



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Nanopartícules y Células Dendríticas: Estudio de nuevas estrategias en inmunoterapia frente al VIH

Manel Enric Bargalló

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

Nanopartícules y Células Dendríticas:
Estudio de nuevas estrategias en inmunoterapia frente
al VIH

Manel Enric Bargalló Marès

2020



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

2015-2020

**Nanopartícules y Células Dendríticas:
Estudio de nuevas estrategias en inmunoterapia frente
al VIH**

Memòria presentada per **Manel Enric Bargalló Mares** per optar al títol de
doctor per la Universitat de Barcelona.

Directores:

Dra. Montserrat Plana Prades

Dr. Alberto Crespo Guardo

Doctorando:

Manel Enric Bargalló Marès

Tutora:

Dra. Montserrat Plana Prades

2020

Aquesta tesi està dedicada a totes aquelles persones que han mostrat la seva confiança i suport incondicional i que han sigut imprescindibles per a culminar-la.

“La meta no és el premi. La veritable recompensa és el camí fins a arribar a aquella meta. Gaudeix-lo”

Steve Jobs

AGRAÏMENTS

Des del novembre de 2015 fins avui, moltes persones han contribuït a aquesta tesi doctoral de manera directa o indirecta i el seu suport ha sigut essencial per a poder realitzar-la i culminar-la amb èxit. Algunes han aportat el seu granet de sorra des d'un aspecte professional / econòmic i altres ho han fet des d'un prisma personal / afectiu. Les següents línies van dedicades a totes elles.

En primer lloc, des de l'aspecte professional / financer han intervingut un gran nombre de persones:

- Montse Plana, directora i tutora de la tesi. Gràcies per dipositar la teva confiança en mi i donar-me llibertat per poder créixer com a científic. He après moltíssim a través de tu i aprecio molt l'atmosfera oberta al laboratori per la contribució d'idees.
- Alberto Crespo, codirector de la tesi. Gràcies pel teu suport i per les discussions científiques del dia a dia, per compartir la teva experiència i els teus valors. Sempre m'he sentit que podria recórrer a tu per a qualsevol tipus de problema. La teva verdadera passió per la investigació ha sigut una font d'inspiració per mi.
- Felipe García i el seu equip per fer-me sentir implicat en l'apassionant recerca per aconseguir la vacuna del VIH.
- Als investigadors del Grup de Recerca de la SIDA. Actualment, Pepe Alcamí, Sonsoles, Cristina (sabem que no ets de VIH, però formes part de nosaltres) i els que no estan en el Grup (Narcís, Joan, Mireia, Gilles, Eloisa, Victor). Moltes gràcies a tots pel vostre suport, aportacions, interès i ajuda tan a nivell científic com personal.
- A tots els metges/esses, infermers/es i col·laboradors del Grup de Recerca de SIDA de l'Hospital Clínic de Barcelona, perquè la col·laboració entre investigadors bàsics i clínics fa equip i és essencial per assolir els nostres objectius comuns.

- Als grups d'investigació que han contribuït i apostat en el nostre projecte de recerca: el Dr. Bernard Verrier de la Universitat de Lyon, la Dra. Maria José Alonso del Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS), la Dra. Isabel García del CIC biomaGune i el Dr. Peter Liljestöm del Karolinska. Tots ells m'han ajudat a endinsar-me en el fascinant món de les nanopartícules i dels replicons.
- A la Red de Investigación del SIDA (RIS), per aportar-me suport econòmic i per les jornades de docència que ens ha permès conèixer, fer amics i generar sinergies positives amb la resta de científics com també, és clar, conèixer millor la geografia peninsular i la seva gastronomia.
- Als membres de l'Escola de Doctorat en Biomedicina de la UB (EDUB) per la seva tasca d'acompanyament i capacitat resolutiva i de gestió; en especial als membres de la comissió de seguiment Dr. Jorge Lloveras i Dr. Enric Borràs que m'han aportat moltíssim durant el desenvolupament d'aquesta tesi.
- A més a més, he tingut el privilegi de treballar amb un grup amb molt de talent, intel·ligència i humanitat on ens hem ajudat i donat suport mútuament en moments difícils i que s'han convertit en uns magnífics companys de viatge que han contribuït essencialment en que el treball diari fos molt motivador. Per tant, Laia, Maria Jose, Núria, Cris, Tania, Javi, Carmen i tots els companys que heu anat passant pel laboratori, a part de companys de feina, us tinc com a amics i us sento com si fóssiu família. Sou un equip humà d'un valor incalculable, per mi valeu un imperi.
- Per últim, però no per això menys important, agraeixo profundament la col·laboració dels pacients i donants sans, ja que sense ells no s'hauria pogut dur a terme la tasca de recerca i investigació objecte d'aquesta tesi.

En segon lloc, pel seu suport personal i afectiu rebut durant aquests anys vull agrair a les següents persones:

- Apreciada Anaïs, si hagués d'agrar-te tot el que m'has ajudat durant tot aquest temps, hauria d'escriure una tesi apart segur. És un honor compartir el viatge de la vida amb tu, ets un oasi de pau, una estona de cel i el far que il·lumina tota foscor. Gent com tu fa que el món sigui millor. Milions de gràcies per la teva estima, suport i empatia.
- Als meus pares, Manel i Pilar. Gràcies pel vostre gran suport tant moral com econòmic durant tota la meva etapa acadèmica i professional, i sobretot en aquests cinc anys, en què no heu deixat de creure en mi.
- Tatí i Núria. Com a bons padrins m'heu acompanyat al llarg de la meva vida, donant-me suport i empenta en tots els meus reptes. Sóc el fillol més afortunat d'aquest món.
- Vull agrair profundament a la meva iaia Ció pel seu excepcional i imprescindible paper dins de la família; al igual que als padrins, t'agraeixo moltíssim tot el teu carinyo i escalf. També vull dedicar unes línies als meus avis Manel, Enric i Enriqueta, que tot i que no han pogut veure com he acabat aquesta tesi, els vull donar les gràcies per ser els millors avis que un net hagi pogut tenir i per inculcar-me uns valors que són un tresor per mi; us estimo molt i us tinc molt presents cada dia.
- També vull agrair als meus germans Aleix, Jan i Nina i com no, a tota la legió de cosins i tiets que quan ens juntem em feu disfrutar molt.
- Als meus amics. Per una banda, els de la UVIC, el Miki (urraca), el Javi (ciborg), el Torru (el padre), el Pau (l'amant del Cònsol de Bielorússia), l'Abel (Cònsol de Bielorússia). Per l'altra banda, l'Ainara i l'Euly, les panera party. Vull agrair-vos tots els moments que hem viscut junts des de la nostra època universitària fins avui.

Gràcies pel vostre suport, consells, carinyo, paciència i com no, per les tantes celebracions que que hem fet junts.

- Per últim, al meu gos Sammy per alegrar-me cada dia amb els teus mimos i animar-me en els dies que ho necessitava més.

RESUMEN

De entre las vacunas de ácidos nucleicos, las basadas en ARNm autoreplicativos (replicones) o ARNm convencionales unidos a diferentes nanopartículas (NPs) como: oro (Au-NP), nanocápsulas (NCs), ácido poliláctico (PLA), PLA con corona lipídica (LP-PLA) y liposomas (LS), están siendo muy prometedoras por sus perfiles de seguridad e inmunogenicidad. El principal éxito de estas vacunas radica en la captación y administración de estos candidatos por parte de las células dendríticas (CDs) que son claves para la eficacia de la vacuna.

El objetivo de esta tesis consistió en comparar y seleccionar la mejor formulación de ARNm a partir del modelo *in-vitro* de CDs humanas para evaluar la capacidad inmunogénica de DREP/RREP-gp140 y ARNm Gag/NPs (Au-NP, NCs, PLA, LP-PLA, LS).

Utilizando el modelo *in vitro* de CD humana, hemos evaluado *DNA-RNA launched alphavirus replicon vectors (DREP/RREP)* que codifican para el *HIV clade C gp140* y complejos de ARNm-NPs que codifican para el *HIV clade B Gag*. Mediante citometría de flujo evaluamos la viabilidad celular (7-AAD y Annexina-V) y los perfiles de maduración (CD83+ y HLA-DR) de las CDs de individuos sanos o infectados derivadas de monocitos, transfectadas por (electroporación, lipofección o pulsado). Por tinción de CFSE medimos la proliferación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ tras 6 días de cocultivo con células T autólogas. Por Luminex realizamos el análisis de 25 citocinas en los sobrenadantes de los cocultivos. Finalmente, por Elispot evaluamos la inducción de las células T secretoras de IFN- γ frente a Env o Gag.

La evaluación de la viabilidad celular reveló una alta tasa de supervivencia (>60%) en las CDsmo. En los perfiles de maduración, se observó un aumento de la expresión de CD83 y HLA-DR (hasta un 40%) en CDsmo tanto en replicones como con ARNm-NPs. Dentro de esta subpoblación madura de CDs, se determinó la mayor expresión de gp140/Gag tras la transfección de DREPgp140 (10-20%) y LAH4-L1/ARNmGag/LP-PLA (15-20%), respectivamente. Los ensayos de CFSE mostraron, por un lado, que las CDsmo con

RREP/DREPgp140 inducían ligeramente la capacidad proliferativa de los linfocitos T CD8+ (hasta un 10%) y en un 5% en los linfocitos T CD4+, y por otro, que los complejos de ARNm-NPs no estimulan la proliferación. Por el contrario, tras el cocultivo con CDsmo por DREP-gp140 o LAH4-L1/ARNmGag/LP-PLA, aumentaba la secreción de citocinas proinflamatorias (IFN- α e IL-6) y Th-1 (IFN- γ y MIP-1 β). Por último, la adición de CDsmo con DREPgp140 o LAH4-L1/ARNmGag/LP-PLA incrementó la formación de *spots* equivalente a las células T secretoras de IFN- γ en los cocultivos tras la estimulación *overnight* con *poles* de péptidos de Env o Gag, respectivamente.

Estos hallazgos sugieren que replicones y ARNm/NPs fueron capaces de activar a las CDs y de administrar eficazmente gp140 o Gag. De entre ellos, DREPgp140 y LAH4-L1/ARNmGag/LP-PLA parecen ser los candidatos más prometedores para ser utilizados en un contexto de vacuna preventiva y terapéutica, respectivamente, frente al VIH.

ABSTRACT

Among all nucleic acid vaccines, the ones based on self-amplifying mRNA (replicons) and conventional mRNA-nanoparticles (NPs) complexes as: gold (Au-NP), nanocapsules (NCs), polylactid acid (PLA), PLA with lipid crown (LP-PLA) and liposome (LS), have emerged as very promising alternatives due to their safety and immunogenic profiles. The potential success of these vaccine candidates depends on the uptake by dendritic cells (DC) as they play essential roles in the efficacy of vaccine delivery.

The objective of this thesis was to compare and select the best-in class RNA-coformulation using an in-vitro human dendritic cell (DC) model and to evaluate the immunogenic capacity of DREP/RREPgp140 or mRNA Gag/NPs (Au-NP, NCs, PLA, LP-PLA, LS) complexes.

Using an *in vitro* human DC model, we have tested both a DNA-RNA launched alphavirus replicon vectors (DREP/RREP) which codify for a trimeric recombinant HIV clade C gp140 and, mRNA/NPs complexes which codify for a HIV clade B Gag. Using flow cytometry, we evaluated the cell viability (7-AAD and annexin V) and maturation (CD83⁺ and HLA-DR⁺) profiles of the transfected (by electroporation, lipofection or pulsing) immature monocyte-derived DC (iDC) from healthy or HIV-infected individuals. CD4⁺ and CD8⁺ T-cell proliferation was measured by CFSE staining in 6-days co-cultures with autologous T cells. Analysis of 25-cytokines on culture supernatants was performed using Luminex assay. Moreover, induction of IFN-gamma-specific T cells against Env or Gag was evaluated by Elispot.

Cell viability determinations revealed a good survival rate of the transfected iDCs (>60%). An increase in CD83 and HLA-DR expression levels was observed with both replicons and mRNA/NPs (up to 40%). In this matured DC subpopulation, we detected a higher expression of HIV gp140 after DREP transfection (10-20%) and HIV gag after pulsing LAH4-L1/Gag/LP-PLA transfection (15-20%). CFSE assays showed that CD8⁺ T-cells had a slightly proliferative capacity (up to 10%) than CD4⁺ T cells (<5%) in response to RREP/DREP

gp140-transfected DC and do not have a relevant impact to DCs modified (DCsmo) with mRNA-NPs. By contrast, increased secretion of pro-inflammatory (IFN-alpha and IL-6) and Th-1 (IFN-gamma and MIP-1beta) cytokines was mainly seen after co-culture with DREP gp140 or LAH4-L1/Gag mRNA/LP-PLA transfected DC. Lastly, the addition of DREP gp140 or LAH4-L1/Gag mRNA/LP-PLA-transfected DC on a 6-days autologous co-culture after an overnight stimulation with Env or Gag peptides pools induced an increase of IFN-gamma-specific T cells, respectively.

Our findings suggest that these replicons and mRNA/NPs complexes were able to activate DC and efficiently deliver HIV gp140 or Gag. Moreover, by inducing Env/Gag-specific immune responses, DREP gp140 or LAH4-L1/Gag mRNA/LP-PLA seems to be a more promising candidates to be used in the preventive and therapeutic vaccine approaches against HIV, respectively.

ABREVIATURAS

5MeC: *5-Methyl-Cytidine*

μF: Microfaradios

Ω: Omega

aa: Aminoácidos

ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ARNasas: Ribonucleasa

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

APC: *Allophycocyanin*

ART: Terapia antiretroviral

AUG: Codón de iniciación

Au-NP: Nanopartícula de oro

B7: Moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86

BST-BCN: Banc de Sang i Teixits de Barcelona

CA: *p24 cápside*

CaCl₂: Cloruro cálcico

CAP: Casquete

cART: Terapia antirretroviral combinada

CCR5: Quimiocina receptora de tipo 5

CCR5D32: Alelo mutante del CCR5

CD: *Cluster of differentiation*

CDs: Células dendríticas

CDsi: Células dendríticas inmaduras

CDsm: Células dendríticas maduras

CDsmo: Células dendríticas modificadas

CEF: *Cytomegalovirus, Epstein Barr virus, Influenza virus*

CFSE: *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*

CHIKV: *Chikungunya*

CiMUS: Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas

CITV: Comité internacional de taxonomía de virus

CMH: Complejo mayor de Histocompatibilidad

CMV: Citomegalovirus

CO₂: Dióxido de carbono

CPAs: Células presentadoras de antígeno

CTL: Linfocitos T citotóxicos

Cy5.5: *Cyanine 5.5*

CXCR4: Quimiocina receptora de tipo 4

DMSO: *Dimethyl sulfoxide*

DREP: *DNA replicon*

EEA1: *Early endosome antigen*

EEV: Encefalitis equino venezolano

eGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*

EHVA: *European HIV Vaccine Alliance*

Env: Proteína de la envuelta del VIH

EP: Electroporación

FBS: Suero bovino fetal

Fc: Receptor presente en la superficie

FDA: *Food and Drug Administration*

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*

FSC: *Forward scatter*

G: ARNm Gag

Gag: Proteína estructural del VIH

GALT: Tejido linfoide asociado con el tracto digestivo

GM: ARNm Gag modificado

GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

gp: Glicoproteína

gp41: Glicoproteína de transmembrana de la envuelta del VIH

gp120: Glicoproteína de la superficie de la envuelta del VIH

gp140: Glicoproteína quimérica compuesta por gp120+ gp41

gp160: Glicoproteína compuesta por gp120+ gp41

HIVERA: *Harmonizing, Integrating and Vitalizing European Research on Hiv/Aids*

HLA-DR: *Human leukocyte antigen – DR isotype*

HxB2 Gag: Cepa del subtipo B del VIH-1

ICAM: Moléculas de adhesión intercelulares

IHIVARNA: *Therapeutic TriMix / mRNA-based Vaccine in Chronic HIV-1 Infected Patients Receiving Antiretroviral Therapy*

IFN: Interferón

IgG: Immunoglobulina G

IL: Interleucina

IMDM: Medio Dulbecos modificado por Iscove sin suero

Kb: Kilobases

LAH4/-L1: Péptido catiónico

LIPO: Lipofección

LFA: *Lymphocyte function-associated antigen-1*

LP-PLA: Lipopartícula de PLA

LS: Liposoma

LTR: Repetición terminal larga

M: Materiales y Métodos

MA: *p17 matrix*

mAb: Anticuerpo monoclonal

MCSF: *Macrophage colony-stimulating factor*

MIP: *Macrophage inflammatory protein*

MoDC: *Modified Dendritic cells*

MPER: Región externa próxima a la membrana

MVA: *Modified Vaccinia Ankara*

NaCl: *Cloruro sódico*

NC: *p7 nucleocápside*

NCs: Nanocápsulas

Nef: *Proteína reguladora*

NIH: Instituto Nacional de Salud

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK: *Natural killer cell*

NLR: *NOD (nucleotide-binding oligomerization domain)-like receptor*

Nod2 / NOD2: *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*

NPs: Nanopartículas

nsP: Proteínas no estructurales

ORF: Pautas abiertas de lectura

OX-40: Receptor de TNF

p24: Proteína de Gag

PAb: Anticuerpos policlonales

PAMPS: Patrón asociado a patógenos

PAP: Fosfatasa ácida prostática

PARG: Poliarginina

PBMC: *Peripheral blood mononuclear cells*

PBS: Buffer fosfato salino

pDNA: ADN plasmídico

PE: *Phycoerythrin*

PerCP: *Peridinin-chlorophyll-protein complex*

PEG: Polietilenglicol

Pdl: Índice de polidispersión

PHA: *Phytohemagglutinin*

PIC: Complejo de pre-integración

PLA: *Poly(lactic acid)*

Pol: Proteína estructural

poly-A: Cadena de poliadeninas

PRR: *Pattern recognition receptor*

PROT: Protamina

PSU: *Pseudouridine*

R10: RPMI 1640 Medium suplementado con un 10% de FBS

RALA: Péptido catiónico

Rev: Proteína reguladora

RIG-I: *Retinoic acid-inducible gene-I protein*

RREP: *ARN replicon*

rpm: Revoluciones por minuto

RPMI: *Medio Roswell Park Memorial Institute*

RT: Transcriptasa inversa

SEA: *Staphylococcus aureus* enterotoxin A

SFV: *Semliki Forest Virus*

SIDA: Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida

SIN: *Sinbis*

SIV: Virus de la inmunodeficiencia del simio

SIVcpz: Virus de la inmunodeficiencia del simio *chimpanzee Pan trglodyte*

SIVsm: Virus de la inmunodeficiencia del simio *sooty mangabeys Cercocebus atys*

SP1/2: Péptido espaciador ½

SP6: *Bacteriophage RNA polymerase*

SSC: *Side scatter*

ssARN: *Single-stranded RNA*

TA: Temperatura ambiente

TARc: Tratamiento antirretroviral combinado

Tat: Proteína reguladora

TCR: Receptores de células T

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

Th: Linfocito T colaborador

TLR: *Toll-like receptor*

Treg: Linfocito T regulador

TNF: Factor de necrosis tumoral

UTR: *Untranslated region*

UV: Ultravioleta

V: Voltios

Vif: Proteína reguladora

VIH-1: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

VIH-2: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2

VIS: Virus de la inmunodeficiencia del simio

VISsm: Virus de la inmunodeficiencia del simio *sooty mangabeys* *Cercocebus atys*

VLPs: Virus-like particles

Vpr: Proteína reguladora

Vpu: Proteína reguladora

ZM96gp140: Cepa del subtipo C del VIH-1

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	24
CAPÍTULO 1. EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA	24
1.1. HISTORIA DE LA INFECCIÓN POR EL VIH.....	24
1.2. CLASIFICACIÓN DEL VIH	25
1.3. GENOMA DEL VIH-1	26
1.4. MORFOLOGÍA DEL VIH-1	27
1.5. REPLICACIÓN DEL VIRUS DEL VIH	28
1.6. PATOGENICIDAD DEL VIH-1.....	30
CAPÍTULO 2. NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS FRENTE A LA INFECCIÓN POR EL VIH-1.....	33
2.1. ESTRATEGIAS DE ERRADICACIÓN DEL VIH-1.....	33
2.2. VACUNAS FRENTE AL VIH-1	34
2.2.1. Vacunas preventivas.....	34
2.2.2. Vacunas terapéuticas	35
2.3. VACUNAS BASADAS EN CDS PARA HACER FRENTE AL VIH-1.....	36
CAPÍTULO 3. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS Y SU RELEVANCIA EN EL SISTEMA INMUNE	38
3.1. INTRODUCCIÓN	38
3.2. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	39
3.3. SINÁPSIS ENTRE LA CD Y EL LINFOCITO T	42
3.4. SUBPOBLACIONES DE CDS	44
3.5 EL PAPEL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA INMUNIDAD INNATA.....	45
3.6. EL PAPEL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA INMUNIDAD ADAPTATIVA.....	46

CAPÍTULO 4. NUEVAS FORMULACIONES DE VACUNAS:	48
VACUNAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	48
4.1. DE LAS VACUNAS CONVENCIONALES A LAS VACUNAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	48
4.2. ADN Y ARNm: BIOMOLÉCULAS DE ELECCIÓN PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS ...	49
4.3. CLASIFICACIÓN DE LAS VACUNAS BASADAS EN ARNM CONVENCIONALES Y ARNm AUTOREPLICATIVOS (REPLICONES)	52
4.4. BARRERAS EN LA VEHICULIZACIÓN DE ARNm	55
4.5. ESTRATEGIAS PARA OPTIMIZAR LA ENTREGA DE ARNm	56
CAPÍTULO 5. REPLICONES ARN/DNA DE ALFAVIRUS COMO CANDIDATOS VACUNALES ...	59
5.1. EL ORIGEN DE LOS REPLICONES DE ARN/DNA (RREP/DREP)	59
5.2. EL USO DE LOS REPLICONES DE ALFAVIRUS (RREP Y DREP) EN EL DESARROLLO DE VACUNAS FRENTE A PATOLOGIAS	61
5.2.1. RREP como candidato vacunal frente al VIH	62
5.2.2. DREP como candidato vacunal frente al VIH	63
CAPÍTULO 6. LAS NANOPARTÍCULAS COMO CANDIDATOS VACUNALES	64
6.1. EL USO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA BIOMEDICINA	64
6.2. PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS	65
6.3. TIPOS DE NANOPARTÍCULAS UTILIZADAS EN BIOMEDICINA	66
6.3.1. Nanopartículas inorgánicas como las Au-NPs	67
6.3.2. Nanopartículas poliméricas como las NCs,PLA,LP-PLA y LS	68
<u>6.3.2.1. Nanocápsulas (NCs) ricas en Arginina</u>	<u>68</u>
<u>6.3.2.2. Nanopartículas de ácido poliláctico (PLA) coformulados con LAH4 o RALA</u>	<u>69</u>
<u>6.3.2.3. Lipopartículas de ácido poliláctico (LP-PLA) coformulados con LAH4-L1</u>	<u>70</u>
6.3.3 Liposomas (LS) coformulados con LAH4-L1	71
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	72
3. HIPÓTESIS	74
4. OBJETIVOS	75

5. MATERIALES Y MÉTODOS76

5.1. OBTENCIÓN DE LOS REPLICON Y LOS ARNm CONVENCIONALES COFORMULADOS CON NANOPARTÍCULAS.....	79
5.1.1. Replicones y plásmidos.....	79
<u>5.1.1.1. REPLICONES</u>	<u>79</u>
<u>5.1.1.2. Plásmido</u>	<u>81</u>
5.1.2. ARNm convencionales	81
5.1.3. Complejos de nanopartículas con ARNm.....	83
<u>5.1.3.1. Complejos de Nanopartículas de oro (Au-NP) en forma esférica o estrellada con ARNm eGFP.....</u>	<u>83</u>
<u>5.1.3.2. Complejos de nanocápsulas (NCs) ricas en arginina con ARNm eGFP</u>	<u>85</u>
<u>5.1.3.3. Complejos de nanopartículas de ácido poliláctico y liposomas con ARNm asociados con péptidos catiónicos penetrantes (RALA, LAH4 y LAH4-L1).....</u>	<u>87</u>
<u>5.1.3.3.1 Complejos de nanopartículas de ácido poliláctico (PLA) con ARNm eGFP asociados con péptidos catiónicos RALA, LAH4.</u>	<u>87</u>
<u>5.1.3.3.2 Complejos de nanopartículas de ácido poliláctico con corona lipídica (LP-PLA) con ARNm asociados con el péptido catiónico LAH4-L1.</u>	<u>87</u>
<u>5.1.3.3.3. Complejos de liposomas (LS) con ARNm asociados con el péptido catiónico LAH4-L1.....</u>	<u>87</u>
5.2 SUJETOS DE ESTUDIO PARA LA OBTENCIÓN DE LAS PBMCs.....	90
5.3. ADHERENCIA DE LAS PBMCs Y GENERACIÓN DE CDsi A PARTIR DE MONOCITOS.....	90
5.4. TRANSFECCIÓN DE CDs	91
5.4.1. Electroporación de CDs.....	91
5.4.2. Lipofección de CDs	92
5.4.3. Pulsado de CDs.....	93
5.5. CITOMETRÍA DE FLUJO	95
5.6. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.	97
5.7. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN.	97
5.8. MEDICIÓN DE LA SECRECIÓN DE CITOCINAS Y QUIMIOquinas.....	99

5.9. ENSAYO DE INMUNOADSORCIÓN VINCULADO A ENZIMAS (ELISPOT) PARA DETECTAR LAS CÉLULAS FORMADORAS DE SPOTS (SFC) EQUIVALENTES A LAS CÉLULAS SECRETORAS DE IFN- γ	99
5.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	103

6. RESULTADOS104

6.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS CAMBIOS FENOTÍPICOS EN LA CÉLULA DENDRÍTICA MODIFICADA (CDmo) CON REPLICONES (RREP/DREP) QUE CODIFICAN PARA GP140 Y ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE SUSCITADA MEDIANTE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T Y EL PERFIL DE CITOCINAS GENERADO.....	104
---	-----

6.1.1. Ensayo de optimización de la concentración de DREP eGFP.....	104
---	-----

6.1.2. Cinética de expresión de eGFP en CDsmo RREP/DREP eGFP.	107
--	-----

6.1.3. Cinética de expresión de anti <i>early endosome antigen</i> (EEA1) en CDsmo con DREP eGFP para determinar el tráfico endosomal.	108
---	-----

6.1.4. Efectos de los replicones (RREP y DREP) que codifican para gp140 en la viabilidad, maduración y expresión de gp140 en CDs.....	110
---	-----

6.1.5 Efectos de los replicones (RREP y DREP) que codifican para gp140 en la proliferación de linfocitos T.....	113
---	-----

6.1.6. Perfil de secreción de citocinas generado por las CDsmo con RREP y DREP gp140 en cocultivo con linfocitos T.....	114
---	-----

6.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS CAMBIOS FENOTÍPICOS DE CDsmo CON DIFERENTES NANOPARTÍCULAS (NPs) COFORMULADOS CON INMUNÓGENOS DE DOS CEPAS DE GAG (<i>HXB2 O CONSENSUS B</i>) Y ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIDA POR LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T Y EL PERFIL DE CITOCINAS GENERADO.....	116
--	-----

6.2.1. Nanopartículas de oro (Au-NP)	116
--	-----

<u>6.2.1.1. Efectos de las Au-NP en forma de esferas y estrellas cargadas con un ARNm eGFP en la viabilidad, maduración y expresión de eGFP en CDs.....</u>	<u>116</u>
---	------------

<u>6.2.1.2. Cinética de expresión de eGFP en CDsmo con Au-NP en forma de esferas y estrellas cargadas con ARNm eGFP.....</u>	<u>119</u>
--	------------

6.2.2. Nanocápsulas (NCs) ricas en polímeros catiónicos.....	121
--	-----

<u>6.2.2.1. Ensayo de optimización de concentración de las NCs eGFP.....</u>	<u>121</u>
<u>6.2.2.2. Efectos de las NCs de PARG y PROT cargadas con un ARNm eGFP en la viabilidad, maduración y expresión de eGFP en CDs.....</u>	<u>123</u>
<u>6.2.2.3. Cinética de expresión de eGFP en CDsmo con NCs cargadas con ARNm eGFP.</u>	<u>125</u>
<u>6.2.2.4. Efectos de las NCs de PARG, PROT, eGFP en la viabilidad, maduración y expresión de eGFP en CDs.....</u>	<u>126</u>
6.2.3. Nanopartículas de ácido poliláctico (PLA).....	129
<u>6.2.3.1. Ensayo de optimización de concentración de ARNm en el complejo y captura de PLA en CDs.....</u>	<u>130</u>
<u>6.2.3.2. Efectos de las PLAs cargadas con Gag de la cepa HxB2 en la viabilidad, maduración y expresión de Gag en CDs.</u>	<u>133</u>
<u>6.2.3.3. Efecto de las CDsmo con LAH4 o RALA/Gag/PLA en la proliferación de linfocitos T.....</u>	<u>136</u>
<u>6.2.3.4. Perfil de secreción de citocinas generado por las CDsmo con LAH4 o RALA/Gag/PLA en cocultivo con linfocitos T.</u>	<u>137</u>
6.2.4. Nanopartículas de ácido poliláctico con corona lipídica (LP-PLA)	140
<u>6.2.4.1. Ensayo de optimización de concentración de ARNm en el complejo de LP-PLA y LS en CDs.....</u>	<u>140</u>
<u>6.2.4.2. Efectos de las LP-PLA y LS cargadas con Gag (G) o Gag modificado (GM) de la cepa Consensus B del VIH-1 en la viabilidad, maduración y expresión de Gag en las CDs.</u>	<u>143</u>
<u>6.2.4.3. Efecto de las CDsmo con LAH4/G o GM/LP-PLA o LS en la proliferación de linfocitos T.....</u>	<u>146</u>
<u>6.2.4.4. Perfil de secreción de citocinas generado por las CDsmo con LAH4/G o GM/LP-PLA o LS en co-cultivo con linfocitos T autólogos.</u>	<u>147</u>

6.3. RESUMEN DE LOS MEJORES CANDIDATOS VACUNALES SELECCIONADOS ENTRE REPLICONES Y NPs EN BASE A LOS PARÁMETROS DE VIABILIDAD, MADURACIÓN, EXPRESIÓN DE INSERTO EN CDs, PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T Y PRODUCCIÓN DE CITOCINAS..... 150

6.3.1. La presencia de los inmunógenos de gp140 vehiculizados por DREP gp140 y G y GM por LP-PLA, son cruciales para incrementar la producción específica de IFN-γ... 151

7. DISCUSIÓN	156
8. CONCLUSIONES	172
9.REFERENCIAS.....	174
10. PUBLICACIONES	202
10.1. ARTÍCULOS	202
10.2. CONGRESOS.....	203
10.3. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS	204
10.4. TRABAJOS CIENTÍFICOS PRESENTADOS EN CONFERENCIAS NACIONALES E INTERNACIONALES	207

1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

1.1. HISTORIA DE LA INFECCIÓN POR EL VIH

A principios de los años ochenta el Centro para Control y Prevención de Enfermedades en Atlanta, hizo público un brote de neumonía surgido entre cinco jóvenes homosexuales¹. Se trataba de pacientes con recuento de linfocitos T CD4+ bajos, infecciones y sarcoma de Kaposi². En los años sucesivos se diagnosticaron más de 450 casos entre homosexuales, hemofílicos, neonatos por transmisión materno-fetal y drogadictos^{3,4}. Esta dolencia se definió como Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)⁵.

A mediados de la década de los ochenta, en el Instituto Pasteur se informaba del aislamiento de un nuevo retrovirus procedente de un paciente con SIDA y se denominó virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (CITV)⁶. Además, se aisló otro retrovirus diferente en pacientes africanos con SIDA que se denominó VIH de tipo 2 o VIH-2^{7,8}.

A finales de los ochenta, la *Food and Drug Administration* (FDA) de EE. UU. aprobó la primera prueba comercial para diagnosticar la infección por el VIH-1 y el primer agente antirretroviral fue la zidovudina⁹. Actualmente, la combinación de 3 fármacos antirretrovirales es denominada Terapia Antirretroviral de Gran Actividad o TARGA (TARc) y es la mejor estrategia para el control del VIH. El TARc influye positivamente en la disminución de la mortalidad relacionada con el SIDA¹⁰. Aunque estos avances son muy ventajosos, el TARc es incapaz de erradicar por completo el virus debido a la formación de reservorios del virus, principalmente en células T y en otros compartimentos¹¹.

Por otro lado se ha determinado que la fecha del primer antepasado infectado por VIH-1 podría haberse producido durante la década de 1930, a través de infecciones zoonóticas por el Virus de la Inmunodeficiencia del Simio (SIV)¹².

Este hecho está probado con el aislado SIVcpz de las subespecies *chimpanzee Pan troglodytes*¹³ para la población VIH-1 de los grupos M, N y O, mientras que los del VIH-2 están asociados con el SIVsm del *sooty mangabeys Cercocebus atys*¹⁴.

Desde que se declararon los primeros casos de VIH hace casi 40 años, 78 millones de personas han contraído este virus y 35 millones han muerto por enfermedades relacionadas con el SIDA. Actualmente, se estima que 37,9 millones de personas viven con el VIH en todo el mundo. De ellas, el 61% de los infectados tienen acceso a la terapia con antirretrovirales y aun así unas 770,000 personas al año fallecen a causa de enfermedades relacionadas con el SIDA¹⁵. El TARc y los nuevos antirretrovirales han supuesto un cambio radical en la vida de los enfermos infectados por el VIH-1, convirtiendo esta enfermedad en crónica y mejorando radicalmente su calidad y esperanza de vida¹⁶. Hoy en día no hay un tratamiento que cure la enfermedad, ello añadido a que supone un elevado coste económico, podría provocar que los países desarrollados carezcan de capacidad para afrontar este gasto en un futuro próximo. Especialmente ahora dada la alta supervivencia de los pacientes en TARc, el continuo aumento de nuevos casos anuales y la necesidad del TARc de por vida¹⁷. Con todo ello conseguir una vacuna eficaz frente al VIH-1 es primordial para acabar con la epidemia.

1.2. CLASIFICACIÓN DEL VIH

El VIH pertenece al grupo VI de los virus de transcripción reversa de la familia *Retroviridae*, *Orthoretrovirinae subfamily*, *Lentivirus genus*, e incluye a los aislados VIH-1 y VIH-2¹⁸. Aunque ambos virus tienen muchas similitudes, difieren en su capacidad replicativa, patogenia y dianas de infección. El VIH-1 es el más prevalente ya que está presente en todo el mundo mientras que el VIH-2 está confinado en el oeste de África debido, principalmente, a su baja capacidad de transmisión y a su menor patogenia con cargas virales bajas durante el curso de la infección¹⁹.

1.3. GENOMA DEL VIH-1

El genoma del VIH-1 está formado por dos hebras idénticas de ARN de cadena simple (ssARN) de aproximadamente 9,8 Kb y comprende las secuencias repetidas situadas en los extremos del genoma (LTR)²⁰.

El genoma viral está codificado por nueve genes que permiten la integración del VIH-1 en el genoma del hospedador utilizando la maquinaria celular para generar nuevos virus. Además de tener tres de los principales genes que codifican para proteínas estructurales (*gag*, *pol* y *env*) común a todos los retrovirus, el VIH-1 también tiene 6 genes adicionales únicos con función reguladora (*tat* y *rev*) o accesoria (*vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*):

1. ***gag***: Codifica para la poliproteína Gag, la cual es procesada durante la maduración para generar las proteínas estructurales p17 matrix (MA); p24 cápside (CA); p7 nucleocápside (NC); p6 y dos péptidos espaciadores, p2 péptido espaciador 1 (SP1) y p1 péptido espaciador 2 (SP2). Esta proteína está ampliamente utilizada como antígeno en vacunas terapéuticas frente al VIH-1²¹⁻²³.
2. ***pol***: Codifica las enzimas virales transcriptasa reversa, integrasa y proteasa.
3. ***env***: Codifica la glicoproteína gp160, precursor de la gp120 y la gp41, por la acción de una proteasa humana, que son embebidas en la envuelta viral y facilitan la fusión del virus con la célula diana. Dicha glicoproteína se utiliza como inmunógeno en un contexto de vacunas preventivas frente al VIH-1²⁴⁻²⁶.
4. ***tat* y *rev***: Codifican para las proteínas reguladoras Tat y Rev, que regulan la expresión génica transcripcional y post-transcripcional del VIH-1.
5. ***vif*, *nef*, *vpr* y *vpu***: Codifican las proteínas reguladoras Vif, Nef, Vpr y Vpu, respectivamente. Aunque son inicialmente prescindibles para la infección, son muy importantes para que se produzca una infección eficiente *in vivo* (Figura 1).

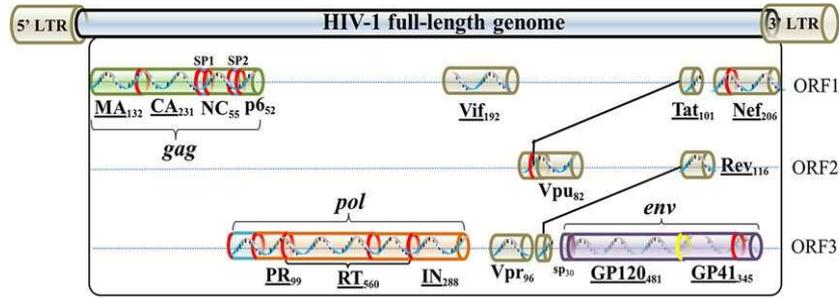


Figura 1. Organización del genoma del VIH-1. a) Modelo esquemático del genoma completo del VIH-1 de la cepa de referencia HxB2. Los nombres de las proteínas del VIH y las longitudes de los aminoácidos se muestran debajo de las regiones de proteínas coloreadas en tres marcos de lectura abiertos (ORF). Las once proteínas multiméricas de VIH están subrayadas. En amarillo, en el gen *env* se muestra la posición de escisión de las proteasas humanas. Las regiones terminales (LTR) de 5' y 3' también se indican en el genoma completo. (Figura original de Guangdi Li et al, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016)²⁷.

1.4. MORFOLOGÍA DEL VIH-1

Los viriones del VIH-1 son partículas esféricas de 100-150 nm de diámetro y contienen una bicapa lipídica derivada de la membrana de la célula infectada. Dicha bicapa contiene múltiples copias de un complejo de glicoproteínas codificadas en el genoma vírico e insertadas en ella. Además, se encuentran proteínas propias de la célula, como son las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), actina y ubiquitina²⁸. En el interior de esta bicapa se encuentra una matriz proteica conformada por alrededor de 2000 copias de la proteína matriz p17 (MA). En el interior de la partícula vírica se encuentra la nucleocápside compuesta por aproximadamente 2000 copias de la proteína p24 que confiere la forma icosaédrica al núcleo del virus. En su interior se encuentra la maquinaria enzimática relacionado con los primeros pasos de la replicación viral, denominadas transcriptasa reversa e integrasa y contiene dos copias del ARN genómico del VIH-1 que son estabilizadas por 2000 proteínas p7 (Figura 2).

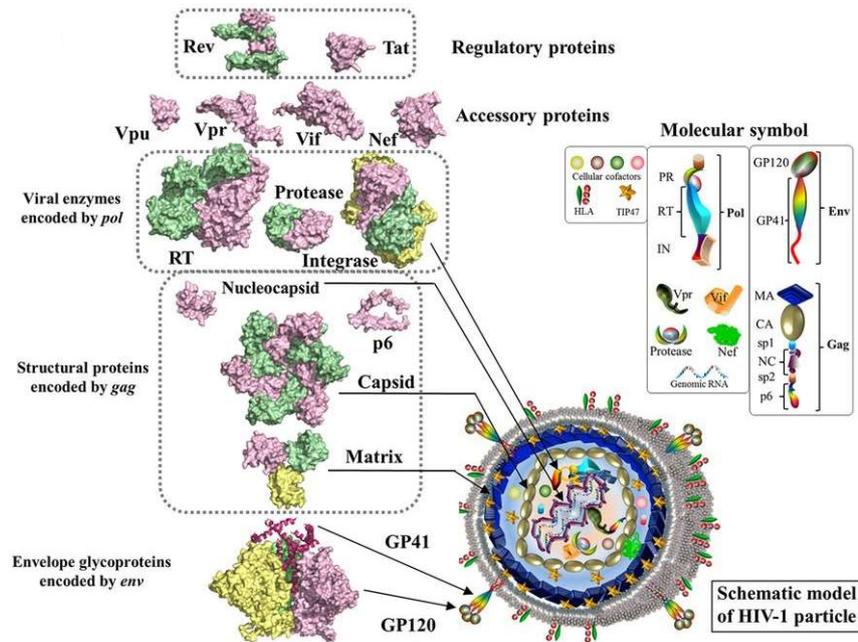


Figura 2. Estructura del VIH-1. Representación de las 15 estructuras proteicas del VIH-1 agrupadas según sus funciones. Las proteínas monoméricas del VIH-1 se muestran en color rosa y las diferentes subunidades de proteínas multiméricas se ilustran en diferentes colores (verde, amarillo y rojo). En la parte inferior derecha, se muestra un modelo esquemático de una partícula viral madura. (Figura original de Guangdi Li et al, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2016)²⁷.

1.5. REPLICACIÓN DEL VIRUS DEL VIH

El VIH-1 infecta a las células presentadoras de antígeno (CPAs) tales como macrófagos y CD4, que a su vez promueven la infección de los linfocitos T CD4⁺²⁹, la principal célula diana del VIH. La infección se inicia cuando la proteína gp120 del virus se une al receptor CD4⁺ presente en dichas células diana³⁰ (Figura 3). Esta unión induce un cambio conformacional que promueve que la gp120 interactúe con el co-receptor CCR5 y/o CXCR4, receptores de quimiocinas presentes en estas células. Esta interacción a su vez conduce a un reordenamiento de la proteína gp41, que se insertará en la membrana de la célula huésped e inducirá el fenómeno de fusión. Este paso permite que el virus entre en el citoplasma.

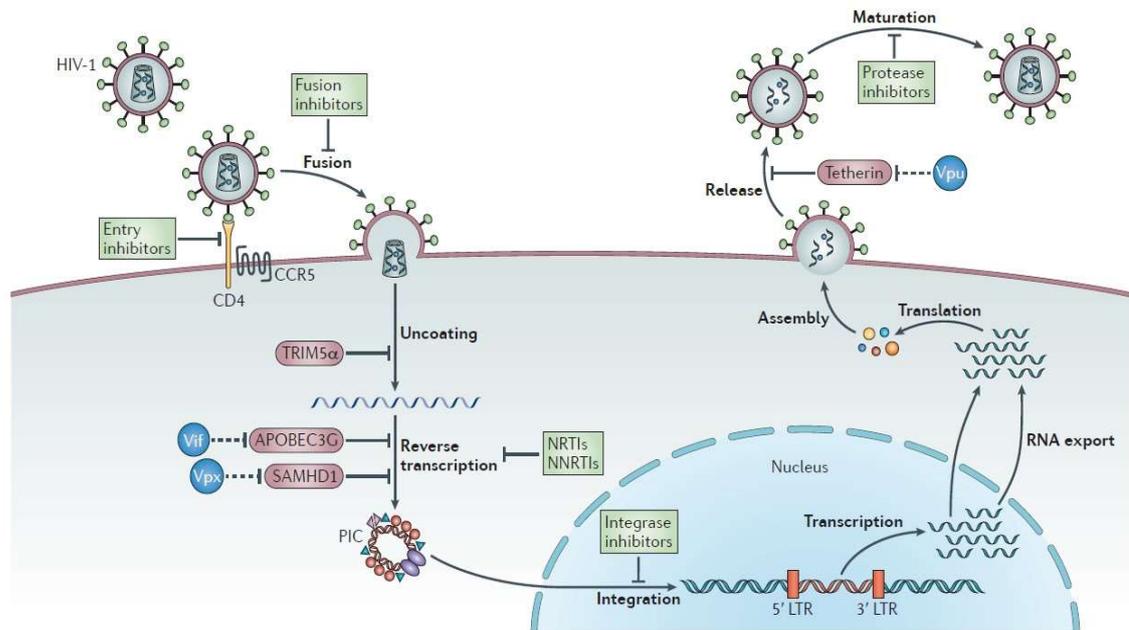


Figura 3: Ciclo de replicación del virus VIH-1. El ciclo de replicación se divide en varios pasos que son: unión del virus al receptor CD4+ y al co-receptor por la proteína gp120, fusión con la membrana de la célula huésped, descapsulación para liberar el genoma viral y las proteínas en el citoplasma, transcripción inversa del ARN en ADNc, formación del complejo de preintegración (PIC) y translocación de este último al núcleo, la integración del ADN viral en el ADN de la célula huésped y su transcripción en el ARN, la exportación del ARN viral al citoplasma y su traducción en proteínas, la migración de este último a la superficie de la membrana celular, el enrepliconblaje, la salida de los nuevos viriones (*budding*) y su maduración en nuevos virus. Las familias de los principales medicamentos antirretrovirales se presentan en verde (Figura original de Barré-Sinoussi et al, Nature Reviews Microbiology, 2013)³¹.

A continuación, tiene lugar la descapsidación que permite la liberación del material genético del virus, permitiendo la transcripción inversa del ARN viral en ADN proviral complementario (ADNc). Este ADN será transportado al núcleo de la célula hospedadora por el complejo de pre-integración (PIC) e integrado en el núcleo utilizando la proteína Vpr. Una vez en el núcleo, el ADNc se integra en el genoma de la célula huésped mediante la integrasa³⁰. Este ADN proviral se copiará durante los ciclos de división celular y se amplificará. La transcripción del ADNc proviral se lleva a cabo por la ARN polimerasa II en cooperación con tat, que cataliza la iniciación y el alargamiento de la transcripción. Las primeras transcripciones virales codifican las proteínas Nef, Tat y Rev, que se exportan al citoplasma^{30,32}. Estos ARNs se traducen en el retículo endoplasmático utilizando la maquinaria de traducción de la propia célula en proteínas estructurales como la gp160

donde se sintetiza y es dirigida a la membrana plasmática por la maquinaria de secreción celular. Durante su tránsito por el aparato de Golgi, el gp160 se glicosila y se corta para formar complejos maduros gp41/gp120. Por otra parte, la proteína Gag también se traduce en el mismo sitio y se dirige a los *lipids raft* (regiones ricas en lípidos)³³. A continuación, estos lípidos forman la envoltura del nuevo virus que juntamente con la acción enzimática de la proteasa provoca el reordenamiento del nuevo virión formando el virus maduro. Las familias de los principales medicamentos antirretrovirales inhiben las distintas fases de la infección del VIH (inhibidores de la entrada/fusión, de la RT, integrasa y proteasa).

1.6. PATOGENICIDAD DEL VIH-1

El virus se transmite a través del contacto sexual, del contacto sanguíneo (transfusión o jeringas contaminadas), o verticalmente, de la madre al niño durante el embarazo y/o el parto³⁰. Sin embargo, la gran mayoría de las transmisiones de virus ocurren por vía sexual, lo que la convierte en una de las principales enfermedades de transmisión. El riesgo de transmisión está presente desde las primeras etapas de la infección y persiste a lo largo de toda la vida, pero puede ser limitado si se controla la carga viral; este tipo de fenómeno es la base de los tratamientos actuales basados en el uso de terapias antirretrovirales³¹. A nivel clínico, la infección por el VIH-1 en ausencia de TARc puede dividirse en tres fases: 1) la fase de infección primaria o aguda, 2) la fase crónica o asintomática y 3) la fase del SIDA (Figura 4).

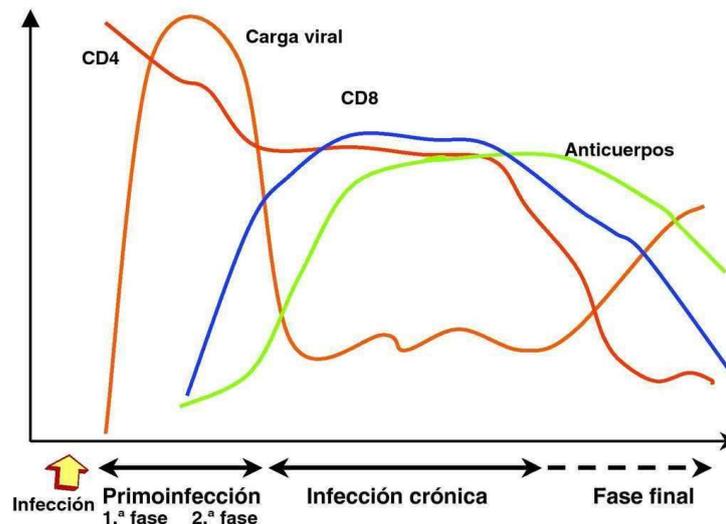


Figura 4: Evolución de carga viral, linfocitos T CD4+ y respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD8+ y anticuerpos anti-VIH-1 en la infección por el VIH-1. (Figura original de J. Alcamí et al, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2011)³⁴.

1. La **fase de infección primaria (primoinfección)** corresponde a las primeras semanas después de la infección. Durante esta fase, el virus entrará en el cuerpo y se propagará rápidamente a los ganglios linfáticos locales a través del torrente sanguíneo, todos los órganos linfoides y en particular al GALT (tejido linfoide asociado con el tracto digestivo), donde hay CPAs y linfocitos T CD4+ con co-receptor CCR5³⁵. Dentro de los linfocitos T CD4+, el virus se replicará rápidamente induciendo un aumento de la carga viral detectable en sangre, acompañado de una fuerte disminución de la población de linfocitos T CD4+, que son esenciales para el buen funcionamiento del sistema inmunitario (linfocitos T colaboradores). A raíz de esto, aparecen síntomas gripales como: dolores de cabeza, fiebre, fatiga o pérdida de peso. Después de 6 semanas, el sistema inmunológico producirá anticuerpos, una respuesta de linfocitos T CD8+ que permitirá que la carga viral disminuya³⁵, si bien al mismo tiempo generará un reservorio de células infectadas.
2. En la **fase asintomática (fase crónica)**, el sistema inmunológico logra contener la infección manteniendo la carga viral a un nivel estable. Esta fase asintomática puede durar un promedio de 10 años. Durante este periodo, gradualmente

aumenta la viremia y se produce la disminución de los linfocitos T CD4+. Si no se trata, esta inmunosupresión progresiva lleva a la última fase de la infección por VIH.

3. La **fase del SIDA (fase final)** se reconoce clínicamente cuando la cantidad de linfocitos T CD4⁺ está por debajo de las 200 células/ μ L de sangre³⁶. El sistema inmunológico por tanto se degradará ostensiblemente. Esta fase irá acompañada de la aparición de numerosas enfermedades oportunistas como tumores (sarcoma de Kaposi y leucemias en particular), infecciones bacterianas o virales (tuberculosis, herpes o infección por citomegalovirus) o infecciones parasitarias y fúngicas³⁶.

CAPÍTULO 2. NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS FRENTE A LA INFECCIÓN POR EL VIH-1

2.1. ESTRATEGIAS DE ERRADICACIÓN DEL VIH-1

La comunidad científica está centrada en el desarrollo de varias estrategias que permitan controlar la propagación y transmisión del VIH³⁷ o abordar la persistencia del VIH-1³⁸. Estas estrategias se pueden agrupar en:

- Microbicidas: geles, cremas o espumas que aplicados por vía vaginal o rectal pueden impedir la transmisión sexual del VIH-1.
- Profilaxis preexposición: estrategia preventiva basada en el tratamiento de poblaciones de riesgo con antirretrovirales de manera previa al contacto con el VIH-1.
- Trasplantes con células madre CCR5D32/D32: Se han descrito dos casos de “curación total”; el primero fue el “Paciente de Berlín” que, tras someterse a este tipo de trasplante, permanece con carga viral indetectable en ausencia de TARc³⁹. El segundo caso es similar al descrito anteriormente, donde las células del donante pueden ser capaces de lograr la remisión del VIH-1⁴⁰.
- Vacunas: Existen dos tipos de vacunas para hacer frente al VIH-1: i) vacunas preventivas, enfocadas a personas no infectadas por el VIH-1, para reducir el riesgo de contagio a nivel poblacional; ii) vacunas terapéuticas, orientadas a personas ya infectadas por el VIH-1, para controlar e intentar eliminar el VIH-1 desencadenando una inmunidad humoral y celular específicas.

2.2. VACUNAS FRENTE AL VIH-1

2.2.1. Vacunas preventivas

El poder disponer de una vacuna preventiva eficaz sería la estrategia más óptima para frenar el VIH a través de la disminución sostenida del número de infecciones⁴¹. En definitiva, la finalidad de dicha vacuna es conferir protección frente a la infección por el VIH-1.

En los primeros estudios sobre vacunas preventivas se desarrollaron más de 20 proteínas de la envuelta del virus con la esperanza de inducir anticuerpos neutralizantes contra el VIH^{42,43}. Sin embargo, se demostró que este tipo de vacunas generaban anticuerpos neutralizantes poco efectivos frente al virus, ya que producían anticuerpos frente a la cepa utilizada en la vacuna⁴⁴. Ello podría atribuirse a la pérdida de células B durante la infección por el VIH que conduce al desarrollo de anticuerpos neutralizantes poco efectivos frente al virus⁴⁵.

Aunque la mayor parte de los esfuerzos realizados con vacunas preventivas frente al VIH han sido estériles o poco efectivos⁴⁶, cabe destacar que el ensayo clínico RV144 realizado en Tailandia, donde se utilizó un *poxvirus* que expresaba los genes de la gp120 y gp41 del subtipo E, gag y la proteasa del subtipo B, así como un refuerzo con gp120 recombinante, mostró un efecto moderado con un 31,2% de eficacia^{47,48}. Este modelo demostró por primera vez que una vacuna preventiva era capaz de prevenir parcialmente la infección del VIH mediante la inducción de una respuesta celular y humoral mediada con anticuerpos (Figura 5).

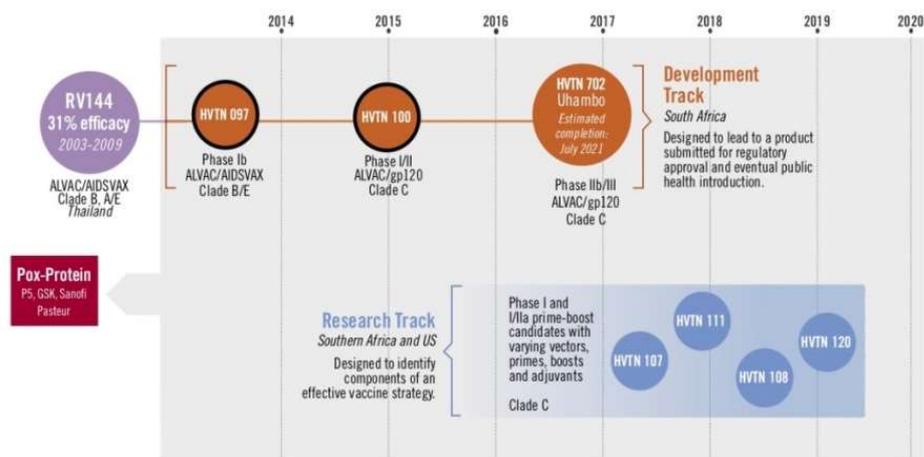


Figura 5. Cronología del ensayo clínico RV144. Fuente: <http://www.avac.org/>.

2.2.2. Vacunas terapéuticas

Las vacunas terapéuticas representan uno de los enfoques más prometedores para hacer frente a la infección por el VIH⁴⁹, ya que su objetivo principal es inducir una respuesta inmunitaria frente antígenos virales del VIH para mantener la replicación viral a niveles indetectables. Dicha respuesta consiste en imitar una “cura funcional” que se da espontáneamente en algunos individuos infectados, como son los controladores de élite⁵⁰. Esta población VIH+ es capaz de controlar la replicación del VIH-1 sin necesidad de TARc y de permanecer durante años con la viremia controlada^{51,52}.

Debido a ello, se han desarrollado diversas vacunas terapéuticas con el fin de mejorar el sistema inmunológico de pacientes infectados por VIH. Ejemplo de ello son las vacunas basadas en ADN que expresan antígenos virales del VIS (virus de la Inmunodeficiencia del Simio) como gag que contribuyen a la disminución de la viremia en *Rhesus macacos*⁵³. También se ha inmunizado con vectores virales como *Modified Vaccinia Ankara (MVA)* y adenovirus⁵⁴, donde se determinó una disminución de la carga viral de VIS que se correlacionó positivamente con un aumento del número de linfocitos T CD4+ contribuyendo a un control de la replicación viral. Recientemente, la vacunación con el vector *ChAdV63-MVA/HIVconsv*, generó una respuesta T específica frente a regiones conservadas del VIH en pacientes infectados por VIH-1 permitiendo la eliminación de células reactivas por el virus y por consiguiente controlar la viremia⁵⁵.

2.3. VACUNAS BASADAS EN CDs PARA HACER FRENTE AL VIH-1

Tal como se ha descrito en la bibliografía, las CDs tienen un papel importante tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa con las siguientes propiedades: capacidad de captar, procesar y presentar antígenos a través de las moléculas del CMH de clase I y II, induciendo la estimulación específica de linfocitos T CD4+ y CD8+, respectivamente^{56,57}.

Este tipo de estrategia basada en CDs se ha utilizado previamente con éxito en el tratamiento de otras patologías como el cáncer. Pacientes con melanoma severo recibieron vacunas con CDs pulsadas con p53 y péptidos derivados de la telomerasa que permitió una disminución de los linfocitos T reguladores, relacionados con la no progresión de la enfermedad en un 25% de los pacientes⁵⁸. Otro ejemplo lo encontramos en el cáncer de próstata donde la vacunación con CDs cargadas con la fosfatasa ácida prostática (PAP) induce una respuesta inmune específica frente al antígeno tumoral, mejorando la supervivencia en pacientes con esta dolencia⁵⁹.

Por otra parte, también se han desarrollado inmunoterapias basadas en CDs como métodos de vacunación frente al VIH-1 en diversos modelos animales y en humanos. A modo de ejemplo, la inmunización terapéutica en pacientes con VIH-1 con CDs pulsadas con péptidos de Gag, Pol, Env e influenza A, determinó una respuesta específica frente a estos péptidos, aumentando la eficacia del tratamiento⁶⁰. Otro ejemplo lo encontramos en pacientes con VIH bajo TARc que fueron vacunados con CDs electroporadas con ARN que codifica antígenos de Gag, Nef, Rev y Vpr, donde se demostró una respuesta específica frente a estos antígenos, acompañada con una disminución de la carga viral⁶¹.

En todas ellas se han obtenido resultados moderados en relación con la inhibición del VIH-1, siendo uno de los más prometedores el realizado en nuestro centro donde se vacunaron pacientes con CDs pulsadas con virus autólogo inactivado por calor. Los datos revelaron una reducción transitoria mayor del 90% en la carga viral en un 55% de los pacientes VIH+ vacunados tras 24 semanas post-vacunación⁶²⁻⁶⁴.

Este tipo de inmunización con CDs presenta una serie de ventajas: buenos perfiles de seguridad, inducción de respuestas específicas frente al VIH y en algunos casos control de la viremia⁵¹. Sin embargo, existen también puntos débiles que son relevantes para mejorar las vacunas basadas con CDs, y que son: i) la elección del inmunógeno; ii) el método de inactivación del virus, solo si se utiliza el virus como inmunógeno; iii) el procedimiento y obtención de las CD *ex-vivo*; iv) su estado de maduración y v) el método de vacunación (dosis de antígeno, ruta de administración, frecuencia de las inyecciones, etc.)⁵⁷.

Todas estas barreras dificultan el desarrollo de vacunas eficaces frente el VIH-1, unido a que la diana del virus son las propias células del sistema inmune, todo ello influye en la pérdida progresiva de linfocitos T CD4+ que dificulta la aparición de respuestas inmunes efectivas. Además, la alta tasa de mutación del propio virus dificulta la selección de antígenos eficaces. En este sentido, se ha descrito la relación entre el control virológico y las respuestas de linfocitos T CD4+ y CD8+ frente al virus del VIH^{52,65}. Además, este tipo de estrategias pueden ir combinadas con fármacos movilizadores del reservorio, terapia génica y anticuerpos específicos contra el VIH para poder combatir más eficazmente los reservorios virales⁶⁶.

CAPÍTULO 3. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS Y SU RELEVANCIA EN EL SISTEMA INMUNE

3.1. INTRODUCCIÓN

La función principal del sistema inmune es proteger al organismo de agentes infecciosos y microorganismos presentes en el ambiente. Un sistema inmune eficaz debe detectar una gran variedad de patógenos y debe saber distinguir los patógenos de las células y tejidos del propio organismo. En este contexto, en el sistema inmune cabe diferenciar: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa⁶⁷.

1. El **sistema inmune innato** es la primera línea de defensa frente a microorganismos, pues proporciona una respuesta inmediata e inespecífica, al reconocer y responder a patógenos de forma genérica y sin generar una inmunidad duradera a largo plazo⁶⁸. En general, las células que constituyen el sistema innato son: i) células epiteliales; ii) células dendríticas; iii) monocitos-macrófagos; iv) neutrófilos; v) células NK; vi) moléculas del sistema del complemento; vii) citocinas y viii) quimiocinas⁶⁷.
2. Por otra parte, el **sistema inmune adaptativo** genera respuestas antígeno-específicas y de memoria tras el primer contacto con el antígeno. Los principales actores que forman la respuesta inmune adaptativa son: linfocitos T y B⁶⁷.

Entre la inmunidad innata y la adaptativa existe un nexo de coordinación que está representado por las CPA. Dentro de este grupo se encuentran las CDs, que juegan un papel crucial por ser las responsables de procesar y presentar antígenos a los linfocitos T mediante el CMH presente en su superficie⁶⁹, con el fin de potenciar la eliminación de patógenos y minimizar los daños tisulares⁷⁰. Por otra parte, las CDs también están implicadas en la respuesta humoral mediante presentación de péptidos vía clase II estimulando a su vez a los linfocitos T CD4+ colaboradores de la respuesta mediada por linfocitos B⁷¹.

En un contexto de VIH, la respuesta inmunológica frente al virus se desarrolla desde un punto de vista celular y humoral.

1. La **respuesta inmune celular** empieza cuando la viremia aumenta produciendo una respuesta de células T restringidas a moléculas HLA I que se dirigen frente a los epítomos de la proteína Nef y Gag del VIH-1⁷². Este hecho se asocia a una fuerte respuesta de los linfocitos T CD8+ específicos frente a Gag con la reducción de la carga viral e incluso el control de la viremia en algunos pacientes infectados⁷³. Por lo tanto el estudio de las respuestas T citotóxicas frente a Gag es importante para su inclusión en vacunas terapéuticas⁷⁴. Sin embargo, las respuestas T citotóxicas dependen de la presencia de las células T cooperadoras CD4+ que durante las primeras etapas de la infección aguda por el VIH son las primeras en agotarse y por consiguiente la respuesta T citotóxica se ve afectada⁷⁵.

2. La **respuesta humoral** frente al virus la desarrollan las células B en los 8 días siguientes a la viremia detectable y se presenta en forma de complejos de virus-anticuerpo. Esta respuesta es seguida por anticuerpos específicos frente a la gp41, que se desarrollan después de 12 días. A partir de dos semanas más tarde aparecen las respuestas a gp120⁷⁶. A pesar de todo, estos anticuerpos no tiene capacidad de neutralizar el virus, debido a la naturaleza conformacional de la envuelta del Virus que dificulta el desarrollo de vacunas frente a Env⁷⁷. Por lo tanto una vacuna preventiva eficaz necesita que los anticuerpos generados neutralicen al mayor número posible de virus heterólogos⁷⁸.

3.2. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las CD^s fueron visualizadas por primera vez en la epidermis por Langerhans en 1868, pero no fue hasta 1973 cuando fueron descritas por Ralph M. Steinman y Zanvil A. Cohn⁷⁹. En 1984 Van Voorhis y col. identificaron a las CD^s como *Peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) en humanos⁸⁰ y se las identificó como células estimuladoras de linfocitos^{81,82}.

El origen de estas CD se encuentra en su diferenciación a partir de las células madre presentes en la médula ósea; a continuación, llegan a los tejidos periféricos por el sistema circulatorio, donde residen como células inmaduras hasta que reciben señales que estimulan su maduración y migración. Las células maduras migran a los nódulos linfáticos donde activan y polarizan la respuesta de las células T (Figura 6).

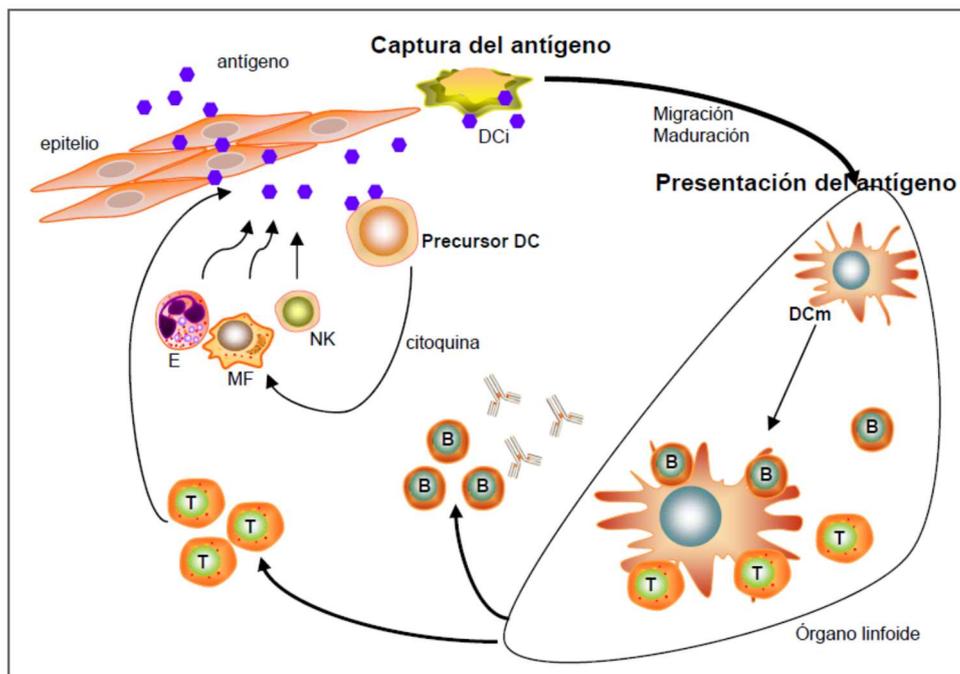


Figura 6: Origen y diferenciación de las células dendríticas (Figura original de Susana Álvarez-Losada et al, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), 2017⁸³).

En condiciones normales, las CD inmaduras (CDsi) están especializadas en la captación de antígeno por vía de endocitosis y macropinocitosis, mientras que las CD maduras (CDsm) pierden estas capacidades en favor de una mayor capacidad estimuladora que inducirán la activación de los linfocitos T *naive* para el desarrollo de células T efectoras ⁸⁴.

El proceso de maduración de las CD está formado por diferentes estadios y cambios fisiológicos. Como se representa en la Figura 7, las CD captan el antígeno y lo procesan por vía endocítica; en esta vía se produce el tráfico endosomal, que consiste en la invaginación de la membrana que formará una vesícula de diversos tamaños en función del antígeno.

Dicha vesícula se fusionará con los endosomas que madurarán hasta convertirse en endosomas tardíos, los cuales finalmente se fusionarán con los lisosomas^{85,86}.

Dentro de estas vesículas se establece un gradiente de pH que va de menos ácido en los endosomas (pH 6,5 - 6,8) a más ácido en los lisosomas (pH 4,5), que con el ambiente ácido y la presencia de numerosas hidrolasas provocan la degradación de la molécula internalizada⁸⁷.

Paralelamente, durante el proceso de maduración existe en la superficie de las CDs un aumento de: moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 (B7), receptores de maduración como el CD83, complejos mayores de histocompatibilidad y receptores de quimiocinas.

Además, se han identificado receptores tipo *toll-like receptors* (TLRs) y lectinas de tipo C como factores involucrados en la regulación de la maduración de las CDs. En contextos de infección vírica e inflamación, dichos receptores permiten el reconocimiento de ciertos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y la activación de la vía NF- κ B para secretar citocinas proinflamatorias como el TNF- α , que actúa de forma autocrina o paracrina⁸⁸. También se induce a la secreción de otras citocinas proinflamatorias tales como IL-1 e IL-6 que participan durante el proceso de maduración, en colaboración con otras señales mediadas por los receptores Fc⁸⁹.

Al madurar, las CDs migraran al linfonodo con la finalidad de presentar antígenos a las células T⁸⁴. Esta acción es promovida por la quimiocinas que se secretan en episodios de infección viral e inflamación⁹⁰.

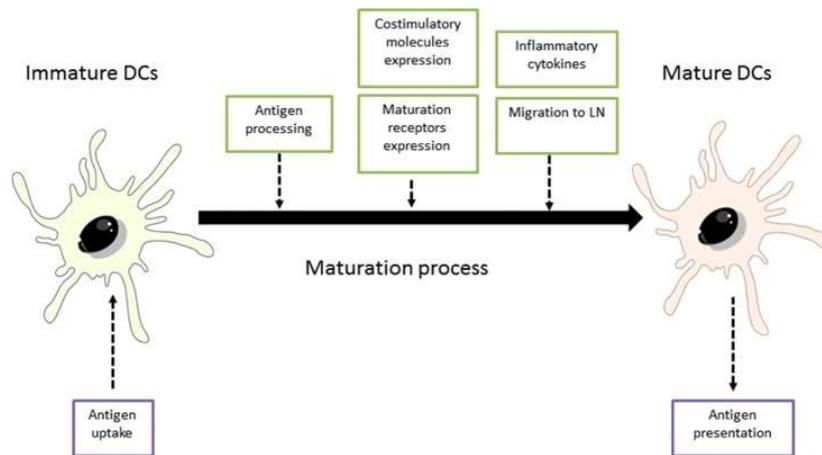


Figura 7. Proceso de maduración de las CDs (Figura original de G. Flórez-Grau et al, *Frontiers in Immunology*, 2018)⁸⁴.

3.3. SINÁPSIS ENTRE LA CD Y EL LINFOCITO T

Una vez adquirido el fenotipo de maduración y migrado a los linfonodos, las CDs interactúan con los linfocitos T CD4+ o CD8+ para activarlas. Este contacto se denomina *priming* cuando activa células T *naive* y es específica de antígeno^{91,92}. Para la correcta activación de las células T se necesitan al menos tres señales de activación:

1. La **primera señal** es antígeno específico y está involucrada en el reconocimiento por parte de CMH de clase I o II, cargado con péptido, en la superficie de las CDs con los receptores de antígenos de las células T (TCRs).
2. La **segunda señal** consiste en la activación de los linfocitos T. Se trata de la interacción entre las moléculas coestimuladoras que expresan las CDs con los respectivos ligandos que se expresan en las células T. En este caso las moléculas coestimuladoras, como también las de adhesión (ICAM 1, ICAM 2 y OX40-I) presentes en las CDs, interactúan con sus receptores respectivos de células T (CD28, LFA-1 y OX40). En conjunto, estas dos señales son imprescindibles para la activación y amplificación de las respuestas inmunes de los linfocitos T, y contribuyen significativamente a la diferenciación de las células T.

3. Por último, la **tercera señal** está relacionada con el gradiente de citocinas presente en el medio que puede influir en la regulación del fenotipo y función de las células T^{93} .

Como se puede apreciar en la Figura 8, el patrón de citocinas secretado por las CD define la polarización de los linfocitos Th *naive* hacia: Th1, productores de IFN- γ eficaces en eliminar patógenos intracelulares; Th2, productores de IL-4 eficaces en eliminar patógenos extracelulares; Th17, productores de IL-17 implicados en respuestas autoinmunes, y células T reguladoras (Treg) implicadas en procesos inmunosupresores^{94,95}.

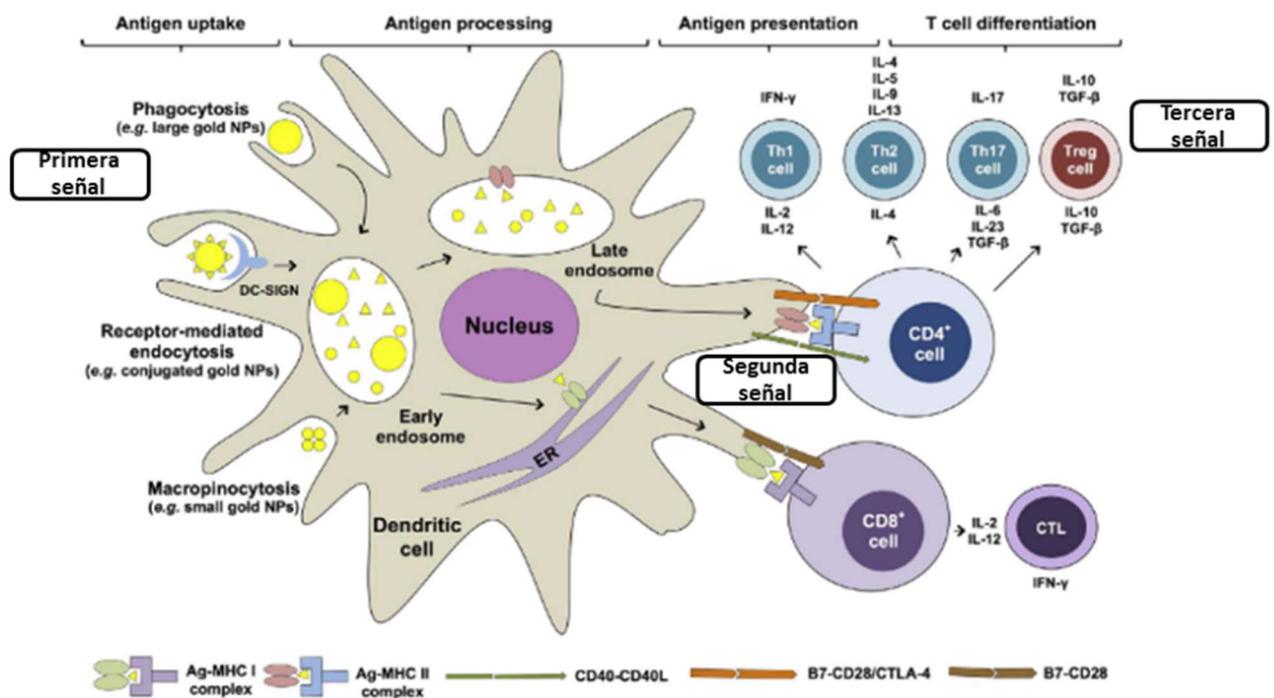


Figura 8. Señales activación y determinación del tipo de respuesta inmune por células dendríticas (Figura adaptada de Suhana Ahmad et al, Molecular immunology, 2017⁹⁶).

3.4. SUBPOBLACIONES DE CD_s

Las CD_s son un grupo de células heterogéneo que se clasifican en función de la localización anatómica, el origen y la función.

En sangre periférica, las CD_s están divididas en dos grandes grupos: CD_s mieloides, con elevada capacidad de activar de células T *naive*⁹⁷ y CD_s plasmacitoides que presentan una cierta especialización en la respuesta T citotóxica con capacidad antiviral y anti-cancerígena, mediante la producción de grandes cantidades de IFNs tipo I⁹⁸.

Por otra parte, tenemos las CD_s derivadas *in-vitro* de monocitos con una elevada capacidad fagocítica^{99,100} (Figura 9).

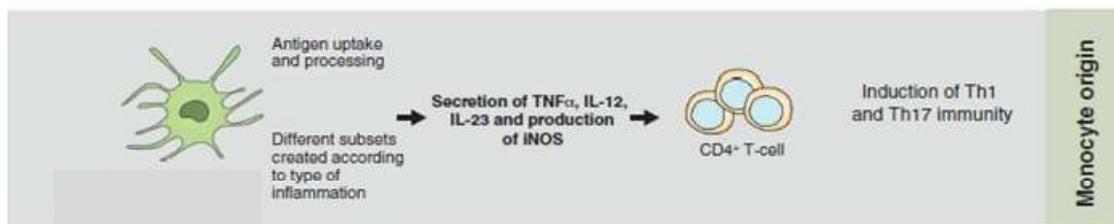


Figura 9. Características CD_s derivadas de monocitos (Figura adaptada de Andreas Schlitzer et al, Current Opinion in Immunology, 2014 ⁹⁹).

Esta transformación es gracias a la plasticidad que presentan durante su proceso de diferenciación y ello es dependiente del estímulo o tejido en que se encuentren localizados¹⁰¹. Por ejemplo, las CD_s derivadas *in vitro* a partir de monocitos pierden sus funciones efectoras si se retiran o se añaden citocinas¹⁰² (Figura 10).

De hecho, el primer contacto de una citocina determina su programa de diferenciación y perfil de respuesta frente a otras citocinas⁹⁰. Concretamente, se usan GM-CSF e IL-4 para la diferenciación a CD_s¹⁰³⁻¹⁰⁵, mientras que para macrófagos se diferencian en presencia de GM-CSF o MCSF¹⁰⁵. Además, el microambiente celular y la presencia de estímulos externos ayuda también en la diferenciación del monocito inducido por citocinas^{106,107}. Gracias a

esta propiedad se han establecido técnicas de cultivo *in vitro* que permiten la generación de gran cantidad de CDs a partir de monocitos como modelo en diferentes vacunas frente al VIH-1 basadas en CDsmo con diferentes inmunógenos^{108,109}.

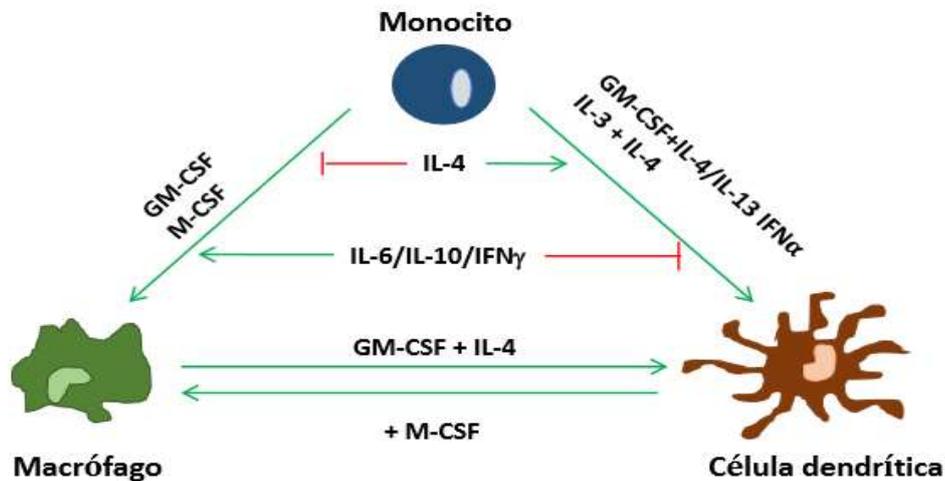


Figura 10: Diferenciación *in vitro* de CDs y macrófagos a partir de monocitos. (Figura original de Susana Álvarez-Losada et al, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), 2017⁸³).

3.5 EL PAPEL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA INMUNIDAD INNATA

La respuesta inmunitaria innata es la primera línea de defensa del cuerpo contra un agente infeccioso. Por este motivo, esta tiene lugar en sitios de entrada de patógenos tales como: la piel, el tracto respiratorio, las mucosas, los pulmones y el intestino. En dichas localizaciones están presentes las CDs que desempeñan un papel clave en el control de la infección y pueden influir en el inicio de la respuesta innata⁹⁴.

Las CDs detectan patógenos a través receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que reconocen PAMPs y señales endógenas asociadas a daño tisular. Estos PRR, que incluyen receptores de tipo TLR 1-11¹¹⁰ y una variedad de lectinas tipo-C¹¹¹, activan factores de transcripción NF- κ B que están relacionados en:

1. La **activación celular de las células efectoras** de la inmunidad innata como lo son las células NK. Concretamente, mediante la liberación de IFN- α las CD8 activan las NK, promoviendo una mayor actividad antiviral y antitumoral¹¹².

2. La **producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias** promueven la dilatación de los vasos y el reclutamiento de otras células fagocíticas como: monocitos, neutrófilos y eosinófilos; como consecuencia, ayudan en la eliminación del antígeno en el lugar de la infección⁹⁴.

3. La **estimulación del proceso de maduración de las CD8** promueve la migración hacia los linfonodos donde entrarán en contacto con los linfocitos T *naive* iniciando la inmunidad adaptativa⁹⁴.

3.6. EL PAPEL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA INMUNIDAD ADAPTATIVA

La respuesta inmune adaptativa es la segunda línea defensiva y está mediada principalmente por los linfocitos B y linfocitos T. La respuesta se inicia en el linfonodo, donde las CD8 maduras que expresan el complejo CMH/péptido coordinan la activación de los linfocitos T CD4+¹¹³ (Figura 11). Durante esta unión, se genera un gradiente de citocinas que polarizarán los linfocitos T CD4+ *naive* en linfocitos T CD4+ TH1 o TH2¹¹⁴.

1. Los **linfocitos T CD4+ Th1** producen citocinas como la IL2 asociada con la activación de los linfocitos T colaboradores e IFN- γ que estimulan los linfocitos T CD8+ promoviendo la respuesta citotóxica⁹⁴. Estas células, tras la unión con las CD8 mediante el complejo CMH/péptido, secretarán perforinas que inducen la formación de poros en la célula diana. Estos poros permiten la entrada de enzimas proteolíticas secretadas por las propias T CD8+ como la granzima B promoviendo la apoptosis en células infectadas o dañadas¹¹⁵.

2. Los **linfocitos T CD4+ Th2** secretan varias citocinas como IL4, IL5, IL6 e IL10 que inhibe una variedad de citocinas como la IL2 y el IFN- γ para prevenir la sobreestimulación de los linfocitos T CD4+ Th1 y a su vez activan los linfocitos B induciendo la respuesta humoral⁹⁴. En esta interacción, los linfocitos B se diferenciarán, por un lado, en células plasmacitoides productoras de anticuerpos frente al antígeno de interés, y por otro, formarán linfocitos B memoria que, en caso de que se encuentren con el antígeno una segunda vez, se diferenciarán más rápidamente generando una respuesta más potente, de mayor calidad y confiriendo inmunidad a largo plazo¹¹⁶.

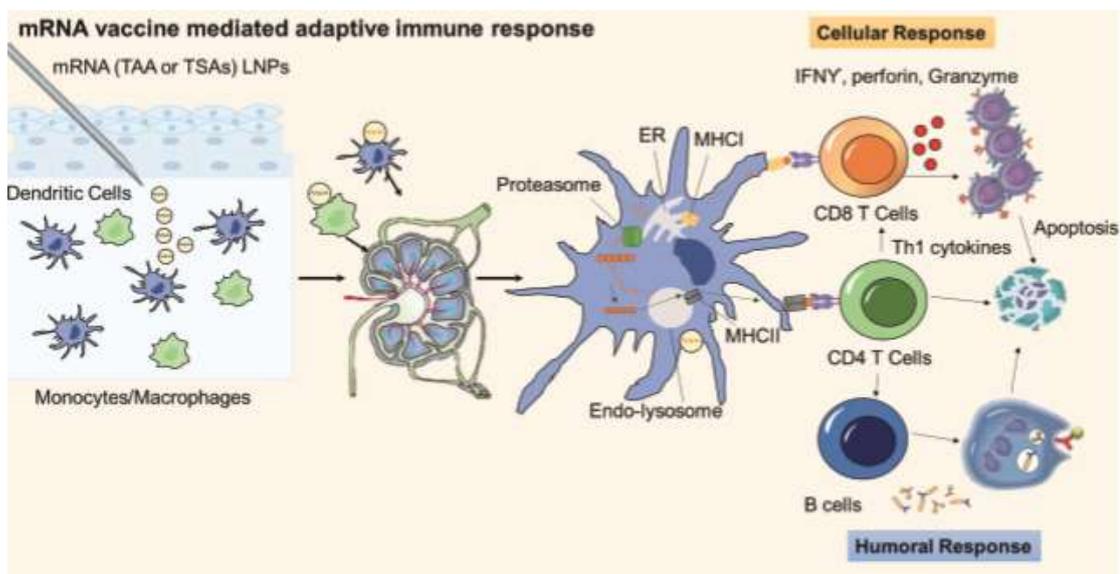


Figura 11. Inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa mediante vacunas de ARNm en células dendríticas. (Figura original de Kowalski, Piotr S et al, Molecular Therapy, 2019).¹¹³

CAPÍTULO 4. NUEVAS FORMULACIONES DE VACUNAS:

VACUNAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.1. DE LAS VACUNAS CONVENCIONALES A LAS VACUNAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La vacunación es una herramienta muy útil para hacer frente a las enfermedades infecciosas y como tal, debe cumplir las siguientes especificaciones: i) ser segura y no inducir patologías; ii) conferir protección a largo plazo; iii) ser práctica en términos de coste, estabilidad y facilidad de administración y iv) tener efectos secundarios limitados¹¹⁶.

Las vacunas convencionales se dividen en 4 grupos: i) heterólogas y/o atenuadas, ii) inactivadas, iii) subunidades y iv) proteínas recombinantes.

1. Las **vacunas heterólogas** se basan en atenuar patógenos de modo que pierdan su capacidad de causar enfermedad en un hospedador. Este proceso se consigue seleccionando cepas que son menos capaces de reproducirse en el hospedador natural. La ventaja de estas vacunas es que ofrecen una exposición prolongada a los epítomos de los patógenos atenuados, que conlleva un aumento de la inmunogenicidad y producción de células de memoria¹¹⁷. Como desventaja, existe la posibilidad de que los patógenos retornen a su forma más virulenta y no sean aplicables a determinadas personas como: inmunodeprimidos, personas trasplantadas, etc.¹¹⁸. Este tipo de vacunación es utilizada para hacer frente a la viruela ¹¹⁹, la rabia ¹²⁰ o el rotavirus ¹²¹.

2. Las **vacunas inactivadas** consisten en la desactivación del agente patógeno mediante calor o sustancias químicas, de tal modo que no sea capaz de multiplicarse en el hospedador. Este tipo de vacunación requiere refuerzos repetidos para conservar el estado de inmunidad del hospedador¹¹⁷. Entre las vacunas desactivadas de uso común encontramos las vacunas contra la peste o hepatitis A^{120,122}.

3. Las **vacunas subunitarias** están compuestas por macromoléculas purificadas específicas que derivan de agentes patógenos. En general, se utilizan tres formas de estas

vacunas: eotoxinas desactivadas, polisacáridos capsulares y antígenos proteínicos. Como ventaja, encontramos que la selección de antígenos específicos reduce la posibilidad de reacciones adversas¹¹⁷. Este tipo de vacunas se usa frente a meningococo y neumococo¹²⁰.

4. Las **vacunas recombinantes** consisten en el uso de microorganismos atenuados (bacterias o virus) que funcionan como vector multiplicándose en el hospedador y expresando genes de agentes infecciosos; por consiguiente, se imita la infección natural generando una intensa inmunoreacción. Este tipo de vacunación se utiliza frente la hepatitis B¹²³.

A pesar del éxito de las vacunas tradicionales, existen varias limitaciones para el desarrollo de vacunas en ciertos patógenos infecciosos, incluidos aquellos que tienen la capacidad de escapar de las respuestas inmunitarias adaptativas¹²⁴. Además, este tipo de vacunas se asocian con la inducción de la respuesta humoral que en algunas enfermedades no es suficiente, ya que sería necesario estimular una respuesta citotóxica que permitiese la eliminación de las células infectadas o dañadas, como en el caso del VIH o de células tumorales¹²⁵. Debido a esto, las nuevas estrategias de vacunación se han centrado en el uso de los ácidos nucleicos para inducir una respuesta citotóxica.

4.2. ADN Y ARNm: BIOMOLÉCULAS DE ELECCIÓN PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS

Las vacunas de ácido nucleico se basan en el uso de ADN o ARNm que permiten la entrega de secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas antigénicas. Además, permiten la inducción de respuestas inmunitarias humorales y/o adaptativas para hacer frente a enfermedades que son difíciles de tratar con las vacunas tradicionales¹²⁶. Por lo tanto, las ventajas que presenta el uso de ADN y ARNm en el desarrollo de vacunas son las siguientes:

1. La posibilidad de codificar una amplia variedad de antígenos¹²⁷.
2. El propio efecto adyuvante que genera la administración de ADN o ARNm¹²⁷.

3. Imitan la infección viral natural, por tanto, una vez administrada la vacuna la secuencia nucleica será manejada por la células como si se tratase de una infección viral de origen de ARN o ADN¹²⁷.

A partir de los primeros resultados favorables que demostraron que la inyección directa de ADN plasmídico o ARNm desnudo en el músculo esquelético de ratón permitía la expresión de proteínas¹²⁸, las vacunas de ácidos nucleicos se han centrado en el uso de ADN y ARNm.

1. **Las vacunas de ADN** se basan en el uso de ADN plasmídico que codifica proteínas antigénicas y que son administradas por varias vías: intramuscular, intradérmica o subcutánea. Las células presentes en la zona de administración, como las CD, captan el ADN, lo procesan por la propia maquinaria de la célula huésped para producir ARNm que se traducirá en proteínas antigénicas. Todo ello desencadenará en una reacción humoral y otra mediada por células generando en su conjunto respuesta inmunitaria prolongada y duradera¹²⁹. Las vacunas de ADN ofrecen una serie de ventajas, como por ejemplo que la proteína codificada se expresa en el hospedador en su forma natural, sin modificaciones o desnaturalización, de forma que la reacción inmunitaria se dirige contra el antígeno tal y como lo expresa el patógeno¹¹⁷. Actualmente, existen numerosos ensayos clínicos de vacunas de ácidos nucleicos contra la gripe, la hepatitis B y en oncología¹³⁰, así como en VIH. Por ejemplo, en pacientes infectados por el VIH-1 inmunizados 4 veces con un ADN que codifica epítomos conservados del VIH-1 y que estimulan a linfocitos T citotóxicos revelaron respuestas a uno o más epítomos codificados por la vacuna, lo cual indica el “*priming*” de la células T inducido por los epítomos codificados por esta vacuna de ADN¹³¹.

2. **Las vacunas de ARNm** se basan en administrar un ARNm que codifica para un inmunógeno desnudo o vectorizado que irá dirigido a células presentadoras de antígenos como las CD. En el citoplasma de estas células, el ARNm se traducirá en una proteína antigénica a través de la maquinaria de traducción de la célula huésped. Específicamente, la traducción se divide en 3 fases: i) Iniciación (unión al ribosoma y reconocimiento del codón de iniciación AUG), ii) Alargamiento (traducción del gen de interés) y iii) Terminación

(disociación de la maquinaria de traducción). Una vez finalizada la traducción, la proteína formada se someterá a modificaciones postraduccionales, dando lugar a proteínas funcionales¹³². Esta proteína antigénica será reconocida por el sistema inmunológico con el fin de inducir una respuesta inmunitaria adecuada¹³².

El uso de ARNm con fines vacunales presenta una ventaja frente al ADN, ya que aquél puede ser traducido a proteína en el citosol; ello hace que disminuya el riesgo de integración o mutación en el genoma de la célula huésped y, por consiguiente, presenta mejores perfiles de seguridad¹³³.

Al igual que en las vacunas de ADN, las basadas en ARN están siendo utilizadas frente a infecciones o en cáncer¹²⁷ (Tabla 2). Por ejemplo, en el ensayo clínico en humanos de vacuna profiláctica basada en ARNm que codifican la glicoproteína del virus de la rabia, se demostró que este tipo de vacunación era capaz de inducir anticuerpos frente a este virus, además de unos buenos perfiles de seguridad y tolerabilidad¹³⁴. El desarrollo de vacuna terapéutica frente al VIH-1 realizado en nuestro centro fue evaluado en un modelo *in-vitro* de CDs de pacientes infectados por el VIH y en un modelo de ratón el impacto de un ARNm que codifica para fragmentos del VIH-1 como Gag, Pol, Vif y Nef junto la acción de ARNm desnudo con funciones de adyuvante que codifica para CD40L, CD70 y una forma constitutiva del TLR4. Los resultados sugieren que el ARNm fue captado por las CDs, que fueron capaces de procesar y expresar dichos antígenos, promoviendo la activación de los linfocitos T y producir respuestas inmunes específicas de antígenos de VIH-1¹³⁵. A posteriori, en el ensayo clínico en fase I a pacientes infectados con VIH-1 se les administró 3 dosis intranodales de los ARNm descritos anteriormente, cuyos resultados demostraron que son seguras, bien toleradas, y se indujeron moderadas respuestas de células T específicas frente al VIH¹³⁶.

Sponsoring institution	Vaccine type (route of administration)	Targets	Trial numbers (phase)	Status
Argos Therapeutics	DC EP with autologous viral Ag and CD40L mRNAs (i.d.)	HIV-1	• NCT00672191 (II) • NCT01069809 (II) • NCT02042248 (I)	• Completed ¹⁰⁵ • Completed; results NA • Completed; results NA
CureVac AG	RNActive viral Ag mRNA (i.m., i.d.)	Rabies virus	NCT02241135 (I)	Active ^{56,91}
Erasmus Medical Center	DC loaded with viral Ag mRNA with TriMix (i.nod.)	HIV-1	NCT02888756 (II)	Recruiting
Fundació Clínic per la Recerca Biomèdica	Viral Ag mRNA with TriMix (NA)	HIV-1	NCT02413645 (I)	Active
Massachusetts General Hospital	DC loaded with viral Ag mRNA (i.d.)	HIV-1	NCT00833781 (II)	Completed ¹⁰⁴
McGill University Health Centre	DC EP with autologous viral Ag and CD40L mRNAs (i.d.)	HIV-1	NCT00381212 (I/II)	Completed ¹⁰²
Moderna Therapeutics	Nucleoside-modified viral Ag mRNA (i.m.)	Zika virus	NCT03014089 (I/II)	Recruiting ⁸⁵
		Influenza virus	NCT03076385 (I)	Ongoing ²²

Tabla 2. Tabla resumen con los ensayos clínicos de vacunas basadas en ARNm frente a enfermedades infecciosas (Tabla original de Pardi. N et al, Nature Reviews, 2018) ¹²⁷. La tabla resume los ensayos clínicos registrados en ClinicalTrials.gov hasta el 5 de mayo de 2017. Ag, antígeno; CD40L, ligando CD40; DC, célula dendrítica; EP, electroporado; i.d., intradérmico; i.m., intramuscular; i.nodal, intranodal; NA, no disponible.

4.3. CLASIFICACIÓN DE LAS VACUNAS BASADAS EN ARNm CONVENCIONALES Y ARNm AUTOREPLICATIVOS (REPLICONES)

Gracias a los descubrimientos obtenidos en cáncer sobre el uso de vacunas basadas en ARNm¹³⁷, éstas han sido clasificadas en dos subtipos: 1. ARNm convencionales y 2. replicones.

Ambas son captadas por las células por vía endocitosis, por lo que estimulan PRRs como los TLR3,7 y 8 y receptores citosólicos; seguidamente, en el citosol tiene lugar la traducción y el procesamiento de la proteína antigénica que será presentada en la superficie de la célula por el complejo CMH¹³⁸. Por lo tanto, utilizan la maquinaria de traducción de la célula huésped para producir antígenos con el objetivo de potenciar y obtener respuestas inmunitarias adaptativas específicas¹³⁹ (Figura 12).

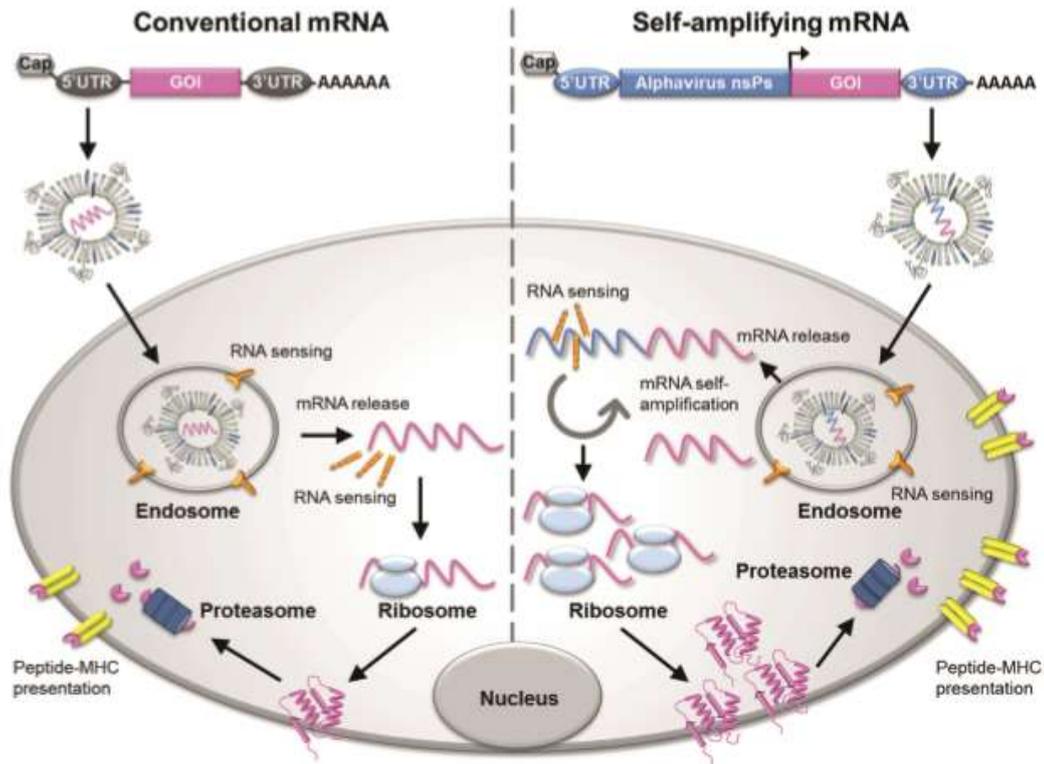


Figura 12. Representación esquemática de ARNm convencional y replicón utilizados en un contexto de vacunas y su mecanismo de expresión antigénica. (Figura original de Giulietta Maruggi et al, Molecular Therapy, 2019)¹⁴⁰.

1. Los **ARNm convencionales** están formados por 5 regiones importantes: una secuencia de iniciación o CAP, una región UTR en 5', una región con la secuencia que codifica el antígeno (*ORF, Open Reading Frame*), una región UTR en 3' y una cola de poly-A

Como ventajas del uso de ARNm convencionales en vacunas son: i) el tamaño sensiblemente inferior si lo comparamos con un replicón (2–3 versus 10 kb); ii) la ausencia de maquinarias de autoreplicación viral minimiza la posibilidad de interacciones inmunogénicas indeseables con el huésped, y iii) su facilidad de fabricación¹⁴¹.

A pesar de las ventajas que presenta el uso de ARNm en vacunas, existen limitaciones relacionadas con la entrega de estos ARNm en el interior de la célula, ya que son

degradados por varios agentes como endonucleasas o proteínas séricas que provocan una expresión transitoria de las proteínas¹⁴².

El uso de ARNm convencionales ha demostrado su éxito en vacunas enfocadas a conferir inmunidad frente al virus de la gripe o Zika en ratones y primates^{143,144}.

2. Los **replicones** son derivados de un ARN viral, que codifica el antígeno de interés y proteínas virales no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4)¹⁴⁰ que le permiten autoamplificarse generando intermediarios de ARN y copias subgenómicas de ARNm que codificarán grandes cantidades de antígeno¹⁴⁰.

Como ventajas, los replicones tienen la capacidad de producir una gran cantidad de proteína antigénica y una durabilidad prolongada en la célula huésped¹³⁸. En cuanto a las limitaciones, hay que destacar que su tamaño (11-13kb) es un obstáculo para poder ser internalizado eficazmente^{145,146}.

Como recapitulación, las vacunas basadas en replicones han demostrado ser más efectivas que las convencionales por varias razones: i) incrementan la potencia de las respuestas inmunitarias; ii) amplían la duración de la expresión de antígeno; iii) activan la respuesta innata, y iv) tienen un efecto adyuvante debido a su origen viral. Por ejemplo, la administración de un replicón que codifica fragmentos del virus de la gripe es capaz de potenciar la respuesta T CD8+ y de aumentar la respuesta de las T CD4+ confiriendo protección frente al virus¹⁴⁷.

Sin embargo, existen ciertos obstáculos en el uso de ARNm convencionales y replicones. Para superarlos se han planteado métodos de transfección más eficientes en varios ensayos clínicos contra el melanoma, el mieloma, leucemia y VIH (Tabla 2) como la electroporación *ex vivo* en CD8¹⁴⁸. Además, se han explorado otros métodos de entrega de ARNm más eficientes y menos tóxicos usando nanotransportadores de base lipídica o polímeros¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

4.4. BARRERAS EN LA VEHICULIZACIÓN DE ARNm

Para conseguir que el ARNm convencional o replicon pueda ser entregado con éxito en el interior de la célula diana, es importante superar las barreras físicas que están presentes en la célula¹¹³, como cruzar la bicapa lipídica para poder ser internalizado en el citoplasma (Figura 13). Como ejemplo de dichos obstáculos de entrega de ARNm a nivel *ex vivo* e *in vivo* podemos señalar: i) la citotoxicidad asociada a la manipulación y vectores de entrega¹⁵²⁻¹⁵⁴; ii) la captación celular; iii) el escape endosomal; iv) la degradación del ARNm provocado por el lisosoma y las nucleasas presentes en el citoplasma^{155,156}; v) la respuesta inmune mediada a través de los PRRs asociados al sistema inmune innato, como los TLRs, RIG-1¹⁵⁷; vi) la baja eficiencia de transfección; y vii) la producción de formulaciones con baja capacidad de entrega^{158,159}.

Para superar estos impedimentos las vacunas de ARNm deberían cumplir una serie de requisitos: i) formulación de complejos de NPs con ARNm estables con el fin de conferir protección frente a la degradación, ii) potenciar la eficiencia en la captura, iii) permitir el escape endosomal y iv) entregar ARNm en el citoplasma de la célula diana¹¹³. Así pues, para optimizar las condiciones de transfección y conseguir un alto rendimiento y una buena eficiencia, se han desarrollado métodos físicos como la electroporación y la transfección mediante microfluídicos¹⁶⁰.

A nivel *in vivo*, la entrega de ARNm en la célula diana necesita atravesar órganos y tejidos. Estos últimos presentan unas barreras físicas muy complejas que hay que tener en cuenta y que son: i) la rápida degradación del ARNm debido a las nucleasas presentes en suero, a nivel del líquido tisular o en mucosa^{156,161}, ii) las interacciones no específicas con proteínas o con las células no diana que dan lugar a agregados de glóbulos rojos o por proteínas séricas¹⁶², iii) la extravasación desde los vasos sanguíneos hacia los tejidos diana y iv) la interacción a nivel hepático o renal¹⁶³.

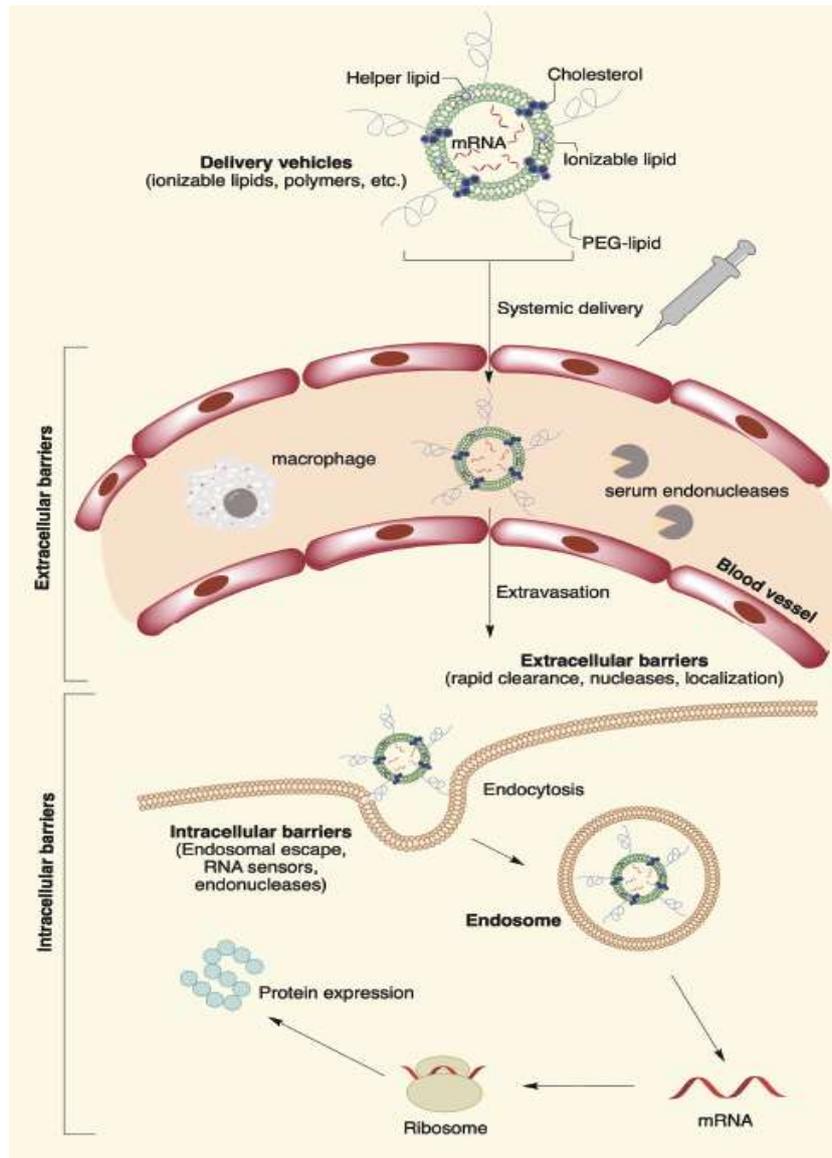


Figura 13. Representación esquemática sobre las barreras extracelulares e intracelulares en la entrega de ARNm en una célula diana. (Figura original de Piotr S Kowalski et al, Molecular Therapy, 2019)¹¹³.

4.5. ESTRATEGIAS PARA OPTIMIZAR LA ENTREGA DE ARNm

En el uso de las vacunas basadas en ARNm, la entrega del ARNm en el interior de las células diana es un paso crítico en la efectividad de la inducción de la respuesta inmunológica deseada¹²⁷. Debido a esto, se ha planteado una mejora en los diferentes sistemas de entrega de ARNm que se pueden dividir de la siguiente manera (Tabla 3):

1. Entrega de **ARNm desnudos**: Debido a su naturaleza polianiónica, que contiene muchas cargas negativas, el ARNm puede ser repulsado por las cargas positivas presentes en la membrana celular¹⁶⁴. Aun así, los ARNm desnudos se han utilizado con éxito en algunas inmunizaciones, como por ejemplo en la inducción de respuestas T en modelo de ratón ¹⁶⁵. Sin embargo, el ARNm desnudo sin la ayuda de métodos físicos o vectores de entrega es débilmente captado por las CPAs (1 por cada 10.000 moléculas administradas); además, la vida media de estos ARNm es muy baja (7 horas) debido a su susceptibilidad a ser degradado por endonucleasas¹⁶⁶.

2. La **electroporación** es un método físico que consiste en crear poros en la membrana celular a partir de un campo eléctrico de alta intensidad para permitir que los ácidos nucleicos presentes en las proximidades puedan entrar en la célula¹⁶⁷. Esta técnica se usa en experimentos *in vitro* en ratones y en humanos para transfectar eficazmente el ARNm y promover respuestas inmunes potentes^{168,169}. Aun así, estos métodos presentan algunas limitaciones asociadas a las barreras físicas descritas anteriormente.

3. Los **vectores de entrega** se utilizan para superar los principales obstáculos físicos presentes en las células y promueven la entrada de ARNm en el interior de la célula. En concreto, se están utilizando diferentes sistemas basados en el uso de:

3.1. **Protamina (PROT)**, una proteína catiónica que confiere protección contra la degradación de los ARNm¹⁷⁰ y estimula los TLRs influyendo en la proliferación celular¹⁷¹.

3.2. Complejos con **péptidos catiónicos** que reducen el impacto de la interacción entre la nanopartícula y el ARNm permitiendo una mejora en la expresión del ARNm^{172,173}. Por ejemplo, se ha descrito que los péptidos catiónicos anfipáticos RALA y LAH4 condensan el ARNm en los nanocomplejos y son capaces de alterar las membranas del endosoma, permitiendo así el escape endosomal y la liberación del complejo en el citosol¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

3.3. Agentes comerciales basados en **lípidos catiónicos**. A raíz de su alta eficacia para la administración de ARNm, se han desarrollado agentes transfectantes para promover la transfección *in-vitro* de ARNm¹⁷⁷. Ejemplo de ello es la lipofectamina 2000 (Thermo Fisher) que permite la expresión prolongada de ARN en el 90% de las células *in vitro*^{178,179}.

3.4. **Vectores con lípidos** (PLAs, LS y LP-PLAs). Estos tipos de vectores permiten la formación espontánea de complejos entre los ARNm cargados negativamente, con los lípidos catiónicos a través de interacciones electrostáticas. Estos complejos han demostrado alta eficacia de transfección como también inducción de respuestas citotóxicas en un contexto de vacuna frente al VIH-1¹⁸⁰. Además, este tipo de nanoplataformas lipídicas tienen una buena biocompatibilidad con el organismo y, de hecho, se han convertido en prometedores nanovectores en la administración de ARNm¹⁸¹.

	Application	Efficiency	Toxicity	Other Characteristics
Microinjection	<i>ex vivo</i>	high	low	not applicable for large number of cells
Electroporation	<i>in vitro</i>	high	medium to high	not applicable for <i>in vivo</i> delivery
	<i>ex vivo</i>			
Squeeze	<i>in vitro</i>	high	medium	not applicable for <i>in vivo</i> delivery
	<i>ex vivo</i>			
Cationic lipids	<i>in vitro</i>	high	medium to low	can be used in combination with systemic or local administration
	<i>in vivo</i>			
Cationic polymers	<i>in vitro</i>	high	medium to low	can be used in combination with systemic or local administration
	<i>in vivo</i>			

Tabla 3. Tabla resumen con los diferentes sistemas de entrega de ARNm. (Tabla original de Hong-Xia Zhang et al, Molecular Therapy, 2019)¹⁸²

CAPÍTULO 5. REPLICONES ARN/DNA DE ALFAVIRUS COMO CANDIDATOS VACUNALES

5.1. EL ORIGEN DE LOS REPLICONES DE ARN/DNA (RREP/DREP)

Los Alfavirus pertenecen a la familia *Togaviridae* y de su tipología se han identificado unos treinta, como el Sindbis (SIN), Semliki Forest (SFV), Chikungunya (CHIKV) o Encefalitis Equino Venezolano (EEV)¹⁸³. De entre ellos, el alfavirus más común para generar replicones de ADN/ARN es el SFV, ya que este ARN viral sirve de molde para la fabricación de replicón de ARN (RREP) o ADN (DREP)¹⁸⁴.

La composición de estos RREP y DREP es similar a la de un replicón, ya descrito en el punto 4.3. La única diferencia radica en el promotor: RREP tiene un promotor SP6 mientras que DREP presenta uno de CMV (Figura 14)¹⁸³.

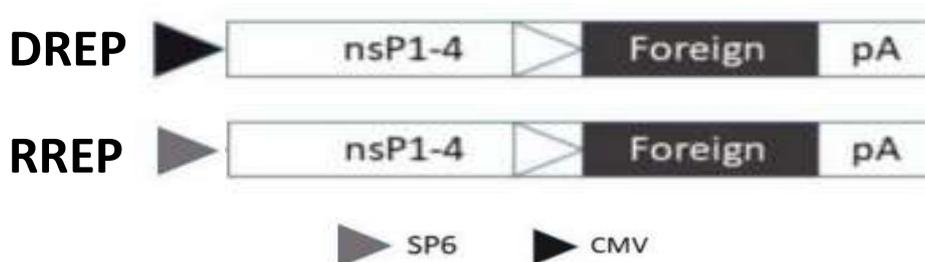


Figura 14. Representación esquemática de la composición DREP/RREP. (Figura adaptada de Kenneth Lundstrom, *Molecules*, 2018)¹⁸³. SP6, bacteriophage; RNA polymerase; CMV, citomegalovirus; nsP1-4, proteínas virales no estructurales; pA, cola de poliadenalización.

Cuando RREP y DREP son internalizados, la célula diana los procesa como si se tratase de una infección natural: así, en primer lugar, son reconocidos por múltiples TLRs y receptores citosólicos que en su conjunto iniciarán una cascada de transducción de señales y producirá una respuesta potente de IFN de tipo I¹⁸³. En función de su composición, RREP y DREP son procesados por vías diferentes dentro de la célula (Figura 15).

1. **RREP** es internalizado por vía endocítica, y una vez entregado en el citoplasma es detectado por PRRs endosomales como los TLR3, 7, 8 y receptores citosólicos como MDA5. A continuación, las proteínas virales no estructurales (nsP) conformarán una replicasa que amplificará tanto el replicón de ARN como también el gen de interés.

2. En el caso de **DREP**, éste será detectado por el TLR9 y receptores citosólicos de ADN. Acto seguido, será transportado al interior del núcleo de la célula donde será transcrito en un replicón de ARN idéntico a RREP. Este RREP formado en el núcleo de la célula será transportado al citoplasma y allí será detectado y procesado por la célula como el RREP descrito anteriormente.

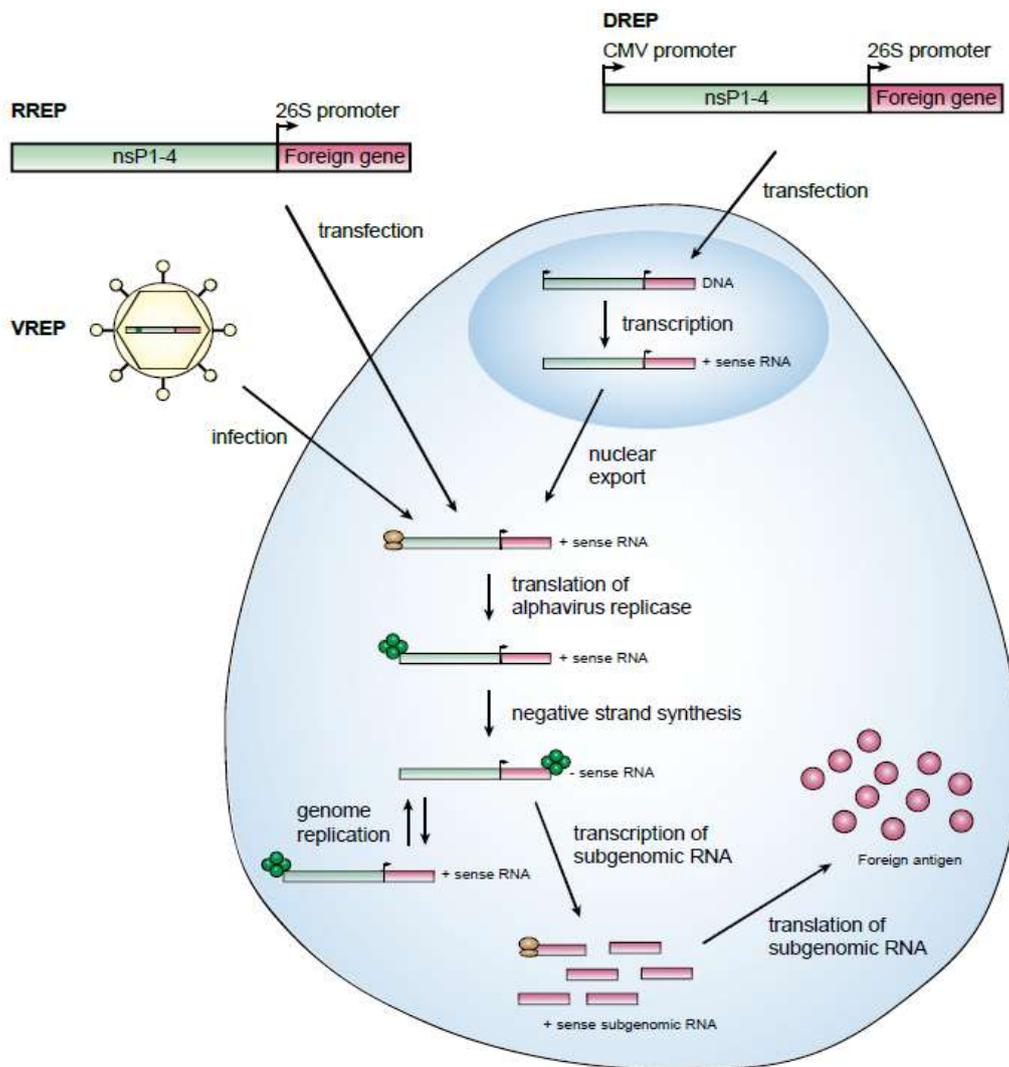


Figura 15. La Replicación de RREP y DREP en la célula (Figura original de M.Knudsen, Plos one, 2015)¹⁸⁵.

En el campo de la vacunación el uso de RREP y DREP conlleva algunas ventajas como, por ejemplo:

1. Inducen respuestas potentes de IFN de tipo I¹⁸³.
2. Debido a su tamaño y al tipo de respuestas de IFN de tipo I, inducen a apoptosis que se asocian a la crosspresentación de antígenos de clase I¹⁸³.
3. La administración de RREP y DREP no genera una inmunidad frente al vector y, por lo tanto, la respuesta inmune generada es específica del inmunógeno de interés codificado por estos replicones¹⁸³.

En general el uso de RREP y DREP se asocia a un perfil alto de seguridad con un mínimo riesgo de causar enfermedades¹⁸⁶. Por otro lado promueve la inducción de ambas respuestas, celulares y humorales, convirtiéndoles en candidatos ideales para su utilización en vacunas¹⁸⁷.

5.2. EL USO DE LOS REPLICONES DE ALFAVIRUS (RREP Y DREP) EN EL DESARROLLO DE VACUNAS FRENTE A PATOLOGIAS.

Gracias a las ventajas descritas en el punto anterior, actualmente se están desarrollando estudios preclínicos con replicones en áreas como la inmunoterapia en cáncer ¹⁸⁸ o en el desarrollo de vacunas frente agentes infecciosos¹⁸⁹.

En el campo de la vacunación estos alfavirus han demostrado su éxito, como por ejemplo en ensayos clínicos en fase I de vacunas frente al CMV, donde la administración de estos replicones que codifican fragmentos del virus lograron inducir la producción de anticuerpos neutralizantes frente al CMV¹⁸³.

Adicionalmente, RREP se ha utilizado como candidato vacunal en vacunas frente al virus de la gripe. Tras la inmunización de ratones con un RREP que expresaba

antígenos de diferentes virus como el influenza, flavovirus y el virus respiratorio sincitial, se demostró que aumentaron los niveles de IgG frente a estos virus y, por lo tanto, que el uso de RREP era capaz de aumentar los niveles de protección frente a estos 3 modelos de virus¹⁹⁰.

Por otra parte, DREP ha sido evaluado como candidato frente a una vacuna contra el CHIKV. En este caso, la inmunización en un modelo murino con DREP que expresa CHIKV, generó una respuesta T específica frente al virus acompañado de una producción de anticuerpos frente al mismo ¹⁹¹.

A raíz de los buenos resultados obtenidos en otros campos, en el contexto del VIH se han utilizado RREP y DREP como candidatos vacunales (Tabla 4).

Indication	Target/Antigen	Vector	Response
HIV	Env	SFV VLPs	Humoral response
	Env	SFV RNA	Antibody response
	Env/Gag/Pol	SFVVLPs/RNA	Ag-specific immune response
	Env/GagPolNef	SFV DNA	T cell and IgG responses

Tabla 4. Tabla con ensayos de inmunización preclínicos con replicones frente al VIH. (Tabla adaptada de Kenneth Lundstrom et al, *Molecules*, 2018)¹⁸³. HIV, human immunodeficiency virus; SFV, Semliki Forest virus; VLPs, virus-like particles.

5.2.1. RREP como candidato vacunal frente al VIH

Como se ha descrito anteriormente, las vacunas basadas en ARN presentan limitaciones debido a su facilidad para ser degradadas¹²⁷. Sin embargo, RREP parece ser un candidato bastante resistente a la degradación; ello junto a la mejora en los métodos de administración como la electroporación, justifica que su uso se haya asociado a un incremento de las respuestas inmunitarias¹⁶⁸. A modo de ejemplo, en estudios donde se administró intramuscularmente un ARN autoreplicativo que codificaba para la glicoproteína Env del VIH, se generaron anticuerpos específicos frente a la envuelta en 4 de los 5 ratones inmunizados. Estos resultados sugieren que

el uso de estos replicones son un buen método para producir anticuerpos monoclonales¹⁹². Otro estudio en ratones inmunizados con replicones de ARN que codificaban genes del VIH como env/gag/pol, la respuesta T específica frente a las proteínas codificadas por estos genes aumentaron significativamente, y además se produjo una producción superior de anticuerpos frente a la gp120 en la condición de inmunización con replicón vs la condición de inmunización con ARN solo¹⁹³. Por último, en la comparación entre diferentes candidatos vacunales que codifican para la glicoproteína Env del VIH en *Rhesus macacos*, se demostró que la vacunación a dosis bajas con RREP coformulado con una nanoemulsión catiónica, produjo la mayor tasa de anticuerpos neutralizantes frente a la envuelta del VIH-1¹⁹⁴.

5.2.2. DREP como candidato vacunal frente al VIH

En general, las vacunas de ADN en humanos requieren altas dosis de administración para generar respuestas inmunes potentes¹⁹⁵. Sin embargo, el uso de DREP en vacunas de ADN ha demostrado que es capaz de incrementar la inmunogenicidad en ratones en el contexto del VIH¹⁹⁶. Esto se debe a que este vector, por sus propias características inmunoestimuladoras, sólo requiere dosis bajas de administración para producir respuestas celulares específicas de antígeno similares a las obtenidas con plásmidos de ADN convencionales. A modo de ejemplo, la inmunización de ratones con solo 0.2 µg de DREP que expresa Env y una proteína de fusión Gag-Pol-Nef, junto a un refuerzo de inmunizaciones con MVA y/o la proteína gp140 del VIH formulada con un adyuvante, fue capaz de hacer el *priming* de la respuesta T e inducir una mayor producción de IgG que los demás candidatos evaluados¹⁸⁵. Otro ejemplo similar lo encontramos en la inmunización de ratones y *Rhesus macacos*, comparando un DREP y un plásmido de ADN, donde ambos codifican regiones conservadas del VIH, y donde se estimula la respuesta T específica frente al virus. En concreto, la respuesta generada con 5 ng de DREP fue similar a la producida con 1 µg del plásmido convencional¹⁹⁷.

CAPÍTULO 6. LAS NANOPARTÍCULAS COMO CANDIDATOS VACUNALES

6.1. EL USO DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA BIOMEDICINA

La definición clásica de nanotecnología hace referencia a todo tipo de dispositivos moleculares de tamaño inferior a una micra. Estos dispositivos se denominan nanopartículas (NPs), cuyo tamaño oscila entre 5 y 500 nm, y están compuestas por dos partes, el núcleo, que es la matriz central y la corona que es la superficie de la NPs. Durante la última década, tanto la nanotecnología como la nanociencia han permitido desarrollar varias herramientas y materiales como las nanocápsulas, nanopartículas, nanoporos, las micelas poliméricas, los nanocristales y nanotubos¹⁹⁸, con propiedades beneficiosas y con múltiples aplicaciones en biomedicina. Actualmente, gracias al uso de la nanotecnología se ha podido avanzar en múltiples áreas médicas, principalmente porque ofrece ventajas únicas en comparación con los tratamientos convencionales¹⁹⁹ (Tabla 5).

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Desarrollo de nuevas terapias	Una mala formulación genera un bajo rendimiento de la molécula bioactiva
Protección de las moléculas bioactivas frente a la degradación enzimática	
Mejorar la eficiencia en el suministro de moléculas bioactivas	
Administración más específica	Requieren una tecnología altamente sofisticada
Nanovectores que pueden contener ligandos específicos frente a células diana	
Prolongar y mejorar la biodistribución de las moléculas bioactivas	
Disminuir la toxicidad y mantener los efectos terapéuticos	Las dimensiones pequeñas pueden dar lugar a agregados
Perfiles de seguridad y biocompatibilidad	

Tabla 5. Ventajas y desventajas de las NPs. (Tabla adaptada de S. Moghimi et al, The FASEB Journal, 2005)²⁰⁰

6.2. PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS.

Las NPs, por su entidad sintética, influyen en las respuestas celulares gracias a sus propiedades fisicoquímicas, tales como: tamaño, morfología, materiales de las NPs y revestimiento de sus superficies²⁰¹ (Figura 15).

1. El **tamaño de la partícula** está relacionado con la respuesta toxicológica, la vía de endocitosis, el grado de internalización y el destino final intracelular²⁰². Estudios previos han llegado a la conclusión de que las partículas más pequeñas inducen un mayor grado de muerte celular debido a la generación de radicales libres, la pérdida de la integridad mitocondrial y el aumento de la secreción de citocinas proinflamatorias²⁰³.

2. **La morfología de las NPs** afecta en mayor o en menor medida a las células. En general, las partículas esféricas se internalizan en mejor requiriendo menos energía que las partículas en forma de estrella²⁰⁴.

3. **La carga de la superficie de las NPs** juega un papel importante en las interacciones celulares. Por ejemplo, las NPs con cargas positivas en superficie (catiónicas), favorecen una internalización más eficiente y aumentan la disrupción de la membrana celular, respecto a las partículas con carga negativa o neutra²⁰⁵. Además, la composición de la corona es la que determinará las interacciones con la membrana celular, el mecanismo de endocitosis y en definitiva la toxicidad²⁰⁶.

4. Según **la composición de los nanomateriales**, las NPs pueden ser más biocompatibles (ej. Ácido poliláctico) o ser más citotóxicas (ej. Plata). Los estudios demuestran que el mecanismo de toxicidad depende de la composición del núcleo de la partícula; aunque el núcleo no contacte con la superficie de la corona, sí que determina la densidad, la orientación y la carga de los ligandos asociados a la corona. En función de esta interacción entre núcleo y superficie, algunos materiales generan

un ratio de iones dañina para la célula diana induciendo un aumento del estrés oxidativo y en consecuencia toxicidad²⁰⁷.

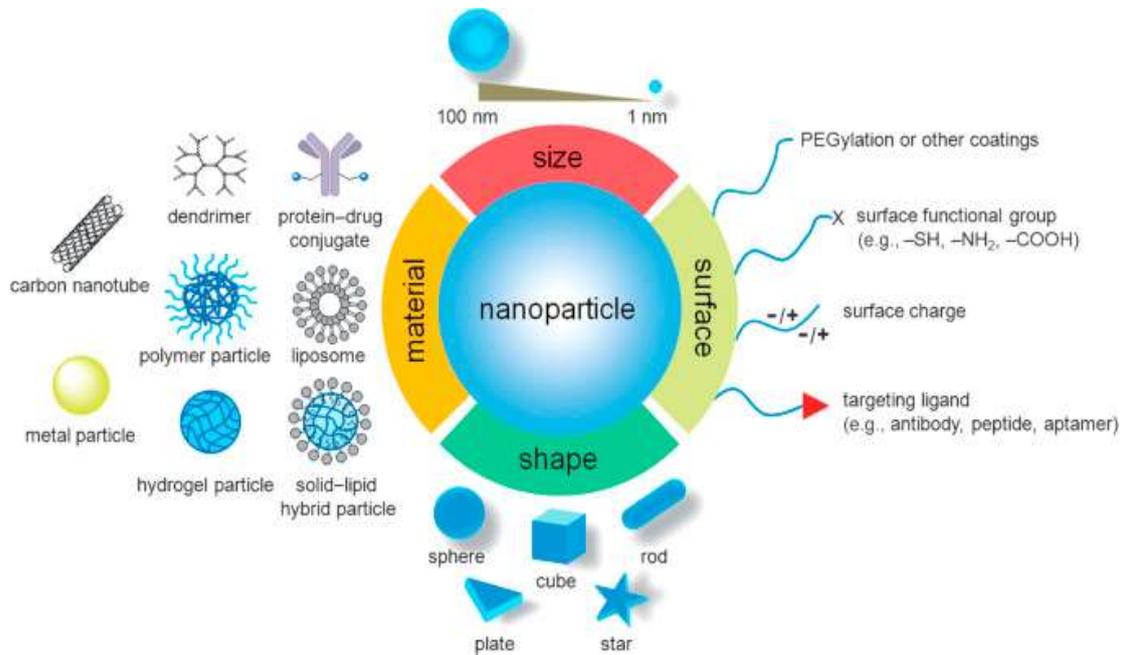


Figura 15. Propiedades físico-químicas de las NPs (Figura original de Hendrik Heinz, Surface Science Reports, 2017)²⁰⁸.

6.3. TIPOS DE NANOPARTÍCULAS UTILIZADAS EN BIOMEDICINA

Numerosos estudios previos se han centrado en incorporar ARNm en nanotransportadores biocompatibles. Por lo tanto, dependiendo del área médica de que se trate, se han elaborado diferentes tipos de nanotransportadores clasificados en función de su origen: inorgánicos, poliméricos y liposomas²⁰⁹ (Figura 16).

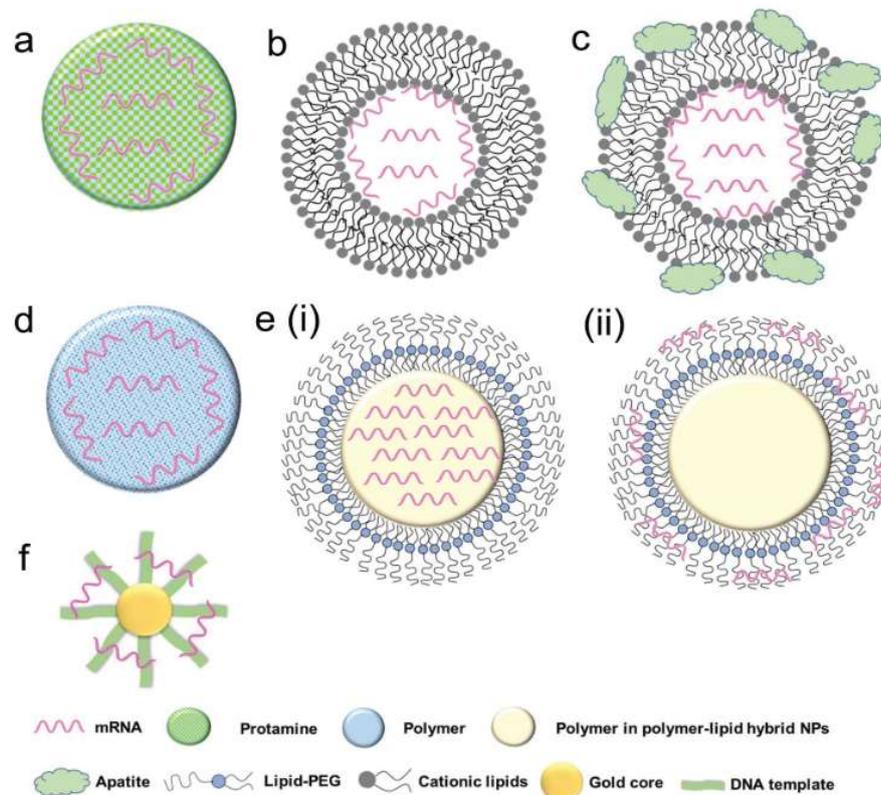


Figura 16. Representación esquemática de diferentes nanobiomateriales para la administración de ARNm (Figura original de M.Islam, Biomaterials Science, 2015²⁰⁹): a) complejo de protamina; b) nanopartículas de lípidos; c) nanopartículas de lípidos con compuestos inorgánicos ; d) nanopartículas polimérica catiónica; e) nanopartícula híbrida de polímeros y corona de lípidos, incluyendo el ARNm i) en el interior y ii) en la superficie; y f) nanopartícula de oro²⁰⁹.

6.3.1. Nanopartículas inorgánicas como las Au-NPs

Las Au-NPs se sintetizan en soluciones coloidales formadas por medios acuosos y orgánicos que permiten la formación de clústeres de oro²¹⁰. Entre sus principales ventajas las Au-NPs, por su naturaleza catiónica, inducen interacciones electrostáticas con entidades cargadas negativamente tales como: ADN, ARN y proteínas. Esto les permite incorporar grandes cantidades de estas biomoléculas de manera eficiente²¹⁰. Sin embargo, presentan limitaciones durante su síntesis, pues las Au-NPs tienden a

agregarse entre ellas, y ello hace que disminuya su capacidad de poder ser coformuladas con ARNm. Por lo tanto, precisan de recubrimientos para evitar la degradación del ARNm y favorecer su interacción con la célula diana²¹¹.

Las Au-NPs se han utilizado en vacunas frente a múltiples patógenos para mejorar la respuesta inmune. Por ejemplo, en ratones inmunizados con Au-NPs híbridas recubiertas con el polisacárido de la bacteria *S.pneumoniae*, se promovió la fagocitosis frente a este patógeno junto con una potente inducción de anticuerpos anti-sacromices²¹².

En un estudio realizado en nuestro centro en el contexto del VIH con el fin de determinar la capacidad de las CDs para procesar péptidos del VIH-1 vehiculizados en Au-NP, se observó un aumento de la proliferación de linfocitos T en ambos linajes CD4+ y CD8+, un aumento de la producción de citocinas y quimiocinas pro-Th1 junto a una moderada producción de citocinas pro-Th2. Por lo tanto, el uso de este tipo de coformulación de Au-NP es un sistema óptimo de entrega para la inducción de las respuestas inmunes frente al VIH, lo cual es importante para futuras vacunas anti-VIH²¹³.

6.3.2. Nanopartículas poliméricas como las NCs,PLA,LP-PLA y LS

6.3.2.1. Nanocápsulas (NCs) ricas en Arginina

Las NCs son sistemas vesiculares constituidos por un núcleo oleoso y una superficie polimérica²¹⁴. Su principal función es el encapsulamiento de diferentes tipos de moléculas o fármacos como puede ser el caso del ARN²¹⁵.

Estos nanosistemas ofrecen ventajas en cuanto a sus modificaciones en superficie: las cargas permiten la unión con el ARN mensajero proporcionando estabilidad al complejo formado²¹⁶. Por el contrario, su superficie polimérica puede dar lugar a toxicidad celular debido a su naturaleza sintética²¹⁶.

Para solventar esto, estas NCs están recubiertas de poliarginina (PARG), que es un péptido catiónico que contiene guanidina que le permite atravesar la membrana celular facilitando la internalización de las NCs en el interior de la célula²¹⁷.

Gracias a estas propiedades las NCs ricas en arginina han sido utilizadas en diferentes campos como en el cáncer. Se administró NCs ricas en arginina conjugadas con siRNA, y se observó un silenciamiento del factor de crecimiento endotelial relacionado con la vascularización de tumores sólidos. Ello demostró que las NCs fueron eficientemente internalizadas, y que la entrega de este siRNA fue satisfactorio para la disminución de la masa tumoral²¹⁸.

6.3.2.2. Nanopartículas de ácido poliláctico (PLA) coformulados con LAH4 o RALA

Las PLAs son un polímero compuesto por monómeros de ácido láctico. Como ventajas principales destacan: i) son biocompatibles y biodegradables por hidrólisis enzimática²¹⁹; ii) poca toxicidad asociada que permite una óptima distribución y eliminación¹¹⁶; iii) baja inmunogenicidad, es decir, son bastante inocuas²³, y iv) han sido aprobadas por la FDA para su uso en vacunas, lo cual las convierte en un buen candidato vacunal.²¹⁹ Sin embargo, y a pesar de sus ventajas, presentan algunas limitaciones asociadas al escape endosomal²²⁰.

Por este motivo, estas PLAs pueden estar coformuladas con LAH4 o RALA, que son unos péptidos catiónicos que influyen en la presión osmótica del endosoma impidiendo la degradación de biomoléculas sensibles como el ARN y desestabilizando la membrana del endosoma para que el ARNm pueda ser entregado en el citoplasma²²⁰.

Estas NPs se están utilizando en vacunas terapéuticas frente al VIH-1. A modo de ejemplo, en estudios con ratones, las CDs de ratón una vez pulsadas con PLAs coformuladas con p24, indujeron repuestas humorales potentes y estimularon la

proliferación de linfocitos T²²¹. Además, en nuestro grupo hemos realizado un ensayo *ex vivo* con CDs autólogas de pacientes infectados por el VIH, que pulsadas con PLAs cargadas con la proteína del VIH Gag p24 mostraron un incremento de la maduración de las CDs, acompañado de un aumento de la respuesta de linfocitos T CD8+.

Estos datos indican que las PLAs son capaces de entregar la p24 en las CDs y dichas células son capaces de expresarla, en consecuencia se induce una respuesta T específica frente al VIH. Todo ello las convierte en un candidato prometedor a tener en cuenta en el desarrollo de vacunas terapéuticas frente al VIH²².

6.3.2.3. Lipopartículas de ácido poliláctico (LP-PLA) coformulados con LAH4-L1

Las LP-PLAs están constituidas por un *core* de PLA idéntico al descrito anteriormente, junto a una corona lipídica compuesta por lípidos ionizables, colesterol, fosfolípidos y lípidos de polietilenglicol (PEG)¹³².

Entre sus principales funciones encontramos que: i) protegen el ARNm, ii) facilitan la captación celular, iii) mejoran el escape endosomal y iv) permiten la entrega del ARNm en el citoplasma¹³². Sin embargo, el uso de este tipo de nanovector presenta algunas limitaciones, como por ejemplo: i) la toxicidad asociada a las formulaciones lipídicas, ii) la dificultad en penetrar en los órganos linfoides secundarios y iii) la necesidad de ajustar cada vector de entrega en función de la ruta de administración empleada²²².

Para superar estos obstáculos se están mejorando estas LP-PLA con el uso de diferentes lípidos ionizables con carga neutra que favorecen la inducción de respuestas celulares y humorales²²³.

Por estos motivos, las NPs con corona lipídica son la plataforma más utilizada en vacunas dado que presentan los mejores resultados en la entrega de ARNm¹¹³. Un ejemplo lo encontramos en la vacuna frente al Zika¹⁴³, donde se demostró que con

sólo una inmunización, (a concentraciones bajas de complejos de nanopartículas lipídicas coformuladas con un ARN que codificaba para las glicoproteínas de la envuelta del Zika), se inducía una potente respuesta de anticuerpos neutralizantes tanto en ratones como en primates no humanos. De hecho, la inmunización de ratones con 30 µg del complejo fue capaz de conferir protección durante 5 meses tras la vacunación. Estos datos demostraron que el complejo con corona lipídica es capaz de conferir inmunidad, y ello lo convierte en un nuevo y prometedor candidato vacunal frente al Zika, suscitando además interés para ser utilizado en el campo del VIH¹⁴³.

6.3.3 Liposomas (LS) coformulados con LAH4-L1

Los liposomas son nanovesículas esféricas formadas por bicapas lipídicas con un *core* líquido. Esta conformación permite coformular componentes hidrofóbicos o hidrofílicos en función del líquido interno o de los lípidos que forman la membrana²²⁴. Estos nanovectores son muy útiles en la entrega de ácidos nucleicos porque los liposomas se fusionan con la membrana de las células diana. Además, condensan espontáneamente el ARNm en la superficie de los liposomas gracias a las interacciones electrostáticas con los ácidos nucleicos cargados negativamente¹¹⁶. Sin embargo, presentan algunas limitaciones en la entrega de algunos componentes coformulados, tales como medicamentos²²⁵.

Estos nanosistemas han sido aprobados para su uso médico frente el cáncer. Ejemplo de ello lo encontramos en el ensayo clínico en fase I sobre el uso de complejos de liposomas que contiene doxorubicina que confiere mayor actividad antitumoral respecto al tratamiento convencional²²⁶.

En el campo del VIH la inmunización de ratones con complejos de liposomas coformulados con ARNm que codificaba para Gag, indujo: respuestas humorales, secreción de IFN de tipo I asociado con la migración de los monocitos a los linfonodos y respuestas T específicas frente a Gag²²⁷.

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las terapias basadas en combinaciones con antirretrovirales han demostrado su eficacia clínica en la lucha frente a la infección por el VIH. Sin embargo, estas estrategias no son capaces de prevenir o de erradicar el virus en los pacientes infectados.

Los resultados obtenidos hasta el momento con vacunas basadas en CDs han sido las más prometedoras para cumplir dichas expectativas. Concretamente, el uso de ARNm en vacunaciones con CDs parece ser muy seguro y prometedor. De hecho, la captación del ARN desnudo por parte de las CDs induce la generación de respuestas inmunes eficaces.

La estrategia de vacunación con CDs basadas en ARNm presenta algunas limitaciones como: i) la necesidad de una producción individualizada de CDs, ii) la vectorización de los ARNm para permitir su liberación y protección en el citoplasma de las CDs y iii) dificultades inherentes a la vía de administración.

Las vacunas basadas en replicones han demostrado ser más efectivas que las convencionales por varias razones: i) incrementan la potencia de las respuestas inmunitarias, ii) amplían la duración de la expresión de antígeno, iii) activan la respuesta innata y iv) tienen un efecto adyuvante debido a su origen viral.

Así mismo, los ARNm convencionales coformulados con NPs (de oro, nanocápsulas ricas en arginina, de ácido poliláctico o liposomas) han demostrado ser más efectivos en la entrega y en el procrepiconiento de estos ARNm en de la CDs con respecto a los ARNm desnudos. Ejemplo de ello es que pueden vehiculizar ARNm, son internalizadas eficientemente por las CDs y protegen el ARNm de las ARNasas durante el transporte a la CDs.

El motivo de esta tesis es explorar la utilidad de los replicones y los ARNm convencionales coformulados con nanopartículas como posibles candidatos vacunales en un contexto de vacunas frente al VIH.

3. HIPÓTESIS

La hipótesis de esta tesis consiste en probar nuevas aproximaciones de vacunas en CDs basadas en: i) replicones o ii) ARNm convencionales, vehiculizados por NPs, frente al VIH-1 utilizando diferentes inmunógenos que sean capaces de potenciar la respuesta inmunitaria frente al mismo.

- Comparando y seleccionando las mejores formulaciones de replicones que codifican gp140 de la envuelta del virus en un contexto vacuna preventiva frente al VIH-1.
- Evaluando diferentes nanopartículas coformuladas con ARNm convencional que codifica para Gag en un contexto de vacuna terapéutica frente al VIH-1.

Todo ello con el fin de poder obtener una acción más selectiva sobre las CDs, una mejor internalización del inmunógeno y la potenciación de la respuesta inmune específica que se genere.

Si se demuestra que alguna de las estrategias probadas resultase eficaz en modelos *in vitro*, habríamos conseguido un potencial candidato a futura vacuna frente al VIH con múltiples ventajas. Entre ellas destacan: su fácil producción a gran escala, su estabilidad en condiciones estándar de almacenaje, o la posibilidad de ser administradas por vías rutinarias en la clínica.

4. OBJETIVOS

Objetivo principal:

El objetivo general de esta tesis es analizar la internalización de los candidatos vacunales en las CDs, caracterizar su efectividad en la activación de dichas células y su capacidad para inducir una respuesta inmunológica específica frente al VIH.

En este contexto, y de acuerdo con la hipótesis, los objetivos secundarios fueron:

- **Objetivo secundario 1:** Analizar la captación, los efectos fenotípicos y funcionales de los replicones y de los diferentes nanotransportadores (de oro, nanocápsulas ricas en arginina, de ácido poliláctico o liposomas) para preseleccionar los mejores candidatos en CDs *in vitro* en muestras de pacientes VIH-1.
- **Objetivo secundario 2:** Evaluar la efectividad de dichos candidatos preseleccionados de ARNm que codifican para inmunógenos de VIH-1 (gp140/Gag) en CDs *in vitro* en muestras de pacientes VIH-1.
- **Objetivo secundario 3:** Analizar la capacidad de los candidatos seleccionados para activar las CDs *in vitro* en muestras de pacientes VIH-1 con el fin de inducir respuestas inmunitarias específicas frente al VIH-1.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos marcados en esta tesis se realizó la siguiente metodología (Figura 17):

- **Para el Objetivo 1:**

5.1. Obtención de las PBMCs de pacientes infectados con VIH-1.

5.2. Adherencia de PBMCs para obtener los monocitos y derivación de los monocitos a células dendríticas inmaduras (CDsi).

5.3. Transfección de las CDsi mediante electroporación y lipofección de los ARNm autoreplicativos o pulsado de los complejos de ARNm con nanopartículas en que ambos codifican para un trazador (eGFP).

5.4. Evaluación de la eficiencia de transfección mediante fenotipado de la viabilidad y maduración de las CDsmo junto con la expresión de eGFP. En algunos candidatos seleccionados se ha determinado el tráfico endosomal. Todos los fenotipados se han evaluado por citometría de flujo.

5.5. Preparaciones para microscopía de fluorescencia para constatar la expresión de eGFP.

- **Para el Objetivo 2:**

Una vez obtenidos los resultados del objetivo 1 se seleccionarán los candidatos vacunales que mejor se internalizan (vía endosomal) y activan a la CDs midiendo los parámetros de viabilidad, maduración y expresión de eGFP y que vayan a codificar para inmunógenos frente al VIH-1 como gp140 o Gag, respectivamente. Se realizan las

mismas metodologías descritas en el objetivo 1 añadiendo los cocultivos de CDsmo con linfocitos autólogos obtenidos de pacientes infectados con VIH-1 para evaluar:

5.6. Proliferación de los linfocitos T mediante tinción de CFSE.

5.7. Medición de la secreción de citocinas por Luminex.

Una vez obtenidos los resultados se seleccionan los mejores candidatos vacunales que induzcan respuestas inmunitarias para evaluar si dicha respuesta es específica frente al VIH-1

- **Para el Objetivo 3:**

Una vez obtenidos los resultados del objetivo 2 se seleccionan los mejores candidatos vacunales que induzcan respuestas inmunitarias para evaluar si dicha respuesta es específica frente al VIH-1.

Para este objetivo se utilizan los candidatos seleccionados en el objetivo 2 siguiendo las metodologías **5.1.**, **5.2.** y **5.3.** y añadiendo cocultivos de CDsmo con linfocitos autólogos obtenidos de pacientes infectados con VIH-1 para evaluar:

5.8. La respuesta específica del inmunógeno mediante la formación de *spots forming cells* por ELISPOT.

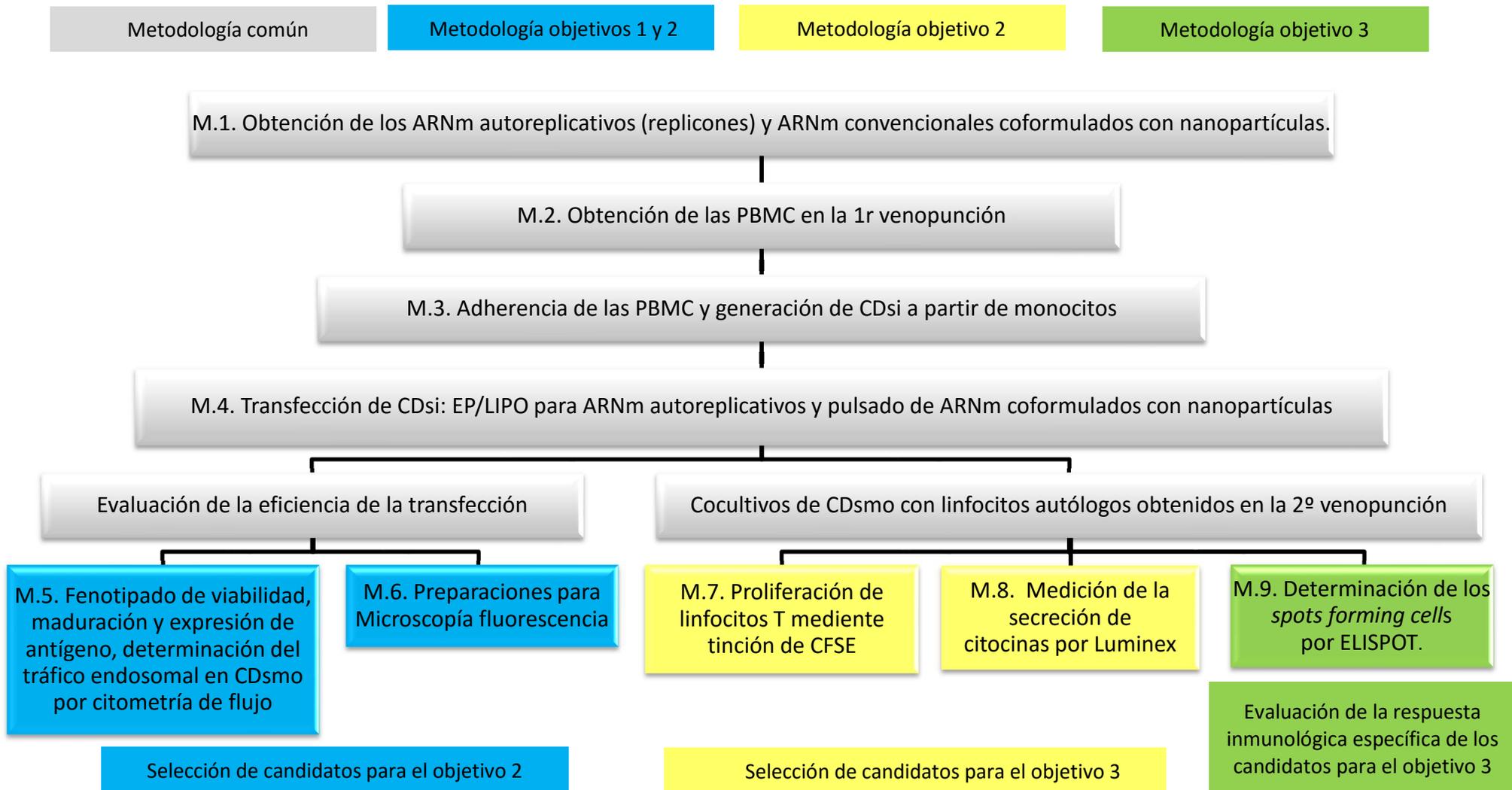


Figura 17. Esquema resumen de la metodología empleada mostrando la obtención de las dendríticas inmaduras (CDsi), la modificación de las CDs (CDsmo) mediante transfección por electroporación (EP), lipofección (LIPO) y pulsado junto con los ensayos posteriores de evaluación de eficiencia de transfección y los cocultivos de CDsmo con linfocitos autólogos para determinar la funcionalidad celular.

5.1. OBTENCIÓN DE LOS REPLICON Y LOS ARNm CONVENCIONALES COFORMULADOS CON NANOPARTÍCULAS.

5.1.1. Replicones y plásmidos

5.1.1.1. REPLICONES

Para el **Objetivo 1** se han utilizado los siguientes replicones que codifican para un trazador (eGFP) para determinar la concentración, la cinética de expresión y el tráfico endosomal de estos candidatos (Figura 18).

RREP-eGFP: Replicón constituido por: SP6, promotor SP6; nsP, proteínas no estructurales (replicasa); 26S, promotor subgenómico 26S; (A)n, señal de poliadenilación y el gen eGFP como gen de interés.

DREP-eGFP: Replicón constituido por: CMV, promotor del citomegalovirus; nsP, proteínas no estructurales (replicasa); 26S, promotor subgenómico 26S; (A)n, señal de poliadenilación y el gen eGFP como gen de interés.

Para el **Objetivo 2** se han seleccionado los siguiente replicones (Figura 18) para caracterizar los cambios fenotípicos en las CDs y la respuesta inmune suscitada mediante la proliferación y el patrón de citocinas generado.

RREP-gp140: El mismo replicón descrito anteriormente pero que codifica para la secuencia de ZM96gp140, Clade C que expresa el trímero de gp140 derivado del virus VIH-1.

DREP-gp140: El mismo replicón descrito anteriormente pero que codifica para la secuencia de ZM96gp140, Clade C que expresa el trímero de gp140 derivado del virus VIH-1.

Para el **Objetivo 3** se evaluó *DREP gp140* para determinar la inducción de respuestas inmunitarias específicas frente al VIH.

Los replicones RREP y DREP han sido cedidos por el profesor Peter Lijeström (Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia) dentro del programa de colaboración del proyecto europeo EHVA nº 681032.

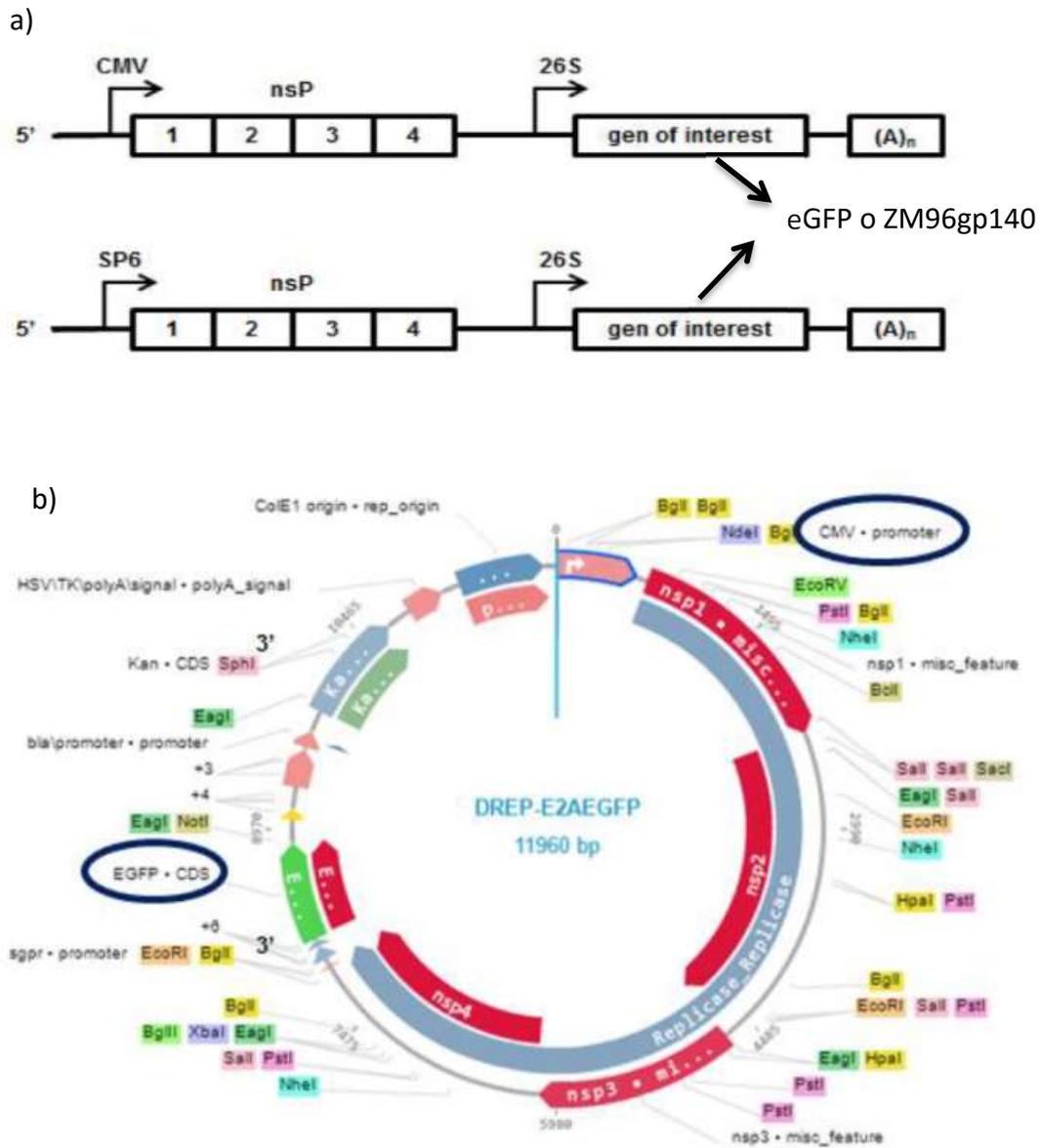


Figura 18. a) Ilustración esquemática del *cassette* de expresión de DREP (arriba) y RREP (abajo). b) Representación esquemática del plásmido de ADN E2A que expresa DREP-eGFP (mediante *Genome Compiler*).

5.1.1.2. Plásmido

Para el **Objetivo 2** se ha utilizado el siguiente plásmido (ARNm no autoreplicativo) para ser comparado con los replicones (RREP/DREP gp140).

pETherNA gp140 (pDNA-gp140): El plásmido (Figura 19) incluye un promotor T7, una región 5' a 3' donde se codifica que codifica para la secuencia de ZM96gp140, Clade C. La producción de los plásmidos (pDNA) (Figura 19) se ha realizado en la empresa ETherNA (Bruselas, BE).

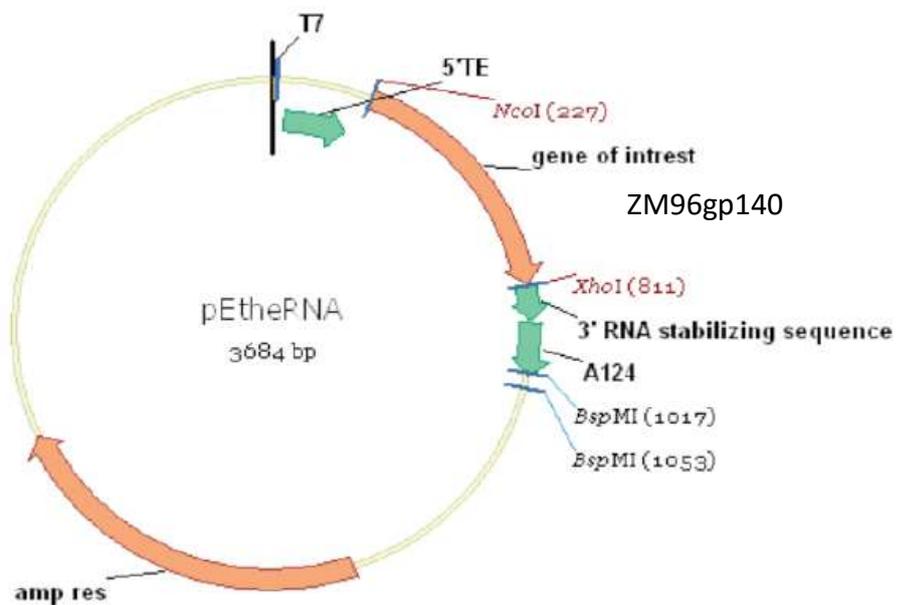


Figura 19. Representación esquemática del plásmido (pDNA gp140). (Figura original de Lorna Leal, AIDS, 2018¹³⁶.)

5.1.2. ARNm convencionales

Para el **Objetivo 1** se ha utilizado el siguiente ARNm convencional que codifica para el trazador eGFP con el fin de determinar la concentración y la cinética de expresión de los ARNm convencionales coformulados con nanopartículas.

Stem MACS eGFP mRNA (ARNm eGFP): ARNm comercial de Miltenyi Biotec que codifica para eGFP con modificaciones por la incorporación del nucleósido de *pseudouridine* y *5-Methyl-Cytidine* en CAP-1.

Para el **Objetivo 2** se han seleccionado los siguientes ARNm convencionales coformulados con nanopartículas para caracterizar los cambios fenotípicos en las CD8 y la respuesta inmune suscitada mediante la proliferación y el patrón de citocinas generado.

Gag-HxB2: *Gag wild-type* (wt)-HxB2 amplificado y subclonado en el vector de pGEM4Z/hgag/A64 para que expresase un ARNm que codifica la proteína de HIV-1 Gag-HxB2.

Este ARNm HxB2gag-64A ha sido cedido por el profesor Bernard Verrier (Université Claude Bernard, Lyon, Francia) dentro del programa de colaboración del proyecto europeo HIVERA nº249697.

G: ARNm suministrado por TriLink Technologies, US que codifica para la proteína de HIV-1 Gag Consensus B.

GM: ARNm suministrado por TriLink Technologies, US que codifica para proteína de HIV-1 Gag Consensus B con modificaciones por la incorporación del nucleósido de *pseudouridine* y *5-Methyl-Cytidine* en CAP-1.

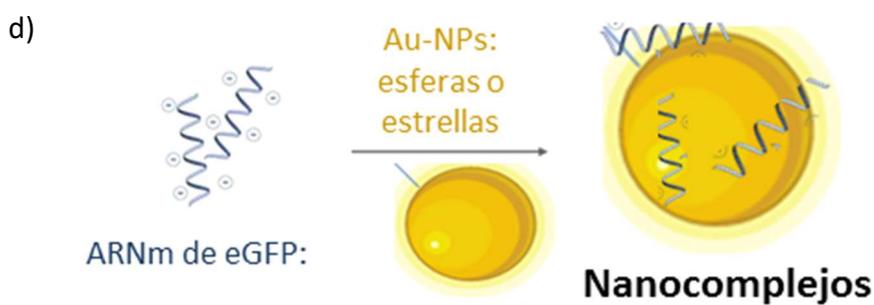
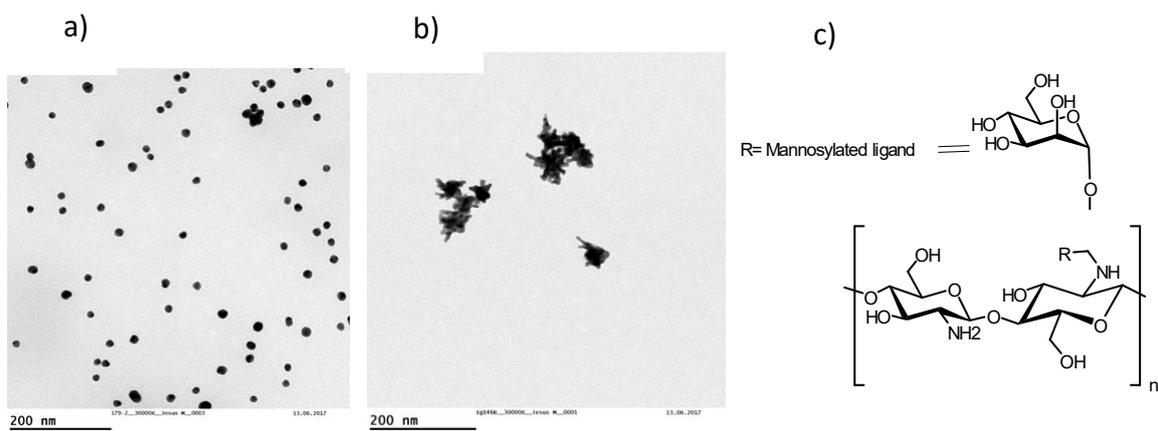
Para el **Objetivo 3** se compararon *Gag mRNA (G)* y *Gag mRNA (5MeC, PSU) (GM)* para determinar la inducción de respuestas inmunitarias específicas frente al VIH.

5.1.3. Complejos de nanopartículas con ARNm

Para el **Objetivo 1** se han utilizado complejos de nanopartículas coformulas con ARNm que codifica para eGFP descrito en el punto 5.1.2. para determinar su internalización y la entrega de ARNm en las CDs. Los complejos de nanopartículas utilizados son: oro, nanocápsulas, ácido poliláctico y Liposomas.

5.1.3.1. Complejos de Nanopartículas de oro (Au-NP) en forma esférica o estrellada con ARNm eGFP

Compuestas por un *core* de clústeres de oro, una superficie con ligandos que confieren cargas positivas a la Au-NPs para permitir la unión con el ARNm por interacciones electrostáticas. Además, están recubiertas de manosas que dotan a las nanopartículas con propiedades singulares de biocompatibilidad, solubilidad y evita *in-vivo* la adhesión inespecífica de las proteínas del plasma. La generación de Au NP en forma esférica o estrellada (Figura 20) se ha realizado por el equipo de la Dra. Isabel García en el CIC biomaGUNE (Donostia, España) donde han evaluado la preparación y caracterización de nanopartículas de oro biocompatibles para estudio en vacunas implicadas en la infección del VIH en el contexto del proyecto FIS P15/00480.



e)

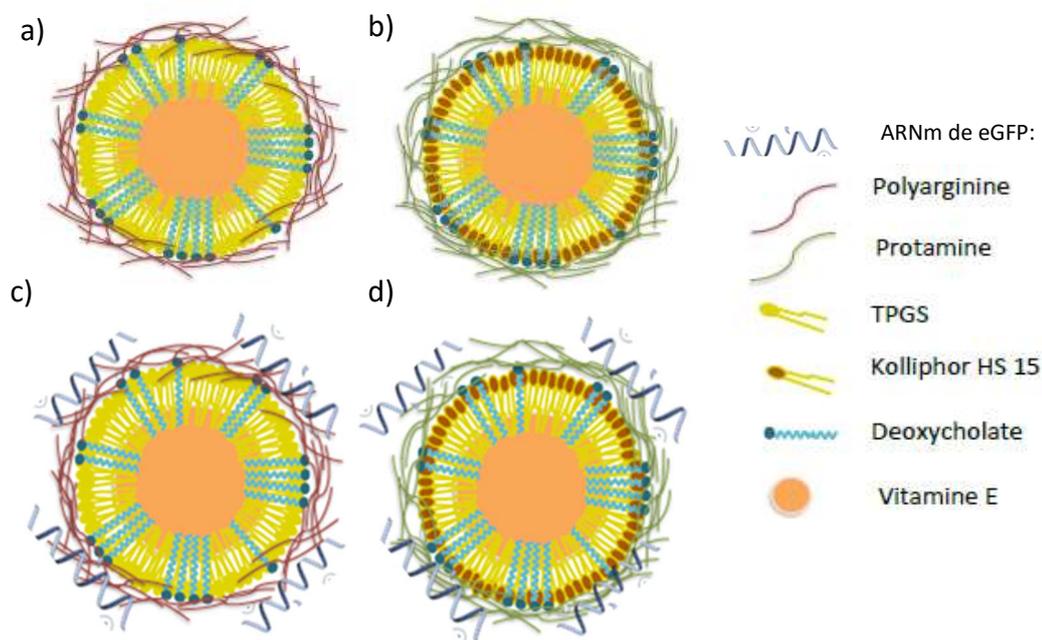
Nanocomplejos de Au-NP				
Componentes		Características		
ARNm	Au-NP	Tamaño	PdI	Potencial Zeta
eGFP	Esfera 	20	0,4	+53
eGFP	Estrella 	60	0,4	+52

Figura 20. Imágenes de Au-NP en forma a) esférica y b) estrella caracterizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). c) Representación de los ligandos de manosa que recubren las Au-NP. d) Representación esquemática de la estrategia de vectorización de ARNm en las Au-NPs. e) Tabla comparativa del tamaño, Índice de polidispersión (pdl) y potencial Z de las Au-NPs cofrmuladas con ARNm eGFP. (Figura adaptada de Anne-Line Coolen, Biomaterials, 2019²²⁰).

5.1.3.2. Complejos de nanocápsulas (NCs) ricas en arginina con ARNm eGFP

Las NCs están compuestas por: un *core* de vitamina E (D- α -Tocopherol) que le confiere propiedades inmunomoduladoras²²⁸; varios surfactantes para evitar la interacción del núcleo con los ARNm unidos en la superficie y para dotar de naturaleza catiónica a las NCs Además están recubiertas en su superficie con poliarginina (PARG) o protamina (PROT) lo que permite la interacción electrostática con las moléculas de ARNm.

Estas nanocapsulas con ARNm (Figura 21) han sido generadas en el Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS) por el equipo de la Dra. Maria Jose Alonso, donde han valorado la preparación y caracterización de nanoemulsiones cargadas con ARNm en un contexto de vacuna terapéutica dentro del programa de colaboración del proyecto europeo iHIVRNA nº 602570.



e)

Nanocomplejos de NCs				
Nanocomplejos		Características		
ARNm	Nanocápsulas	Tamaño	Pdl	Potencial Zeta
eGFP	Poliarginina 	171	0,13	+23
eGFP	Protamina 	175	0,17	-15

Figura 21. Representación de las NCs ricas en: a) Poliarginina (PARG) y b) Protamina (PROT). c) Representación NCs ricas en: c) Poliarginina (PARG) y d) Protamina (PROT) coformuladas con las ARNm eGFP. e) Tabla comparativa del tamaño, Índice de polidispersión (pdl) y potencial Z de las NCs coformuladas. (Figura adaptada de Anne-Line Coolen, Biomaterials, 2019²²⁰.)

5.1.3.3. Complejos de nanopartículas de ácido poliláctico y liposomas con ARNm asociados con péptidos catiónicos penetrantes (RALA, LAH4 y LAH4-L1)

5.1.3.3.1 Complejos de nanopartículas de ácido poliláctico (PLA) con ARNm eGFP asociados con péptidos catiónicos RALA, LAH4.

Están compuestas por un polímero de monómeros de ácido láctico que absorben los poliplexos de ARNm eGFP con cargas negativas con junto a los péptidos catiónicos (RALA, LAH4), formando nanocomplejos de Péptido/ARNm/PLA.

5.1.3.3.2 Complejos de nanopartículas de ácido poliláctico con corona lipídica (LP-PLA) con ARNm asociados con el péptido catiónico LAH4-L1.

Están constituidas por un *core* de PLA idéntico al descrito anteriormente con una corona lipídica formada por 4 elementos: i) un lípido catiónico que permite el autoenrepliconblaje entre el ARNm y la nanopartícula, ii) un lípido que aumenta la vida media de las formulaciones, iii) un colesterol que ayuda a la estabilización de la NP y iv) un fosfolípido que minimiza la interacción con la bicapa lipídica presente en la célula diana¹⁶⁶. Igual al anterior, esta LP-PLA absorben los poliplexos de ARNm con cargas negativas con junto al péptido catiónicos LAH4-L1, formando nanocomplejos de Péptido/ARNm/PLA.

5.1.3.3.3. Complejos de liposomas (LS) con ARNm asociados con el péptido catiónico LAH4-L1.

Estructura esférica formada por bicapas de fosfolípidos que permite la interacción electrostática con el poliplexo ARNm descrito en las LP-PLA.

Todas las NPs de PLA, LP-PLA y LS (Figura 22) y los péptidos catiónicos (RALA, LAH4, LAH4-L1) han sido cedidos por el profesor Bernard Verrier (Université Claude Bernard,

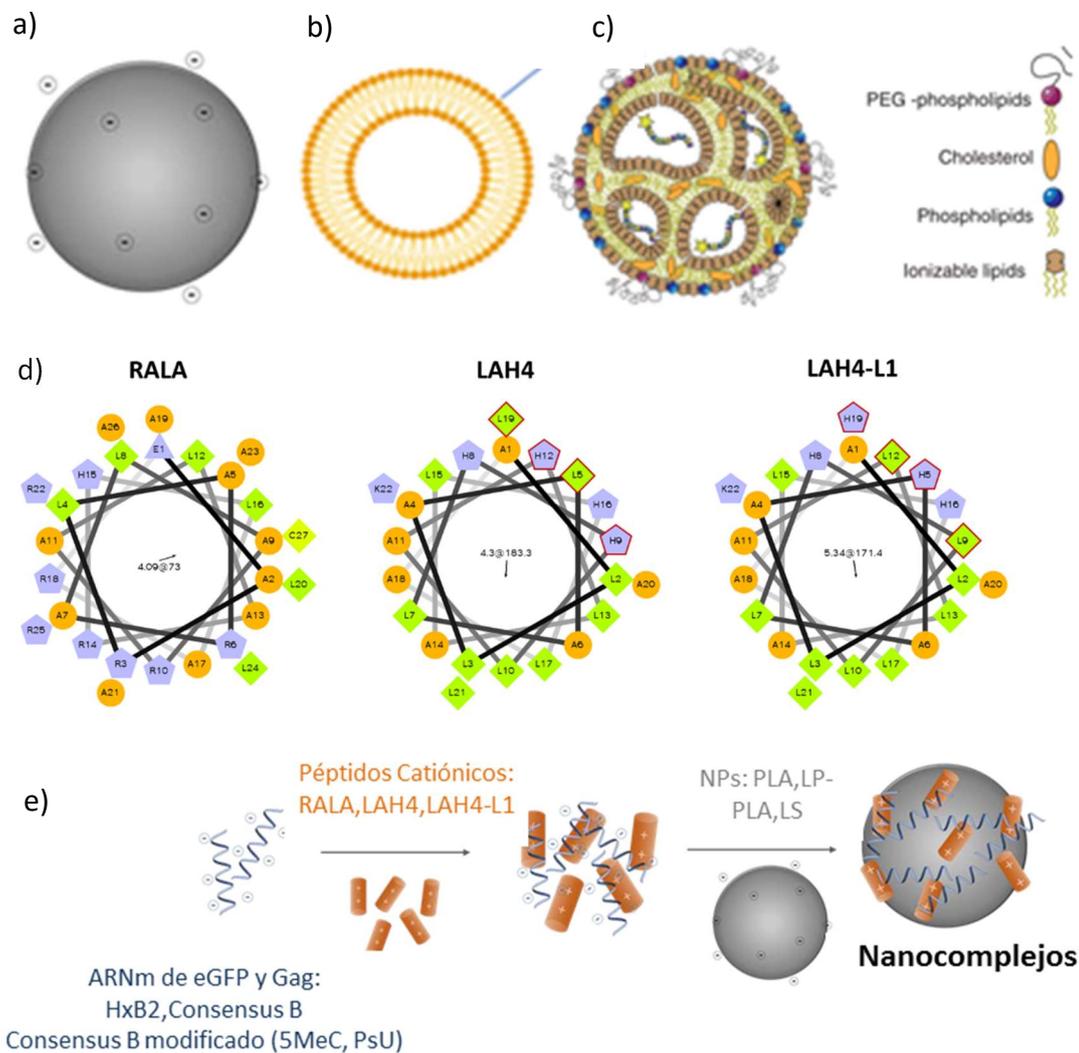
Lyon, Francia) dentro del programa de colaboración del proyecto europeo HIV-NANOVA.

Para el **Objetivo 2** se han utilizado complejos de nanopartículas coformuladas con diferentes ARNm convencionales que codifican para Gag, según lo descrito en el punto 5.1.2. para determinar su internalización y la entrega de ARNm en las CDs. Los complejos de nanopartículas utilizados son: ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico con corona lipídica (LP-PLA) y Liposomas (LS). Sus formulaciones se describen a continuación:

- Complejos de PLAs coformulados con ARNm de Gag HxB2.
- Complejos de LP-PLA y LS coformulados con Gag *Consensus B* (G) y Gag *Consensus B* con modificaciones (5MeC, PSU) (GM).

Para el **Objetivo 3** se han seleccionado la LP-PLA por su mayor capacidad de internalización y entrega de ARNm en las CDs. Sus formulaciones se describen a continuación.

- El complejo de LP-PLA coformulado con Gag *Consensus B* (G).
- El complejo de LP-PLA coformulado con Gag *Consensus B* con modificaciones (5MeC, PSU) (GM).



f)

Nanocomplejos de PLA,LP-PLA,LS						
Nanocomplejos			Características			
ARNm	Péptidos	Nanopartículas	Tamaño	Pdl	Potencial Zeta	
eGFP	RALA	PLA 	237	0,134	+34,8	
eGFP	LAH4	PLA 	275	0,244	+29	
eGFP	LAH4-L1	LP-PLA 	60	0,045	-20	
eGFP	LAH4-L1	LS 	73	0,083	-10	

Figura 22. Representación de las nanopartículas de: a) PLA, b) LS, c) LP-PLA. (Figura adaptada de Sergio Linares, Trends in molecular medicine,2019¹³²). **d) Representación de la estructura helicoidal de los péptidos cationicos (RALA, LAH4, LAH4-L1) que forman los poliplexos con el ARNm.** **e) Representación de la esquemática de la estrategia de vectorización de las ARNm en las PLA, LP-PLA, LS.** **f) Tabla comparativa del tamaño, Índice de polidispersión (pdl) y potencial Z de los nanocomplejos de Péptido/ARNm/NP.** (Figura adaptada de Anne-Line Coolen, Biomaterials, 2019²²⁰). 5MeC, 5-Methyl-Cytidine y PsU, Pseudouridine.

5.2 SUJETOS DE ESTUDIO PARA LA OBTENCIÓN DE LAS PBMCs

Para obtener las PBMCs se realizaron extracciones de sangre mediante venipunción en los siguientes grupos de individuos:

a) Pacientes crónicos infectados por el VIH-1 con carga viral suprimida: pacientes clínicamente asintomáticos, con CD4+ superiores a 350/mm³, en tratamiento con cART desde al menos un año y con cargas virales indetectables (< 50 copias/ml).

b) Individuos voluntarios sanos, no infectados por el VIH-1, procedentes de donantes altruistas del banco de sangre de nuestro hospital o del “Banc de Sang i Teixits de Barcelona” (BST- BCN).

La muestra biológica extraída a cada individuo ha sido sangre venosa (100-200 ml) para obtener plasma y PBMCs. Se utilizaron en parte el mismo día y parte de ellas se criopreservaron en nitrógeno líquido. A la semana, se obtuvo una segunda muestra venosa de 50 ml del mismo paciente para poder realizar el cocultivo autólogo.

5.3. ADHERENCIA DE LAS PBMCs Y GENERACIÓN DE CDsi A PARTIR DE MONOCITOS

Las PBMCs aisladas a partir de 90ml de sangre periférica, se obtuvieron a partir de una centrifugación estándar por gradiente de densidad (método Ficoll-Hypaque) Las PBMC fueron recolectadas e inmediatamente utilizadas para la generación de CDsi derivadas de monocitos como se ha descrito en trabajos previos¹³⁵. Las PBMCs fueron contadas e incubadas en una proporción de 3-4-10⁶ células/ml (fracción adherente) durante 2 horas en incubador a 37°C con atmósfera humidificada con 5% de CO₂ en el aire, en medio-CD, compuesto por medio de cultivo x-VIVO 10 (Gibco BRL Alcobendas, España) complementado con 1% de suero autólogo inactivado por calor a 56°C durante 30min, 50 µg/ml de gentamicina farmacéutica (Braun B. Melsungen, Alemania), 2,5 µg/ml *fungizone* (Bristol-Myers Squibb, Munchen, Alemania) y

1 μ mol/ml *azidothymidine* (Genéricos Españoles Laboratorios, Las Rozas, Madrid) para evitar la replicación endógena del VIH-1. Después de 2 horas de incubación, se confirmó que los monocitos se encontraban en monocapa y se recogió la fracción no adherente (PBMC-monocitos), la cual se contó y, si no se utilizaba inmediatamente, se congelaron las células con suero fetal bovino (FBS, Gibco, Alcobendas, España) más un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma, Alcobendas, España). Luego, los monocitos adheridos en el frasco de cultivo fueron cultivados durante 6 días con medio-CD complementado en los días 0, 2 y 5 con IL-4 humana recombinante y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (1000 IU/ml, respectivamente, Prospec, Freiberg, Alemania). Al sexto día de cultivo, se recogieron las CDs inmaduras (CDsi) después de disgregación mecánica con la pipeta y dos lavados con PBS estéril y frío (Lonza, Basilea, Suiza).

5.4. TRANSFECCIÓN DE CDS

Los diferentes sistemas de entrega de ARNm en las CDs fueron, por una parte, la electroporación y la lipofección para ARNm convencionales y autoreplicativos. Por otra parte, se utilizó el pulsado para los complejos de ARNm con nanopartículas. En todos los casos nos hemos basado en publicaciones anteriores^{22,135,231}.

5.4.1. Electroporación de CDs

Para la electroporación (EP), las CDsi se lavaron dos veces con el medio Dulbecos modificado por Iscove sin suero (IMDM) (Thermo Fisher, Barcelona, España) y se resuspendieron en medio Ingenio solution (Mirus Madison, USA). Se probaron las siguientes condiciones: pDNA-gp140 (eTheRNA, Niel, Bélgica), ARNm-eGFP (Miltenyi, Colonia, Alemania) y RREP-eGFP y RREP-gp140 (proporcionado por el grupo de P. Liljeström, Karolinska Institutet, Suecia). Para cada condición, se mezcló un volumen de suspensión celular de 0.4mL con 4-10⁶ células con 10 μ g del producto, y se electroporó en una cubeta de 0.4 cm usando un sistema de electroporación de Gene Pulser II

(Biorad, Hércules, California, EE. UU). Las condiciones de electroporación de los replicones fueron: voltaje de 400V, capacitancia de 975 μ F, resistencia de 800 Ω resultando en un tiempo de pulso de 20 ms aproximadamente. Para los ARNm convencionales y plásmido se probaron las siguientes condiciones de electroporación: voltaje de 400V, capacitancia de 150 μ F, resistencia de 800 Ω resultando en un tiempo de pulso de 5 ms aproximadamente. Después de la electroporación, la suspensión celular se transfirió rápidamente a un tubo de 15 ml con 10 ml de medio R10 (RPMI 1640 Medium (Gibco BRL Alcobendas, España) suplementado con un 10% de FBS). Después de 3 horas de incubación, se sustituyó el medio tras lavar las células y se agregó medio R10 nuevo. Las células se incubaron durante 24 horas antes de su uso.

5.4.2. Lipofección de CDs

Para la lipofección (LIPO) de CDsi, se resuspendieron 1-10⁶ CDsi en 2ml de Opti-MEM (Gibco BRL Alcobendas, España) en cada pocillo de una placa de 6 pocillos y se incubaron durante 24h a 37°C y 5% de CO₂ antes de su lipofección. Se evaluaron las siguientes condiciones: pDNA-gp140 y DREP-eGFP y DREP-gp140 (proporcionado por el grupo de P. Liljeström, Karolinska Institutet, Suecia). Para cada condición, se prepararon complejos ADN-lípidos en proporción 1:3 el mismo día de la lipofección. Para ello, 4 μ g (1 μ g/ μ l) de cada condición y 12 μ L de Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.) se diluyeron en Opti-MEM hasta 250 μ L. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente (TA), se agregó ADN diluido a la preparación de Lipofectamina diluida. Después de una incubación de 20-30 minutos en TA, los complejos ADN-lípidos se añadieron gota a gota a la placa. Tras 3 horas de incubación a 37°C en un 5% de CO₂, se retiró el medio cuidadosamente y se agregó el medio R10 fresco para incubar durante 48 horas más a 37°C en un 5% de CO₂, antes de su uso.

5.4.3. Pulsado de CDsi

Para el pulsado de CDsi con nanopartículas de oro (Au-NP) coformuladas con ARNm (Tabla 6), se ajustaron las CDsi a $2 \cdot 10^5$ en 200 μL de Opti-MEM por condición en una placa de 96 pocillos. Las formulaciones que se evaluaron fueron: Au-NP en forma esférica, en forma estrellada y éstas unidas ambas con ARNm. Como control positivo de pulsado se usó el reactivo de transfección Trans IT (Mirus Madison, USA) con ARNm (Stagment eGFP-mRNA, Miltenyi, Pozuelo de Alarcón, Madrid). Después de 3 horas se retiraron los sobrenadantes y se agregaron 200 μL de x-VIVO15 para incubar durante 24 horas más a 37°C en un 5% de CO₂, antes de su uso.

Para el pulsado de CDsi con nanocápsulas ricas en arginina (PARG, PROT, ENCP, TB) coformuladas con ARNm (Tabla 6) se añadieron a las CDsi a una concentración de $2 \cdot 10^5$ en 200 μL x-VIVO15 por pocillo en una placa de 96 de fondo redondo. Como control positivo, se electroporó ARNm (Stagment eGFP-mRNA, Miltenyi, Pozuelo de Alarcón, Madrid) siguiendo las especificaciones descritas en el apartado 5.4.1. Transcurridas 2 horas se retiraron los sobrenadantes y se agregó 200 μL de x-VIVO15 para incubar durante 24 horas a 37°C en un 5% de CO₂, antes de su uso.

Para el pulsado de CDsi con nanocomplejos poliméricos (PLA, LP-PLA y LS) asociados con péptidos catiónicos, se ajustó a la densidad de $1 \cdot 10^5$ células en 200 μL de R10 en cada pocillo en una placa de 96 de fondo redondo. Después de 24 horas, se prepararon las formulaciones de los nanocomplejos que consistió en mezclar volumen a volumen (V/V) ARNm disuelto en agua libre de RNAsa con péptidos RALA, LAH4-L1 o LAH4. Estos precomplejos se coformularon V/V a nanotransportadores (PLA, LP-PLA, LS) (Adjuvatis, Lyon, France) para obtener nanocomplejos de péptidos/ARNm/nanotransportador (Tabla 6). Se reemplazó el medio de la suspensión celular por 200 μL de medio libre de suero (RPMI) para añadir las formulaciones a las células.

Las condiciones evaluadas han sido las siguientes: complejos intermedios de péptido/ARN, el complejo completo péptidos/ARNm/nanotransportador y como control positivo el reactivo de transfección Trans IT (Mirus, Madison, USA) con ARNm (Stagment eGFP-mRNA, Miltenyi) utilizando las recomendaciones del fabricante¹⁷². Después de 2-3 horas de exposición, se retiraron los sobrenadantes y se agregaron 200 μ L de R10 fresco. Se incubó durante 24 horas a 37°C en un 5% de CO₂, antes de su uso.

Nanocomplejos	ARNm	Cantidad ARNm
ARNm/Au-NP esfera	eGFP	5ng
ARNm/Au-NP estrella	eGFP	10ng
PARG/ARNm/NCs	eGFP	10ng
PROT/ARNm/NCs	eGFP	10ng
RALA/ARNm/PLA	eGFP	20ng
	Gag-HxB2	
LAH4/ARNm/PLA	eGFP	20ng
	Gag-HxB2	
LAH4-L1/ARNm/LP-PLA	eGFP	250ng
	Gag	
	Gag mod	
LAH4-L1/ARNm/LS	eGFP	250ng
	Gag	
	Gag mod	

Tabla 6. Cantidad de ARNm coformulado en las diferentes NPs utilizadas en esta tesis.

En todos los experimentos de transfección siempre se añadió un control negativo, que era una cubeta o un pozo con CDsi sin ningún tipo de construcción transfectada. Además, en algunos ensayos de transfección después del pulsado se añadieron citocinas IL4 y GM-CSF (1000 UI/ml) (Cellgenix, Freiburg, Germany) y un cóctel de maduración (TNF α , IL-1 β , IL-6 y prostaglandina E₂; Cellgenix, Freiburg, Germany) para mejorar el proceso de maduración de las CDsi²¹³.

Por último, tras 24 o 48h después de la transfección, las CDsmo fueron recogidas para evaluar la eficiencia de la transfección (**Objetivos 1 y 2**) mediante los parámetros de viabilidad y maduración analizados por citometría de flujo. Además, la expresión de antígeno también se evaluó por dicha técnica y fue confirmada mediante microscopía de fluorescencia (ver secciones 5.5 y 5.6). Por otro lado se utilizaron los cocultivos con linfocitos T autólogos (**Objetivo 2 y 3**) para evaluar su proliferación y la secreción de citocinas por fluorescencia (ver secciones 5.7 y 5.8), así como la determinación de los *spots forming cells* de IFN- γ mediante ELISPOT (ver sección 5.9).

5.5. CITOMETRÍA DE FLUJO

Todos los datos sobre el tráfico endosomal y la eficiencia de la transfección (viabilidad, maduración de CDs y expresión de antígeno) correspondientes a los **Objetivos 1 y 2**, junto al ensayo de proliferación de linfocitos T (**Objetivo 2**), se realizaron con el citometro *FACSCalibur* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) y se analizaron con el software de análisis *FlowJo* (Ashland, OR, USA, Becton Dickinson & Company).

Los diferentes mAbs (BD Biociences, San Jose, CA, USA) se utilizaron en diversos paneles de 4 colores para el análisis de: viabilidad de las CDs CD14-APC, Annexin-V-PE, 7-AAD; maduración de las CDs y expresión de ARNm de eGFP CD14-APC, CD83-PE, HLA-DR-PerCP y para determinar el linaje de linfocitos T CD4-APC, CD8-PE, CD3-PerCP.

Para el análisis de la expresión de gp140 o Gag, se realizaron marcajes intracelulares con el fin de detectar la expresión de estos antígenos en las CDs. Por un lado, para determinar la expresión de gp140 se utilizó el anticuerpo monoclonal IgGb12 dirigido frente a gp120 (adquirido a Polymun Scientific, Viena, Austria) y como secundario se empleó el anti-human IgG marcado con PE adquirido en Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (Pennsylvania, USA). Por otro lado, se utilizó el anticuerpo monoclonal KC57 FITC (Beckman Coulter) dirigido frente a gag p24.

Por último, se empleó el anticuerpo monoclonal de conejo EEA1 conjugado con Alexa Fluor 647 (Abcam) dirigido frente a las vesículas fosfolipídicas que contienen fosfatidilinositol 3-fosfato, para determinar el tráfico endosomal²²⁹. En la siguiente tabla (Tabla 7) se presentan todos los anticuerpos utilizados en esta tesis.

Anticuerpo	Fluorocromo	Tipo	Clon	Compañía
7-AAD	PerCPy5.5	Monoclonal	Unknown	BD Biosciences
Annexin-V	PE	Monoclonal	Unknown	BD Biosciences
CD3	PerCP	Monoclonal	SK7	BD Biosciences
CD4	APC	Monoclonal	RPA-T4	BD Biosciences
CD8	PE	Monoclonal	RPA-T8	BD Biosciences
CD14	APC	Monoclonal	MφP9	BD Biosciences
CD83	PE	Monoclonal	HB15e	BD Biosciences
EEA1	Alexa Fluor 647	Monoclonal	EPR4245	Abcam
HLA-DR	PerCP	Monoclonal	L243	BD Biosciences
Human IgGb12	Unconjugated	Monoclonal	Unknown	Polymun
KC57	FITC	Monoclonal	KC57	Beckman Coulter
Mouse IgG	APC	Monoclonal	X40	BD Biosciences
Mouse IgG	FITC	Monoclonal	X40	BD Biosciences
Mouse IgG	PE	Monoclonal	X40	BD Biosciences
Mouse IgG	PerCP	Monoclonal	X40	BD Biosciences
Goat anti-human IgG	PE	Polyclonal	-	Jackson Immunoresearch

Tabla 7. Anticuerpos utilizados en el trabajo de tesis.

En todos los experimentos, antes y después del marcaje, las células han sido lavadas con 2 mL of PBS + BSA + *sodium azide* (PBS suplementado con 0,5% BSA and 0,01% *sodium azide*). Sin embargo, en el marcaje con la Annexina V, las células fueron lavadas con *Annexin V binding buffer* (diluición de Hepes 1M en agua destilada con NaCl and CaCl₂).

Después del marcaje de superficie se realizó el marcaje intracelular. En primer lugar, se fijaron y permeabilizaron las células con (BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) y se bloquearon con

PBS estéril frío suplementado con el 10% de suero AB. A partir de este punto se siguió el protocolo descrito por BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit protocol. Por último, las células fueron fijadas con 200 µL of 1x PBS + 10% paraformaldehído.

5.6. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

Para constatar la expresión del antígeno obtenida en la citometría en los **Objetivo 1 y 2**, se realizaron preparaciones en porta para ser evaluadas por microscopía de fluorescencia de la siguiente manera: Para la preparación de las muestras, se recogió una alícuota de 50 µL ($1,8 \times 10^5$ cells/mL) de las muestras de citometría de flujo y se fijaron en SuperFrost Plus™ Adhesion slides (Fisher Scientific, Leicestershire, UK). A continuación, los portaobjetos se dejaron secando en aire para deshidratarlos durante 30 minutos. Tras este tiempo, se marcaron y fijaron con 25 µL de DAPI solution (Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, USA) y se guardaron en oscuridad a 4°C para su observación mediante microscopía de fluorescencia invertida ZEISS, con un objetivo de 63X y analizadas con el *software* de IMAGEj.

5.7. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN.

Para observar el impacto de los ARNm autoreplicativos que codifican para gp140 y los ARNm convencionales que codifican para Gag coformulados con nanopartículas en la activación de los linfocitos T (**Objetivo 2**), se realizó la tinción de CFSE de los linfocitos T y se evaluó mediante citometría de flujo.

Para este ensayo se utilizó la fracción no adherente (PBMC-monocitos) obtenida en el 5.2. Esta fracción se lavó y se resuspendió con PBS + 1% FBS para obtener 10×10^6 células/mL. A continuación, se marcaron con CFSE siguiendo las instrucciones del fabricante (CellTrace CFSE cell proliferation kit, Molecular Probes, Paisley, UK) y se incubó durante 10 minutos a 37°C en el baño termostático. Después, se añadió 5

volúmenes de PBS frío al 10% FBS y se incubó en hielo durante 5 minutos. Por último, las células fueron lavadas 3 veces con PBS + 10% FBS y un último lavado con X-VIVO10 al para ajustar las células a 2×10^5 células/100 μ L.

Las CDsmo obtenidas después de las diferentes transfecciones (6×10^4 células/pocillo), fueron lavadas tres veces con PBS frío y un último lavado con X-VIVO10. Se resuspendieron con X-VIVO10 y se pusieron en cocultivo con los linfocitos T autólogos marcados con CFSE descritos anteriormente (2×10^5 células/pocillo) en un volumen final de 200 μ L in X-VIVO-10, suplementado con 1mM zidovudine para evitar la replicación endógena del VIH-1.

Se evaluaron todas las condiciones con inmunógeno, como controles negativos de proliferación se utilizaron CDs no modificadas y la fracción no adherente (PBMC-monocitos). Como control positivo se realizó con CDs no modificadas en cocultivo con linfocitos en presencia de SEA (*Staphylococcus aureus* enterotoxin A, Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany). En los cocultivos para cada condición evaluada, se realizaron triplicados y se incubaron a 37°C y al 5% CO₂.

Tras 6 días de cocultivo, la proliferación de las células T se midió por citometría de flujo mediante el análisis de la dilución del CFSE. Los linfocitos T se marcaron por tinción directa con anticuerpos monoclonales para identificar las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ (CD3⁺ CD4⁺) y T CD8+ (CD3⁺ CD8⁺). Como control negativo las células se tiñeron con inmunoglobulina de ratón (IgG) como marcadores inespecíficos de antígeno. Por último, y con el fin de determinar la proliferación de las células T, se cuantificó el decrecimiento de la intensidad del CFSE (CFSE^{Low}) como indicador asociado a la división celular.

5.8. MEDICIÓN DE LA SECRECIÓN DE CITOCINAS Y QUIMIOCINAS

Aprovechando el cocultivo entre las CDsmo por los candidatos vacunales junto a los linfocitos T autólogos de la 5.7, se evaluó el patrón de secreción de citocinas (**Objetivo 2**) de la siguiente forma:

Se recolectaron sobrenadantes a los 6 días de los cocultivos de CDs modificadas y linfocitos T autólogos descritos en el ensayo de proliferación y se guardaron a -20°C para ser analizados mediante el ensayo Multiplex Luminex (Human Cytokine Magnetic 25-Plex Panel, Invitrogen, Carlsbad, California, USA), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

5.9. ENSAYO DE INMUNOADSORCIÓN VINCULADO A ENZIMAS (ELISPOT) PARA DETECTAR LAS CÉLULAS FORMADORAS DE SPOTS (SFC) EQUIVALENTES A LAS CÉLULAS SECRETORAS DE IFN- γ

Para evaluar si la respuesta específica contra el VIH-1 está claramente inducida por la secuencia incluida en estos candidatos vacunales (**Objetivo 3**), se realizó el ensayo de ELISPOT.

En primer lugar, las placas de ELISPOT de 96 pocillos (Multiscreen Millipore, Bedford, MA) fueron sensibilizadas con 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anti-IFN- γ mAb 1-D1K (Mabtech, Estocolmo, Suecia) en tampón carbonato (Na_2CO_3 0.1M, pH 9.6) e incubadas *overnight* a 4°C. A continuación, las placas fueron lavadas seis veces con RPMI 1640 libre de suero (Lonza-Biowhitaker, Whaltman, USA) y bloqueadas con RPMI 1640/10% FBS durante una hora. A continuación, se descartó el medio R10 y se añadió las CDsmo (2×10^4) de la M.4 con los candidatos seleccionados en el objetivo 2 y los linfocitos (8×10^4) obtenidos en la segunda venipunción respectivamente, en presencia de los diferentes *pools* de péptidos solapantes (40-60 aa de longitud), abarcando las

secuencias enteras de las proteínas Gag y Env del VIH-1 descritas en las Tablas 7 y 8 a una concentración final de 2 µg/ml.

Para el ELISPOT al día 1, se utilizó un control negativo de CDs no modificadas con linfocitos frescos (RPMI/10%FCS), las CDsmo con los candidatos seleccionados en el objetivo 2 más los linfocitos en presencia de los *pools* de péptidos (ver Tabla 7 y 8) y finalmente controles positivos con CEF (*Cytomegalovirus, Epstein Barr virus, Influenza virus*) a 2 µg/mL (Mabtech AB, Nacka Strand, Sweden) y PHA (Fitohemaglutinina) a 4 µg/ml (Sigma, Saint Louis,USA).

Pool #	Proteína	Número de péptidos	Mezcla pools de péptidos (PepMix)	Número de péptidos
p1 (Gag)	Gag	37		
p2 (Gag)	Gag	21	GAG1	58
p3 (Gag)	Gag	31		
p4 (Gag)	Gag	17	GAG2	65
p5 (Gag)	Gag	17		
p1 (Env)	Env	41		
p2 (Env)	Env	44	ENV1	125
p3 (Env)	Env	40		
p4 (Env)	Env	43	ENV2	85
p5 (Env)	Env	42		

Tabla 7. Pools de péptidos de Gag y Env correspondientes al *clade C* del virus VIH-1 que abarcan la cepa ZM96gp140 codificada por DREP gp140: El grupo de péptidos que abarcan las proteínas de Gag y Env de la secuencia de ZM96, se agruparon en *pools* de Gag y Env, atendiendo al número de péptidos por *pool* y a la cantidad de DMSO presente en cada *pool*. Estos *pools* fueron proporcionados por el grupo del Dr. G. Pantaleo del Centre Hôpitalier Univeritaire Vaudois (CHUV) (Lausane, Suiza) en el contexto del proyecto colaborativo EHVA.

Pool #	Proteína	Número de péptidos
Gag-1	Gag	68
Gag-2	Gag	53
Env-1	Env	55
Env-2	Env	54
Env-3	Env	55

Tabla 8. Pools de péptidos de Gag y Env correspondientes al *clade B* del virus VIH-1 que abarcan la cepa BxB2 codificada por los ARNm convencionales de Gag (G) y (GM) coformulados con LP-PLA: El grupo de péptidos que abarcan las proteínas de Gag y Env de la secuencia de BXB2, se agruparon en *pools* de Gag y Env, atendiendo al número de péptidos por *pool* y a la cantidad de DMSO presente en cada *pool*. Estos *pools* fueron obtenidos a través del NIH AIDS reagent program (Maryland, USA).

Por otro lado, se realizó un ELISPOT a día 6 de la siguiente manera:

- Las CDsmo obtenidas después de las diferentes transfecciones (3×10^4 células/pocillo), fueron lavadas tres veces con PBS frío y un último lavado con X-VIVO10. Se resuspendieron con X-VIVO10 y se pusieron en cocultivo con los linfocitos T autólogos descritos anteriormente (2×10^5 células/pocillo) en un volumen final de 200 μ L in XVIVO-10, suplementado con 1mM zidovudine para evitar la replicación endógena del VIH-1 y se cocultivaron durante 6 días en una placa de 96 pocillos de fondo redondo (Corning, Nueva York, USA). Al sexto día, se traspasó el cocultivo a una placa de ELISPOT y se siguió la estrategia descrita para el ELISPOT día 1. Además se añadió en estos cocultivos CDs frescas (*ex-novo*) (1×10^4) transfectadas 24/48h antes por los candidatos seleccionados en el objetivo 2, para poder detectar la acumulación de IFN- γ secretado (Figura 23). De nuevo, la PHA y CEF se incluyeron como controles positivos (PHA 4 μ g/ml; Sigma, y CEF 2 μ g/ml; Mabtech).

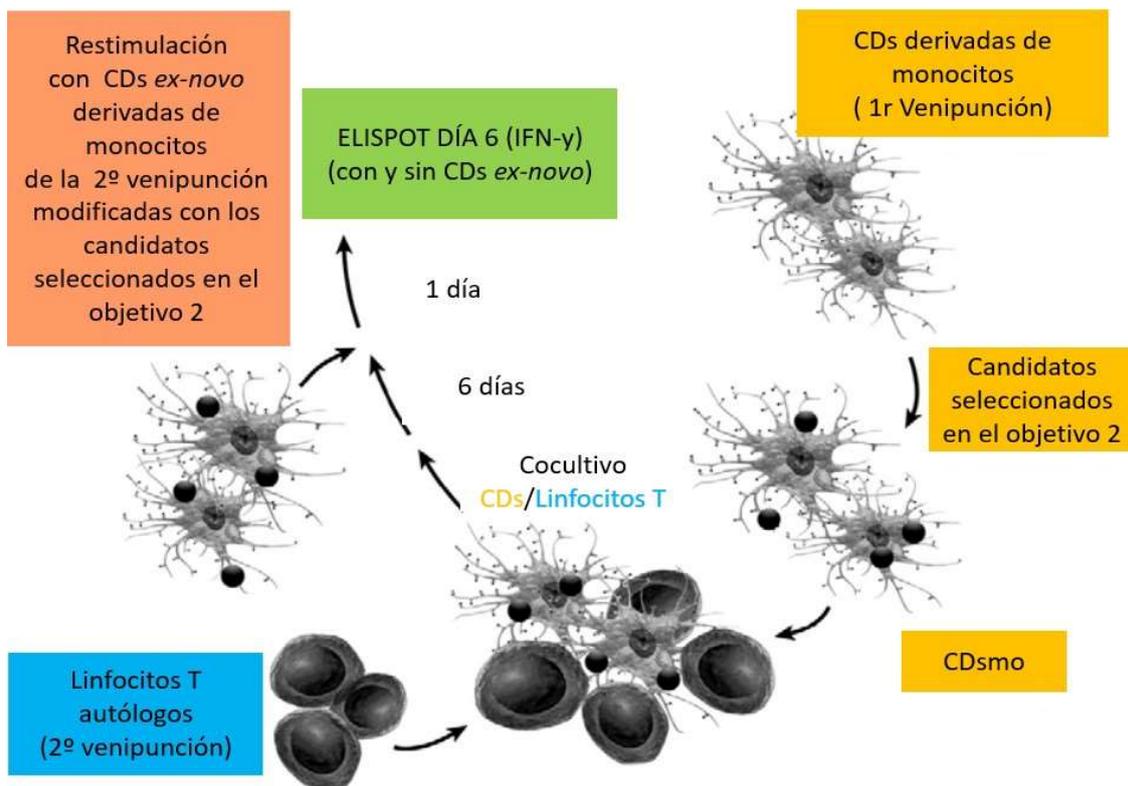


Figura 23. Representación esquemática de los cocultivos de CD y linfocitos para el ELISPOT día 6. Las CDsmo se ponen en cultivo con los linfocitos T autólogos obtenidos en la segunda venipunción durante 6 días. Tras este tiempo, se pasan a una placa de ELISPOT y se reestiman con CD frescas modificadas durante 24h y luego se evalúa las células formadoras de *spots*. (Figura adaptada de Janice M.Moser, *Journal of Immunological Methods*, 2010)²³⁰.

En todas las placas, después de 16-18h de incubación a 37°C, las células se lisaron mediante seis lavados con PBS/0.05% Tween 20. A posteriori, se agregó 1 µg/ml de anti-IFN-mAb 7-B6-1 conjugado con biotina (Mabtech) dejándose incubar durante 1h. Para detectar las células formadoras de *spots* (SFC) (equivalente a las células secretoras de IFN-γ), se realizaron seis lavados con PBS Tween y se añadió durante 1 hora estreptavidina-fosfatasa alcalina (Mabtech). Tras esta incubación se volvieron a lavar los pocillos y se agregaron 100 µl/pocillo de sustrato cromogénico (BioRad, Hercules, CA, EUA). Los *spots* fueron claramente visibles en menos de 30 minutos, evitando la exposición directa a la luz.

Las SFC se contaron con un lector AID ELISPOT (Autoimmun Diagnostika GmbH, Alemania). Los resultados se consideraron positivos si el número de SFC/10⁶ PBMC en pozos estimulados era el doble que en pozos de control no estimulados y si había al menos 50 SFC/10⁶ PBMC después de la sustracción de fondo.

5.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de datos y la comparativa de los diferentes parámetros, se han utilizado test paramétricos (ej. *T-Student's*) y no paramétricos (ej. *Mann-Whitney* o *Wilcoxon*), según corresponda. Para la comparativa de más de dos grupos, se ha utilizado la prueba de *Kruskal-Wallis* con verificación de prueba de *Dunn's* para múltiples comparativas. En los ensayos de dosimetrías se ha empleado *One-way ANOVA* con verificación de Bonferroni.

El análisis estadístico se realizó utilizando el software *GraphPad Prism* Version 6.0. Para todos los análisis, los datos se representan con su promedio y el error estándar del promedio (*mean with SEM*), y se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p \leq 0.05$ (*), 0.01 (**), y 0.001 (***).

6. RESULTADOS

6.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS CAMBIOS FENOTÍPICOS EN LA CÉLULA DENDRÍTICA MODIFICADA (CDmo) CON REPLICONES (RREP/DREP) QUE CODIFICAN PARA GP140 Y ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE SUSCITADA MEDIANTE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T Y EL PERFIL DE CITOCINAS GENERADO.

Como se ha descrito en estudios previos, el uso de ARNm en vacunaciones basadas en CDs parecen ser muy seguras y prometedoras^{64,108,136}. De acuerdo con esto, hemos seleccionado y comparado las mejores formulaciones de ARNm autoreplicativo, denominados replicones (RREP y DREP), que codifican para gp140. Así pues, se han diseñado diferentes experimentos para analizar la internalización de estos candidatos vacunales en las CDs, caracterizar su efectividad en la activación de dichas células y evaluar su capacidad para inducir una respuesta inmunológica específica frente al VIH-1.

6.1.1. Ensayo de optimización de la concentración de DREP eGFP

En primer lugar nos centramos en determinar las concentraciones óptimas de transfección, evaluando los siguientes parámetros de: viabilidad, maduración y expresión de eGFP dentro de la subpoblación madura de CDs.

Con el objetivo de profundizar sobre el efecto de los replicones en la toxicidad celular analizamos la viabilidad de las CDs mediante citometría de flujo. Se realizó siguiendo el criterio de selección de la población viable (región doble negativa en la expresión de Annexina-V y 7AAD como marcador de apoptosis y necrosis celular, respectivamente). Como se puede apreciar en la Figura 24, las CDsmo por DREP a concentración de 4µg de ARNm/pocillo no ven afectada su viabilidad, hallándose más de un 70% de esta población de CDsmo doble negativa para 7AAD y Annexina.

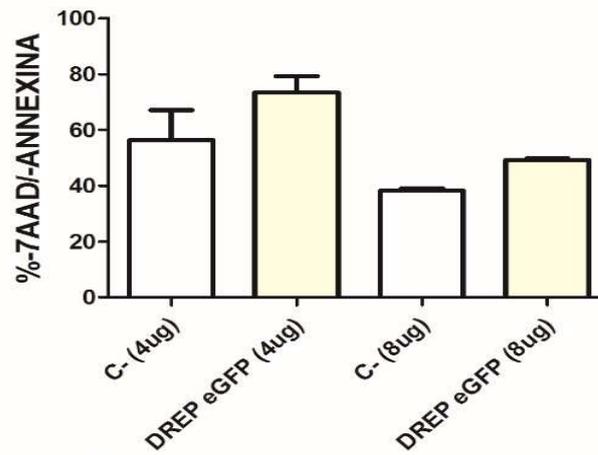
En este contexto, nos propusimos determinar el perfil de maduración de estas células una vez modificadas por DREP eGFP. Se evaluó la expresión de CD83, marcador clásico de maduración en CDs y HLA-DR, marcador del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II que se encuentra expresado en CPA como las CDs. Como era de esperar, las CDs con DREP eGFP mostraron un marcado aumento de la expresión de estas moléculas. Cabe destacar que observamos diferencias en la expresión de CD83 y HLA-DR en las concentraciones evaluadas, siendo óptima la concentración 4µg de ARNm/pocillo (Figura24b).

Con el propósito de explorar cómo influye la concentración de DREP en la expresión de eGFP en las CDs, se compararon las dos concentraciones de 4 y 8µg de DREP eGFP. Sorprendentemente, no observamos diferencias en la expresión de eGFP en las CDs, entre las dos concentraciones usadas. Específicamente, fue un 12% a 4 µg y un 11% en 8 µg de ARNm/pocillo, respectivamente (Figura 24c).

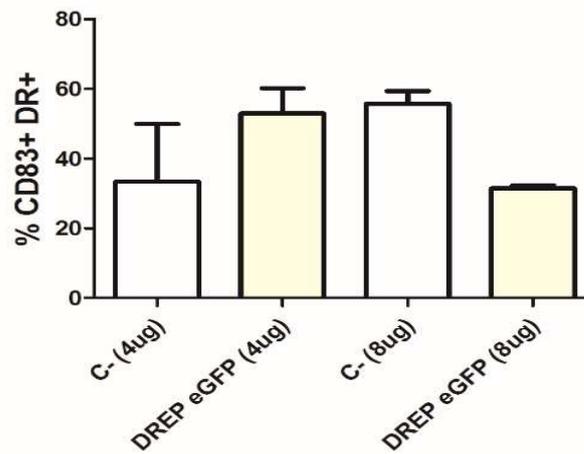
Los datos recogidos en este ensayo indican que a mayor concentración de DREP eGFP en la lipofección, mayor toxicidad celular. Además, observamos un incremento de los marcadores de maduración, pero sin diferencias destacadas entre las concentraciones evaluadas y, por consiguiente, no observamos mejoras en los porcentajes de expresión de eGFP. Sin embargo, sí que a concentración de 4 µg de DREP detectamos mejores resultados en viabilidad y maduración, acompañados además por una expresión de eGFP similar a la obtenida en la concentración alta de DREP eGFP. A la luz de estos resultados, nos inclinamos por utilizar el DREP eGFP a 4 µg.

Por otra parte, con el replicón RREP no fue necesario estandarizar la cantidad óptima para electroporar, puesto que el fabricante ya nos recomendó electroporar las células con 10µg tal y como había descrito en trabajos previos^{168,185,197}

a) Viabilidad



b) Maduración



c) Expresión de eGFP en CD83+HLADR+

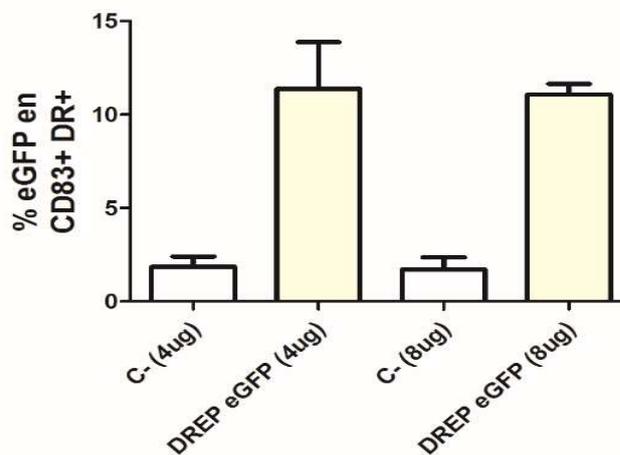


Figura 24. Gráficas de concentración respuesta para determinar la concentración óptima de DREP eGFP. Los gráficos representan los porcentajes de los marcadores de: a) Viabilidad (-7AAD-ANNEXINA), b) Maduración (CD83+DR+) y c) Expresión del eGFP en la subpoblación CD83+DR+. Se lipofectaron CDs con DREP eGFP durante 3h a diferentes concentraciones de 4 y 8 μ g de ADN/pocillo. Como control negativo (C-) se lipofectaron CDs sin DREP eGFP. Test de Wilcoxon (* $p < 0.05$). Los datos representan la media y SEM de individuos VIH-1(n=3).

6.1.2. Cinética de expresión de eGFP en CDsmo RREP/DREP eGFP.

Con el fin de establecer el momento máximo en el que se expresan los replicones en las CDs, se transfectaron éstas con RREP/DREP eGFP a diferentes tiempos para su posterior detección mediante citometría de flujo. Los datos revelaron que a las 6 primeras horas se observa positividad de eGFP en las CDs, pero no se aprecian diferencias entre RREP y DREP. A partir de las 24 horas, observamos el pico máximo de expresión de eGFP en RREP, 28% *versus* un 12% en DREP. En cambio, a las 48 horas se detecta una disminución de la expresión de eGFP en RREP con valores similares a los obtenidos a las 6 horas (Figura 25) y un ligero aumento en DREP de un 18% aproximadamente. Una vez demostrada la cinética de expresión de eGFP por citometría de flujo, se procedió a analizar la expresión de gp140 en RREP y DREP a las 24h y 48h, respectivamente.

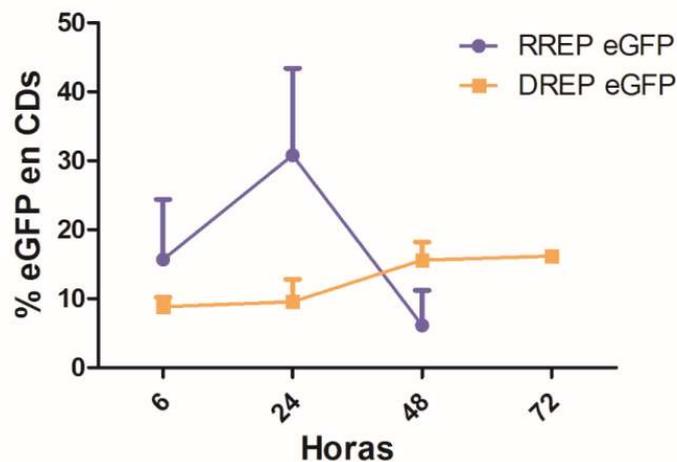


Figura 25. Cinéticas de expresión de DREP/RREP eGFP en CDs. Los símbolos representan el porcentaje (%) de CDs positivas para eGFP, en azul RREP eGFP a concentración de 10µg y en naranja DREP eGFP a 4 µg evaluados a tiempos de 6, 24, 48, y 72h. *Two-way ANOVA* con verificación de Bonferroni (* $p < 0.05$). El porcentaje de CDs positivas para eGFP están presentados por la media y SEM en individuos VIH+ ($n=3$).

6.1.3. Cinética de expresión de anti *early endosome antigen* (EEA1) en CDsmo con DREP eGFP para determinar el tráfico endosomal.

Una vez demostrada la expresión de estos candidatos y previo al uso de los replicones que codifican gp140, decidimos comprobar el tráfico intracelular de los replicones en las CDs.

En el caso del RREP no se procedió a evaluar el tráfico endosomal. Como está descrito en estudios previos, la electroporación induce la permeabilidad transitoria y reversible de la membrana celular permitiendo la entrada de RREP en el citoplasma donde empieza a replicarse^{168,197}.

En este sentido, diseñamos diferentes experimentos para establecer si DREP lipofectado era procesado por vía endocítica. Por este motivo, nos propusimos teñir las CDsmo con DREP eGFP con el anticuerpo EEA1. Este marcador reconoce las vesículas fosfolipídicas que contienen fosfatidilinositol 3-fosfato relacionadas con los estadios tempranos del tráfico endosomal.

Los resultados de la cinética de expresión de EEA1 revelaron un incremento marcado en la intensidad de EEA1 en el caso del ARNm eGFP comercial y un ligero aumento en el caso del DREP eGFP en las CDsmo durante las primeras 24h (Figura 26). A partir de las 48 horas, se observa un patrón similar, con un incremento destacable y significativo en la condición de ARNm eGFP (**p<0.01) respecto al control negativo y un aumento moderado en DREP eGFP. A las 72 horas, observamos una disminución de la expresión de EEA1 en la condición de ARNm. Sin embargo, cabe resaltar que en el caso del DREP eGFP la expresión de EEA1 siguió aumentado.

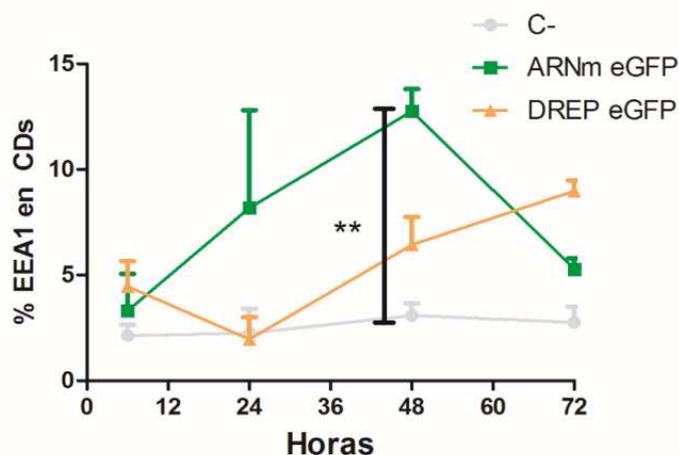


Figura 26. Cinética de la expresión de EEA1 en CDs transfectadas con DREP eGFP. El gráfico muestra los porcentajes de expresión de EEA1 en la población de CDs CD83+DR+. Se lipofectaron CDs con ARNm comercial de eGFP y con DREP eGFP a diferentes tiempos 6, 24, 48, y 72h, a la concentración de 4µg de ADN/pocillo. Los porcentajes de CDs positivas para EEA1 representan la media y SEM de individuos VIH+(n=3). Two-way ANOVA con verificación de Bonferroni (**p<0.01).

Para visualizar como DREP eGFP es procesado por la vía endocítica, realizamos preparaciones para microscopía de fluorescencia con las muestras utilizadas en la cinética de expresión de EEA-1 (Figura 26). Como se muestra en la Figura 27, la expresión de eGFP fue localizada en el citoplasma celular. A su vez, observamos la expresión de EEA1 en forma de *spots* de color turquesa presentes también en el citoplasma. Estas imágenes sugieren que DREP se internaliza por endocitosis.

El conjunto de estos datos sugiere que la endocitosis está implicada en el tráfico intracelular de DREP eGFP en las CDs y que, debido al diseño de este replicón, su tráfico intracelular empieza a partir de las 48 horas después de su transfección. Estos resultados nos muestran la importancia del tráfico endosomal para la expresión de ARNm en el citosol.

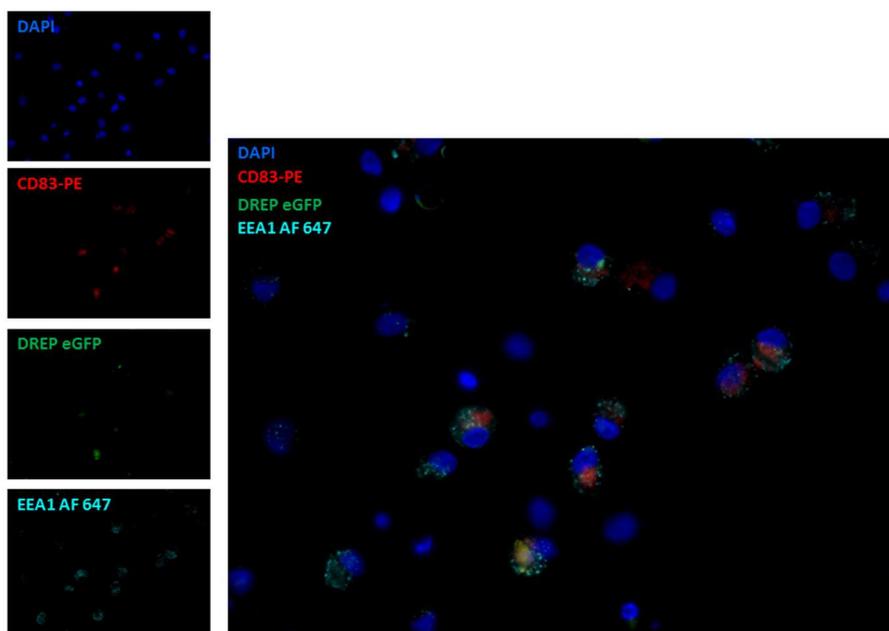


Figura 27. Internalización de DREP eGFP y expresión de EEA1 por parte de las CDs. Imágenes de microscopía de fluorescencia (63x) de CD8mo con DREP eGFP a las 48 h. Las CDs fueron teñidas en superficie con CD83-PE (rojo), con DAPI (azul) y permeabilizadas y marcadas con anticuerpo Alexa Fluor 647-anti-EEA1 (Turquesa).

6.1.4. Efectos de los replicones (RREP y DREP) que codifican para gp140 en la viabilidad, maduración y expresión de gp140 en CDs.

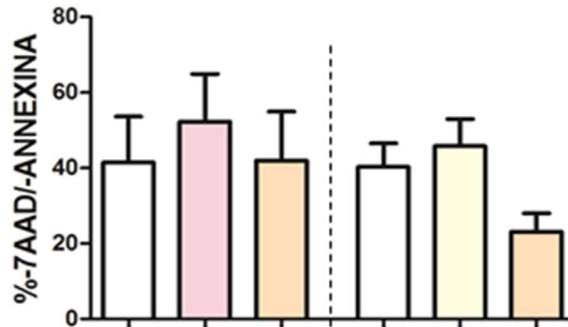
Como hemos mostrado en experimentos anteriores, los replicones son eficientemente expresados en las CDs. Con el objetivo de estudiarlos en profundidad, hemos planteado diferentes ensayos para determinar los efectos de los replicones que codifican gp140 en las CDs mediante citometría de flujo.

Por este motivo, analizamos la viabilidad celular después de su transfección. Como podemos observar en la Figura 28a, la transfección con RREP/DREP gp140 no han mostrado un impacto relevante en la viabilidad de las CDs.

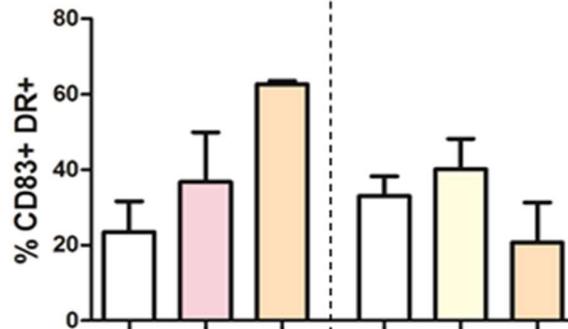
Por otra parte, el perfil de maduración mostró, como era de esperar, un aumento de los marcadores CD83+DR+ al ser comparados con sus respectivos controles

negativos (Figura 28b). Especialmente, cuando DREP gp140 estaba presente, se obtuvo un ligero aumento del porcentaje de CDs maduras en comparación a RREP gp140 (42% vs 30%). Además, la expresión de gp140 fue detectada en esta subpoblación de CDs maduras. Concretamente, DREP induce los valores más altos de expresión gp140 en comparación con RREP (12% vs 5%) (Figura 28c).

a) Viabilidad



b) Maduración



c) Expresión de gp140 en CD83+HLADR+

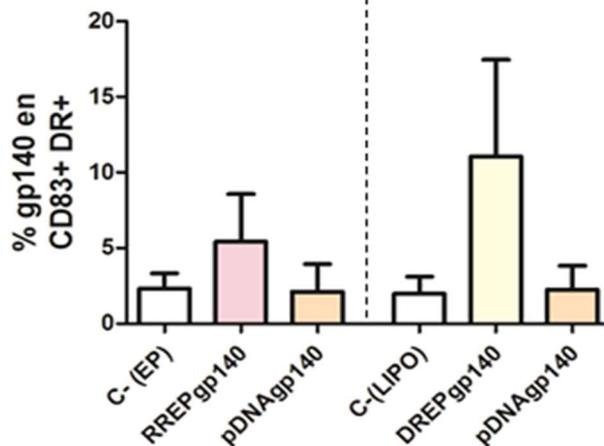


Figura 28. Caracterización fenotípica de las CDsmo con RREP/DREP gp140. (a-c) Análisis del perfil de: a) Viabilidad (-7AAD-ANNEXINA), b) Maduración (CD83+DR+) y c) Expresión de gp140 en la subpoblación de CDs CD83+DR+ por citometría de flujo. Los datos representan la media y SEM de RREP y DREP gp140 (n=4 y n=11 de pacientes VIH-1+, respectivamente). Test de Wilcoxon con nivel de significación (*p<0.05). EP, electroporación; LIPO, lipofección; pDNA gp140, ARNm desnudo de gp140.

Adicionalmente, para observar qué sucedía con DREP gp140 y su internalización en las CDs, se utilizó el microscopio de fluorescencia. Las imágenes de la Figura 29, muestran como el replicón se expresa en las CDs y aparentemente se localiza en el citoplasma, tal y como indica la expresión de gp140 detectada por el canal rojo emitido por el microscopio de fluorescencia.

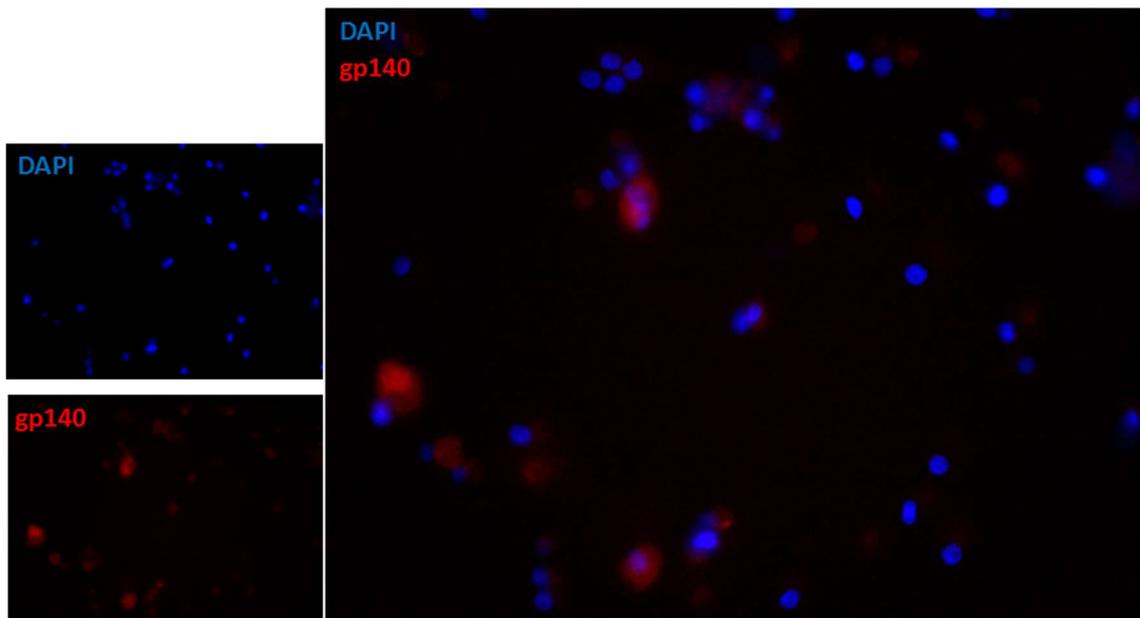


Figura 29. Internalización y expresión de DREP gp140 en CDs. Imágenes de microscopía de fluorescencia (63x) de CDsmo con DREP gp140 a las 24h. Las CDs fueron teñidas en superficie con DAPI (azul) y permeabilizadas y marcadas con anticuerpo anti-gp120-PE (Rojo).

A la luz de estos resultados, decidimos estudiar el efecto funcional de estas CDsmo por replicones sobre las células

6.1.5 Efectos de los replicones (RREP y DREP) que codifican para gp140 en la proliferación de linfocitos T.

En esta línea, diseñamos diferentes experimentos para medir la proliferación de los linfocitos T mediante tinción de CFSE y citometría de flujo y la producción de citocinas mediante Luminex. Los resultados de citometría de flujo, reflejados en la Figura 30, mostraron una ligera proliferación en ambos linajes. En los T CD4+ fue 2% (8% C- vs 10% RREPgp140) y en los T CD8+ un 4% (20% vs 24%) después de la transfección con RREPgp140 y en menor medida en DREPgp140. Por lo tanto no observamos diferencias significativas entre los replicones.

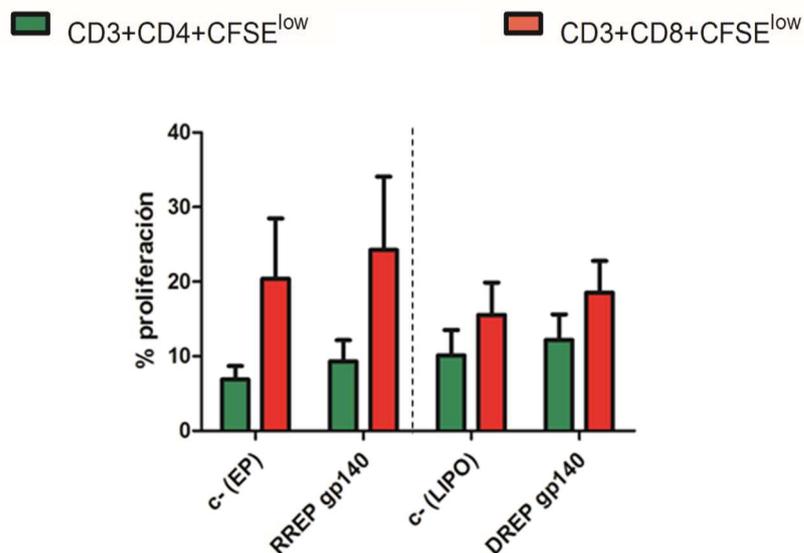


Figura 30. Proliferación de células T CD4+ y T CD8+ en cocultivo con CDsmo por RREP/DREP gp140. Proliferación de linfocitos T mediante tinción con CFSE. Los datos representan la media y SEM de RREP y DREP gp140 (n=4 y n=11 de pacientes VIH-1+, respectivamente). *Two-way ANOVA* con verificación de Bonferroni (*p< 0.05). EP: electroporación; LIPO: lipofección.

6.1.6. Perfil de secreción de citocinas generado por las CDsmo con RREP y DREP gp140 en cocultivo con linfocitos T.

También en este contexto, evaluamos el efecto de estas CDsmo con replicón en cocultivo con linfocitos T sobre el patrón de citocinas generado al sexto día de cultivo.

Tal y como se muestra en la Figura 31, la producción de citocinas se incrementó después de la estimulación con CDsmo con RREP y DREP gp140. En este sentido, RREP gp140 influyó en la secreción de citocinas proinflamatorias, tales como: IL1- β , TNF- α , IFN- α e IL6. De forma similar al patrón descrito anteriormente, se observó un aumento de las citocinas y quimiocinas pro-Th1. Además, el perfil de Th2 reveló un incremento de la secreción de IL4 e IL10 en presencia de RREP, mientras DREP gp140 no fue tan influyente como lo observado con RREP. Es destacable el aumento significativo (* $p < 0.05$) de los niveles secreción de IL6 y MIP-1 β en presencia de DREP gp140.

Por consiguiente, el conjunto de los datos obtenidos en la evaluación de los replicones indica que las CDsmo por RREP y DREP gp140 son viables, son capaces de madurar y de expresar la proteína gp140. Además, las CDsmo por los replicones induciendo un mayor perfil pro-Th1.

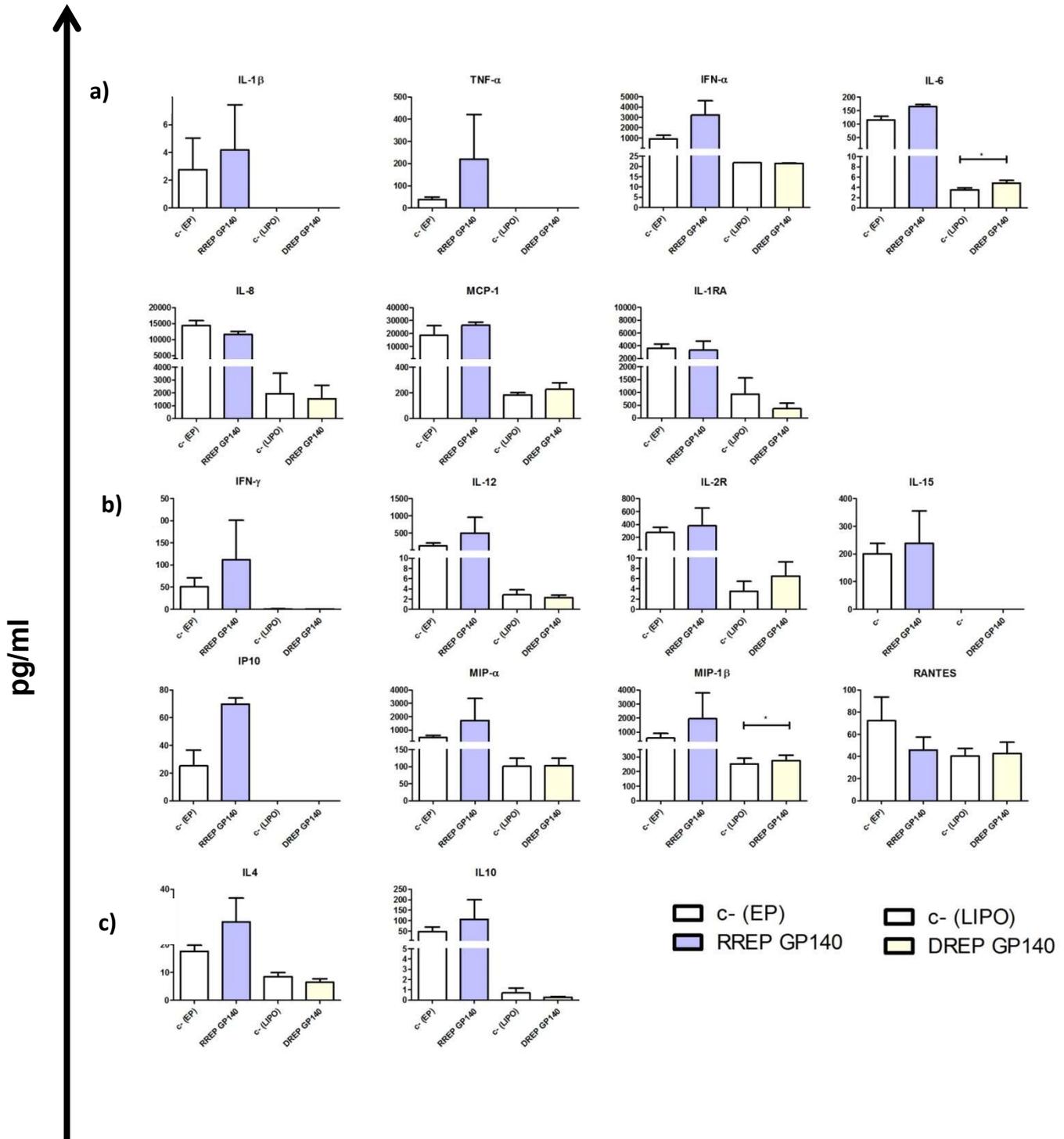


Figura 31. Patrón de citocinas secretado en el cocultivo de CDsmo por RREP/DREP gp140 y linfocitos T autólogos, y evaluado mediante ensayo de Luminex. Efectos de RREP/DREP gp140 en los niveles de secreción de citocinas y quimiocinas. Los resultados están clasificados en función del tipo de respuesta: a) proinflamatoria, b) Th1 y c) Th2. Los datos representan la media y SEM de RREP y DREP gp140 (n=3 y n=6 de pacientes VIH-1+, respectivamente). Test de Wilcoxon (*p< 0.05). EP, electroporación; LIPO, lipofección; pDNA gp140, ARNm desnudo de gp140.

6.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS CAMBIOS FENOTÍPICOS DE CDsmo CON DIFERENTES NANOPARTÍCULAS (NPs) COFORMULADOS CON INMUNÓGENOS DE DOS CEPAS DE GAG (HXB2 O CONSENSUS B) Y ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIDA POR LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T Y EL PERFIL DE CITOCINAS GENERADO.

Como se ha descrito previamente en el apartado de introducción, las nanopartículas (NPs) son candidatos prometedores en la vectorización de ARNm para permitir su liberación y protección en el citoplasma de las CD₈^{22,173,213}. Con este propósito, hemos evaluado diferentes formulaciones de ARNm con distintos tipos de NPs (Au NP / NCs / PLA / LP-PLA / LS) para estudiar la captura por parte de las CD₈, caracterizar su eficacia en la activación de dichas células y su capacidad para inducir una respuesta inmunológica específica frente al VIH-1.

6.2.1. Nanopartículas de oro (Au-NP)

Para determinar el efecto de las NPs en las CD₈, se han planteado experimentos como los descritos previamente en el apartado de los replicones. En este caso concreto, la determinación de las concentraciones óptimas de ARNm sobre Au-NP, se realizaron en el CIC-Biomagune de San Sebastián y están descritas en el apartado de Materiales y Métodos. Por este motivo, nos hemos centrado en evaluar los efectos de los complejos con Au-NP en nuestro modelo de CD₈.

6.2.1.1. Efectos de las Au-NP en forma de esferas ● y estrellas ★ cargadas con un ARNm eGFP en la viabilidad, maduración y expresión de eGFP en CD₈.

Como está descrito en trabajos previos, el uso de agentes madurativos influye positivamente en la captación de las Au-NP y en el posterior procesado de los ARNm en el citosol de las CD₈²¹³. Por ello, establecimos diferentes experimentos para analizar el impacto de estos conjugados en las CD₈, tras 24 horas de su pulsado en condiciones con y sin cóctel de maduración .

Como se puede observar en la Figura 32a, las Au-NP ● inducen una afectación moderada pero significativa de los marcadores de apoptosis y necrosis celular en ausencia de cóctel de maduración (C- 56+-11% vs ● 22+-8%, * $p<0,05$). Este efecto se agudiza en presencia de cóctel, siendo aún mayor su diferencia estadística, (C- 60+-6% vs ● 27+-9, ** $p<0,01$) (Figura 32a). Sin embargo, las Au-NP ★ reducen dicho efecto, sobre todo cuando están coformuladas con el ARNm mostrando valores superiores al 50% de viabilidad celular, independientemente de la adición o no de cóctel de maduración (Figura 32a).

En términos en maduración, las Au-NP ★ promueven el incremento de los marcadores CD83+ y DR+ en las CDs. Cabe destacar que se alcanzan porcentajes altos de dichos marcadores de maduración (25%) en la coformulación con ARNm eGFP, siendo significativo ($p<0,05$) sin la acción de agentes de maduración añadidos (Figura 32b). En cambio, las Au-NP ● no sólo no influyen en la expresión de estos marcadores, sino que en presencia de cóctel de maduración inducen una reducción de los porcentajes de células CD83+DR+ al ser comparados con su control negativo (Figura 32b).

Finalmente, determinamos la expresión de la proteína eGFP en la subpoblación de CDs CD83+DR+ mediante citometría. Observamos una escasa expresión de eGFP en el caso de Au-NP ● y una expresión débil (5%) aunque significativa ($p<0,05$) en CDs pulsadas por Au-NP en ausencia de cóctel de maduración (Figura 32c). En presencia de cóctel la expresión de eGFP fue muy escasa en ambas coformulaciones.

Estos datos sugieren que las Au-NP ★ en ausencia de cóctel de maduración serían los mejores candidatos dentro de las formulaciones de Au-NP evaluadas. Una vez estudiado el impacto de las formulaciones, nos propusimos determinar en qué momento son capturadas las Au-NP por las CDs. Para ello, medimos el efecto de esta captura a diferentes tiempos mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

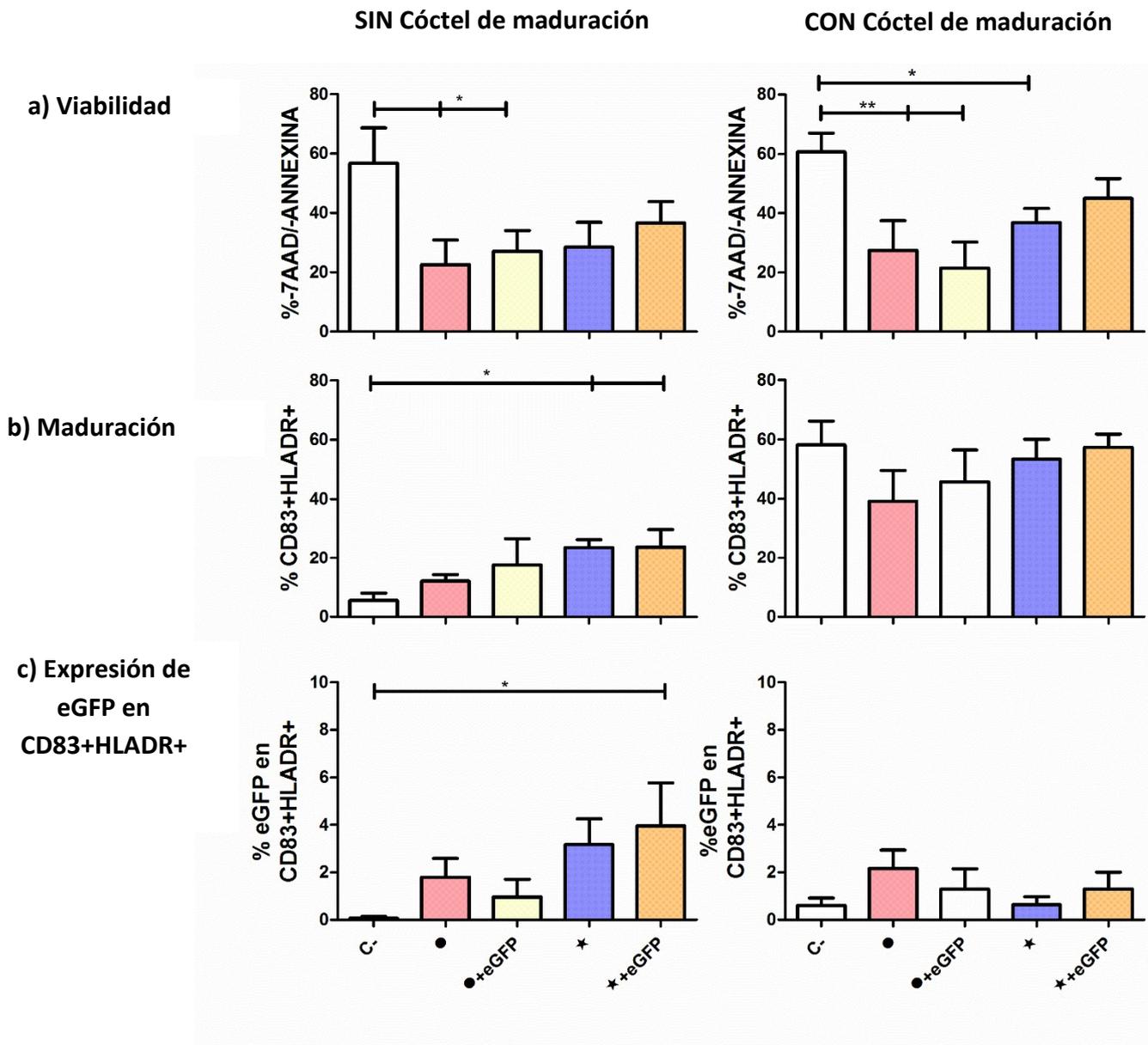


Figura 32. Caracterización fenotípica de las CD83+HLADR+ con Au-NP cargadas con ARNm eGFP. Los gráficos están divididos en dos columnas: (izquierda) sin cóctel de maduración y (derecha) con cóctel de maduración en (n=5 y n=9 individuos VIH+, respectivamente). (a-c) Análisis del perfil de: a) Viabilidad (-7AAD-ANNEXINA), b) Maduración (CD83+DR+) y c) Expresión de eGFP en la subpoblación CD83+DR+ por citometría de flujo. Los datos representan la media y SEM. Kruskal-Wallis con verificación de prueba de Dunn's, (*p<0,05, ** p<0,01). ●, Au-NP en forma de esfera (rojo); ★, Au-NP en forma de estrella (amarillo); ●+eGFP, Au-NP en forma de esfera cargado con ARNm de eGFP (lila), ★+eGFP, Au-NP en forma de estrella cargado con ARNm de eGFP (naranja).

6.2.1.2. Cinética de expresión de eGFP en CDsmo con Au-NP en forma de esferas ● y estrellas ★ cargadas con ARNm eGFP.

Los datos de la cinética mostraron que las CDsmo por Au-NP ★ presentan el mayor porcentaje de eGFP a las 24 horas después de su pulsado, sin la presencia de un agente externo de maduración. De hecho, hasta un 4% de las células expresaron eGFP (Figura 33). Por el contrario, en las CDsmo por Au-NP ● se determinó una escasa expresión de eGFP, indicando que esta coformulación no fue eficientemente capturada por las CDs.

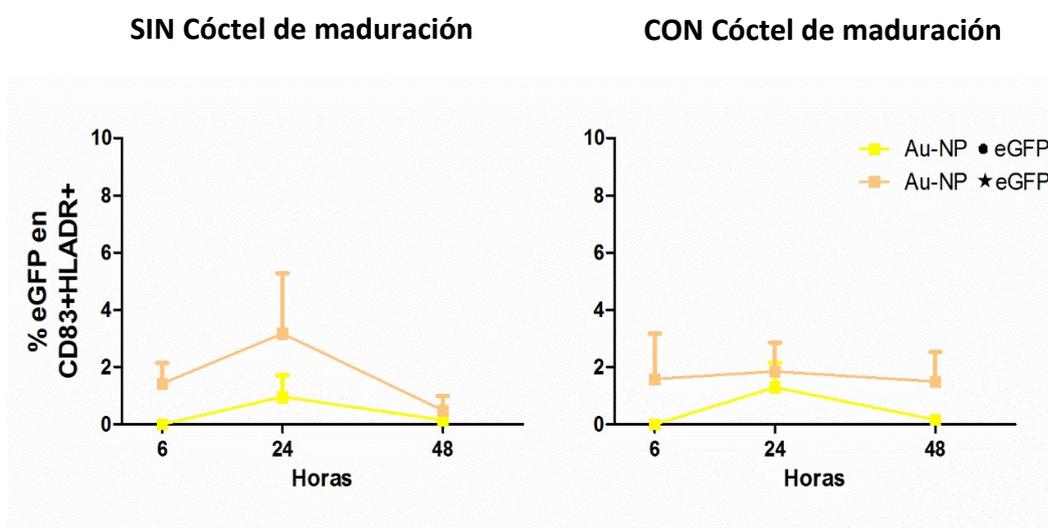


Figura 33. Cinéticas de expresión de ARNm eGFP coformulado en Au-NP en CDs.

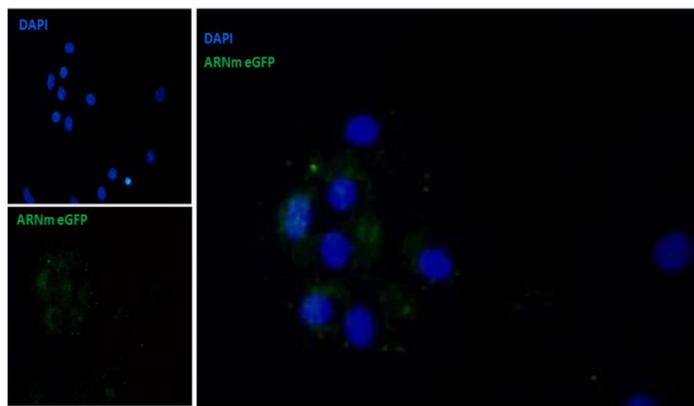
Los símbolos representan el porcentaje de CDs positivas para eGFP, tras el pulsado con Au-NP ● (amarillo) y ★ (naranja) cargadas con ARNm de eGFP, en condiciones de sin o con cóctel de maduración a diferentes tiempos: 6, 24, 48, y 72 h. El porcentaje de CDs positivas para eGFP están presentados con la media y SEM de individuos VIH-1+(n=3). *Two-way ANOVA* con verificación de Bonferroni (*p<0.05).

Igualmente, y para validar que las Au-NP son capturadas por las CDs, utilizamos la microscopía de fluorescencia para corroborar los resultados obtenidos por citometría (Figura 33). Como se muestra en las imágenes de la Figura 34, en las CDsmo por Au-NP ★ eGFP se aprecia la expresión de eGFP en el citoplasma localizada alrededor de los núcleos. Sin embargo, en Au-NP ● se visualiza una pobre expresión de eGFP, una

muestra más de la toxicidad ya reportada y confirmación de una baja transfección por parte de las CDs empleadas.

El conjunto de estos datos indica que las Au-NP ● son tóxicas para las células, disminuyen los marcadores de maduración y expresan de manera ineficiente las proteínas codificantes que contienen (eGFP). Por otra parte, las Au-NP ★ presentan mejores resultados en los parámetros de viabilidad y en inducción de maduración, con una ligera mejora en la expresión de antígeno respecto a las Au-NP●. Además, la presencia o no de cóctel de maduración en CDs no tiene un impacto relevante, ni a nivel celular, ni en la expresión de eGFP.

a) Au-NP ★ cargadas con ARNm de eGFP



b) Au-NP ● cargadas con ARNm de eGFP

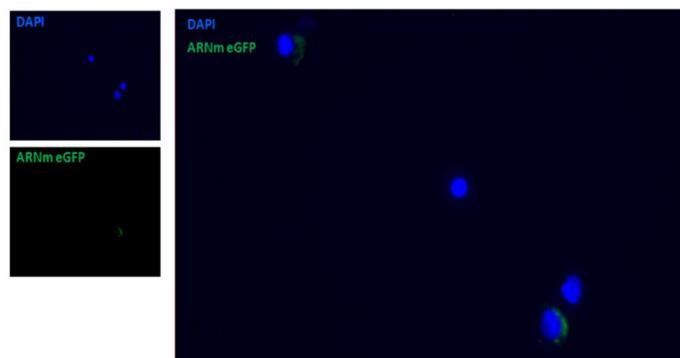


Figura 34. Captura y expresión de Au-NP eGFP en CDs. Imágenes de microscopía de fluorescencia (63x) con la expresión de eGFP en CDsmo por a) Au-NP ● y b) ★ a las 24h. Las fotos ilustran la expresión de ARNm de eGFP en el citoplasma por el canal verde y el núcleo de las CDs en azul.

A raíz de los datos obtenidos, que sugieren una aparente ineficacia de estas NPs para vehicular ARNm, nos propusimos evaluar otros nanocompuestos prometedores. Tal es el caso de las nanocapsulas (NCs) ricas en polímeros catiónicos, ya empleadas en la vehiculización de ARNm en las CDs^{178,180}.

6.2.2. Nanocápsulas (NCs) ricas en polímeros catiónicos

Con el propósito de explorar detalladamente las NCs recubiertas de polímeros catiónicos (*Poliarginina (PARG)*, *Protamina (PROT)*, *Octarginina (ENCP)*, *Benzethonium chloride (TB)*, *Benzethonium chloride concentrate (TBC)* y *Benzethonium chloride light (TBL)*) como nuevas aproximaciones en la entrega de ARNm en CDs, hemos determinado su efecto a diferentes concentraciones de ARNm de eGFP.

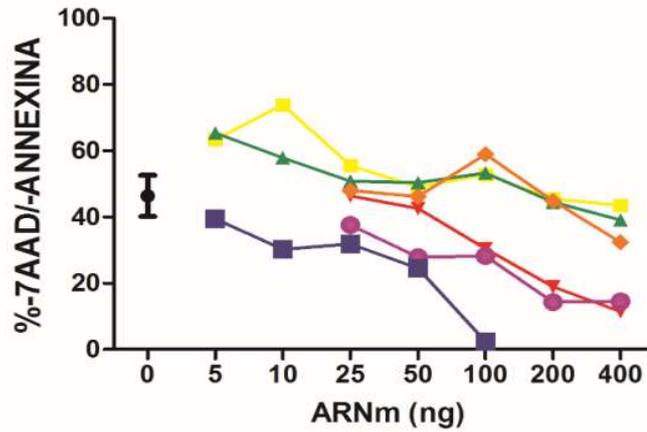
6.2.2.1. Ensayo de optimización de concentración de las NCs eGFP

Siguiendo el planteamiento experimental descrito anteriormente, evaluamos en primer lugar la viabilidad celular. Los porcentajes de viabilidad obtenidos se ven afectados severamente a concentraciones superiores a 50ng de ARNm/pocillo, tal y como se refleja en la Figura 35a. Sin embargo, a concentraciones bajas de ARNm/pocillo (inferior a 25ng), las NCs de PARG y PROT, presentaron porcentajes de viabilidad óptimos (60%), incluso superiores al obtenido en el control negativo (50%). Cabe señalar que el aumento de la concentración de ARNm en las distintas NCs influyó negativamente en la viabilidad de las CDs.

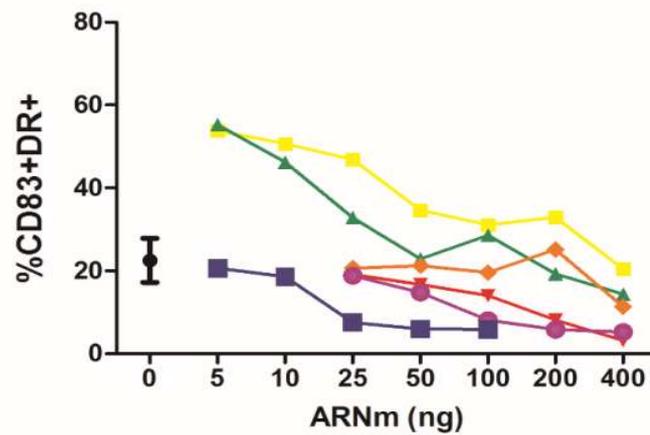
De forma similar, los marcadores de maduración aumentaron por la presencia de PARG y PROT. Más concretamente, al usar concentraciones de 10 y 25 ng de ARNm respectivamente (Figura 12b). Es destacable que a concentraciones altas de ARNm en ambas formulaciones y en el resto de NCs (ENCP, TB, TBL y TBC), observamos una disminución de estos marcadores de maduración (Figura 35b).

En este contexto, la expresión de eGFP dentro de la población madura CD83+DR+, fue muy escasa en términos generales. Concretamente, sólo observamos un 1% de expresión de eGFP en las CDsmo por PARG (Figura 35c).

a) Viabilidad



b) Maduración



c) Expresión de eGFP en CD83+HLADR+

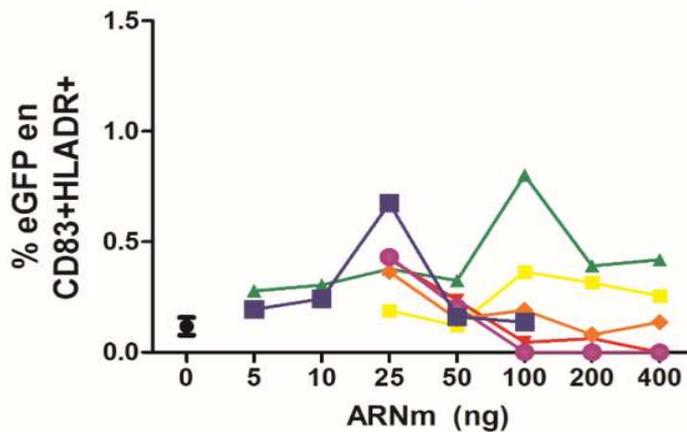


Figura 35. Gráficas de concentración respuesta para determinar la cantidad óptima de NCs eGFP.

Los gráficos representan los porcentajes de los marcadores de: a) Viabilidad (-7AAD-ANEXINA), b) Maduración (CD83+DR+) y c) Expresión de eGFP en la subpoblación CD83+DR+. Se pulsaron CDs con PARG, PROT, n=8 respectivamente, ENCP n=7 y TB, TBL, TBC n=2, durante 3h a diferentes concentraciones de ARNm (400, 200, 100, 50, 25, 10, y 5 ng /pocillo). Como control negativo (C-) se pulso de igual modo, pero en ausencia de NCs. Los datos representan la media y SEM de individuos VIH-1+ (n=8). Como control negativo (C-) se pulsaron de igual modo, pero en ausencia de NCs (negro); PARG, poliarginina(amarillo); PROT, protamina (verde); ENCP, octarginina (azul); TB, *Benzethonium chloride* (rojo); TBC, *Benzethonium chloride concentrate* (naranja); TBL, *Benzethonium chloride light* (morado).

A raíz de los resultados obtenidos, seleccionamos las NCs con mejor eficacia para activar a las CDs. En concreto , decidimos profundizar en las formulaciones de PARG y PROT a 20ng de ARNm coformulado, respectivamente. Además, como se refleja en el ensayo anterior (Figura 12c), las NCs generaron una escasa expresión de eGFP dentro de la subpoblación madura de CDs. Por esta razón, decidimos realizar el pulsado en presencia y en ausencia de un cóctel de maduración de CDs, con el fin de intentar mejorar la presentación antigénica.

6.2.2.2. Efectos de las NCs de PARG y PROT cargadas con un ARNm eGFP en la viabilidad, maduración y expresión de eGFP en CDs.

En este contexto, podemos observar que los porcentajes de viabilidad celular observados por citometría aumentan moderadamente en las NCs de PARG y PROT en presencia del cóctel, mientras que en ENCP la viabilidad disminuye considerablemente, incluso en presencia de cóctel de maduración. Curiosamente, en ausencia de cóctel los porcentajes de viabilidad disminuyen en todos los casos (Figura 36a).

Por su parte, el perfil fenotípico de maduración en presencia de cóctel mostró un patrón similar a los obtenidos en la viabilidad. Concretamente, PARG y PROT inducen la expresión de marcadores de maduración por parte de las CDs, alrededor de un 40%, al ser comparados con el control negativo (Figura 36b). Mientras que, en ausencia de

cóctel se observó el mismo patrón, pero con porcentajes sensiblemente inferiores, no superando el 25% en PARG y PROT.

La expresión de eGFP dentro de la subpoblación madura mostró una escasa expresión de eGFP (5%) en las CDs pulsadas por PARG y PROT en presencia de cóctel. Sin embargo, este resultado es ligeramente superior que en la condición sin cóctel (Figura 36c).

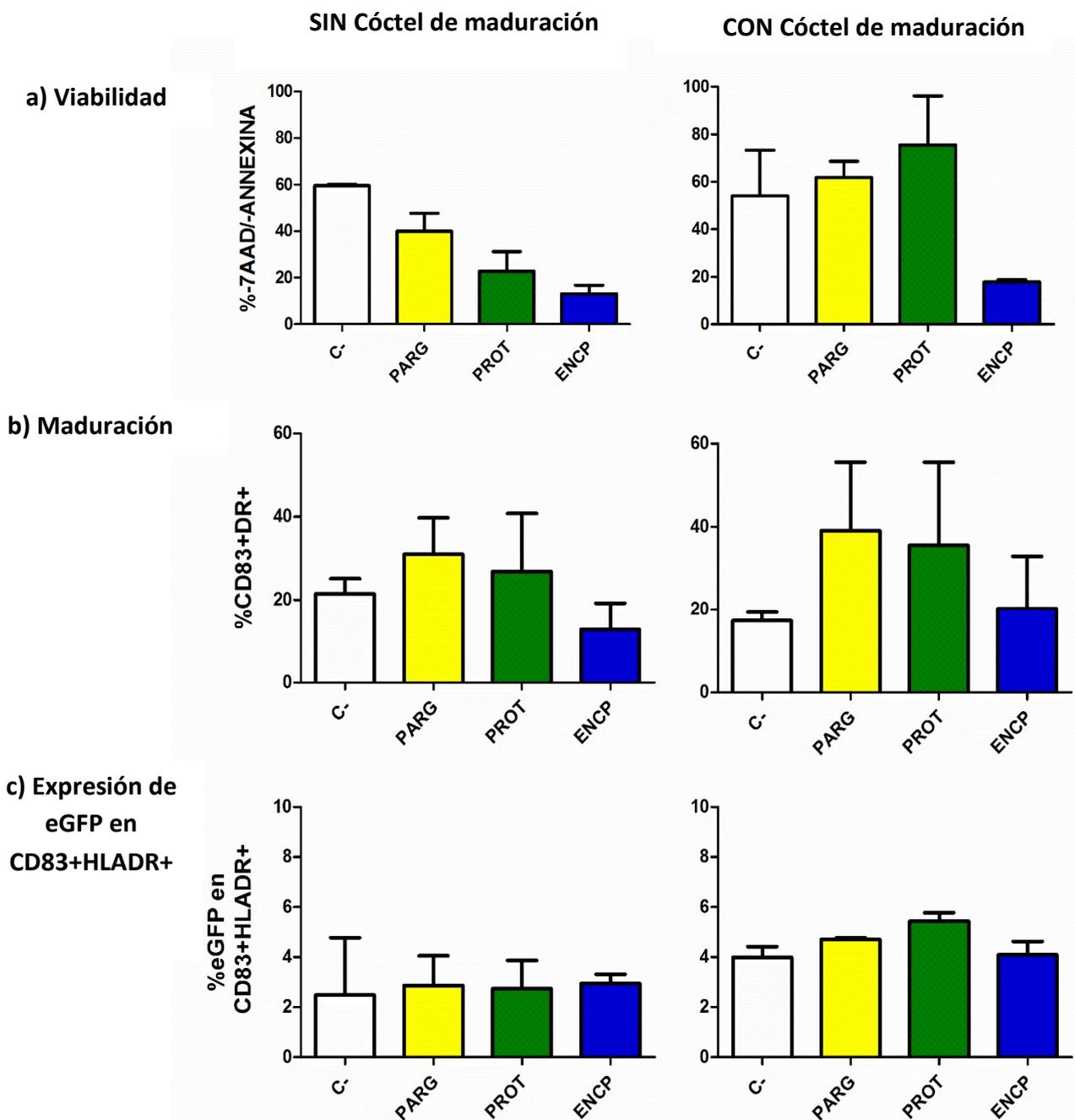


Figura 36. Caracterización fenotípica de las CDsmo con NCs eGFP. Los gráficos están divididos en dos columnas: (izquierda) sin cóctel de maduración y (derecha) con cóctel de maduración. (a-c) Análisis del perfil de: a) Viabilidad (-7AAD-ANNEXINA), b) Maduración (CD83+DR+) y c) Expresión de eGFP en la subpoblación CD83+DR+ por citometría de flujo. Los datos representan la media y SEM de individuos VIH+(n=2). PARG, poliarginina (amarillo); PROT, protamina (verde); ENCP, octarginina (azul).

Una vez demostrada que la mejor condición para activar a las CDs es en presencia de cóctel de maduración a 20 ng ARNm en la formulación, nos centramos en investigar en qué tiempo tiene lugar la máxima captura de los complejos NCs por parte de las CDs.

6.2.2.3. Cinética de expresión de eGFP en CDsmo con NCs cargadas con ARNm eGFP.

Los resultados de la cinética revelaron que las CDs pulsadas con NCs, en términos generales presentaron ratios bajos de expresión de proteína en cualquiera de los tiempos evaluados, con un máximo del 1% de CDs positivas para eGFP en la condición de PROT a las 48h (Figura 37).

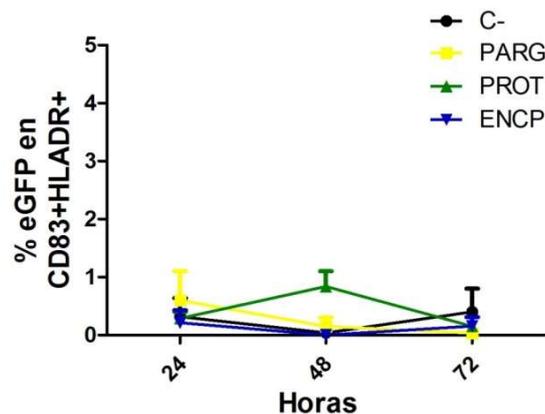


Figura 37. Cinéticas de expresión de NCs eGFP en CDs. Los símbolos representan el porcentaje de CDs positivas para eGFP, en PARG, PROT, a concentración de 25ng/pocillo y en ENCP a 10ng/pocillo, a tiempos de 6, 24, y 48h, en presencia de cóctel de maduración. Los datos representan la media y SEM de individuos VIH-1+ (n=3). *Two-way ANOVA* con verificación de Bonferroni (*p<0.05). PARG, poliarginina (amarillo); PROT, protamina (verde); ENCP, octarginina (azul).

A pesar de los resultados obtenidos hasta el momento, decidimos profundizar sobre los efectos de PARG y PROT en las CDs, a partir de las condiciones validadas en los experimentos anteriores. Concretamente, a concentración de 20ng en PARG y PROT, evaluadas 24 horas después de su pulsado y en presencia de cóctel de maduración.

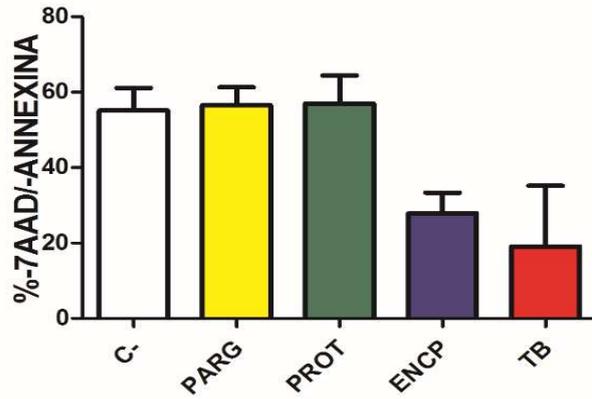
6.2.2.4. Efectos de las NCs de PARG, PROT, eGFP en la viabilidad, maduración y expresión de eGFP en CDs.

Los porcentajes de viabilidad, en presencia de NCs de PARG y PROT, no se vieron afectados de forma relevante respecto al control (Figura 38a) y se asemejan a los datos obtenidos en experimentos previos (Figura 35a).

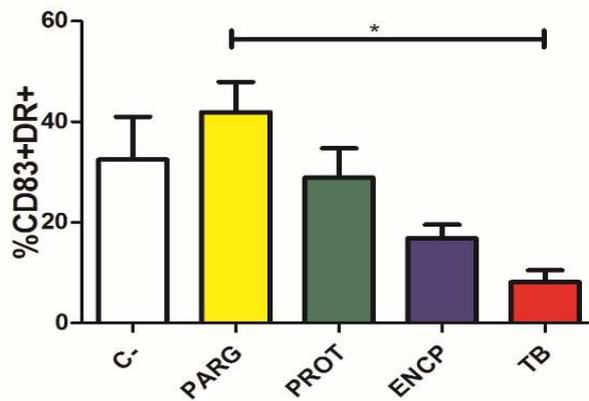
En lo relacionado con los marcadores de maduración (Figura 38b), los NCs de PARG y PROT aumentaron dichos marcadores. Incluso en PARG los porcentajes de CD83+DR+ son superiores y significativos (* $p < 0,05$) cuando son comparados con los datos obtenidos en NCs de TB.

Aunque las NCs de PARG y PROT no alteran la viabilidad e influyen positivamente en la maduración de las CDs, los datos de citometría revelan una pobre expresión de eGFP dentro de la subpoblación madura de CDs. Los niveles son similares a los mostrados en la Figura 38c, observándose unos valores inferiores al 5% de positividad en CDs.

a) Viabilidad



b) Maduración



c) Expresión de eGFP en CD83+HLADR+

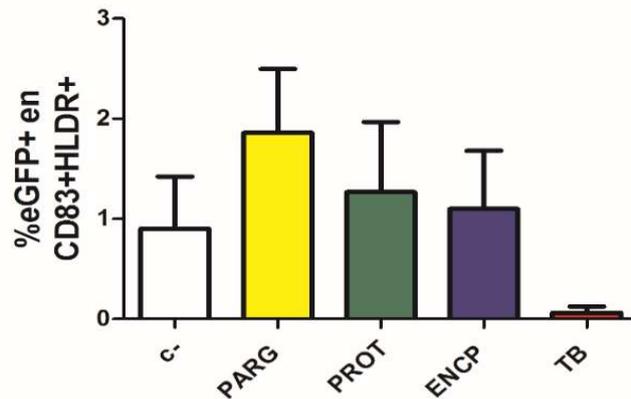
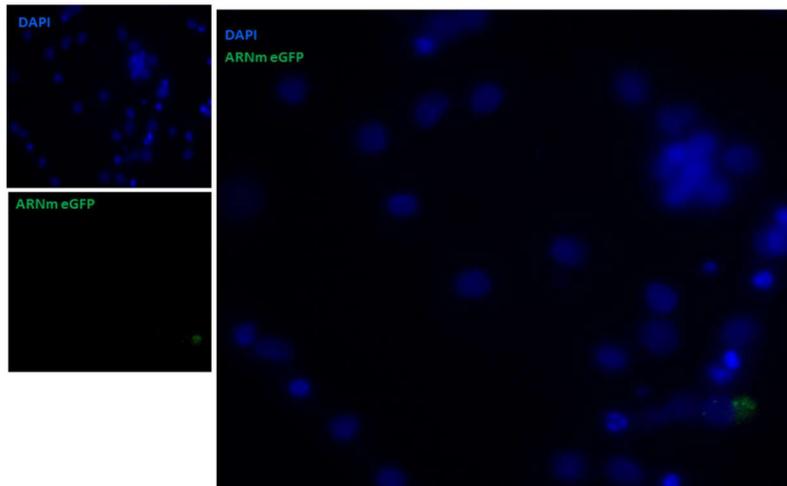


Figura 38. Resultados con los efectos de las NCs seleccionadas previamente (PARG, PROT, ENCP y TB) en la viabilidad celular, maduración de CDs y expresión de eGFP en CDs: Los gráficos están divididos en 3 columnas: a) porcentaje de viabilidad (7AAD-Anexina), b) Porcentaje de maduración (CD83+DR+) y c) porcentaje de expresión de eGFP en las CDs CD83+DR+. Se pulsaron PARG, PROT, ENCP a las concentraciones descritas en la figura anterior y TB a 200 ng de ARNm/pocillo durante 2h en presencia de cóctel de maduración. Como control negativo (C-) se pulsaron de igual modo, pero en ausencia de NCs. Los datos representan la media y SEM de individuos VIH-1+(n=5). Kruskal-Wallis con verificación de prueba de Dunn's, (*p<0,05). PARG, poliarginina (amarillo); PROT, protamina (verde); ENCP, octarginina (azul); TB, Benzethonium chloride (rojo).

Estos datos de citometría se reafirman con los visualizados por la microscopía de fluorescencia. Específicamente, sólo se observó una débil expresión de eGFP (verde) en la condición de PARG, mientras que en PROT no hemos detectado expresión de eGFP en el citoplasma (Figura 39b). Por lo tanto, ello indica que los mensajeros incluidos en las NCs no han sido procesados convenientemente por las CDs.

a) NCs de poliarginina y eGFP (PARG)



b) NCs de protamina y eGFP (PROT)

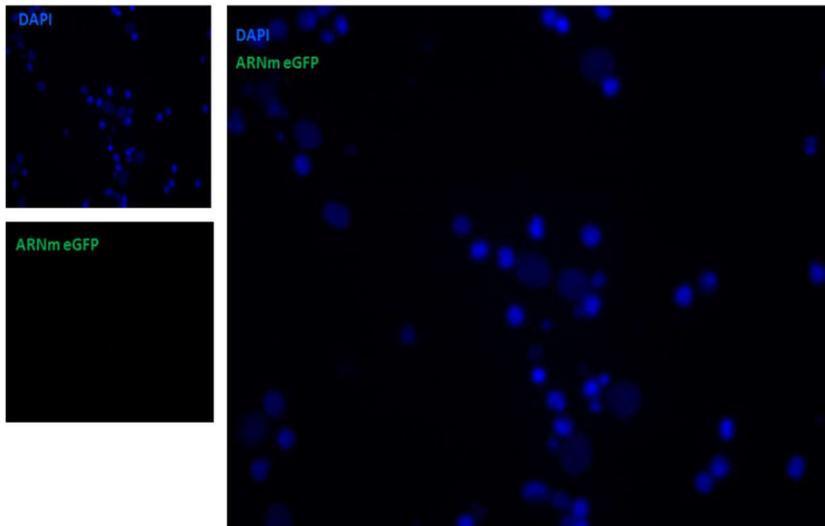


Figura 39. Captura y expresión de NCs eGFP en CDs. Imágenes de microscopía de fluorescencia con la expresión de eGFP en CDsmo por PARG y PROT a concentración de 10 μ g a las 24h del pulsado. Las fotos ilustran la expresión de ARNm de eGFP en el citoplasma por el canal verde y el núcleo de las CDs en azul.

Por consiguiente, los datos recogidos en la evaluación de las NCs sugieren que los mejores candidatos para activar a las CDs son PARG y PROT, más específicamente a concentración de 20ng de ARNm en su conjugado. Además, los resultados indican que la presencia de cóctel de maduración, durante el pulsado, influyó positivamente en la activación de las CDs y sus porcentajes de viabilidad resultan óptimos (60%). Por contrapartida, es notoria la débil expresión de antígeno obtenida, incluso en presencia de cóctel de maduración.

A la luz de estos datos, las NCs parecen ser poco eficientes en la captura y el posterior procesamiento del ARNm por parte de las CDs. Debido a la aparente ineficacia de este candidato vacunal, nos inclinamos por estudiar otro tipo de NPs, tales como las nanopartículas de ácido poliláctico (PLA), que están descritas en la bibliografía como nanovectores eficaces en la liberación de antígeno, que protegen el ARNm de las nucleasas y tienen excelentes perfiles de toxicidad^{22,172,173}. Además, hemos utilizado péptidos catiónicos (LAH4 y RALA) con las siguientes propiedades: facilitar la condensación de ARNm, ventajas para la captación celular, la superación de la membrana celular y actuación como intermediarios entre el ARNm y la PLA^{172,175}, con el fin de poder obtener una acción más selectiva sobre las CDs, una mejor internalización del inmunógeno y consecuentemente una respuesta inmune específica mayor.

6.2.3. Nanopartículas de ácido poliláctico (PLA)

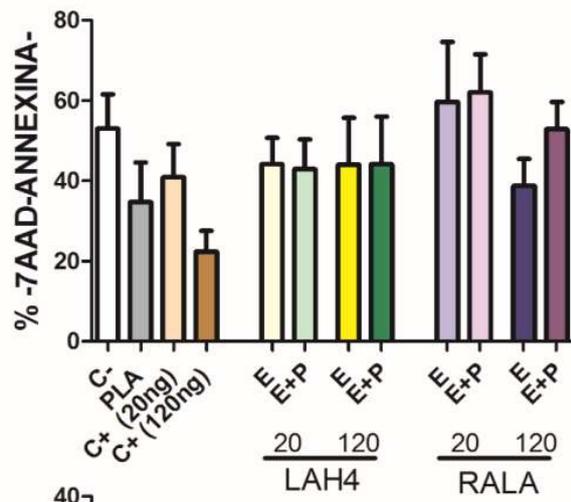
Con referencia al punto anterior, diseñamos ensayos con conjugados de péptido/ARNm/PLA siguiendo el mismo planteamiento experimental descrito en los apartados anteriores con las otras NPs, a fin de poder establecer la eficiencia de estos conjugados en las CDs. Por lo tanto, nos focalizamos en la optimización de la concentración de ARNm en el complejo y la captura de éstos por parte de las CDs.

6.2.3.1. Ensayo de optimización de concentración de ARNm en el complejo y captura de PLA en CDs.

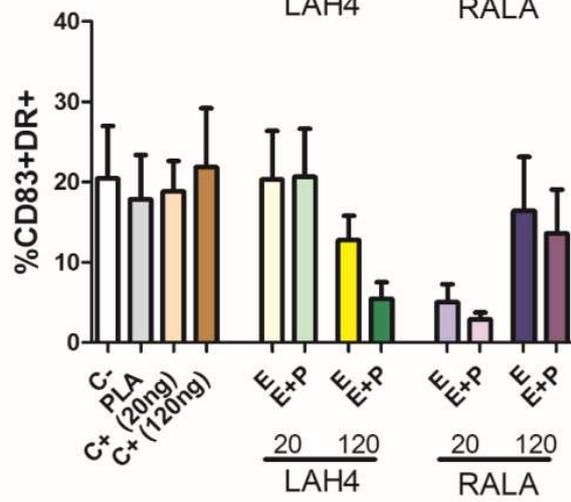
En este contexto, como se muestra en la Figura 40, las coformulaciones no tienen un impacto relevante en la viabilidad celular (Figura 40a). Sin embargo, los datos de maduración indican que los complejos de ARNm formados con péptido RALA no lograron estimular la maduración de las CDs, mientras que con el péptido LAH4, sí que se observa un ligero aumento de los marcadores CD83+ y DR+. En realidad, en los complejos de péptido+ARNm eGFP+PLA (E+P) con 20ng ARNm de eGFP se observaron valores cercanos al 20% de células CD83+ DR+, similares al control negativo en presencia de LAH4. En cambio, en RALA se observó una disminución de los citados marcadores (Figura 40b).

En consonancia con los datos obtenidos del perfil de maduración de las CDs, las PLA's con RALA no fueron capaces de promover la expresión de eGFP eficientemente en las CDs. Por otro lado, las formulaciones basadas en LAH4 y concretamente con 20ng de ARNm presente en el complejo, indujeron una expresión eficiente de eGFP por las CDs. De hecho, en el caso del poliplexos de LAH4/ARNm (E) o nanocomplejos de LAH4/ARNm/PLA (E+P), alrededor del 10% de las células expresaron eGFP, respectivamente, con una eficiencia cercana a la obtenida con el control positivo de TransIT (10% vs 17%) (Figura 40c). Además, la expresión de eGFP fue significativa (* $p < 0.05$) usando el nanocomplejo LAH4/ARNm/PLA, en comparación con el control negativo (Figura 40c). Estos resultados indican que la expresión de antígeno de estas NPs es potenciada por la presencia del péptido LAH4 en las formulaciones con PLA a concentración de 20ng de ARNm.

a) Viabilidad



b) Maduración



c) Expresión de eGFP en CD83+HLADR+

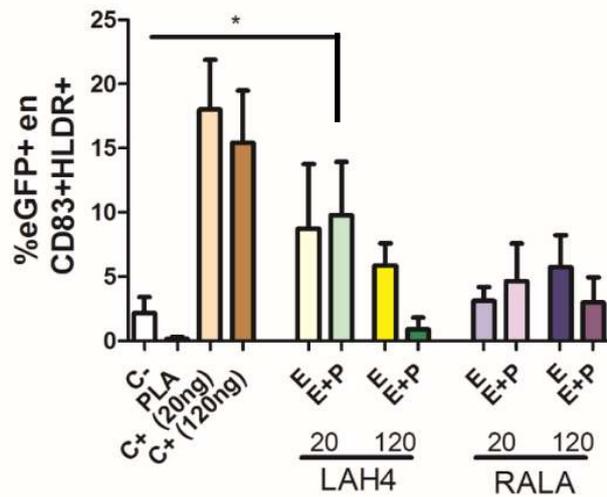
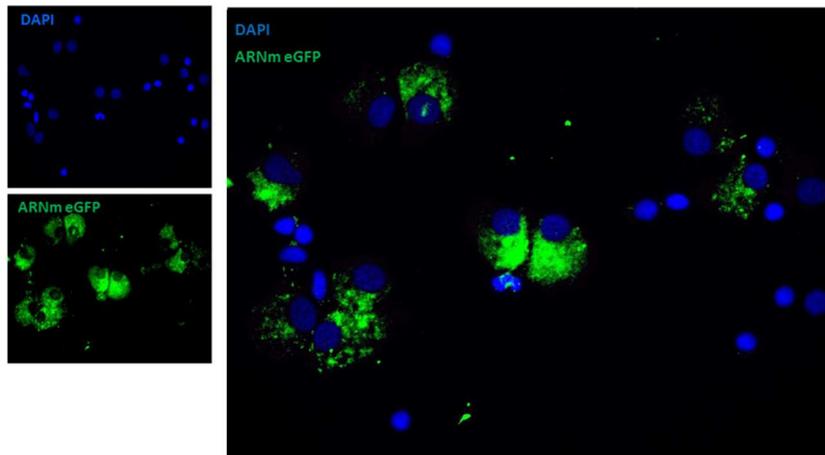


Figura 40. Gráficas de concentración respuesta para determinar la cantidad óptima de ARNm a utilizar en PLA. Los gráficos representan los porcentajes de los marcadores de: a) Viabilidad (-7AAD-ANNEXINA), b) Maduración (CD83+DR+) y c) Expresión del eGFP en la subpoblación CD83+DR+ de CDs pulsadas durante 3h a concentraciones de 20 y 120 ng de ARN/pocillo. Los datos representan la media y SEM de individuos VIH-1+(n=9), Test de Wilcoxon (*p<0.05). C-, CDs no pulsadas con PLA; C+, ARNm eGFP en solución de Trans IT; PLA, PLA sin coformular; E, poliplexo de ARNm eGFP con péptido de LAH4 o RALA; E+P, complejo del poliplexo anterior formulado con PLA.

En la línea de nuestros experimentos anteriores, para reforzar los datos obtenidos por citometría y visualizar la captación de los nanocomplejos de péptidos/ARNm/PLA por parte de las CDs se utilizó la microscopía de fluorescencia. Como se muestra en la ilustración de la Figura 41, los nanocomplejos de LAH4 fueron eficientemente capturados por las CDs, tal y como se puede apreciar por el canal verde con la expresión de eGFP localizada en el citoplasma alrededor de los núcleos (Figura 41a). Por el contrario, en presencia de RALA se aprecia una expresión débil de eGFP en el citoplasma (Figura 41b).

a) LAH4 + ARNm de eGFP + PLA



b) RALA + ARNm de eGFP + PLA

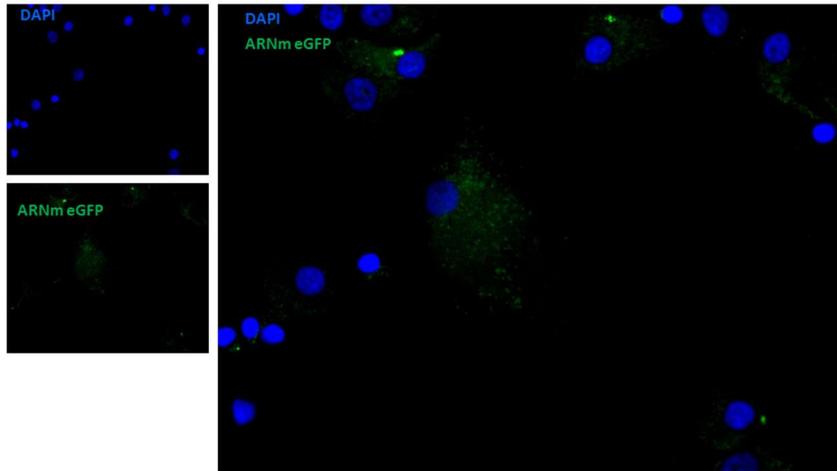


Figura 41. Captura y expresión de nanocomplejos de LAH4 o RALA/ARNm eGFP/PLA en CD4. Imágenes de microscopía de fluorescencia con la expresión de eGFP en CD4smo por PLA-NP coformuladas con ARNm de eGFP recubiertas con a) LAH4 y b) RALA a concentración de 20ng ARNm/pocillo tras 24h del pulsado. Las fotos ilustran la expresión de ARNm de eGFP en el citoplasma por el canal verde y el núcleo de las CD4 en azul.

En conjunto, estos resultados confirman que estos nanocomplejos de péptido/ARNm/PLA son capturados por las CD4. Específicamente, a la luz de estos resultados, el mejor candidato ha resultado ser el complejo de LAH4/ARNm a 20ng/PLA. Por ello, nos centramos en evaluar posteriormente estas formulaciones con ARNm que codifican para la proteína Gag de la cepa de HxB2 (Gag-HxB2) del VIH-1.

6.2.3.2. Efectos de las PLAs cargadas con Gag de la cepa HxB2 en la viabilidad, maduración y expresión de Gag en CD4.

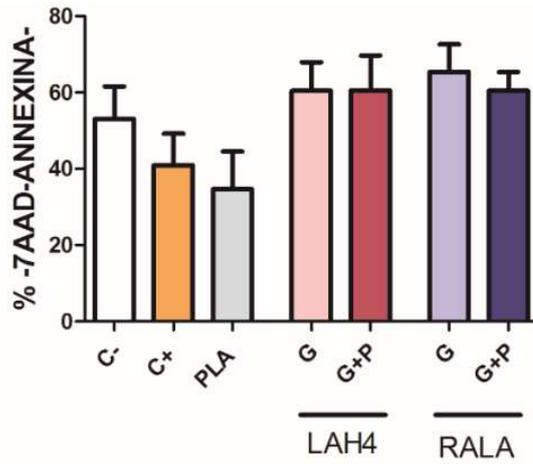
Como se ha demostrado en experimentos anteriores, los complejos con PLA han sido capturados eficientemente por las CD4. Con el objetivo de realizar una investigación más detallada sobre los nanocomplejos de PLA cargados con ARNm de Gag, nos centramos en evaluar la toxicidad y la capacidad de activación de estos en las CD4.

En primer lugar, analizamos la viabilidad de las CDs tras el pulsado a las 24h. Como puede observarse en la Figura 42a, los complejos de PLA no afectaron a la misma, mostrando valores de células viables superiores al 60%.

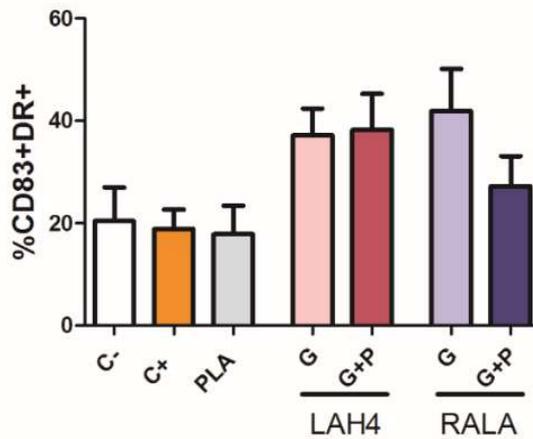
Posteriormente se evaluaron los perfiles de maduración de CDs (Figura 42b), donde se observó que las formulaciones de LAH4/Gag-ARNm y LAH4/Gag-ARNm/PLA incrementaron los marcadores de maduración de las CDs. De hecho, los datos observados con ARNm de Gag son sensiblemente superiores a los determinados con los mismos complejos cargados con ARNm de eGFP (40% vs 20%, respectivamente) (Figura 40).

En cuanto a la expresión de Gag (Figura 42c), los datos obtenidos dentro de la subpoblación madura de CDs mostraron alrededor de un 5% de expresión de proteína de Gag en todos los complejos utilizados.

a) Viabilidad



b) Maduración



c) Expresión de (Gag-HxB2) en CD83+HLADR+

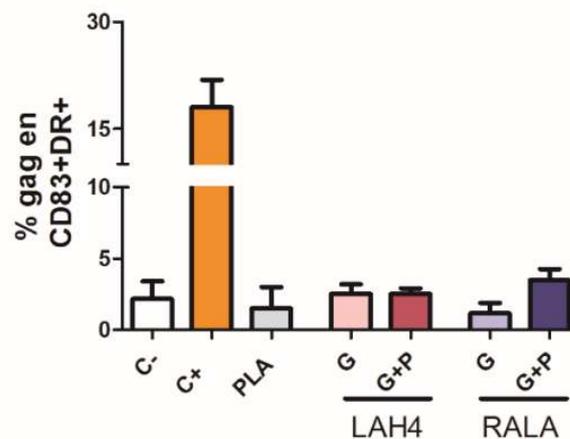


Figura 42. Caracterización fenotípica de las CDsmo con PLAs coformuladas con Gag. (a-c) Análisis del perfil de: a) Viabilidad (-7AAD-ANNEXINA), b) Maduración (CD83+DR+) y c) Expresión de Gag en la subpoblación CD83+DR+ por citometría de flujo. Los datos representan la media y SEM de individuos VIH+(n=5). Test de Wilcoxon (*p<0.05). C-, CDs no pulsadas con PLA; C+, ARNm eGFP en solución de Trans IT; PLA, PLA sin coformular; G, poliplexo de Gag con péptido de LAH4 o RALA; G+P, complejo del poliplexo anterior formulado con PLA.

6.2.3.3. Efecto de las CDsmo con LAH4 o RALA/Gag/PLA en la proliferación de linfocitos

I.

A continuación, para estudiar la funcionalidad de las CDsmo con LAH4/RALA con G+P realizamos un experimento para analizar la proliferación de los linfocitos T mediante tinción de CFSE como el descrito anteriormente en el apartado de los replicones (Figura 30). Los resultados determinaron que estos complejos no inducen proliferación de linfocitos T en ninguno de los linajes celulares T CD4+ y T CD8+ (Figura 43).

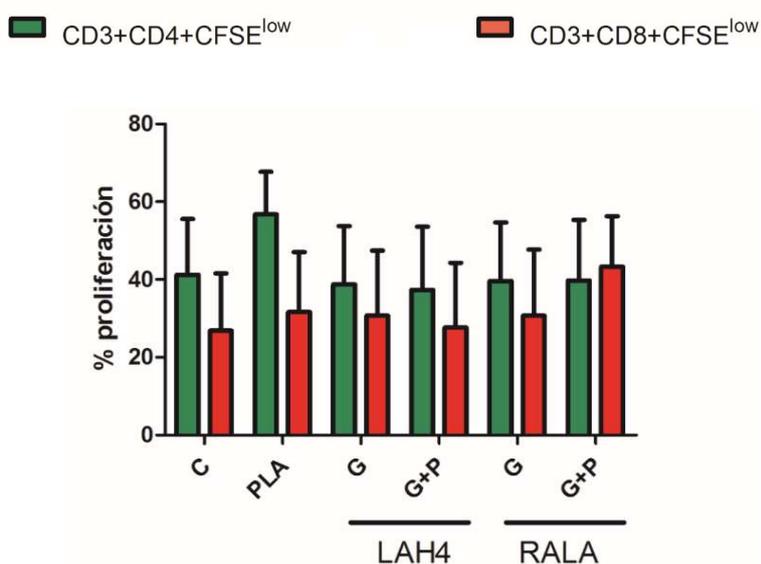


Figura 43. Proliferación de células T CD4+ y T CD8+ en cocultivo con CDsmo por complejos de PLA cargados con Gag. Proliferación de linfocitos T mediante tinción de CFSE. Los datos representan la media y SEM de individuos VIH+(n=3). *Two-way ANOVA* con verificación de Bonferroni (*p< 0.05). C-, CDs no pulsadas con PLA; PLA, PLA sin coformular; G, poliplexo de Gag con péptido de LAH4 o RALA; G+P, complejo del poliplexo anterior formulado con PLA.

Como está descrito en estudios anteriores, dado que la maduración de las CDs está asociada con la secreción de citocinas y quimiocinas que inducen y dirigen respuestas inmunitarias^{172,173,231}, nos decidimos a seguir explorando este fenómeno. Se procedió a

caracterizar la secreción de estos mediadores por parte de las CDs expuestas a estos complejos cargados con Gag por el ensayo de Luminex después de 6 días de co-cultivo.

6.2.3.4. Perfil de secreción de citocinas generado por las CDsmo con LAH4 o RALA/Gag/PLA en cocultivo con linfocitos T.

Los datos de la Figura 44 indican que la presencia de ARNm de Gag vehiculado con PLA en formulaciones basadas en LAH4, hicieron aumentar la secreción de citocinas y quimiocinas pro-Th1, lo que sugiere un impacto directo del ARNm en la respuesta inflamatoria. Más precisamente, las formulaciones de LAH4 (G+P) indujeron la secreción de: citocinas y quimiocinas proinflamatorias tales como IL-8 y MCP-1; citocinas Th1: IFN- γ e IL2 (*p<0,05), quimiocinas relacionadas con Th1 (RANTES e IP10) e influyeron en la secreción de citocinas de tipo Th2 como la IL-13. Sin embargo, no hubo un aumento significativo en la cantidad de IL-4 (no se muestra) y sólo hubo una débil secreción de IL-5, dos factores bien conocidos de la respuesta de Th2. En comparación, los nanocomplejos RALA (G+P) dieron unos resultado similares e incluso superiores, pero con un perfil asociado a daño celular con una inducción más elevada de la citocina antiinflamatoria IL1-RA (**p<0,01) y, además, con incrementos significativos (*p<0,05) en la secreción de IL-8, MCP-1 y MIP-1 α/β .

En general, las formulaciones basadas en PLA son eficientemente capturadas y activan a las CDs. Concretamente, los complejos con LAH4 influyen positivamente en la viabilidad, maduración y presentación antigénica. Adicionalmente, los datos funcionales obtenidos con los complejos con LAH4 sugieren que son activadores potenciales de respuestas proinflamatorias e inmunológicas de tipo Th1. Por contrapartida, los complejos de RALA muestran menor eficacia que la observada con LAH4. Además, su perfil de citocinas está relacionado con patrones de factores solubles antiinflamatorios, datos que sugieren la ineficacia de este tipo de complejo para inducir una respuesta Th1 adecuada.

A partir de los resultados obtenidos en el anterior apartado 6.2.3.2. y tras los estudios previamente publicados, donde se comprueba que las NPs con lípidos ayudan

a: la estabilización de la NPs , aumentar su vida útil, evitar la interacción con las proteínas séricas y al escape endosomal^{172,173,232-234}; decidimos utilizar PLA's con corona lipídica en su formulación (LP-PLA) y también liposomas (LS). De este modo, estableceríamos si estos vectores vacunales permitirían que el ARNm se tradujera eficientemente a proteína antigénica. Además, se propuso por parte de nuestros colaboradores el uso del péptido LAH4-L1 como intermediario entre el ARNm y la LP-PLA o LS, porque está descrito que en estas formulaciones mejoran la expresión de ARNm^{172,173,175,235}.

Ensayo de luminex

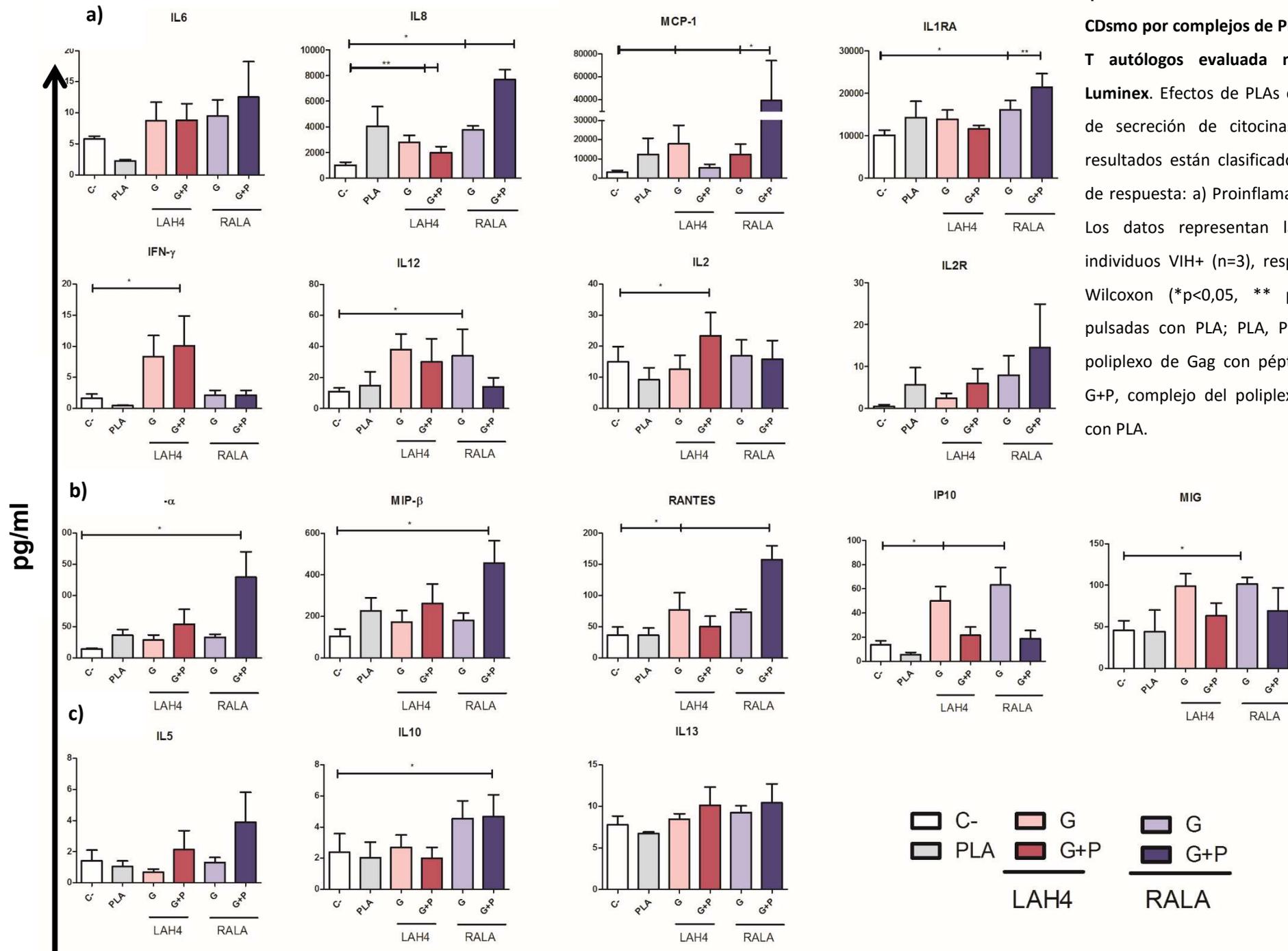


Figura 44. Producción de citocinas y quimiocinas en sobrenadantes del cocultivo de CDsmo por complejos de PLA con Gag y linfocitos T autólogos evaluada mediante ensayo de Luminex. Efectos de PLAs con Gag en los niveles de secreción de citocinas y quimiocinas. Los resultados están clasificados en función del tipo de respuesta: a) Proinflamatoria, b) Th1 y c) Th2. Los datos representan la media y SEM de individuos VIH+ (n=3), respectivamente. Test de Wilcoxon (*p<0,05, ** p<0,01), C-, CDs no pulsadas con PLA; PLA, PLA sin coformular; G, poliplexo de Gag con péptido de LAH4 o RALA; G+P, complejo del poliplexo anterior formulado con PLA.

6.2.4. Nanopartículas de ácido poliláctico con corona lipídica (LP-PLA)

6.2.4.1. Ensayo de optimización de concentración de ARNm en el complejo de LP-PLA y LS en CDs.

En este contexto y en la línea del esquema experimental descrito en esta tesis, hemos analizado el efecto de las diferentes concentraciones de ARNm en las formulaciones con LP-PLA y LS. Como se puede observar en la Figura 45a, a concentraciones altas (≥ 500 ng) de ARNm se ven afectados severamente los porcentajes de viabilidad celular en ambas combinaciones de NPs. Sin embargo, a concentración de 250ng de ARNm se muestran los porcentajes de viabilidad óptimos, siendo superiores al 50% en ambas combinaciones de NPs (Figura 45a).

De forma similar, los marcadores de maduración CD83+DR+ se incrementaron con concentraciones de 250ng en ambos compuestos de NPs. Curiosamente, los complejos de LP-PLA revelaron porcentajes de células CD83+DR+ superiores al 20% mientras que las CDs con LS no superaron el 12% (Figura 45b).

En este sentido, nuestros resultados relativos a la expresión de eGFP, dentro de esta subpoblación madura de CDs, mostraron una expresión destacada y significativa (* $p < 0.05$) tanto del poliplexo de LAH4-L1/ARNm (E) como de los complejos de LAH4-L1/ARNm/LP (E+LP) a 250ng de ARNm, al ser comparados con su control negativo. Por el contrario, en las formulaciones con LS se observó una baja expresión de eGFP en el complejo de LAH4-L1 (E+LS) usando la misma cantidad de ARNm.

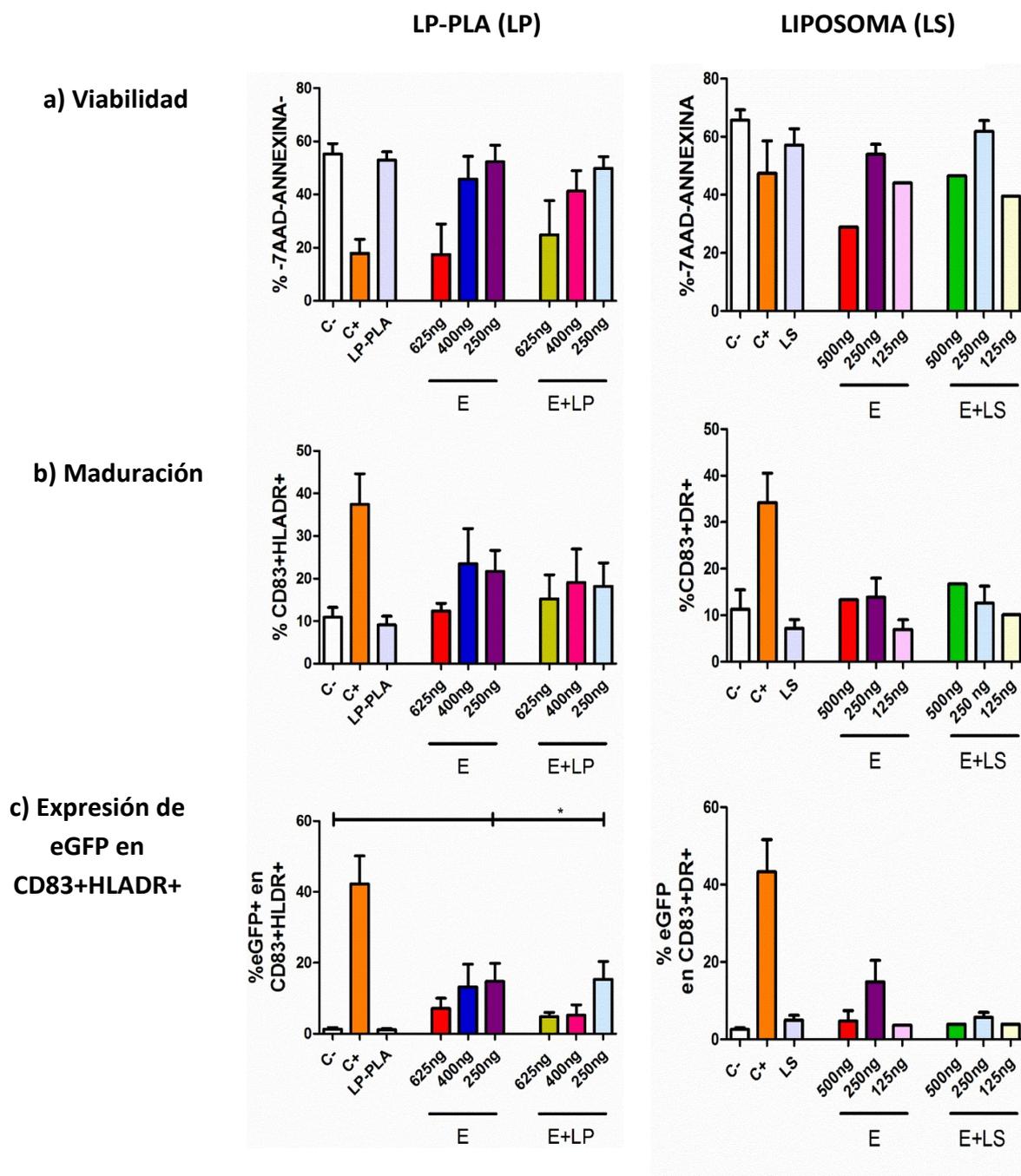


Figura 45. Gráficas de concentración respuesta para determinar la cantidad óptima de ARNm en LP-PLA y LS. Los gráficos representan los porcentajes de los marcadores de: a) Viabilidad (-7AAD-ANNEXINA), b) Maduración (CD83+DR+) y c) Expresión del eGFP en la subpoblación CD83+DR+ de CDs pulsadas a diferentes concentraciones (250, 400 y 500) ng ARNm/pocillo. Los datos representan la media y SEM en los complejos de LP y LS (n=11 y n=5 de pacientes VIH+, respectivamente). Kruskal Wallis (*p<0.05). C-, CDs no pulsadas con PLA; C+, CDs pulsadas con ARNm eGFP en solución de Trans IT; LP-PLA, LP-PLA sin coformular; LS, LS sin coformular; E, poliplexo de ARNm eGFP con péptido de LAH4-L1; E+LP O E+LS, complejo del poliplexo anterior formulado con LP-PLA o LS, respectivamente.

Para demostrar que las NPs fueron efectivamente capturadas y validar la expresión de eGFP en las CDs, utilizamos la microscopía de fluorescencia nuevamente. Como se ilustra en la Figura 46, la mayor expresión de eGFP se mostró en la condición con CDsmo por LP-PLA, tal y como se intuía por los resultados obtenidos previamente por la citometría de flujo (Figura 45c).

a) LAH4-L1 + ARNm de eGFP + LP-PLA

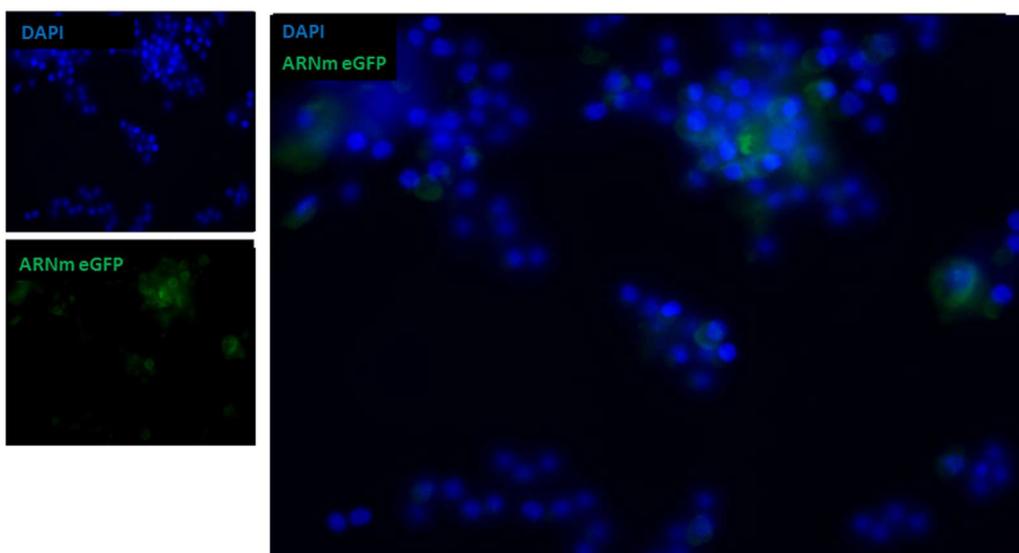


Figura 46. Captura y expresión de LAH4-L1/ARNm eGFP/LP-PLA en CDs. Imágenes de microscopía de fluorescencia de la expresión de eGFP en CDsmo por LP-PLA coformuladas con ARNm de eGFP recubiertas con LAH4-L1 a las 24h del pulsado a concentración de 250ng ARNm eGFP/pocillo. Las fotos ilustran la expresión de ARNm de eGFP en el citoplasma por el canal verde y el núcleo de las CDs en azul.

En general, estos resultados confirman la eficacia de estos nanocomplejos de LAH4-L1/ARNm/LP-PLA o LS para ser capturados por las CDs. Además, muestran que la concentración de ARNm más adecuada para las formulaciones de LP-PLA o LS es de 250ng.

A raíz de estos resultados, nos propusimos evaluar estos nanocomplejos cargados con ARNm de Gag. En concreto, comparando ARNm de Gag *wild type* (G) versus el mismo Gag con modificaciones por la incorporación del nucleósido de *pseudouridine* y

5-Methyl-Cytidine en CAP-1, codificando ambos la proteína Gag de la cepa *consensus B* del VIH-1, y que están descritas en la literatura como inmunógenos prometedores en vacunas basadas en CDs²³⁶.

6.2.4.2. Efectos de las LP-PLA y LS cargadas con Gag (G) o Gag modificado (GM) de la cepa Consensus B del VIH-1 en la viabilidad, maduración y expresión de Gag en las CDs.

Como era de esperar respecto a los resultados anteriores, estas NPs cargadas con ARNm de Gag no tuvieron un efecto negativo en la viabilidad de las CDs (Figura 47a). De hecho, se aprecian valores incluso superiores a los obtenidos en la condición de control negativo. Por este motivo, al demostrar que los conjugados de NPs no son tóxicos para las CDs, nos propusimos analizar el efecto sobre los marcadores de maduración con dichos compuestos.

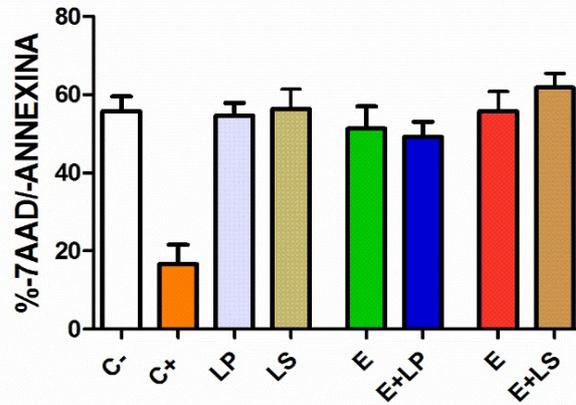
El análisis por citometría mostró que la presencia de inmunógeno en las formulaciones provoca el aumento de los porcentajes de células maduras CD83+DR+. Sorprendentemente, la expresión de Gag se incrementó de manera notable en las formulaciones que contenían Gag modificado (GM), independientemente de las NPs conjugada (LP o LS). Más concretamente, en el caso de las formulaciones de GM+LS fue donde se observaron los porcentajes más elevados de CD83+DR+ (40%). De hecho, este valor se parece bastante al obtenido por el control positivo de Trans-IT (42%) (Figura 47b).

Como hemos demostrado en la Figura 47b los nanocomplejos de Gag maduran las CDs. Por este motivo, nos preguntamos si esta maduración está directamente relacionada con la expresión de Gag en las CDs.

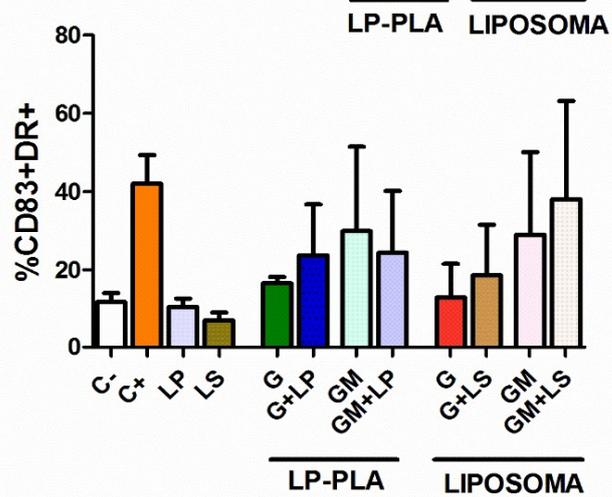
Los datos de citometría mostraron un incremento moderado de la expresión de Gag en las CDs cuando han estado pulsadas con LP o LS. Más concretamente, en presencia del complejo de LS conjugado con GM, la expresión de Gag fue

significativamente (* $p < 0.05$) superior en comparación con el resto de las formulaciones con LS. Sin embargo, en LP-PLA se obtuvieron resultados comparables, pero menos llamativos. En este caso concreto, se determinó solamente significación estadística (* $p < 0.05$) en el complejo de G+LP (Figura 47c).

a) Viabilidad



b) Maduración



c) Expresión de Gag ConsB en CD83+HLADR+

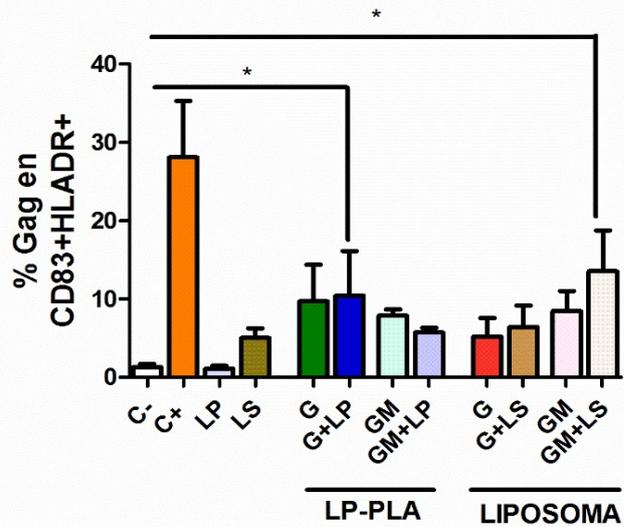
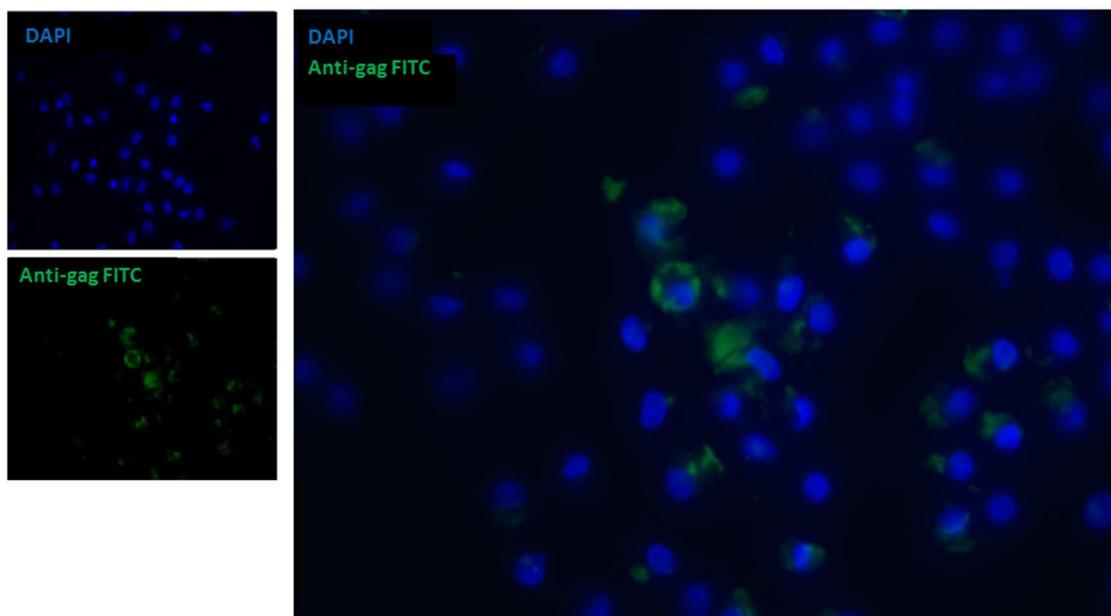


Figura 47. Caracterización fenotípica de las CDsmo con LP-PLA y LS coformuladas con Gag *consensus B* modificado (GM) y no modificado (G). (a-c) Análisis del perfil de: a) Viabilidad (-7AAD-ANNEXINA), b) Maduración (CD83+DR+) y c) Expresión de Gag en la subpoblación CD83+DR+ por citometría de flujo en CDs pulsadas durante 2 horas con 250ng de ARNm/pocillo. Prueba de Wilcoxon (*p<0.05). Los datos representan la media y SEM de n=3 individuos VIH-1+. C-, CDs no pulsadas con PLA; C+, CDs pulsadas con ARNm eGFP en solución de Trans IT; LP-PLA, LP-PLA sin coformular; LS, LS sin coformular; E, poliplexo de ARNm eGFP con péptido de LAH4-L1; E+LP O E+LS, complejo del poliplexo anterior formulado con LP-PLA o LS, respectivamente; G, poliplexo de ARNm Gag con LAH4-L1; GM, poliplexo de ARNm Gag modificado con LAH4-L1; G/GM+LP/LS, complejos del poliplexo anterior formulado con LP-PLA o LS.

Como ya hemos mostrado las LP-PLA y LS son eficientemente capturadas por las CDs (Figura 47) y a fin de constatar los datos obtenidos por citometría, hemos utilizado el microscopio de fluorescencia para evaluar la expresión de Gag modificado, una vez las CDs han sido pulsadas con estos complejos. Como se puede apreciar en la Figura 48, la expresión de Gag se localiza en el citoplasma en ambos complejos de NPs. En consecuencia, estas imágenes reafirman los datos obtenidos previamente por citometría e indican que las NPs han sido eficientemente capturadas por las CDs, promoviendo la expresión de Gag.

a) LAH4-L1 + ARNm de Gag modificado + LP-PLA



b) LAH4-L1 + ARNm de Gag modificado + LS

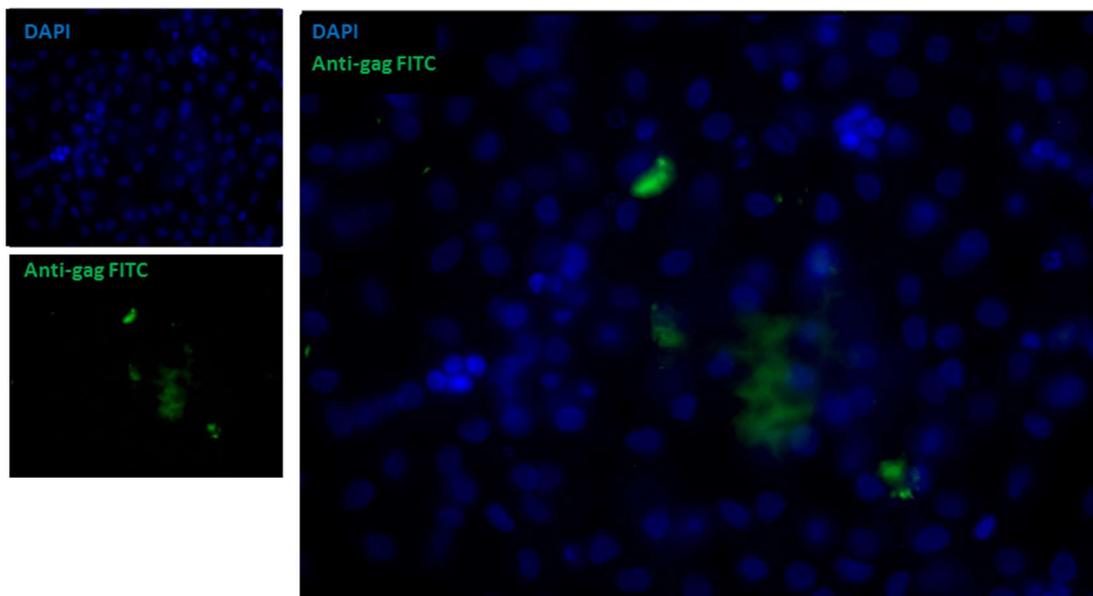


Figura 48. Captura y expresión de LAH4-L1/ARNm Gag modificado (GM) / LP-PLA y LS en CD4⁺. Imágenes de microscopía de fluorescencia de la expresión de Gag detectada en CD4⁺ por a) LP-PLA y b) LS coformuladas con ARNm de Gag modificado recubiertas con LAH4-L1 tras 24h del pulsado. Las CD4⁺ fueron teñidas en superficie con DAPI (azul) y permeabilizadas y marcadas con anticuerpo anti-KC57-FITC (Verde).

Con el propósito de seguir explorando cuál es el efecto funcional de estas CD4⁺ con NPs lipídicas cargadas con dos tipos de ARNm de Gag, diseñamos un experimento para evaluar la capacidad de estimular la proliferación de las células T, como el descrito en la Figura 43.

6.2.4.3. Efecto de las CD4⁺ con LAH4/G o GM/LP-PLA o LS en la proliferación de linfocitos T.

Los datos de proliferación indican una pobre inducción de la proliferación de células T (Figura 49). Este resultado es similar al mostrado previamente en el ensayo con PLAs cargadas con ARNm de Gag (Figura 43).

A continuación, se caracterizó el perfil de secreción de citocinas y quimiocinas como se ha descrito en experimentos previos.

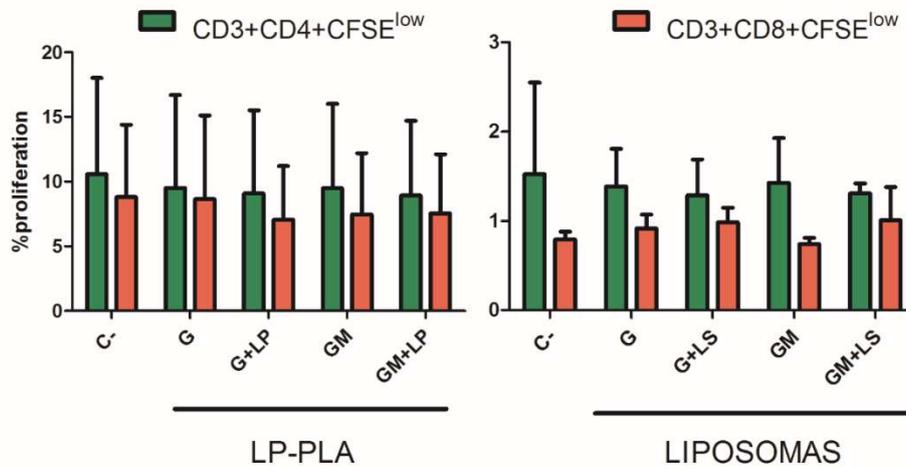


Figura 49. Proliferación de células T CD4+ y T CD8+ en cocultivo con CDsmo por complejos de LP-PLA y LS con Gag (G) y Gag modificado (GM). Proliferación de linfocitos T mediante tinción de CFSE. Los datos representan la media y SEM de n=2 individuos VIH-1+. C-, CDs no pulsadas con PLA; LP-PLA, LP-PLA sin coformular; LS, LS sin coformular; G, poliplexo de ARNm Gag consensus con LAH4-L1; GM, poliplexo de ARNm Gag consensus modificado con LAH4-L1; G/GM+LP/LS, complejos del poliplexo anterior formulado con LP-PLA o LS.

6.2.4.4. Perfil de secreción de citocinas generado por las CDsmo con LAH4/G o GM/LP-PLA o LS en co-cultivo con linfocitos T autólogos.

Como se aprecia en la Figura 50, la presencia de ARNm de GM en las formulaciones basadas en LP-PLA incrementa moderadamente la secreción de citocinas y quimiocinas. Más precirepliconente, las formulaciones de GM+LP indujeron la secreción de citocinas (IL-6, IFN- α , TNF- α) y quimiocinas (IL-8 y MCP-1) proinflamatorias. También citocinas relacionadas con un perfil de tipo Th1 (IFN- γ , IL-12), y quimiocinas (MIP1- α , MIP1- β y MIG). Sin embargo, no hubo un aumento destacable de factores solubles relacionados con respuesta de tipo Th2. En comparación, los nanocomplejos LAH4-L1/ARNm/LS dieron un resultado similar a su control negativo.

pg/ml

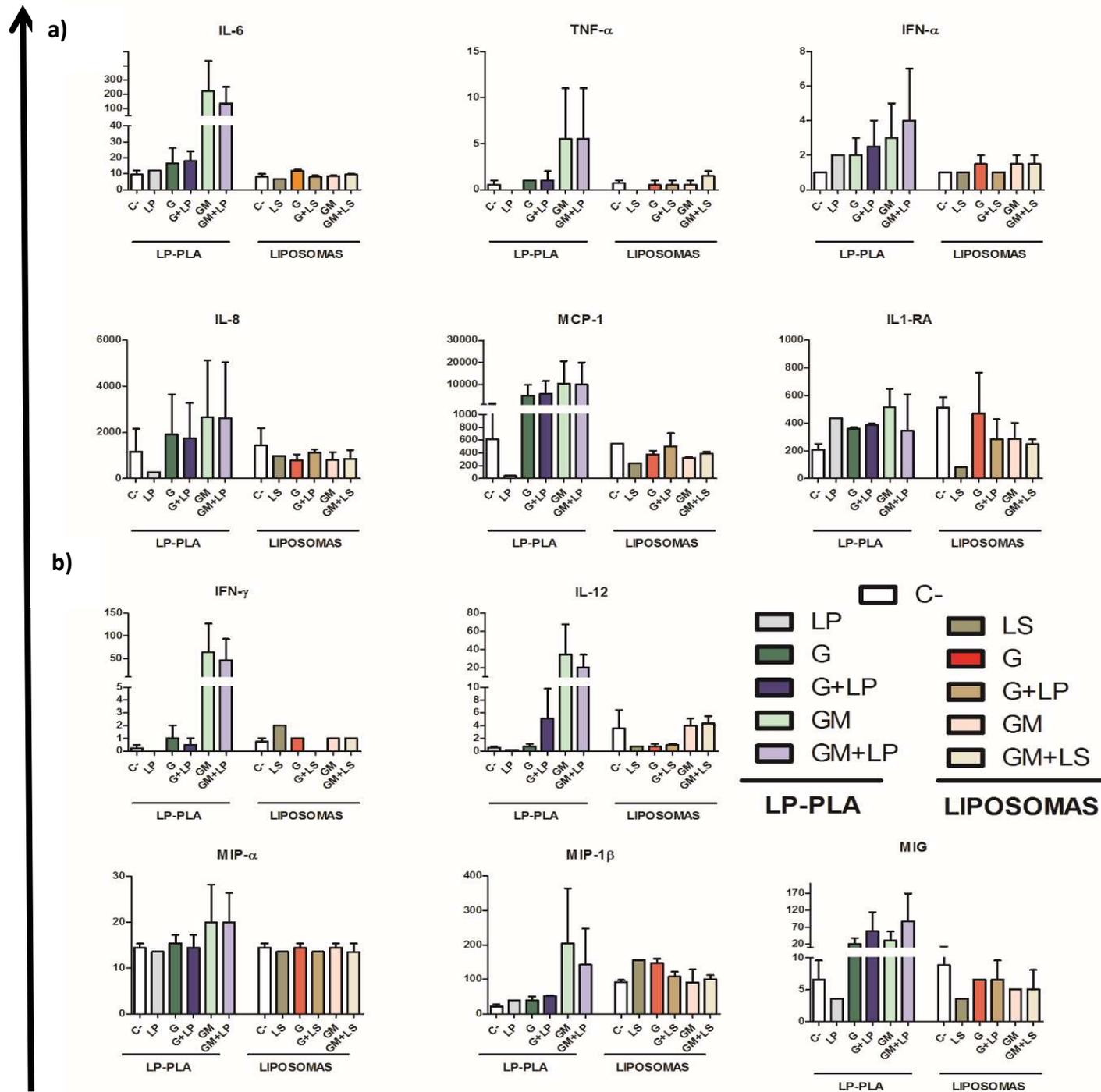


Figura 50. Producción de citocinas y quimiocinas en el cocultivo CDsmo por complejos de LP-PLA y LS con Gag o Gag modificado y linfocitos T autólogos mediante ensayo de Luminex. Efectos de LP-PLA y LS con Gag en los niveles de secreción de citocinas y quimiocinas. Los resultados están clasificados en función del tipo de respuesta: a) proinflamatoria y b) Th1. Los datos representan la media y SEM de n=2 individuos VIH-1+ respectivamente. C-, CDs no pulsadas con PLA; LP-PLA, LP-PLA sin coformular; LS, LS sin coformular; G, poliplexo de ARNm Gag consenso con LAH4-L1; GM, poliplexo de ARNm Gag consenso modificado con LAH4-L1; G/GM+LP/LS, complejos del poliplexo anterior formulado con LP-PLA o LS.

En general, estos resultados sugieren que las formulaciones de LP y LS cargadas con ARNm de Gag o GM promueven la maduración de las CDs en nuestro modelo experimental. Además, parece que la maduración de las CDs por parte de estos conjugados está asociada a un incremento de la secreción de citocinas y quimiocinas. Cabe señalar que las formulaciones de LP con GM parecen ser activadores de respuestas proinflamatorias e inmunológicas orientadas hacia una respuesta de tipo Th1.

De todos los datos recogidos en el apartado de resultados de esta tesis y con el propósito de cumplir los objetivos establecidos en la misma, se han preseleccionado los mejores candidatos en función de los siguientes criterios: internalización en las CDs, la activación de dichas células y su capacidad para inducir respuesta inmunológica específica frente al VIH-1 (Tabla 9).

6.3. RESUMEN DE LOS MEJORES CANDIDATOS VACUNALES SELECCIONADOS ENTRE REPLICONES Y NPs EN BASE A LOS PARÁMETROS DE VIABILIDAD, MADURACIÓN, EXPRESIÓN DE INSERTO EN CDS, PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T Y PRODUCCIÓN DE CITOCINAS.

Candidato	Cantidad de ARN/ADN	%Viabilidad (-7AAD/Anexina)	%Maduración (CD83+HLADR+)	% Expresión de ARNm en CD83+HLADR+ (eGFP/gag/gp140)			Proliferacion de linfocitos T		Patrón de citocinas		
				eGFP	Gag	gp140	CD4+	CD8+	Pro inf	Th1	Th2
RREP	10µg	55	35	20	N.A	8	SI	SI	SI	SI	SI
DREP	4 µg	70	40	15	N.A	14	SI	SI	NO	SI	NO
Au-NP (estrella)	5 µg	40	30	3	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
PARG	25ng	60	40	4	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
PROT	25ng	70	38	5	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
LAH4/PLA	20ng	60	40	10	5	N.A	NO	NO	SI	SI	SI
LAH4-L1/LP-PLA	250ng	50	30	15	10	N.A	NO	SI	SI	SI	NO
LAH4-L1/LS	250ng	60	40	8	15	N.A	NO	NO	NO	SI	NO

Tabla 9. Tabla descriptiva con los porcentajes de viabilidad, maduración, expresión de inserto, de proliferación y patrón de citocinas generados por los candidatos previamente seleccionados en base a estos parámetros. N.A, no analizado; DREP, *alphavirus DNA-launched replicon*; RREP, *Semliki Forest virus replicon RNA* ; Au NPs Nanopartículas de oro; PARG, Nanocápsulas ricas en polímeros catiónicos de Poliarginina; PROT, Nanocápsulas ricas en polímeros catiónicos de Protamina; LAH4/PLA, Nanopartículas de ácido poliláctico unido a péptido catiónico LAH4; LP-PLA, Nanopartículas de ácido poliláctico con corona lipídica unido al péptido catiónico LAH4-L1; LS, Liposomas unido al péptido catiónico LAH4-L1;

En este contexto, se han seleccionado dos candidatos representativos para validar la efectividad de los inmunógenos de ARNm vectorizados en las CDs que estimulen una respuesta específica frente al VIH-1. Más concretamente, a partir de los hallazgos previamente expuestos nos decidimos a analizar con más detalle el replicón DREP gp140 y la NP LP-PLA Gag, con el objetivo de probar si la respuesta específica contra el VIH-1 está claramente inducida por la secuencia incluida en estos candidatos vacunales. Por esta razón, realizamos una prueba de ELISPOT utilizando *pools* o grupos de péptidos solapantes de Gag *consensus* B, que están incluidos en la secuencia codificante del Gag ARNm utilizado en nuestros complejos, y grupos de péptidos solapantes de Env *Clade C* del VIH-1 donde se incluye la secuencia del ARNm gp140.

6.3.1. La presencia de los inmunógenos de gp140 vehiculizados por DREP gp140 y G y GM por LP-PLA, son cruciales para incrementar la producción específica de IFN- γ .

Como se puede observar en la Figura 51, a día 1 las CDs con DREP gp140 influyen en la producción de IFN- γ tras la estimulación con los *pools* de Env (Figura 51a). Curiosamente a día 6 del cocultivo y en presencia de los *pools* de péptidos de VIH-1 indicados, no se detectaron células productoras de IFN- γ (Figura 51b). Cabe destacar que con la adición de CDs transfectadas *ex novo* con el mismo replicón codificando para gp140, la producción de IFN- γ se vio incrementada significativamente (* $p < 0.05$) frente a la restimulación con los *pools* de Env, en comparación con la condición basal (CDs sin modificar) (Figura 51c).

Ensayo ELISPOT

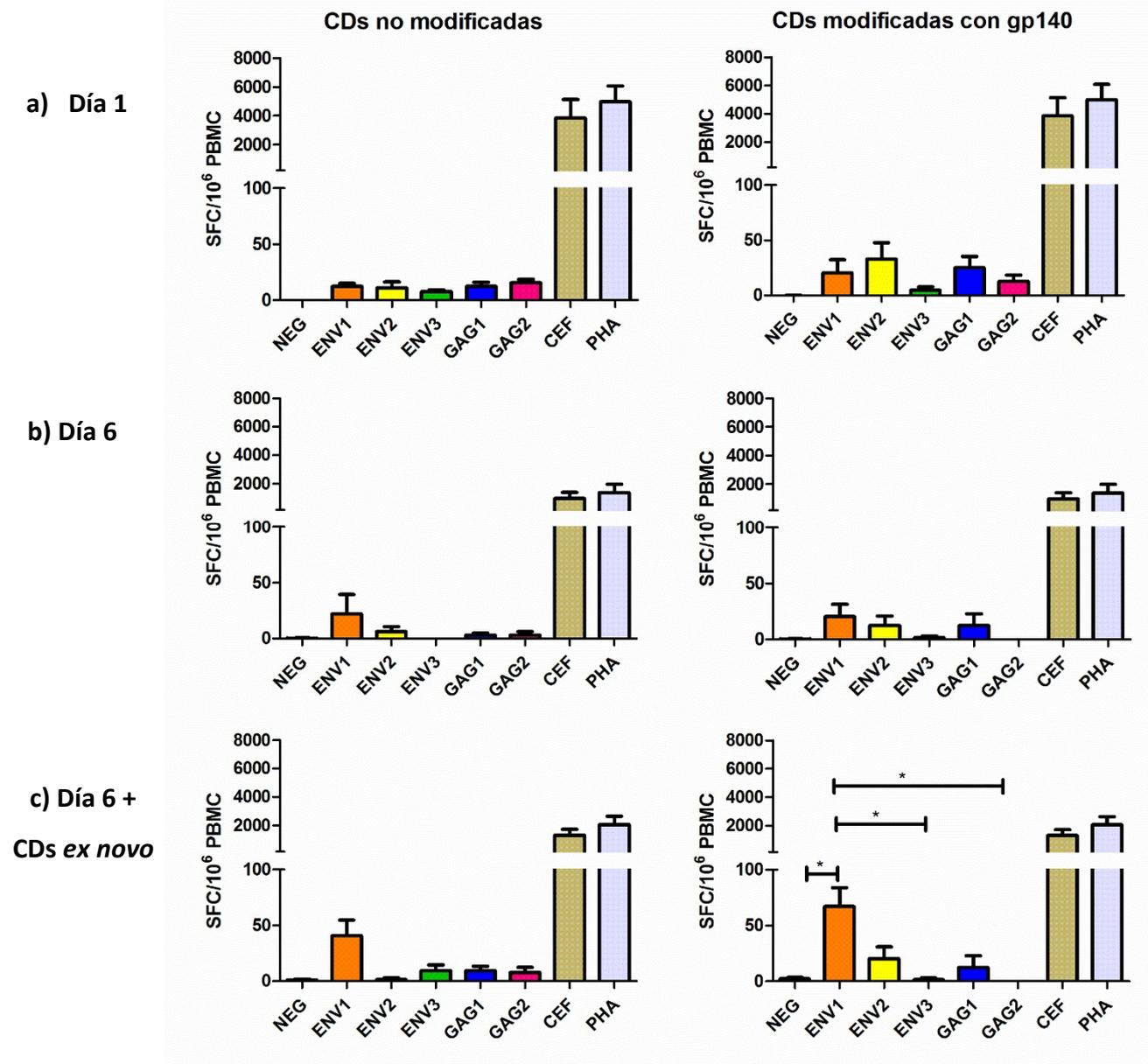


Figura 51: Producción IFN- γ en células T en cocultivo de CDsmo con DREP gp140. Los gráficos están divididos en dos columnas: Izquierda: CDs sin transfectar y Derecha: CDsmo con DREP gp140. Cada barra representa el promedio y el SEM de las respuestas de las células T expresadas por SFC/ 10^6 PBMC a diferentes tiempos: a) Día 1, b) Día 6 y c) Día 6 con CDs pulsadas *ex-novo* 24h antes, y después de la estimulación *overnight* con los *pools* de péptidos de ENV y GAG (n=4).

Por otra parte, la Figura 52 muestra la producción de IFN- γ inducida por la presencia de CDsmo por G+LP. En este caso, se generaron respuestas importantes tras el estímulo con los *pools* de péptidos de Gag en comparación con sus respectivas condiciones basales (CDs sin modificar) (42% vs 30%, $p > 0.05$)

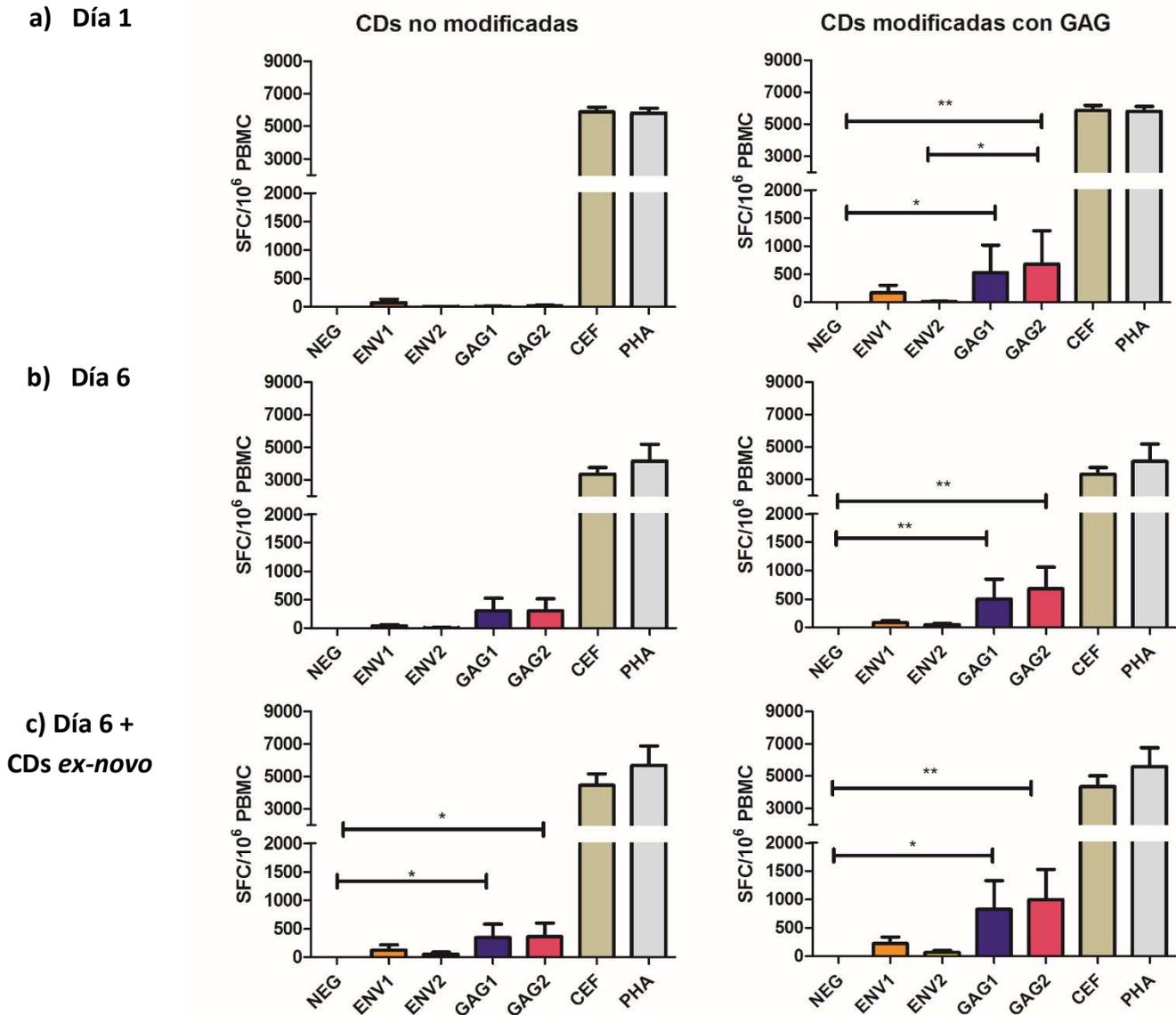


Figura 52: Producción IFN- γ en células T en cocultivo de CDsmo con LP-PLA de Gag. Los gráficos están divididos en dos columnas: Izquierda: CDs sin transfectar y Derecha: CDs transfectadas con LP-PLA de Gag. Cada barra representa el promedio y el SEM de las respuestas de las células T expresadas por SFC/ 10^6 a diferentes tiempos: a) Día 1, b) Día 6 y c) Día 6 con CDs pulsadas *ex-novo*, después de la estimulación *overnight* con los *pools* de péptidos de ENV y GAG ($n=4$).

Para ampliar aún más nuestro estudio sobre las respuestas inmunitarias inducidas por estos candidatos vacunales, nos propusimos evaluar más detalladamente mediante ELISPOT, los ARNm de G y GM conjugados con LP-PLA, por sus perfiles potencialmente inmunogénicos descritos previamente en nuestros resultados.

Como se puede observar en la Figura 53, las CDsmo con complejos de LP-PLA con G o GM indujeron respuestas moderadas frente a *pools* de péptidos de la proteína Gag del VIH-1. Concretamente, la inducción de la producción de IFN- γ frente a *pools* de Gag se observó a día 6 en presencia de CDsmo con GM+LP en comparación con los otros grupos (basal y G+LP) (Figura 53b). Asimismo, tal y como muestra la Figura 53c, observamos respuestas más potentes y significativas (** $p < 0.01$) frente a los *pools* de Gag a los 6 días del co-cultivo y en la condición donde se añadieron de CDs pulsadas *ex novo* con GM+LP.

El conjunto de estos datos demuestran que los candidatos seleccionados vehiculizan y promueven la presentación y expresión, por un lado, de gp140 (DREP) y, por otro, de Gag (LP-PLA) en las CDs, hecho que conlleva la inducción de respuestas inmunitarias específicas frente al VIH-1.

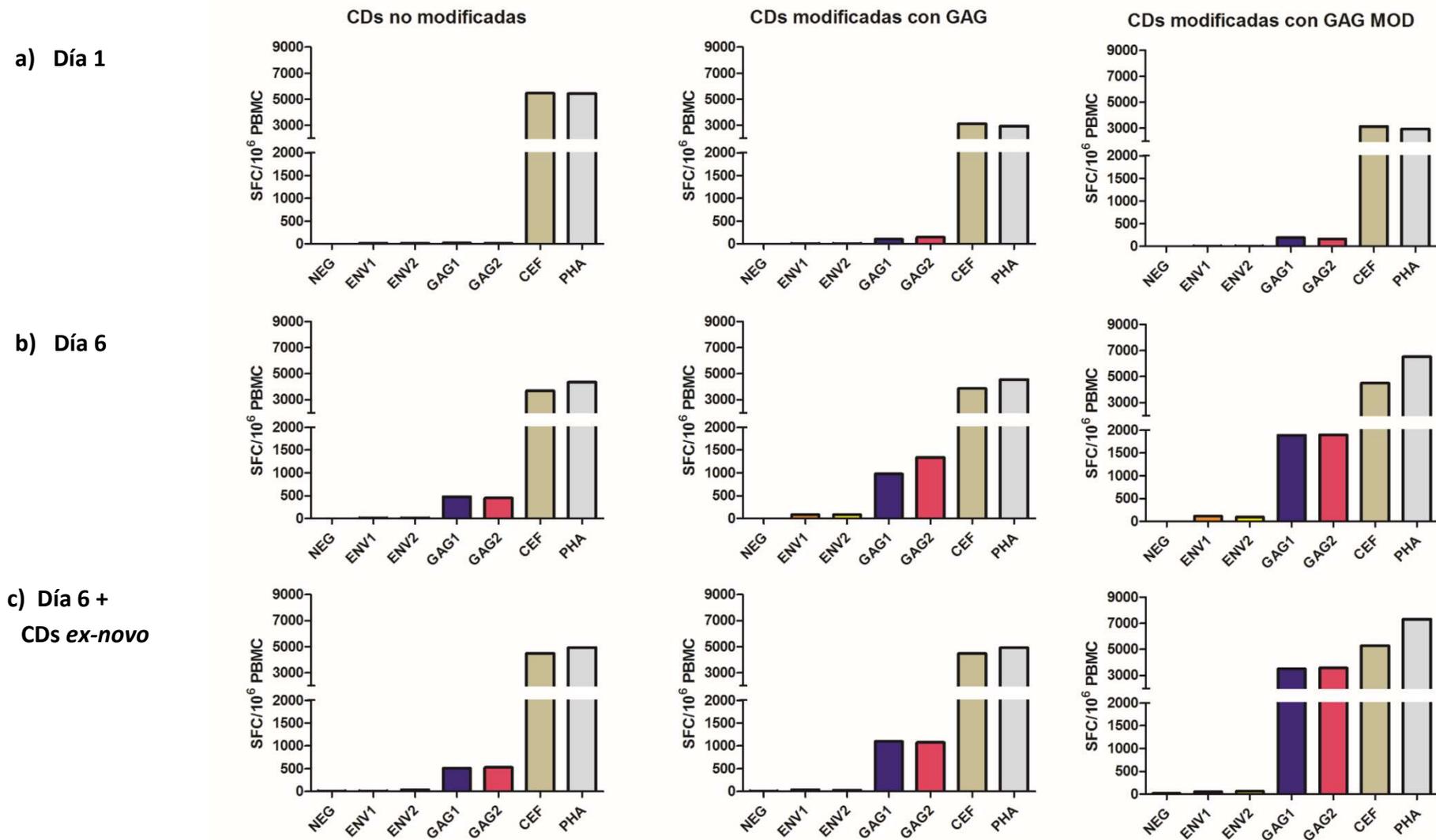


Figura 53: Ejemplo representativo de células T productoras de IFN- γ tras el cocultivo de CDsmo con LP-PLA de Gag (G) o Gag modificado (GM). Los gráficos están divididos en tres columnas: Izquierda: CDs sin transfectar, Centro: CDs transfectadas con LP-PLA de G y Derecha: CDsmo con LP-PLA de GM; Cada barra representa el valor de las respuestas de las células T por SFC/10⁶ PBMC a diferentes tiempos: a) Día 1, b) Día 6 y c) Día 6 tras añadir CDs pulsadas *ex-novo*, después de la estimulación *overnight* con los *pools* de péptidos de ENV y GAG (n=1).

7. DISCUSIÓN

A lo largo de este trabajo hemos observado como los replicones y los diferentes ARNm con NPs, son internalizados eficientemente en las CDs y son capaces de activarlas e inducir una respuesta inmunológica específica frente al VIH.

Los datos referidos a la comparación y selección del mejor candidato de replicón que codifica para la proteína gp140 de la envuelta del VIH (en un contexto de vacuna preventiva), han mostrado su capacidad de activación de las CDs y de mejora de la respuesta inmune específica frente al VIH-1. Ello podría deberse, entre otras causas, a la capacidad autoreplicativa de estos ácidos nucleicos que les permite aumentar su expresión en el tiempo alargando su presencia en el entorno de las CDs^{168,185}. Esto contribuye a generar una respuesta inmune tanto a nivel humoral como celular¹⁸⁷.

Aunque los replicones de alfavirus tienen un potencial uso en vacunas²³⁷⁻²³⁹ pueden resultar tóxicos para las CDs, lo que puede limitar su uso en dichas células²⁴⁰. Por consiguiente, el uso de replicones menos tóxicos como los derivados del *Semliki Forest Virus* (SFV), ofrecen la ventaja de incrementar la producción de antígeno en las CDs sin destruirlas²⁴¹. Esto se debe a que los replicones derivados del genoma del SFV no generan inmunidad frente al vector¹⁸³, mostrando así una ventaja importante como candidatos en vacunas basadas en ARNm en CDs.

Algunos estudios han demostrado que las vacunas basadas en ARNm son muy sensibles a la degradación por endonucleasas y en algunos casos han mostrado sus limitaciones, sobre todo cuando se administran los ácidos nucleicos desnudos¹⁶⁶. Por este motivo, se emplearon sistemas como la electroporación y la lipofección para la administración de replicones, y los resultados de éstos se compararon con un pDNA de referencia para comprobar su eficacia de manera comparativa.

De los resultados obtenidos en esta tesis se puede afirmar que ambas metodologías de administración de ARNm son válidas para la entrega de estos

replicones. Las condiciones de electroporación empleadas para RREP fueron diferentes debido a su gran tamaño (10-12kb); es decir, se utilizaron valores altos de capacitancia para formar poros más grandes y con un tiempo de exposición más largo, lo que mejoró la expresión del antígeno. Por lo tanto, la cantidad de replicón influye en el buen funcionamiento de las CDs, ya que los replicones son detectados por múltiples PRRs que inducirán la secreción de interferones de tipo I, lo que potencialmente perjudicaría la traducción del ARNm, aumentando su degradación. Todo ello provoca una sobreactivación tóxica que puede influir negativamente en los marcadores de viabilidad y maduración en las CDs²⁴².

Existen pocos estudios sobre el uso de lípidos catiónicos, como la lipofectamina, para la entrega de replicones. Ello se debe a que la mayoría de los estudios previos se han centrado en la electroporación de estos replicones^{168,185}. Además, la entrega de ARNm por complejos con lípidos catiónicos, se asocia a la vía endocítica y hay que tener presente que los replicones sólo pueden ser efectivos si son debidamente entregados en el citosol¹⁸⁵. De aquí que el método de administración tenga importancia en el tráfico intracelular en las CDs. Este método de lipofección potencia la translación de este ARNm autoreplicativo y promueve correctamente la respuesta inmune^{197,243}. Los resultados obtenidos en esta tesis han demostrado que DREP lipofectado es internalizado por vía endocítica (Figura 27) y promueve una mayor eficacia en la transfección, facilitando la traducción del replicón en la CDs *in vitro* (Figura 28).

Una vez estandarizados los sistemas de administración, procedimos a evaluar los replicones que codifican para gp140 con la finalidad de determinar el efecto que generan en las CDs y la inducción de la respuesta inmunitaria asociada. El perfil de maduración de las CDs aumentó después de la administración de RREP/DREP gp140 y, dentro de la subpoblación madura de CDs, se observó una mayor expresión de gp140 en DREP que en RREP (Figura 28). La razón por la que se encontró mayor expresión en DREP pudo deberse a la propia técnica empleada (la lipofección). Este método permitiría, por un lado, la correcta compactación de DREP protegiéndolo y

entregándolo correctamente en las CDs, y por otro, la descompactación eficaz dentro de las CDs que facilitaría la traducción de DREP gp140²⁴⁴. Esto podría conllevar que probablemente DREP gp140 genere una mayor señalización interna que activa más las CDs permitiendo que el replicón se pueda amplificar más y, en consecuencia, genere mayor cantidad de antígeno que el RREP^{183,185}.

Una vez observada la eficacia de la transfección y la activación de las CDs por parte los replicones de gp140, se investigó la capacidad de estas células modificadas por RREP o DREP gp140 para inducir respuestas inmunitarias específicas como la proliferación de los linfocitos T y la secreción de citocinas tras cocultivos con linfocitos T autólogos.

De los resultados obtenidos se observó una ligera proliferación de los linfocitos tras 6 días de cocultivo con las CDs modificadas con gp140 (Figura 30). Estos datos sugieren que la electroporación y la lipofección de RREP y DREPgp140, respectivamente, son sistemas de administración apropiados para la traducción del replicón en las CDs, conduciendo a la expresión de gp140 en su superficie y pudiendo activar la proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+²⁴³.

Con referencia a la producción de citocinas y quimiocinas en estos cocultivos, observamos secreción de ambas por parte de los linfocitos T al ser estimulados con las CDs modificadas por estos replicones (Figura 31). En nuestro caso, estas CD modificadas con RREP inducen una gran producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas pro-Th1, junto a un incremento de la secreción de IL4 e IL10. Esta sobreproducción tendría su explicación en que la electroporación, en algunos casos, puede inducir la permeabilización irreversible de la membrana celular. Esto conduce a la pérdida de la homeostasis y en su conjunto, conlleva a esta sobreproducción de citocinas y quimiocinas inflamatorias²⁴⁵. Por otra parte, las CDs con DREP gp140 generaron una menor producción de citocinas y quimiocinas al compararlo con RREP. Aun así en 12 citocinas se determinó cierta variación entre las condiciones evaluadas (DREPgp140 vs control negativo), y se observaron diferencias significativas en la

secreción de la IL6 (relacionada con la maduración de las CD^s²⁴⁶) y la secreción por parte de los linfocitos T de la quimiocina Th1 MIP1- β , involucrada en la acción quimioatrayente (reclutando a CD^s, monocitos, células NK y neutrófilos²⁴⁷ además de células T CD4+ y CD8+ memoria activadas en el lugar de la infección²⁴⁸). En términos generales, las CDsmo por DREP inducen un perfil de linfocitos Th1 en lugar de Th2, ya que se detecta la IL6 en los sobrenadantes de DREP, mientras que las citocinas Th2 como la IL4 están disminuidas en comparación con el control negativo.

Por último, al evaluar la respuesta celular VIH específica (Figura 51) inducida por las CDsmo por DREPgp140, tras el estímulo con péptidos solapantes que cubren la secuencia que codifica DREP gp140, observamos que en presencia de DREPgp140 aparecen células formadoras de *spots* equivalentes a las células específicas secretoras de IFN- γ . Por consiguiente estamos en condiciones de afirmar que la respuesta inmune generada es específica frente a la envuelta del virus del VIH.

En resumen, estos prometedores resultados sobre la administración eficiente de los replicones de gp140, la activación de las CD^s, la proliferación de linfocitos T, el patrón de citocinas secretado, la determinación de células específicas productoras de IFN- γ , junto con el hecho de que los replicones son más inmunogénicos que el pDNA y más resistentes a la degradación que los ARN desnudos¹⁸⁵, sugieren que los replicones son buenos candidatos para las terapias basadas en CD^s. De entre todos ellos, el vector DREPgp140 parece ser el candidato más prometedor por sus buenos perfiles de viabilidad, maduración y expresión de antígeno en las CD^s que, junto a los ensayos funcionales realizados, indican que son capaces de inducir respuestas inmunológicas específicas frente a Env y, por lo tanto, podría ser un buen candidato para futuras vacunas *ex vivo* basadas en CD^s en un contexto de vacunación preventiva contra el VIH.

Sin embargo, la mayor desventaja de los replicones es la dificultad de internalizarlos dentro de las células^{142,145}. Esta limitación se podría solventar mediante la unión de estos con nanopartículas para mejorar la funcionalidad de los ARNm. No

obstante, el tamaño de los replicones junto con las cargas de las nanopartículas pueden obstaculizar su unión. Actualmente han aparecido estudios donde la formulación de estas moléculas con polímeros lipídicos están dando resultados prometedores^{244,249}. Estas novedosas formulaciones son capaces de: superar las barreras anatómicas de las células dianas, limitar la inmunidad frente a los replicones y, por consiguiente, mejorar la eficiencia en las transfecciones y en la presentación de antígenos^{113,244}. Todo ello hace que estas formulaciones sean de gran interés para el uso de replicones como DREPgp140 que, combinados con nanopartículas, conllevarían mejoras en su internalización, activación de las CDs, aumento de la expresión de gp140 e incremento de la respuesta T específica frente al VIH.

Los datos sobre la administración de ARNm que codifica para Gag *consensus* B de Gag WT (G) y Gag modificado (GM) en diferentes NPs (Au NPs, NCs, PLA, LP-PLA y LS) en un contexto de vacuna terapéutica frente al VIH-1 han demostrado su eficacia tanto en la activación de las CDs como en la inducción de respuesta inmune específica frente al VIH-1.

La razón por la que se ha planteado la utilización de estas plataformas de vectorización de ARNm unidos a nanopartículas, se debe a que en estudios previos se ha demostrado que los ARNm son muy sensibles a la degradación por endonucleasas, sobre todo cuando se administran solos¹⁶⁶. Además, la utilización de NPs presenta las siguientes ventajas: condensar el ARNm en su superficie, internalizar correctamente el ARNm en las CDs y proteger el ARNm de las ARNasas durante el transporte a la CDs¹¹³.

La primera nanopartícula que utilizamos para unir el ARNm fue la nanopartícula de oro (Au-NP). Ésta, por su naturaleza catiónica, induce interacciones electrostáticas con moléculas cargadas negativamente, como: ADN, ARN y proteínas²¹⁰ permitiendo incorporar grandes cantidades de estas biomoléculas en la superficie de las Au-NP. Estos complejos de ARNm con Au-NP han demostrado su potencial uso en vacunas basadas en CDs²⁵⁰. Sin embargo, tienden a agregarse entre ellos, y ello hace que disminuya su capacidad de poder ser coformuladas con ARNm²¹¹. Aun así, el uso de

este tipo de coformulación de Au-NP es un sistema adecuado de entrega para la inducción de respuestas inmune específicas frente al VIH, que es importante para futuras vacunas anti-VIH²¹³.

De forma similar al análisis con replicones, se ha evaluado la captación de ARNm coformulado en las Au-NP en forma de estrella y esféricas, en presencia o no de cóctel de maduración en las CDs (Figura 32). Los datos obtenidos en los ARNm con Au-NP sugieren que las de forma de estrella mantienen la viabilidad celular e incrementan la maduración en las CDs, aunque muestran una débil expresión de eGFP dentro de las CDs maduras. Estos resultados sugieren que las NPs no esféricas muestran una mejor adherencia a la membrana de las CDs, y favorecen el proceso de fagocitosis²⁵¹, pero su forma requiere una mayor remodelación de la actina que genera una internalización más lenta y dificultosa²⁵², lo que puede dañar el ARNm disminuyendo su funcionalidad en las CDs¹²⁷. Cabe añadir que el uso de agentes madurativos influye solo ligeramente en la captación de las Au-NP y en el posterior procesado de los ARNm en el citosol de las CDs²¹³.

De los datos presentados en esta memoria se desprende que el complejo de ARNm unido a las Au-NPs no ha sido eficaz en la administración del ARNm y en conseguir la activación de las CDs. Por lo tanto, para utilizar esta estrategia sería necesario hacer ajustes para estabilizar el complejo y protegerlo de agentes extracelulares e intracelulares que conduzcan al correcto procesamiento del ARNm administrado. Dado que estos ajustes excederían del objetivo de esta tesis, no se profundizó en ellos. Por otro lado, para superar las limitaciones antes descritas se podría emplear recubrimientos catiónicos como la arginina, protamina o péptidos catiónicos penetrantes que evitan la degradación del ARNm y favorecen su interacción con la célula diana^{220,253}, aumentando la expresión de antígeno y mejorando la respuesta T específica frente al VIH.

Tras la aparente ineficacia de las Au-NPs para vehiculizar ARNm en nuestro modelo *in vitro*, en la siguiente etapa evaluamos nanocápsulas (NCs) poliméricas, cuya cubierta

está constituida por poliaminoácido poliarginina o protamina ricas en cargas positivas. El interés en utilizar estos aminoácidos radica en sus demostradas propiedades como inductores de la internalización celular²⁵³.

Una de las principales ventajas de las NCs son las cargas presentes en su superficie que permiten la unión con el ARNm proporcionando estabilidad al complejo formado²¹⁶. Aunque este tipo de complejos han sido ya utilizados en la vehiculización de ARNm en las CDs²⁵⁴ y en vacunas²⁵⁵, dichas partículas pueden generar toxicidad celular debido a su naturaleza sintética²¹⁶. Para superar este obstáculo, estas NCs se pueden recubrir con poliarginina (PARG), que consiste en un péptido catiónico formado por guanidina que le permite atravesar la membrana celular facilitando la internalización de las NCs en el citosol de la célula²¹⁷.

Los datos obtenidos con las NCs ricas en arginina (Figura 35) fueron análogos a los descritos en los complejos de ARNm unidos a Au-NPs en forma de estrella. Los datos sugirieron que las NCs recubiertas de PARG y PROT a concentración de 10ng de ARNm no generan un efecto negativo en la viabilidad de las CDs y observamos un aumento de los parámetros de maduración celular junto a una débil expresión de eGFP dentro de la subpoblación madura de las CDs. Sin embargo, a concentraciones altas de ARNm en el complejo, se percibe la disminución de la viabilidad y maduración en las CDs. Por otro lado, las NCs de octarginina (ENCP) y el resto de nanoemulsiones (TB y TBL), también disminuyeron los parámetros de viabilidad y maduración de las CDs en mayor grado, al compararlas con los NCs de PARG y PROT, demostrando la ineficacia de estas plataformas. Estos hallazgos pueden deberse a que las NCs recubiertas de poliarginina y protamina favorecen la internalización gracias a su naturaleza catiónica que les permite atravesar las membranas celulares, aumentando así la entrada de moléculas²⁵⁶.

En resumen, el complejo de ARNm unido a NCs ricas en arginina han mostrado una eficacia reducida en la administración del ARNm y en la activación de las CDs. Por lo tanto, para utilizar este sistema de administración sería necesario hacer

modificaciones para estabilizar el complejo²⁵⁶, protegerlo de agentes extracelulares e intracelulares que conduzcan al correcto procerepliconiento del ARNm administrado¹¹³ y utilizar ligandos en su superficie sensibles a alteraciones al pH que les permitiese escapar del escape endosomal²⁵⁷ para entregar el ARNm en las mejores condiciones posibles en el citosol de las CDs. En todo caso estos ajustes merecerían ser objeto de un proyecto a parte.

De nuestro trabajo se extrae que NPs de PLAs con ARNm de Gag junto a intermediarios catiónicos como RALA y LAH4, son candidatos prometedores para vehicular ARNm en las CDs, activándolas e induciendo respuestas inmunes^{172,220}. Sin embargo, de entre todos los datos analizados, algunos complejos presentan resultados negativos, por lo que estandarizar y optimizar la carga de ARNm en las PLAs parece ser importante para que el ARNm se procese en las CDs con el fin de generar una respuesta inmune más adecuada¹⁷³.

De entre las condiciones evaluadas de poliplexos de péptido/ARNm y nanocomplejos de Péptido/ARNm/PLA (Figura 40), la concentración de 20ng de ARNm resultó ser la óptima para ser vectorizada en la superficie de las PLAs con el péptido LAH4. De hecho esta formulación mostró no tener un impacto relevante en la viabilidad celular, incrementó la expresión de los marcadores de maduración (CD83+ y HLA DR+) y, dentro de esta subpoblación madura, obtuvo una ligera expresión de Gag-p24 tras la transfección de ARNm en las CDs (Figura 42). Estos resultados podrían deberse a las propiedades catiónicas de LAH4 que ofrece algunas ventajas como: condensar correctamente el ARNm de Gag en la superficie de la PLA mejorando la internalización, proteger del ARNm frente a la degradación de agentes externos²⁵⁸ y favorecer el escape endosomal que permitiría la correcta traducción del ARNm en el citosol de las CDs²²⁰. Sin embargo, la débil expresión de Gag determinada en el citoplasma de las CDs se debería a que, tras la captura de estos complejos, los ARNm son reconocidos por varios PRRs que promueven la activación de la vía de transducción de señal de IFN de tipo I, lo que podría inhibir la traducción del ARNm degradándolo^{156,173}.

Una vez verificada la capacidad de estos nanocomplejos para transfectar *in vitro* las CDs, se evaluó el efecto de los nanocomplejos seleccionados vectorizados con ARNm de Gag, en la activación de la respuesta inmune mediante: i) la proliferación de los linfocitos T teñidos con CFSE después de la estimulación con CDs modificadas por estos complejos y ii) el patrón de citocinas y quimiocinas secretado en los sobrenadantes de estos cocultivos por Luminex.

En los datos de proliferación (Figura 43) no se observó la estimulación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ aunque previamente se obtuvieran buenos porcentajes de maduración de CDs. La explicación podría ser que pacientes infectados por VIH generan altos niveles de antígenos de VIH²⁵⁹ que provocan cambios en la funcionalidad y en el fenotipo de los linfocitos T CD4+²⁶⁰. Todo esto conlleva una alteración en el desarrollo de las células T memoria centrales productoras de IL2, que limita la proliferación de las CD4+²⁶¹. No obstante en diferentes estudios se ha demostrado que el uso de CDs pulsadas con ARNm o péptidos de VIH son buenos modelos de presentación antigénica para activar *ex vivo* linfocitos T CD8+ en términos de proliferación²¹³.

Por su parte los resultados obtenidos de los ensayos de Luminex (Figura 44) resultaron muy útiles en la evaluación funcional de las CDs con complejos de PLA. De todas las condiciones evaluadas, la PLA coformulada con LAH4, fue la que mostró los mejores resultados tras 6 días de cocultivo, y coincide con que este complejo fue el mejor en la evaluación de la eficiencia de la captura. Esta formulación induce la secreción de la citocina proinflamatoria IL6 y disminuye la antiinflamatoria IL1RA. Además, las citocinas Th1 como IFN- γ e IL-2 y las quimiocinas MIP-1 α y MIP-1 β están aumentadas en presencia de esta formulación, y en menor medida, las citocinas Th2 como IL5 e IL13. Estos resultados sugieren que este tipo de formulación sería capaz de polarizar alternativamente la inmunidad adaptativa, ya que se observa una moderada respuesta Th1 junto a una más baja respuesta Th2. Esto coincide con el estudio previo realizado por nuestros colaboradores donde el uso de este tipo de formulaciones pudo inducir respuestas tanto citotóxicas como humorales²²⁰.

En comparación con el anterior, los resultados del complejo con RALA mostraron: una secreción elevada de citocinas proinflamatorias como (IL-6, IL-8, MCP-1); una fuerte secreción en la antiinflamatoria IL1RA; una inducción reducida de citocinas Th1, como la secreción de la IL2r; y una inducción elevada de quimiocinas Th1 como (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β y MIG) y Th2 (IL5, IL10 y IL13). Ello podría deberse a que estudios anteriores han descrito que, en los complejos con RALA, la concentración de ARNm coformulado puede inducir a agregaciones en las formulaciones que disminuyen la entrega del ARNm en el citosol alterando su composición²²⁰. Si este ARNm se ve alterado, puede estimular inadecuadamente a las CDs, sobreactivándolas generando una sobreproducción de citocinas como las observadas en los complejos con RALA²⁶².

A modo de síntesis de entre todos los candidatos evaluados, atendiendo a la activación de las CDs, la administración eficiente del inserto de Gag y el patrón de citocinas secretado, los péptidos catiónicos son los que permiten una mejor internalización y una mayor protección del ARNm frente a la degradación por agentes externos. De entre ellos, el complejo de PLA con 20ng de Gag junto a LAH4 parece ser el candidato más prometedor por sus buenos perfiles de viabilidad, maduración y expresión de antígeno; junto a la liberación de citocinas de tipo Th1 que inducen a la diferenciación de las células T CD8+. No hay que olvidar que dicha población resulta esencial para la eliminación de las células infectadas por el VIH²⁶³. Por lo tanto, podría ser un buen candidato para futuras vacunas *ex vivo* basadas en CDs en un contexto de vacunación terapéutica frente al VIH.

Sin embargo, estos complejos presentan algunas desventajas como la débil expresión de Gag detectada en la superficie de las CDs. Para solventar este obstáculo, se ha planteado utilizar ARNm con modificaciones en CAP-1 para que interaccionen correctamente con los PRRs y así optimizar la producción de antígeno evitando la sobreactivación tóxica de las CDs¹³². Si el uso de ARNm hecho a medida lo combinamos con nuevos péptidos catiónicos penetrantes como el LAH4-L1, una isoforma del LAH4 que permite mejorar el escape endosomal²²⁰ y lo vectorizamos en nanopartículas poliméricas de base lipídica (que están demostrando resultados prometedores en la

internalización y entrega de ARNm), como las PLAs con corona lipídica y liposomas^{249,264}, todo ello podría mejorar la transfección, la activación de las CDs, aumentar de la expresión de Gag y mejorar la respuesta T específica frente al VIH.

Otra limitación radica en la concentración de carga de 20ng de ARNm en la PLA. Esto supone una desventaja para su aplicación *in vivo*, ya que en estudios previos se ha determinado que para inyectar 5µg de estos complejos haría falta administrar 250 µl de agua, glucosa o soluciones isotónicas que harían diluir la concentración de ARNm¹⁷². Por este motivo, el uso de NPs como las LP-PLA y LS que permiten albergar mayor cantidad de ARNm sin ser inestables para la célula, permitiría superar la limitación descrita anteriormente.

Finalmente en la última sección las NPs de LS o LP-PLA con ARNm de Gag (G) o ARNm con modificaciones en CAP-1 (GM), condensado con el péptido catiónico LAH4-L1, han demostrado ser unas novedosas y prometedoras plataformas de transporte de ARNm en CDs para optimizar la transferencia del ARNm y el procesamiento de este con el fin de mejorar la respuesta inmune suscitada.

Las LP-PLA y LS con ARNm de G o GM (Figura 47), indujeron perfiles de viabilidad y maduración análogos a los descritos en las PLAs, siendo mayor el incremento de la maduración (CD83+) en el caso de los complejos con ARNm de GM. La molécula CD83 está considerada como un marcador clásico de maduración⁹⁴ y su incremento sugiere que la transfección con LP-PLA o LS/LAH4-L1/ARNm es capaz de inducir la maduración de las CDs. Considerando que CD83 es esencial para transmitir señales que activen adecuadamente a la células T²⁶⁵, el incremento de CD83 indica que los complejos descritos anteriormente estimulan las señales coestimuladoras de las CDs. De entre las condiciones evaluadas, los nanocomplejos de LP-PLA o LS/LAH4-L1/ARNm, a concentración de 250 ng de ARNm GM es la mejor para ser vectorizada en la superficie de las LP-PLAs y LS con el péptido LAH4-L1 para la transfección de ARNm en las CDs. Ello sería gracias al uso de péptidos catiónicos, como se ha descrito en la sección anterior²⁶⁶. El LAH4-L1, isómero del LAH4, contiene residuos de histidina y lisina que

actúan como donadores y receptores de protones; además, la conformación espacial de estos residuos confiere mayor capacidad para la disrupción de la membrana del endosoma, promoviendo el escape endosomal^{175,220}.

De entre las dos nanopartículas evaluadas, la LP-PLA es la que mejor resultados ha dado por su eficacia de transfección y los datos en ensayos funcionales en las CDs. Este dato coincidiría con la literatura vigente donde el uso de la LP-PLA es una de las plataformas más comúnmente utilizadas y con mejores resultados para la entrega de ARNm^{113,267}. El posible éxito de esta plataforma podría deberse a su composición fisicoquímica que protege el ARNm del reconocimiento de los TLRs presentes en el endosoma impidiendo así la sobreactivación del sistema inmune innato¹³².

Además, fuimos capaces de detectar antígeno Gag-p24 en un 10% de las células maduras al utilizar ARNm G, y en alrededor de un 15% de las CDs al utilizar ARNm GM. Estos resultados sugieren que el uso del diseño de ARNm que codifica para proteína de HIV-1 Gag *Consensus B* con modificaciones en CAP-1 de *pseudouridine* y *5-Methyl-Cytidine* favorece la traducción del ARNm así como la estabilidad en los complejos de nanopartículas¹³². Estas modificaciones en un contexto de vacunas basadas en ARNm son importantes para lograr la máxima eficiencia en la codificación del gen de interés, en nuestro caso Gag, porque evitan la sobreactivación de la inmunidad innata a través de los PRR²⁶⁸ como el RIG-I que desencadenan respuestas de IFN tipo I que se unen al CAP del ARNm dificultando la traducción del ARNm y la síntesis de la proteína²⁶⁹.

Análogo a lo descrito en las PLAs, detallamos la capacidad de dichos complejos a inducir respuestas específicas frente al VIH. Volvimos a observar la ausencia de proliferación en los linfocitos T CD4+ y CD8+ (Figura 49), aunque previamente se obtuvieran buenos porcentajes de maduración de CDs y de expresión de Gag en la subpoblación madura de CDs. Estos hallazgos se asemejan a los descritos en la sección anterior sobre las PLAs.

Similar a los datos obtenidos en el ensayo de Luminex con las PLAs (Figura 50), los complejos de LP-PLA o LS aumentan la secreción de citocinas y quimiocinas sobre todo en presencia de LP-PLA con GM, que parecen ser activadoras de respuesta proinflamatoria de tipo Th1. En concreto, esta formulación induce la secreción de las citocinas IL-6, IFN- α y TNF- α que promueven la inflamación y la activación de las respuestas innatas y adaptativas, como por ejemplo la generación de las CD4+ T memoria²⁷⁰ y la maduración de las CDs²⁷¹. Por otro lado, el TNF- α es un quimioatrayente de neutrófilos que promueve la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales que contribuyen a la extravasación de los neutrófilos²². También observamos un aumento de las quimiocinas proinflamatorias como la IL-8 y MCP-1. La MCP-1 es una de las principales quimiocinas que regula la migración e infiltración de monocitos/macrófagos necesarias para dar respuesta a la inflamación en tejidos²⁷². A parte de lo descrito anteriormente, las CDsmo con este complejo no tienen un efecto relevante en la secreción de la IL1RA antiinflamatoria agonista de la IL1 cuya función es promover la expansión y diferenciación clonal²⁷³. Asimismo, las CDsmo con LAH4-L1/GM/LP-PLA incrementan las citocinas de tipo Th1 como IFN- γ y IL-12; esta última es secretada por CDs estimulando la diferenciación de los linfocitos Th1²¹³. Además, se observa un aumento de las quimiocinas MIP1- α , MIP1- β y MIG, que están descritas como inductoras de la migración de CDs, monocitos, NK y linfocitos TCD4+ y CD8+ hacia tejidos donde tendrá lugar el procesamiento de antígenos con el fin de aumentar la respuesta inmune²⁴⁸. Sin embargo, no hubo un aumento destacable de factores solubles relacionados con respuesta de tipo Th2. Estos resultados son superiores en cantidad en cuanto a secreción de citocinas si los comparamos con los obtenidos con las PLAs, pero siguen el mismo patrón. Todo ello sugiere que: i) las mejoras en la secuencia del ARNm de Gag favorecen la traducción del ARNm en el citosol¹³², ii) el uso del péptido catiónico LAH4-L1 mejora el escape endosomal respecto a LAH4 y iii) la cobertura en la superficie de las NPs con lípidos catiónicos presentes en las LP-PLA o LS optimiza la internalización de dichos compuestos en las CDs^{274,275}. Los resultados arriba expuestos sugieren en su conjunto que las CDsmo con LAH4-L1/GM/LP-PLA serían más inmunogénicas pudiendo activar tanto la inmunidad innata como adaptativa favoreciendo así las respuestas T específicas frente al VIH²²⁰.

En el ensayo de ELISPOT (Figura 52 y 53) para evaluar la inducción de una respuesta específica al inserto en CDsmo con LAH4-L1/G o GM /LP-PLA y estimulados con péptidos de Gag y Env, se observó que, tras el estímulo con péptidos de Gag en presencia de CDsmo con este complejo, hubo un incremento de *spots* equivalentes a las células T específicas productoras de IFN- γ en comparación con sus respectivas condiciones basales (CDs sin modificar), sugiriendo este resultado que se asocia una respuesta antígeno específica frente a Gag.

A modo de recapitulación, el complejo de LAH4-L1/GM/LP-PLA parece ser el candidato más prometedor con respecto a los demás complejos evaluados (Au-NP, NCs, PLA y LS) y sería el candidato más adecuado por sus notables acciones, en concreto por: i) la activación de las CDs, ii) la administración eficiente del ARNm, iii) la expresión de Gag, iv) el patrón de citocinas secretado y v) la determinación de células específicas productoras de IFN- γ , junto con el hecho de que la composición del complejo de Gag con modificaciones en CAP-1 y el péptido catiónico LAH4-L1, hacen que el complejo sea más inmunogénico e de inducir respuestas inmunológicas específicas frente a Gag^{132,220}. Por lo tanto, podría ser un buen candidato para futuras vacunas *ex-vivo* basadas en CDs en un contexto de vacunación terapéutica frente el VIH.

Sin embargo, el obstáculo más importante sería optimizar las condiciones de internalización y administración de ARNm unido a NPs en las células^{173,220}. Para superar estas barreras, en futuros ensayos se podría homogeneizar la estrategia de vectorización con el fin de optimizar la transferencia de ARNm en las CDs y tener más información sobre cómo mejorar la accesibilidad de los ARNm para que puedan ser procesados correctamente en las CDs y poder generar una respuesta inmune adecuada. Actualmente, han surgido ensayos prometedores con complejos de ARNm unido con NPs combinados con péptidos catiónicos penetrantes que han mejorado la captación, internalización y la presentación antigénica^{113,276}. Ello se debe a que la formulación de ARNm hechos a medida o con modificaciones estimulan adecuadamente a la célula¹³²; la unión a polímeros lipídicos como micelas o lipoplexos

altamente estables favorecen su vehiculización^{274,277}; y los ligandos como los péptidos catiónicos penetrantes (LAH4-L1) mejoran la eficiencia de la administración de ARNm y promueven el escape endosomal. Todo ello hace que estos complejos sean de gran interés para el uso del diseño de ARNm que codifica la proteína de HIV-1 Gag Consensus B con modificaciones por la incorporación del nucleósido de *pseudouridine* y *5-Methyl-Cytidine* en CAP-1, pues conllevaría a mejoras en su internalización, activación de las CDs, aumento de la expresión de Gag e incremento de la respuesta T específica frente al VIH.

A lo largo de esta tesis nos hemos encontrado con varias limitaciones, entre ellas cabe destacar: i) el número reducido de pacientes reclutados en algunas secciones de este trabajo (únicamente 3 pacientes en la evaluación de las NPs de LP-PLA y LS). ii) Además, en algunos experimentos no obtuvimos el número suficiente de CDs para ser transfectadas en paralelo con todas las condiciones de ARNm autoreplicativos o con los complejos de ARNm con NPs. En general hay que reseñar que las CDs generadas a partir de PBMCs de pacientes VIH-1 presentan una gran heterogeneidad en la distribución y en la cantidad de sus poblaciones celulares (ej. los monocitos base de esta producción). En cualquier caso, estudios previos realizados en nuestro centro han demostrado de manera fehaciente que la generación de CDs es una buena herramienta metodológica para obtener células inmunes que se encuentran en porcentajes bajos en sangre¹³⁵. iii) Otro obstáculo que se nos ha presentado fue el limitado stock de ARNm autoreplicativo o de NPs para su evaluación, dado que su producción se realizaba fuera de nuestro centro y por tanto no controlable su disponibilidad por nuestra parte. iv) Asimismo, en algunos experimentos de proliferación, sobretudo con las NPs, nos encontramos con una escasa activación de los linfocitos T por parte de las CDsmo con complejos de PLA, LP-PLA o LS. Para solventar esto, en futuros experimentos se podría combinar el uso de estos complejos junto con un refuerzo (*in-vitro priminig*) para inducir la respuesta T memoria a largo plazo²³⁰. Todo ello con el fin de poder determinar si las CDsmo con estos complejos son capaces de estimular la proliferación de los linfocitos T de manera más efectiva. v) Para concluir, el mayor inconveniente en la evaluación del patrón de

citocinas lo encontramos por haber realizado una única recogida de sobrenadante al sexto día del cocultivo. Esto nos limitó obtener una visión más general de la secreción de algunas citocinas como pueda ser la IL2. Dicha molécula asociada a la proliferación de los linfocitos T, pudo haberse consumido y no ser ya detectable en el momento de su medición (esta citocina se secreta en los inicios de la proliferación)²⁷⁸. Para corregirlo sería conveniente poder recoger sobrenadantes a diferentes tiempos tales como a 0, 2, 4 y 6 días con el objeto de poder determinar con mayor detalle el patrón de secreción de citocinas y quimiocinas.

8. CONCLUSIONES

- ✓ La evaluación de la eficiencia de transfección en las CDsmo por replicones (RREP/ DREP gp140) y los diferentes ARNm coformulados con NPs: Au NPs, NCs, PLA, LP-PLA o LS, revelaron incrementos de los marcadores de maduración (CD83 y HLA-DR) y activación de las CDs.
- ✓ La capacidad de las CDsmo con DREPgp140 o LAH4-L1/GM/LP-PLA para estimular la proliferación de los linfocitos T con el fin de activar una respuesta específica, demostró ser escasa en ambos casos.
- ✓ El análisis de la producción de citocinas y quimiocinas mostró que las CDsmo con DREPgp140 inducen un perfil de linfocitos Th1. En las CDsmo con LAH4-L1/GM/LP-PLA se incrementaron notablemente los perfiles Th1 en comparación con los demás complejos de LAH4/G/PLA o LAH4-L1/G/LP-PLA.
- ✓ En presencia de CDsmo con DREPgp140 y estimulación con péptidos de Env, existe un incremento de células T productoras de IFN- γ . Esto nos indica que se están induciendo respuestas Env-específicas frente al VIH-1 y, por tanto, DREPgp140 podría ser un buen candidato para futuras vacunas *ex-vivo* basadas en CDs en un contexto de vacunación preventiva contra el VIH.
- ✓ Igualmente, el ensayo de ELISPOT con CDsmo con LAH4-L1/GM/LP-PLA y estimulados con péptidos de Gag correspondientes al *clade B* del virus VIH-1, mostró un incremento de células T secretoras de IFN- γ . En este caso la inducción de respuestas específicas frente a Gag sugieren que dicha coformulación podría ser un buen candidato para futuras vacunas *ex vivo* basadas en CDs en un contexto, en este caso, de vacunación terapéutica contra el VIH.

- ✓ Estas estrategias de vehiculación de ARNm del VIH podrían ser de utilidad en los futuros estudios de desarrollo de vacunas frente al VIH.

9.REFERENCIAS

1. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1981;30:250-252.
2. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, et al. *Pneumocystis carinii* Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men. *N Engl J Med.* 1981;305(24):1425-1431. doi:10.1056/NEJM198112103052401
3. Epidemiologic Notes and Reports Possible Transfusion-Associated Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) -- California. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001203.htm>. Accessed November 4, 2019.
4. Unexplained Immunodeficiency and Opportunistic Infections in Infants -- New York, New Jersey, California. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001208.htm>. Accessed November 4, 2019.
5. Rep MMMW. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. 1982;31:507-508,513-504.
6. Coffin J, Haase A, Levy J, et al. Human immunodeficiency viruses. *Science (80-).* 1986;232(4751):697-697. doi:10.1126/SCIENCE.3008335
7. Hahn BH, Shaw GM, Popovic M, Monico A Lo, Gallo RC, Wong-Staal F. Molecular cloning and analysis of a new variant of human T-cell leukemia virus (HTLV-Ib) from an African patient with adult T-cell leukemia-lymphoma. *Int J Cancer.* 1984;34(5):613-618. doi:10.1002/ijc.2910340505
8. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science (80-).* 1986;233(4761):343-346. doi:10.1126/science.2425430
9. Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, et al. The Efficacy of Azidothymidine (AZT) in the Treatment of Patients with AIDS and AIDS-Related Complex. *N Engl J Med.* 1987;317(4):185-191. doi:10.1056/NEJM198707233170401
10. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. *N*

- Engl J Med.* 1998;338(13):853-860. doi:10.1056/NEJM199803263381301
11. Finzi D. Identification of a Reservoir for HIV-1 in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Science* (80-). 1997;278(5341):1295-1300. doi:10.1126/science.278.5341.1295
 12. Faria NR, Rambaut A, Suchard MA, et al. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* (80-). 2014;346(6205):56-61. doi:10.1126/science.1256739
 13. Gao F, Bailes E, Robertson DL, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*. 1999;397(6718):436-441. doi:10.1038/17130
 14. Gao F, Yue L, Robertson DL, et al. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol.* 1994;68(11):7433-7447. <https://jvi.asm.org/content/68/11/7433.long>. Accessed November 4, 2019.
 15. ONUSIDA. <https://www.unaids.org/es/resources/presscentre/pressreleaseandstatementarchive/2019>.
 16. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, et al. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature*. 1997;387(6629):188-191. doi:10.1038/387188a0
 17. Hecht R, Stover J, Bollinger L, Muhib F, Case K, de Ferranti D. Financing of HIV/AIDS programme scale-up in low-income and middle-income countries, 2009-31. *Lancet (London, England)*. 2010;376(9748):1254-1260. doi:10.1016/S0140-6736(10)61255-X
 18. King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB. Virus Taxonomy. *Virus Taxon.* 2012. doi:10.1016/b978-012465330-6/50022-1
 19. Doms RW, Reeves JD. Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol.* 2002;83(6):1253-1265. doi:10.1099/0022-1317-83-6-1253
 20. Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD, Benton C V., Lasky LA, Capon DJ. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature*. 1985;313(6002):450-458. doi:10.1038/313450a0
 21. Mothe B, Llano A, Ibarondo J, et al. Definition of the viral targets of protective

- HIV-1-specific T cell responses. *J Transl Med*. 2011;9(1):208. doi:10.1186/1479-5876-9-208
22. Climent N, Munier S, Piqué N, et al. Loading dendritic cells with PLA-p24 nanoparticles or MVA expressing HIV genes induces HIV-1-specific T cell responses. *Vaccine*. 2014;32(47):6266-6276. doi:10.1016/j.vaccine.2014.09.010
 23. Pavot V, Rochereau N, Primard C, et al. Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties. *J Control Release*. 2013;167(1):60-67. doi:10.1016/j.jconrel.2013.01.015
 24. Aline F, Brand D, Bout D, et al. Generation of specific Th1 and CD8+ T-cell responses by immunization with mouse CD8+ dendritic cells loaded with HIV-1 viral lysate or envelope glycoproteins. *Microbes Infect*. 2007;9(4):536-543. doi:10.1016/j.micinf.2007.01.021
 25. Sanders RW, Derking R, Cupo A, et al. A Next-Generation Cleaved, Soluble HIV-1 Env Trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, Expresses Multiple Epitopes for Broadly Neutralizing but Not Non-Neutralizing Antibodies. Trkola A, ed. *PLoS Pathog*. 2013;9(9):e1003618. doi:10.1371/journal.ppat.1003618
 26. Khattar SK, Samal S, LaBranche CC, et al. Comparative Immunogenicity of HIV-1 gp160, gp140 and gp120 Expressed by Live Attenuated Newcastle Disease Virus Vector. Tyagi AK, ed. *PLoS One*. 2013;8(10):e78521. doi:10.1371/journal.pone.0078521
 27. Li G, De Clercq E. HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):679-731. doi:10.1128/MMBR.00065-15
 28. Arthur L, Bess J, Sowder R, et al. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* (80-). 1992;258(5090):1935-1938. doi:10.1126/science.1470916
 29. Sattentau QJ, Moore JP. The role of CD4 in HIV binding and entry. *Philos Trans R Soc London Ser B Biol Sci*. 1993;342(1299):59-66. doi:10.1098/rstb.1993.0136
 30. de Goede AL, Vulto AG, Osterhaus ADME, Gruters RA. Understanding HIV infection for the design of a therapeutic vaccine. Part I: Epidemiology and

- pathogenesis of HIV infection. *Ann Pharm Françaises*. 2015;73(2):87-99. doi:10.1016/j.pharma.2014.11.002
31. Barré-Sinoussi F, Ross AL, Delfraissy J-F. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(12):877-883. doi:10.1038/nrmicro3132
 32. Heaphy S, Dingwall C, Ernberg I, et al. HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region. *Cell*. 1990;60(4):685-693. doi:10.1016/0092-8674(90)90671-Z
 33. Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(8):484-496. doi:10.1038/nrmicro3490
 34. Alcamí J, Coiras M. Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(3):216-226. doi:10.1016/j.eimc.2011.01.006
 35. McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(1):11-23. doi:10.1038/nri2674
 36. Ceulemans A, Bouzahzah C, Prat I, Urassa W, Kestens L. CD4-T cell enumeration in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients: A laboratory performance evaluation of Muse Auto CD4/CD4% system by World Health Organization prequalification of in vitro diagnostics. *PLoS One*. 2019;14(1):e0209677. doi:10.1371/journal.pone.0209677
 37. Padian NS, McCoy SI, Balkus JE, Wasserheit JN. Weighing the gold in the gold standard: challenges in HIV prevention research. *AIDS*. 2010;24(5):621-635. doi:10.1097/QAD.0b013e328337798a
 38. Deeks SG, Autran B, Berkhout B, et al. Towards an HIV cure: a global scientific strategy. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(8):607-614. doi:10.1038/nri3262
 39. Hütter G, Nowak D, Mossner M, et al. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med*. 2009;360(7):692-698. doi:10.1056/NEJMoa0802905
 40. Gupta RK, Abdul-Jawad S, McCoy LE, et al. HIV-1 remission following CCR5Δ32/Δ32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature*. 2019;568(7751):244-248. doi:10.1038/s41586-019-1027-4

41. Koff WC, Burton DR, Johnson PR, et al. Accelerating Next-Generation Vaccine Development for Global Disease Prevention. *Science* (80-). 2013;340(6136):1232910-1232910. doi:10.1126/science.1232910
42. Flynn NM, Forthal DN, Harro CD, et al. Placebo-Controlled Phase 3 Trial of a Recombinant Glycoprotein 120 Vaccine to Prevent HIV-1 Infection. *J Infect Dis.* 2005;191(5):654-665. doi:10.1086/428404
43. Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis.* 2006;194(12):1661-1671. doi:10.1086/508748
44. Mascola JR, Snyder SW, Weislow OS, et al. Immunization with Envelope Subunit Vaccine Products Elicits Neutralizing Antibodies against Laboratory-Adapted but Not Primary Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Infect Dis.* 1996;173(2):340-348. doi:10.1093/infdis/173.2.340
45. Haynes BF, Verkoczy L, Kelsoe G. Redemption of autoreactive B cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(25):9022-9023. doi:10.1073/pnas.1407877111
46. Esparza J. A brief history of the global effort to develop a preventive HIV vaccine. *Vaccine.* 2013;31(35):3502-3518. doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.018
47. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med.* 2009;361(23):2209-2220. doi:10.1056/NEJMoa0908492
48. Pitisuttithum P, Rerks-Ngarm S, Bussaratid V, et al. Safety and Reactogenicity of Canarypox ALVAC-HIV (vCP1521) and HIV-1 gp120 AIDSVAX B/E Vaccination in an Efficacy Trial in Thailand. Kallas EG, ed. *PLoS One.* 2011;6(12):e27837. doi:10.1371/journal.pone.0027837
49. Leal L, Lucero C, Gatell JM, Gallart T, Plana M, García F. New challenges in therapeutic vaccines against HIV infection. *Expert Rev Vaccines.* 2017;16(6):587-600. doi:10.1080/14760584.2017.1322513
50. García F. "Functional cure" of HIV infection: The role of immunotherapy. *Immunotherapy.* 2012;4(3):245-248. doi:10.2217/imt.12.2
51. Vanham G, Van Gulck E. Can immunotherapy be useful as a "functional cure" for

- infection with Human Immunodeficiency Virus-1? *Retrovirology*. 2012;9(1):72. doi:10.1186/1742-4690-9-72
52. Boppana S, Goepfert P. Understanding the CD8 T-cell response in natural HIV control. *F1000Research*. 2018;7. doi:10.12688/f1000research.15029.1
 53. Rosati M, von Gegerfelt A, Roth P, et al. DNA Vaccines Expressing Different Forms of Simian Immunodeficiency Virus Antigens Decrease Viremia upon SIVmac251 Challenge. *J Virol*. 2005;79(13):8480-8492. doi:10.1128/JVI.79.13.8480-8492.2005
 54. Shimada M, Wang H-B, Kondo A, et al. Effect of therapeutic immunization using Ad5/35 and MVA vectors on SIV infection of rhesus monkeys undergoing antiretroviral therapy. *Gene Ther*. 2009;16(2):218-228. doi:10.1038/gt.2008.152
 55. Mothe B, Manzardo C, Sanchez-Bernabeu A, et al. Therapeutic Vaccination Refocuses T-cell Responses Towards Conserved Regions of HIV-1 in Early Treated Individuals (BCN 01 study). *EClinicalMedicine*. 2019;11:65-80. doi:10.1016/j.eclinm.2019.05.009
 56. Zhang H, Hong H, Li D, et al. Comparing Pooled Peptides with Intact Protein for Accessing Cross-presentation Pathways for Protective CD8⁺ and CD4⁺ T Cells. *J Biol Chem*. 2009;284(14):9184-9191. doi:10.1074/jbc.M809456200
 57. Steinman RM. Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. *Annu Rev Immunol*. 2012;30(1):1-22. doi:10.1146/annurev-immunol-100311-102839
 58. Trepiaikas R, Berntsen A, Hadrup SR, et al. Vaccination with autologous dendritic cells pulsed with multiple tumor antigens for treatment of patients with malignant melanoma: results from a phase I/II trial. *Cytotherapy*. 2010;12(6):721-734. doi:10.3109/14653241003774045
 59. Thara E, Dorff TB, Pinski JK, Quinn DI. Vaccine therapy with sipuleucel-T (Provenge) for prostate cancer. *Maturitas*. 2011;69(4):296-303. doi:10.1016/j.maturitas.2011.04.012
 60. Connolly NC, Whiteside TL, Wilson C, Kondragunta V, Rinaldo CR, Riddler SA. Therapeutic immunization with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces immunogenicity in HIV-1-infected individuals. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(2):284-292.

doi:10.1128/CVI.00221-07

61. Routy J-P, Boulassel M-R, Yassine-Diab B, et al. Immunologic activity and safety of autologous HIV RNA-electroporated dendritic cells in HIV-1 infected patients receiving antiretroviral therapy. *Clin Immunol.* 2010;134(2):140-147. doi:10.1016/j.clim.2009.09.009
62. Garcia F, Ruiz L, Lopez-Bernaldo de Quiros JC MS& DP. Immunotherapy and therapeutic vaccines in HIV infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005;23:95-104. doi:10.1016/S0210-5705(09)71003-9
63. García F, Climent N, Assoumou L, et al. A therapeutic dendritic cell-based vaccine for HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2011;203(4):473-478. doi:10.1093/infdis/jiq077
64. Garcia F, Climent N, Guardo AC, et al. A Dendritic Cell-Based Vaccine Elicits T Cell Responses Associated with Control of HIV-1 Replication. *Sci Transl Med.* 2013;5(166):166ra2-166ra2. doi:10.1126/scitranslmed.3004682
65. Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, et al. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med.* 2007;13(1):46-53. doi:10.1038/nm1520
66. Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, Pomerantz RJ. The Challenge of Finding a Cure for HIV Infection. *Science (80-).* 2009;323(5919):1304-1307. doi:10.1126/science.1165706
67. Medzhitov R, Janeway Jr CA. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol.* 1998;10(5):351-353. doi:10.1006/smim.1998.0136
68. Hoffmann JA. Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science (80-).* 1999;284(5418):1313-1318. doi:10.1126/science.284.5418.1313
69. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2001;13(1):114-119. doi:10.1016/S0952-7915(00)00191-6
70. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007;449(7164):819-826. doi:10.1038/nature06246
71. Wykes M, Macpherson G. Dendritic cell–B-cell interaction: dendritic cells provide B cells with CD40-independent proliferation signals and CD40-

- dependent survival signals. *Immunology*. 2000;100(1):1. doi:10.1046/J.1365-2567.2000.00044.X
72. Brander C, Frahm N, Walker BD. The challenges of host and viral diversity in HIV vaccine design. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(4):430-437. doi:10.1016/j.coi.2006.05.012
 73. Zuñiga R, Lucchetti A, Galvan P, et al. Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control. *J Virol*. 2006;80(6):3122-3125. doi:10.1128/JVI.80.6.3122-3125.2006
 74. Troyer RM, McNevin J, Liu Y, et al. Variable fitness impact of HIV-1 escape mutations to cytotoxic T lymphocyte (CTL) response. *PLoS Pathog*. 2009;5(4). doi:10.1371/journal.ppat.1000365
 75. Walker B, McMichael A. The T-cell response to HIV. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(11). doi:10.1101/cshperspect.a007054
 76. Tomaras GD, Yates NL, Liu P, et al. Initial B-Cell Responses to Transmitted Human Immunodeficiency Virus Type 1: Virion-Binding Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies Followed by Plasma Anti-gp41 Antibodies with Ineffective Control of Initial Viremia. *J Virol*. 2008;82(24):12449-12463. doi:10.1128/jvi.01708-08
 77. Moore PL, Crooks ET, Porter L, et al. Nature of nonfunctional envelope proteins on the surface of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 2006;80(5):2515-2528. doi:10.1128/JVI.80.5.2515
 78. Hraber P, Seaman MS, Bailer RT, Mascola JR, Montefiori DC, Korber BT. Prevalence of broadly neutralizing antibody responses during chronic HIV-1 infection. *AIDS*. 2014;28(2):163-169. doi:10.1097/QAD.000000000000106
 79. Steinman RM. IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE: I. MORPHOLOGY, QUANTITATION, TISSUE DISTRIBUTION. *J Exp Med*. 1973;137(5):1142-1162. doi:10.1084/jem.137.5.1142
 80. Van Voorhis W. Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *J Exp Med*. 1982;155(4):1172-1187. doi:10.1084/jem.155.4.1172
 81. Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of

- the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 1978;75(10):5132-5136. doi:10.1073/pnas.75.10.5132
82. Steinman RM and Nussenzweig MC. Dendritic cells: features and functions. - PubMed - NCBI. *Immunol Rev.* 1980;53:127-147. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6162776>. Accessed November 4, 2019.
 83. Susana Álvarez-Losada, María Jesús Serramía, Cristina Municio AP-K y MAM-F. *BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS Y SU APLICACIÓN EN EL DISEÑO DE NUEVAS VACUNAS*. Primera ed. (M^a Ángeles Muñoz-Fernández, ed.). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED); 2017.
 84. Flórez-Grau G, Zubizarreta I, Cabezón R, Villoslada P, Benitez-Ribas D. Tolerogenic Dendritic Cells as a Promising Antigen-Specific Therapy in the Treatment of Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica From Preclinical to Clinical Trials. *Front Immunol.* 2018;9. doi:10.3389/FIMMU.2018.01169
 85. Ackerman AL, Kyritsis C, Tampe R, Cresswell P. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(22):12889-12894. doi:10.1073/pnas.1735556100
 86. Burgdorf S, Kautz A, Bohnert V, Knolle PA, Kurts C. Distinct Pathways of Antigen Uptake and Intracellular Routing in CD4 and CD8 T Cell Activation. *Science (80-).* 2007;316(5824):612-616. doi:10.1126/science.1137971
 87. Pelkmans L, Helenius A. Endocytosis Via Caveolae. *Traffic.* 2002;3(5):311-320. doi:10.1034/j.1600-0854.2002.30501.x
 88. Kaisho T and Akira S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. - PubMed - NCBI. *Trends Immunol.* 2001;22:78-83. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11286707>. Accessed November 4, 2019.
 89. Amigorena S. Fcγ Receptors and Cross-Presentation in Dendritic Cells. *J Exp Med.* 2002;195(1):f1. doi:10.1084/JEM.20011925
 90. Erwig LP1, Kluth DC, Walsh GM RA. Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. *J Immunol.* 1998;15:1983-1988.
 91. Fazekasova H, Golshayan D, Read J, et al. Regulation of Rat and Human T-Cell

- Immune Response by Pharmacologically Modified Dendritic Cells. *Transplantation*. 2009;87(11):1617-1628. doi:10.1097/TP.0b013e3181a5504c
92. Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN, Bobryshev Y V. Myeloid dendritic cells: Development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Immunobiology*. 2015;220(6):833-844. doi:10.1016/j.imbio.2014.12.010
 93. Moser M. Dendritic Cells in Immunity and Tolerance—Do They Display Opposite Functions? *Immunity*. 2003;19(1):5-8. doi:10.1016/S1074-7613(03)00182-1
 94. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767
 95. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(6):476-483. doi:10.1038/nri1845
 96. Ahmad S, Zamry AA, Tan H-TT, Wong KK, Lim J, Mohamud R. Targeting dendritic cells through gold nanoparticles: A review on the cellular uptake and subsequent immunological properties. *Mol Immunol*. 2017;91(January):123-133. doi:10.1016/j.molimm.2017.09.001
 97. Shortman K. and Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. - PubMed - NCBI. *Nat Rev Immunol*. 2007;1:19-30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170756>. Accessed November 4, 2019.
 98. Fitzgerald-Bocarsly P, Feng D. The role of type I interferon production by dendritic cells in host defense. *Biochimie*. 2007;89(6-7):843-855. doi:10.1016/j.biochi.2007.04.018
 99. Schlitzer A, Ginhoux F. Organization of the mouse and human DC network. *Curr Opin Immunol*. 2014;26(1):90-99. doi:10.1016/j.coi.2013.11.002
 100. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27(1):669-692. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132557
 101. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol*. 2004;76(3):509-513. doi:10.1189/jlb.0504272
 102. Zou W, Borvak J, Marches F, et al. Macrophage-Derived Dendritic Cells Have Strong Th1-Polarizing Potential Mediated by β -Chemokines Rather Than IL-12. *J*

- Immunol.* 2000;165(8):4388-4396. doi:10.4049/jimmunol.165.8.4388
103. Sallusto F. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994;179(4):1109-1118. doi:10.1084/jem.179.4.1109
 104. Sánchez-Torres C, García-Romo GS, Cornejo-Cortés MA, Rivas-Carvalho A, Sánchez-Schmitz G. CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells. *Int Immunol.* 2001;13(12):1571-1581. doi:10.1093/intimm/13.12.1571
 105. Conti L, Gessani S. GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: Recent advances. *Immunobiology.* 2008;213(9-10):859-870. doi:10.1016/j.imbio.2008.07.017
 106. Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, et al. C-Myb+ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity.* 2015;42(4):665-678. doi:10.1016/j.immuni.2015.03.011
 107. Valledor AF, Borràs FE, Cullell-Young M, Celada A. Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol.* 1998;63(4):405-417. doi:10.1002/jlb.63.4.405
 108. Climent N, Guerra S, García F, et al. Dendritic cells exposed to MVA-based HIV-1 vaccine induce highly functional HIV-1-specific CD8(+) T cell responses in HIV-1-infected individuals. *PLoS One.* 2011;6(5):e19644. doi:10.1371/journal.pone.0019644
 109. Qiao Y, Huang Y, Qiu C, et al. The use of PEGylated poly [2-(N,N-dimethylamino) ethyl methacrylate] as a mucosal DNA delivery vector and the activation of innate immunity and improvement of HIV-1-specific immune responses. *Biomaterials.* 2010;31(1):115-123. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.032
 110. Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2003;15(1):5-11. doi:10.1016/S0952-7915(02)00013-4
 111. Gordon S. Pattern Recognition Receptors. *Cell.* 2002;111(7):927-930. doi:10.1016/S0092-8674(02)01201-1
 112. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The Nature of the Principal Type

- 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. *Science* (80-). 1999;284(5421):1835-1837. doi:10.1126/science.284.5421.1835
113. Kowalski PS, Rudra A, Miao L, Anderson DG. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Mol Ther.* 2019;27(4). doi:10.1016/j.ymthe.2019.02.012
 114. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺ T Cells: Differentiation and Functions. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:1-12. doi:10.1155/2012/925135
 115. Dotiwala F, Mulik S, Polidoro RB, et al. Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. *Nat Med.* 2016;22(2):210-216. doi:10.1038/nm.4023
 116. Anne-Line Coolen. Formulation et vectorisation d'un ARN messenger vaccinal codant l'antigène Gag du VIH-1 à l'aide de nanoparticules biodégradables de poly(acide lactique). 2018.
 117. J.Kindt T, Richard A .Goldsby, Barbara A .Osborne. *Inmunologia de Kuby.* Vol 1.; 2004. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
 118. Minor PD. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology.* 2015;479-480:379-392. doi:10.1016/j.virol.2015.03.032
 119. Moss B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol Rev.* 2011;239(1):8-26. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00975.x
 120. Plotkin S. History of vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(34):12283-12287. doi:10.1073/pnas.1400472111
 121. Clark HF, Offit PA, Plotkin SA, Heaton PM. The New Pentavalent Rotavirus Vaccine Composed of Bovine (Strain WC3) -Human Rotavirus Reassortants. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25(7):577-583. doi:10.1097/01.inf.0000220283.58039.b6
 122. Provost PJ, Hughes J V., Miller WJ, Giesa PA, Banker FS, Emini EA. An inactivated hepatitis A viral vaccine of cell culture origin. *J Med Virol.* 1986;19(1):23-31. doi:10.1002/jmv.1890190105
 123. Hilleman MR, McAleer WJ, Buynak EB, McLean AA. The preparation and safety of hepatitis B vaccine. *J Infect.* 1983;7 Suppl 1:3-8. doi:10.1016/s0163-4453(83)96465-4

124. Rodrigues CMC, Pinto M V., Sadarangani M, Plotkin SA. Whither vaccines? *J Infect.* 2017;74:S2-S9. doi:10.1016/S0163-4453(17)30184-6
125. Appay V, Douek DC, Price DA. CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med.* 2008;14(6):623-628. doi:10.1038/nm.f.1774
126. Pardi N, Hogan MJ, Naradikian MS, et al. Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses. *J Exp Med.* 2018;jem.20171450. doi:10.1084/jem.20171450
127. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(4):261. doi:10.1038/NRD.2017.243
128. Wolff J, Malone R, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science (80-).* 1990;247(4949):1465-1468. doi:10.1126/science.1690918
129. Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet.* 2008;9(10):776-788. doi:10.1038/nrg2432
130. Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, Shin TH, Lucke CE, Weiner DB. Clinical Applications of DNA Vaccines: Current Progress. *Clin Infect Dis.* 2011;53(3):296-302. doi:10.1093/cid/cir334
131. Wilson CC, Newman MJ, Livingston BD, et al. Clinical Phase 1 Testing of the Safety and Immunogenicity of an Epitope-Based DNA Vaccine in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Subjects Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15(6):986-994. doi:10.1128/CVI.00492-07
132. Linares-ferna S. Tailoring mRNA Vaccine to Balance Innate / Adaptive Immune Response. 2019:1-13. doi:10.1016/j.molmed.2019.10.002
133. Pascolo S. The messenger's great message for vaccination. *Expert Rev Vaccines.* 2015;14(2):153-156. doi:10.1586/14760584.2015.1000871
134. Alberer M, Gnad-Vogt U, Hong HS, et al. Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial. *Lancet.* 2017;390(10101):1511-1520. doi:10.1016/S0140-6736(17)31665-3
135. Guardo AC, Joe PT, Miralles L, et al. Preclinical evaluation of an mRNA HIV vaccine combining rationally selected antigenic sequences and adjuvant signals

- (HTI-TriMix). *AIDS*. 2017;31(3). doi:10.1097/QAD.0000000000001276
136. Leal L, Guardo AC, Morón-López S, et al. Phase I clinical trial of an intranodally administered mRNA-based therapeutic vaccine against HIV-1 infection. *AIDS*. 2018;32(17). doi:10.1097/QAD.0000000000002026
 137. Lu D, Benjamin R, Kim M, Conry RM, Curiel DT. Optimization of methods to achieve mRNA-mediated transfection of tumor cells in vitro and in vivo employing cationic liposome vectors. *Cancer Gene Ther*. 1994;1(4):245-252. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7627814>. Accessed November 6, 2019.
 138. Zhang C, Maruggi G, Shan H, Li J. Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. *Front Immunol*. 2019;10(MAR). doi:10.3389/fimmu.2019.00594
 139. Iavarone C, O'hagan DT, Yu D, Delahaye NF, Ulmer JB. Mechanism of action of mRNA-based vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2017;16(9):871-881. doi:10.1080/14760584.2017.1355245
 140. Maruggi G, Zhang C, Li J, Ulmer JB, Yu D. mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases. *Mol Ther*. 2019;27(4):757-772. doi:10.1016/j.ymthe.2019.01.020
 141. Richner JM, Himansu S, Dowd KA, et al. Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. *Cell*. 2017;168(6):1114-1125.e10. doi:10.1016/j.cell.2017.02.017
 142. Brito LA, Kommareddy S, Maione D, et al. Self-Amplifying mRNA Vaccines. In: *Advances in Genetics*. Vol 89. ; 2015:179-233. doi:10.1016/bs.adgen.2014.10.005
 143. Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*. 2017;543(7644):248-251. doi:10.1038/nature21428
 144. Pardi N, Parkhouse K, Kirkpatrick E, et al. Nucleoside-modified mRNA immunization elicits influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies. *Nat Commun*. 2018;9(1):3361. doi:10.1038/s41467-018-05482-0
 145. Schwendener RA. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther Adv Vaccines*. 2014;2(6):159-182. doi:10.1177/2051013614541440

146. Geall AJ, Verma A, Otten GR, et al. Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(36):14604-14609. doi:10.1073/pnas.1209367109
147. Magini D, Giovani C, Mangiavacchi S, et al. Self-Amplifying mRNA Vaccines Expressing Multiple Conserved Influenza Antigens Confer Protection against Homologous and Heterosubtypic Viral Challenge. Stambas J, ed. *PLoS One.* 2016;11(8):e0161193. doi:10.1371/journal.pone.0161193
148. Wilgenhof S, Van Nuffel AMT, Corthals J, et al. Therapeutic Vaccination With an Autologous mRNA Electroporated Dendritic Cell Vaccine in Patients With Advanced Melanoma. *J Immunother.* 2011;34(5):448-456. doi:10.1097/CJI.0b013e31821dcb31
149. Martínez-Ávila O, Hijazi K, Marradi M, et al. Gold Manno -Glyconanoparticles: Multivalent Systems to Block HIV-1 gp120 Binding to the Lectin DC-SIGN. *Chem - A Eur J.* 2009;15(38):9874-9888. doi:10.1002/chem.200900923
150. Kim M-G, Park JY, Shon Y, Kim G, Shim G, Oh Y-K. Nanotechnology and vaccine development. *Asian J Pharm Sci.* 2014;9(5):227-235. doi:10.1016/J.AJPS.2014.06.002
151. Date AA, Destache CJ. A review of nanotechnological approaches for the prophylaxis of HIV/AIDS. *Biomaterials.* 2013;34(26):6202-6228. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.05.012
152. Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release.* 2006;114(1):100-109. doi:10.1016/j.jconrel.2006.04.014
153. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, et al. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science (80-).* 2005;307(5709):538-544. doi:10.1126/science.1104274
154. Van Meirvenne S, Straetman L, Heirman C, et al. Efficient genetic modification of murine dendritic cells by electroporation with mRNA. *Cancer Gene Ther.* 2002;9(9):787-797. doi:10.1038/sj.cgt.7700499
155. Lorenz C, Fotin-Mleczek M, Roth G, et al. Protein expression from exogenous mRNA: Uptake by receptor-mediated endocytosis and trafficking via the

- lysosomal pathway. *RNA Biol.* 2011;8(4):627-636. doi:10.4161/rna.8.4.15394
156. Houseley J, Tollervey D. The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell.* 2009;136(4):763-776. doi:10.1016/j.cell.2009.01.019
157. Devoldere J, Dewitte H, De Smedt SC, Remaut K. Evading innate immunity in nonviral mRNA delivery: don't shoot the messenger. *Drug Discov Today.* 2016;21(1):11-25. doi:10.1016/j.drudis.2015.07.009
158. Yin H, Kauffman KJ, Anderson DG. Delivery technologies for genome editing. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(6):387-399. doi:10.1038/nrd.2016.280
159. Wang H-X, Li M, Lee CM, et al. CRISPR/Cas9-Based Genome Editing for Disease Modeling and Therapy: Challenges and Opportunities for Nonviral Delivery. *Chem Rev.* 2017;117(15):9874-9906. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00799
160. VILLEMEJANE J, MIR LM. Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications. *Br J Pharmacol.* 2009;157(2):207-219. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00032.x
161. Lorenz C, Fotin-Mleczek M, Roth G, et al. Protein expression from exogenous mRNA: Uptake by receptor-mediated endocytosis and trafficking via the lysosomal pathway. *RNA Biol.* 2011;8(4):627-636. doi:10.4161/rna.8.4.15394
162. Wolff JA, Rozema DB. Breaking the Bonds: Non-viral Vectors Become Chemically Dynamic. *Mol Ther.* 2008;16(1):8-15. doi:10.1038/sj.mt.6300326
163. Yin H, Kauffman KJ, Anderson DG. Delivery technologies for genome editing. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(6):387-399. doi:10.1038/nrd.2016.280
164. Kaczmarek JC, Kowalski PS, Anderson DG. Advances in the delivery of RNA therapeutics: From concept to clinical reality. *Genome Med.* 2017;9(1). doi:10.1186/s13073-017-0450-0
165. Selmi A, Vascotto F, Kautz-Neu K, et al. Uptake of synthetic naked RNA by skin-resident dendritic cells via macropinocytosis allows antigen expression and induction of T-cell responses in mice. *Cancer Immunol Immunother.* 2016;65(9):1075-1083. doi:10.1007/s00262-016-1869-7
166. Hajj KA, Whitehead KA. Tools for translation: non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. *Nat Rev Mater.* 2017;2(10):17056. doi:10.1038/natrevmats.2017.56

167. Li S, Cutrera J, Heller R, Teissié J. *Electroporation Protocols. Preclinical and Clinical Gene Medicine IN Series Editor.*; 2014. doi:1064-3745
168. Johansson DX, Ljungberg K, Kakoulidou M, Liljeström P. Intradermal electroporation of naked replicon RNA elicits strong immune responses. *PLoS One*. 2012;7(1):e29732. doi:10.1371/journal.pone.0029732
169. Young JL, Dean DA. Electroporation-Mediated Gene Delivery. *Adv Genet*. 2015;89:49-88. doi:10.1016/bs.adgen.2014.10.003
170. Probst J, Weide B, Scheel B, et al. Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA in vivo is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent. *Gene Ther*. 2007;14(15):1175-1180. doi:10.1038/sj.gt.3302964
171. Scheel B, Teufel R, Probst J, et al. Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. *Eur J Immunol*. 2005;35(5):1557-1566. doi:10.1002/eji.200425656
172. Rességuier J, Delaune E, Coolen AL, et al. Specific and efficient uptake of surfactant-free poly(lactic acid) nanovaccine vehicles by mucosal dendritic cells in adult zebrafish after bath immersion. *Front Immunol*. 2017;8(FEB):1-13. doi:10.3389/fimmu.2017.00190
173. Gutjahr A, Phelip C, Coolen A-L, et al. Biodegradable Polymeric Nanoparticles-Based Vaccine Adjuvants for Lymph Nodes Targeting. *Vaccines*. 2016;4(4):34. doi:10.3390/vaccines4040034
174. Udhayakumar VK, De Beuckelaer A, McCaffrey J, et al. Arginine-Rich Peptide-Based mRNA Nanocomplexes Efficiently Instigate Cytotoxic T Cell Immunity Dependent on the Amphipathic Organization of the Peptide. *Adv Healthc Mater*. 2017;6(13):1601412. doi:10.1002/adhm.201601412
175. Wolf J, Aisenbrey C, Harmouche N, et al. pH-Dependent Membrane Interactions of the Histidine-Rich Cell-Penetrating Peptide LAH4-L1. *Biophys J*. 2017;113(6). doi:10.1016/j.bpj.2017.06.053
176. Zhang TT, Kang TH, Ma B, Xu Y, Hung C-F, Wu T-C. LAH4 enhances CD8+ T cell immunity of protein/peptide-based vaccines. *Vaccine*. 2012;30(4):784-793. doi:10.1016/j.vaccine.2011.11.056
177. Kormann MSD, Hasenpusch G, Aneja MK, et al. Expression of therapeutic

- proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol.* 2011;29(2):154-157. doi:10.1038/nbt.1733
178. Rejman J, Tavernier G, Bavarsad N, Demeester J, De Smedt SC. mRNA transfection of cervical carcinoma and mesenchymal stem cells mediated by cationic carriers. *J Control Release.* 2010;147(3):385-391. doi:10.1016/j.jconrel.2010.07.124
 179. Johler SM, Rejman J, Guan S, Rosenecker J. Nebulisation of IVT mRNA Complexes for Intrapulmonary Administration. Ceña V, ed. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137504. doi:10.1371/journal.pone.0137504
 180. De Haes W, Rejman J, Pollard C, et al. Lipoplexes carrying mRNA encoding Gag protein modulate dendritic cells to stimulate HIV-specific immune responses. *Nanomedicine.* 2013;8(1):77-87. doi:10.2217/nnm.12.97
 181. Pavot V, Berthet M, Ressaygues J, et al. Poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery. *Nanomedicine.* 2014;9(17):2703-2718. doi:10.2217/nnm.14.156
 182. Zhang H-X, Zhang Y, Yin H. Genome Editing with mRNA Encoding ZFN, TALEN, and Cas9. *Mol Ther.* 2019;27(4):735-746. doi:10.1016/j.ymthe.2019.01.014
 183. Lundstrom K. Self-replicating RNA viruses for RNA therapeutics. *Molecules.* 2018. doi:10.3390/molecules23123310
 184. Liljeström P, Garoff H. A New Generation of Animal Cell Expression Vectors Based on the Semliki Forest Virus Replicon. *Bio/Technology.* 1991;9(12):1356-1361. doi:10.1038/nbt1291-1356
 185. Knudsen ML, Ljungberg K, Tatoud R, Weber J, Esteban M, Liljeström P. Alphavirus Replicon DNA Expressing HIV Antigens Is an Excellent Prime for Boosting with Recombinant Modified Vaccinia Ankara (MVA) or with HIV gp140 Protein Antigen. Weaver EA, ed. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117042. doi:10.1371/journal.pone.0117042
 186. Uematsu Y, Vajdy M, Lian Y, et al. Lack of Interference with Immunogenicity of a Chimeric Alphavirus Replicon Particle-Based Influenza Vaccine by Preexisting Antivector Immunity. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19(7):991-998. doi:10.1128/CVI.00031-12

187. Barry G, Fragkoudis R, Ferguson MC, et al. Semliki Forest Virus-Induced Endoplasmic Reticulum Stress Accelerates Apoptotic Death of Mammalian Cells. *J Virol*. 2010;84(14):7369-7377. doi:10.1128/JVI.02310-09
188. Fotin-Mleczek M, Duchardt KM, Lorenz C, et al. Messenger RNA-based Vaccines With Dual Activity Induce Balanced TLR-7 Dependent Adaptive Immune Responses and Provide Antitumor Activity. *J Immunother*. 2011;34(1):1-15. doi:10.1097/CJI.0b013e3181f7dbe8
189. Allard SD, De Keersmaecker B, de Goede AL, et al. A phase I/IIa immunotherapy trial of HIV-1-infected patients with Tat, Rev and Nef expressing dendritic cells followed by treatment interruption. *Clin Immunol*. 2012;142(3):252-268. doi:10.1016/j.clim.2011.10.010
190. Fleeton MN, Chen M, Berglund P, et al. Self-Replicative RNA Vaccines Elicit Protection against Influenza A Virus, Respiratory Syncytial Virus, and a Tickborne Encephalitis Virus. *J Infect Dis*. 2001;183(9):1395-1398. doi:10.1086/319857
191. Hallengard D, Lum F-M, Kummerer BM, et al. Prime-Boost Immunization Strategies against Chikungunya Virus. *J Virol*. 2014;88(22):13333-13343. doi:10.1128/JVI.01926-14
192. Giraud A, Ataman-Onal Y, Battail N, et al. Generation of monoclonal antibodies to native human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein by immunization of mice with naked RNA. *J Virol Methods*. 1999;79(1):75-84. doi:10.1016/s0166-0934(99)00009-9
193. Ajbani SP, Velhal SM, Kadam RB, Patel V V., Bandivdekar AH. Immunogenicity of Semliki Forest virus based self-amplifying RNA expressing Indian HIV-1C genes in mice. *Int J Biol Macromol*. 2015;81:794-802. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.09.010
194. Bogers WM, Oostermeijer H, Mooij P, et al. Potent Immune Responses in Rhesus Macaques Induced by Nonviral Delivery of a Self-amplifying RNA Vaccine Expressing HIV Type 1 Envelope With a Cationic Nanoemulsion. *J Infect Dis*. 2015;211(6):947-955. doi:10.1093/infdis/jiu522
195. Liu MA. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev*. 2011;239(1):62-84. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00980.x
196. Nordstrom EKL, Forsell MNE, Barnfield C, et al. Enhanced immunogenicity using

- an alphavirus replicon DNA vaccine against human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol.* 2005;86(2):349-354. doi:10.1099/vir.0.80481-0
197. Knudsen ML, Mbewe-Mvula A, Rosario M, et al. Superior induction of T cell responses to conserved HIV-1 regions by electroporated alphavirus replicon DNA compared to that with conventional plasmid DNA vaccine. *J Virol.* 2012;86(8):4082-4090. doi:10.1128/JVI.06535-11
198. Scida K, Stege PW, Haby G, Messina GA, García CD. Recent applications of carbon-based nanomaterials in analytical chemistry: Critical review. *Anal Chim Acta.* 2011;691(1-2):6-17. doi:10.1016/j.aca.2011.02.025
199. Shao K, Singha S, Clemente-Casares X, Tsai S, Yang Y, Santamaria P. Nanoparticle-Based Immunotherapy for Cancer. *ACS Nano.* 2015;9(1):16-30. doi:10.1021/nn5062029
200. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J.* 2005;19(3):311-330. doi:10.1096/fj.04-2747rev
201. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(17):2873-2896. doi:10.1007/s00018-009-0053-z
202. Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol.* 2008;3(3):145-150. doi:10.1038/nnano.2008.30
203. Guo X, Li Y, Yan J, et al. Size- and coating-dependent cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using *in vitro* standard assays. *Nanotoxicology.* 2016;10(9):1373-1384. doi:10.1080/17435390.2016.1214764
204. Chauhan VP, Popović Z, Chen O, et al. Fluorescent Nanorods and Nanospheres for Real-Time In Vivo Probing of Nanoparticle Shape-Dependent Tumor Penetration. *Angew Chemie Int Ed.* 2011;50(48):11417-11420. doi:10.1002/anie.201104449
205. Yu B, Zhang Y, Zheng W, Fan C, Chen T. Positive Surface Charge Enhances Selective Cellular Uptake and Anticancer Efficacy of Selenium Nanoparticles. *Inorg Chem.* 2012;51(16):8956-8963. doi:10.1021/ic301050v
206. Zanganeh S, Spitler R, Erfanzadeh M, Alkilany AM, Mahmoudi M. Protein

- corona: Opportunities and challenges. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;75:143-147. doi:10.1016/j.biocel.2016.01.005
207. Fadeel B, Fornara A, Toprak MS, Bhattacharya K. Keeping it real: The importance of material characterization in nanotoxicology. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;468(3):498-503. doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.178
208. Heinz H, Pramanik C, Heinz O, et al. Nanoparticle decoration with surfactants: Molecular interactions, assembly, and applications. *Surf Sci Rep.* 2017;72(1):1-58. doi:10.1016/J.SURFREP.2017.02.001
209. Islam MA, Reesor EKG, Xu Y, Zope HR, Zetter BR, Shi J. Biomaterials for mRNA delivery. *Biomater Sci.* 2015. doi:10.1039/c5bm00198f
210. Alex S, Tiwari A. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications—A Review. *J Nanosci Nanotechnol.* 2015;15(3):1869-1894. doi:10.1166/jnn.2015.9718
211. Basly B, Popa G, Fleutot S, et al. Effect of the nanoparticle synthesis method on dendronized iron oxides as MRI contrast agents. *Dalt Trans.* 2013;42(6):2146-2157. doi:10.1039/C2DT31788E
212. Safari D, Marradi M, Chiodo F, et al. Gold nanoparticles as carriers for a synthetic Streptococcus pneumoniae type 14 conjugate vaccine. *Nanomedicine (Lond).* 2012;7(5):651-662. doi:10.2217/nnm.11.151
213. Climent N, García I, Marradi M, et al. Loading dendritic cells with gold nanoparticles (GNPs) bearing HIV-peptides and mannosides enhance HIV-specific T cell responses. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2018;14(2):339-351. doi:10.1016/J.NANO.2017.11.009
214. Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. Nanocapsule technology: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2002;19(2):99-134. doi:10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v19.i2.10
215. Bae KH, Lee Y, Park TG. Oil-Encapsulating PEO–PPO–PEO/PEG Shell Cross-Linked Nanocapsules for Target-Specific Delivery of Paclitaxel. *Biomacromolecules.* 2007;8(2):650-656. doi:10.1021/bm0608939
216. Hervella P, Lozano V, Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Nanomedicine: New Challenges and Opportunities in Cancer Therapy. *J Biomed Nanotechnol.*

- 2008;4(3):276-292. doi:10.1166/jbn.2008.339
217. Patel LN, Zaro JL, Shen W-C. Cell Penetrating Peptides: Intracellular Pathways and Pharmaceutical Perspectives. *Pharm Res.* 2007;24(11):1977-1992. doi:10.1007/s11095-007-9303-7
218. Kim WJ, Christensen L V., Jo S, et al. Cholesteryl Oligoarginine Delivering Vascular Endothelial Growth Factor siRNA Effectively Inhibits Tumor Growth in Colon Adenocarcinoma. *Mol Ther.* 2006;14(3):343-350. doi:10.1016/j.ymthe.2006.03.022
219. Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T, Brem H. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;107:163-175. doi:10.1016/j.addr.2016.06.018
220. Coolen A-L, Lacroix C, Mercier-Gouy P, et al. Poly(lactic acid) nanoparticles and cell-penetrating peptide potentiate mRNA-based vaccine expression in dendritic cells triggering their activation. *Biomaterials.* 2019;195:23-37. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.12.019
221. Aline F, Brand D, Pierre J, et al. Dendritic cells loaded with HIV-1 p24 proteins adsorbed on surfactant-free anionic PLA nanoparticles induce enhanced cellular immune responses against HIV-1 after vaccination. *Vaccine.* 2009;27(38):5284-5291. doi:10.1016/j.vaccine.2009.05.028
222. Hassett KJ, Benenato KE, Jacquinet E, et al. Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2019;15. doi:10.1016/j.omtn.2019.01.013
223. Hajj KA, Ball RL, Deluty SB, et al. Branched-Tail Lipid Nanoparticles Potently Deliver mRNA In Vivo due to Enhanced Ionization at Endosomal pH. *Small.* 2019;15(6). doi:10.1002/smll.201805097
224. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(2):145-160. doi:10.1038/nrd1632
225. Heath JR, Davis ME. Nanotechnology and Cancer. *Annu Rev Med.* 2008;59(1):251-265. doi:10.1146/annurev.med.59.061506.185523
226. Andresen TL, Jensen SS, Jørgensen K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Prog*

- Lipid Res.* 2005;44(1):68-97. doi:10.1016/j.plipres.2004.12.001
227. Pollard C, Rejman J, De Haes W, et al. Type I IFN counteracts the induction of antigen-specific immune responses by lipid-based delivery of mRNA vaccines. *Mol Ther.* 2013;21(1):251-259. doi:10.1038/mt.2012.202
228. Salinthon S, Kerns AR, Tsang V, Carr DW. α -Tocopherol (vitamin E) stimulates cyclic AMP production in human peripheral mononuclear cells and alters immune function. *Mol Immunol.* 2013;53(3):173-178. doi:10.1016/j.molimm.2012.08.005
229. Hamasaki M, Araki N, Hatae T. Association of early endosomal autoantigen 1 with macropinocytosis in EGF-stimulated a431 cells. *Anat Rec.* 2004;277A(2):298-306. doi:10.1002/ar.a.20027
230. Moser JM, Sassano ER, Leistritz DC, et al. Optimization of a dendritic cell-based assay for the in vitro priming of naïve human CD4+ T cells. *J Immunol Methods.* 2010;353(1-2):8-19. doi:10.1016/j.jim.2009.11.006
231. Climent N, Munier S, Piqué N, et al. Loading dendritic cells from HIV-1 infected patients with PLA-p24 nanoparticles or MVA expressing HIV genes induces HIV-1-specific T cell responses. *Retrovirology.* 2012;9(Suppl 2):P247. doi:10.1186/1742-4690-9-S2-P247
232. Brito LA, Chan M, Shaw CA, et al. A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines. *Mol Ther.* 2014;22(12):2118-2129. doi:10.1038/mt.2014.133
233. Viger-Gravel J, Schantz A, Pinon AC, Rossini AJ, Schantz S, Emsley L. Structure of Lipid Nanoparticles Containing siRNA or mRNA by Dynamic Nuclear Polarization-Enhanced NMR Spectroscopy. *J Phys Chem B.* 2018;122(7). doi:10.1021/acs.jpcc.7b10795
234. Hess PR, Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Vaccination with mRNAs encoding tumor-associated antigens and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor efficiently primes CTL responses, but is insufficient to overcome tolerance to a model tumor/self antigen. *Cancer Immunol Immunother.* 2006;55(6):672-683. doi:10.1007/s00262-005-0064-z
235. Lam JKW, Liang W, Lan Y, et al. Effective endogenous gene silencing mediated by

- pH responsive peptides proceeds via multiple pathways. *J Control Release*. 2012;158(2):293-303. doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.024
236. DENISA L.DRAGU1,#, ANA I. NEAGU1,#, LILIA MATEI1,#, CORALIA BLEOTU1, SIMONA M. RUTA1,2, CARMEN C. DIACONU1 *. Characterization of a platform based on dendritic cells for new therapeutic vaccine development. *Rom Biotechnol Lett*. 2018;(x). doi:DOI: 10.26327/RBL2018.241
 237. McCullough K, Milona P, Thomann-Harwood L, et al. Self-Amplifying Replicon RNA Vaccine Delivery to Dendritic Cells by Synthetic Nanoparticles. *Vaccines*. 2014. doi:10.3390/vaccines2040735
 238. Van Gulck ER, Vanham G, Heyndrickx L, et al. Efficient in vitro expansion of human immunodeficiency virus (HIV)-specific T-cell responses by gag mRNA-electroporated dendritic cells from treated and untreated HIV type 1-infected individuals. *J Virol*. 2008;82(7):3561-3573. doi:10.1128/JVI.02080-07
 239. Lundstrom K. Replicon RNA Viral Vectors as Vaccines. *Vaccines*. 2016;4(4). doi:10.3390/vaccines4040039
 240. McCullough KC, Bassi I, Démoulin T, Thomann-Harwood LJ, Ruggli N. Functional RNA delivery targeted to dendritic cells by synthetic nanoparticles. *Ther Deliv*. 2012;3(9):1077-1099. doi:10.4155/tde.12.90
 241. Liljeström P, Garoff H. A New Generation of Animal Cell Expression Vectors Based on the Semliki Forest Virus Replicon. *Bio/Technology*. 1991;9(12):1356-1361. doi:10.1038/nbt1291-1356
 242. Ljungberg K, Liljeström P. Self-replicating alphavirus RNA vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2015;14(2):177-194. doi:10.1586/14760584.2015.965690
 243. De Beuckelaer A, Grooten J, De Koker S. Type I Interferons Modulate CD8+ T Cell Immunity to mRNA Vaccines. *Trends Mol Med*. 2017;23(3):216-226. doi:10.1016/j.molmed.2017.01.006
 244. Englezou PC, Sapet C, Démoulin T, et al. Self-Amplifying Replicon RNA Delivery to Dendritic Cells by Cationic Lipids. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2018;12(September):118-134. doi:10.1016/j.omtn.2018.04.019
 245. Bolhassani A, Khavari A, Oraf Z. Electroporation – Advantages and Drawbacks for Delivery of Drug, Gene and Vaccine. In: *Application of Nanotechnology in Drug*

- Delivery*. InTech; 2014. doi:10.5772/58376
246. Zhang R, Xing M, Ji X, et al. Interferon- α and Interleukin-6 in SLE serum induce the differentiation and maturation of dendritic cells derived from CD34+ hematopoietic precursor cells. *Cytokine*. 2010;50(2):195-203. doi:10.1016/j.cyto.2010.02.017
247. Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: A versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol*. 2001;22(2):83-87. doi:10.1016/S1471-4906(00)01812-3
248. Castellino F, Huang AY, Altan-Bonnet G, Stoll S, Scheinecker C, Germain RN. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature*. 2006;440(7086):890-895. doi:10.1038/nature04651
249. Melo M, Porter E, Zhang Y, et al. Immunogenicity of RNA Replicons Encoding HIV Env Immunogens Designed for Self-Assembly into Nanoparticles. *Mol Ther*. 2019;27(12):2080-2090. doi:10.1016/j.ymthe.2019.08.007
250. Garrido C, Simpson CA, Dahl NP, et al. Gold nanoparticles to improve HIV drug delivery. *Future Med Chem*. 2015;7(9):1097-1107. doi:10.4155/fmc.15.57
251. Champion JA, Mitragotri S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(13):4930-4934. doi:10.1073/pnas.0600997103
252. Sharma G, Valenta DT, Altman Y, et al. Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *J Control Release*. 2010;147(3):408-412. doi:10.1016/j.jconrel.2010.07.116
253. González-Aramundiz JV, Presas E, Dalmau-Mena I, et al. Rational design of protamine nanocapsules as antigen delivery carriers. *J Control Release*. 2017;245:62-69. doi:10.1016/j.jconrel.2016.11.012
254. Rejman J, Tavernier G, Bavarsad N, Demeester J, De Smedt SC. mRNA transfection of cervical carcinoma and mesenchymal stem cells mediated by cationic carriers. *J Control Release*. 2010;147(3):385-391. doi:10.1016/j.jconrel.2010.07.124
255. Cruz LJ, Tacke PJ, Rueda F, Domingo JC, Albericio F, Figdor CG. Targeting nanoparticles to dendritic cells for immunotherapy. *Methods Enzymol*. 2012;509:143-163. doi:10.1016/B978-0-12-391858-1.00008-3

256. Lozano M V., Lollo G, Alonso-Nocelo M, et al. Polyarginine nanocapsules: A new platform for intracellular drug delivery. *J Nanoparticle Res.* 2013;15(3):1-14. doi:10.1007/s11051-013-1515-7
257. Das M, Mardyani S, Chan WCW, Kumacheva E. Biofunctionalized pH-Responsive Microgels for Cancer Cell Targeting: Rational Design. *Adv Mater.* 2006;18(1):80-83. doi:10.1002/adma.200501043
258. Jain AK, Massey A, Yusuf H, McDonald DM, McCarthy HO, Kett VL. Development of polymeric–cationic peptide composite nanoparticles, a nanoparticle-in-nanoparticle system for controlled gene delivery. *Int J Nanomedicine.* 2015;10. doi:10.2147/IJN.S95245
259. Jabbari A, Harty JT. Secondary memory CD8+ T cells are more protective but slower to acquire a central-memory phenotype. *J Exp Med.* 2006;203(4):919-932. doi:10.1084/jem.20052237
260. Salwe S, Singh A, Padwal V, et al. Immune signatures for HIV-1 and HIV-2 induced CD4 + T cell dysregulation in an Indian cohort. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):135. doi:10.1186/s12879-019-3743-7
261. Negi N, Mojumdar K, Singh R, et al. Comparative proliferation capacity of Gag-C-specific naive and memory CD4+ and CD8+ T lymphocytes in rapid, viremic slow, and slow progressors during human immunodeficiency virus infection. *Viral Immunol.* 2018;31(7):513-524. doi:10.1089/vim.2018.0012
262. Karikó K, Muramatsu H, Ludwig J, Weissman D. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(21):e142-e142. doi:10.1093/nar/gkr695
263. Alloatti A, Kotsias F, Magalhaes JG, Amigorena S. Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! *Immunol Rev.* 2016;272(1):97-108. doi:10.1111/imr.12432
264. Van Der Jeught K, De Koker S, Bialkowski L, et al. Dendritic Cell Targeting mRNA Lipopolyplexes Combine Strong Antitumor T-Cell Immunity with Improved Inflammatory Safety. *ACS Nano.* 2018.
265. Kruse M, Rosorius O, Krätzer F, et al. Inhibition of CD83 cell surface expression

- during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. *J Exp Med.* 2000;191(9):1581-1590. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2213428&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed June 16, 2015.
266. Langlet-Bertin B, Leborgne C, Scherman D, Bechinger B, Mason AJ, Kichler A. Design and evaluation of histidine-rich amphipathic peptides for siRNA delivery. *Pharm Res.* 2010;27(7):1426-1436. doi:10.1007/s11095-010-0138-2
 267. Granot Y, Peer D. Delivering the right message: Challenges and opportunities in lipid nanoparticles-mediated modified mRNA therapeutics—An innate immune system standpoint. *Semin Immunol.* 2017;34. doi:10.1016/j.smim.2017.08.015
 268. Hornung V, Ellegast J, Kim S, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science (80-).* 2006;314(5801):994-997. doi:10.1126/science.1132505
 269. Parimal Kumar, Trevor R. Sweeney, Maxim A. Skabkin, Olga V. Skabkina, Christopher U. T. Hellen TVP. Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and 5'ppp- mRNAs | Nucleic Acids Research | Oxford Academic. Nucleic Acids Research. doi:https://doi.org/10.1093/nar/gkt1321
 270. Longhi MP, Wright K, Lauder SN, et al. Interleukin-6 is crucial for recall of influenza-specific memory CD4 T cells. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):e1000006. doi:10.1371/journal.ppat.1000006
 271. Frick J-S, Grünebach F, Autenrieth IB. Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(1):19-24. doi:10.1016/j.ijmm.2009.08.010
 272. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29(6):313-326. doi:10.1089/jir.2008.0027
 273. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(2):89-102. doi:10.1038/nri2691
 274. Lacroix C, Humanes A, Coiffier C, Gigmes D, Verrier B, Trimaille T. Polylactide-Based Reactive Micelles as a Robust Platform for mRNA Delivery. *Pharm Res.* 2020;37(2). doi:10.1007/s11095-019-2749-6

275. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal formulations in clinical use: An updated review. *Pharmaceutics*. 2017;9(2). doi:10.3390/pharmaceutics9020012
276. Smith SA, Selby LI, Johnston APR, Such GK. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. *Bioconjug Chem*. 2019;30(2). doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00732
277. Mukherjee A, Waters AK, Kalyan P, Achrol AS, Kesari S, Yenugonda VM. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a nextgeneration drug delivery platform: State of the art, emerging technologies, and perspectives. *Int J Nanomedicine*. 2019;14. doi:10.2147/IJN.S198353
278. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kedl RM. T cell responses: Naïve to memory and everything in between. *Am J Physiol - Adv Physiol Educ*. 2013;37(4):273-283. doi:10.1152/advan.00066.2013

10. PUBLICACIONES

10.1. ARTÍCULOS

- Guardo AC, Joe PT, Miralles L, **Bargalló ME**, Mothe B, Krasniqi A, Heirman C, García F, Thielemans K, Brander C, Aerts JL, Plana M; iHIVARNA consortium.
Preclinical evaluation of an mRNA HIV vaccine combining rationally selected antigenic sequences and adjuvant signals (HTI-TriMix). AIDS. 2017 Jan 28;31(3):321-332. doi: 10.1097/QAD.0000000000001276. Erratum in: AIDS. 2019 Oct1;33(12):1957. PubMed PMID: 27677160.
- Guardo AC, Ruiz-Riol M, Fernández E, Maleno MJ, **Bargalló ME**, León A, Climent N, García F, Gatell JM, Brander C, Plana M. ***Detection of HIV-1-specific T-cell immune responses in highly HIV-exposed uninfected individuals by in-vitro dendritic cell co-culture.*** AIDS. 2015 Jul 17;29(11):1309-18. doi: 10.1097/QAD.0000000000000728. PubMed PMID: 26091301.

10.2. CONGRESOS

- **Bargalló ME**, Guardo AC, Szurgot I, Ljungberg K, Leal L, Maleno MJ, Miralles L, Climent N, García F, Gatell JM, Lijjeström P, Plana M; on behalf of EHVA consortium. ***Preclinical assessment of Self-replicating DNA/RNA vaccine encoding HIV gp140*** XI Congreso Nacional GESIDA. POR-37 Póster Oral. Toledo, España. 10– 13 Dic 2019.
- **Bargalló ME**, Guardo AC, Szurgot I, Ljungberg K, Leal L, Maleno MJ, Miralles L, Climent N, García F, Gatell JM, Lijjeström P, Plana M, on behalf of EHVA consortium. ***In vitro Evaluation of Self-Amplifying Alphavirus replicons delivered as DNA or RNA expressing HIVgp140 as potential RNA based vaccine candidates.*** HIV Research for Prevention 2018 (HIVR4P 2018). Póster. Madrid, España. Octubre 21-25, 2018.
- **Bargalló ME**, Guardo AC, Szurgot I, Ljungberg K, Leal L, Maleno MJ, Miralles L, Climent N, García F, Gatell JM, Lijjeström P, Plana M; on behalf of EHVA consortium. ***In vitro Evaluation of Self-Amplifying Alphavirus replicons delivered as DNA or RNA expressing HIVgp140 as potential RNA based vaccine candidates for HIV Vaccination.*** EHVA Annual Full Group & SAB Meeting 2018. Póster. Madrid, España. Junio 21-22, 2018.

10.3. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

- Etcheverry-Rufino F, Lucero C, López-Cerón M, Aleñar-Gelabert Y, Fernández I, Ugarte A, **Bargalló ME**, Goetz M, Veloza L, Bombí JA, Pellisé M, Leal L, Plana M, Climent N, García F. *Local barrier dysfunction identified by confocal laser endomicroscopy predicts bacterial translocation in HIV infection.* AIDS. 2020 Feb 1;34(2):328-331. doi: 10.1097/QAD.0000000000002415. PubMed PMID: 31876597.

- Guardo AC, Zarama A, González T, **Bargalló ME**, Rojas J, Martínez E, Plana M, Sánchez-Palomino S. *Effects on immune system and viral reservoir of a short-cycle antiretroviral therapy in virologically suppressed HIV-positive patients.* AIDS.2019 May 1;33(6):965-972. doi: 10.1097/QAD.0000000000002169. PubMed PMID:30946150.

- **Bargalló ME**, Guardo AC, Maleno MJ, Miralles L, Egaña-Gorroño L, Escribà T, García F, Gatell JM, Arnedo M, Plana M. *Utility of Systematic Isolation of immune cell subsets from HIV-infected individuals for miRNA profiling.* J Immunol Methods. 2017 Mar; 442:12-19. doi: 10.1016/j.jim.2016.12.005. Epub 2016 Dec 27. PubMed PMID: 28039100.

- Egaña-Gorroño L, Guardo AC, **Bargalló ME**, Planet E, Vilaplana E, Escribà T, Pérez I, Gatell JM, García F, Arnedo M, Plana M; *HIV Controllers Consortium of the AIDS Spanish Network. **MicroRNA Profile in CD8+ T-Lymphocytes from HIV-Infected Individuals: Relationship with Antiviral Immune Response and Disease Progression.*** PLoS One. 2016 May 12;11(5): e0155245. doi: 10.1371/journal.pone.0155245. eCollection 2016. PubMed PMID: 27171002; PubMed Central PMCID: PMC4865051.

- Egaña-Gorroño L, Escribà T, Boulanger N, Guardo AC, León A, **Bargalló ME**, Garcia F, Gatell JM, Plana M, Arnedo M; *HIV Controllers Consortium of the AIDS Spanish Network. **Differential microRNA expression profile between stimulated PBMCs from HIV-1 infected elite controllers and viremic progressors.*** PLoS One. 2014 Sep 16;9(9): e106360. doi: 10.1371/journal.pone.0106360. eCollection 2014. PubMed PMID: 25225963; PubMed Central PMCID: PMC4165582.

- Guardo AC, Alvarez-Fernández C, Arberas H, García-Pérez J, García F, **Bargalló ME**, Maleno MJ, Gatell JM, Mothe B, Alcamí J, Sánchez-Palomino S, Plana M. ***Use of RT-defective HIV virions: new tool to evaluate specific response in chronic asymptomatic HIV-infected individuals.*** PLoS One. 2013;8(3): e58927. doi:10.1371/journal.pone.0058927. Epub 2013 Mar 14. PubMed PMID: 23516578; PubMed Central PMCID: PMC3597525.

- Arberas H, Guardo AC, **Bargalló ME**, Maleno MJ, Calvo M, Blanco JL, García F, Gatell JM, Plana M. ***In vitro effects of the CCR5 inhibitor maraviroc on human T cell function.*** J Antimicrob Chemother. 2013 Mar;68(3):577-86. doi: 10.1093/jac/dks432. Epub 2012 Nov 14. PubMed PMID: 23152485.

10.4. TRABAJOS CIENTÍFICOS PRESENTADOS EN CONFERENCIAS NACIONALES E INTERNACIONALES

- Climent N, **Bargalló ME**, Guardo AC, Arnedo M, Gatell JM, Garcia F, Plana M. ***La expresión de SAMHD1 intracelular se encuentra disminuida en pacientes VIH+ y se asocia al aumento de la expresión del microRNA miR-181^a.*** X Congreso Nacional GESIDA. Póster. Madrid, España. 6- 9 noviembre 2018.
- Torres B, Guardo AC, Fabra A, Leal L, Rovira C, Hurtado C, **Bargalló ME**, Lucero C, Fernández I, Etcheverry-Rufino F, Gatell JM, Plana M and Garcia F. ***Effect of Switching to Raltegravir and/or Adding Losartan on HIV Immune Activation.*** Conference on Retroviruses and Opportunistic infections 2018 (CROI 2018). Póster. Boston, EE.UU. Marzo 4-7, 2018
- Guardo AC, Zarama A, González T, **Bargalló ME**, Rojas J.F, Martínez E, Plana M, Sánchez Palomino S. ***Viral and immune effects of a dose-reduction strategy in suppressed HIV+ patients.*** International AIDS Society (IAS) 2017. Póster. Paris, Francia, Julio 23-26, 2017

- Egaña-Gorroño L, Guardo AC, **Bargalló ME**, Planet E, Vilaplana E, Escribà T, Pérez I, Gatell JM, García F, Arnedo M, Plana M, HIV Controllers Consortium of the AIDS Spanish Network. ***MicroRNA Profile in CD8+ T-Lymphocytes from HIV-Infected Individuals and Disease Progression.*** Conference on Retroviruses and Opportunistic infections 2016 (CROI 2016). Póster. Boston, EE.UU. Febrero 22-25, 2016

- Guardo AC, Leal L, Climent N, León A., **Bargalló ME**, Gatell JM, García F, Plana M. ***Efectos de tres regimens de PEP distintos sobre el Sistema immune de individuos VIH negativos.***VII Congreso Nacional GESIDA. Póster. Madrid, España. 10– 13 Dic 2015.

- Guardo AC, Leal L, Climent N, León A, **Bargalló ME**, Gatell JM, García F, Plana M. ***Effect of three Regimens of PEP on the Immune System of HIV Seronegative Individuals.*** Conference on Retroviruses and Opportunistic infections 2015 (CROI 2015). Póster. Boston, EE.UU. Febrero 23-26, 2015

- **Bargalló ME**, Guardo AC, Maleno MJ, Miralles L, Egaña-Gorroño L, Escribà T, Gatell JM, Arnedo M, Plana M, Mendes, F. ***Inmunomagnetic Separation of Isolated Cells between Hiv-positive Patients and Healty Controls after MiRNA Profiling.*** The 31st World Congress of Biomedical Laboratory Science 2014. Presentación oral Taipei, Taiwan. Octubre 3-7, 2014.

- Guardo AC, Ruiz Riol M, Fernández E, Maleno MJ, **Bargalló ME**, León A, Gatell JM, Brander C, Plana M. ***Mapping and Characterization of HIV-1 Specific immune Responses Present in Highly HIV Exposed Uninfected Individuals.*** AIDS Vaccine 2013. Póster Barcelona, España. Octubre 7-10, 2013

- García F, Guardo AC, Maleno MJ, Papagno L, **Bargalló ME**, Climent N, Autran B, Gatell JM, Gallart T, Plana M, for the DCV2/MANON07 study group. The 31st World Congress of Biomedical Laboratory Science 2014. Presentación oral Taipei, Taiwan. Octubre 3-7, 2014. ***Cellular Immune Responses and Changes in VL after a Dendritic Cells (DC)-based Therapeutic Vaccine in cART Treated Chronic HIV-infected Patients with CD4 T Cells Above 450/mm³.*** AIDS Vaccine 2012. Presentación oral, Boston, EE.UU. Septiembre 9-12, 2012

- Guardo AC, García F, Maleno MJ, Papagno L, **Bargalló ME**, Climent N, Autran B, Gatell JM, Gallart T, Plana M, for the DCV2/MANON07 study group. ***Cellular Immune Responses after a Dendritic Cells (DC)-based Therapeutic Vaccine in cART Treated Chronic HIV-infected Patients.*** European Congress of Immunology 2012. Póster Glasgow, Escocia, Reino Unido. Setiembre 5-8, 2012

- Arberas H, Guardo AC, **Bargalló ME**, Maleno MJ, Calvo M, Blanco JL, García F, Gatell JM, Plana M. ***Analysis Of In Vitro Effects Of The CCR5 Inhibitor Maraviroc On Human T Lymphocytes Functionality.*** International AIDS Society (IAS) 2011. Póster, Roma, Italia, Julio 17-20, 2011.

