

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**“CONSTRUCCIÓN DE INMUNÓGENOS  
EN BASE DE EPÍTOPOS VARIABLES DE VIH-1”**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA**

**BIOL. CÉSAR PEDROZA ROLDÁN**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN**

**CIUDAD UNIVERSITARIA**

**FEBRERO DEL 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la dirección del  
Dr. Karen Manoutcharian Airapetian

A mi padre,

Que siempre me apoyaste y me enseñaste el valor del trabajo y el sacrificio para cumplir nuestras metas. Me diste lo justo para saber valorar los detalles más importantes y más por el contrario derrochaste orgullo de mí ante los demás. No esperaste a ver este momento, mas ahora debes saber que donde quiera que estés, yo me siento orgulloso de ti.

A mi hermano Jesús,

Que quizá por ser el mayor, fuiste mi segundo padre, que quizá por ser el primero entendiste el valor de la responsabilidad y del amor antes que yo, me enseñaste el mundo y el valor de la alegría siempre, te fuiste sin despedirte y yo sé cuan orgulloso te sentías de mi y cuanto deseabas estar conmigo en este momento, ahora yo te debo decir cuan orgulloso estoy de ti donde quiera que estés y siempre estarás a mi lado.

Descansen tranquilos.

A mi madre y mi hermano Hugo, Lucy y mis niños,  
Por estar en el momento preciso, juntos y siempre con su apoyo.

A Claudia  
Por ser la fortaleza en mi vida, por siempre estar a mi lado.

A mi bebe Grecia,  
Por ser la felicidad más grande en mi vida.

A mi familia de Monterrey,  
Una oración siempre es escuchada.

Siempre Juntos, Siempre.

## **AGRADECIMIENTOS.**

A Karen, por tu apoyo, tus consejos, tus ideas, gracias por la formación que me diste y confiar en mí.

Agradezco el apoyo y guía de mi comité tutorial, Dres. Karen Manoutcharian, Goar Gevorkian y Luis Vaca Domínguez.

Al jurado de examen por la revisión y sugerencias en la redacción de la presente tesis, Dres. Karen Manoutcharian, Leticia Rocha, Gustavo Reyes Terán, Luis Felipe Montaña, Constantino López Macías.

A la M en C. María Elena Munguía y al Biol. Gonzalo Acero Galindo por su invaluable asistencia técnica para el desarrollo del presente trabajo.

A mis compañero de laboratorio por su apoyo y amistad, Iván, Francisco, Jairo, Jorge, Pancho, Mariel, Gonzalo.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, a la Dirección General de Estudios de Posgrado y a la UNAM, por haberme brindado todas las facilidades para poder realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme brindado una beca para poder realizar mis estudios de doctorado.

## ÍNDICE.

<b>INTRODUCCIÓN.</b>	1
<b>ANTECEDENTES.</b>	3
<b>Virus de la Inmunodeficiencia Humana: descubrimiento y posible origen</b>	3
<b>Organización genómica y estructura</b>	3
<b>Ciclo de replicación viral</b>	7
<b>VIH y su interacción con el sistema inmunológico.</b>	8
<b>Importancia de la respuesta inmune celular en la contención de la carga viral</b>	9
<b>Vectores de expresión</b>	10
<b>Mecanismo de escape de VIH del sistema inmune</b>	11
<b>Efectos de la variación antigénica viral sobre el sistema inmune</b>	12
<b>JUSTIFICACIÓN.</b>	15
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.</b>	19
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	20
<b>Diseño de oligonucleótidos</b>	20
<b>Construcción de los inmunógenos</b>	20
<b>Selección de antígenos, extracción de cadena sencilla y secuenciación de ADN</b>	25
<b>Rescate de bibliotecas en fago y obtención de antígenos</b>	26
<b>Extracción de ADN plasmídico para inmunización</b>	26
<b>Ensayos de proliferación celular e incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina</b>	27
<b>Análisis por citometría de flujo (FACS)</b>	27
<b>Modelación <i>in silico</i> y obtención de afinidades teóricas (Kds)</b>	28
<b>Análisis estadístico</b>	28
<b>RESULTADOS.</b>	29
<b>Construcción de los inmunógenos</b>	29
<b>Las Bibliotecas de Epítomos Variables (BEVs) tienen la capacidad de inducir respuesta celular específica contra variantes.</b>	30
<b>Las Bibliotecas de Epítomos Variables tienen la capacidad de estimular la generación de células T CD8+IFN-<math>\gamma</math>+</b>	34
<b>Los índices de estimulación <i>in vitro</i> correlacionan con la estabilidad del complejo péptido-CPH I: un acercamiento bio-informático.</b>	37
<b>Las Bibliotecas de Epítomos Variables tienen la capacidad de generar memoria celular específica.</b>	38
<b>La inmunización de antígenos nominales seguido de la inmunización con BEVs disminuye la capacidad del sistema inmune para responder contra variantes del antígeno.</b>	41
<b>DISCUSION Y CONCLUSION.</b>	43
<b>PERSPECTIVAS.</b>	50
<b>REFERENCIA.</b>	52

## **RESUMEN.**

La variación antigénica es uno de los principales obstáculos para vacunas contra patógenos antigénicamente variables (PAVs). En este trabajo, se presenta el desarrollo de nuevos inmunógenos llamada Bibliotecas de Epítomos Variables (BEVs). Esta estrategia utiliza una mezcla de miles de variantes de un solo epítopo. Para el desarrollo de los experimentos, fue utilizado un epítopo inmuno-dominante de VIH (RGPGRAFVTI), el cual es reconocido por células T CD8+. Se construyeron inmunógenos en forma de ADN y fagos recombinantes que expresan variantes de este epítopo al reemplazar por aminoácidos al azar de 2 a 5 posiciones dentro de la secuencia original. Ensayos de proliferación celular y análisis por citometría de flujo revelaron que los grupos inmunizados con las BEVs desarrollaron una mejor respuesta celular reconociendo a más del 50% de las variantes en comparación con los grupos inmunizados con epítopo nominal. Esta respuesta celular resultó además, ser de larga duración. Después de 12 meses de la primera inmunización, las variantes fueron reconocidas y se indujo células T efectoras de memoria. Por otro lado, los ratones inmunizados por primera vez con el epítopo nominal y 8 ó 12 meses más tarde inmunizados con BEVs, no fueron capaces de reconocer las variantes. Estos datos dan una posible explicación al fracaso de los ensayos clínicos de vacunas contra el VIH y destacan el principal obstáculo en el desarrollo de vacunas dirigidas hacia otros PAVs y cáncer. Se sugieren que las BEVs pueden ser una plataforma confiable de vacunas contra la variabilidad antigénica.

## **SUMMARY.**

While the antigenic variability is the major obstacle for developing vaccines against antigenically variable pathogens (AVPs), we developed a novel variable epitope library (VEL)-based vaccine strategy, using immunogens carrying a mixture of thousands of variants of a single epitope. We used an immunodominant HIV-1-derived CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-lymphocyte (CTL) epitope as a model antigen to construct immunogens in the form of plasmid DNA and recombinant M13 bacteriophages. We generated combinatorial libraries expressing epitope variants with random amino acid substitutions at 2–5 amino acid positions within the epitope. Mice immunized with these immunogens developed epitope-specific CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-cell responses that recognized more than 50% of heavily mutated variants of wild-type epitope, as demonstrated in T-cell proliferation assays and FACS analysis. Strikingly, these potent and broad epitope-specific immune responses were long lasting: after 12 months of priming, epitope variants were recognized by CD8<sup>+</sup> cells and effector memory T cells were induced. In addition, the mice primed with wild-type epitope and 8 or 12 months later immunized with VELs, were not able to recognize variant epitopes efficiently. These data may give a mechanistic explanation for the failure of recent HIV vaccine trials as well as highlight specific hurdles in current molecular vaccine efforts targeting other important antigenically variable pathogens and diseases. These findings suggest that the VEL-based strategy for immunogen construction can be used as a reliable technological platform for the generation of vaccines against AVPs and contribute to better understanding complex host–pathogen interactions



## **ABREVIATURAS.**

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
E. coli	<i>Escherichia coli</i> .
LTNP	Long term non progresors, no progresores, progresores lentos.
LTR	Long terminal repeat.
SIDA	Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida.
VIH	Virus de la Inmuno Deficiencia Humana.
VIS	Virus de la Inmuno Deficiencia de Simio.
IFN- $\gamma$	Interferón gamma.
LTCs	Linfocitos T citotóxicos.
RCT	Receptor de Células T.
RDC	Región determinante de complementariedad.
CPH	Complejo principal de histocompatibilidad.
CPA	Célula presentadora de antígeno.
PAVs	Patógenos antigénicamente variables.
BEVs	Biblioteca de epítomos variables.

## INTRODUCCIÓN.

Se ha estimado que 33.4 millones de personas viven con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), en el curso del año 2008 aproximadamente 2.7 millones de personas resultaron infectadas y 2 millones perdieron la vida a causa del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). El área del Sub-Sahara en África, prevalece como la región más afectada por el VIH; actualmente representa el 67% de los casos mundiales, en esa región se generan el 68% de las nuevas infecciones en adultos, así como, el 91% de casos en niños. También esta región representa el 72% de las muertes relacionadas con SIDA en el mundo. Debido a esto, la infección por VIH se ha convertido en una epidemia de importancia global (UNAIDS informe sobre la epidemia mundial de SIDA, 2009. <http://www.unaids.org/>).

Los intentos hasta hoy descritos para el desarrollo de vacunas no han generado resultados y no existe grandes expectativas para el desarrollo de una vacuna importante durante la próxima década. Uno de los principales obstáculos para el desarrollo de una vacuna eficaz ha sido la variabilidad antigénica del virus, el VIH presenta una capacidad de mutación muy importante lo que le confiere gran resistencia y capacidad de adaptación al huésped. Hasta hoy las vacunas no incluyen en su diseño un esquema el fenómeno de la variabilidad antigénica del virus, por lo que posiblemente las vacunas actuales esta condenadas al fracaso.

En el presente trabajo, nosotros proponemos la utilización de bibliotecas de epítomos variables (BEVs) en base de un epítomo inmuno-dominante del VIH llamado L (RGPGRAFVTI). Esta biblioteca presenta de característica esencial, el tratar de imitar la variabilidad antigénica del VIH. Esta biblioteca presenta 5 posiciones degeneradas donde puede existir cualquiera de los 20 aminoácidos naturales. La administración simultánea de variantes (BEVs) en modelo murino permitió la estimulación y reconocimiento de variantes individuales del epítomo nominal L; además, de permitir la generación de una respuesta de linfocitos T CD8+ productores de IFN- $\gamma$ . Esta respuesta fue dependiente de la complejidad de aminoácidos mutados en el inmunógeno. Por otro lado, la administración de BEVs permitió la generación de memoria de largo plazo en los ratones inmunizados, llegando a detectar LTCs específicos contra variantes hasta 8 meses después de una sola administración del inmunógeno. Un fenómeno interesante abordado durante el curso del presente trabajo fue la generación de interferencia inmunológica por la administración primaria de antígenos nominal y posteriormente la administración de BEVs. Este fenómeno, ya descrito previamente mas no a nivel de epítomos fue llamado pecado original antigénico.

Así pues, esta es la primera vez que se describe la utilización de variantes de un epítomo para su administración como inmunógenos para estimular una respuesta inmune celular amplia y diversa que permita el reconocimiento de variantes, permitiendo ir un paso adelante de lo que pudiera el virus establecer durante un proceso de infección.

## **ANTECEDENTES.**

### **Virus de la Inmunodeficiencia Humana: Descubrimiento y posible origen.**

En 1983, Barré-Sinoussi, Cherman, Montagnier y asociados en el Instituto Pasteur en Francia, aislaron un virus de un paciente con síndrome de linfo-adenopatía (LAS) persistente que contenía la proteína transcriptasa reversa [1] lo que hizo pensar que este virus estaba asociado con el SIDA, pero no se logró un resultado concluyente en este estudio. Se planteó la posibilidad de que este virus fuera un miembro de los virus de leucemia de células T (HTLV), esta conclusión se planteó cuando Gallo R y colaboradores aislaron un virus de HTLV de individuos con SIDA [2]. Pero se plantearon dudas debido a que este grupo de virus (HTLV) immortalizaban las células CD4+, lo cual no explicaba como los individuos con SIDA presentaban niveles menores de los normales de estas células. Estudios posteriores de Montagnier y colaboradores demostraron que la enfermedad del SIDA era posiblemente causada por otro agente viral parecido a HTLV al que llamaron LAV (virus linfo-adenopático asociado) ya que ambos infectaban células T CD4+, pero la característica diferencial de ambos agentes es que HTLV immortaliza las células y LAV las destruye [3]. En 1984 Gallo y colaboradores aislaron un nuevo tipo de virus y le asignaron el nombre de HTLV-III, este presentaba las mismas características de virus aislado por Montagnier [4]; más tarde Levy y colaboradores aislaron de grupos de alto riesgo un retrovirus al que llamaron virus asociado a SIDA (ARV), este presentaba reacción cruzada con los virus aislados por Montagnier y además destruía células CD4+ [5]. En 1986 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus reunió la información de los tres aislados (LAV, HTLV-III y ARV) para asignarle un nombre y darlo a conocer a la sociedad como un nuevo virus al que se llamó Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

Las hipótesis sobre el origen del VIH son variadas, una de las hipótesis más aceptadas es que el virus fue transferido de los primates a humanos, esto debido a una conexión entre el virus de inmunodeficiencia de simio (VIS) y VIH tipo 2. Las evidencias surgen de la aparición de una cepa de VIS con homología a VIH-2 en un individuo en Liberia [6], además de la relación estrecha entre la secuencia de ADN de aislados de VIS en África y VIH-2 [7;8].

### **Organización genómica y estructura.**

El genoma de VIH está compuesto por 2 cadenas de ARN positivo de peso aproximado de 9.8 kilobases (kb) el cual se encuentra empacado dentro del virus. Este genoma codifica 9 marcos de lectura, 3 de los cuales codifican para las proteínas Gag, Pol y Env quienes, mediante proteólisis y procesamiento, conforman la parte estructural del virus. El genoma del virus además codifica para

6 proteínas accesorias que están involucradas en la función reguladora de la generación y supervivencia del virus en la célula hospedera [9].

El transcrito primario, después de la integración del genoma del virus a la célula huésped, es un ARN mensajero completo que codifica a un precursor completo de Gag-Pol. Este precursor es procesado por la enzima proteasa del virus. El precursor Gag es una poli proteína que se ensambla a sí misma en la membrana de la célula formando un virión inmaduro. De la proteína Gag, por procesamiento, se obtienen las proteínas de matriz (MA), cápside (CA), núcleo-cápside (NC) y la proteína p6. Por otro lado, del precursor Pol se obtienen las proteínas con actividad enzimática como la proteasa (PR), la transcriptasa reversa (RT) y la integrasa (IN) que le permiten al virus formar ADNc, integrar su genoma al ADN de la célula huésped y procesar los productos de la expresión de estos genes. El gen *env* expresa un precursor de 160 kDa el cual es procesado por proteasas de la célula huésped en 2 proteínas importantes: gp120 y gp41, ambas de importancia en el ciclo de vida del virus debido a que interactúan con los receptores en las células y así permiten la entrada del virus [9].

### **Proteínas estructurales.**

#### **Precursor Gag.**

El precursor Gag p55 es procesado por la enzima proteasa codificada por el virus, los productos de este procesamiento son la proteína MA y la proteína CA; esta última genera la estructura tipo cónica del virus y contiene a las dos cadenas de ARN genómico [9]. El precursor Gag p55 contiene 3 dominios funcionales: el dominio de unión a membrana (M), el dominio de interacción Gag-Gag y el dominio tardío. En particular, el dominio M está localizado en la región N-terminal de MA y consiste, en su mayoría, de aminoácidos básicos; presenta también aminoácidos miristilados los cuales sirven de anclaje y estabilización de la membrana lipídica [9].

#### **Precursor Env.**

El VIH es un virus que presenta una membrana plasmática como envoltura, en donde se encuentran insertadas proteínas tanto de la célula que infectó como proteínas que son importantes para su ciclo de infección: las proteínas gp120 y gp41, moléculas altamente glicosiladas que son utilizadas por el virus para entrar en la célula mediante su interacción con la molécula CD4 y otros receptores celulares [10].

Las proteínas de envoltura son inicialmente sintetizadas como un precursor de 160 kDa el cual es procesado por la enzima celular furina o enzima parecida a furina [11]. La proteína gp120 o de superficie (SU) es una molécula altamente glicosilada, se estima que el 50% del total del peso de

la proteína son residuos de carbohidratos, esta proteína no presenta dominios transmembranales y es mantenida en la superficie mediante interacciones proteína-proteína con la molécula gp41[12;13].

La conformación tomada por gp120 le permite la formación de trímeros en la superficie. Esta proteína está conformada por 5 regiones constantes (C1-C5) intercaladas con 5 regiones variables (V1-V5), la región C-terminal de la porción conservada C4 es la responsable de la interacción con la región D1 de la molécula CD4, esta interacción es un paso importante para la entrada del virus a la célula [9]. Las regiones variables de gp120 con excepción de V5 están formando loops estabilizados por puentes disulfuro [10]. La proteína gp41 es una molécula transmembranal localizada en la membrana del virus, su función es mediar la fusión entre la membrana viral y la membrana celular después de la unión del gp120 al receptor de la célula [14]. Esta proteína está compuesta de un ecto-dominio N-terminal, un dominio transmembranal y un segmento intraviral C-terminal que interacciona con la proteína TM derivada de Gag [9]. El dominio N-terminal o también llamado péptido de fusión es un segmento que inicia la fusión de las membranas y permite la entrada del virus a la célula; este péptido es hidrofóbico además de ser rico en glicinas [9].

Otras proteínas importantes del virus son descritas brevemente en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Proteínas de VIH y su función (Adaptada de Turner et al, 1999).

Proteína	Tamaño (kDa)	Función
Gag	p24(p25)	Cápside (CA) proteína estructural. Ensamblaje de la partícula viral e infectividad.
	p17	Matriz (MA) proteína miristilada. Estabiliza la incorporación de las proteínas Env en los viriones maduros.
	p6	Participa en gemación.
	p7	Proteína de la nucleocápside (NC); ayuda en la transcripción reversa.
Polimerasa (Pol)	p66, p51	Transcriptasa reversa (RT); RNAsa H dentro del core.
Proteasa (PR)	p10	Procesamiento post-traducciona de proteínas virales.
Integrasa (IN)	p32	Integra el ADNc viral en el ADN celular.
Envoltura (ENV)	gp120	Proteína de superficie (SU). Interacción con receptores de la célula al momento de iniciarse la entrada del virus.
	gp41	Proteína transmembranal (TM). Media la fusión de la membrana viral con la celular después de la interacción con ENV.
Tat	p14	Transactivación. Permite la elongación eficiente durante la transcripción.
Rev	p19	Regula la expresión viral del ARNm.
Nef	p27	Puede incrementar o decrecer la replicación viral.
Vif	p23	Incrementa la infectividad del virus y la transmisión célula: célula; ayuda en la síntesis de ADN proviral y/o al ensamblaje.
Vpr	p15	Ayuda en la replicación viral y en la transactivación.
Vpu	p16	Ayuda en la liberación viral; rompe los complejos gp120/CD4.
Vpx	p15	Ayuda a la infectividad.

## **Ciclo de replicación viral.**

### **Fase temprana.**

El VIH se une específicamente a través de la molécula gp120 a la molécula CD4 [10;13]. La región de gp120 responsable de la interacción está localizada en los dominios conservados C3 y C4, las cuales interactúan con la región D1 de la molécula CD4 [10]. Este evento no es suficiente para la entrada del virus a la célula ya que es necesario que la región V3 de gp120 realice una interacción adicional con una molécula que funcionará como co-receptor; es en este punto donde se clasifican los virus según el co-receptor que utilicen y dependerá de la secuencia del loop V3 de gp120: los virus con tropismo a macrófagos utilizan el receptor de quimiocinas CCR5 y no son formadores de sincisios, en cambio, los virus que utilizan el receptor de quimiocinas CXCR4 infectan células T y estos virus son formadores de sincisios celulares [14].

La unión de la región C4 (gp120) con la región D1 (CD4) provoca un cambio de conformación, éste permite que la región V3 interactúe con el co-receptor provocando un nuevo cambio en gp120 que expone el ecto-dominio de gp41, esta molécula contiene una región hidrofóbica, también llamado “péptido de fusión” el cual es insertado en la membrana celular. Esta serie de eventos permite la fusión de la membrana tanto viral como celular y la entrada del virus a la célula [11]; una vez que la partícula viral entra al citoplasma de la célula, ocurre la salida del material contenido dentro del virus (uncoating). La transcriptasa reversa inicia la síntesis del ADN complementario utilizando como templado el ARN viral. El ADN viral recién sintetizado es transportado al núcleo por el complejo de pre integración el cual contiene la enzima IN además de proteínas accesorias como Vpr. Una vez dentro del núcleo la enzima integrasa comienza la integración de ADN viral dentro del genoma de la célula huésped. La enzima integrasa elimina algunos nucleótidos del extremo 3' de ambas cadenas lo que genera extremos cohesivos, esta misma enzima realiza cortes en el ADN genómico de la célula y por una reacción de transferencia de cadenas se unen los extremos del ADN viral con el ADN cromosómico; las enzimas celulares reparan cualquier daño que se presentara en este proceso [11].

### **Fase tardía.**

La fase tardía del ciclo de infección inicia con la expresión de ARNs de diferentes tipos como: a) ARN sin procesar, los cuales codifican precursores como Gag/Pol además de ser utilizados como ARN viral que será empacado en nuevas partículas, b) ARNs parcialmente procesados que codifican al precursor Env y las proteínas accesorias Vif, Vpu y Vpr y por último c) los ARNs con procesamiento múltiple que codifican proteínas como Rev, Tat y Nef, estas últimas



de expresión temprana. Después de la síntesis de las proteínas, estas son transportadas a la membrana de la célula donde son reclutadas por una proteína llamada Pr55Gag, esta proteína contiene sitios blanco de anclaje a la membrana celular además de permitir la interacción de las proteínas Gag, encapsular el ARN viral, asociar las glico-proteínas Env y estimular el desprendimiento del virus de la membrana celular [11;14].

### **VIH y su interacción con el sistema inmunológico.**

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es caracterizado por la pérdida progresiva de células CD4+ el cual finaliza con la inmunodeficiencia [15]. Previamente, se creía en la hipótesis de una pérdida lenta y progresiva de este tipo de células a través del curso de la infección (1% diario) en fase crónica y el 20% en fase aguda [16], pero se ha reportado que durante la etapa aguda de la infección existe una caída de cerca del 60% al pico de esta fase (día 10) del total de células CD4+ presentes en lamina propia del intestino de monos [17;18], por lo que se genera una nueva visión sobre el desarrollo de la infección en esta etapa. Los mecanismos involucrados con la desaparición de estas células parecen estar mediados por citotoxicidad causada por el virus o lisis dependiente de células T, se calcula que el 20% de la depleción celular es causada directamente por la infección. Otro mecanismo de depleción celular que se ha considerado es la apoptosis mediada por el ligando Fas inducida por la proteína de envoltura Env del virus [19].

Un elemento importante de la respuesta inmune contra la infección son las célula T; que involucra la activación de células CD4+ cooperadoras (T helper cells) y Linfocitos T citotóxicos (LTCs) CD8+. La activación de células CD4+ es resultado de la interacción del receptor de células T (RCT) con un antígeno procesado en endosomas y presentado en contexto del complejo principal de histocompatibilidad clase II (CPH II), por una célula presentadora de antígeno (CPA) [11]. Una vez activada una célula CD4+, secreta citocinas que a su vez activan otras poblaciones celulares como las células CD8+ (IL-2 y IFN- $\gamma$ ) y células B secretoras de anticuerpos (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10). Por otro lado, la activación de LTCs proviene de la interacción del RCT con un antígeno procesado en citosol y presentado en contexto del complejo principal de histocompatibilidad clase I (CPH I) por una CPA [11]. La célula activada tiene un efecto citotóxico sobre aquellas células que presentan el antígeno que las activó, identificándolas y secretando enzimas como perforinas y granzimas, las cuales destruyen la célula blanco. Otra propiedad de una célula T citotóxica activada es la secreción de algunas moléculas las cuales tienen efectos antivirales como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) [11].

### **Importancia de la respuesta inmune celular en la contención de la carga viral.**

La importancia de la respuesta inmune celular radica en que es un medio de reducción importante de la carga viral en el organismo y contención de la aparición de SIDA [20]. Las evidencias existentes sobre el papel de LTCs en la contención del virus son: la disminución de la carga viral en la fase aguda de la infección correlaciona con la aparición de LTCs específicos para epítomos de VIH; segundo, LTCs tomadas de pacientes infectados con VIH inhiben la replicación viral en cultivos de células CD4+ infectadas *in vitro* [21].

Jin y colaboradores demostraron la importancia de los LTCs en la contención de la carga viral utilizando como modelo macacos infectados con VIS. Mediante depleción celular utilizando un anticuerpo anti-CD8 se logró la reducción de las células CD8+ en un 99%; al mismo tiempo se midió la carga viral en plasma demostrando un incremento de esta de 1 a 3 órdenes de magnitud en los 5 monos estudiados [20]. En humanos se ha demostrado que las células CD8+ específicas contra epítomos derivados de proteínas de VIH son importantes en la contención de la carga viral. Borrow P y colaboradores demostraron la aparición de LTCs específicos contra proteínas derivadas de VIH como Env, Gag, Pol, Nef y Tat en pacientes en fase aguda de infección. Los pacientes que mostraron mayor actividad LTC contra estas proteínas alcanzaron una reducción de la carga viral en comparación con un paciente que no generó una respuesta activa importante sugiriendo la importancia de la aparición de LTCs específicos en la contención de la carga viral [22].

La infección crónica por VIH está asociada a una respuesta mono-funcional caracterizada por una baja frecuencia y/o diversidad de células T CD4+ y CD8+ que secretan IFN- $\gamma$ , en contraste con infecciones ocasionadas por EBV (Epstein-Barr Virus), CMV (Citomegalovirus) y pacientes progresores lentos infectados por VIH que son caracterizados por una respuesta poli-funcional y de alta frecuencia de células T CD8+ y CD4+ [23]. El estudio de una cohorte de 10 individuos infectados por más de una década y que presentaban cargas normales de células CD4+ (progresores lentos), mostró que los 10 individuos infectados presentaban una fuerte actividad mediada por LTCs en comparación con una respuesta débil de anticuerpos neutralizantes [24], lo que indicaría que la actividad de los LTCs específicos para VIH es en parte responsable en la progresión lenta de la infección en los individuos estudiados [25]. La limitación de la carga viral *in vivo* no solo es resultado de la lisis de células infectadas por LTCs específicos [26], también se ha reportado que las células T CD8+ y CD4+ activadas tienen la capacidad de secretar quimiocinas como MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES, las cuales inhiben la entrada del virus mediante competencia por el co-receptor de quimiocinas CCR5 y CXCR4 de células T CD4+ y macrófagos, respectivamente [11].

### **Vectores de expresión.**

La importancia de la protección mediada por células T durante el curso de la infección por VIH ha sido demostrada por diferentes experimentos como se describió anteriormente. Bajo este criterio se han desarrollado diferentes inmunógenos que permiten la generación de una respuesta inmune celular específica contra proteínas virales de VIH [27]. Actualmente se encuentran en curso ensayos clínicos en diferentes fases, la mayoría de estas pruebas se encuentran en fase I y II. Dentro de los prototipos de vacunas que se han desarrollado y se están probando se encuentran las vacunas de ADN plasmídico, vaccinia virus ankara modificado, canarypox virus, fowlpox y vectores adeno-virales, más recientemente se ha incluido adeno-asociados virales, virus de encefalitis equina y lipopéptidos derivados de la proteína gp120 [28].

### **Vacunas de ADN.**

La importancia de esta estrategia radica en que imitan a las vacunas vivas atenuadas pero sin el riesgo patogénico que esto implica [29]. Genes procedentes del virus pueden ser introducidos en estos vectores y a su vez eliminar aquellas proteínas virales que representan un riesgo para el individuo [29;30]. Una consideración importante en el uso de estas vacunas es que tienen la capacidad de inducir una respuesta celular CD4+/CD8+ específica contra las proteínas que expresa el vector. Así pues, se pueden insertar genes de proteínas completas como en el caso del gen gag/pol y env de VIH o solamente utilizar epítomos LTCs definidos derivados de estas proteínas [31-33]. Este tipo de vacunas han sido ampliamente examinadas en macacos como modelo de SIDA y se ha encontrado que su administración tanto sola como en combinación con proteínas virales recombinantes puede proveer una protección parcial contra el reto con virus homólogos [34]. La importancia de estos ensayos es que estas vacunas pueden aminorar la depleción de células CD4+ y en consecuencia la aparición de SIDA, la desventaja más importante en que no son tan potentes en humanos además, de que se requieren grandes cantidades para realizar una inmunización [29].

### **Despliegue en Fagos.**

La tecnología de despliegue en fagos es una técnica de expresión de moléculas en bacteriófagos, en la cual un péptido o proteína es fusionada genéticamente a una de las proteínas de superficie de un bacteriófago o fago filamentoso, desplegando el péptidos/proteína de interés en la superficie del fago [35].

El fago M13 es comúnmente utilizado en esta metodología, éste mide 6.5 nm de diámetro y 930 nm de longitud, su masa total está constituida por un 87% de proteína, posee un genoma de

ADN de cadena sencilla (ADNss) empaquetado en un cilindro de proteínas en las cuales se incluyen: pIII, pV, pVI, pVII, pVIII y pIX [35].

Las ventajas del uso de esta metodología son las siguientes:

1. La manipulación *in vitro* de los fagos es sencilla, rápida y de bajo costo, por lo que permite la generación de una gran cantidad de la proteína de interés.
2. A diferencia de los fagos líticos, el fago M13 no lisan a sus hospederos dando gran ventaja al proceso de obtención y purificación de las partículas virales.
3. La fusión genética de las proteínas de interés al genoma del fago, da la ventaja de poder extraer la cadena sencilla de ADN de éste y conocer la secuencia de la proteína fusionada.
4. Se ha comprobado que el fago por sí mismo es un potente inmunógeno por lo que no es necesario el uso de adyuvantes al inmunizar [36].
5. Nuestro grupo de trabajo conoce y domina la técnica, la cual ha sido utilizada en múltiples trabajos publicados [37-39].

Esta tecnología ha sido empleada en el estudio del VIH/SIDA para el mapeo de anticuerpos monoclonales anti-VIH, evaluaciones inmunogénicas de gp120, así como en la búsqueda de epítomos/mimótopos reconocidos por sueros policlonales de pacientes infectados [35;40;41]; en el presente trabajo, se reporta por primera vez la utilización de este tipo de bacteriófagos y su utilización como antígenos en ensayos de estimulación celular

### **Mecanismos de escape de VIH del sistema inmune.**

Uno de los principales problemas que se han encontrado durante los ensayos de vacunas terapéuticas y/o preventivas es la variabilidad antigénica de los epítomos de VIH/VIS que resulta en escape a la respuesta de LTCs [42;43]. Se ha reportado que la tasa de mutación del virus es de  $10^{-5}$  por base por generación, si se toma en cuenta que el genoma del virus es de aproximadamente  $10^4$  pares de bases y que se ha encontrado que se generan  $10^9$ - $10^{10}$  partículas virales cada día, obtendríamos  $10^8$  mutantes diarias; aunado a esto se ha descrito que la posibilidad de recombinación por dos o más virus se puede llevar a cabo dentro de la célula huésped lo que puede ser una causa inmediata de generación de un mosaico de virus [44]. Por lo tanto el sistema inmune es retado cada día con esta cantidad de partículas virales; cabe destacar que la mayoría de estas partículas virales generadas no son viables para infectar nuevas células [28].

### **Escape por recombinación viral.**

La recombinación es una de las mayores fuentes de heterogeneidad genética de las poblaciones del virus de la inmunodeficiencia humana [45]. Se ha reportado que una célula infectada puede tener de 1 a 8 pro-virus diferentes contribuyendo con una copia cada uno [46;47]. Esto implica que las mutaciones puntuales y la recombinación son mecanismos importantes en la evolución del virus en el huésped [48]. Este proceso contribuye en la resistencia a drogas antivirales [49], la variación antigénica del virus y la generación de nuevos subtipos de virus que aparecen en la población, entre otros [45].

### **Escape por mutaciones puntuales.**

Las mutaciones puntuales generadas por el virus también son una fuente importante de variabilidad en las poblaciones del virus en el individuo infectado. Como ya se ha comentado previamente la tasa de mutación de los retrovirus se ha calculado en un rango de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  sustituciones por nucleótido copiado. La tasa de mutación de VIH se ha calculado en  $8.5 \times 10^{-5}$  mutaciones por base por ciclo de replicación. Las causas de esta tasa de mutación son: la baja fidelidad de la transcriptasa reversa de ARN comparadas con las ADN polimerasas virales. Segundo, la carencia de un sistema de corrección de lectura 3'-5' [50] lo que provoca mutaciones dentro de los epítomos reconocidos por moléculas del sistema inmune y también en las regiones alrededor del epítomo que a su vez afecta el procesamiento correcto del epítomo.

### **Otros mecanismos de escape de VIH a la respuesta inmunológica.**

Otro mecanismo que se ha relacionado con el escape del virus es la eliminación de células antígeno específicas CD4+ y CD8+; reportes indican que el continuo reto del virus por la generación de nuevas variantes generan una desaparición exhaustiva de LTCs que previamente proliferaron para contener la fase aguda de la infección [51]. Los mecanismos implicados en esta depleción celular son: formación de sincisios celulares, acumulación de ADN/ARN no integrado, cambios en la membrana por la salida de partículas virales, degradación del ARNm de la célula, destrucción de la célula por la respuesta celular generada, entre otros [19].

### **Efectos de la variación antigénica viral sobre el sistema inmune.**

Las células CD4 una vez infectadas por VIH inician la presentación de epítomos derivados de las proteínas virales en sus respectivos CPHs, esta presentación del epítomo genera una activación de células T específicas CD4+ y CD8+. Los LTCs específicos eliminan aquellas células que presenten este epítomo en su superficie mediante su reconocimiento por el RCT, pero en caso de

que el epítomo presente una mutación puntual puede dar lugar al no reconocimiento y en consecuencia la no eliminación de la célula infectada por los LTCs activados previamente con el epítomo silvestre [52]. Las primeras evidencias de escape relacionado con epítomos de células T fueron encontradas en ratón transgénico de RCT específico para un epítomo derivado del virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV); este experimento demostró que el escape del virus al reconocimiento por LTCs es causado por la mutación del epítomo, lo que generaba un incremento en la carga viral [16]. Phillips RE y colaboradores en 1991 demostraron el mismo proceso en pacientes infectados por VIH, de pacientes se aislaron LTCs específicos de la proteína Gag y las utilizaron para realizar ensayos de lisis específica utilizando péptidos derivados de la misma proteína; paralelamente realizaron secuenciaciones longitudinales para observar la variación de Gag dentro de la población viral con respecto al tiempo. Ellos concluyeron que la acumulación de mutaciones en epítomos del virus específico de células T pudiera proveer un mecanismo de escape y la no contención de la carga viral [53]. Price DA y colaboradores (1997) reportaron la selección positiva de una mutación de escape de LTC derivado del epítomo Nef en un paciente que presentaba seroconversión reciente; esta mutación se confinó al epítomo además de presentarse justo cuando se estaba ejerciendo una fuerte actividad citotóxica mediada por LTCs. Péptidos diseñados en base a la secuencia mutante de este virus no presentaban reconocimiento por LTCs del mismo individuo lo que indicaba que las LTCs específicas del virus pudieran estar ejerciendo una presión de selección de la población de virus mutantes en el individuo infectado [54].

Goulder PJ y colaboradores (2001) reportaron la transmisión de una mutación en un epítomo inmuno-dominante restringido a HLA-B27. En este trabajo analizaron la transmisión de una madre infectada a su hijo de un epítomo derivado de la proteína Gag restringido a HLA-B27, y el análisis del epítomo derivado de VIH de la madre demostró que presentaba un cambio de aminoácido en la posición 2 (Arg→Thr) relacionado con el aminoácido de anclaje a HLA-B27. Además de demostrar que el epítomo que presentaba la mutación no inducía activación de LTCs como lo hacía el epítomo original no mutado (nominal), el análisis del epítomo en el hijo demostró la presencia de la misma mutación en la misma posición y, en consecuencia, que este no respondía al mismo. Este epítomo con el paso del tiempo no revirtió al tipo silvestre por lo que esta mutación se fijó en la población viral del infante [55]. Una conclusión importante es que las mutaciones de escape asociadas con la supresión de la carga viral tienden a acumularse dentro de la población viral, además, pueden ser transmisibles en individuos y no se revierte esta mutación mientras exista una presión de selección constante; tal y como lo demostró Barouch DH y colaboradores (2005) donde la presión de selección ejercida por LTCs sobre un epítomo denominado p11 (181CTPYDINQM189), derivado del Virus de Inmunodeficiencia de Simio, restringido al alelo de CPH I Mamu-A\*01 de macacos,

este alelo seleccionó mutaciones en la posición 2 (Thr/Ile/Ser/Ala) del epítomo; al infectar macacos Mamu-A\*01 negativos con el virus mutante el epítomo revirtió la mutación al epítomo original [56]. Esto indica que mientras exista presión de selección sobre determinado epítomo este mantendrá las mutaciones puntuales que se reflejaron en el mantenimiento de la población viral. A nivel evolutivo, las poblaciones virales conservan estas mutaciones cuando encuentran presión de selección, la transmisión de estas mutaciones son conservadas hasta que exista una nueva presión de selección que lo revierta o se genere una nueva variante como se ha demostrado a nivel poblacional de individuos infectados [57].

Los efectos más importantes de la variación antigénica viral sobre el sistema inmune son:

1. Linfocitos T citotóxicos (LTCs) activados con un epítomo determinado no eliminan células infectadas que presentan en contexto de CPH I epítomos variantes en la mayoría de los casos y una eventual vacuna basada en secuencias conservadas no funcionaria debido a este mecanismo de evasión inmunológica conocido como pecado original antigénico [34;58].
2. Existen procesos de anergia y generación de tolerancia en linfocitos T citotóxicos debido a la incorrecta estimulación durante el contacto con una célula presentadora de antígeno [59;60].
3. Las células T CD8+ presentan disfunciones en la actividad citolítica en especial en la secreción de granzimas y perforina debido a una activación deficiente [60].

## JUSTIFICACIÓN.

La variabilidad antigénica del virus evita el correcto procesamiento, presentación y reconocimiento de epítomos reconocidos por LTCs; la utilización de inmunógenos no variables (o nominales) no permitiría la inducción de una respuesta amplia de células T contra variantes y como consecuencia fracasaría en contener la carga viral y/o un proceso de infección; además, imposibilitaría su uso en población abierta debido a la diversidad genética de los CPHs. En trabajos previos reportado por Meyer y Torres, la inmunización de ratones con un epítomo de célula T en forma de péptidos sintéticos derivados de la región V3, con base en secuencias reportadas en bases de datos, generaron una respuesta de células T CD4+ ayudadoras y LTCs específicas, además de demostrar la habilidad de inducir respuesta en ratones con diferentes CPH [61;62], estos péptidos representaban la variabilidad *in vivo* de aislados virales. La inmunización con inmunógenos variantes permite evitar el antagonismo que induce la inmunización con un epítomo y el no reconocimiento del mismo inmunógeno cuando presenta mutaciones, lo que se ha llamado como “pecado original antigénico”. Este proceso se ha demostrado durante la infección por VIH [63] y más detallado en condiciones experimentales con el virus de linfocoriomeningitis linfocítica (LCMV) [64]. Trabajos recientes indican que la utilización de ambos inmunógenos (tanto el nominal como el mutado) pueden inducir una respuesta de tipo celular simultánea [65], ya que como se ha reportado en trabajos de Singh RAK y colaboradores (2002), la co-inmunización, con un epítomo derivado de OVA tanto nominal como mutante, en ratones transgénicos con RCT específico para OVA, induce un reconocimiento simultáneo para ambos epítomos; contrario a lo que sucede cuando se inmuniza con uno (ya sea el nominal o el mutante) y seguido de la inmunización del otro epítomo donde no existe un reconocimiento dando a lugar a lo descrito sobre el pecado antigénico [66].

Allen TM y colaboradores reportaron un estudio donde, estudiando pacientes infectados con VIH por más de 6 años, uno de ellos desarrolló respuesta epítomo específica contra un epítomo derivado de la proteína Gag (349ACQGVGGPGHK359); esta respuesta fue medida por ELISPOT longitudinalmente. Aproximadamente al día 730 mediante secuenciación de clonas virales del individuo se observó la aparición de un reemplazo de Gly por Ser en la posición 357 del epítomo, al día 1460 se observó que esta mutación se había fijado en la población viral del individuo; células aisladas en este tiempo no demostraron algún tipo de estimulación contra el péptido variante. Siguiendo el análisis longitudinal se encontró al día 1825 la aparición de un nuevo tipo de respuesta celular contra el epítomo variante que no presentaba reactividad cruzada con el silvestre; mientras que el análisis con anticuerpos para tipificar la cadena V $\beta$  de RCT, mostró la aparición de un nuevo repertorio de células T. Posteriormente, al día 2190, se encontró que el epítomo variante no estimuló



células aisladas del paciente, por lo que se analizó por secuencia partículas virales del individuo y se encontró un nuevo reemplazo; el aminoácido Gly por Trp en la posición 354 [67]; así pues la generación de nuevas células T capaces de reconocer variantes de un epítomo es posible.

Se ha descrito que individuos altamente expuestos al virus permanecen seronegativos y no presentan evidencias de infección, a estos individuos se les han denominado HEPS (highly exposed persistently seronegative). Estos individuos, que se han denominado resistentes a la infección, presentan actividad LTC específica contra las proteínas virales de VIH. Las evidencias más contundentes provienen de una cohorte de trabajadoras sexuales de Nairobi; estudios presentados por Rowland-Jones SL y colaboradores demostraron que la respuesta CD8+ específica contra HIV es menor en la cohorte de HEPS en comparación con los donadores que presentaban evidencias de infección, la detección de respuesta específica para VIH correlacionaba con el momento de re-exposición debido a relaciones sexuales no protegidas (para este trabajo se seleccionaron 91 trabajadoras sexuales que fueron clasificadas como HEPS y se determinó que tuvieron al menos 60 exposiciones al virus de VIH al año); se encontró que los epítomos reconocidos por LTCs son diferentes entre los donadores infectados y los HEPS, habiéndose encontrado fenómenos de inmuno-dominancia contra algunos epítomos en los pacientes infectados [68;69]. Estos reportes pudieran demostrar que el sistema inmune puede ser preparado la represión de una infección viral y dominar múltiples retos con variantes antigénicas.

Un caso interesante es el reportado por Jacobson JM y colaboradores en pruebas clínicas con pacientes infectados y con terapia anti-retroviral. Ellos investigaron el efecto que tenía la inmunización con una vacuna (ALVAC-HIV vCP1452) en estos pacientes después de la suspensión de la terapia. Noventa y siete individuos que recibieron terapia anti-retroviral, manteniendo así la carga viral en 50 copias de ARN por ml y cuentas de células CD4+ mayores de  $400/\text{mm}^3$ , después de suspender la terapia a un grupo, se realizó la inmunización con la vacuna dando 3 dosis por semana durante 3 semanas y a otro grupo se le administró un esquema de terapia de intervalos interrumpidos. Los resultados arrojaron que los individuos que no recibieron la vacuna contuvieron por mayor tiempo la viremia en comparación con los individuos inmunizados [70]. Este ejemplo puede representar el peligro que pudieran representar las vacunas que tiene la capacidad de enfocar la respuesta inmune hacia solo algunos o un epítomo determinado.

Hasta hoy solamente el Virus de Inmunodeficiencia de Simio (SIV) atenuado es capaz de reducir tres logaritmos la carga viral de monos infectados con VIS, a diferencia de las vacunas hasta hoy probadas en mono, que solo permiten la reducción un logaritmo [71]. Este virus que se utilizó como inmunógeno en este modelo (VISmac239 $\Delta$ nef) fue atenuado mediante la eliminación del gen nef y es una derivación de la cepa VISmac239. Este gen es un regulador de la replicación in vivo lo

que permite una replicación lenta de las partículas virales, manteniendo su tasa de mutación intrínseca y la expresión de proteínas virales en el organismo infectado. En estudios secuenciales de inmunización de monos con este tipo de virus se encontró que la protección varía dependiendo del tiempo en el que se realice el reto. Se ha reportado que la protección puede ser parcial a partir de las 8 semanas de inmunización hasta la protección total a las 79 semanas de inmunización, lo que indica que a mayor tiempo después de la inmunización mejor es la protección del mono [71-73]. Debido a esto se ha realizado un énfasis en tratar de elucidar cual es el mecanismo de protección. Se ha demostrado que este tipo de virus atenuado inducen una fuerte actividad tipo LTC específica contra proteínas del virus además de secreción de citocinas indispensables para la contención de la replicación viral [71].

Resumiendo los antecedentes descritos podemos llegar a varias conclusiones que justifican el presente trabajo:

1. La administración de inmunógenos variantes de manera simultánea permite evitar la acción antagonista de variantes administrados de manera secuencial evitando así el “pecado original antigénico”.
2. La administración simultánea de variantes de inmunógenos incrementaría la posibilidad de que los epítomos sean presentados en diferentes haplotipos del CPH.
3. Debido a que un individuo constantemente genera nuevas células T con diferentes re-arreglos de RCT, se puede inducir el reconocimiento de múltiples variantes de epítomos, lo que permitiría activar un repertorio amplio y diverso de células T que reconocerían cualquier futura modificación en el epítomo utilizado para inmunización, evitando así el escape viral.
4. La inmunización preventiva permitiría estimular al sistema inmune contra el desafío antigénico viral como se puede observar con la inmunización de monos con VIS atenuando.
5. El presente trabajo puede servir como base para el desarrollo de vacunas tanto preventivas como terapéuticas contra la infección por VIH/SIDA, hepatitis C, influenza, además de enfermedades que presentan inestabilidad genómica como cáncer.

Por lo tanto, como hemos observado, hasta hoy no existen inmunógenos que tomen en cuenta la variabilidad antigénica intrínseca de los patógenos antigénicamente variables (PAVs); además, ninguno de los inmunógenos generados hasta hoy permiten el reconocimiento de variantes individuales de un epítomo, por lo que en el presente trabajo describimos por primera vez

inmunógenos que imitan a los PAVs, además de estimular el reconocimiento de variantes de un epítomo por el sistema inmunológico de ratones.

### **HIPÓTESIS.**

La inmunización simultánea de variantes de un epítomo/péptido, podría inducir activación de poblaciones de LTCs de mayor diversidad en comparación con la inmunización de epítomos nominales o no mutados de VIH-1.

### **OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar la capacidad de la administración simultánea de variantes de un epítomo/péptido para inducir una respuesta celular específica que permita el reconocimiento de variantes individuales *in vitro*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Construcción de inmunógenos que contienen un epítomo derivado de la proteína gp120 de VIH y bancos de variantes de este.
2. Inmunización de ratones Balb/c con las construcciones generadas en forma de ADN y fagos filamentosos.
3. Evaluación de la respuesta inmune celular en ratones mediante ensayos de proliferación celular, análisis por citometría de flujo.

## **MATERIALES Y METODOS.**

### **Diseño de oligonucleótidos.**

Para la construcción de las bibliotecas y de los antígenos se diseñaron oligonucleótidos con base en la secuencia de un epítomo reportado previamente [74]. Se seleccionó el epítomo L (318RGPGRAFVTI327) derivado del loop V3 de la proteína gp120 de VIH. Para la construcción de estos inmunógenos tanto en forma de ADN plasmídico como expresada en proteína pVIII de fago M13, se diseñaron los oligonucleótidos como se aprecia en la Tabla 2, 3 y 4.

### **Construcción de los Inmunógenos.**

Se realizó el ensamblaje de la región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina humana (Ig-VH) utilizando los oligonucleótidos B1 a B8 reemplazando el oligonucleótido B7 (CDR3) por el codificante para el epítomo/péptido nominal de VIH (VHPL en ADN y ELN en pVIII de M13. Ver Figura 1 y los bancos de variantes (VHB-L en ADN y BFL en pVIII de M13). Como control de ADN se construyó solamente el Ig-VH con el oligonucleótido B7 reemplazado anteriormente (VVH). Para la construcción de la Ig-VH se mezcló en un tubo los oligonucleótidos B1 a B8 a concentración de 21 pmol/ $\mu$ l cada uno mas la adición del oligonucleótido codificante para el epítomo/péptido dependiendo de la construcción. A esta mezcla se le adicionó buffer de PCR a concentración 1X, 0.75  $\mu$ l de  $MgCl_2$  50 mM, 0.5  $\mu$ l de dNTP's 10 mM y 13  $\mu$ l de agua. Se realizó la reacción en las siguientes condiciones: 94°C, 30s; 84°C, 1 min; 74°C, 1 min; 64°C, 1 min; 54°C, 1 min; temperatura ambiente 5 minutos y se incubó al final en hielo. Se le añadió 1 U de Taq polimerasa y se realizaron los siguientes ciclos: 94°C, 7 min de desnaturalización; 7 ciclos de amplificación a 94°C 1.5 min; 57°C, 2 min; 72°C, 2 min y, 2 minutos de extensión a 72°C (Termociclador Corbett Research).

Estas construcciones se amplificaron con los oligonucleótidos 5' y 3'Namp que introduce los sitios de restricción para las enzimas Pst I/Bst EII necesarios para clonarlos en el vector de expresión en células eucariotas VHEXpress. Alternativamente se amplificó el ADN de estas mismas construcciones por PCR con los oligonucleótidos 5' y 3'Damp que introducen los sitios de restricción para las enzimas Nco I/Bam HI necesarios para clonar epítomos en el vector de expresión en fago fusionados a proteína VIII de M13 pG8SAET. Estos oligonucleótidos hibridan solo en la regiones de FR3 y FR4 por lo que solo se construyeron las bibliotecas expresando el epítomo/péptido sin contexto de Ig-VH como en el caso de la clonación en VHEXpress.

La amplificación del Ig-VH con epítomo/péptido en CDR3 se llevó a cabo como sigue: se mezclaron 0.5  $\mu$ l de la reacción por separado con 3  $\mu$ l de oligonucleótidos Namp [5 pmol/ $\mu$ l], 5  $\mu$ l

de buffer de PCR 10x, 1 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 µl de DNTP's 10 mM, 1 U de Taq polimerasa y 39 µl de agua. Se manejó el siguiente programa de amplificación: desnaturalización 94°C, 3 min; 30 ciclos de amplificación a 94°C, 1 min; 57°C, 1 min; 72°C, 1 min y, 3 min de extensión a 72°C. La amplificación del epítomo/péptido para la clonación en el vector pG8SAET se llevó a cabo como sigue: se mezclaron por separado 1 µl de la reacción, 3µl de los oligonucleótidos Damp [5pmol/µl], 5µl de buffer de PCR 10x, 1µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1µl de DNTP's 10 mM, 1U de Taq polimerasa y 38µl de agua. Se amplificó con el siguiente programa: desnaturalización 94°C, 2 min; 30 ciclos de amplificación a 94°C, 30s; 56°C, 40s y 72°C, 30s; la extensión final se realizó a 72°C por 2 minutos.

Los productos de la amplificación por PCR fueron separados en geles de agarosa al 2% y extraídos por el kit "Wizard SV Gel and PCR Clean Up System" (Promega) para posteriormente realizar la digestión. Para la clonación en el vector VHEXpress se digirieron de 2 a 3 µg del vector e inserto con 20 U de la enzima de restricción Pst I por 3 horas a 37°C, posteriormente se le adicionó 20 U de la enzima Bst EII y se incubo por 3 horas a 60°C. Para el caso de la construcción de los inmunógenos expresados en la proteína pVIII de fago utilizamos el fagémido pG8SAET. Se realizó doble digestión de 1 a 2 µg de vector e inserto con 20U de las enzimas Nco I/Bam HI por 6 horas a 37°C. Los productos de las digestiones fueron separados en un gel de agarosa y purificados con el kit Rapid Gel Extraction System (Marlingen). Los productos de PCR fueron clonados en sus respectivos vectores utilizando una relación 1:2 molar de vector sobre inserto con 10 U de la enzima T4 ligasa en 15µl de volumen de reacción final.

Se realizó la electroporación de las ligaciones en la cepa TG1 de *E. coli* en un electroporador Gen Pulser II (Biorad). Se sembró 100 µl después de 45 minutos de recuperación y se calculó la complejidad de las bibliotecas.

**Tabla 2.** Diseño de oligonucleótidos para la construcción de la región pesada de una inmunoglobulina humana (Ig-VH).

Regiones Ig-VH	Oligonucleótidos	Observaciones	
<b>FR1</b>	<b>B1.</b> 5'GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGTCCCTGAGACTCTC 3'	El dominio Ig-VH wt es codificado por los oligonucleótidos B1-B8	
<b>HRDC 1</b>	<b>B2.</b> 5'CCCTGGAGCCTGGCGGACCCAGCTCATGGCATAGCTGCTAAAGGT GAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGG 3'		
<b>FR 2</b>	<b>B3.</b> 5'TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA 3'		
<b>HRDC 2</b>	<b>B4.</b> 5'GAACCGGCCCTTCACGGAGTCTGCGTAGTATGTGCTACCACCACTA CCACTAATAGCTGAGACCCACTCCAGCCCCCTT 3'		
<b>FR 3</b>	<b>B5.</b> 5'GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG AACACGCTG TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA 3'		Vector de expresión en células eucariotas VHExpress. El dominio Ig-VH wt fue clonado y expresado como construcción en ADN y usado como vector control, el cual fue denominado VVH.
<b>FR 3/HRDC 3</b>	<b>B6.</b> 5'CGCACAGTAATATACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCATT TGCAGATAC 3'		
<b>HRDC 3</b>	<b><sup>1</sup>B7.</b> 5'GCCGTATATTACTGTGCGAAAGGTAGTTACTTTGACTACTGGGGCC AGGGAACCCT GGTC 3'		
<b>FR 4</b>	<b>B8.</b> 5'TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCA 3'		

Abreviaturas. Ig-VH: región pesada de una inmunoglobulina humana; FR: framework; HRDC: región determinante de complementariedad.

<sup>1</sup>El oligonucleótido B7 wt que codifica para la región determinante de complementariedad 3(RDC3) fue usado para la construcción del inmunógeno control (VVH)

**Tabla 3.** Diseño de oligonucleótidos que codifican el epítomo/péptido L nominal y sus variantes.

Inmunógenos	Composición de Biblioteca de Epítomos Variables con 2-5 aminoácidos al azar	Oligonucleótidos <sup>1</sup>	Vectores de clonación
<b>BFL y VHBL</b>	VYYCA RGPGXAXXXX WGQGT	<b>L2.5'</b> GTATATTACTGTGCGCGTGGT CCTGGTNNKGCTNNKNNKNNKNN KTGGGGCCAGGGAACC3'	VHExpress. Los BEVs son expresados en contexto de un Ig VH modificado (VHBL)
	VYYCA XGXGXAXVXI WGQGT	<b>L1.5'</b> GTATATTACTGTGCGNNKGGT NNKGGTNNKGCTNNKGTNNKATT TGGGGCCAGGGAACC 3'	pG8SAET. Los BEVs son expresados sin el contexto VH fusionados a la proteína cpVIII en la superficie de fagos M13 (BFL)
<b>BFL4</b>	VYYCA RGPGRAXXXX WGQGT	<b>L4.5'</b> GTATATTACTGTGCGCGTGGT CCTGGTTCGTGCTNNKNNKNNKNN KTGGGGCCAGGGAACC 3'	pG8SAET. Los BEVs son expresados sin el contexto VH fusionados a la proteína cpVIII en la superficie de fagos M13 (BFL4)
<b>BFL3</b>	VYYCA RGPGRAFXXX WGQGT	<b>L3.5'</b> GTATATTACTGTGCGCGTGGT CCTGGTTCGTGCTTTTNNKNNKNNK TGGGGCCAGGGAACC 3'	pG8SAET. Los BEVs son expresados sin el contexto VH fusionados a la proteína cpVIII en la superficie de fagos M13 (BFL3)
<b>BFL2</b>	VYYCA RGPXRXFVTI WGQGT	<b>L22.5'</b> GTATATTACTGTGCGCGTGG TCCTNNKCGTNNKTTTGTACTATT TGGGGCCAGGGAACC 3'	pG8SAET. Los BEVs son expresados sin el contexto VH fusionados a la proteína cpVIII en la superficie de fagos M13 (BFL2)
Epítomo Env LWT de VIH <b>ELN y VHPL</b> (nominales)	VYYCA RGPGRAFVTI WGQGT	<b>LN.5'</b> GTATATTACTGTGCGCGTGGT CCTGGTTCGTGCTTTTGTACTATTT GGGGCCAGGGAACCCTG 3'	VHExpress. Epítomo LWT es expresado en el contexto de HRDC3 de un VH (VHPL)  pG8SAET. El epítomo LWT es expresado sin el contexto VH fusionado a la proteína cpVIII en la superficie de fagos M13 (ELN)

<sup>1</sup>NNK: donde N representa cualquiera de los 4 nucleótidos (G, A, T, C), K→G ó T



**Tabla 4.** Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de las construcciones e introducción de sitios de restricción para su posterior clonación en los vectores de expresión VExpress y pG8SAET.

Oligonucleótidos para amplificación por PCR	Oligonucleótidos	Vectores de clonación
<b>5Namp</b>	5'ATTCTAGCCATGGTGAATTCCTGCAGGAGGTGCAGC TGTTGGAGTCT3'	Oligonucleótidos para amplificación por PCR de los insertos en contexto de VH para su clonación en VExpress
<b>3Namp</b>	5'CATGTACGTATGGATCCATTGAGGAGACGGTGACCA GGGT 3'	
<b>5Damp</b>	5'TGATATTCGTA <del>CT</del> CGAGCCATGGTGTATATTACTGTG CG 3'	Oligonucleótidos para amplificación por PCR de los insertos sin contexto de VH para su clonación en el fagémido pG8SAET
<b>3Damp</b>	5'ATGATTGACAAAGCTTGGATCCCTAGGTTCCCTGGC CCCA 3'	

### **Selección de antígenos, extracción de cadena sencilla y secuenciación de ADN.**

Del contenido sembrado para calcular la complejidad de las bibliotecas, se aislaron e inocularon colonias en medio nutritivo YT 2X con carbenicilina (CB) 50 µg/ml. Se dejó crecer hasta una densidad óptica (D.O.) aproximada de 0.6 (250 rpm, 37°C) y llevaron 500 µl de este cultivo a un tubo eppendorf de 2 ml. Se añadió 5 µl de fago helper M13KO7 (Invitrogen) y se incubó 30 min sin agitación a 37°C seguidos de otros 30 min de incubación a la misma temperatura pero con agitación de 250 rpm. El resto del inóculo se centrifugó 1 min a 9 000 rpm y las células fueron resuspendidas en medio 2X YT Glicerol 30% para conservarlas a -70°C. Transcurrido el tiempo de incubación se añadió 2X YT CB 50µg/ml y Kanamicina (Kn) 50 µg/ml hasta un volumen de 5 ml en un tubo Falcon de 50 ml y se dejó incubando a 30°C toda la noche a 250 rpm. Al día siguiente se centrifugó 20 minutos a 5 000 rpm 4°C y se transfirió el sobrenadante a tubos eppendorf de 2 ml. Se centrifugó nuevamente por 10 min a 14 000 rpm 4°C para eliminar completamente las células. Se transfirió 1.7 ml del sobrenadante a tubos nuevos y se agregó 300 µl de PEG/NaCl e incubando 1 hora en hielo. Después se centrifugó 10 min a 14 000 rpm 4°C y el precipitado de ambos tubos se resuspendió en 600µl de TBS (Tris-HCl 50Mm, NaCl 150mM pH 7.5). Se centrifugó 10 minutos a 14 000 rpm 4°C y el sobrenadante se llevó a tubos eppendorf nuevos de 1.5 ml. Se añadió 120 µl de PEG/NaCl y se dejó incubando 1 hora en hielo. Después de la incubación se centrifugó 10 minutos a 14 000 rpm 4°C, se retiró completamente el sobrenadante aspirando con vacío. El precipitado se resuspendió en 100 µl de NaI (NaI 4M, Tris-Base 10mM pH8.0, EDTA 1mM) y 250 µl de EtOH. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después se centrifugó 10 minutos a velocidad máxima a temperatura ambiente. Se aspiró el sobrenadante con vacío y el precipitado se lavó con 250 µl de EtOH 70% frío. El ADN se resuspendió en 25 µl de H<sub>2</sub>O estéril. Se realizó secuenciación manual utilizando el kit “Sequenase version 2.0 Quick-Denature plasmid sequencing kit” (Amersham Life Science, OH) y <sup>35</sup>S-dATP de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En breve: se alicuotaron 12 µl de ADNss con 1 µl de oligonucleótido F8 y 2 µl de buffer de reacción, la mezcla se incubó 37°C por 10 minutos. Se preparó una mezcla conteniendo 0.3 µl de α-<sup>35</sup>SdATP, 1 µl DTT (0.1M) y 2 µl de labeling Mix (dilución 1:7) por reacción de secuencia. Pasados los 10 minutos de incubación, se mezclaron los 15 µl de ADNss previos con 3.3 de la mezcla con la marca. Se agregó 2 µl de sequenasa y se incubó a 37°C por 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación, de esta mezcla se tomaron alícuotas de 5 µl para mezclarse con 2.5 µl de terminadores (G, A, T, C), esto se incubó por 5 minutos a 37°C y se detuvo la reacción con 4 µl de stop solution. Las muestras se separaron en un gel desnaturalizante al 13% de Bis/acrilamida por 2 horas a 1 800 V/40 mA. El gel fue secado y expuesto a placas Kodak por 24 horas.

### **Rescate de bibliotecas en fago y obtención de antígenos.**

Las clonas positivas en secuencia y las bibliotecas construidas en el vector pG8SAET fueron rescatadas de la siguiente manera: una alícuota en glicerol de las bibliotecas o las clonas aisladas se inocularon en medio 2X YT con CB [50µg/ml] en incubación hasta una D.O de 0.6. Se tomaron 500 µl del cultivo y se colocaron en un tubo frescos para infección con 5 µl de fago ayudador M13KO7 y se incubaron 30 min a 37°C sin agitar y otros 30 min con agitación. Pasado este tiempo se transfirieron los 500 µl a un matraz con 50 ml de YT 2X con CB [50µg/ml] y Kn [50µg/ml]; este matraz se dejó toda la noche en agitación a 30°C. Al día siguiente se centrifugó el cultivo y el sobrenadante se colocó en tubos Falcon de 50 ml, se agregó 1/5 parte de PEG/NaCl 5X y se incubó por 2 horas a 4°C. Posteriormente se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 1 ml de TBS; esta suspensión fue colocada en un tubo de 2 ml, se agregó 1/5 parte de PEG/NaCl 5X y se incubó 1 hora a 4°C. Pasado el tiempo se centrifugó y se resuspendió el precipitado en 400 µl de TBS y se centrifugó a máxima velocidad para eliminar bacterias remanentes, el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo y se guardó a 4°C para realizar la titulación.

Los péptidos sintéticos fueron preparados disolviendo 2 mg en 20 µl de DMSO (Sigma, USA) en agitación, posteriormente se llevo a un volumen de 1 ml con Dulbecco's PBS 1X (Invitrogen, USA) para una concentración final de 2 mg/ml, los stocks fueron congelados a -20°C.

### **Extracción de ADN plasmídico para inmunización.**

A partir de alícuotas en glicerol se realizó un pre-inóculo de 20 ml en medio 2XYT/CB/Kn hasta una OD de 0.6 posteriormente este pre-inoculo se sembró en 200 ml de medio 2XYT/CB/Kn y se dejó en incubación por 18 hrs a 37°C a 250 rpm. Al día siguiente el cultivo se centrifugó y se realizó lisis alcalina del paquete células como sigue: el precipitado se resuspendió en 10 ml de solución I (Glucosa 50mM, Tris-HCl 25 mM pH8.0, EDTA 10 mM pH 8.0). Después se añadió 10 ml de la solución II (NaOH 0.2 N, SDS 10%) y se mezcló suavemente por inversión. Se incubó por 5 minutos a T ambiente. Inmediatamente después se añadió 10 ml de la solución III (Acetato de Potasio 5M pH 4.8) y se mezcló suavemente por inversión. Se incubó en hielo por 15 minutos y se centrifugó 30 minutos a 14 000 rpm 4°C. Al sobrenadante se le añadió 1.5 volúmenes de isopropanol y se centrifugó 30 minutos a 14 000 rpm 4°C. El precipitado se resuspendió en 600 µl de H<sub>2</sub>O estéril. Se añadió 1 volumen de fenol/cloroformo y se agitó en vortex por 1 minuto. Se centrifugó 10 minutos a 14 000 rpm 4°C y se separó la fase acuosa. Se añadió dos volúmenes de etanol 100% y se centrifugó por 10 minutos a 14 000 rpm 4°C. El precipitado se lavó dos veces con 1.5 ml de etanol 70%. El ADN se resuspendió en 400 µl de H<sub>2</sub>O/RNasa (20µg/ml). Se realizó la cuantificación visual del ADN por medio de electroforesis en gel de agarosa 0.8% con un marcador estándar de peso molecular.

### **Inmunización de ratones.**

Grupos de 3-5 ratones hembra BALB/c AnN de 4 a 6 semanas fueron inmunizados con los diferentes inmunógenos construidos, para el caso de las construcciones en fago se administraron  $1 \times 10^{11}$  UFC vía sub-cutánea (s.c.) e intra-peritoneal (i.p.); para el caso de los inmunógenos en forma de ADN plasmídico se administraron 75  $\mu$ g de modo intra-dérmico (i.d).

### **Ensayos de Proliferación Celular e Incorporación de $^3\text{H}$ -Timidina.**

Los ratones inmunizados con los diferentes inmunógenos fueron anestesiados por inhalación de sevoflurano (sevorane) y sacrificados por dislocación cervical; sus bazos fueron extraídos para la obtención de los linfocitos como se describe a continuación: los bazos fueron extraídos del ratón mediante cirugía, se perfundieron las células con 5 ml de RPMI y colocados en tubos de 15 ml, las células fueron centrifugadas a 1500 rpm por 10 min. Al paquete celular se le agregó 1.5 ml de solución de lisis de eritrocitos y se incubó por 5 minutos agitando suavemente, pasando los 5 minutos se agregó 10 ml de RPMI y se centrifugó nuevamente. El paquete se resuspendió en 5 ml de RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato de sodio, 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol y 1% de penicilina-estreptomicina, posteriormente se realizó el conteo de células viables en un hemocitometro. Los cultivos se realizaron colocando  $5 \times 10^5$  células por pozo y  $1 \times 10^{10}$  ufc de los antígenos (fagos recombinantes) aislados y secuenciados previamente en un volumen final de 200  $\mu$ l de medio o 10  $\mu$ M de péptidos sintéticos. Los cultivos se incubaron por 72 hrs cuando se utilizó fago o 5 días cuando se utilizó péptido como antígeno en una incubadora humidificada a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Dieciséis horas antes de la cosecha se agregó 0.5 $\mu$ Ci de  $^3\text{H}$ -timidina por pozo. Posteriormente se realizó la cosecha de las placas en membranas de fibra de vidrio y selladas con 10 ml de líquido de centelleo. Se realizó la lectura de la incorporación de timidina en un lector betaplate (Wallac) en un formato de cuentas por minuto (cpm). Los índices de estimulación se determinaron utilizando la siguiente fórmula: cpm de células estimuladas con antígeno/ cpm de células sin estimular.

### **Análisis por Citometría de flujo (FACS).**

Para realizar los análisis por citometría se utilizaron las células de los bazos de los mismos ratones que se utilizaron para incorporación de timidina, para esto se colocaron  $1 \times 10^7$  células por pozo en una placa de 24 pozos. Las células aisladas de los ratones inmunizados fueron estimuladas con  $1 \times 10^{11}$  ufc por 72 horas en una incubadora humidificada a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ ; a cada pozo se agregó 2  $\mu$ M de monensina y se incubó por 4 horas más. Las células fueron fijadas y marcadas utilizando el kit "Inside Stain Kit" (Miltenyi Biotec) siguiendo el protocolo del fabricante como se describe brevemente a continuación:

aproximadamente  $10^6$  células fueron fijadas con 100  $\mu$ l de “inside fix” por 30 minutos, posteriormente fueron lavadas con 1 ml de buffer de citometría (25 mM EDTA, 1% suero fetal bovino en PBS 1X). Las células fueron centrifugadas por 5 min a 1 000 rpm y se agregó 100  $\mu$ l de la mezcla de anticuerpos para moléculas de superficie deseadas (Anti CD3-PECy5, CD4-APC, CD8-PE, CD44-APC y CD62L FITC) e incubadas por 30 minutos en hielo y oscuridad. Posteriormente las células fueron lavadas, se agregó 100  $\mu$ l de “inside perm” con el anticuerpo IFN- $\gamma$ -FITC y se incubó por 10 min en oscuridad. Se agregó 1 ml de buffer de citometría y se centrifugó por 2 minutos. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences, USA) y al menos 10,000 eventos fueron analizados por muestra.

#### **Modelación *in silico* y obtención de afinidades teóricas (Kds).**

La molécula del Complejo Principal de Histocompatibilidad H-2D<sup>d</sup> en complejo con el péptido L nominal (RGPGRAFVTI) derivado del loop V3 de la proteína gp120 de VIH, fue obtenida de la base de datos Protein Data Bank (PDB) con número de acceso 1DDH. Se generaron los complejos CPH-péptido introduciendo las mutaciones apropiadas con base en las secuencias de los péptidos obtenidas de los antígenos aislados previamente. Las proteínas estabilizadoras fueron eliminadas en todos los modelos. Se realizaron minimizaciones de energía usando el modulo SwissPdb Viewer para un potencial de campo de fuerza AMBER 95. Los criterios de las estructuras minimizadas fueron de 0.05 KJ/mol. Los cálculos electrostáticos fueron desarrollados utilizando la ecuación no lineal de Poisson-Boltzmann usando el programa APBS.

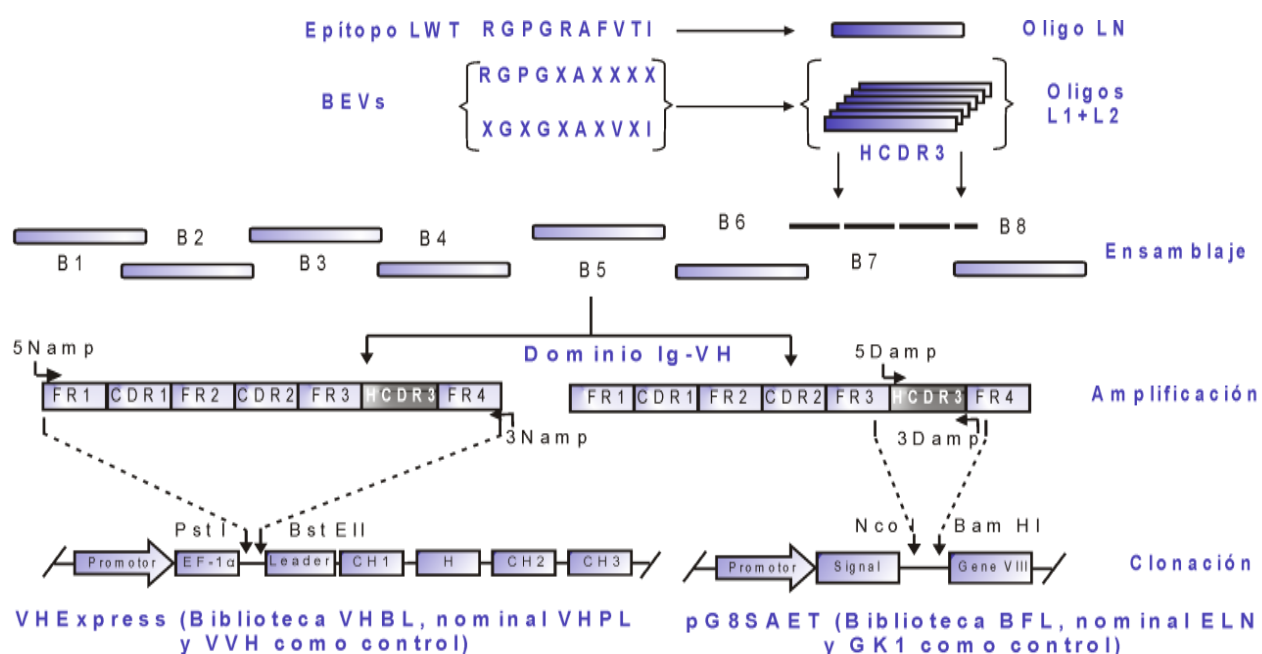
#### **Análisis Estadístico.**

Los valores son mostrados como la media  $\pm$  desviación estándar. Las pruebas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis fueron desarrolladas usando el software GraphPad Prism en su versión 4.0 para Windows. Los valores de *P* menores a 0.05 fueron considerados significativos.

## RESULTADOS.

### Construcción de los Inmunógenos.

Para la construcción de los inmunógenos se diseñaron una serie de oligonucleótidos los cuales codifican la región Ig-VH, la región determinante de complementariedad 3 (HRDC3) fue reemplazada por oligonucleótidos que codifican el epítipo L derivado de gp120 de VIH. Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 2, 3 y 4 de materiales y métodos. Un esquema representativo de la construcción se detalla en la Figura 1.



**Figura 1.** Diagrama de ensamblaje, amplificación y clonación de los inmunógenos.

El epítipo LWT (nominal) así como los bancos de variantes (BEVs) fueron utilizados para ensamblarse en la región variable de la cadena pesada (VH) de una inmunoglobulina humana, para esto se utilizaron los oligonucleótidos B1 a B8 en la construcción del VH y, se reemplazó el oligonucleótido B7 por los oligonucleótidos que codifican para el epítipo nominal o sus variantes. Para el caso del inmunógeno en forma de ADN, el nominal (VHPL), control (VVH) y 2 bibliotecas (VHBL) se clonaron en contexto de VH en el vector VHEXpress; para el caso de fago M13, los inmunógenos nominal (ELN), control (GK1) y biblioteca (BFL) se clonaron en el fagémido pG8SAET sin contexto VH (Figura 1).

Se utilizaron oligonucleótidos degenerados con el propósito de introducir mutaciones en la secuencia original del epítomo. Las complejidades de las bibliotecas estuvieron en alrededor de las 10,000 clonas, de estas se aislaron 20 clonas, las cuales se utilizaron para confirmar por secuenciación la correcta construcción, las secuencias se muestran en la Tabla 5.

Las clonas secuenciadas mostraron una alta diversidad de aminoácidos en las posiciones de modificación, estas 20 clonas seleccionadas al azar fueron utilizadas como antígenos en ensayos de estimulación celular, por otro lado, 10 de estas secuencias fueron seleccionadas para su síntesis como péptidos sintéticos y, de igual manera, estos péptidos fueron utilizados en ensayos de estimulación celular.

**Las Bibliotecas de Epítomos Variables (BEVs) tienen la capacidad de inducir respuesta celular específica contra variantes.**

Para evaluar la capacidad de los inmunógenos para generar una respuesta inmune amplia, se inmunizaron grupos de ratones BALB/c una vez con BEVs en forma de fago (BFL) y GK1 control de inmunógeno, 15 días después los ratones fueron sacrificados. Se utilizaron 20 antígenos previamente secuenciados en forma de fago para realizar la estimulación in vitro de las células aisladas de los ratones y se realizó el ensayo de incorporación de timidina. Se encontraron índices de estimulación de 50 a 175 en las células de ratones inmunizados con BFL en comparación con los índices de 10 a 30 presentados por los ratones inmunizados con GK1. De los 20 antígenos utilizados, 14 de ellos presentaron índices de estimulación mayor al control de antígeno B1 (Figura 2A).

Por otro lado, grupos de ratones inmunizados con BEVs en forma de ADN fueron sacrificados y las células del bazo estimuladas con las variantes antes descritas, se encontraron índices de estimulación más bajos en comparación con los ratones inmunizados con BEVs en forma de fago. Los índices de estimulación fueron de 30 a 90 aproximadamente en los grupos inmunizados con BEVs (VHBL), mientras que en los ratones control inmunizados con VVH los índices de estimulación fueron de 10 a 40. De las 20 variantes utilizadas, 12 de ellas presentaron índices de estimulación mayor en comparación al control de antígeno B1 (Figura 2B).

En una serie de experimentos independientes, se realizó la estimulación de células de ratones inmunizados con BFL, ELN (nominal) y GK1 como control. Las células fueron estimuladas con 10 antígenos en forma de péptidos sintéticos seleccionados al azar con base en las secuencias previamente obtenidas de los fagos utilizados como antígeno. De igual manera, las células de los ratones inmunizados con BFL son estimuladas de manera específica cuando se utilizan variantes en péptidos sintéticos como antígenos. Así pues, se confirman los resultados obtenidos previamente con la utilización de fago como antígeno (Figura 2C).

**Tabla 5.** Secuencias de aminoácidos de las clonas aisladas en fago de la biblioteca BFL.

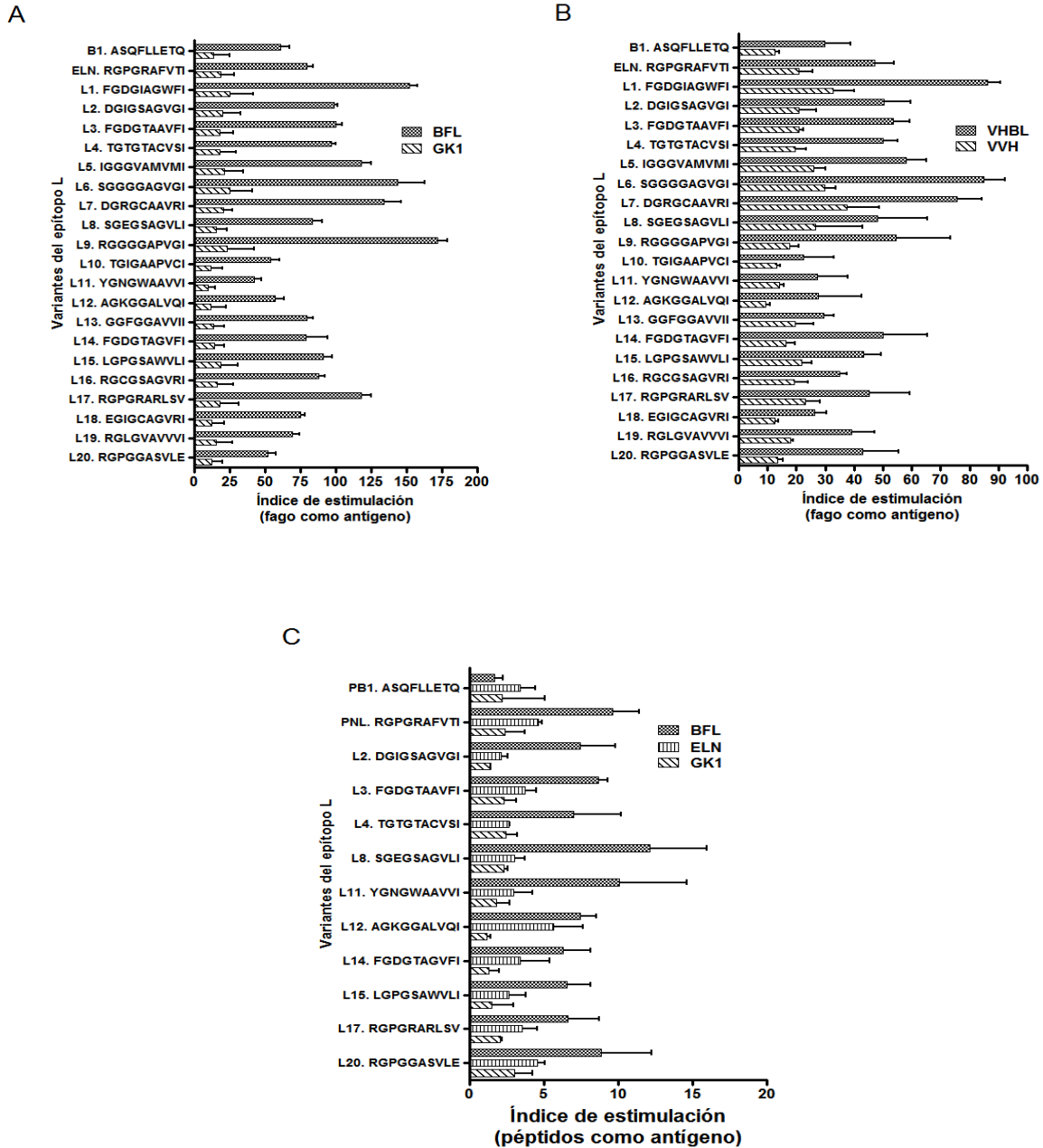
<b>Epítomo L</b>		<b>R</b>	<b>G<sup>a</sup></b>	<b>P<sup>a</sup></b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>F</b>	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>I</b>
Diseño de secuencia		<b>X<sup>b</sup></b>	G	<b>X</b>	G	<b>X</b>	A	<b>X</b>	V	<b>X</b>	I
	Variantes										
	L1	F	-	D	-	I	-	G	-	F	-
	<b>L2<sup>c</sup></b>	<b>D</b>	-	<b>I</b>	-	<b>S</b>	-	<b>G</b>	-	<b>G</b>	-
	<b>L3</b>	<b>F</b>	-	<b>D</b>	-	<b>T</b>	-	<b>A</b>	-	<b>F</b>	-
	<b>L4</b>	<b>T</b>	-	<b>T</b>	-	<b>T</b>	-	<b>C</b>	-	<b>S</b>	-
	L5	I	-	G	-	V	-	M	-	M	-
	L6	S	-	G	-	G	-	G	-	G	-
	L7	D	-	R	-	C	-	A	-	R	-
	<b>L8</b>	<b>S</b>	-	<b>E</b>	-	<b>S</b>	-	<b>G</b>	-	<b>L</b>	-
	L9	-	-	G	-	G	-	P	-	G	-
	L10	T	-	I	-	A	-	P	-	C	-
	<b>L11</b>	<b>Y</b>	-	<b>N</b>	-	<b>W</b>	-	<b>A</b>	-	<b>V</b>	-
	<b>L12</b>	<b>A</b>	-	<b>K</b>	-	<b>G</b>	-	<b>L</b>	-	<b>Q</b>	-
	L13	G	-	F	-	G	-	V	-	I	-
	<b>L14</b>	<b>F</b>	-	<b>D</b>	-	<b>T</b>	-	<b>G</b>	-	<b>F</b>	-
	<b>L15</b>	<b>L</b>	-	-	-	<b>S</b>	-	<b>W</b>	-	<b>L</b>	-
	L16	-	-	C	-	S	-	G	-	R	-
	L18	E	-	I	-	C	-	G	-	R	-
	L19	-	-	L	-	V	-	V	-	V	-
Diseño de secuencia		R	G	P	G	<b>X</b>	A	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
	<b>L17</b>	-	-	-	-	-	-	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>V</b>
	<b>L20</b>	-	-	-	-	<b>G</b>	-	<b>S</b>	-	<b>L</b>	<b>E</b>
Frecuencia de aminoácidos		11/18		12/18		9/20		10/20		11/20	

<sup>a</sup>Posiciones de anclaje a CPH. El aminoácido glicina en la posición P2 fue dejado intacto en ambas versiones; el aminoácido prolina de la posición de anclaje 3 fue modificado al azar.

<sup>b</sup>X representa cualquiera de los 20 aminoácidos naturales.

<sup>c</sup>Secuencias de epítomos resaltadas en negro fueron preparadas como péptidos sintéticos.

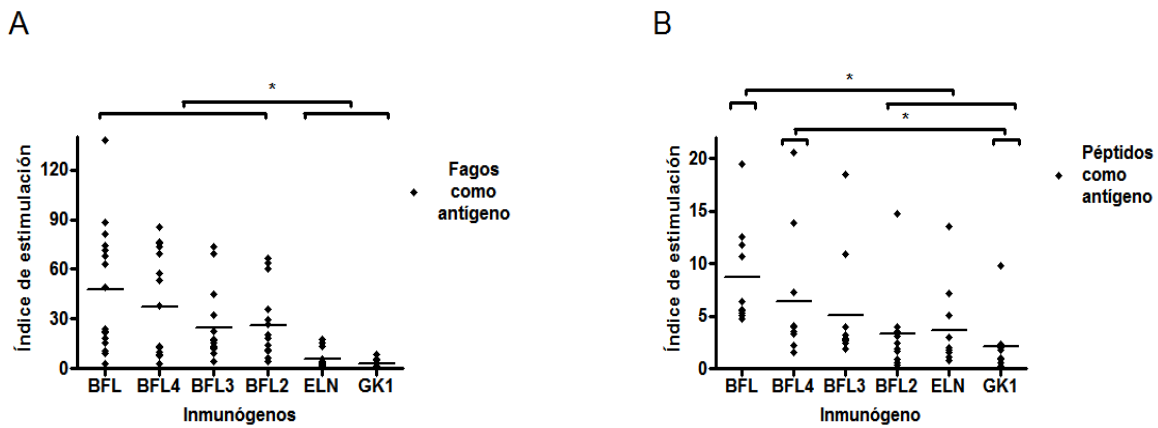




**Figura 2. La inmunización con BEVs permite el reconocimiento específico de variantes individuales del epítopo L.** Ensayos de proliferación (incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina) utilizando las células de bazo de ratones inmunizados una vez con BEVs (BFL y VHBL) y controles (GK1 y VVH), los ratones fueron sacrificados 15 días después de la inmunización. A y B, se estimuló por 3 días con antígeno en fago, C se estimuló por 5 días con péptidos como antígeno.

Con base en estos resultados se decidió evaluar si esta capacidad del inmunógeno de generar respuesta específica contra variantes es dependiente de la complejidad de las BEVs. Para esto se construyeron 3 inmunógenos más disminuyendo la cantidad de posiciones degeneradas. Se inmunizaron grupos de ratones con fago BFL, BFL4, BFL3, BFL2, ELN y GK1 como control de inmunógeno. Se obtuvieron los bazos y las células fueron estimuladas con los 20 antígenos en forma de fago y péptidos sintéticos. Se encontró que conforme se disminuye la complejidad del inmunógeno, los índices de estimulación disminuyen tanto utilizando las 20 variantes en fago como antígeno así como las 10 variantes en péptidos sintéticos (Figura 3).

Estos resultados demuestran la capacidad de los BEVs para inducir una respuesta celular contra variantes en comparación a nominales, esta capacidad de los inmunógenos para reconocer variantes depende fundamentalmente de la cantidad de posiciones degeneradas dentro del epítomo utilizado para la inmunización.



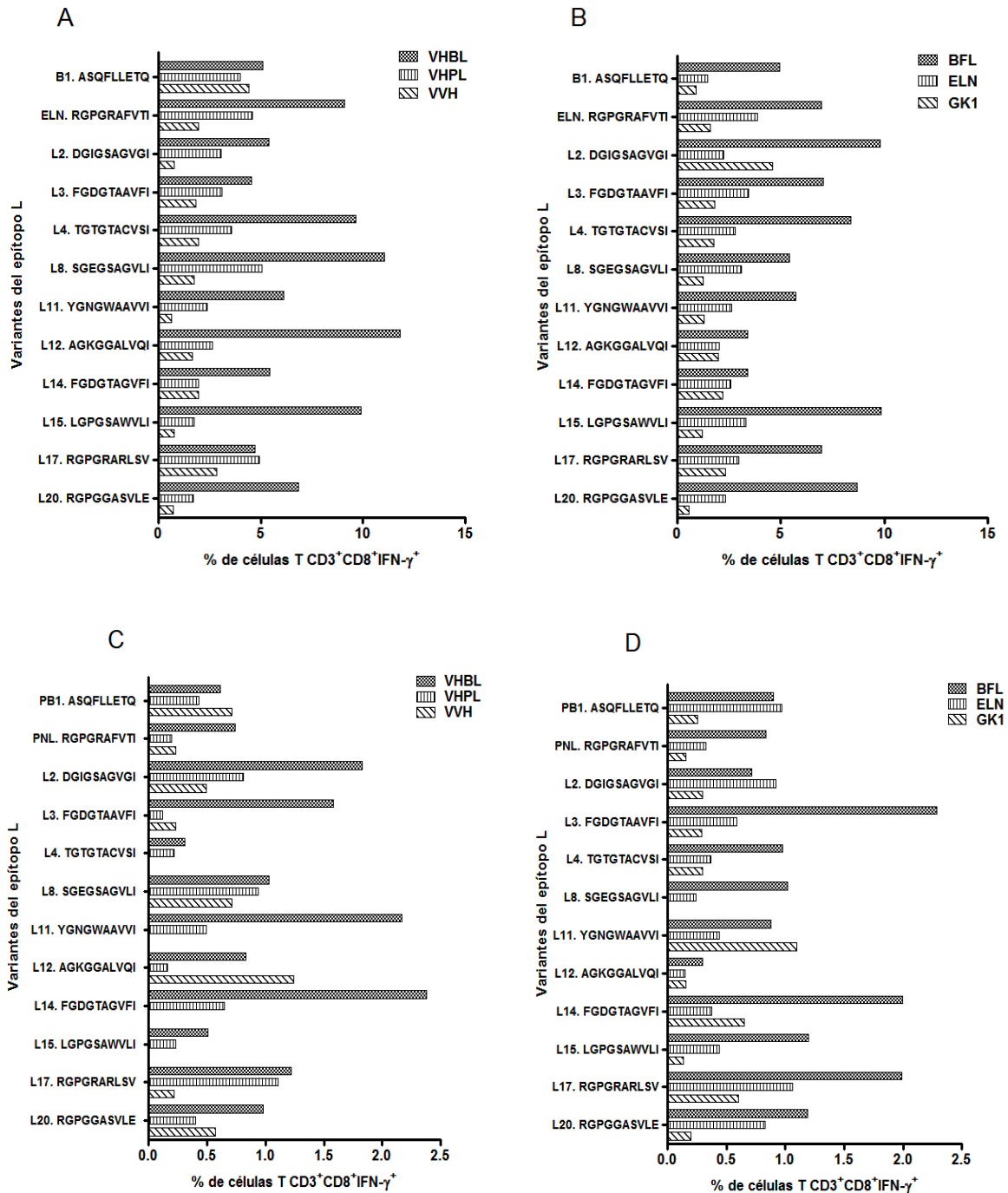
**Figura 3. El reconocimiento de las variantes es dependiente de la complejidad de las BEVs.** Ensayos de proliferación de grupos de ratones inmunizados una vez con BEVs de diferentes complejidades (BFL, BFL4, BFL3, BFL2 con 5, 4, 3, 2 posiciones degeneradas respectivamente, ELN como nominal y GK1 como control de inmunógeno). A) Se estimularon las células por 3 días con fago como antígeno. B) Se estimularon las células por 5 días con péptidos como antígeno. \* $P < 0.05$

### **Las Bibliotecas de Epítomos Variables tienen la capacidad de estimular la generación de células T CD8+IFN- $\gamma$ +**

Como se ha descrito previamente en los antecedentes del presente trabajo, la generación de células CD8+ es importante en la contención de la carga viral, además la utilización de algunos marcadores específicos como producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) son utilizados como indicador de células T citotóxicas. Debido a esto, se decidió utilizar la citometría de flujo para determinar la capacidad de los BEVs para inducir células CD8+ productoras de IFN- $\gamma$  específicas para las variantes del epítomo L utilizadas.

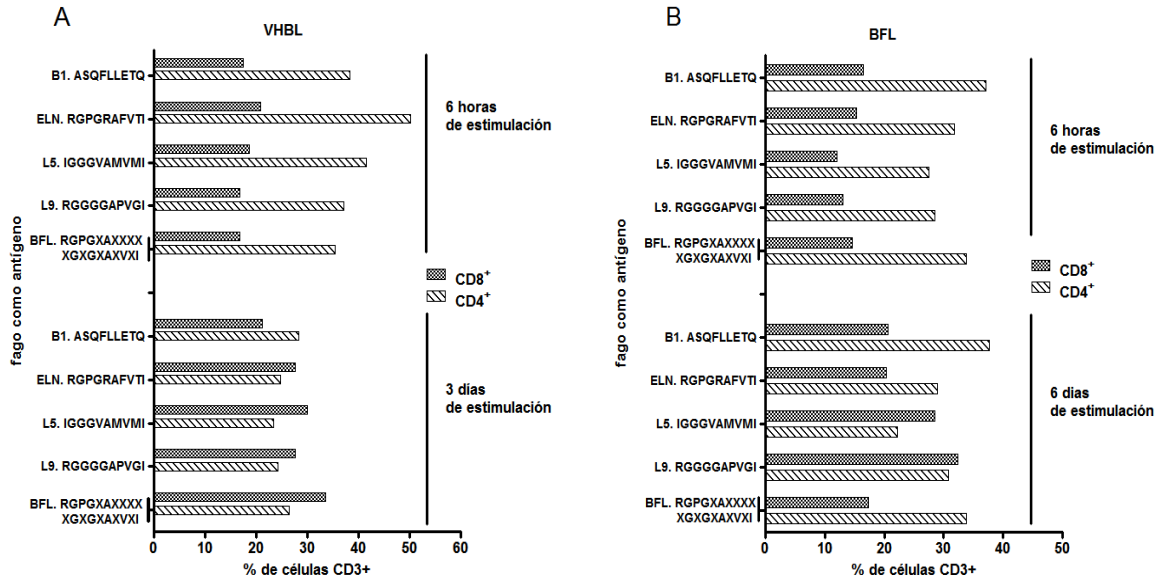
Se realizó el análisis de células CD3+CD8+IFN- $\gamma$ + mediante citometría de flujo; grupos de ratones fueron inmunizados con ADN (VHBL, VHPL y VVH). Después de 15 días de la única inmunización, los ratones fueron sacrificados y las células del bazo extraídas y estimuladas con un panel de 10 antígenos en fago correspondientes con sus similares en péptidos sintéticos. Las células fueron marcadas y analizadas; se encontró que las células de los ratones inmunizados con VHBL son mejor estimuladas por los antígenos en fago, con valores de 5 a 11% CD3+CD8+IFN- $\gamma$ + en comparación con ratones inmunizados con nominal (VHPL) donde se encontraron valores de 4 a 6% CD3+CD8+IFN- $\gamma$ + y células de ratones inmunizados con VVH del 2 al 5% CD3+CD8+IFN- $\gamma$ + (Figura 4A). En el caso de la utilización de péptidos sintéticos los valores de VHBL fueron de 0.5 a 2.5 % CD3+CD8+IFN- $\gamma$ + en comparación con VHPL que indujo valores de 0.5 a 1% CD3+CD8+IFN- $\gamma$ + y VVH con 0.2 a 0.7% CD3+CD8+IFN- $\gamma$ +. La capacidad de reconocer variantes fue similar que en los ensayos de proliferación, reconociendo específicamente más del 50% de las variantes utilizadas tanto en fagos como péptidos (Figura 4C).

Los grupos de ratones inmunizados con BFL, ELN y GK1 se comportaron de una manera similar, utilizando las mismas variantes como antígeno se encontró que las células de los ratones inmunizados con BFL presentaron valores que van del 5 al 10% CD3+CD8+IFN- $\gamma$ + en comparación con las células de los ratones inmunizados con nominal (ELN) con valores de van del 3 al 4% CD3+CD8+IFN- $\gamma$ + y control (GK1) con valores de 1 a 4% CD3+CD8+IFN- $\gamma$ + utilizando fago como antígeno (Figura 4B). Para el caso de la utilización de péptidos como antígeno se encontraron valores para BFL de 1 a 2.5% CD3+CD8+IFN- $\gamma$ + en comparación con ELN con valores de 0.5 a 1% CD3+CD8+IFN- $\gamma$ + y control GK1 con valores de 0.2 a 0.1% CD3+CD8+IFN- $\gamma$ + (Figura 4D).



**Figura 4.** La inmunización con BEVs tienen la capacidad de estimular LTCs productores de IFN- $\gamma$  específicos contra variantes del epítipo L. Análisis por citometría de flujo de células CD3+ CD8+ IFN- $\gamma$ + de ratones inmunizados una vez con BEVs. Se analizaron las células de los ratones 15 días después de la inmunización. A y B, las células fueron estimuladas por 3 días con fago como antígeno. C y D, las

Por otro lado, se realizaron inmunizaciones de grupos de ratones con las diferentes BEVs, 15 días después los ratones fueron sacrificados y sus células estimuladas con un panel de 2 variantes (L5 y L9), nominal (ELN) y bibliotecas (BFL) en fago. En la Figura 5A, se muestra un incremento en las poblaciones de células CD3+CD8+ después de 3 días en comparación con 6 horas de estimulación en el caso de los grupos inmunizados con VHBL; por otro lado, se encontró un perfil similar en células estimuladas 6 días en comparación con 6 horas en los grupos inmunizados con BFL (Figura 5B).



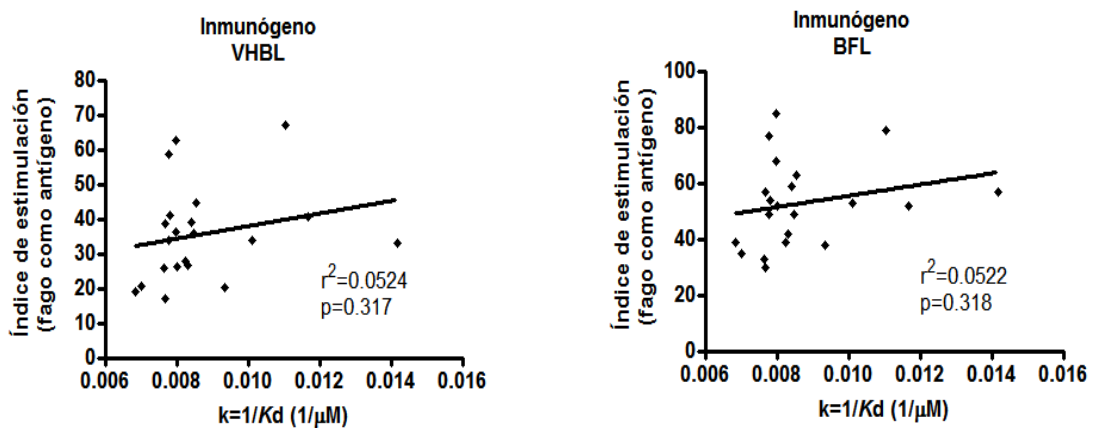
**Figura 5. Las variantes del epítoto L modifican los perfiles de poblaciones celulares *in vitro* de ratones inmunizados con BEVs.** Análisis de poblaciones celulares CD3+CD8+ y CD3+CD4+ mediante citometría de flujo. Grupos de ratones fueron inmunizados una vez con los diferentes inmunógenos y sacrificados 15 después. A) las células de los ratones inmunizados con VHBL fueron estimuladas por 6 horas y 3 días con los antígenos descritos en el gráfico. B) las células de ratones inmunizados con BFL

En el caso de las poblaciones de células CD3+CD4+ obtenidas de los ratones inmunizados con VHBL, se observó por el contrario, una disminución de las poblaciones celulares al tercer día de estimulación. Se puede observar que la presencia de los antígenos experimentales aumenta la disminución de este tipo de población *in vitro* en comparación con el control B1 (Figura 5A). Por otro lado, en el caso de las células obtenidas de ratones inmunizados con BFL, se puede observar de la misma manera una disminución de las poblaciones celulares CD3+CD4+ (Figura 5B) aunque no tan visible como en el caso de los grupos inmunizado con VHBL (Figura 5A).

**Los índices de estimulación in vitro correlacionan con la estabilidad del complejo péptido-CPH I: un acercamiento bio-informático.**

Para que una célula T pueda ser activada es necesaria que esta sea estimulada través de una serie de señales transmitidas por moléculas especializadas tales como el receptor de célula T (RCT). Este receptor recibe señales de un complejo importante llamado complejo péptido:CPH I, este complejo es presentado por cualquier célula nucleada del organismo y especialmente cuando hay un proceso de infección, por células presentadoras de antígeno. Existen algunos reportes que indican que la estabilidad del complejo péptido:CPH es importante para permitir la adecuada respuesta de células T. Por esta razón, decidimos indagar si existía una relación entre las afinidades teóricas de las variantes al CPH I y la respuesta a los antígenos con los datos obtenidos en los ensayos de incorporación de timidina.

Para realizar esto, se llevo a cabo una búsqueda en la base de datos Protein Data Bank y se descargó el archivo con número de acceso 1DDH. Este archivo describe la cristalización de una molécula CPH clase I de ratón H2-D<sup>d</sup> en complejo con el péptido L (RGPGRAFVTI) de VIH derivado de la proteína gp120. Con el programa SwissPdb Viewer se efectuaron las mutaciones *in silico* con base en las secuencias obtenidas de las clonas utilizadas. Se realizó un análisis de correlación entre los promedios de los índices de estimulación obtenidos in vitro contra las Kds teóricas de los complejos péptido:CPH. Se encontró una tendencia positiva entre los índices de estimulación y las afinidades obtenidas *in silico* aunque estadísticamente no significativa (Figura 6), lo que indicaría que entre mayor estabilidad del complejo, mejor la capacidad de estimulación celular.

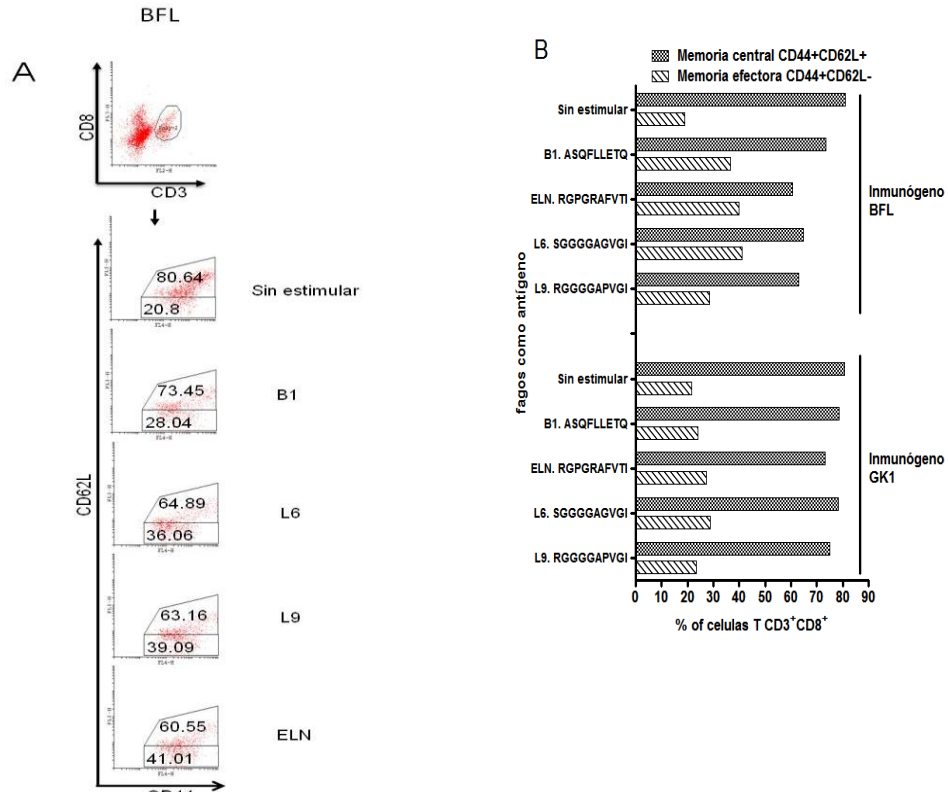


**Figura 6. Los índices de estimulación están relacionados con las Kds teóricas.** Relación entre índices de estimulación obtenidos con fago como antígeno y determinación de afinidades teóricas (Kds) in silico.

**Las Bibliotecas de Epítomos Variables tienen la capacidad de generar memoria celular específica.**

La capacidad de las vacunas para generar memoria inmunológica contra patógenos es de vital importancia ya que esta determina la capacidad de respuesta contra un reencuentro con el patógeno además de la efectividad para la erradicación de este del organismo. Por esta razón, decidimos evaluar la capacidad de las BEVs para inducir memoria celular específica contra variantes. Se inmunizaron grupos de ratones una vez con inmunógenos en fago (BFL y GK1) e inmunógenos en ADN (VHBL y VVH); estos ratones fueron sacrificados 7 meses después y las células de estos fueron estimuladas con 10 antígenos correspondientes en fago y péptidos.

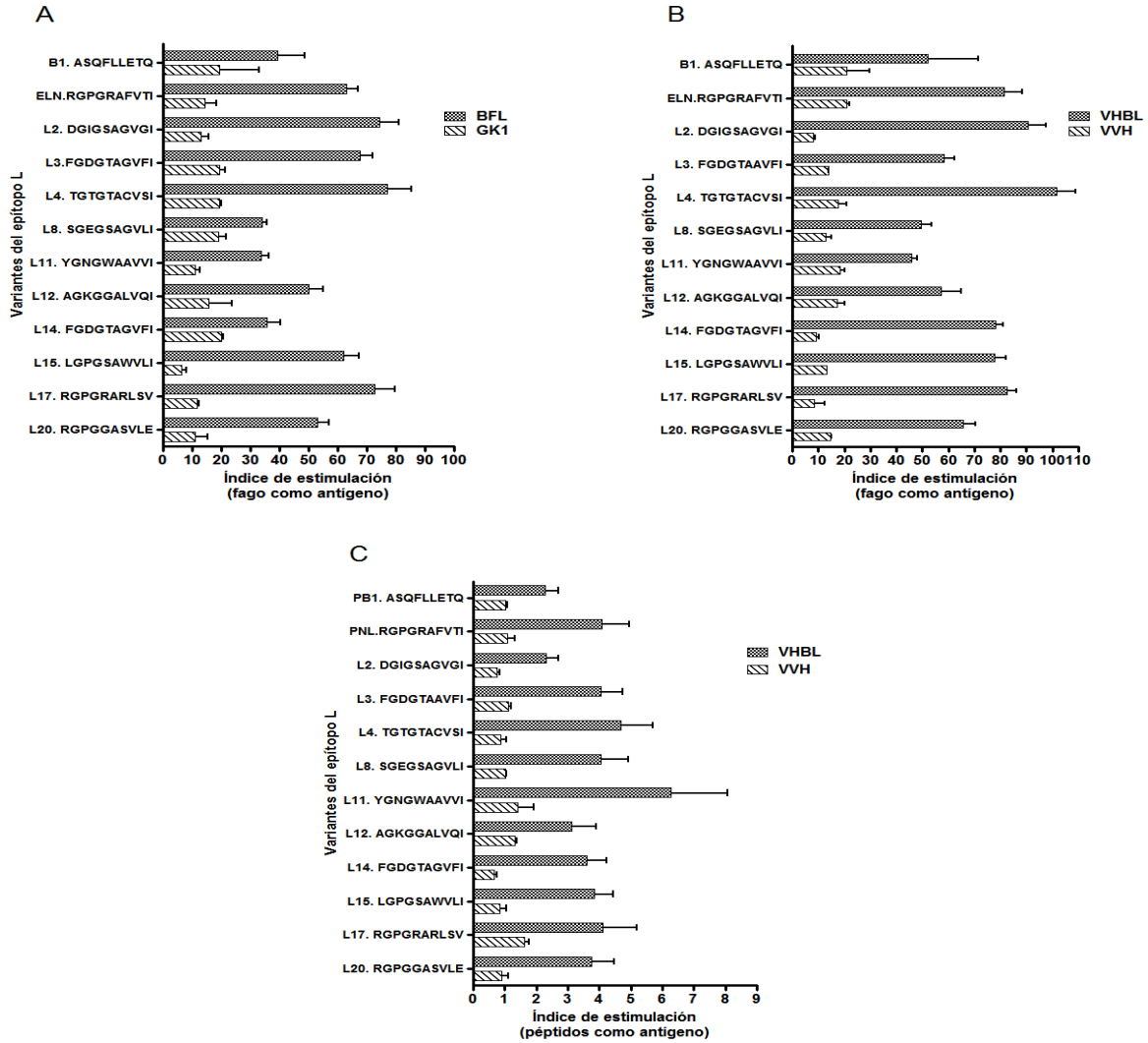
Se realizaron ensayos de citometría para medición de memoria específica utilizando células de ratones inmunizados con BFL y GK1 y estimulando con 2 variantes en fago (L6 y L9) y nominal (ELN). Se utilizaron los marcadores CD3+CD8+ para identificación de poblaciones de células T CD8, se agregaron dos marcadores más para la determinación de memoria central (CD44+CD62L+) y memoria periférica o efectora (CD44+CD62L-). Al momento de la obtención de las células de los ratones, estas fueron analizadas para estos marcadores, el resto de ellas fueron estimuladas con los antígenos por 3 días. Las células de los ratones inmunizados previa a la estimulación in vitro (Figura 7) presentaron en promedio un 80% de células con el fenotipo de memoria central (CD3+CD8+CD44+CD62L+) y 20% con el fenotipo de memoria efectora o periférica (CD3+CD8+CD44+CD62L-). Las células de estos mismos ratones fueron estimuladas in vitro con los antígenos arriba descritos; después de 3 días de estimulación las células fueron analizadas y se encontró la formación de poblaciones celulares de memoria efectora antígeno-específica, observando ELN y L6 (35 y 37% respectivamente) como antígenos con valores arriba del control. Un dato importante fue que estos antígenos no fueron capaces de estimular una memoria antígeno-específica efectora (20 a 25%) en el caso de las células de ratones inmunizados con GK1 (Figura 7).



**Figura 7. La inmunización con BEVs tiene la capacidad de estimular memoria antígeno-específica a largo plazo.** Análisis de memoria inmunológica mediante citometría de flujo utilizando marcadores para memoria central y periférica. A) Esquema representativo del procedimiento realizado, B) comparación de memoria celular generada mediante inmunización con BFL y GK1, se utilizó fago como antígeno y se estimuló por 3 días.

Las células de los ratones de estos mismos grupos fueron utilizadas para realizar experimentos de incorporación de timidina, con el propósito de ampliar el panel de antígenos utilizados además de observar la capacidad de estimular después de 7 meses de la única dosis administrada. Células de ratones inmunizados con BFL fueron estimuladas 3 días con un panel de 10 antígenos (Figura 8A), se encontraron valores de 30 a 80 de índice de estimulación, las células estimuladas del grupo de ratones inmunizados con GK1 no superó valores de 40. Se encontró un 60% (6/10) de variantes reconocidas en el grupo de BFL. Por otro lado, se experimentó con grupos inmunizados con ADN (VHBL y VVH), se encontraron índices de estimulación de 50 a 100 en las células de los ratones inmunizados con VHBL en comparación con valores no superiores a 40 en células de ratones inmunizados con VVH y estimuladas con fago como antígeno (Figura 8B). Se realizaron experimentos en paralelo con el panel de péptidos sintéticos para estimular células de ratones inmunizados con VHBL. Se encontraron índices de 2.5 a 8.5 en comparación con células de ratones inmunizados con VVH con valores que no superan un índice de 2. Por otro lado, se encontró un 70% de reconocimiento con respecto al control de antígeno (Figura 8C).





**Figura 8. La inmunización con BEVs tiene la capacidad de estimular memoria antígeno-específica a largo plazo** Análisis de memoria inmunológica mediante ensayos de proliferación celular. A y B) se estimularon las células con fago como antígeno, C) se estimularon las células con péptidos como antígeno.

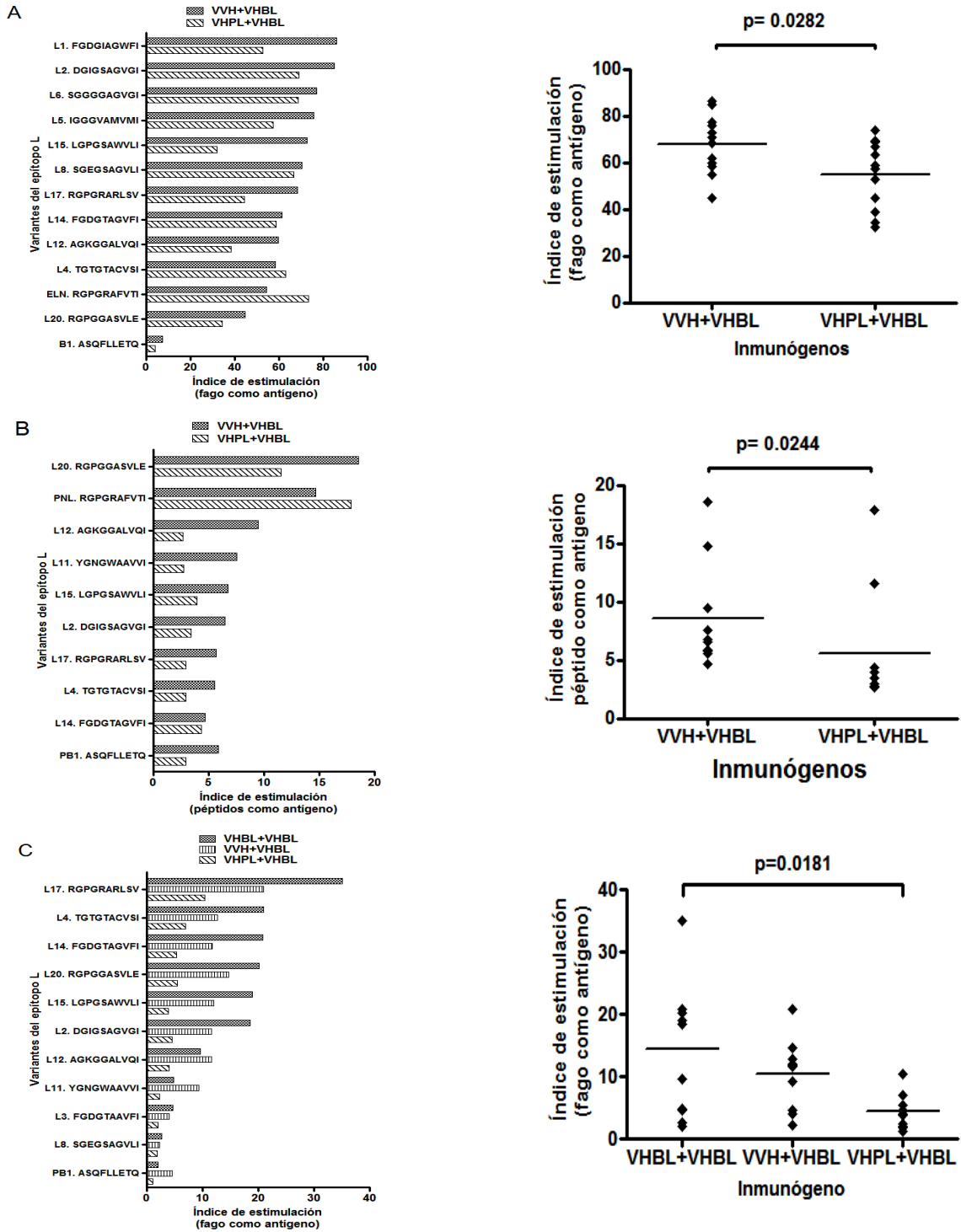
Como hemos demostrado, los BEVs tienen la capacidad de generar una respuesta inmune amplia que permite el reconocimiento de variantes, además de esta virtud, el inmunógeno es capaz de generar memoria inmunológica a largo plazo como hemos observado en los ensayos de citometría de flujo y ensayos de incorporación de timidina. Estos datos implican la capacidad de los BEVs para generar una respuesta inmune celular robusta y duradera.

**La inmunización de antígenos nominales seguido de la inmunización con BEVs disminuye la capacidad del sistema inmune para responder contra variantes del antígeno.**

Como se ha descrito previamente en la introducción y antecedentes del presente trabajo, actualmente se utilizan secuencias conservadas, consenso u otros métodos contrarios a la utilización de variantes virales como inmunógenos. Cuando se realizan ensayos clínicos con nuevos inmunógenos, los individuos reciben dosis con una limitada o nula cantidad de variantes, así pues la capacidad de generar una respuesta inmune contra las variantes podría verse influenciada; por esta razón, decidimos recrear un posible escenario donde se administraron a grupos de ratones inmunógenos nominales y posteriormente se administraron BEVs, tratando de simular un fenómeno de infección natural.

Para realizar esto, grupos de ratones fueron inmunizados por primera vez (prime) con VVH (control) y VHPL (nominal), 8 meses después se les administró un refuerzo con VHBL (BEVs), quince días después del refuerzo los ratones fueron sacrificados y los bazos obtenidos, las células fueron aisladas y estimuladas por 3 días con un panel de 10 variantes en fago y péptidos sintéticos en ensayos de incorporación de timidina. Se encontró que el grupo de ratones inmunizados primeramente con VHPL presentaron índices de estimulación significativamente menores en comparación al grupo de ratones inmunizados con VVH (Figura 9A). Este fenómeno fue ratificado mediante la utilización de péptidos sintéticos, encontrando una disminución significativa en el reconocimiento de variantes (Figura 9B). Este fenómeno de disminución de reconocimiento de variantes es remarcado en experimentos de 12 meses donde, bajo el mismo protocolo de inmunización, se puede observar que la capacidad de respuesta a las variantes se ve significativamente disminuida cuando se inmuniza primeramente con el inmunógeno nominal (Figura 9C).

Estos resultados nos indican que la capacidad del sistema inmune para responder a variantes está condicionada a la primera forma en que se presentan los inmunógenos, esto es, si utilizamos secuencias nominales para realizar inmunizaciones este no tendrá la capacidad de responder a variantes naturales del inmunógeno en una exposición subsecuente. Este fenómeno es conocido como pecado antigénico original (PAO), interferencia inmune o inmunidad heteróloga.



**Figura 9. Interferencia inmunológica generada por la administración del epítomo L previo a la administración de BEVs.** Respuesta de variantes en células de ratones inmunizados con epítomos nominales seguidos de la inmunización con BEVs. A y B grupos de ratones que fueron inmunizados con VVH (control) y VHPL (nominal), ocho meses después fueron inmunizados con VHBL (BEVs) y sacrificados 15 días después. Las células de los ratones fueron estimuladas por 3 días con fago como antígeno (A) o por 5 días con péptido como antígeno (B). C) Grupos inmunizados una vez con VHBL y sacrificados 12 meses después, las células fueron estimuladas con fago como antígeno.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.

El desarrollo de vacunas contra patógenos antigénicamente variables (VIH, VHC, influenza entre otros) representa un reto sin precedentes. Desde el descubrimiento del VIH hace 25 años se ha realizado un esfuerzo sin precedentes en investigación para comprender su ciclo de vida, formas de infección, su interacción con el sistema inmune, entre otros [75]. Toda esta información se ha utilizado para el desarrollo de vacunas que sean capaces de detener la transmisión, infección y reducción de carga viral, desafortunadamente los esfuerzos con el objetivo de desarrollar una vacuna han sido poco o nada exitosos. Uno de los problemas fundamentales a considerar es la baja capacidad de los inmunógenos generados para estimular respuestas inmunes amplias y diversas. Como hemos descrito previamente, inmunógenos basados en secuencias conservadas no parecen ser la solución puesto que no permiten la generación de una respuesta que reconozcan variantes virales y por otro lado, puede permitir la generación de inmuno-dominancia contra determinados epítomos [76-79].

En el presente trabajo, nosotros desarrollamos una plataforma novedosa donde resaltamos el hecho de la utilización de un epítomo inmuno-dominante derivado de la región V3 de la proteína gp120 de VIH, este epítomo funcionó como marco para la degeneración de posiciones de aminoácidos con el propósito de generar una BEV mimetizando de esta manera lo que sucede naturalmente en el virus silvestre. Se utilizó el marco de una región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina humana (VH) para la construcción del inmunógeno insertando el epítomo dentro de la región determinante de complementariedad 3 (HRDC 3). Esto fue debido a que previamente se ha reportado que estas regiones son susceptibles de ser procesadas y presentadas por moléculas del CPH I [80-82].

Se utilizó un vector de clonación en forma de vacuna de ADN (VHExpress), el cual es un plásmido que permite la expresión de proteínas en células eucariotas, además este vector contiene la región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina humana (VH). Por otro lado, la utilización de fago M13 como acarreador nos permite la ventaja de su fácil construcción y obtención para realizar dosis para inmunización o para ensayos de estimulación in vitro.

Los ensayos de estimulación celular in vitro (Figura 2) demostraron la capacidad de las BEVs para inducir una respuesta inmune amplia y diversa, capaz de reconocer variantes de un epítomo, de las 20 clonas seleccionada en fago como antígeno observamos un reconocimiento mayor al 50% de variantes, así mismo estos datos fueron corroborados mediante la utilización de péptidos sintéticos de los cuales más del 50% presentaron índices de estimulación mayor al control. Estos datos son importantes ya que en ensayos previos reportados por McKinney DM y colaboradores se demuestra la poca o nula capacidad de los inmunógenos reportados para reconocer variantes, donde

más de dos cambios dentro del epítomo ya no permite una estimulación o reconocimiento [83]. Este hecho es de vital importancia ya que como hemos descrito en el presente trabajo, el virus tiene la capacidad de mutar y escapar a la respuesta inmune. Cabe destacar que nosotros reportamos reconocimiento de variantes seleccionadas al azar con 5 cambios de aminoácidos cada uno. Si utilizamos este dato para calcular la complejidad teórica del inmunógeno este sería de  $3.2 \times 10^6$  variantes, de las cuales solo fueron utilizadas 10,000 variantes.

Para saber si esta capacidad de las BEVs es dependiente de la cantidad de posiciones degeneradas, se construyeron otros 3 inmunógenos con una característica importante: la disminución de posiciones degeneradas. Así pues, BFL contenía 5 posiciones degeneradas, BFL 4 contenía 4 posiciones y así sucesivamente BFL3, BFL2, y ELN como nominal, este método nos permitió determinar si la respuesta es dependiente de las posiciones degeneradas, a lo cual mediante inmunización de grupos de ratones y ensayos de proliferación encontramos una respuesta afirmativa (Figura 3). Este dato nos muestra que el sistema inmune tiene la capacidad no solo de responder contra variantes antigénicas, sino además que esta respuesta puede ser manipulada dependiendo de la complejidad de las variantes administradas, una repercusión importante sería que para patógenos con variabilidad antigénica alta como VIH, VHC o influenza, la cantidad de variantes administradas debe ser alta en comparación de una construcción contra patógenos como bacterias con bajo nivel de mutación. Por otro lado, el encontrar una complejidad ideal de variantes permitiría la administración de estas con un efecto positivo en la prevención/contención de la infección además de evitar posibles fenómenos de autoinmunidad en el individuo.

En el presente trabajo, analizamos la capacidad de generar esta respuesta inmune mediante la utilización de vectores como el fago filamentos y el ADN plasmídico (vector de expresión en células eucariotas). La capacidad de generar una respuesta inmune por ambos sistemas ha sido demostrada en este y otros trabajos [84-86]. Se pudo observar que grupos de ratones inmunizados con fago presentaron índices de estimulación mayor *in vitro* que los grupos inmunizados con ADN, esto no necesariamente debería implicar que la inmunización con fago es mejor que la de ADN (Figura 2); ya que como podemos observar en la figura 4, cuando analizamos las poblaciones de células T CD3+CD8+ productoras de IFN- $\gamma$  estimuladas con un panel de 10 antígenos, no existen diferencias visibles entre los 2 esquemas de inmunización y tampoco si comparamos con los experimentos estimulando con péptidos sintéticos y fagos como antígeno. Donde se encuentra una diferencia visible, es en el movimiento de las poblaciones CD3+CD4+ de los grupos inmunizados y presentados en la figura 5. Se puede observar que los grupos inmunizados con VHBL presentan una disminución de las poblaciones de linfocitos T CD3+CD4+ (Figura 5A) conforme se estimularon las células, lo que no se observa en el caso de los linfocitos extraídos de los grupos

inmunizados con BFL (Figura 5B); esto podría explicarse si colocamos en contexto que el fago es un estimulador de linfocitos T CD4+[39;82;87], lo cual pudiera ser confirmado por los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación celular donde los grupos inmunizados con BFL presentaron índices de estimulación más elevados con los grupos con VHBL (Figura 2A y B).

Una de las estrategias utilizadas en protocolos de inmunización, es la administración intercalada de proteína y ADN[88-90]. En experimentos realizados dentro del grupo de trabajo, se intercalaron 5 dosis con nuestros inmunógenos (VHBL+BFL y viceversa) en grupos de ratones y, se encontró que cuando se realiza la última inmunización con ADN a grupos de ratones, estos producían mayor cantidad de IFN- $\gamma$  medida en suero mediante inmuno-ensayos cuantitativos en comparación con grupos a los cuales se les administro en su última dosis BFL (Francisco Loera, tesis de licenciatura en proceso). Estos hallazgos fundamentan el hecho de que las vacunas basadas en ADN, son mejores para modular la respuesta inmune celular tipo T<sub>H</sub>1 en comparación a la administración de proteínas [81;91]; pero, los vectores basados en proteína son mejores en la modulación de respuestas humorales o producción de anticuerpos en comparación con los vectores de ADN[92;93]. Debido a esto, se propone el intercalar las dosis con ambos vectores.

En nuestro estudio tratamos de relacionar la capacidad de estimulación de los antígenos en fago con valores de afinidades teóricas obtenidas *in silico*. A pesar de no encontrar una correlación estadísticamente significativa, sí observamos una tendencia donde a mayor índice de estimulación, mayor la afinidad teórica del péptido con el CPH I. Esta afinidad está dada por la interacción de los aminoácidos del péptido con la superficie del complejo. La interacción del RCT es funcionalmente dependiente de la contribución de la estructura molecular del epítomo/péptido en la superficie de una molécula del CPH, esta interacción debe ser estable para poder activar células CD8 específicas. Por otro lado, existe una preferencia en la utilización de ciertos aminoácidos en el epítomo que le permiten estabilidad en el complejo péptido:CPH, a estos aminoácidos se le ha denominado residuos de anclaje, los cuales para el caso de la molécula H2-D<sup>d</sup> de ratón son los aminoácidos GP en las posiciones 2 y 3 del amino terminal del péptido; otros aminoácidos en la región carboxilo terminal parecieran tener un papel de anclaje aunque como hemos demostrado pueden ser modificados y no alterar gravemente el reconocimiento. Por otro lado, como observamos, algunas clonas a pesar de tener una afinidad teórica comparable, los antígenos no fueron capaces de estimular las células *in vitro*, esto puede ser debido a un mal procesamiento del epítomo o una débil interacción del RCT con el complejo péptido:CPH. Se ha propuesto que un RCT puede tener la capacidad de reconocer 10<sup>6</sup> péptidos diferentes lo que habla de un fenómeno de promiscuidad [94]. Algunos estudios indican que los RCT más afines existen solo contra los epítomos nominales y el reconocimiento de variantes es consecuencia de la promiscuidad o de bajas afinidades de RCT

[83;95]. Tal vez esta hipótesis no sea del todo correcta ya que como se ha demostrado previamente [96;97], se puede observar la capacidad de generar nuevos RCT de clonotipos diferentes capaces de reconocer variantes de un epítomo. El porqué a pesar de esta capacidad de generar RCTs con capacidad de reconocer variantes durante el curso de una infección no es eficaz en los individuos infectados, aun no es claro.

La memoria inmunológica puede ser definida como una respuesta fuerte y rápida debido a la re-exposición con un patógeno o antígeno determinado. En respuesta a una infección por un patógeno intracelular, linfocitos T CD8+ específicas se expanden en número, se diferencian a células efectoras y se diseminan a través del cuerpo, este fenómeno contribuye a la contención y/o eliminación del patógeno. Esta fase de expansión que generalmente permanece de 7 a 10 días después de la infección es seguida de una fase de eliminación o depleción de células donde el 90-95% desaparecen por mecanismos relacionados con apoptosis. El resto de la células antígeno específicas generan lo que llamamos memoria inmunológica [98;99]. Los linfocitos T CD8+ efectoras muestran un fenotipo caracterizado por citotoxicidad y producción de citocinas después de su activación a través de RCT. Las células de memoria T CD8+ muestran una disminución en la capacidad citotóxica, pero con capacidad de producir y secretar citocina con una cinética comparable a las células efectoras. Las células de memoria se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo con sus patrones de circulación: el primer grupo llamado células T de memoria central que expresan los marcadores CD62L, las cuales preferencialmente residen en los órganos linfoides secundarios y las células de memoria efectora (CD62L-), las cuales preferencialmente se encuentran localizadas en la periferia. Ambos grupos son encontrados en la sangre y en el bazo. La diferencia inmediata de la actividad entre células de memoria central y periférica tiene implicaciones importantes relacionadas con la eliminación de células blanco infectadas. Se ha propuesto que, cuando son activadas células de memoria central residentes de nódulos linfáticos, debería tener actividad de degranulación pero no ejercer actividad citotóxica ya que estas células poseen bajos niveles de moléculas citotóxicas; relacionado con esto existe una disminución en los niveles de CD62L (homing markers) lo que resulta en la migración de la célula a la periferia. Esto pudiera permitir la salida rápida del nódulo linfático y evitar una posible eliminación *in situ* de la célula presentadora de antígeno que lo activó, permitiendo la posibilidad de activar otras células T disponibles. Estos datos tienen una implicación importante sobre todo en los protocolos de inmunización y desarrollo de inmunógenos. La administración de 2 o más inmunizaciones permite la estimulación de células para que migren de los nódulos linfáticos a la periferia, permitiendo la posibilidad de que otros tipos celulares residan en ellos aumentando la capacidad del sistema inmune [98-100].

Por tanto, la capacidad de los inmunógenos para estimular la generación de células de memoria es de gran importancia; se observó en el presente estudio que las BEVs son capaces de estimular un perfil de memoria central con la sola administración de una dosis, esta capacidad de generar memoria fue analizada 7 meses después de recibir la inmunización. Los marcadores de memoria celular nos muestran una formación antígeno-específica de memoria efectora después de la re-estimulación *in vitro*, por otro lado las células obtenidas de los ratones inmunizados tienen la capacidad de proliferar y mantener el reconocimiento de variantes. Esta capacidad del inmunógeno de permitir la generación de memoria antígeno-específica contra variantes le confiere una gran importancia para la contención de una infección viral.

La aplicación masiva de candidatos a vacunas contra VIH puede presentar un riesgo potencial, ya que estos inmunógenos pueden reducir la capacidad de un conjunto de células *naive* para responder contra solo algunos epítomos incluidos en la vacuna, un fenómeno llamado enfocamiento de la respuesta inmune [76;78;101;102]; esto puede permitir el desarrollo de SIDA de una manera más rápida en personas vacunadas. La variabilidad antigénica no solo permite el escape viral sino además puede permitir un fenómeno llamado pecado antigénico original e inmunidad heteróloga, dos fenómenos que pudieran explicar el mecanismo por el cual las vacunas utilizadas actualmente fallan.

Klenerman y Zinkernagel demostraron claramente el fenómeno de pecado antigénico a nivel de células T en modelo murino utilizando el virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV), ellos examinaron la respuesta celular después de la infección con una variante de LCMV, la respuesta del ratón utilizando esta variante solo generó una respuesta celular contra la utilizada originalmente durante la infección [64]; en los experimentos presentados en la figura 9, se trató de recrear un escenario donde un individuo es inmunizado con un inmunógeno nominal y posteriormente se le administran variantes de ese epítomo, como ocurriría naturalmente durante una infección con PAVs. Encontramos que estos ratones no son capaces de montar respuestas inmunes contra las variantes, mas sí contra el epítomo nominal; este fenómeno se ve acrecentado con respecto al tiempo, ya que no se logró recrear en corto tiempo (15 días y un mes post-inmunización), sino en 7 y 12 meses. Esto sin lugar a dudas, permite creer que es un fenómeno relacionado con la memoria inmunológica [65;66]. Este fenómeno resulta ser sin duda uno de los principales obstáculos para el desarrollo de vacunas eficaces contra VIH y otros PAVs. Uno de los candidatos a vacunas, que actualmente ha fallado, consistía en la inmunización múltiple de proteínas recombinantes de envoltura de dos cepas de VIH. Esto nos lleva a pensar que la respuesta celular fue estrechada para atacar estas dos cepas virales y con los antecedentes de variabilidad antigénica presente en las



poblaciones virales de VIH, implica que es improbable que estos individuos se infecten con la misma cepa para la cual fueron vacunados.

Anderson DE y colaboradores sugirieron una alternativa mediante la administración simultánea de variantes, un concepto llamado Construcciones de Epítomos Hipervariables (CEHs), ellos encontraron que la administración simultánea de variantes permitió una expansión durable de células T ayudadoras (Helper) en comparación con la administración de nominales en forma de péptidos sintéticos [65]. En otros trabajos reportados por el mismo grupo demostraron que es posible, mediante la utilización de este tipo de construcciones, generar sueros que permitieron el reconocimiento de diferentes clados de VIH mediante inmuno-ensayos [103]. Algo discutible en estos trabajos, es la utilización de secuencias previamente reportadas por las bases de datos de retrovirus humanos de los Alamos (USA), ya que estas secuencias representan un paso atrás de la capacidad de mutación del virus, esto es, las secuencias reportadas provienen de virus aislados de individuos en fases crónicas de infección; esto representa un punto importante ya que las secuencias presentes en ese momento son de virus estables, los cuales han escapado a la respuesta inmune. Por esta razón las vacunas basadas en CEHs no fueron capaces en experimentos posteriores de prevenir o reducir la carga viral en ensayos con monos [104]. Altfeld M y colaboradores demostraron que la molécula HLA-A2 contribuye en la contención de la carga viral durante la fase aguda en sujetos infectados, pero la mayoría de los virus circulantes dentro de una población HLA-A2 positiva carecen de epítomos inmuno-génicos capaces de ser presentados por estos alelos. Ellos sugieren una conclusión muy importante: epítomos inmuno-dominantes presentados por ciertos alelos de HLA pueden perderse conforme una infección o epidemia sigue su curso [105].

Singh RAK y colaboradores demostraron de una manera más clara que el fenómeno de pecado antigénico puede ser evitado mediante la inmunización simultánea de variantes, ya que este fenómeno no depende de la alteración del péptido sino de la forma o tiempo en que se presenta [66].

Existen al menos 3 formas de explicar este fenómeno: 1) un epítomo con reactividad cruzada débil es capaz de reactivar un grupo de células T de memoria dirigidas contra el epítomo original en vez de activar un repertorio nuevo de células T; 2) el fenómeno de pecado antigénico es debido a la eliminación de células con reactividad cruzada débil con el péptido alterado y 3) la hipótesis de anergia, donde un péptido alterado reactiva débilmente a células de memoria contra el epítomo original causando una activación sub-óptima llegando a inactivar a las célula T de memoria [106]. Singh RAK y colaboradores proponen un modelo alternativo para explicar este fenómeno; ellos proponen que una población grande de células T de memoria pueden ser reclutadas por el péptido alterado presente en células dendríticas, esto ocasiona una interferencia para que las células dendríticas presenten el péptido alterado a células T *naive*. Este modelo predice que cualquier

péptido alterado puede generar pecado antigénico y no permitirá generar una respuesta secundaria independiente. Aunque este modelo pudiera ser acertado, nosotros demostramos que el fenómeno depende del tiempo de la administración de nominal y la administración de variantes acercándose a la hipótesis primeramente descrita, lo cual también pudiera fundamentarse con la necesidad del sistema inmune para dejar espacio a nuevas células T para generar una respuesta secundaria. Por otro lado, la tercera hipótesis podría no ser tan válida ya que se ha demostrado que células en anergia pueden ser reactivadas mediante la administración de un refuerzo del epítomo nominal. Así pues, aunque el fenómeno no es claro, este existe y puede ser evitado como lo hemos demostrado mediante la administración simultánea de variantes.

Como hemos mostrado en el presente trabajo, la administración simultánea de variantes de un epítomos, es una posibilidad real para aumentar la capacidad del sistema inmune para responder contra variantes antigénicas. En el presente trabajo tratamos de demostrar que la administración de BEVs, son capaces de generar una respuesta inmune celular amplia y diversa que permite el reconocimiento de variantes, la idea es mimetizar o utilizar las mismas armas que utilizan los PAVs para escapar de la respuesta inmune: la variabilidad antigénica debido a mutaciones. Así pues, en el presente trabajo, las BEVs pudieran ser una posibilidad real, para su uso en ensayos de protección contra patógenos antigénicamente variables.

## **PERSPECTIVAS.**

En el presente trabajo, utilizamos un epítomo derivado del loop V3 de la proteína gp120 de VIH, para demostrar que la utilización de variantes de éste, administrados de manera simultánea en modelo murino, pueden estimular al sistema inmune para permitir el reconocimiento de variantes en comparación a la administración de epítomos o péptidos nominales. Además de esto, demostramos la capacidad de estas construcciones para generar memoria de larga duración en este modelo animal. A pesar de esto, no deja de ser aun, un sistema alejado de un verdadero ensayo de reto *in vivo*.

Debemos demostrar si es real la capacidad de estos inmunógenos para generar una población amplia y diversa de células T. Para esto, se podría hacer uso de la técnica de tetrámeros [107-109] para la selección de poblaciones específicas de células T que reconozcan algunas de las variantes probadas en el presente trabajo. Posteriormente, aislar estas poblaciones mediante citometría de flujo y, ya sea utilizar un panel de anticuerpos para determinar familias de receptores de células T o realizar extracción de ARNm y síntesis de ADNc para la secuenciación con oligonucleótidos específicos de las regiones determinantes de complementariedad de los segmentos V $\beta$ . Así con estos análisis, podríamos determinar si un epítomo es reconocido por una o varias familia de células T. Hasta qué punto la reactividad cruzada pudiera jugar un papel en el reconocimiento de variantes estimulada por las BEVs, estos estudios serian muy importantes también dentro de la inmunología básica.

Debido a que en el presente trabajo, se realizó la construcción de un inmunógeno en base de una secuencia de la región principal de neutralización de gp120 de VIH, sería interesante determinar si la inmunización de estas variantes son capaces de generar sueros capaces de reconocer y neutralizar el virus *in vitro* (tanto cepas de laboratorio como aislados primarios). Suponemos que este inmunógeno debería ser capaz de neutralizar a diferentes aislados primarios y de diferentes clados. Como avance, se han realizado algunos experimentos en el laboratorio para demostrar esta hipótesis, estos experimentos han generado resultados prometedores (Claudia Charles, tesis de doctorado en proceso).

Un elemento importante que demostraría la eficacia del inmunógeno seria la administración de éste en un modelo de reto aprobado por la comunidad científica, tal como el simio. La administración de éste inmunógeno en el modelo, permitiría analizar la capacidad de los inmunógenos para proteger a los individuos de una infección real por el virus. Estos experimentos de ser positivos y permitan la protección contra un reto viral, permitirían analizar cuáles son los mecanismos involucrados en la protección contra el virus y cuáles de estos, deben ser tomados en cuenta como relevantes para la generación de inmunógenos contra otros patógenos con variabilidad

antigénica; además finalmente, este precedente sería la antesala de la prueba de este inmunógeno en humanos, que es la finalidad de todos los inmunógenos y/o vacunas hasta hoy generadas.

## REFERENCIAS

- [1] Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983 May 20;220(4599):868-71.
- [2] Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983 May 20;220(4599):865-7.
- [3] Montagnier L, Chermann JC, Barre-Sinoussi F, et al. Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS. *Princess Takamatsu Symp* 1984;15:319-31.
- [4] Gallo RC. Kaplan memorial lecture. The family of human lymphotropic retroviruses called HTLV: HTLV-I in adult T-cell leukemia (ATL), HTLV-II in hairy cell leukemias, and HTLV-III in AIDS. *Princess Takamatsu Symp* 1984;15:13-38.
- [5] Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984 Aug 24;225(4664):840-2.
- [6] Gao F, Yue L, White AT, et al. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* 1992 Aug 6;358(6386):495-9.
- [7] Keele BF, Van HF, Li Y, et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 2006 Jul 28;313(5786):523-6.
- [8] Van HF, Li Y, Neel C, et al. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature* 2006 Nov 9;444(7116):164.
- [9] Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 1999 Jan 8;285(1):1-32.
- [10] Poignard P, Saphire EO, Parren PW, Burton DR. gp120: Biologic aspects of structural features. *Annu Rev Immunol* 2001;19:253-74.
- [11] Freed EO. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 2001 Nov;26(1-6):13-33.
- [12] Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, et al. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol* 2004 Mar;5(3):233-6.
- [13] Burton DR. Structural biology: images from the surface of HIV. *Nature* 2006 Jun 15;441(7095):817-8.
- [14] Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 1998;67:1-25.
- [15] Deeks SG, Walker BD. The immune response to AIDS virus infection: good, bad, or both? *J Clin Invest* 2004 Mar;113(6):808-10.
- [16] Picker LJ, Watkins DI. HIV pathogenesis: the first cut is the deepest. *Nat Immunol* 2005 May;6(5):430-2.
- [17] Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 2005 Apr 28;434(7037):1093-7.
- [18] Li Q, Duan L, Estes JD, et al. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* 2005 Apr 28;434(7037):1148-52.
- [19] Hurtrel B, Petit F, Arnoult D, Muller-Trutwin M, Silvestri G, Estaquier J. Apoptosis in SIV infection. *Cell Death Differ* 2005 Aug;12 Suppl 1:979-90.
- [20] Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, et al. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med* 1999 Mar 15;189(6):991-8.
- [21] Gandhi RT, Walker BD. Immunologic control of HIV-1. *Annu Rev Med* 2002;53:149-72.
- [22] Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1994 Sep;68(9):6103-10.
- [23] Pantaleo G, Koup RA. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat Med* 2004 Aug;10(8):806-10.

- [24] Harrer T, Harrer E, Kalams SA, et al. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996 May 1;12(7):585-92.
- [25] Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* 1996;50:825-54.
- [26] McMichael AJ, Phillips RE. Escape of human immunodeficiency virus from immune control. *Annu Rev Immunol* 1997;15:271-96.
- [27] Barouch DH, Letvin NL. HIV escape from cytotoxic T lymphocytes: a potential hurdle for vaccines? *Lancet* 2004 Jul 3;364(9428):10-1.
- [28] McMichael AJ. HIV vaccines. *Annu Rev Immunol* 2006;24:227-55.
- [29] Fomsgaard A. HIV-1 DNA vaccines. *Immunol Lett* 1999 Jan;65(1-2):127-31.
- [30] Fomsgaard A, Nielsen HV, Kirkby N, et al. Induction of cytotoxic T-cell responses by gene gun DNA vaccination with minigenes encoding influenza A virus HA and NP CTL-epitopes. *Vaccine* 1999 Nov 12;18(7-8):681-91.
- [31] Doria-Rose NA, Ohlen C, Polacino P, et al. Multigene DNA priming-boosting vaccines protect macaques from acute CD4+-T-cell depletion after simian-human immunodeficiency virus SHIV89.6P mucosal challenge. *J Virol* 2003 Nov;77(21):11563-77.
- [32] Doria-Rose NA, Haigwood NL. DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimens. *Methods* 2003 Nov;31(3):207-16.
- [33] Fuller DH, Rajakumar PA, Wu MS, et al. DNA immunization in combination with effective antiretroviral drug therapy controls viral rebound and prevents simian AIDS after treatment is discontinued. *Virology* 2006 Apr 25;348(1):200-15.
- [34] Barouch DH, Kunstman J, Kuroda MJ, et al. Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 2002 Jan 17;415(6869):335-9.
- [35] Bratkovic T. Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. *Cell Mol Life Sci* 2009 Nov 15.
- [36] Chen X, Scala G, Quinto I, et al. Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with phage-displayed HIV-1 epitopes. *Nat Med* 2001 Nov;7(11):1225-31.
- [37] Acero G, Manoutcharian K, Vasilevko V, et al. Immunodominant epitope and properties of pyroglutamate-modified Abeta-specific antibodies produced in rabbits. *J Neuroimmunol* 2009 Aug 18;213(1-2):39-46.
- [38] Gevorkian G, Manoutcharian K, Larralde C, et al. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol Lett* 1996 Mar;49(3):185-9.
- [39] Manoutcharian K. Bacteriophages as tools for vaccine and drug development. *Expert Rev Vaccines* 2005 Feb;4(1):5-7.
- [40] Cano A, Viveros M, Acero G, et al. Antigenic properties of phage displayed peptides comprising disulfide-bonded loop of the immunodominant region of HIV-1 gp41. *Immunol Lett* 2004 Sep;95(2):207-12.
- [41] Freund NT, Enshell-Seijffers D, Gershoni JM. Phage display selection, analysis, and prediction of B cell epitopes. *Curr Protoc Immunol* 2009 Aug;Chapter 9:Unit.
- [42] McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. *Nature* 2001 Apr 19;410(6831):980-7.
- [43] McMichael AJ, Callan M, Appay V, Hanke T, Ogg G, Rowland-Jones S. The dynamics of the cellular immune response to HIV infection: implications for vaccination. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2000 Aug 29;355(1400):1007-11.
- [44] Bano AS, Sood V, Neogi U, et al. Genetic and functional characterization of human immunodeficiency virus type 1 VprC variants from north India: presence of unique

- recombinants with mosaic genomes from B, C and D subtypes within the open reading frame of Vpr. *J Gen Virol* 2009 Nov;90(Pt 11):2768-76.
- [45] Galetto R, Negroni M. Mechanistic features of recombination in HIV. *AIDS Rev* 2005 Apr;7(2):92-102.
- [46] Delwart EL, Mullins JI, Gupta P, et al. Human immunodeficiency virus type 1 populations in blood and semen. *J Virol* 1998 Jan;72(1):617-23.
- [47] Delwart EL, Mullins JI, Gupta P, et al. Human immunodeficiency virus type 1 populations in blood and semen. *J Virol* 1998 Jan;72(1):617-23.
- [48] Bocharov G, Ford NJ, Edwards J, Breinig T, Wain-Hobson S, Meyerhans A. A genetic-algorithm approach to simulating human immunodeficiency virus evolution reveals the strong impact of multiply infected cells and recombination. *J Gen Virol* 2005 Nov;86(Pt 11):3109-18.
- [49] Althaus CL, Bonhoeffer S. Stochastic interplay between mutation and recombination during the acquisition of drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2005 Nov;79(21):13572-8.
- [50] Anderson JP, Daifuku R, Loeb LA. Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides. *Annu Rev Microbiol* 2004;58:183-205.
- [51] Pantaleo G, Soudeyns H, Demarest JF, et al. Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8+ T cell clones during primary HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Sep 2;94(18):9848-53.
- [52] Brander C, Frahm N, Walker BD. The challenges of host and viral diversity in HIV vaccine design. *Curr Opin Immunol* 2006 Aug;18(4):430-7.
- [53] Phillips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, et al. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* 1991 Dec 12;354(6353):453-9.
- [54] Price DA, Goulder PJ, Klenerman P, et al. Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Mar 4;94(5):1890-5.
- [55] Goulder PJ, Brander C, Tang Y, et al. Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature* 2001 Jul 19;412(6844):334-8.
- [56] Barouch DH, Powers J, Truitt DM, et al. Dynamic immune responses maintain cytotoxic T lymphocyte epitope mutations in transmitted simian immunodeficiency virus variants. *Nat Immunol* 2005 Mar;6(3):247-52.
- [57] Leslie AJ, Pfafferott KJ, Chetty P, et al. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med* 2004 Mar;10(3):282-9.
- [58] Barouch DH, Letvin NL. Viral evolution and challenges in the development of HIV vaccines. *Vaccine* 2002 Dec 19;20 Suppl 4:A66-A68.
- [59] Pantaleo G, Soudeyns H, Demarest JF, et al. Accumulation of human immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes away from the predominant site of virus replication during primary infection. *Eur J Immunol* 1997 Dec;27(12):3166-73.
- [60] Lieberman J, Shankar P, Manjunath N, Andersson J. Dressed to kill? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection. *Blood* 2001 Sep 15;98(6):1667-77.
- [61] Meyer D, Torres JV. Hypervariable epitope construct: a synthetic immunogen that overcomes MHC restriction of antigen presentation. *Mol Immunol* 1999 Jul;36(10):631-7.
- [62] Meyer D, Torres JV. Induction of cytotoxic and helper T cell responses by modified simian immunodeficiency virus hypervariable epitope constructs. *Viral Immunol* 1999;12(2):117-29.
- [63] Bertoletti A, Sette A, Chisari FV, et al. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature* 1994 Jun 2;369(6479):407-10.

- [64] Klenerman P, Zinkernagel RM. Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes. *Nature* 1998 Jul 30;394(6692):482-5.
- [65] Anderson DE, Carlos MP, Nguyen L, Torres JV. Overcoming original (antigenic) sin. *Clin Immunol* 2001 Nov;101(2):152-7.
- [66] Singh RA, Rodgers JR, Barry MA. The role of T cell antagonism and original antigenic sin in genetic immunization. *J Immunol* 2002 Dec 15;169(12):6779-86.
- [67] Allen TM, Yu XG, Kalife ET, et al. De novo generation of escape variant-specific CD8+ T-cell responses following cytotoxic T-lymphocyte escape in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2005 Oct;79(20):12952-60.
- [68] Rowland-Jones SL, Dong T, Dorrell L, et al. Broadly cross-reactive HIV-specific cytotoxic T-lymphocytes in highly-exposed persistently seronegative donors. *Immunol Lett* 1999 Mar;66(1-3):9-14.
- [69] Rowland-Jones SL, Dong T, Fowke KR, et al. Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *J Clin Invest* 1998 Nov 1;102(9):1758-65.
- [70] Jacobson JM, Pat BR, Spritzler J, et al. Evidence that intermittent structured treatment interruption, but not immunization with ALVAC-HIV vCP1452, promotes host control of HIV replication: the results of AIDS Clinical Trials Group 5068. *J Infect Dis* 2006 Sep 1;194(5):623-32.
- [71] Koff WC, Johnson PR, Watkins DI, et al. HIV vaccine design: insights from live attenuated SIV vaccines. *Nat Immunol* 2006 Jan;7(1):19-23.
- [72] Schmitz JE, Johnson RP, McClure HM, et al. Effect of CD8+ lymphocyte depletion on virus containment after simian immunodeficiency virus SIVmac251 challenge of live attenuated SIVmac239delta3-vaccinated rhesus macaques. *J Virol* 2005 Jul;79(13):8131-41.
- [73] Reynolds MR, Weiler AM, Weisgrau KL, et al. Macaques vaccinated with live-attenuated SIV control replication of heterologous virus. *J Exp Med* 2008 Oct 27;205(11):2537-50.
- [74] Wild J, Bojak A, Deml L, Wagner R. Influence of polypeptide size and intracellular sorting on the induction of epitope-specific CTL responses by DNA vaccines in a mouse model. *Vaccine* 2004 Apr 16;22(13-14):1732-43.
- [75] Fauci AS, Johnston MI, Dieffenbach CW, et al. HIV vaccine research: the way forward. *Science* 2008 Jul 25;321(5888):530-2.
- [76] Tenzer S, Wee E, Burgevin A, et al. Antigen processing influences HIV-specific cytotoxic T lymphocyte immunodominance. *Nat Immunol* 2009 May 3.
- [77] Loffredo JT, Bean AT, Beal DR, et al. Patterns of CD8+ immunodominance may influence the ability of Mamu-B\*08-positive macaques to naturally control simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J Virol* 2008 Feb;82(4):1723-38.
- [78] Hasegawa A, Moriya C, Liu H, et al. Analysis of TCRalpha combinations used by simian immunodeficiency virus-specific CD8+ T cells in rhesus monkeys: implications for CTL immunodominance. *J Immunol* 2007 Mar 15;178(6):3409-17.
- [79] Bihl F, Frahm N, Di GL, et al. Impact of HLA-B alleles, epitope binding affinity, functional avidity, and viral coinfection on the immunodominance of virus-specific CTL responses. *J Immunol* 2006 Apr 1;176(7):4094-101.
- [80] Bona CA, Casares S, Brumeanu TD. Towards development of T-cell vaccines. *Immunol Today* 1998 Mar;19(3):126-33.
- [81] Cano A, Fragoso G, Gevorkian G, et al. Intraspleen DNA inoculation elicits protective cellular immune responses. *DNA Cell Biol* 2001 Apr;20(4):215-21.
- [82] Manoutcharian K, Terrazas LI, Gevorkian G, et al. Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis. *Infect Immun* 1999 Sep;67(9):4764-70.



- [83] McKinney DM, Skvoretz R, Livingston BD, et al. Recognition of variant HIV-1 epitopes from diverse viral subtypes by vaccine-induced CTL. *J Immunol* 2004 Aug 1;173(3):1941-50.
- [84] Manoutcharian K, Rosas G, Hernandez M, et al. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol* 1996 Apr;82(2):250-4.
- [85] Manoutcharian K, Terrazas LI, Gevorkian G, Govezensky T. Protection against murine cysticercosis using cDNA expression library immunization. *Immunol Lett* 1998 Jul;62(3):131-6.
- [86] Manoutcharian K, Terrazas LI, Gevorkian G, Govezensky T. DNA pulsed macrophage-mediated cDNA expression library immunization in vaccine development. *Vaccine* 1999 Oct 14;18(5-6):389-91.
- [87] Manoutcharian K, Diaz-Orea A, Gevorkian G, et al. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2004 May;99(1-2):11-24.
- [88] Allen TM, Vogel TU, Fuller DH, et al. Induction of AIDS virus-specific CTL activity in fresh, unstimulated peripheral blood lymphocytes from rhesus macaques vaccinated with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara boost regimen. *J Immunol* 2000 May 1;164(9):4968-78.
- [89] Barefoot B, Thornburg NJ, Barouch DH, et al. Comparison of multiple vaccine vectors in a single heterologous prime-boost trial. *Vaccine* 2008 Nov 11;26(48):6108-18.
- [90] Hanke T, Samuel RV, Blanchard TJ, et al. Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost vaccination regimen. *J Virol* 1999 Sep;73(9):7524-32.
- [91] Barouch DH, Letvin NL. DNA vaccination for HIV-1 and SIV. *Intervirology* 2000;43(4-6):282-7.
- [92] Carlos MP, Anderson DE, Gardner MB, Torres JV. Immunogenicity of a vaccine preparation representing the variable regions of the HIV type 1 envelope glycoprotein. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000 Jan 20;16(2):153-61.
- [93] Haynes BF, Torres JV, Langlois AJ, et al. Induction of HIVMN neutralizing antibodies in primates using a prime-boost regimen of hybrid synthetic gp120 envelope peptides. *J Immunol* 1993 Aug 1;151(3):1646-53.
- [94] Chen ZW, Li Y, Zeng X, et al. The TCR repertoire of an immunodominant CD8+ T lymphocyte population. *J Immunol* 2001 Apr 1;166(7):4525-33.
- [95] Lee JK, Stewart-Jones G, Dong T, et al. T cell cross-reactivity and conformational changes during TCR engagement. *J Exp Med* 2004 Dec 6;200(11):1455-66.
- [96] Draenert R, Allen TM, Liu Y, et al. Constraints on HIV-1 evolution and immunodominance revealed in monozygotic adult twins infected with the same virus. *J Exp Med* 2006 Mar 20;203(3):529-39.
- [97] Rebai N, Pantaleo G, Demarest JF, et al. Analysis of the T-cell receptor beta-chain variable-region (V beta) repertoire in monozygotic twins discordant for human immunodeficiency virus: evidence for perturbations of specific V beta segments in CD4+ T cells of the virus-positive twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Feb 15;91(4):1529-33.
- [98] Vezys V, Yates A, Casey KA, et al. Memory CD8 T-cell compartment grows in size with immunological experience. *Nature* 2009 Jan 8;457(7226):196-9.
- [99] Hovav AH, Panas MW, Osuna CE, Cayabyab MJ, Autissier P, Letvin NL. The impact of a boosting immunogen on the differentiation of secondary memory CD8+ T cells. *J Virol* 2007 Dec;81(23):12793-802.
- [100] Letvin NL, Mascola JR, Sun Y, et al. Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. *Science* 2006 Jun 9;312(5779):1530-3.

- [101] Yu XG, Addo MM, Rosenberg ES, et al. Consistent patterns in the development and immunodominance of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD8+ T-cell responses following acute HIV-1 infection. *J Virol* 2002 Sep;76(17):8690-701.
- [102] Goulder PJ, Sewell AK, Lalloo DG, et al. Patterns of immunodominance in HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte responses in two human histocompatibility leukocyte antigens (HLA)-identical siblings with HLA-A\*0201 are influenced by epitope mutation. *J Exp Med* 1997 Apr 21;185(8):1423-33.
- [103] Anderson DE, Malley A, Benjamini E, Gardner MB, Torres JV. Hypervariable epitope constructs as a means of accounting for epitope variability. *Vaccine* 1994 Jun;12(8):736-40.
- [104] Anderson DE, Singapuri A, Kang KH, Montefiori DC, Torres JV. Timing of retroviral infection influences anamnestic immune response in vaccinated primates. *Viral Immunol* 2005;18(4):689-94.
- [105] Altfeld M, Allen TM, Kalife ET, et al. The majority of currently circulating human immunodeficiency virus type 1 clade B viruses fail to prime cytotoxic T-lymphocyte responses against an otherwise immunodominant HLA-A2-restricted epitope: implications for vaccine design. *J Virol* 2005 Apr;79(8):5000-5.
- [106] McMichael AJ. The original sin of killer T cells. *Nature* 1998 Jul 30;394(6692):421-2.
- [107] Egan MA, Kuroda MJ, Voss G, et al. Use of major histocompatibility complex class I/peptide/beta2M tetramers to quantitate CD8(+) cytotoxic T lymphocytes specific for dominant and nondominant viral epitopes in simian-human immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Virol* 1999 Jul;73(7):5466-72.
- [108] McMichael AJ, Kelleher A. The arrival of HLA class II tetramers. *J Clin Invest* 1999 Dec;104(12):1669-70.
- [109] Subbramanian RA, Moriya C, Martin KL, et al. Engineered T-cell receptor tetramers bind MHC-peptide complexes with high affinity. *Nat Biotechnol* 2004 Nov;22(11):1429-34.