiste en una tapa hecha de tres moléculas llamadas glicoproteína (gp) 120, y un tallo que consiste en tres moléculas de gp41 que anclan la estructura a la envuelta vírica. Este complejo de glicoproteínas permite que el virus se una a y se fusione con células diana para iniciar el ciclo infeccioso.

El término “virus de la inmunodeficiencia humana” o “VIH”, como se usa en el presente documento se pretende que incluya VIH-1 y VIH-2. “VIH-1” significa el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1. VIH-1 incluye, pero no está limitado a, partículas víricas extracelulares y formas de VIH-1 asociadas con células infectadas por VIH-1. “VIH-2” significa el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2. VIH-2 incluye, pero no está limitado a, partículas víricas extracelulares y formas de VIH-2 asociadas con células infectadas por VIH-2. Preferiblemente, VIH es VIH-1.

El término “célula dendrítica inmadura”, como se usa en el presente documento, se refiere a una célula dendrítica que tiene capacidad de activar células T significativamente baja comparada con una célula dendrítica en un estado maduro. Específicamente, las células dendríticas inmaduras pueden tener una capacidad de presentación de antígeno que es menor de 1/2, preferiblemente menor de 1/4 de la de células dendríticas cuya maduración se ha inducido añadiendo LPS (1 µg/ml) y cultivando durante dos días. La capacidad presentadora de antígeno se puede cuantificar, por ejemplo, usando la capacidad de activación de células T alo (prueba de linfocitos mezclados: se cocultivan células T alo y células dendríticas a una relación células T:células dendríticas de 1:10, o preferiblemente a relaciones variables; se añade 3H-timidina 8 horas antes de terminar el cultivo y se evalúa la capacidad de crecimiento de células T basada en la cantidad de 3H-timidina incorporada en el ADN de las células T. Véase, Jonuleit H, *et al.*, *Gene Ther.* 2000; 7:249-254. De forma alternativa, se puede evaluar ensayando la capacidad de inducir células T citotóxicas (LTC) específicas usando un péptido, en el que se añade un péptido restringido de clase I conocido de un cierto antígeno a células dendríticas; las células dendríticas se cocultivan con células T obtenidas de sangre periférica del mismo donante sano del que se han recogido las células dendríticas (con 25 U/ml o preferiblemente 100 U/ml de IL-2 el día 3 o más tarde). Las células T preferiblemente se estimulan con células dendríticas tres veces durante 21 días, más preferiblemente se estimulan con células dendríticas dos veces durante 14 días. Las células efectoras resultantes se cocultivan durante cuatro horas con células diana marcadas con 51Cr (células tumorales positivas para péptido restringido de clase I) a una relación de 100:1 a 2,5:1 (100:1, 50:1, 25:1, 20:1, 12,5:1, 10:1, 5:1 o 2,5:1), preferiblemente a una relación de 10:1, y se cuantifica el 51Cr liberado de las células diana. Véase, Hristov G, *et al.*, *Arch. Dermatol. Res.* 2000; 292:325-332. Además, las células dendríticas inmaduras preferiblemente tienen capacidad fagocítica para antígenos, y más preferiblemente muestran expresión baja (por ejemplo, significativamente baja comparada con las CD maduras inducidas por LPS como se ha descrito anteriormente) o negativa de receptores que inducen la coestimulación para la activación de células T. Las células dendríticas inmaduras expresan marcadores de superficie que se pueden usar para identificar tales células por citometría de flujo o tinción inmunohistoquímica.

El término “inmunógeno”, como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que es capaz de provocar una respuesta inmune adaptativa si se inyecta por sí

misma. Todos los inmunógenos son también antígenos pero no todos los antígenos son inmunógenos.

El término “composición inmunogénica”, como se usa en el presente documento, se refiere a una composición que induce una respuesta inmune en un sujeto que produce anticuerpos o respuestas inmunes celulares contra un inmunógeno específico. Las composiciones inmunogénicas se pueden preparar, por ejemplo, como inyectables tal como soluciones líquidas, suspensiones y emulsiones. El término “composición antigénica” se refiere a una composición que puede ser reconocida por el sistema inmune del huésped. Por ejemplo, una composición antigénica contiene epítomos que pueden ser reconocidos por componentes humorales o celulares de un sistema inmune huésped.

El término “incubación”, como se usa en el presente documento, se refiere a mantener el cultivo de las células dendríticas en un medio de maduración durante un tiempo específico, preferiblemente durante 48 horas, hasta que la célula dendrítica inmadura se transforma en una célula dendrítica madura. El término “medio” es sustrato de maduración que comprende un medio de cultivo adecuado, uno o más agentes de maduración y, opcionalmente, otros suplementos.

El término “proteína integrasa” o “IN”, como se usa en el presente documento, se refiere al producto génico de la región *int* de un virus, particularmente del virus VIH-1, caracterizado por tener tres dominios claramente identificables; el dominio catalítico central flanqueado por los dominios N-terminal y C-terminal, el último implicado en la unión a ADN. Una única cadena polipeptídica de la mayoría de las IN retrovíticas comprende aproximadamente 290 residuos. Sin embargo, algunas variaciones importantes están presentes. Por ejemplo, la IN de PFV es significativamente más larga, comprende 392 residuos, y la IN de ASV está codificada como una proteína de 323 aminoácidos de longitud que se procesa postraduccionalmente al polipéptido final que consiste en 286 residuos, que es totalmente enzimáticamente activo. Particularmente, la integrasa del virus VIH-1 es el producto génico de la región *int* del virus, que tiene 288 aminoácidos y se designa como IN. El término “integrasa”, como se usa en el presente documento, se refiere a la forma procesada madura del polipéptido integrasa de VIH-1 definido con el número de acceso C7B8I1 en la base de datos Uniprot (publicación 14 de diciembre, 2011. Versión 18), El término integrasa de VIH-1 también se usa para referirse a la integrasa de VIH-1 de otras cepas o aislados del virus. La secuencia de ácido nucleico y aminoácidos de un gran número de integrasas de VIH-1 están fácilmente disponibles al público. Véase, bases de datos de secuencias de VIH,

<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>, enero, 2012; bases de datos y compendios de VIH Los Alamos, <http://www.hiv.lanl.gov/>, enero 2011.

El término “célula dendrítica madura”, como se usa en el presente documento, es una célula que tiene capacidad presentadora de antígeno significativamente fuerte para células T o similares comparada con una célula dendrítica en el estado inmaduro. Específicamente, las células dendríticas maduras pueden tener una capacidad presentadora de antígeno que es la mitad o más fuerte, preferiblemente equivalente o más fuerte que la capacidad presentadora de antígeno de células dendríticas en las que se ha inducido la maduración añadiendo LPS (1 µg/ml) y cultivando durante dos días. Las CD maduras muestran expresión aumentada de moléculas de superficie celular coestimuladoras y secretan varias citocinas. Específicamente, las CD maduras expresan niveles más altos de antígenos HLA de clase I y clase II (HLA-A, B, C, HLA-DR) y en general son positivas para la expresión de marcadores de superficie CD80, CD83 y CD86.

El término “medicamento”, como se usa en el presente documento, es entiende que es una composición farmacéutica, particularmente una vacuna, que comprende la composición inmunogénica de la invención.

El término “precursores monocíticos de células dendríticas” o precursores MoCD, como se usa en el presente documento, comprende monocitos que tienen el receptor de GM-CSF en su superficie y otras células precursoras mieloides que responden a GM-CSF. Las células se pueden obtener de cualquier tejido donde residen, particularmente tejidos linfoides tales como bazo, médula ósea, ganglios linfáticos y timo. También se pueden aislar precursores monocíticos de células dendríticas del sistema circulatorio. La sangre periférica es una fuente fácilmente accesible de precursores monocíticos de células dendríticas. La sangre de cordón umbilical es otra fuente de precursores monocíticos de células dendríticas.

El término “operativamente unido”, como se usa en el presente documento, significa que la secuencia de nucleótidos de interés está unida a secuencia(s) reguladora(s) de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped). Véase, Auer H, Nature Biotechnol. 2006; 24: 41-43.

Los términos “soporte farmacéuticamente aceptable”, “diluyente farmacéuticamente aceptable”, “excipiente farmacéuticamente aceptable” o “vehículo farmacéuticamente aceptable”, usados de forma intercambiable en el presente documento, se refieren a un relleno, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar de cualquier tipo

convencional sólido, semisólido o líquido no tóxico. Un soporte farmacéuticamente aceptable es esencialmente no tóxico para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación. El número y naturaleza de los soportes farmacéuticamente aceptables depende de la forma de administración deseada. Los soportes farmacéuticamente aceptables se conocen y se pueden preparar por métodos bien conocidos en la técnica. Véase, Faulí i Trillo C, “Tratado de Farmacia Galénica” (Ed. Luzán 5, S.A., Madrid, ES, 1993) y Gennaro A, Ed., “Remington: The Science and Practice of Pharmacy” 20ª ed. (Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, PA, EE UU, 2003).

El término “prevención”, como se usa en el presente documento, significa la administración de una composición inmunogénica de la invención o de un medicamento que la contiene en una fase inicial o temprana de la infección, para evitar la aparición de signos clínicos.

La expresión “mezcla de citocinas proinflamatorias”, como se usa en el presente documento, se refiere a una mezcla de dos o más citocinas que son capaces de desencadenar la maduración de células dendríticas inmaduras. Los ejemplos de tales citocinas son, sin limitación, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-18, IL-11, IL-27 e IFN- α . Las mezclas de citocinas proinflamatorias adecuadas son, sin limitación, una mezcla formada por TNF- α y CD40L; una mezcla formada por IFN- α y TNF- α ; una mezcla formada por IFN- α y CD40L; una mezcla formada por IFN- α , TNF- α y CD40L; una mezcla formada por TNF- α , IL-1 β e IL-6; una mezclada formada por IL-1 β , TNF- α , IFN- α , IFN- γ y poli (I:C); una mezclada formada por IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- α y CD40L.

El término “prostaglandina”, como se usa en el presente documento, se refiere a un miembro de un grupo de compuestos lipídicos que derivan enzimáticamente de ácidos grasos y tienen funciones importantes en el cuerpo animal. Cada prostaglandina contiene 20 átomos de carbono, incluyendo un anillo de 5 carbonos. Ejemplos de prostaglandinas útiles en la presente invención son, sin limitación, prostaciclina I₂ (PGI₂), prostaglandina E₂ (PGE₂) y prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}).

El término “ligando de TLR4” o “ligando del receptor de tipo toll 4”, como se usa en el presente documento, se refiere a un ligando del receptor de tipo toll 4 (TLR4). TLR4 también se ha designado CD284 (grupo de diferenciación 284) y es un miembro de la familia de receptores de tipo toll, que desempeña un papel fundamental en el reconocimiento de patógenos y activación del sistema inmune innato.

El término “miembro de la superfamilia de TNF”, como se usa en el presente documento, se refiere a una citocina que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). La superfamilia de TNF de citocinas representa un grupo multifuncional de citocinas proinflamatorias que activan rutas de señalización para la supervivencia celular, apoptosis, respuestas inflamatorias y diferenciación celular. Ejemplos de miembros de la superfamilia de TNF incluye, sin limitación, factor de necrosis tumor alfa (TNF α), LIGHT, ligando de CD40 (CD40L), ligando de 4-1BB (4-1BBL), APRIL, ligando de CD27 (CD27L), ligando de CD30 (CD30L), ligando de Fas, ligando relacionado con TNFR inducido por glucocorticoides (GITRL), linfotoxina alfa (LT α), linfotoxina beta (LT β), ligando de OX40 (OX40L), activador del receptor del ligando de NF- κ B (RANKL), factor activador de células B de la familia TNF (BAFF), ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), inductor débil de tipo TNF de apoptosis (TWEAK) y VEG1.

El término “tratar” o “tratamiento”, como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de una composición inmunogénica de la invención o de un medicamento que la contiene para controlar la evolución de la enfermedad antes o después de que hayan aparecido signos clínicos. Se entiende que control de la evolución de la enfermedad significa los resultados clínicos beneficiosos o deseados que incluyen, pero no están limitados a, reducción de los síntomas, reducción de la duración de la enfermedad, estabilización de estados patológicos (específicamente para evitar deterioro adicional), retraso de la evolución de la enfermedad, mejora del estado patológico y remisión (tanto parcial como total). El control de la evolución de la enfermedad también implica una extensión de la supervivencia, comparada con la supervivencia esperada si no se aplicara el tratamiento. Dentro del contexto de la presente invención, los términos “tratar” y “tratamiento” se refieren específicamente a prevenir o retrasar la infección y destrucción de células T CD4+ sanas en un sujeto infectado por VIH-1. También se refiere a la prevención y retraso del inicio de los síntomas de la enfermedad de inmunodeficiencia adquirida tales como recuento de células T CD4+ extremadamente bajo e infecciones repetidas por patógenos oportunistas tales como *Mycobacteria spp.*, *Pneumocystis carinii*, y *Pneumocystis cryptococcus*. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no están limitados a, un aumento en el recuento de células T CD4+ indiferenciadas absoluto (intervalo 10-3520), un aumento en el porcentaje de células T CD4+ sobre las células inmunes circulantes totales (intervalo 1-50 por ciento) y/o aumento en el recuento de células T CD4+ como porcentaje del recuento de células T CD4+ normales en un sujeto sin infectar (intervalo 1-161 por ciento). “Tratamiento”

también puede significar prolongar la supervivencia del sujeto infectado comparada con la supervivencia esperada si el sujeto no recibiera ningún tratamiento dirigido a VIH.

El término “vacuna”, como se usa en el presente documento, se refiere a una composición inmunogénica para la administración *in vivo* a un huésped, que puede ser un primate, especialmente un huésped humano, para conferir protección contra una enfermedad, particularmente una enfermedad vírica.

El término “vector”, como se usa en el presente documento, indica una molécula de ácido nucleico, lineal o circular, que comprende el genoma que codifica todas las proteínas que forman una partícula vírica (excepto una parte o el total de la proteína integrasa) operativamente unido a segmentos adicionales que aseguran su replicación autónoma en una célula huésped de interés. Preferiblemente, el vector es un vector de expresión, que se define como un vector, que además de las regiones de replicación autónoma en una célula huésped, contiene regiones operativamente unidas al genoma de la invención y que son capaces de aumentar la expresión de productos del genoma según la invención.

El término “partícula vírica”, como se usa en el presente documento, se refiere a una partícula vírica completa y no a una subunidad proteica o péptido. Las partículas víricas (también conocidas como viriones) consisten en dos o tres partes: el material genético del virus hecho de ADN o ARN; una cubierta proteica que protege estos genes; y, en algunos casos, una envuelta de lípidos que rodea la cubierta proteica cuando están fuera de una célula. La forma de la partícula vírica varía desde formas helicoidal e icosaédrica simples a estructuras más complejas, dependiendo del virus.

2. Método para obtener una célula presentadora de antígeno cargada con antígeno *in Vitro*

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método (en adelante denominado “primer método de la invención”) para obtener una célula presentadora de antígeno cargada con antígeno *in vitro* que comprende poner en contacto una célula dendrítica inmadura con un inmunógeno en condiciones adecuadas para su procesamiento y presentación por la célula presentadora de antígeno.

En una forma de realización preferida, el inmunógeno es una partícula vírica, preferiblemente una partícula vírica de VIH, más preferiblemente una partícula vírica de VIH-1. La partícula vírica puede contener varios antígenos.

El virus VIH-1 muestra un grado inusualmente alto de variabilidad genética en todo su genoma. Comparaciones de secuencias han identificado tres grupos genéticos de VIH-1, designados M, O y N. Se ha hipotetizado la existencia de un cuarto grupo, “P”, basada en un virus aislado en 2009. El grupo M se divide además en subtipos genéticos principales filogenéticamente relacionados (o clados), designados A, B, C, D, E, F, G, H, J y K. La coinfección con subtipos distintos da lugar a formas recombinantes circulantes (CRF). Junto con las formas recombinantes circulantes (CRF) intersubtipo, el grupo M comprende la mayoría de las variantes de VIH-1 en el mundo hoy. El virus VIH-1 de la presente invención puede representar cualquiera de los grupos genéticos o subtipos genéticos capaces de infectar un ser humano, y también incluye formas recombinantes circulantes, cepas de laboratorio y aislados primarios. Por tanto, en una forma de realización preferida el inmunógeno es un inmunógeno de VIH.

Los inmunógenos de VIH adecuados incluyen la envuelta de VIH (env; por ejemplo, Seq. Ref. NCBI NPJ357856), gag (por ejemplo, p6, p7, p17, p24, GenBank AAD39400.1), la proteasa codificada por pol (por ejemplo, UniProt P03366), nef (por ejemplo, GenBank CAA41585.1, Shugars D, *et al.*, J. Virol. 1993; 67(8):4639-4650), así como variantes, derivados y proteínas de fusión de los mismos. Véase, Gómez C, *et al.*, Vaccine 2007; 25:1969-1992. Las cepas y combinaciones adecuadas las puede seleccionar el experto en la materia según desee.

El inmunógeno de VIH de la invención es capaz de inducir una respuesta inmune. Particularmente, “respuesta inmune” se refiere a una respuesta inmune mediada por células T CD4+ o células T CD8+ a una infección por VIH. Se puede determinar una respuesta inmune a VIH midiendo, por ejemplo, la carga vírica, la proliferación de células T, supervivencia de células T, secreción de citocinas por células T o un aumento en la producción de anticuerpos específicos de antígeno (por ejemplo, concentración de anticuerpo).

La terapia de células dendríticas representa un nuevo y prometedor planteamiento para el tratamiento o prevención de muchas enfermedades tales como cáncer o infección por VIH. Dichas terapias comprenden el uso de células dendríticas que contienen uno o más antígenos que se han introducido artificialmente en dichas células para obtener “células dendríticas cargadas con antígeno”.

El método de la invención comprende poner en contacto una célula dendrítica inmadura con un inmunógeno en condiciones adecuadas para su procesamiento y presentación por una célula presentadora de antígeno.

Las células dendríticas afectadas por los métodos de la invención se pueden seleccionar para que sean células dendríticas inmaduras o maduras. Las células dendríticas inmaduras se pueden obtener de una población de precursores de células dendríticas. Preferiblemente, el precursor de células dendríticas es una célula que se puede diferenciar en una célula dendrítica inmadura en cuatro semanas o menos, más preferiblemente, en 20 días o menos, incluso más preferiblemente, en 18 días o menos, y aún más preferiblemente, en 16 días o menos. En una forma de realización preferida, el precursor de células dendríticas se diferencia a una célula dendrítica inmadura en presencia de GM-CSF e IL-4 en menos de siete días, y más preferiblemente, en cinco días.

En una forma de realización preferida, la población de células precursoras dendríticas es una población de precursores monocíticos de células dendríticas. Más preferiblemente, los precursores monocíticos de células dendríticas derivan de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las PBMC se pueden obtener de sangre completa diluida 1:1 con solución salina tamponada o de concentrados de leucocitos (fracciones de “capa leucocítica”, MSKCC Blood Bank) por centrifugación estándar en Ficoll-Paque PLUS (sin endotoxina, no. de catálogo 17-1440-03, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, SE). Los precursores MoCD son PBMC adherentes a plástico (no. de catálogo 35-3003, Falcon, Becton-Dickinson Labware Inc., Franklin Lakes, NJ, EE UU) en cultivo, y se pueden cultivar en RPMI 1640 completo más suero humano normal (SHN) al 1% (o suero bovino fetal al 10%) en presencia de GM-CSF (1000 UI/ml) e IL-4 (500 UI/ml) con cambio cada 2 días como se ha descrito. Véase, Thurner B, *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 1999; 223:1-15 y Ratzinger G, *et al.*, *J. Immunol.* 2004; 173:2780-2791.

Las poblaciones de monocitos purificados se pueden aislar de PBMC con anticuerpos de CD14⁺ antes del cultivo para obtener células dendríticas inmaduras. Los monocitos se identifican habitualmente en frotis teñidos por su gran núcleo bilobulado. Además de la expresión de CD14, los monocitos expresan también, entre otros, uno o más de los siguientes marcadores de superficie: 125I-WVH-1, 63D3, adipofilina, CB12, CD1 Ia, CD1 Ib, CD15, CD54, Cdl63, citidina desaminasa y Flt-I. Véase, Feyle D, *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 1985; 147:409-419, Malavasi F, *et al.*, *Cell Immunol.* 1986; 97(2):276-285, Rupert J, *et al.*, *Immunobiol.* 1991; 182(5):449-464; Ziegler-Heitbrock H, *J. Leukoc. Biol.* 2000; 67:603-606, y Pilling D, *et al.*, *PLoS One* 2009; 4(10):e-7475.

En general, los precursores monocíticos de células dendríticas se pueden identificar por la expresión de marcadores tales como CD13 y CD33. Los precursores dendríticos mieloides

se pueden diferenciar a células dendríticas a través de rutas de CD14 o CD1a. Según esto, una célula precursora dendrítica de la invención puede ser una célula precursora dendrítica CD14+CD1a- o una célula precursora dendrítica CD14-CD1a+. En ciertas formas de realización de la invención, una célula precursora dendrítica mielóide se puede caracterizar por la expresión de los marcadores SCA-1, c-kit, CD34, CD16 y CD14. En una forma de realización preferida, la célula precursora dendrítica mielóide es un monocito CD14+. El monocito CD14+ también puede expresar el receptor de GM-CSF.

Las células dendríticas inmaduras usadas como material de partida para el método de la invención pueden ser autólogas al sujeto que se va a tratar. En otras formas de realización, las células dendríticas inmaduras usadas como material de partida para los métodos de la invención son células dendríticas heterólogas. Por ejemplo, si se va a tratar la enfermedad de injerto contra el huésped, las células dendríticas inmaduras que se usan como material de partida son células dendríticas que se obtuvieron del donante. El sujeto puede ser, por ejemplo, un ratón, una rata, un perro, un pollo, un caballo, una cabra, un burro o un primate. Lo más preferiblemente, el sujeto es un ser humano. En una forma de realización preferida, la célula dendrítica inmadura es una célula dendrítica inmadura derivada de monocito.

El primer método de la invención comprende poner en contacto dichas células dendríticas inmaduras con un inmunógeno que comprende el antígeno que se va a introducir en la célula dendrítica en condiciones adecuadas para el procesamiento del inmunógeno y la presentación por la célula presentadora de antígeno. Como resultado, se obtiene una célula presentadora de antígeno cargada con antígeno.

En una forma de realización, el primer método de la invención comprende además colocar la célula dendrítica inmadura en condiciones adecuadas para su maduración en donde dicho paso de maduración se lleva a cabo simultáneamente con el paso de poner en contacto la célula dendrítica inmadura con un inmunógeno. En otra forma de realización, la célula dendrítica inmadura se carga primero con el inmunógeno y se madura después. En aún otra forma de realización, la célula dendrítica se madura primero y después se carga con el inmunógeno. Preferiblemente, la célula inmadura se madura mientras se carga con el inmunógeno.

El segundo paso del primer método de la invención comprende colocar dicha célula dendrítica inmadura en condiciones adecuadas para su maduración a una célula dendrítica madura. En una forma de realización preferida, las condiciones adecuadas para la maduración

comprenden la incubación de las células dendríticas inmaduras en un medio que comprende un agente de maduración de células dendríticas seleccionado del grupo que consiste en:

- i) un ligando de TLR4 y
- ii) una mezcla de citocinas proinflamatorias.

5 En una forma de realización preferida, el ligando de TLR4 para su uso en el método según la presente invención incluye, sin limitación, LPS, MPL, proteína de choque térmico 60 (Hsp60), proteína de choque térmico 70 (Hsp70), proteína de choque térmico gp96, fibrinógeno, sulfato de heparano, ácido hialurónico soluble, beta-defensina 2 y angelan. Véase, Kim J, *et al.* Cancer Letters 2011; 313(2): 226-234. Más preferiblemente, el ligando de
10 TLR4 es LPS. Véase, Castiello L, *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 2011; 60(4): 457-466. Preferiblemente, la incubación con LPS se realiza a una concentración de 100 ng/ml.

En un intento de recrear un medio fisiológico para la maduración de CD, se han usado algunas mezclas equilibradas de agentes de maduración. Por tanto, en otra forma de realización preferida, el agente de maduración celular es una mezcla de citocinas
15 proinflamatorias. En una forma de realización preferida, la mezcla de citocinas proinflamatorias comprende al menos un agonista del receptor de IL-1, una citocina que utiliza gp130 y un miembro de la superfamilia de TNF. Dicha mezcla de citocinas puede incluir otros compuestos.

En una forma de realización preferida, el agonista del receptor de IL-1 es IL-1 β .
20 Preferiblemente, la concentración eficaz de IL-1 β es 300 U/ml. En otra forma de realización preferida, la citocina que utiliza gp130 es IL-6. Preferiblemente, la concentración eficaz de IL-6 es 1000 U/ml de IL-6. En otra forma de realización preferida, el miembro de la superfamilia de TNF es TNF α . Preferiblemente, la concentración eficaz de TNF α es 1000 U/ml.

25 La mezcla de citocinas más frecuentemente usada contiene TNF- α , IL-1 β e IL-6. Por tanto, en una forma de realización preferida, la mezcla de citocinas proinflamatorias comprende una mezcla de IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Más preferiblemente, la composición del medio es 300 U/ml de IL-1 β , 1000 U/ml de TNF- α y 1000 U/ml de IL-6.

Se ha divulgado que la adición de una prostaglandina a la mezcla de citocinas
30 proinflamatorias mejora el rendimiento, maduración, capacidad migratoria e inmunoestimuladora de las CD generadas. Véase, Jonuleit H, *et al.*, Eur. J. Immunol. 1997; 27: 3135-3142. Por tanto, en una forma de realización preferida la mezcla de citocinas proinflamatorias comprende además una prostaglandina. Más preferiblemente, la

prostaglandina utilizada es prostaglandina E₂ (PGE₂). Preferiblemente, la concentración eficaz de PGE₂ es 1 µg/ml. Más preferiblemente, la composición del medio de maduración es 300 U/ml de IL-1β, 1000 U/ml de TNF-α, 1000 U/ml de IL-6 y 1 µg/ml de PGE₂.

Al final del periodo de incubación se obtiene una célula dendrítica madura. La maduración de células dendríticas se puede seguir por métodos conocidos en la técnica para células dendríticas. Se pueden detectar marcadores de superficie de CDM en ensayos tales como citometría de flujo y tinción inmunohistoquímica. Las CDM también se pueden seguir por la producción de citocinas (por ejemplo, mediante ELISA, otro inmunoensayo o por el uso de una matriz de oligonucleótidos). La maduración de una célula dendrítica se puede confirmar además determinando el inmunofenotipo. Una célula dendrítica inmadura se puede distinguir de una célula dendrítica madura, por ejemplo, basándose en marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD80 y CD86. Una célula dendrítica inmadura es débilmente positiva y preferiblemente negativa para estos marcadores, mientras que la célula dendrítica madura es positiva.

15 Cuando el método de la invención tiene lugar en un cultivo que tiene una población de células dendríticas inmaduras, las condiciones adecuadas para la maduración son tales donde se alcanza la maduración de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o preferiblemente el 100% de las células dendríticas inmaduras.

El primer método de la invención se caracteriza por el hecho de que ambos pasos: i) el paso de poner en contacto la célula dendrítica inmadura con un inmunógeno, y ii) el paso de madurar la célula dendrítica inmadura, se llevan a cabo simultáneamente durante al menos parte de dichos pasos i) y ii). Por tanto, ambos pasos pueden solapar por completo, cuando la maduración de la célula dendrítica y el contacto con el inmunógeno empiezan al mismo tiempo; o la célula dendrítica se puede incubar con el inmunógeno solo durante parte del paso de maduración, por ejemplo, cuando la maduración de la célula dendrítica empieza primero y después de algún tiempo durante el paso de maduración la célula dendrítica se pone en contacto con el inmunógeno; o la maduración puede tener lugar solo durante parte de la incubación de la célula dendrítica con el inmunógeno, por ejemplo si la incubación con el inmunógeno empieza primero y luego, después de algún tiempo, se empieza la maduración de la célula dendrítica.

30 Cuando los pasos i) y ii) del primer método de la invención han terminado, se obtiene una célula dendrítica cargada con antígeno madura (es decir, una célula dendrítica madura que tiene el antígeno de interés). La maduración de las células dendríticas se puede confirmar

determinando el inmunofenotipo como se ha indicado previamente. La carga antigénica por las células dendríticas se puede ensayar por los métodos descritos anteriormente.

En una forma de realización preferida, el inmunógeno que se va a cargar en una célula dendrítica es una partícula vírica, preferiblemente, una partícula vírica retroviral. En otra forma de realización preferida, el inmunógeno es una partícula de lentivirus, preferiblemente, una partícula vírica de VIH. Más preferiblemente, el inmunógeno es una partícula vírica de VIH-1.

El virus VIH-1 se une y posteriormente infecta células CD4 humanas mediante el uso de un correceptor en la superficie celular. Diferentes cepas de VIH-1 usan diferentes correceptores para entrar en las células CD4 humanas. Por tanto, el virus VIH-1 puede ser CCR5-trópico cuando la cepa de virus solo usa el correceptor receptor de quimioquina C-C de tipo 5 (CCR5) para infectar células CD4; CXCR4-trópico cuando una cepa de virus solo usa el correceptor receptor de quimioquina C-X-C de tipo 4 (CXCR4) para infectar células CD4; y dual-trópico cuando la cepa de virus usa cualquier correceptor CCR5 o CXCR4 para infectar células CD4. Véase, Whitcomb J, *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51(2):566-575. Hay varios ensayos disponibles para distinguir entre diferentes virus trópicos (por ejemplo, Trofile®, Monogram Biosciences, Inc., San Francisco, CA, EE UU). En una forma de realización preferida, el virus VIH-1 se selecciona de un virus CXCR4-trópico y un virus CCR5-trópico, preferiblemente es un virus CXCR4-trópico.

Los lentivirus, incluyendo VIH, se transmiten como virus ARN monocatenarios de sentido positivo, envueltos. Tras la entrada en la célula diana, el genoma de ARN vírico se convierte (transcripción inversa) en ADN bicatenario por una transcriptasa inversa codificada por el virus que se transporta junto con el genoma vírico en la partícula vírica. El ADN vírico resultante se importa después al núcleo celular y se integra en el ADN celular por una integrasa codificada por el virus y cofactores del huésped. Una vez integrado, el virus se vuelve latente, lo que permite que el virus y su célula huésped eviten la detección por el sistema inmune. De forma alternativa, el virus se puede transcribir, producir nuevos genomas de ARN y proteínas víricas que se empaquetan y liberan de la célula como nuevas partículas víricas que empiezan el ciclo de replicación de nuevo.

La presente invención divulga que una partícula vírica que carece de una proteína integrasa funcional puede ser un buen inmunógeno ya que el ADN vírico no se puede integrar en el ADN celular huésped y por tanto no se puede replicar. Sin embargo, dicha partícula vírica que carece de una proteína integrasa funcional mantiene la misma estructura de

antígenos víricos del virus salvaje y por tanto es capaz de inducir una respuesta inmune comparable.

La integrasa es una enzima específica de retrovirus codificada por todos los genomas de retrovirus. Para los fines de esta invención las integrasas incluyen, entre otras, integrasas de VIH-1, VIH-2, virus del sarcoma aviar (ASV), virus de la inmunodeficiencia simia (VIS), espumavirus humano (PFV), virus de mono Mason-Pfizer (MPMV) y virus de la inmunodeficiencia felina (VIF). Por tanto, en una forma de realización preferida, el inmunógeno es una partícula vírica que carece de una proteína integrasa funcional, preferiblemente, una partícula retrovítica, y más preferiblemente, una partícula vírica de VIH-1.

La partícula vírica de VIH-1 de la invención carece de una proteína integrasa funcional. La expresión “carece de una proteína integrasa funcional” incluye no solo la situación en que la proteína integrasa no se sintetiza y la partícula vírica no contiene integrasa sino que también incluye situaciones en que la proteína integrasa se sintetiza pero es inactiva o esencialmente inactiva. Una proteína integrasa inactiva o esencialmente inactiva es una proteína integrasa que carece de al menos el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, preferiblemente el 100% de su función (o actividad).

La actividad integrasa se puede evaluar midiendo su actividad residual. Véase, Philippe S, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006; 103(47):17684-17689. Otro método indirecto de probar la actividad integrasa es ensayar la capacidad de replicación del virus determinando la cinética de producción de p24Gag en células tales como PBMC por métodos conocidos en la técnica.

Las partículas víricas que carecen de una proteína integrasa funcional para su uso en la presente invención pueden ser deficientes en otra proteína o tener alguna mutación o deleción en el genoma que las codifica con respecto a una partícula vírica salvaje. Sin embargo, en una forma de realización más preferida, la partícula vírica de VIH-1 contiene un complemento entero de todos los genes víricos excepto del gen *pol*.

La expresión “contiene un completo entero de todos los genes víricos excepto el gen *pol*” significa que los genes víricos están completos e inalterados excepto el gen *pol*, que es el gen que codifica la proteína integrasa. Por ejemplo, la partícula vírica de dicha forma de realización puede ser una partícula vírica producida después de manipulación genética de la región codificante de integrasa del genoma de una partícula vírica aislada de la naturaleza (por ejemplo, una muestra de un paciente).

La falta de una proteína integrasa funcional de la partícula vírica de la invención se puede deber a distintas razones incluyendo:

- 5 i) una o más mutaciones naturales o artificiales específicas de sitio que provocan un cambio en un aminoácido por un aminoácido diferente que produce una falta de la función integrasa. En tal caso la proteína integrasa está presente en la partícula vírica pero no es funcional.
- ii) una delección de uno o más aminoácidos que produce una falta de la función integrasa. En tal caso la proteína integrasa está presente, tiene un tamaño menor que la proteína integrasa salvaje pero no es funcional.
- 10 iii) una delación de la región completa del genoma vírico que codifica la proteína integrasa. En tal caso la proteína integrasa no está presente en la partícula vírica.

En una forma de realización más preferida, la partícula vírica de VIH-1 que carece de una proteína integrasa funcional contiene una delección en la proteína integrasa o carece de la proteína integrasa, preferiblemente carece de la proteína integrasa.

15 La expresión “delección en la proteína integrasa” se refiere a una delección en uno o más aminoácidos de la proteína lo que produce así una proteína no funcional que tiene un tamaño menor que la proteína integrasa salvaje (es decir, que el polipéptido integrasa no es la proteína integrasa de longitud completa). Preferiblemente, la proteína integrasa carece del dominio catalítico central o una parte de dicho dominio.

20 La expresión “carece de la proteína integrasa”, como se usa en el presente documento, significa que la partícula vírica no es capaz de sintetizar la proteína integrasa debido a una delación completa de la región del gen que codifica la proteína integrasa.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método (en adelante denominado el “segundo método de la invención”) para obtener una célula dendrítica cargada con un
25 inmunógeno de VIH-1 *in vitro* que comprende cargar una célula dendrítica con una partícula vírica de VIH-1 que carece de una proteína integrasa funcional.

La partícula vírica de VIH-1 que carece de proteína integrasa funcional del segundo método de la invención puede ser una partícula vírica de VIH-1 generada de una partícula vírica de VIH-1 aislada de un sujeto infectado con VIH-1.

30 La expresión “generar una partícula vírica de VIH-1 que carece de una proteína integrasa funcional” se refiere a la producción artificial de una partícula vírica de VIH-1 que carece de una proteína integrasa funcional usando técnicas de ingeniería genética. La generación de dicha partícula vírica defectiva puede ser por mutagénesis dirigida o métodos

de delección génica bien conocidos en la técnica. Véase, Brown T, “Gene Cloning” (Chapman & Hall, London, GB, 1995); Watson R, *et al.*, “Recombinant DNA”, 2ª Ed. (Scientific American Books, Nueva York, NY, EE UU, 1992); Alberts B, *et al.*, “Molecular Biology of the Cell” (Garland Publishing Inc., Nueva York, NY, EE UU, 2008); Innis M, *et al.*, Eds.,
 5 “PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications” (Academic Press Inc., San Diego, CA, EE UU, 1990); Erlich H, Ed., “PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification” (Stockton Press, Nueva York, NY, EE UU, 1989); Sambrook J, *et al.*, “Molecular Cloning. A Laboratory Manual” (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, EE UU, 1989); Bishop T, *et al.*, “Nucleic Acid and Protein Sequence. A
 10 Practical Approach” (IRL Press, Oxford, GB, 1987); Reznikoff W, Ed., “Maximizing Gene Expression” (Butterworths Publishers, Stoneham, MA, EE UU, 1987); Davis L, *et al.*, “Basic Methods in Molecular Biology” (Elsevier Science Publishing Co., Nueva York, NY, EE UU, 1986), Schleef M, Ed., “Plasmid for Therapy and Vaccination” (Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, DE, 2001).

15 Para cuantificar la reducción en la actividad integrasa producida por la delección en la región codificante de integrasa, y para cuantificar la actividad integrasa residual que permanece en el virus después de dicha delección, la partícula vírica de VIH-1 que carece de una proteína integrasa funcional se puede someter a un ensayo tal como se ha descrito previamente. Véase, Philippe S, 2006, anteriormente.

20 La expresión “partícula vírica de VIH-1 aislada de un sujeto infectado por VIH-1” significa que la partícula que carece de una proteína integrasa funcional se obtiene después de manipulación genética de un genoma vírico obtenido de una partícula vírica de VIH-1 aislada de un individuo infectado con VIH-1.

25 La partícula vírica de VIH-1 se aísla del sujeto antes del tratamiento para generar un inmunógeno de VIH-1 deficiente en integrasa. En el contexto del segundo aspecto de la invención, el término “aislamiento” o “aislado” se refiere a una partícula vírica de VIH-1 que se puede aislar de linfocitos T CD4+ por métodos conocidos en la técnica. Tales células se pueden aislar de una muestra de sangre periférica. Dicha muestra de sangre periférica se obtiene en condiciones asépticas y puede contener un anticoagulante.

30 La expresión “sujeto infectado por VIH-1”, como se usa en el presente documento, se refiere a un sujeto humano infectado por VIH-1. Los sujetos infectados por VIH-1 se identifican mediante afecciones clínicas asociadas con la infección por VIH y recuentos de linfocitos T CD4+. Desde un punto de vista práctico, el médico ve la infección por VIH-1

como un espectro de trastornos que varían desde infección primaria con o sin el síndrome agudo de VIH a estado de infección sintomática de enfermedad avanzada. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Atlanta, Georgia, ha establecido una definición autorizada para el diagnóstico de SIDA, que informa al experto en la materia de si se ha producido el inicio del SIDA: en un sujeto infectado por VIH, el recuento de células T CD4+ debe estar por debajo de 200 células por mm cúbico de sangre, o debe haber aparición clínica de una infección oportunista inicial que define SIDA, tal como PCP (es decir, neumonía por *Pneumocystis carinii*), candidiasis oral, tuberculosis pulmonar o carcinoma cervical invasivo. Los métodos de determinar el recuento de células T CD4+ de un sujeto se conocen en la técnica. En una forma de realización preferida, el sujeto tiene terapia antirretroviral interrumpida.

El sujeto puede ser asintomático o puede haber desarrollado ya alguno de los signos asociados con enfermedades resultantes de infección por VIH-1. Además, el sujeto también puede estar en tratamiento con una terapia antirretroviral (por ejemplo, terapia HAART). En una forma de realización preferida, el sujeto tiene al menos 450×10^6 /l células T CD4+ o más de 10.000 copias de ARN de VIH-1 por ml de plasma.

El segundo método de la invención comprende cargar una célula dendrítica con una partícula vírica de VIH-1 que carece de una proteína integrasa funcional. Este paso se lleva a cabo esencialmente como se ha descrito anteriormente en el contexto del primer método de la invención.

Las células dendríticas usadas en el segundo método de la invención son células dendríticas maduras que se han obtenido de células dendríticas inmaduras usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente para inducir la maduración de las células dendríticas. En una forma de realización preferida, las células dendríticas se obtienen por maduración de células dendríticas inmaduras usando un medio que comprende un agente de maduración de células dendríticas seleccionado del grupo que consiste en:

- i) un ligando de TLR4 y
- ii) una mezcla de citocina proinflamatorias.

En una forma de realización preferida, el ligando de TLR4 para su uso en el método según la presente invención incluye LPS. En otra forma de realización, la mezcla de citocinas proinflamatorias comprende al menos un agonista del receptor de IL-1, una citocina que utiliza gp130 y un miembro de la superfamilia de TNF. Dicha mezcla de citocinas puede incluir otros compuestos. En una forma de realización aún más preferida, el agonista del

receptor de IL-1 es IL-1 β . Preferiblemente, la concentración eficaz de IL-1 β es 300 U/ml. En otra forma de realización preferida, la citocina que utiliza gp130 es IL-6. Preferiblemente, la concentración eficaz de IL-6 es 1000 U/ml de IL-6. En otra forma de realización preferida, el miembro de la superfamilia de TNF es TNF α . Preferiblemente, la concentración eficaz de

5 TNF α es 1000 U/ml.

La mezcla de citocinas más frecuentemente usada contiene TNF- α , IL-1 β e IL-6. Por tanto, en una forma de realización preferida la mezcla de citocinas proinflamatorias comprende una mezcla de IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Más preferiblemente, la composición del medio es 300 U/ml de IL-1 β , 1000 U/ml de TNF- α y 1000 U/ml de IL-6.

10 En aún otra forma de realización, la mezcla de citocinas comprende una prostaglandina. Más preferiblemente, la prostaglandina utilizada es prostaglandina E₂ (PGE₂). Preferiblemente, la concentración eficaz de PGE₂ es 1 μ g/ml. Más preferiblemente, la composición del medio de maduración es 300 U/ml de IL-1 β , 1000 U/ml de TNF- α , 1000 U/ml de IL-6 y 1 μ g/ml de PGE₂.

15 En otra forma de realización, la invención se refiere a un método para obtener una célula presentadora de antígeno cargada con antígeno *in vitro* que comprende:

- (i) colocar la célula dendrítica inmadura en condiciones adecuadas para la maduración de dicha célula dendrítica inmadura a una célula dendrítica madura y
 - (ii) poner en contacto la célula dendrítica madura con un inmunógeno que comprende
- 20 dicho antígeno en condiciones adecuadas para el procesamiento del inmunógeno presentación por la célula presentadora de antígeno.

Los pasos (i) y (ii) se pueden llevar a cabo de forma secuencial o simultánea. En una forma de realización preferida, los pasos (i) y (ii) se llevan a cabo secuencialmente, es decir, las células dendríticas inmaduras primero se maduran y después las células dendríticas

25 maduras se ponen en contacto con el antígeno.

El paso (i) se lleva a cabo en donde las condiciones adecuadas para la maduración de la célula dendrítica inmadura a una célula dendrítica madura comprende la incubación de dicha célula en un medio que comprende un agente de maduración de células dendríticas seleccionado del grupo que consiste en:

- 30 (i) un ligando de TLR4 y
- (ii) una mezcla de citocina proinflamatorias.

En una forma de realización preferida, el ligando de TLR4 para su uso en el método según la presente invención incluye LPS. En otra forma de realización, la mezcla de citocinas

proinflamatorias comprende al menos un agonista del receptor de IL-1, una citocina que utiliza gp130 y un miembro de la superfamilia de TNF. Dicha mezcla de citocinas puede incluir otros compuestos. En una forma de realización aún más preferida, el agonista del receptor de IL-1 es IL-1 β . Preferiblemente, la concentración eficaz de IL-1 β es 300 U/ml. En
5 otra forma de realización preferida, la citocina que utiliza gp130 es IL-6. Preferiblemente, la concentración eficaz de IL-6 es 1000 U/ml de IL-6. En otra forma de realización preferida, el miembro de la superfamilia de TNF es TNF α . Preferiblemente, la concentración eficaz de TNF α es 1000 U/ml.

La mezcla de citocinas más frecuentemente usada contiene TNF- α , IL-1 β e IL-6. Por
10 tanto, en una forma de realización preferida la mezcla de citocinas proinflamatorias comprende una mezcla de IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Más preferiblemente, la composición del medio es 300 U/ml de IL-1 β , 1000 U/ml de TNF- α y 1000 U/ml de IL-6.

En aún otra forma de realización, la mezcla de citocinas comprende una prostaglandina. Más preferiblemente, la prostaglandina utilizada es prostaglandina E₂ (PGE₂).
15 Preferiblemente, la concentración eficaz de PGE₂ es 1 μ g/ml. Más preferiblemente, la composición del medio de maduración es 300 U/ml de IL-1 β , 1000 U/ml de TNF- α , 1000 U/ml de IL-6 y 1 μ g/ml de PGE₂.

El segundo método de la invención permite obtener células dendríticas cargadas con partículas víricas de VIH-1 que se pueden usar como una vacuna de células dendríticas en el
20 mismo sujeto del que se aisló la partícula vírica de VIH-1. Esto tiene la ventaja de que la partícula vírica de VIH-1 que carece de una proteína integrasa funcional sea exactamente del mismo grupo y subtipo que la partícula vírica que infectó el sujeto.

Además, la célula dendrítica usada en el método de la invención también puede ser del mismo sujeto. En una forma de realización preferida, la célula dendrítica es autóloga al sujeto
25 del que se ha aislado la partícula vírica de VIH-1.

La carga de una célula dendrítica con la partícula vírica de VIH-1 de la invención se puede hacer usando una célula dendrítica madura o una célula dendrítica inmadura. En una forma de realización preferida del segundo método de la invención, la carga de la célula dendrítica se hace con una célula dendrítica inmadura. En otra forma de realización, la carga
30 de la célula dendrítica se hace con una célula dendrítica madura.

En formas de realización preferidas del segundo método de la invención, la partícula vírica de VIH-1 que carece de una proteína integrasa funcional y el método de cargar una célula dendrítica con dicha partícula vírica de VIH-1 puede ser cualquier partícula vírica de

VIH-1 y cualquier método incluido entre los descritos en el contexto del primer método de la invención.

En una forma de realización preferida, la partícula vírica de VIH-1 contiene un complemento entero de proteínas víricas excepto integrasa. En otra forma de realización
5 preferida, la partícula vírica de VIH-1 que carece de una proteína integrasa funcional contiene una delección en la proteína integrasa o carece de la proteína integrasa.

En otra forma de realización preferida, el VIH-1 es CXCR4-trópico.

Los métodos de la invención permiten obtener células dendríticas cargadas con antígeno adecuadas para su uso como una vacuna.

10 Por tanto, otro aspecto de la presente invención es una célula presentadora de antígeno cargada con antígeno obtenible por el primer método de la invención. Dicha célula presentadora de antígeno cargada con antígeno tiene una mayor capacidad de presentar antígenos que células obtenidas por otros métodos conocidos.

Otro aspecto de la invención es una célula presentadora de antígeno cargada con
15 antígeno obtenible por el primer método de la invención para su uso en medicina. En otro aspecto, la invención se refiere a una célula presentadora de antígeno obtenible por el primer método de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad que requiere una respuesta inmune contra el antígeno que se carga en la célula presentadora de antígeno. En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una célula presentadora de
20 antígeno obtenible por el primer método de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad que requiere una respuesta inmune contra el antígeno que se carga en la célula presentadora de antígeno. En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención en un sujeto de una enfermedad que requiere una respuesta inmune contra el antígeno que se carga en la célula
25 presentadora de antígeno según la invención.

En una forma de realización preferida, el inmunógeno es un inmunógeno de VIH y la enfermedad es una infección por VIH o una enfermedad asociada con una infección por VIH. En una forma de realización más preferida, el sujeto que se va a tratar es el mismo sujeto del que se aisló la partícula vírica de VIH-1. En otra forma de realización preferida, el sujeto al
30 que se administra la composición inmunogénica o vacuna está en terapia antirretroviral.

Los términos “medicamento”, “tratamiento”, “prevención”, “infección por VIH” y “enfermedad asociada con una infección por VIH” se definen en el contexto de las composiciones inmunogénicas de la invención y usos terapéuticas de las mismas.

Un aspecto más de la presente invención es una célula dendrítica cargada con una partícula vírica de VIH-1 que carece de una proteína integrasa funcional obtenible por el segundo método de la invención.

Los ensayos convencionales utilizados para detectar respuestas de células T incluyen, por ejemplo, ensayos de proliferación, ensayos de secreción de linfoquinas, ensayos de citotoxicidad directa y ensayos de dilución limitante. Por ejemplo, para medir la inmunidad celular, se usan suspensiones celulares de células T CD4⁺ y CD8⁺ enriquecidas de tejidos linfoides para cuantificar respuestas de células T específicas de antígeno mediante el ensayo ELISPOT específico de citocina. Véase, Wu S, *et al.*, 1995, 1997, anteriormente. Tales ensayos pueden medir los números de células T específicas de antígeno que secretan IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IFN-gamma. Todos los ensayos ELISPOT se realizan usando Acm de captura y detección comercialmente disponibles (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EE UU; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, EE UU). Véase, Wu S, *et al.*, 1995, 1997, anteriormente; Shata M, 2001, anteriormente.

Los ensayos para probar la capacidad de las células dendríticas cargadas con antígeno de presentar antígenos se describen en los procedimientos generales de la parte experimental de la presenta invención.

3. *Inmunógenos de VIH-1 que carecen de una proteína integrasa funcional*

20

La presente invención divulga inmunógenos de VIH-1 que carecen de una proteína integrasa funcional que son capaces de inducir una respuesta inmune sin replicarse en la célula huésped. Como se muestra en los ejemplos 1 a 3 de la presente invención, una partícula vírica de VIH-1 que carece de una proteína integrasa funcional puede ser capturada por una célula dendrítica y activar células T CD4⁺ y CD8⁺ sin producir ninguna transinfección de células CD4⁺.

Por tanto, un aspecto de la presente invención es una partícula vírica de VIH-1 que carece de una proteína integrasa funcional. En una forma de realización preferida, la partícula vírica de VIH-1 carece al menos del 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, preferiblemente, el 100% de su función.

En una forma de realización preferida, la partícula vírica de VIH-1 contiene un complemento entero de todos los genes víricos excepto el gen *pol*. En una forma de realización más preferida, la partícula vírica de VIH-1 que carece de una proteína integrasa

funcional contiene una deleción en la proteína integrasa o carece de la proteína integrasa por completo. Preferiblemente, la partícula vírica de VIH-1 carece de la proteína integrasa entera.

En otra forma de realización preferida, el VIH-1 es CXCR4-trópico.

Dichas formas de realización se han definido previamente en el contexto del primer
5 método de la invención.

4. *Genomas, vectores y células de la invención*

La presente invención también proporciona genomas que codifican inmunógenos de
10 VIH-1 que carecen de una proteína integrasa funcional y vectores y células que los comprenden.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un genoma vírico de VIH-1 caracterizado por carecer parcial o completamente de la región codificante de integrasa.

La expresión “la región codificante de integrasa”, como se usa en el presente
15 documento, se refiere a la región del genoma vírico de VIH-1 que codifica la proteína integrasa.

Mediante “carece parcial o completamente la región codificante de integrasa” se entiende que la región codificante de integrasa no está completa, porque parte de los nucleótidos se han delecionado o porque la región codificante entera se ha delecionado.

20 El genoma vírico de VIH-1 de la invención puede contener una deleción o mutación de otras regiones del genoma.

En una forma de realización preferida, la falta parcial o completa de la región codificante de integrasa es la única diferencia entre dicho genoma vírico de VIH-1 que carece parcial o completamente de la región codificante de integrasa y un genoma vírico de VIH-1
25 salvaje. En el presente contexto, el término “genoma vírico de VIH-1 salvaje” se refiere a un genoma vírico de VIH-1 que es el genoma típico de VIH-1 como se produce en la naturaleza. La forma de realización en que “la falta parcial o completa de la región codificante de integrasa es la única diferencia entre dicho genoma vírico que carece parcial o completamente de la región codificante de integrasa y un genoma vírico de VIH-1 salvaje” significa que el
30 genoma vírico de VIH-1 de la invención que carece parcial o completamente de la región codificante de integrasa es un genoma vírico de VIH-1 idéntico a un genoma vírico de VIH-1 salvaje excepto en que la región codificante de integrasa está parcial o completamente delecionada.

En una forma de realización más preferida, se ha delecionado la región codificante de integrasa entera. Esto significa que la proteína integrasa no se sintetiza. En una forma de realización incluso más preferida, los nucleótidos 4159 a 5124 del gen *gag-pol* se han delecionado.

5 En VIH-1, el gen que codifica la proteasa vírica, *pro*, y el gen que expresa la polimerasa e integrasa, *pol*, se traducen como parte de un único precursor poliproteico Gag-Pro-Pol de 160 kDa (p160). La traducción de Pro-Pol requiere un cambio de marco de -1 que permite la lectura a través del codón de terminación de *gag*. Como resultado del procesamiento de la proteasa vírica, la proteasa misma (PR), el heterodímero de la
10 transcriptasa inversa (RT, compuesto de una subunidad de 66 y una de 51 kDa) y la integrasa (IN) se liberan del precursor. Véase, Cimarelli A, *et al.*, Cell. Mol. Life Sci. 2002; 59:1166-1184.

En otro aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende un genoma como se ha definido previamente.

15 Por tanto, los vectores adecuados según la presente invención incluyen vectores procariotas, tales como plásmidos pUC18, pUC19 y pBluescript y derivados de los mismos, como los plásmidos mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1 y RP4; fagos y vectores lanzadera, tales como los vectores pSA3 y pAT28; vectores de expresión en levaduras, tales como vectores de tipo plásmido de 2-micrones; plásmidos de integración; vectores YEP;
20 plásmidos centroméricos y análogos; vectores de expresión en células de insecto, tal como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL; vectores de expresión en plantas, tales como los vectores de las series pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y análogos; y vectores de expresión en células eucariotas superiores basados en vectores víricos por ejemplo, adenovirus, virus asociados a adenovirus, retrovirus y lentivirus)
25 así como vectores no víricos, tales como los vectores pSilencer 4.1-CMV (Ambion, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EE UU), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL y pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDT1.

30 El plásmido pNL4-3 basado en pUC (14.833 pb de tamaño) es el vector más ampliamente usado para manipulaciones *in vitro* de las secuencias províricas de VIH-1. El vector pNL4-3 de VIH-1 codifica todos los productos génicos conocidos de VIH-1 y su secuencia completa se define en el número de acceso AF324493.2 en la base de datos GenBank (publicación del 24 de mayo, 2010). Por tanto, en una forma de realización

preferida el vector es pNL4-3 en donde la región de integrasa falta parcial o completamente, preferiblemente en donde la región codificante de integrasa falta por completo.

La presente invención se refiere a un plásmido del que se ha delecionado la región codificante de integrasa eliminando los nucleótidos 4160-5121 del vector pNL4-3. El plásmido resultante se llama pNL4-3 Δ IN que tiene una secuencia SEQ ID NO:1. Por tanto, en una forma de realización preferida el vector es el vector pNL4-3 en donde los nucleótidos 4160-5121 se han delecionado. Preferiblemente, el plásmido es pNL4-3 Δ IN.

El plásmido pNL4-3 Δ IN se ha depositado antes de presentar la presente solicitud de patente en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DSMZ), Inhoffenstraße 7 B, D-38124 Braunschweig, Alemania, como institución legalmente reconocida para tal fin según el tratado de Budapest, del 28 de abril, 1977, sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos. La DSMZ ha asignado al plásmido pNL4-3 Δ IN el número de depósito DSM 23817. Por tanto, en una forma de realización más preferida el vector es el plásmido DSM 23817.

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula que comprende un genoma vírico de VIH-1 según la invención o un vector según la invención.

Las células adecuadas para la expresión de los inmunógenos de la invención incluyen, sin limitación, células de mamíferos, vegetales, de insecto, fúngicas y bacterianas. Las células bacterianas incluyen, sin estar limitadas a, células bacterianas gram positivas tal como especies de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces* y *Staphylococcus* y células bacterianas gram negativas tal como células de los géneros *Escherichia* y *Pseudomonas*. Las células fúngicas incluyen, preferiblemente, células de levaduras tales como *Saccharomyces*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*. Las células de insecto incluyen, sin estar limitadas a, células de *Drosophila* y células Sf9. Las células vegetales incluyen, entre otras, células de plantas de cultivo tal como cereales, plantas medicinales, ornamentales o bulbosas. Las células de mamífero incluyen, sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO), tal como CHO-K1 (número de acceso de ATCC CCL-61), DG44 (Chasin L, *et al.*, Som. Cell Mol. Genet. 1986; 12:555-556 y Kolkekar A, *et al.*, Biochemistry 1997; 36:10901-10909), CHO-K1 Tet-On (Clontech Inc., Mountain View, CA, EE UU), CHO designadas ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), CHO clon 13 (GEIMG, Génova, IT), CHO clon B (GEIMG, Génova, IT), CHO-K1/SF designada ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), RR-CHOK1 designada ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), células CHO negativas para dihidrofolato reductasa (CHO/-DHFR, Urlaub G, Chasin L,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 77:4216-4220), células CV1 de riñón de mono transformadas con SV40 (COS, COS-7, número de acceso de ATCC CRL-1651); células de riñón embrionario humano (células 293, 293T); células de riñón de hámster neonato (BHK, número de acceso de ATCC CCL-IO); células de riñón de mono (CV1, número de acceso de ATCC CCL-70);
 5 células de riñón de mono verde africano (VERO-76, número de acceso de ATCC CRL-1587; VERO, número de acceso de ATCC CCL-81); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather J, Biol. Reprod. 1980; 23:243-251); células de carcinoma cervical humano (HELA, número de acceso de ATCC CCL-2); células de riñón de perro (MDCK, número de acceso de ATCC CCL-34); células pulmonares humanas (W138, número de acceso de ATCC CCL-75); células
 10 de hepatoma humano (HEP-G2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, número de acceso de ATCC CCL-51); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, número de acceso de ATCC CRL- 1442); células TRI (Mather J, Ann. NY Acad. Sci. 1982, 383:44-68); células MCR 5 and células FS4. Preferiblemente, las células huésped son células HEK-293T. En otra forma de realización preferida, dicha célula es una célula dendrítica.

15

5. *Composiciones inmunogénicas y usos terapéuticos de las mismas*

Las partículas víricas de VIH-1, genomas víricos de VIH-1, vectores o células de la invención también se pueden usar para preparar una composición inmunogénica. Por tanto,
 20 otro aspecto de la presente invención es una composición inmunogénica o una vacuna que comprende una partícula vírica de VIH-1, un genoma vírico de VIH-1, un vector o una célula según la invención.

Los términos “partícula vírica de VIH-1”, “genoma vírico de VIH-1”, “vector” y “célula” se han definido en el contexto de los aspectos previos de la invención. El término
 25 “célula” se refiere a células obtenibles por el primer método de la invención y también a células obtenibles por el segundo método de la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un genoma vírico de VIH-1, un vector, una célula o una composición inmunogénica o vacuna según la invención para su uso en medicina. La composición inmunogénica o vacuna de la invención contiene al menos un
 30 soporte farmacéuticamente aceptable.

El soporte puede contener agentes adicionales tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores del pH o adyuvantes para aumentar la eficacia de la formulación. Los adyuvantes utilizables pueden aumentar la respuesta inmunológica

activando células presentadoras de antígeno (CPA), macrófagos o estimulando conjuntos específicos de linfocitos.

Un adyuvante según la presente invención puede ser cualquier ligando adecuado para la activación de un receptor de reconocimiento de patógenos (PRR) expresado en y sobre
5 células dendríticas (CD), células T, células B u otras células presentadoras de antígeno. Los ligando que activan la ruta del receptor del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) pueden ser adecuados para el fin de la invención. Los adyuvantes adecuados para estos ligandos pueden ser derivados de muramil dipéptido. También se pueden citar ligandos que activan los receptores de tipo tol (TLR) para el fin de la invención.
10 Esos receptores son miembros de la familia PRR y se expresan ampliamente en una variedad de células inmunes innatas, incluyendo CD, macrófagos, células cebadas y neutrófilos.

Los adyuvantes también se podrían seleccionar, por ejemplo, del grupo que incluye $AlK(SO_4)_2$, $AlNa(SO_4)_2$, $AlNH_4(SO_4)$, sílice, alumbre, $Al(OH)_3$, $Ca_3(PO_4)_2$, caolín, carbono, hidróxido de aluminio, muramil dipéptidos, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-
15 DMP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11687, también denominado nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, también denominado MTP- PE), RIBI (MPL+TDM+CWS) en una emulsión al 2 por ciento de escualeno/TWEEN® 80, lipopolisacáridos y sus varios derivados, incluyendo lípido A, adyuvante completo de Freund
20 (FCA), adyuvante incompleto de Freund, Adyuvante 65 de Merck, polinucleótidos (por ejemplo, ácidos poli IC y poli AU), cera D de *Mycobacterium tuberculosis*, sustancias encontradas en *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis*, y miembros del género *Brucella*, Titermax, ISCOMS, Quil A, ALUN, derivados de Lípido A, derivados de la toxina del cólera, derivados de HSP, derivados de LPS, derivados de MPL, matrices de péptidos
25 sintéticos o GMDP, interleuquina 1, interleuquina 2, Montanide ISA-51 y QS-21, oligonucleótido CpG, poli I:C, e IL-12, IL-15 o GM-CSF. Véase, Hunter R, US 5.554.372 y Jager E, Knuth A, WO1997028816.

Para composiciones farmacéuticas que comprenden un agente que es una molécula de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico puede estar presente en un número de sistemas
30 de distribución conocidos en la técnica, incluyendo sistemas de expresión de ácidos nucleicos, bacterianos, víricos y de mamíferos tales como, por ejemplo, construcciones de expresión recombinantes como se proporcionan en el presente documento. Las técnicas para incorporar ADN en tales sistemas de expresión se han divulgado previamente. Véase, Ulmer J, *et al.*,

Science 1993; 259:1745-1749 y Cohen J, Science 1993; 259:1691-1692. El ADN también puede estar “desnudo”. La captación de ADN desnudo puede aumentar recubriendo el ADN en bolas biodegradables, que se transportan de forma eficaz a las células.

Las moléculas de ácido nucleico se pueden administrar a células por cualquiera de
 5 varios métodos conocidos en la técnica. Véase, Akhtar S, *et al.*, Trends Cell Biol. 1992; 2:139-144, Maurer N, *et al.*, Mol. Membr. Biol. 1999; 16:129-140, Selbo P, *et al.*, Int. J. Cancer 2000; 87:853-859, Selbo P, *et al.*, Tumour Biol. 2002; 23:103-112, Sullivan S, *et al.*, WO1994002595, Hoffman A, *et al.*, US 20010007666, MacLachlan I, US 20030077829, y Beigelman L, *et al.*, US 6.395.713. Estos métodos de administración incluyen, pero no están
 10 limitados a, encapsulación en liposomas, por iontoforesis, o por incorporación en otros vehículos (por ejemplo, polímeros biodegradables, hidrogeles, ciclodextrinas, microesferas de ácido poli(láctico-co-glicólico (PLGA) y PLCA, nanocápsulas biodegradables, microesferas bioadhesivas, vectores proteináceos). Véase, González H, *et al.*, Bioconjug. Chem. 1999; 10:1068-1074, Castor T, US 20020130430, O'Hare P, *et al.*, WO 2000053722, Wang L,
 15 WO2003046185, Wang L, *et al.*, WO2003047518, y Vook N, *et al.*, US 6.447.796. En otra forma de realización, las moléculas de ácido nucleico también se pueden formular o acomplejar con polietilenimina y derivados de la misma, tal como derivados de polietilenimina-polietilenglicol-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-GAL) o polietilenimina-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-triGAL). Véase, MacLachlan I, US
 20 20030077829.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un genoma vírico de VIH-1, un vector, una célula o una composición inmunogénica o vacuna según la invención para su uso en el tratamiento o prevención de una infección por VIH-1 o una enfermedad asociada con una infección por VIH. De forma alternativa, la invención se refiere a un genoma vírico de
 25 VIH-1, un vector, una célula o una composición inmunogénica o vacuna según la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una infección por VIH o una enfermedad asociada con una infección por VIH-1. De forma alternativa, la invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención en un sujeto de una infección por VIH-1 o una enfermedad asociada con una infección por VIH que comprende la
 30 administración a dicho sujeto de un genoma vírico de VIH-1, un vector, una célula o una composición inmunogénica o vacuna según la invención.

El tratamiento beneficioso o efectos preventivos de una composición inmunogénica de VIH-1 respecto a la infección por VIH-1 o síntomas de SIDA incluye, por ejemplo, prevenir o

retrasar la infección inicial de un individuo expuesto a VIH-1; reducir la carga vírica en un individuo infectado con VIH; prolongar la fase asintomática de la infección por VIH; mantener cargas víricas bajas en pacientes infectados con VIH cuyos niveles de virus han disminuido mediante terapia antirretroviral (ART); aumentar los niveles de células T CD4 o mitigar la disminución en células T CD4, tanto específicas como no específicas de VIH-1, en 5 pacientes sin tratamiento farmacológico y en pacientes tratados con ART, aumentar la salud global o calidad de vida en un individuo con SIDA; y prolongar la esperanza de vida de un individuo con SIDA. Un médico puede comparar el efecto de la inmunización con el estado del paciente antes del tratamiento, o con el estado esperado de un paciente sin tratar, para 10 determinar si el tratamiento es eficaz en inhibir el SIDA. En una forma de realización preferida, las composiciones inmunogénicas de la invención son composiciones preventivas.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de una infección por VIH-1. Mientras que todos los animales que puedan estar afectados con VIH-1 o sus equivalentes se pueden tratar de esta manera (por ejemplo, chimpancés, macacos, 15 babuinos o seres humanos), las composiciones inmunogénicas de la invención se dirigen particularmente a sus usos terapéuticos en seres humanos. Con frecuencia, se puede requerir más de una administración para producir el efecto terapéutico deseado; el protocolo exacto (dosis y frecuencia) se puede establecer por procedimientos clínicos estándar.

La presente invención se refiere además a prevenir o reducir síntomas asociados con 20 infección por VIH. Estos incluyen síntomas asociados con la fase sintomática secundaria de la infección por VIH, incluyendo, por ejemplo, culebrilla, erupción cutánea e infección de la uñas, llagas en la boca, infección recurrente en nariz y garganta y pérdida de peso. Además, síntomas adicionales asociados con la fase sintomática principal de la infección por VIH incluyen, por ejemplo, candidiasis oral y vaginal (*Candida*), diarrea persistente, pérdida de 25 peso, tos persistente y tuberculosis reactivada o infecciones de herpes recurrentes, tal como calenturas (*herpes simplex*). Otros síntomas del SIDA completo que se pueden tratar con la presente invención incluyen, por ejemplo, diarrea, náusea y vómitos, candidiasis y llagas bucales, infecciones vaginales persistentes, recurrentes y cáncer cervical, linfadenopatía generalizada persistente (PGL), infecciones graves de la piel, verrugas y tiña, infecciones 30 respiratorias, neumonía, especialmente neumonía por *Pneumocystis carinii* (PCP), *herpes zoster* (o culebrilla), problemas del sistema nervioso, tales como dolores, entumecimiento u hormigueo en manos y pies, anormalidades neurológicas, sarcoma de Kaposi, linfoma, tuberculosis u otras infecciones oportunistas similares.

En una forma de realización preferida, las composiciones inmunogénicas o vacunas según la invención se administran al sujeto del que se aislaron la partícula vírica o células dendríticas. Por tanto, en una forma de realización preferida, el sujeto que se va a tratar es el mismo sujeto del que aisló la partícula vírica de VIH-1.

5 En otra forma de realización preferida, el sujeto al que se administra la composición inmunogénica o vacuna está en terapia antirretroviral (ART), preferiblemente en terapia antirretroviral altamente activa (HAART).

Todas las publicaciones mencionadas anteriormente en el presente documento se incorporan al mismo en su totalidad mediante referencia.

10 Mientras que la invención anterior se ha descrito en algún detalle para fines de claridad y entendimiento, el experto en la materia apreciará de una lectura de esta divulgación que se pueden hacer varios cambios en forma y detalle sin separarse del verdadero ámbito de la invención y reivindicaciones adjuntas.

15 A. Procedimientos generales

1. Cultivos celulares

Las células de sangre periférica de donantes seronegativos de VIH-1 fueron
 20 proporcionados por el Banc de Sang i de Teixits (BST, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Badalona, ES) o compradas (EFS, Etablissement Français du Sang, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, FR). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron de una centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll estándar. Las poblaciones de monocitos purificados se aislaron con bolas magnéticas con selección CD14⁺ (Miltenyi Biotec
 25 GmbH, Bergisch Gladbach, DE) y se cultivaron con RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10% (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE UU), 1000 U/ml de GM-CSF e IL-4 (R&D) durante 5 días. El medio de cultivo que contenía GM-CSF e IL-4 se cambió los días 2 y 5 de diferenciación de células dendríticas (CD). El día 5 las CD se maduraron añadiendo: i) 100 ng/ml de LPS (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EE UU) o ii) IL-1 β 300 U/ml, IL-61000
 30 U/ml, TNF- α 1000 U/ml (CellGenix GmbH, Freiburg, DE) y PGE₂ 1 μ g/ml (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EE UU) (en adelante denominado "ITIP"). Se determinó el inmunofenotipo de monocitos después del aislamiento de PBMC, CD inmaduras derivadas de monocitos (CDi) y CD derivadas de monocitos completamente maduras (CDm) el día 7

mediante citometría de flujo (citómetro de flujo FACSCalibur; BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, EE UU). Los anticuerpos monoclonales (Acm) usados en la determinación del inmunofenotipo celular fueron: CD14-FITC y -PE (clon M5E2, Pharmingen, BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, EE UU), CD209-PE y -APC (clon DCN46, Pharmingen, BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, EE UU), CD4-PerCP (clon SK3, BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, EE UU), HLA-DR-PE y -PerCP (clon L243, BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, EE UU), HLA-Clase I-FITC (clon W6/32, (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EE UU), CD86-FITC (clon 2331, Pharmingen, BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, EE UU), CD83-PE y -APC (clon HB15e, Pharmingen, BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, EE UU), y CD80-PE-Cy5 (clon L307.4, Pharmingen, BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, EE UU).

Se mantuvieron las líneas celulares TZM-bl (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, NIH, Bethesda, MD, EE UU y Tranzyme, Inc., Durham, NC, EE UU) y HEK-293T en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE UU) suplementado con suero bovino fetal al 10%. TMZ-bl es una línea celular HeLa genéticamente manipulada que expresa CD4, CXCR4 y CCR5 y contiene genes indicadores de luciferasa inducible por Tat y β -Gal. Véase, Wei X, *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46(6):1896-1905. Todos los medios contenían 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE UU).

20

2. Clones de células T específicos de VIH

Los clones de células T CD4⁺ N2 y F12 específicos para p24^{gag} de VIH (aa 271-290) y restringidos por HLA-DR β *04 o HLA-DR β *01 respectivamente, se usaron para seguir la presentación de antígenos de HLA-II. Los clones de células T CD8⁺ EM40-F21 y SL9-2 específicos para p17^{gag} de VIH (aa 77-85, péptido SL9) y restringidos por HLA-A2 se usaron para seguir la presentación de antígenos de HLA-I. Los clones de células T se reestimularon y expandieron como se ha descrito previamente usando alimentadores irradiados y líneas celulares linfoblastoides autólogas (LCL) cargadas con péptidos análogos en medio de clonación de células T (RPMI 1640 que contenía suero AB (SAB) al 5%, rhIL-2 100 U/ml y fitohemaglutinina (PHA) 1 μ g/ml (PAA) complementado con aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE UU). Al menos 4 horas antes de los cocultivos con CD, los clones de células T se descongelaron y se dejaron reposar en

30

medio de clonación sin PHA. Véase, Moris A, *et al.*, Blood 2004; 103(7):2648-2654 y Moris A, *et al.*, Blood 2006; 108(5):1643-1651.

3. Soluciones madre víricas y plásmidos

5

Se generaron soluciones madre de VIH-1 CXCR4-trópico de longitud completa y competente para replicación (VIH_{NL4-3}) y VIH-1 CXCR4-trópico deficiente en integrasa (VIH_{NL4-3ΔIN}) transfectando la construcción provírica pNL4-3 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, NIH, Bethesda, MD, US) y pNL4-3ΔIN con fosfato de calcio (CalPhos; BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, EE UU) en células HEK-293T. El vector provírico pNL4-3 se manipuló para generar el vector VIH-1 CXCR4-trópico deficiente en integrasa pNL4-3ΔIN (SEQ ID NO:1). Tanto pNL4-3 como pNL4-3ΔIN se modificaron para expresar el epítipo óptimo (SLYNTVATL) (SEQ ID NO: 2) y de escape (SLENTIAVL) (SEQ ID NO: 3) descritos para p17^{gag} 77-85 (epítipo SL9) restringido por HLA-A2. Véase, Lllano A, *et al.*, How to optimally define optimal cytotoxic t-lymphocyte epitopes in HIV infection? en Korber B, *et al.*, Eds., “Theoretical Biology and Biophysics” (Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, Nuevo México, EE UU, 2009) e Iversen A, *et al.*, Nat. Immunol. 2006; 7:179-189. Se recogieron sobrenadantes que contenían los virus 48 horas después de la transfección, posteriormente se filtraron (Millex HV, 0,45 μm; Millipore Corp., Billerica, MA, EE UU), se concentraron usando el kit concentrador Lenti-X (Clontech Labs., Inc., Mountain View, CA, EE UU) y se congelaron a -80°C hasta su uso.

Para el ensayo de fusión vírica, se produjeron viriones de VIH-1 que contenían la quimera β-lactamasa-Vpr (BlaM-Vpr) como se ha descrito previamente. Véase, Cavrois M, *et al.*, Nat. Biotechnol. 2002; 20:1151-1154. Brevemente, se cotransfectaron células HEK-293T con 60 μg de ADN provírico pNL4-3 o pNL4-3ΔIN, 20 μg de pCMV-BlaM-Vpr (Addgene Inc., Cambridge, MA, EE UU) y 10 μg de vectores pAdVantage (Promega Corp., Madison, WI, EE UU). Se recogieron sobrenadantes que contenían los virus 48 horas después, se filtraron (Millex HV, 0,45 μm; Millipore Corp., Billerica, MA, EE UU), ultracentrifugaron a 72.000 g durante 90 minutos a 4°C y se congelaron a -80°C hasta su uso. El contenido en p24^{Gag} de todas las soluciones madre de virus se determinó mediante un ensayo ELISA (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, EE UU). Se determinaron los títulos de todos los virus usando la línea celular indicadora TZM-bl. Véase, Li M, *et al.*, J. Virol. 2005; 79(16):10108-

10125. Se ensayó la actividad luciferasa de las células 48 horas después de la infección (Sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo, Promega Corp., Madison, WI, EE UU) en un luminómetro Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE UU).

5 4. *Ensayo de fusión vírica*

El ensayo de fusión vírica se realizó como se ha descrito previamente. Véase, Li, 2005, anteriormente. Brevemente, se infectaron 5×10^5 células T Jurkat con 400 ng de p24^{Gag} de HIV_{NL4-3} o HIV_{NL4-3ΔIN} que contenían BlaM-Vpr durante 4 horas (inoculación centrífuga a 10 6000 g durante 90 minutos a 22°C e incubación durante 2,5 horas a 37°C y CO₂ al 5%) en presencia o ausencia de inhibidor de fusión C34 5 μg/ml (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, NIH, Bethesda, MD, EE UU). Las células se lavaron después en medio independiente de CO₂ (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE UU) para eliminar viriones libres y se cargaron con colorante CCF2-AM 1 mM (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE UU) 15 durante 1 hora a temperatura ambiente como recomienda el fabricante. Después de dos lavados con medio de revelado (medio independiente de CO₂ suplementado con SBF al 10%), se dejó seguir el corte de BlaM de la reacción de CCF2 en la oscuridad durante 16 horas a temperatura ambiente en 200 μl de medio de revelado. Por último, las células se lavaron con PBS y se fijaron en una solución de paraformaldehído al 1,2%. La degradación de CCF2-AM 20 por corte de BlaM y su cambio en la fluorescencia de emisión se midió por citometría de flujo usando un BD LSR II (BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, EE UU). Los datos se recogieron con el software FACSDiva (BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, EE UU) y se analizaron con el software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EE UU).

25 5. *Captura vírica por células dendríticas y ensayos de transinfección*

Se incubaron un total de $2,5 \times 10^5$ CDi y CDm maduras durante 48 horas con ITIP (CDm ITIP) o con LPS (CDm LPS) de al menos 7 donantes diferentes a 37°C durante 6 horas con 50 ng de p24^{Gag} de HIV_{NL4-3} o HIV_{NL4-3ΔIN} a una concentración final de 1×10^6 30 células/ml. Durante el pulso vírico, una parte de las CDi se maduraron con ITIP (CDi+ITIP) y otra con LPS (CDi+LPS). Después de la incubación, las células se lavaron extensamente con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar las partículas víricas no capturadas, y se lisaron con Triton X-100 al 0,5% a una concentración final de 5×10^6

células/ml. Los lisados se clarificaron de restos celulares por centrifugación para medir el contenido de antígeno p24^{Gag} intracelular mediante un ensayo ELISA (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, EE UU) como se ha descrito previamente. Véase Izquierdo-Useros N, *et al.*, J. Virol. 2007; 81:7559-7570. Antes de la lisis, se cocultivaron 10⁴ CD pulsadas con VIH-1 con la línea celular indicadora TZM-bl a una relación 1:1 por pocillo en una placa de 96 pocillos, en un volumen final de 100 µl. Se ensayó la actividad luciferasa de las células después de 48 horas de cocultivo (Sistema de ensayo de luciferasa Brighty-Glo, Promega Corp., Madison, WI, EE UU) en un luminómetro Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE UU). Se sustrajeron valores de fondo que consistían en cocultivo de CD no expuestas a VIH-TZM-bl para cada condición celular.

6. Ensayo de presentación de antígenos

Para los experimentos de presentación antígenos de HLA-I, se usaron PBMC de donantes HLA-A2⁺ para generar CD. CDi o CDm maduras durante 48 horas con ITIP (CDm ITIP) o con LPS (CDm LPS) se expusieron durante 24 horas a los virus indicados (500 ng de p24^{Gag}/ml por 1 x 10⁶ células) a 37°C y CO₂ al 5% en medio de cultivo con IL-4, GM-CSF, azidotimidina (AZT) 5 µM y nevirapina (NVP) 1,2 µM (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EE UU). De forma alternativa, se cargaron CDi con VIH como antes y se maduraron simultáneamente con ITIP (CDi+ITIP) o con LPS (CDi+LPS). Las células se lavaron después extensamente con PBS para eliminar virus sin capturar y se cocultivaron durante 16-18 horas con clones de LTC EM40-F21 o SL9-2. La activación de células T se siguió usando un ensayo ELISPOT de IFN γ como se ha descrito previamente. Véase, Moris, 2004, anteriormente. Como control positivo, se cargaron CD con 0,1 µg/ml de péptido análogo en las mismas condiciones que las células pulsadas con VIH con activación óptima y lavado extenso antes de cocultivar con células T. Se restaron valores de control negativo que consistía en cocultivo de CD no expuestas a VIH-clones de células T CD8⁺.

Para los experimentos de presentación de antígeno de HLA-II, se usaron PBMC de donantes HLA-DR β *04 o HLA-DR β *01 para generar CD. CDi o CDm maduras durante 48 horas con ITIP (CDm ITIP) o con LPS (CDm LPS) se expusieron durante 6 horas a los virus indicados (285 ng de p24^{Gag}/ml por 1 x 10⁶ células) a 37°C y CO₂ al 5% en medio de cultivo con AZT 5 µM y NVP 1,2 µM (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EE UU). A continuación, las células se lavaron extensamente con PBS para eliminar virus sin capturar y

se cultivaron durante la noche con IL-4, GM-CSF, AZT y NVP. De forma alternativa, se cargaron CDi con VIH como antes y se maduraron simultáneamente con ITIP (CDi+ITIP) o con LPS (CDi+LPS). A continuación, las células se lavaron con PBS y se cocultivaron durante 16-18 horas con clones de células T CD4⁺ N2 o F12. La activación de células T se siguió usando un ensayo ELISPOT de IFN γ . Como control positivo, se cargaron CD con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de péptido análogo en las mismas condiciones que las células pulsadas con VIH con activación óptima. Se restaron valores de control negativo que consistía en cocultivo de CD no expuestas a VIH-clones de células T CD4⁺.

10 7. Microscopía electrónica y análisis estadístico

Para el análisis por microscopía electrónica de la captura vírica por CD, las células se procesaron como se ha descrito previamente. Véase Izquierdo-Useros, 2007, anteriormente. Brevemente, se pulsaron 3×10^6 CDm LPS a 37°C durante la noche con 1.600 ng de p24^{Gag} de HIV_{NL4-3} o HIV_{NL4-3 Δ IN}. Después, las células se lavaron extensamente con PBS y se fijaron en glutaraldehído al 2,5% durante 1 hora. A continuación, las células se procesaron para análisis de secciones ultrafinas usando un microscopio electrónico Jeol JEM 1010 (Jeol Ltd., Tokio, JP). Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software de GraphPad Prism v.5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE UU).

20

B. Ejemplos

Ejemplo 1

Maduración de CD y captura de VIH-1

25

Se obtuvieron CD completamente maduras cultivando CD inmaduras (CDi) con ITIP (CDm ITIP) o LPS (CDm LPS) durante 48 horas. Después, se incubaron CDi y CD completamente maduras con HIV_{NL4-3} o HIV_{NL4-3 Δ IN} durante 6 horas. Después de un lavado extenso, parte de las células se lisaron y se determinó el VIH-1 asociado con CD. Las células restantes se cocultivaron con la línea indicadora TZM-bl para ensayar la transfección mediada por CD. La maduración de CD con LPS (CDm LPS) aumentó la captura de VIH-1 comparada con CDi (>5 veces, P=0,0039, prueba de Wilcoxon para datos emparejados) y produjo una mayor transfección de HIV_{NL4-3} a células diana (>7 veces, P=0,0156). El

HIV_{NL4-3ΔIN} fue capturado con la misma eficacia que el HIV_{NL4-3} salvaje por CD (P=NS, prueba de Wilcoxon para datos emparejados). Véase, la figura 1. Inesperadamente, la maduración de CD con ITIP (CDm ITIP) ni aumentó la captación ni la transmisión de HIV_{NL4-3} y permaneció a niveles similares que las CDi. Los marcadores fenotípicos de maduración y diferenciación entre CDm LPS y CDm ITIP no divergieron. Véanse las figuras 3 y 4.

Posteriormente, las capacidades de captación y transfección de CD maduras con LPS (CDi+LPS) o con ITIP (CDi+ITIP) durante la captura vírica se compararon con CD completamente maduras antes de la incubación con HIV-1. El objetivo de esta comparación era evaluar si la maduración de las CD durante la carga del antígeno tenía influencia en la captura vírica y posterior transmisión de VIH-1 a células susceptibles. Véase, Ahlers J, *et al.*, Trends Mol. Med. 2009; 15:263-274 y Palucka K, *et al.*, Immunity 2010; 33:464-478. Sorprendentemente, no solo las CDi+ITIP, sino también las CDi+LPS, mostraron malas capacidades de captura y transmisión relativas a CDi. Véase la figura 1. La maduración de CD con LPS durante el pulso vírico (CDi+LPS) no aumentó la captura de VIH-1 a los niveles observados en CDm LPS. Por tanto, las CD completamente maduras con LPS (CDm LPS) mantuvieron la mayor capacidad de capturar y transmitir VIH-1 a células susceptibles. Estos resultados muestran que la captura y transmisión de VIH-1 mediadas por CD depende no solo en el estado de maduración de las CD, sino también de los estímulos de activación usados para la maduración, así como del intervalo de tiempo entre la maduración de CD y la carga de antígeno. Véase, Izquierdo-Useros, 2007, anteriormente y Sanders R, *et al.*, J. Virol. 2002; 76:7812-7821.

En todos los subconjuntos de células, la captura vírica se correlaciona con la transfección vírica de HIV_{NL4-3} a células diana, con mayor capacidad de CDm LPS (P=0,0156, prueba de Wilcoxon para datos emparejados). La transfección de HIV_{NL4-3ΔIN} se abrogó por completo en todas las condiciones celulares (P=0,0156, prueba de Wilcoxon para datos emparejados).

Por otra parte, HIV_{NL4-3ΔIN} fue capturado por CD con la misma eficacia que HIV_{NL4-3} competente en replicación. Véase la figura 1. Posteriormente, se analizó la conservación de la integridad y funcionalidad de la envuelta de HIV_{NL4-3ΔIN}. Mediante ensayos de fusión vírica, se demostró que HIV_{NL4-3ΔIN} era tan fusogénico como el HIV_{NL4-3} salvaje e igualmente susceptible al inhibidor de fusión C34, incluso aunque faltara su región codificante de integrasa entera. Véase la figura 5A; Cavrois, 2002, anteriormente.

Además, para evaluar si el HIV_{NL4-3ΔIN} seguía el mismo transporte intracelular que el HIV_{NL4-3} salvaje en CD, se siguieron ambas partículas víricas en paralelo por microscopía electrónica en CDm LPS. Los viriones HIV_{NL4-3} y HIV_{NL4-3ΔIN} mostraron una estructura idéntica, con un núcleo denso a los electrones característico y acumulación similar en compartimentos intracelulares. Véanse las figuras 5A y 5B. Estos descubrimientos indican que la falta de integrasa en HIV_{NL4-3ΔIN} no altera la fusogenicidad y morfología vírica y que HIV_{NL4-3ΔIN} se comporta como el virus salvaje para todos los fines prácticos, a pesar de no ser infeccioso.

10

Ejemplo 2

Captura vírica y actividad de células T

Se evaluó la capacidad de CDi, CDm ITIP, CDm LPS, CDi+ITIP y CDi+LPS para presentar antígenos derivados de VIH-1 a células T CD4⁺ y CD8⁺ para elucidar, si había alguna, la correlación entre presentación de antígenos y activación de células T a captura vírica. Para este fin se utilizaron varios clones de células T específicos de VIH previamente generados. Para seguir la presentación de antígeno de VIH-1 HLA-I, se usaron dos clones diferentes de células T CD8⁺ EM40-F21 y SL9-2 específicos para p17^{Gag} (aa 77-85) de VIH-1 y restringidos por HLA-A*02. Véase, Moris, 2004, anteriormente. Como el HIV_{NL4-3} salvaje y su HIV_{NL4-3ΔIN} derivado no presentaban el epítipo SL9 consenso restringido por HLA-A*02, HIV_{NL4-3} y HIV_{NL4-3ΔIN} se manipularon para expresar la secuencia SL9 óptima (SLYNTVATL) (SEQ ID NO: 2) o la variante de escape (SL~~E~~NTI~~A~~V~~L~~) (SEQ ID NO: 3) del epítipo SL9. Véase, Llano, 2009 e Iversen, 2006, anteriormente. Se usaron dos clones de células T CD4⁺ N2 y F12 específicos para p24^{Gag} (aa 271-290) de VIH-1 y restringidos por HLA-DRβ*04 o HLA-DRβ*01, respectivamente, para evaluar la presentación de antígeno de HLA-II. Véase, Moris, 2005, anteriormente. Se expusieron CD con HLA coincidentes para cada clon de células T específico de VIH-1 durante 24 horas (ensayos de HLA-I) o 6 horas (ensayos de HLA-II) a HIV_{NL4-3} o HIV_{NL4-3ΔIN}. La activación de células T se siguió usando ELISPOT de IFN γ después del cocultivo durante la noche de CD pulsadas con VIH con clones de células T específicos de VIH. Véase la figura 2. Todos los ensayos se realizaron en presencia de NVP y AZT para prevenir la replicación vírica y garantizar que la activación de los clones de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicos de VIH no era debido a la presentación de síntesis vírica *de novo* en CD.

Las CDm LPS cargadas con HIV_{NL4-3} o HIV_{NL4-3ΔIN} no aumentaron la activación de células T CD8⁺ específicas de VIH comparada con CDi. Véase la figura 2. Esto estaba en contraste con la captura vírica extremadamente alta y expresión de moléculas de HLA observada con CDm LPS. Véanse las figuras 1, 3A y 3C. Por tanto, la captura vírica
5 aumentada no se correlaciona con mejor activación de células T.

Inducir la maduración de CD completa con ITIP tuvo un efecto moderado, si alguno, sobre la activación de LTC específicos de VIH. Véase la figura 2. Se ha mostrado previamente que la presentación de antígeno de VIH exógeno restringido por HLA-I requiere fusión de las membranas vírica y celular de una manera dependiente de CD4/correceptor y la
10 liberación de la cápside VIH-1^{Gag} en el citosol de las CD para procesamiento por proteasomas y carga de HLA-I. Véase, Buseyne F, *et al.*, Nat. Med. 2001; 7:344-349 y Sabado R, *et al.*, Eur. J. Immunol. 2007; 37:1752-1763. Sin embargo, la maduración de CD se asocia con una caída en la fusión de VIH-1, que, a su vez, tiene un impacto directo en la capacidad de CD maduras de apoyar la replicación vírica. Véase, Cavrois, 2002, anteriormente, y Dong C, *et al.*, J. Virol. 2007; 81:11352-11362. Esto puede explicar por qué las CD maduras con LPS
15 o ITIP que muestran niveles altos de HLA-I y moléculas coestimuladoras indujeron una estimulación baja de clones de células T CD8⁺ específicos de VIH.

A pesar de su alta capacidad de captura vírica, las CDm LPS no aumentaron la activación de CD4⁺ específicas de VIH cargadas con HIV_{NL4-3} o HIV_{NL4-3ΔIN} (establecido en
20 la figura 1A).

De forma interesante, comparadas con CDm ITIP o CDm LPS, las CDi indujeron un aumento de 3 veces en la activación de clones de células T CD4⁺ específicas de VIH, lo que está en contraste con su expresión reducida de moléculas de HLA-II y coestimuladoras y su mala capacidad de capturar viriones VIH-1. Véanse las figuras 1, 2, 3B y 3D. Estos resultados
25 sugieren fuertemente que la captura de VIH-1 por CDm LPS no dirige viriones de VIH hacia compartimentos de degradación y carga de HLA.

Ejemplo 3

Maduración de CD con LPS durante la captura vírica y 30 presentación de antígenos de HLA-I y HLA-II

A continuación se examinó el efecto de la maduración de CDi durante la carga de VIH-1 en la presentación de antígenos por moléculas de HLA-I y HLA-II. Para los ensayos de

presentación de antígenos de HLA-I, las CDi se maduraron con ITIP o LPS (CDi+ITIP y CDi+LPS, respectivamente) y simultáneamente se pulsaron con HIV_{NL4-3} o HIV_{NL4-3ΔIN} que expresaban la variante óptima (SLYNTVATL) (SEQ ID NO: 2) o de escape (SLENTIAVL) (SEQ ID NO: 3) del epítipo SL9 durante 24 horas. Véase, Llano, 2009 e Iversen, 2006, 5 anteriormente. Para los experimentos de HLA-II, las CDi se incubaron con HIV_{NL4-3} o HIV_{NL4-3ΔIN} durante 6 horas y después se maduraron con ITIP o LPS (CDi+ITIP y CDi+LPS, respectivamente). Después de cocultivar durante la noche CD pulsadas con VIH con clones de células T específicos para VIH, la presentación de antígeno se cuantificó por ELISPOT de IFN γ . Véase la figura 2. Todos los ensayos se realizaron en presencia de NVP y AZT para 10 asegurar que los antígenos no derivan de proteínas de VIH sintetizadas de nuevo.

Se usó el clon de células T CD8⁺ SL9 p17^{Gag} VIH EM40-F21 (aa 77-85) restringido por HLA-A2 para el análisis de presentación de antígenos de HLA-I exógenos. Se usó el clon de células T CD4⁺ p24^{Gag} VIH N2 (aa 271-290) restringido por HLA-DR β *04 para evaluar la presentación de antígenos de HLA-II.

15 En contraste con CDm ITIP y CDm LPS, las CDi+ITIP y CDi+LPS cargadas con VIH indujeron una activación mayor de células T CD8⁺ específicas de VIH que las CDi. Véase la figura 2. Tanto HIV_{NL4-3} como HIV_{NL4-3ΔIN} fueron igualmente presentados de forma cruzada a células T CD8⁺ específicas de VIH. Se observaron diferencias minoritarias en la presentación de antígeno de HLA-I entre CD que maduran con LPS e ITIP, aunque las CDi+LPS 20 representaron un aumento de >3 veces en la secreción de IFN γ e ITIP un cambio de >1,5 veces comparadas con sus homólogas completamente maduras (CDm LPS y CDm ITIP, respectivamente). Es digno de mencionar que ni la captura vírica aumentada ni la expresión de moléculas de HLA-I se correlacionaron con mejor activación de T CD8⁺. Véanse la figura 3A y 3C. Como se esperaba, tanto HIV_{NL4-3} como HIV_{NL4-3ΔIN} que expresaban la variante de 25 escape (SLENTIAVL) (SEQ ID NO: 3) del epítipo SL9 no indujeron respuestas en el clon de células T CD8⁺ EM40-F21 en ninguna condición de CD. Véase la figura 6. Como se ha establecido previamente, la maduración de CD restringe la fusión de membranas vírica y celular, pero la fusión de VIH es crucial para el procesamiento proteosómico citosólico de las proteínas Gag y la presentación adecuada de antígenos de HLA-I. Véase Buseyne, 2001, 30 Cavrois, 2002 y Sabado, 2007, anteriormente. Aunque las CDi capturan cantidades menores de viriones, VIH-1 es más capaz de fusionarse. Esta propiedad podría ser útil para aumentar la captación de antígeno y la presentación de antígenos de HLA-I de péptidos derivados de VIH.

Comparada con CDm LPS y CDm ITIP, la maduración con LPS de CDi después del pulso vírico (CDi+LPS) sustancialmente aumentó la activación de las células T CD4⁺ específicas de VIH. Véase la figura 2. Una vez más, la capacidad de activar clones de células T CD4⁺ específicos de VIH no se correlacionaba con la capacidad de capturar VIH y los niveles de expresión de HLA-II. Véanse las figuras 1 y 3. Por otra parte, la maduración de CDi con ITIP después (CDi+ITIP), más que antes (CDm ITIP), de la captación de antígeno, no mejoró la presentación de antígenos de HLA-II. Véase la figura 2. Estos resultados subrayan que la maduración de CD antes o después de la carga de antígeno no garantiza que activación eficaz de células T CD4⁺.

El tipo de activación (inducida por ITIP o LPS) también determina la capacidad de procesar y presentar antígeno. Se ha descrito que la presencia de ligandos de TLR4 (tales como LPS) junto con la carga de antígeno en fagosomas fomenta la presentación de antígenos a células T CD4⁺. Además, la maduración de CD con LPS facilita la proteólisis del antígeno y la formación eficaz de complejos péptido-HLA-II por acidificación de lisosomas. Véase, Manickasingham S, *et al.*, J. Immunol. 2000; 165:5027-5034, Blander J, *et al.*, Nature. 2006; 440:808-812 y Trombetta E, *et al.*, Science 2003; 299:1400-1403. De forma interesante, las CD cargadas con HIV_{NL4-3ΔIN} deficiente en integrasa indujeron una activación comparable a CD cargadas con HIV_{NL4-3} en clones de células T tanto CD8⁺ como CD4⁺ específicos de VIH, lo que demuestra adicionalmente que no se necesita replicación vírica para la presentación de antígenos derivados de VIH. HIV_{NL4-3ΔIN} representa un inmunógeno prometedor para el desarrollo de una vacuna contra VIH ya que se procesa y presenta por CD como el VIH salvaje.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener una célula presentadora de antígeno cargada con antígeno *in vitro* que comprende poner en contacto una célula dendrítica inmadura con un inmunógeno que comprende dicho antígeno en condiciones adecuadas para el procesamiento del inmunógeno y presentación por la célula presentadora de antígeno,
5 en donde dicho método comprende además colocar la célula dendrítica inmadura en condiciones adecuadas para la maduración de dicha célula dendrítica inmadura a una célula dendrítica madura en donde el paso de maduración de la célula dendrítica inmadura se lleva a cabo simultáneamente con el paso de poner en contacto la célula
10 dendrítica inmadura con un inmunógeno durante al menos parte de dicho paso de contacto.
2. El método según la reivindicación 1 en donde las condiciones adecuadas para la maduración de la célula dendrítica inmadura a una célula dendrítica madura comprende la incubación de dicha célula en un medio que comprende un agente de maduración de
15 células dendríticas seleccionado del grupo que consiste en:
- (i) un ligando de TLR4, en donde dicho ligando de TLR4 es LPS y
 - (ii) una mezcla de citocinas proinflamatorias que comprende una mezcla de IL-1 β , IL-6 y TNF- α y, además, una prostaglandina.
- 20
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en donde el inmunógeno es un inmunógeno de VIH.
4. El método según la reivindicación 3 en donde el inmunógeno de VIH es una partícula
25 de VIH.
5. El método según la reivindicación 4 en donde la partícula vírica de VIH-1 carece de una proteína integrasa funcional.
- 30
6. Una célula presentadora de antígeno cargada con antígeno obtenible por un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Una composición inmunogénica o una vacuna que comprende una célula presentadora de antígeno según la reivindicación 6.

8. Uso de una célula presentadora de antígeno según la reivindicación 6 para la preparación de un medicamento

5

9. Uso de una célula presentadora de antígeno según la reivindicación 6 para la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad que requiere una respuesta inmune contra el antígeno que está cargado en la célula presentadora de antígeno.

10

10. Un método según la reivindicación 5 en donde la célula dendrítica que se carga con la partícula vírica de VIH-1 se ha obtenido por maduración de una célula dendrítica inmadura usando un agonista de TLR4, en donde dicho agonista de TLR4 es LPS.

15

11. Una célula dendrítica cargada con una partícula vírica de VIH-1 que carece de una proteína integrasa funcional obtenible por el método según de la reivindicación 10.

12. Una composición inmunogénica o una vacuna que comprende una célula dendrítica según la reivindicación 11.

20

13. Uso de una célula dendrítica según la reivindicación 11 para la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de una infección por VIH o una enfermedad asociada con una infección por VIH.

25

30

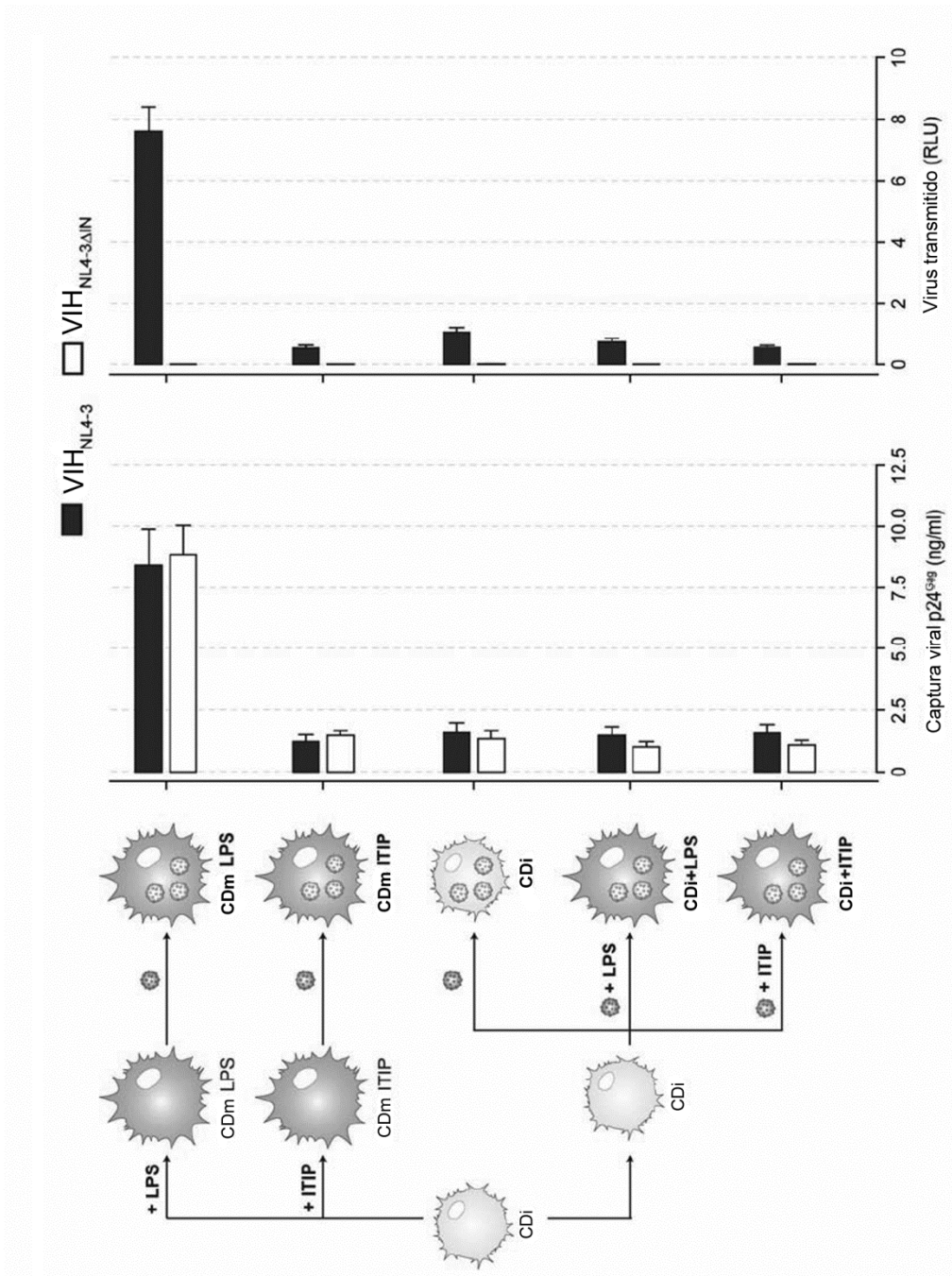


FIGURA 1

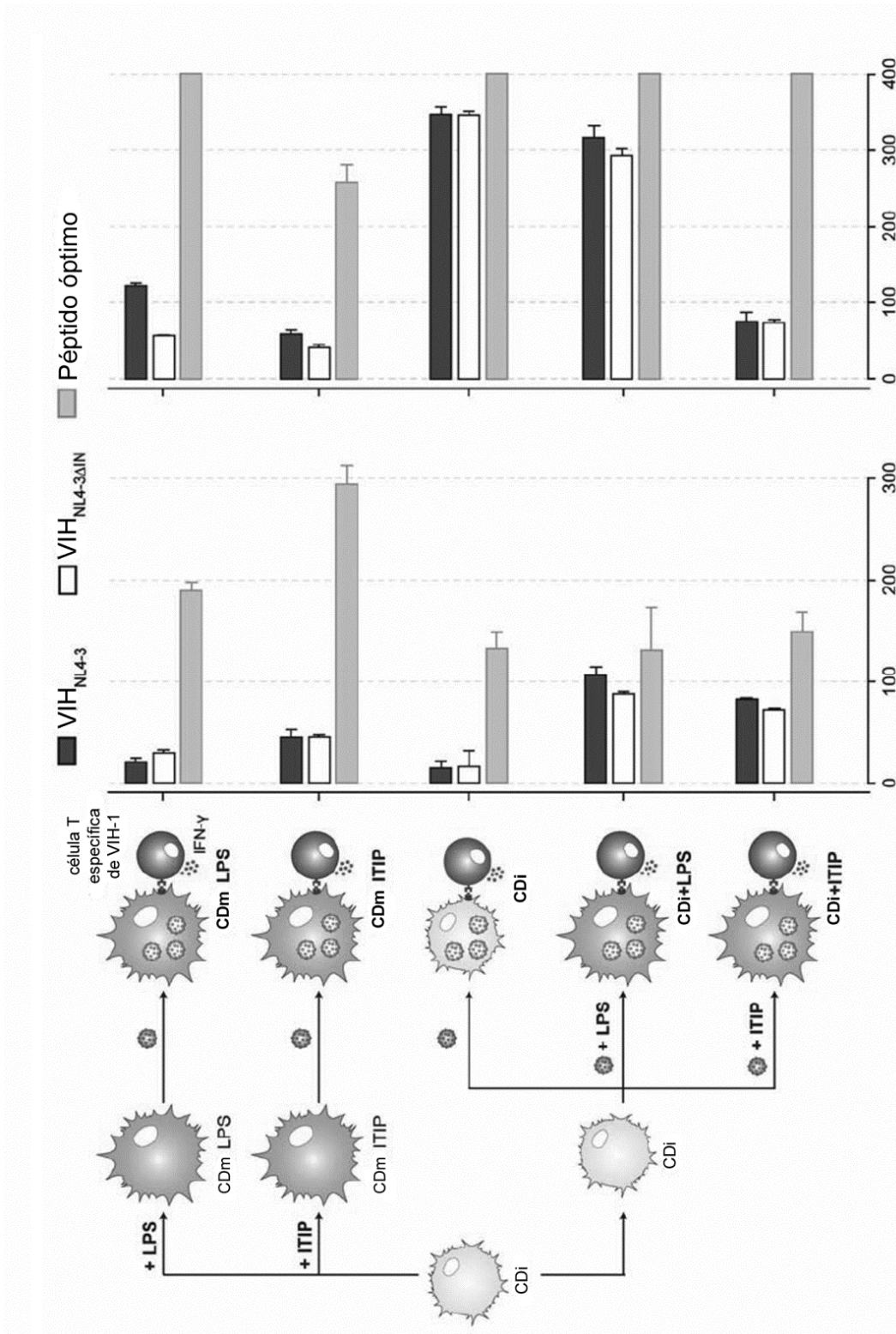


FIGURA 2

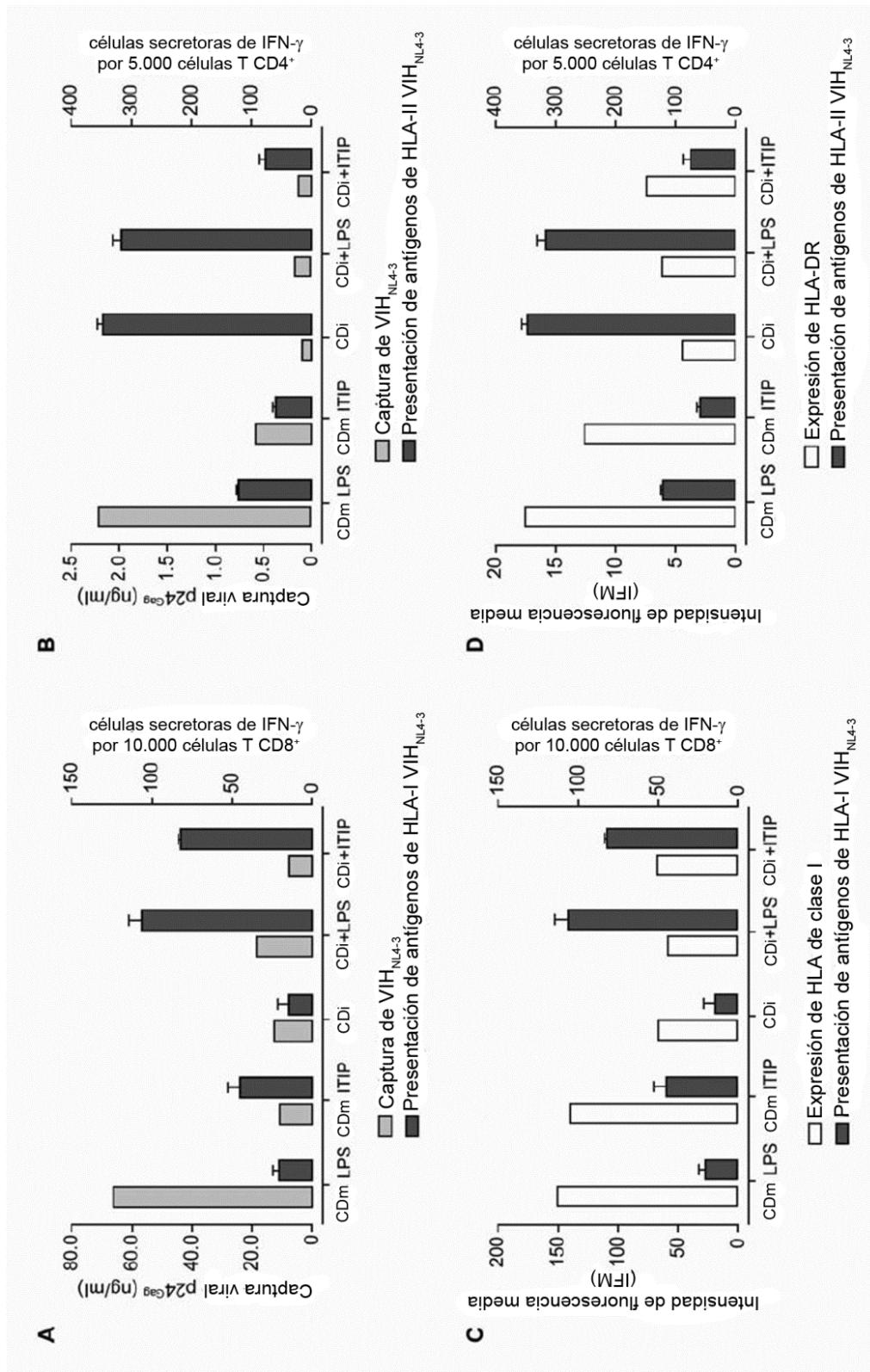


FIGURA 3

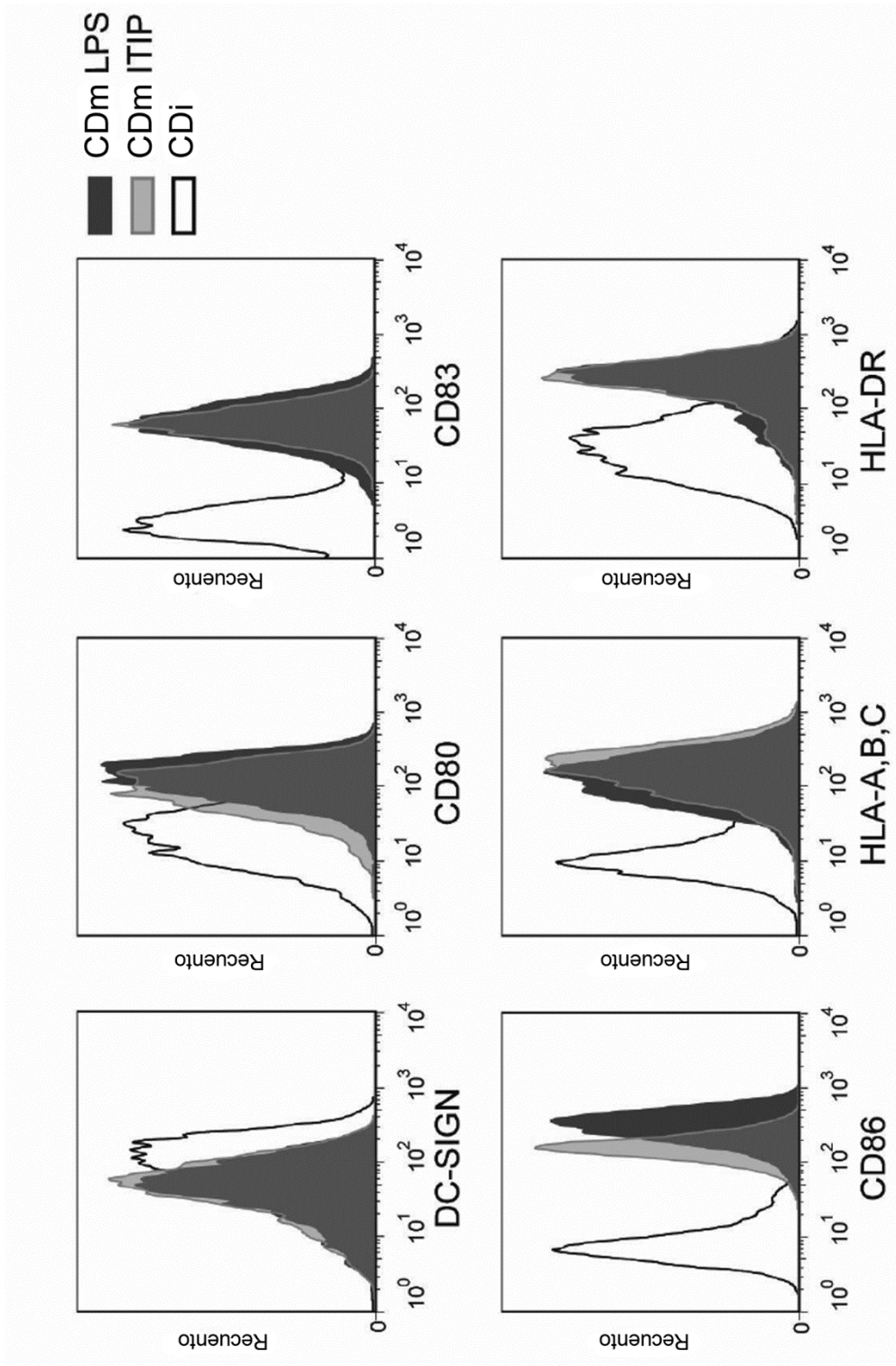


FIGURA 4

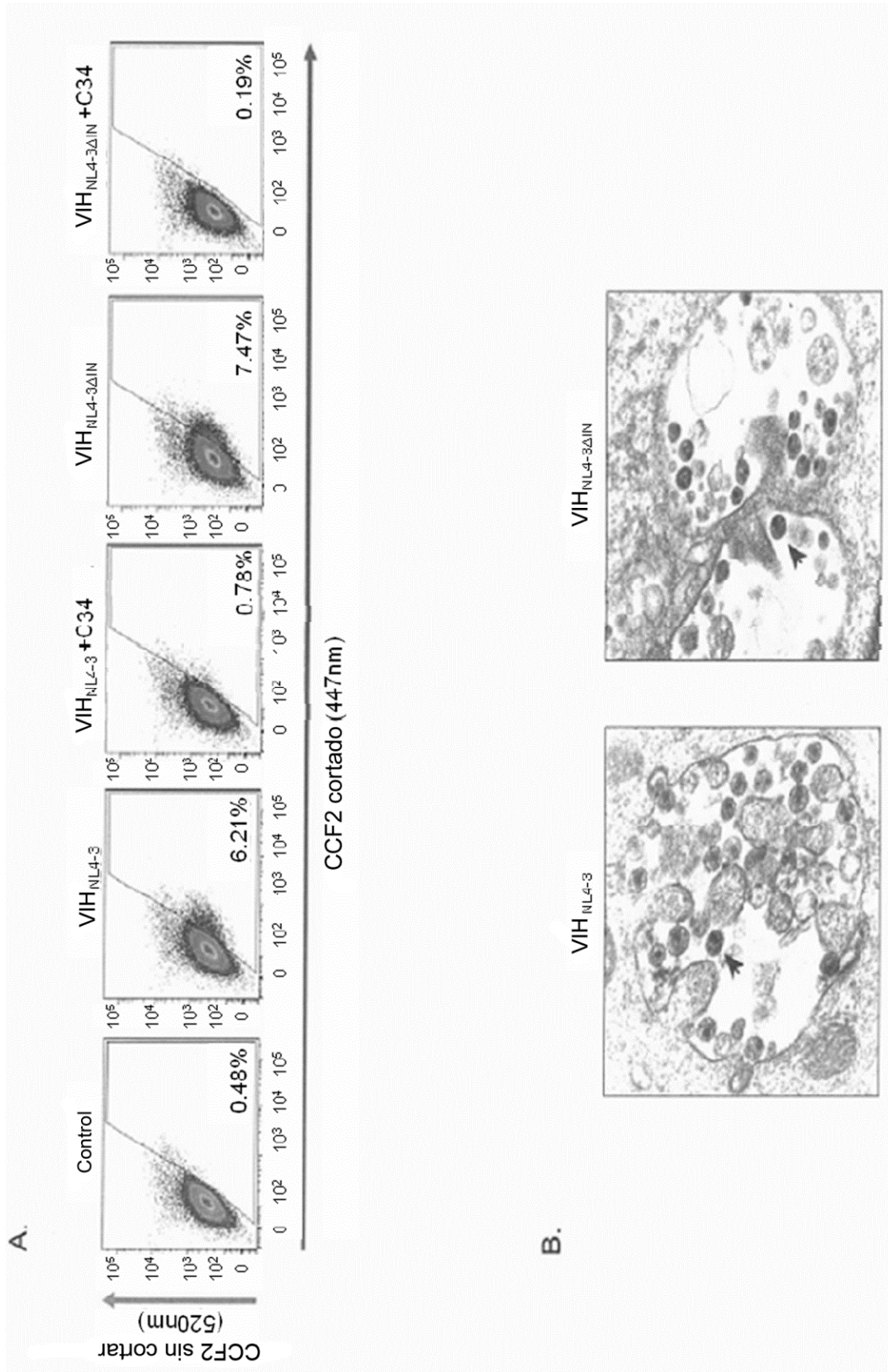


FIGURA 5

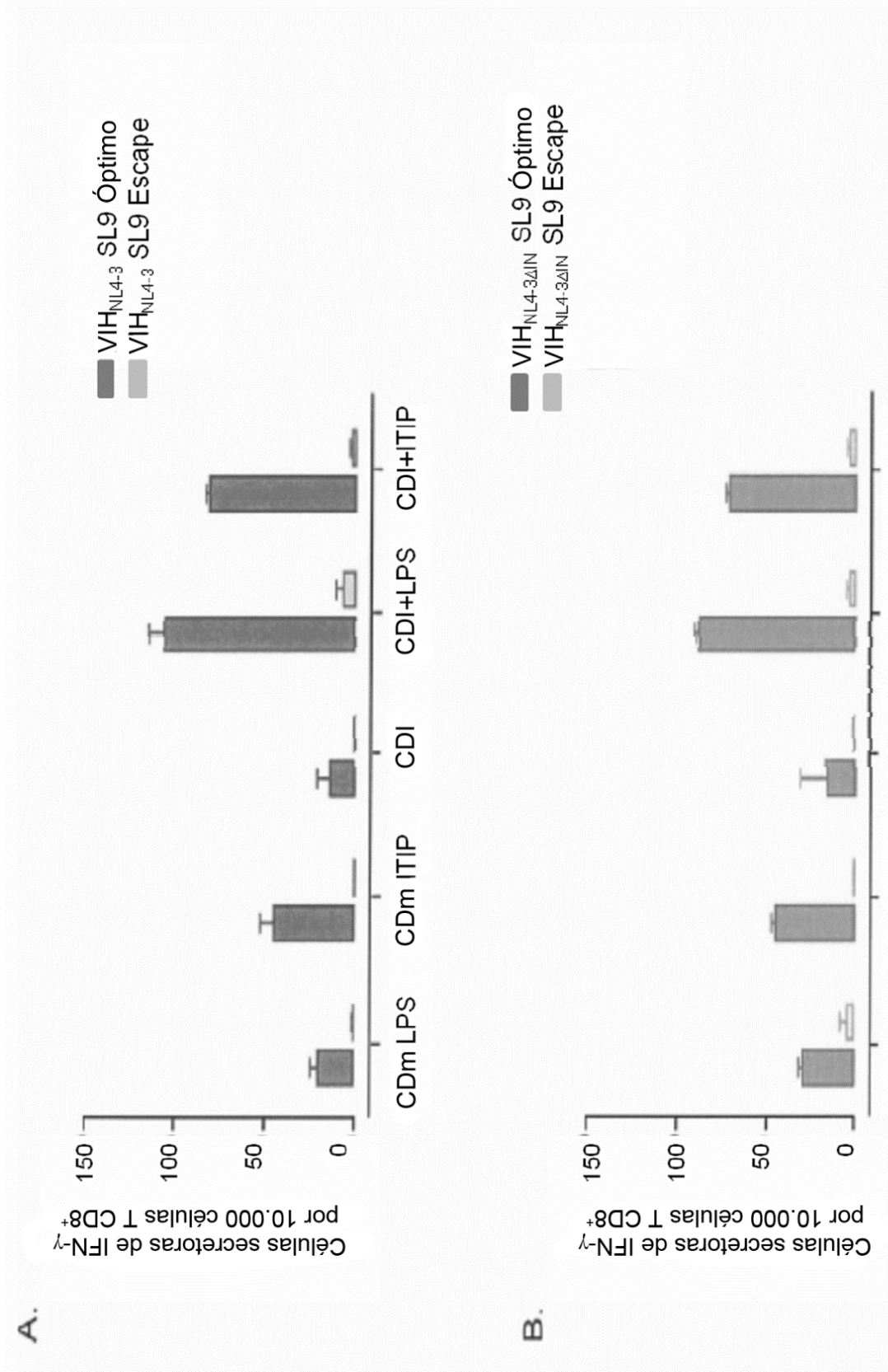


FIGURA 6

ES 2 537 096 A2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> LABORATORIOS DEL DR.ESTEVE, S.A.
FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT DE RECERCA DE LA SIDA-CAIXA

<120> IMMUNÓGENO DEFICIENTE EN INTEGRASA DE VIH-1 Y METODOS PARA
CARGAR CÉLULAS DENDRÍTICAS CON DICHOS IMMUNÓGENOS

<130> P7900PC00

<150> EP12382016
<151> 2012-01-20

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 13943
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> plásmido pNL4-3 delta integrasa

<400> 1
tgaagggt aatttggctc caaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca 60
cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac 120
tgaccttgg atggtgcttc aagtttagtac cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca 180
aataaggaga gaagaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggaccgg 240
agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggcccag 300
agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactttccg 360
ctggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat 420
gctacatata agcagctgct ttttgctgt actgggtctc tctgggtaga ccagatctga 480
gcctgggagc tctctggcta actagggaac cactgctta agcctcaata aagcttgctc 540
tgagtgctca aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc 600
agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaag 660
cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgcacgg 720
caagaggcga ggggcggcga ctggtgagta cgcaaaaat tttgactagc ggaggctaga 780
aggagagaga tgggtgagag agcgtcggt ttaagcgggg gagaattaga taaatgggaa 840
aaaattcggt taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca 900
agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggccttt tagagacatc agaaggctgt 960

ES 2 537 096 A2

agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag gatcagaaga acttagatca 1020
ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc 1080
aaggaagcct tagataagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa 1140
gcagcagctg acacaggaaa caacagccag gtcagccaaa attacctat agtgcagaac 1200
ctccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaattgc atgggtaaaa 1260
gtagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtaataccca tgttttcagc attatcagaa 1320
ggagccaccc cacaagattt aaataccatg ctaaacacag tggggggaca tcaagcagcc 1380
atgcaaattgt taaaagagac catcaatgag gaagctgcag aatgggatag attgcatcca 1440
gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac caaggggaag tgacatagca 1500
ggaactacta gtacccttca ggaacaaata ggatggatga cacataatcc acctatccca 1560
gtaggagaaa tctataaaaag atggataatc ctgggattaa ataaaatagt aagaatgtat 1620
agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaaagg aaccctttag agactatgta 1680
gaccgattct ataaaactct aagagccgag caagcttcac aagaggtaaa aaattggatg 1740
acagaaacct tgttggcca aaatgcgaac ccagattgta agactatttt aaaagcattg 1800
ggaccaggag cgacactaga agaaatgatg acagcatgtc agggagtggg gggaccocggc 1860
cataaagcaa gagttttggc tgaagcaatg agccaagtaa caaatccagc taccataatg 1920
atacagaaag gcaattttag gaaccaaaaga aagactgtta agtgtttcaa ttgtggcaaa 1980
gaagggcaca tagccaaaaa ttgcagggcc ctaggaaaaa agggctgttg gaaatgtgga 2040
aaggaaggac accaaatgaa agattgtact gagagacagg ctaatttttt agggaagatc 2100
tggccttccc acaaggaag gccagggaaat tttcttcaga gcagaccaga gccaacagcc 2160
ccaccagaag agagcttcag gtttggggaa gagacaacia ctccctctca gaagcaggag 2220
ccgatagaca aggaactgta tccttttagct tcctcagat cactctttgg cagcgacccc 2280
tcgtcacaat aaagataggg gggcaattaa aggaagctct attagatata ggagcagatg 2340
atacagtatt agaagaaatg aatttgccag gaagatggaa accaaaaatg atagggggaa 2400
ttggaggttt tatcaaagta ggacagtatg atcagatact catagaaatc tgcggacata 2460
aagctatagg tacagtatta gtaggacctc cacctgtcaa cataattgga agaaatctgt 2520
tgactcagat tggctgcact ttaaattttc ccattagtcc tattgagact gtaccagtaa 2580
aattaaagcc aggaatggat ggcccaaaaag ttaaacaatg gccattgaca gaagaaaaaa 2640

ES 2 537 096 A2

taaaagcatt	agtagaaatt	tgtacagaaa	tggaaaagga	aggaaaaatt	tcaaaaattg	2700
ggcctgaaaa	tccatacaat	actccagtat	ttgccataaa	gaaaaaagac	agtactaaat	2760
ggagaaaatt	agtagatttc	agagaactta	ataagagaac	tcaagatttc	tgggaagttc	2820
aattaggaat	accacatcct	gcaggggtta	aacagaaaaa	atcagtaaca	gtactggatg	2880
tgggcgatgc	atatttttca	gttcccttag	ataaagactt	caggaagtat	actgcattta	2940
ccatacctag	tataaacaat	gagacaccag	ggattagata	tcagtacaat	gtgcttccac	3000
agggatggaa	aggatcacca	gcaatattcc	agtgtagcat	gacaaaaatc	ttagagcctt	3060
ttagaaaaca	aatccagac	atagtcatct	atcaatacat	ggatgatttg	tatgtaggat	3120
ctgacttaga	aatagggcag	catagaacaa	aatagagga	actgagacaa	catctgttga	3180
ggtggggatt	taccacacca	gacaaaaaac	atcagaaaga	acctccattc	ctttggatgg	3240
gttatgaact	ccatcctgat	aatggacag	tacagcctat	agtgctgcca	gaaaaggaca	3300
gctggactgt	caatgacata	cagaaattag	tgggaaaatt	gaattgggca	agtcagattt	3360
atgcagggat	taaagtaagg	caattatgta	aacttcttag	gggaaccaa	gcactaacag	3420
aagtagtacc	actaacagaa	gaagcagagc	tagaactggc	agaaaacagg	gagattctaa	3480
aagaaccggt	acatggagtg	tattatgacc	catcaaaga	cttaatagca	gaaatacaga	3540
agcaggggca	aggccaatgg	acatatcaaa	tttatcaaga	gccatttaa	aatctgaaaa	3600
caggaaaata	tgcaagaatg	aagggtgccc	acactaatga	tgtgaaacaa	ttaacagagg	3660
cagtacaaaa	aatagccaca	gaaagcatag	taatatgggg	aaagactcct	aaatttaa	3720
taccataca	aaaggaaaca	tgggaagcat	ggtggacaga	gtattggcaa	gccacctgga	3780
ttcctgagtg	ggagtttgtc	aataccctc	ccttagtgaa	gttatggtat	cagttagaga	3840
aagaacccat	aataggagca	gaaactttct	atgtagatgg	ggcagccaat	agggaaacta	3900
aattaggaaa	agcaggatat	gtaactgaca	gaggaagaca	aaaagttgtc	cccctaacgg	3960
acacaacaaa	tcagaagact	gagttacaag	caattcatct	agctttgcag	gattcgggat	4020
tagaagtaaa	catagtgaca	gactcacaat	atgcattggg	aatcattcaa	gcacaaccag	4080
ataagagtga	atcagagtta	gtcagtcaaa	taatagagca	gttaataaaa	aaggaaaaag	4140
tctacctggc	atgggtacct	ctagaggatc	ctctagacct	gcaggcatat	gtatatttca	4200
aggaaagcta	aggactgggt	ttatagacat	cactatgaaa	gtactaatcc	aaaaataagt	4260
tcagaagtac	acatcccact	aggggatgct	aaattagtaa	taacaacata	ttggggctctg	4320
catacaggag	aaagagactg	gcatttgggt	cagggagtct	ccatagaatg	gaggaaaaag	4380

ES 2 537 096 A2

agatatagca cacaagtaga ccctgaccta gcagaccaac taattcatct gcactatfff 4440
 gattgfffff cagaatctgc tataagaaat accatattag gacgtatagt tagtcctagg 4500
 tgtgaatata aagcaggaca taacaaggta ggatctctac agtacttggc actagcagca 4560
 ttaataaaac caaaacagat aaagccacct ttgcctagtg ttaggaaact gacagaggac 4620
 agatggaaca agccccagaa gaccaagggc cacagagga gccatacaat gaatggacac 4680
 tagagctfff agaggaactt aagagtgaag ctgttagaca ttttcctagg atatggctcc 4740
 ataacttagg acaacataatc tatgaaactt acggggatac ttgggcagga gtggaagcca 4800
 taataagaat tctgcaacaa ctgctgttta tccatttcag aattgggtgt cgacatagca 4860
 gaataggcgt tactcgacag aggagagcaa gaaatggagc cagtagatcc tagactagag 4920
 ccctggaagc atccaggaag tcagocataa actgcttgta ccaattgcta ttgtaaaaag 4980
 tgttgctfff attgccaagt ttgtttcatg acaaaagcct taggcatctc ctatggcagg 5040
 aagaagcggg gacagcgacg aagagctcat cagaacagtc agactcatca agcttctcta 5100
 tcaaagcagt aagtagtaca tgtaatgcaa cctataatag tagcaatagt agcattagta 5160
 gtagcaataa taatagcaat agttgtgtgg tccatagtaa tcatagaata taggaaaata 5220
 ttaagacaaa gaaaaataga caggttaatt gatagactaa tagaaagagc agaagacagt 5280
 ggcaatgaga gtgaaggaga agtatcagca cttgtggaga tgggggtgga aatggggcac 5340
 catgctcctt gggatattga tgatctgtag tgctacagaa aaattgtggg tcacagtcta 5400
 ttatggggta cctgtgtgga aggaagcaac caccactcta ttttgtgcat cagatgctaa 5460
 agcatatgat acagaggtagc ataatgtttg ggccacacat gcctgtgtac ccacagaccc 5520
 caaccacaaa gaagtagtat tggtaaagt gacagaaaat ttaacatgt ggaaaaatga 5580
 catggtagaa cagatgcatg aggatataat cagtttatgg gatcaaagcc taaagccatg 5640
 tgtaaaatta accccactct gtgttagttt aaagtgcact gatttgaaga atgatactaa 5700
 taccaatagt agtagcggga gaatgataat ggagaaagga gagataaaaa actgctcttt 5760
 caatatacgc acaagcataa gagataaggt gcagaaagaa tatgcatctt tttataaact 5820
 tgatatagta ccaatagata ataccagcta taggttgata agttgtaaca cctcagtcac 5880
 tacacaggcc tgtccaaagg tatectttga gccaatccc atacattatt gtgccccggc 5940
 tggttttgcg attctaaaat gtaataataa gacgttcaat ggaacaggac catgtacaaa 6000
 tgtcagcaca gtacaatgta cacatggaat caggccagta gtatcaactc aactgctggt 6060

ES 2 537 096 A2

aaatggcagt ctagcagaag aagatgtagt aattagatct gccaatcca cagacaatgc 6120
 taaaaccata atagtacagc tgaacacatc tgtagaaatt aattgtacaa gaccaacaa 6180
 caatacaaga aaaagtatcc gtatccagag gggaccaggg agagcatttg ttacaatagg 6240
 aaaaatagga aatatgagac aagcacattg taacattagt agagcaaaat ggaatgccac 6300
 tttaaaacag atagctagca aattaagaga acaatttggga aataataaaa caataatctt 6360
 taagcaatcc tcaggagggg acccagaaat tgtaacgcac agttttaatt gtggagggga 6420
 atttttctac tgtaattcaa cacaactgtt taatagtact tggtttaata gtacttggag 6480
 tactgaaggg tcaaataaca ctgaaggaag tgacacaate aactcccat gcagaataaa 6540
 acaatttata aacatgtggc aggaagtagg aaaagcaatg tatgccctc ccatcagtgg 6600
 acaaattaga tgttcatcaa atattactgg gctgctatta acaagagatg gtggtaataa 6660
 caacaatggg tccgagatct tcagacctgg aggaggcgat atgagggaca attggagaag 6720
 tgaattatat aaatataaag tagtaaaaat tgaaccatta ggagtagcac ccaccaaggc 6780
 aaagagaaga gtggtgcaga gagaaaaaag agcagtggga ataggagctt tgttccttgg 6840
 gttcttggga gcagcaggaa gcaactatggg ctgcacgtca atgacgctga cggtagcaggc 6900
 cagacaatta ttgtctgata tagtgcagca gcagaacaat ttgctgaggg ctattgaggc 6960
 gcaacagcat ctggtgcaac tcacagtctg gggcatcaaa cagctccagg caagaatcct 7020
 ggctgtggaa agatacctaa aggatcaaca gtcctggggg atttggggtt gctctggaaa 7080
 actcatttgc accactgctg tgccttggaa tgctagttagg agtaataaat ctctggaaca 7140
 gatttggaat aacatgacct ggatggagtg ggacagagaa attaacaatt acacaagctt 7200
 aatacactcc ttaattgaag aatcgcaaaa ccagcaagaa aagaatgaac aagaattatt 7260
 ggaattagat aaatgggcaa gtttgtggaa ttggtttaac ataacaatt ggctgtggta 7320
 tataaaatta ttcataatga tagtaggagg cttggtaggt ttaagaatag tttttgctgt 7380
 actttctata gtgaatagag ttaggcaggg atattcacca ttatcgtttc agaccacct 7440
 ccaatcccg aggggacctg acaggcccga aggaatagaa gaagaagggtg gagagagaga 7500
 cagagacaga tccattcgat tagtgaacgg atccttagca cttatctggg acgatctgcg 7560
 gagcctgtgc ctcttcagct accaccgctt gagagactta ctcttgattg taacgaggat 7620
 tgtggaactt ctgggacgca ggggggtggga agccctcaaa tattggtgga atctcctaca 7680
 gtattggagt caggaactaa agaatagtgc tgtaacttg ctcaatgcca cagccatagc 7740
 agtagctgag gggacagata gggttataga agtattacaa gcagcttata gagctattcg 7800

ES 2 537 096 A2

ccacatacct agaagaataa gacagggcctt gaaaggatt ttgctataag atgggtggca 7860
 agtgggtcaaa aagtagtggtg attggatggc ctgctgtaag ggaaagaatg agacgagctg 7920
 agccagcagc agatgggggtg ggagcagtat ctcgagacct agaaaaacat ggagcaatca 7980
 caagtagcaa tacagcagct aacaatgctg cttgtgcctg gctagaagca caagaggagg 8040
 aagaggtggg ttttccagtc acacctcagg tacctttaag accaatgact tacaaggcag 8100
 ctgtagatct tagccacttt ttaaaagaaa aggggggact ggaagggcta attcactccc 8160
 aaagaagaca agatatacctt gatctgtgga tctaccacac acaaggctac ttccctgatt 8220
 ggcagaacta cacaccaggg ccaggggtca gatatacctt gacctttgga tgggtgctaca 8280
 agctagtacc agttgagcca gataaggtag aagaggccaa taaaggagag aacaccagct 8340
 tgttacaccc tgtgagcctg catggaatgg atgacctga gagagaagtg ttagagtgga 8400
 ggtttgacag ccgcctagca tttcatcacg tggcccgaga gctgcatccg gagtacttca 8460
 agaactgctg acatcgagct tgctacaagg gactttccgc tggggacttt ccagggaggc 8520
 gtggcctggg cgggactggg gagtggcgag ccctcagatg ctgcatataa gcagctgctt 8580
 tttgcctgta ctgggtctct ctggttagac cagatctgag cctgggagct ctctggctaa 8640
 ctaggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgctt gagtgcttca agtagtgtgt 8700
 gccgtctgt tgtgtgactc tggtaactag agatccctca gaccctttta gtcagtgtgg 8760
 aaaatctcta gcacccccca ggaggtagag gttgcagtga gccaagatcg cgccactgca 8820
 ttccagcctg ggcaagaaaa caagactgtc taaaataata ataataagtt aagggtatta 8880
 aatatattta tacatggagg tcataaaaat atatatattt gggctgggcg cagtggctca 8940
 cacctgcgcc cggccctttg ggaggccgag gcaggtggat cacctgagtt tgggagttcc 9000
 agaccagcct gaccaacatg gagaaacccc ttctctgtgt attttagta gattttattt 9060
 tatgtgtatt ttattcacag gtatttctgg aaaactgaaa ctgtttttcc tctactctga 9120
 taccacaaga atcatcagca cagaggaaga cttctgtgat caaatgtggt gggagaggga 9180
 ggttttcacc agcacatgag cagtcagttc tgccgcagac tcggcggtg tccttcggtt 9240
 cagttccaac accgcctgcc tggagagagg tcagaccaca gggtgagggc tcagtcccca 9300
 agacataaac acccaagaca taaacaccca acaggtccac cccgcctgct gccagggcag 9360
 agccgattca ccaagacggg aattaggata gagaaagagt aagtcacaca gagccggctg 9420
 tgcgggagaa cggagttcta ttatgactca aatcagtctc cccaagcatt cggggatcag 9480

ES 2 537 096 A2

agtttttaag gataacttag tgtgtagggg gccagtgagt tggagatgaa agcgtagggg 9540
 gtcgaaggtg tccttttgcg ccgagtcagt tcctgggtgg gggccacaag atcggatgag 9600
 ccagtttatac aatccggggg tgccagctga tccatggagt gcagggctctg caaaatatct 9660
 caagcactga ttgatcttag gttttacaat agtgatgtta ccccaggaac aatttgggga 9720
 aggtcagaat cttgtagcct gtagctgcat gactcctaaa ccataatttc ttttttgttt 9780
 tttttttttt atttttgaga caggggtctca ctctgtcacc taggctggag tgcagtggtg 9840
 caatcacagc tcaactgcagc ctcaacgtcg taagctcaag cgatcctccc acctcagcct 9900
 gcctggtagc tgagactaca agcgacgccc cagttaattt ttgtattttt ggtagaggca 9960
 gcgttttgcc gtgtggccct ggctggctc gaactcctgg gctcaagtga tccagcctca 10020
 gcctcccaaa gtgctgggac aaccggggcc agtcaactga cctggcccta aaccataatt 10080
 tctaactctt tggttaattt gttagtccta caaaggcagt ctagtcccca ggcaaaaagg 10140
 gggtttgttt cgggaaaggg ctgttactgt ctttgtttca aactataaac taagttcctc 10200
 ctaaacttag ttcggcctac acccaggaat gaacaaggag agcttgaggg ttagaagcac 10260
 gatggaattg gttaggtcag atctctttca ctgtctgagt tataattttg caatgggtgg 10320
 tcaaagactg cccgcttctg acaccagtcg ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg 10380
 agaggcggtt tgcgtattgg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg 10440
 tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag 10500
 aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc 10560
 gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg ccccctgac gagcatcaca 10620
 aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt 10680
 ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc 10740
 tgtccgcctt tctccctcg ggaagcgtgg cgctttctca atgctcacgc tgtaggtatc 10800
 tcagttcggg gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacc cccgttcagc 10860
 ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact 10920
 tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcgggtg 10980
 ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtg 11040
 tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca 11100
 aacaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa 11160
 aaaaaggatc tcaagaagat cttttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg 11220

ES 2 537 096 A2

aaaactcacg ttaagggatt ttggatcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc 11280
ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttgggtctg 11340
acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat 11400
ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg 11460
gccccagtgc tgcaatgata ccgagagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa 11520
taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggcc tgcaacttta tccgcctcca 11580
tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc 11640
gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg ctcgtcgttt ggtatggctt 11700
cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa 11760
aagcggttag ctccctcggc cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat 11820
cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct 11880
tttctgtgac tggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga 11940
gttgctcttg cccggcgtca atacgggata ataccgccc acatagcaga actttaaaag 12000
tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga 12060
gatccagttc gatgtaacc actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca 12120
ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg 12180
cgacacggaa atggtgaata ctcatactct tcctttttca atattattga agcatttatc 12240
agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag 12300
gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc attattatca 12360
tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca cgaggccctt tcgtcttcaa gaactgcctc 12420
gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc agctcccga gacggtcaca 12480
gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtggt 12540
ggcgggtgtc ggggcgagc catgaccag tcacgtagcg atagcggagt gtactggctt 12600
aactatgagg catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg tgaataaccg 12660
cacagatgag taaggagaaa ataccgcatc aggcgccatt cgccattcag gctgagcaac 12720
tggtgggaag ggcgatcggc gcgggcctct tcgctattac gccaggggag gcagagattg 12780
cagtaagctg agatcgcagc actgcactcc agcctgggag acagagtaag actctgtctc 12840
aaaaataaaa taaataaatc aatcagatat tccaatcttt tcctttattt atttatztat 12900

ES 2 537 096 A2

tttctatfff ggaaacacag tccttcctta ttccagaatt acacatatat tctatfffcc 12960
tttatatgct ccagttfff ttagaccttc acctgaaatg tgtgtataca aaatctaggc 13020
cagtccagca gagcctaaag gtaaaaaata aaataataaa aaataataaa aatctagctc 13080
actccttcac atcaaaatgg agatacagct gttagcatta aataccaaat aacctatctt 13140
gtcctcaata atfftaagcg cctctctcca ccacatctaa ctctgtcaa aggcattgtgc 13200
ccctccggg cgctctgctg tgctgccaac caactggcat gtggactctg cagggctcct 13260
aactgccaag ccccacagtg tgccctgagg ctgccccttc cttctagcgg ctgccccac 13320
tcggctffgc tttccctagt ttcagttact tgcgttcage caaggtctga aactaggtgc 13380
gcacagagcg gtaagactgc gagagaaaga gaccagcttt acagggggtt tatcacagtg 13440
caccctgaca gtcgtcagcc tcacaggggg tttatcacat tgcaccctga cagtctgtag 13500
cctcacaggg ggffttatcac agtgcacct tacaatcatt ccatttgatt cacaatfff 13560
ttagtctcta ctgtgcctaa cttgtaagtt aaatffgatc agaggtgtgt tcccagaggg 13620
gaaaacagta tatacagggg tcagtactat cgcatttcag gcctccacct gggctctgga 13680
atgtgtcccc cgaggggtga tgactacctc agttggatct ccacaggtca cagtgcacaca 13740
agataaccaa gacacctccc aaggctacca caatgggccg ccctccacgt gcacatggcc 13800
ggaggaactg ccatgtcggg ggtgcaagca cacctgcgca tcagagtcct tgggtgtggag 13860
ggagggacca gcgcagcttc cagccatcca cctgatgaac agaacctagg gaaagcccca 13920
gttctactta caccaggaaa ggc 13943

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> epítopo SL9 óptimo

<400> 2

Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 537 096 A2

<223> epítopo SL9 escape

<400> 3

Ser Leu Phe Asn Thr Ile Ala Val Leu
1 5