

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA**

**DESARROLLO DE UNA VACUNA PREVENTIVA
CONTRA EL VIH, BASADA EN BCG
RECOMBINANTE**

**TESIS DOCTORAL: ELIAS B. PEZZAT SAID
21 DE JUNIO DE 2005**

DIRECTORES :

Dr. Joan Joseph Munné

Coordinador Grupo Investigación y Desarrollo de Vacunas Preventivas frente al VIH. Unidad de Estudio del SIDA. Hospital Clínic Barcelona

Dr. J.Ma. Miró Meda

Consultor y Jefe de Docencia e Investigación del Servicio de Enfermedades Infecciosas, del Hospital Clínic de Barcelona

Dr. J.Ma. Gatell Artigas

Jefe del Servicio de Enfermedades Infecciosas, del Hospital Clínic de Barcelona

ABREVIATURAS

Ad5	Adenovirus tipo 5
7H10	Medio Middlebrook en Placa
7H9	Medio Middlebrook líquido
ADC	Albumina-dextrosa-catalasa
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AIDS	Acquired immunodeficiency síndrome
ALVAC	Avian Pox-virus
AntiFlu	Anticuerpo anti-flu
Antiha	Anticuerpo anti-hema-aglutinina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARV	Antirretrovirales
BCG	Bacillus Calmette Guerin
BCGcs	Bacillus Calmette Guerin cepa salvaje
BCGr	Baillus Calmette Guerin recombinante
BCGlis-	Bacillus Calmette Guerin cepa auxotrófica
BCGwt	Bacillus Calmette Guerin Wild type
BSA	Bovine serum albumin
ConA	Concanavalina A
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
D.O.	Densidad óptica
DC	Dentritic Cells
EF	Electrofóresis
ENI	Expuestos no infectados
Env	Envuelta
G	Glicerol
Gag	Gen gag del VIH-1
GFP	Green fluorescente protein
GMP	Good manufacturing procedures
gp	Glicoproteína
HAART	Highly active antiretroviral therapy
HIS	Histidina
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human leukocyte antigen
HLA	Antígeno humano leucocitario
Hsp 60	Heat shock protein 60
HXBc2	Cepa del VIH de Laboratorio
IFN-γ	Interferon-gamma
IL-2	Interleucina-2
K	Kanamicina

Kb	Kilobases
kDa	Kilo Dalton
LB	Agar millar
LTC	Linfocitos T citotóxicos
LTNP	Long-term no progressor
MHC	Major Histocompatibility complex
mL	Mililitro
Nef	Gen nef del VIH-1
nm	Nanometros
NYVAC	Mammalian Pox-virus
° C	Grados centígrados
p11	Péptido 11
p18	Péptido 18
Pb	Pares de bases
pJH222	Vector puente multicopia episomal
pJH223	Vector puente monocopia integrativo
pMV261	Vector puente multicopia episomal
Pol	Polimerasa
RT	Retrotranscriptasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa
SS	Signal sequency
STI	Structured treatment interruptions
T	Tween 80
Tat	Gen tat del VIH-1
TI	Transcriptasa inversa
TI	Transcriptasa inversa
UFC	Unidades formadoras de placas
ug	Microgramo
ul	Micro litro
VAM	Virus Ankhara modificado
VCP205	Virus canary pox 205
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIHA	Virus de inmunodeficiencia humana subtipo A
VIS	Virus de la inmunodeficiencia de los simios
VISH	Virus de la inmunodeficiencia de los simios y humanos (quimérico)
VL	Viral Load
α-antígeno	Promotor alpha antígeno

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I-1. GENERALIDADES VIH/SIDA	2
I-1.1 Epidemiología	2
I-1.2 Estructura y ciclo vital del VIH	4
I-1.3 Respuesta inmunitaria e infección por el VIH	7
I-1.4 Pacientes expuestos al VIH y no infectados (ENI)	26
I-1.5 Tratamiento antirretroviral de la infección por el VIH	29
I-2. VACUNAS PREVENTIVAS FRENTE AL VIH	48
I-2.1 Introducción	48
I-2.2 Respuesta inmune frente al VIH-1, limitaciones y desafíos	49
I-2.3 Candidatos a vacunas. Ventajas y limitaciones	54
I-2.4 Modelo VIS-macaco de SIDA en simios	59
I-2.5 Diseño y producción de inmunógenos	59
I-2.6 Ensayos clínicos de candidatos a vacunas frente al VIH Decepción y confusión.	61
I-2.7 Novedades y aportaciones, de la Conferencia Mundial sobre vacunas contra el VIH, Lausanne septiembre 2004.	63
I-2.8 Vacunas terapéuticas	65
I-2.9 Conclusiones	66
I-3. VACUNAS FRENTE AL VIH BASADAS EN BCG RECOMBINANTE	70
I-3.1 Introducción y progresos en el estudio de BCGr	70
I-3.2 Expresión de antígenos de VIH y VIS en BCGr e inducción de respuesta inmune	78
I-3.3 Efectos de la pre-inmunización con BCG sobre la respuesta a antígenos extraños expresados en BCGr	80
I-3.4 Inmunización con BCGr en personas con infección por el VIH-1	81
I-3.5 Conclusiones y discusiones	81
I-4. HIPÓTESIS	84
II. OBJETIVOS	86
II-1 OBJETIVO PRINCIPAL	86
II-2 OBJETIVOS SECUNDARIOS	86
III. MATERIAL Y MÉTODOS	
III-1 Diseño del estudio	88
III-2 Ámbito del estudio	88
III-3 Cepas bacterianas y medios de cultivo	89
III-4 Construcción de los vectores de expresión micobacterianos	91
III-5 Evaluación de la expresión de las proteínas heterólogas por W. blot	93
III-6 Procedimientos para la inmunización	93
IV. RESULTADOS	
IV-1. Diseño y Construcción de los vectores de expresión pMV:261VIH-1gp120, pJH222:HIV-1gp120 y	

pJH223:VIH-1gp120	98
IV-2. Transformación de <i>E.coli</i> , con el ADN plásmidico correspondiente a los vectores micobacterianos de expresión 261:VIH-1gp120, 222:VIH-1gp120 y 223:VIH-1gp120	99
IV-3. Confirmación de la clonación del fragmento de ADN correspondiente a la gp120 del VIH-1, en los diferentes vectores de expresión micobacteriano pMV261, pJH222 y pJH223.	100
IV-4. Confirmación del marco de lectura del gen que codifica la proteína entera del VIH-1 (HXBc2)	102
IV-5 Transformación de BCG, con el ADN plásmidico de los diferentes vectores de expresión 261:VIH-1gp120, 222:VIH-1gp120 y 223:VIH-1gp120	102
IV-6 Confirmación de la presencia del inserto VIH-1:gp120 en las diferentes cepas de BCGr	103
IV-7 Caracterización y secuenciación del gen VIH-1gp120	106
IV-8 Análisis de la expresión de la proteína gp120 del VIH-1, en las cepas recombinantes de BCG (261,222 y 223)	109
IV-9 Evaluación <i>in vivo</i> de la respuesta inmune celular específica anti VIH-1, utilizando un modelo animal murino	110
IV-10 Detección de ARNm del IFN- γ , de ratón mediante RT-PCR	112

V. DISCUSIÓN 116

VI. CONCLUSIONES 130

VII. ANEXOS (Técnicas y Procedimientos) 133

VII-1. Cepas bacterianas y medios de cultivo	133
VII-2. Construcción de los vectores de expresión	135
VII-2.1. Vectores de expresión micobacteriano	135
VII-2.2. Inserto: FLHIV-1gp120HXBc2+FLU+HIS	136
VII-2.3. Reacción en cadena de la polimerasa PCR	137
VII-2.4. Electroforesis	138
VII-2.5 Extracción de ADN procedente de electroforesis	139
VII-2.6. Purificación del ADN amplificado por PCR	140
VII-2.7. Digestión con enzimas de restricción del ADN inserto	141
VII-2.8. Digestión con enzimas de restricción de ADN plasmídico	141
VII-2.9. Defosforilación del vector digerido	142
VII-2.10. Inactivación de la Fosfatasa alcalina	142
VII-2.11. Control electroforético de los ADN inserto y Vector digeridos y purificados	142
VII-2.12. Ligación	143
VII-2.13. Transformación y selección de clones de <i>E.coli</i>	144
VII-2.14. Extracción de ADN plasmídico en pequeñas cantidades	145
VI-2.14.1..Miniprep	145
VI-2.14.2 Digestion del ADN miniprep	146
VII-2.15 Extracción de ADN plasmídico en cantidades mayores	147
VI-2.15.1 Maxiprep	147
VI-2.15.2 Digestión del ADN maxiprep	147
VII-2.16 Caracterización y secuenciación del ADN	148

VII-2.16.1. PCR para secuenciación	148
VII-2.16.2. Precipitación de ADN para secuenciar	149
VII-2.17 Transformación de BCG por electroporación	150
VII-3. Evaluación de la expresión de las proteínas	
Heterologas in vitro	151
VII-3.1. Preparación del pellet	151
VII-3.2. Sonicación del pellet de células recién centrifugadas o descongeladas	152
VII-3.3. Cuantificación de las proteínas ensayo Bradford	152
VII-3.4. Western blot	153
VII-4 preparación del stock vacunal	155
VII-4.1 Expansión de colonias transformadas y congelación a -80 ° C	155
VII-4.2 Titulación del stock vacunal de BCGr	156
VII-5. Evaluación <i>in vivo</i> de la respuesta inmune específica al VIH en un modelo experimental murino	156
VII-5.1.Preparación del inóculo vacunal de BCGr Y BCGwt para inmunizar ratones.	157
VII-5.2. Obtención y cultivo de esplenocitos	158
VII-5.3 Inducción del IFN-gamma en esplenocitos	159
VII-5.4 Detección de IFN-gamma por ELISA	159
VII-5.5 Tetrámeros	160
VII-5.6 Extracción del ARN total	161
VII-5.7 Cuantificación del ARN	162
VII-5.8 RT-PCR de IFN-gamma	163
VII-5.9 PCR del ADN IFN- γ	163
VII-5.10 Ensayo de inmunización en ratones, aplicando la técnica de RT-PCR para detectar IFN- γ	164
VIII. BIBLIOGRAFÍA	166
IX. MANUSCRITOS EN PREPARACIÓN Y COMUNICACIONES ESCRITAS ACEPTADAS Y PRESENTADAS, EN CONGRESOS INTERNACIONALES	183