



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**Diseño, expresión y purificación de dos vacunas
multiepitópicas para HIV-1**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

DAVID GILBERTO PÉREZ SAUCEDO

DIRECTORA DE TESIS : DRA. LETICIA MORENO FIERROS



SEPTIEMBRE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Índice

Índice de figuras	3
Abreviaturas	4
Resumen	6
Introducción	7
Objetivos	16
Estrategia experimental	17
Metodología	18
Resultados	23
Discusión	32
Conclusiones	36
Bibliografía	37

Índice de figuras

Fig. 1.- Ciclo de vida del VIH	8
Tabla 1.- Epítopos seleccionados para las construcciones quiméricas	20
Fig. 2.- Sobre-expresión y purificación de la proteína VP2 de tipo nativo	25
Fig. 3.- Clonación y selección de transformantes de la construcción quimérica MHIV-B	26
Fig. 4.- Estandarización de las condiciones de purificación de la quimera MHIV-B	27
Fig. 5.- Clonación de la quimera MHIV-A en el vector de expresión	29
Fig. 6.- Purificación y reconocimiento de la quimera MHIV-A	30
Fig. 7.- DLS de las partículas tipo virus ensambladas	32

Abreviaturas

Ad5	Adenovirus
Amp	Ampicilina
AZT	Zudovudine
bnAbs	Anticuerpos ampliamente neutralizantes
C4	Cuarto dominio conservado de gp120
CA	Cápside
cART	Terapia antirretroviral de combinación
CCDA	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
CCR5	C-C Quimiocina receptora 5
CD	Cúmulo de diferenciación
cDNA	DNA complementario
CTL	Linfocito citotóxico
CXCR4	CXC Quimiocina receptora 4
DCs	Células dendríticas
DLS	Difracción dinámica de luz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Env	proteína del envoltorio viral
Gag	Antígeno grupo-específico
gp160	glicoproteína del envoltorio
gp120	glicoproteína del envoltorio gp120
gp41	glicoproteína 41
GuHCl	Cloruro de guanidinio
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
IFN γ	Interferón gama
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IMAC	Cromatografía de afinidad por metal inmovilizado
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
LTR	Región terminal altamente repetitiva
MCS	Sitio múltiple de clonación
MP	Membrana plasmática
mRNA	RNA mensajero
NC	Nucleocápside
PBS	Regulador salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Profilaxis post-exposición
PR	Proteasa
PREP	Profilaxis pre-exposición
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptasa Inversa
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida
SIV	Virus de inmunodeficiencia de simios
STR	Régimen de una sola tableta

TAR	trans activation response element Elemento de respuesta
TCR	Receptor de células T
Th	Células T cooperadoras
V3	asa V3 de la gp120
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
VLP	Partícula tipo virus
WT	Tipo nativa

Resumen

El Virus de Inmunodeficiencia Humana es un lentivirus y un miembro de la familia *Retroviridae*, causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana Adquirida (SIDA). De acuerdo a estimados por la Organización Mundial de Salud y la UNAIDS, para el final del 2014, 36.9 millones de personas que vivían con HIV en el mundo, de los cuales 2 millones fueron nuevos casos y 1.2 millones murieron por complicaciones relacionadas al SIDA. El advenimiento de la terapia anti-retroviral (ART, por sus siglas en inglés) ha mejorado la longevidad y la calidad de vida de los individuos infectados por HIV mediante el control de la replicación viral. A pesar de su efectividad, la terapia presenta una serie de limitaciones que impiden su implementación a nivel mundial - en particular en naciones en desarrollo - entre ellas su alto costo, lo cual representa una carga de por vida para los pacientes y los sistemas de salud. Por esto, se genera una necesidad de buscar terapias profilácticas que sean capaces de estimular niveles altos de inmunidad protectora al momento del contacto entre el virus y el huésped. Las vacunas multiepitópicas representan una ventaja porque se reduce la cantidad de proteína o material genético que debe ser entregado durante la vacunación, facilitan la construcción de vacunas de múltiples aislados (clados/subtipos) y permiten el dirigir la respuesta inmune a regiones proteicas importantes o conservadas, reduciendo así las posibilidades de incorporar proteínas indeseadas. Un aspecto importante de las vacunas multiepitópicas son las partículas tipo virus (VLP), las cuales representan un sistema atractivo de entrega y presentación de antígenos por su capacidad de estimular tanto respuestas humorales como celulares, así como por su estructura espacial, la cual permite el exhibir epítomos conformacionales.

En el presente estudio, se diseñaron dos construcciones quiméricas basadas en el sistema de acarreador de la proteína VP2 del parvovirus humano B19, acoplado a distintos epítomos de HIV-1 identificados como sitios de unión de anticuerpos altamente neutralizantes, respuestas celulares citotóxicas y de linfocitos cooperadores. Las quimeras, denominadas MHIV-A y MHIV-B fueron optimizadas para su expresión en *E. coli* y sintetizadas químicamente, para su posterior subclonación en el vector de expresión pET22b+. Las quimeras pudieron ser expresadas en altas concentraciones (65 mg proteína recombinante/ L cultivo) y se presentaron un patrón de solubilidad y purificación distinto con respecto a la VP2 de tipo nativo (WT). Finalmente, se caracterizaron las partículas tipo virus (VLP) generadas, y se observaron cápsides completas con un tamaño promedio de 16-25 nm para las quimeras ensambladas en una proporción 1:3 (quimera:VP2 WT), 15:15:70 (MHIV-A:MHIV-B:VP2 WT) y MHIV-B 100%, mientras que el ensamblaje de la quimera MHIV-A 100% sólo produjo intermediarios de ensamblaje, sugiriendo la importancia de las interacciones entre la región multiepitópica y los monómeros de B19 VP2 en el proceso de ensamblaje.

Introducción

El HIV pertenece a la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*, por lo cual contiene un genoma en forma de RNA, el cual es llevado a DNA por la transcriptasa inversa e integrado al cromosoma del huésped después de la infección de nuevas células blanco. Estructuralmente se trata de un virus envuelto, con un diámetro promedio de 130-140 nm. Su genoma puede considerarse sencillo con sólo 9 marcos abiertos de lectura que codifican para 15 proteínas -6 estructurales y 9 no estructurales-. El HIV infecta principalmente células linfoides CD4+ y células mieloides como macrófagos y células dendríticas (también CD4+) (Giese *et al.*, 2016).

El HIV-1 se divide en cuatro grupos distintos: P, de reciente identificación, outlier (O), N (no-M y no-O) y, mayor (M), que representa el 90% de las infecciones por HIV. Además, contiene 11 subtipos (A – K), siendo los subtipos B y C los predominantes en América, Australia, Europa y África del sur y oriental, respectivamente. Mundialmente, la ruta principal de transmisión es el contacto sexual heterosexual (>75%), mientras que el 4-9% de las nuevas infecciones son contagios verticales al momento del parto (O'Cofaigh & Lewthwaite, 2013).

Globalmente se registran 63.7 millones de personas viviendo con HIV, 2.1 millones de nuevas infecciones y un total de 1.1 millones de muertes; el número de personas en terapia anti-retroviral es de 18.2 millones (a junio 2016). Para la región de América Latina y el Caribe se registraron 2.0 millones de personas infectadas, con ≈100,000 nuevos casos y ≈50,000 muertes para el año 2015 (UNAIDS, 2016).

En México se registra un total de 250,761 personas viviendo con HIV y SIDA (64,106 HIV+ y 186,655 con SIDA). Desde el año 1983 la principal vía de transmisión es la sexual, seguida por la sanguínea (contagio supuestamente erradicado desde el año 2005), usuarios de drogas intravenosas y vía perinatal. Para el año 2014 se calculó la tasa de defunciones por SIDA en México a 3.98 por 100,000 habitantes. Para los años 2015-2016 se registraron 21,300 casos nuevos de HIV y SIDA. El grupo de edad con mayor prevalencia de progresión a SIDA (años 1983-2016) es el de 30 a 34 años de edad con 35,000 casos (20% del total) para hombres y mujeres (del total de 186,665 reportado 1983-2016) (CENSIDA, 2016).

A nivel mundial, aproximadamente el 46% de las personas infectadas se encuentran bajo tratamiento, sólo el 38% de las personas que viven con HIV están en supresión viral. Más de 14.5 de las 36.7 millones de personas infectadas desconocen su estado de HIV (40%). Para América Latina, existe una mayor proporción de personas que conoce su estado de HIV (75%) y que se encuentra en tratamiento (55%), sin embargo, todavía existe un largo camino por recorrer. La población en riesgo más afectada han sido los homosexuales y hombres que tienen sexo con hombres, representando una tercera parte de las nuevas infecciones en 2014 (Prevention Gap Report, 2016; UNAIDS, 2016).

La infección por HIV-1, cuando no es tratada, progresa a SIDA, cuadro clínico caracterizado por la pérdida de linfocitos T CD4+ a menos de 200 células/ μ L y la aparición de enfermedades oportunistas como tuberculosis, tumores asociados a virus y enfermedades bacterianas crónicas.

Ciclo de vida del HIV

La transmisión del virus se puede dar por difusión pasiva a través de los fluidos extracelulares, por transporte paracelular entre las uniones estrechas, transcitosis viral entre las células epiteliales de la mucosa genital y células presentadoras y macrófagos residentes en la lámina propia, y la sinapsis virológica -la más eficiente- en la cual existe una acumulación de proteínas virales y los receptores celulares CD4+, CXCR4 y CCR5 en las uniones intercelulares. La transmisión célula – célula es más rápida, por lo cual es menos probable que sea detectada por el sistema inmune.

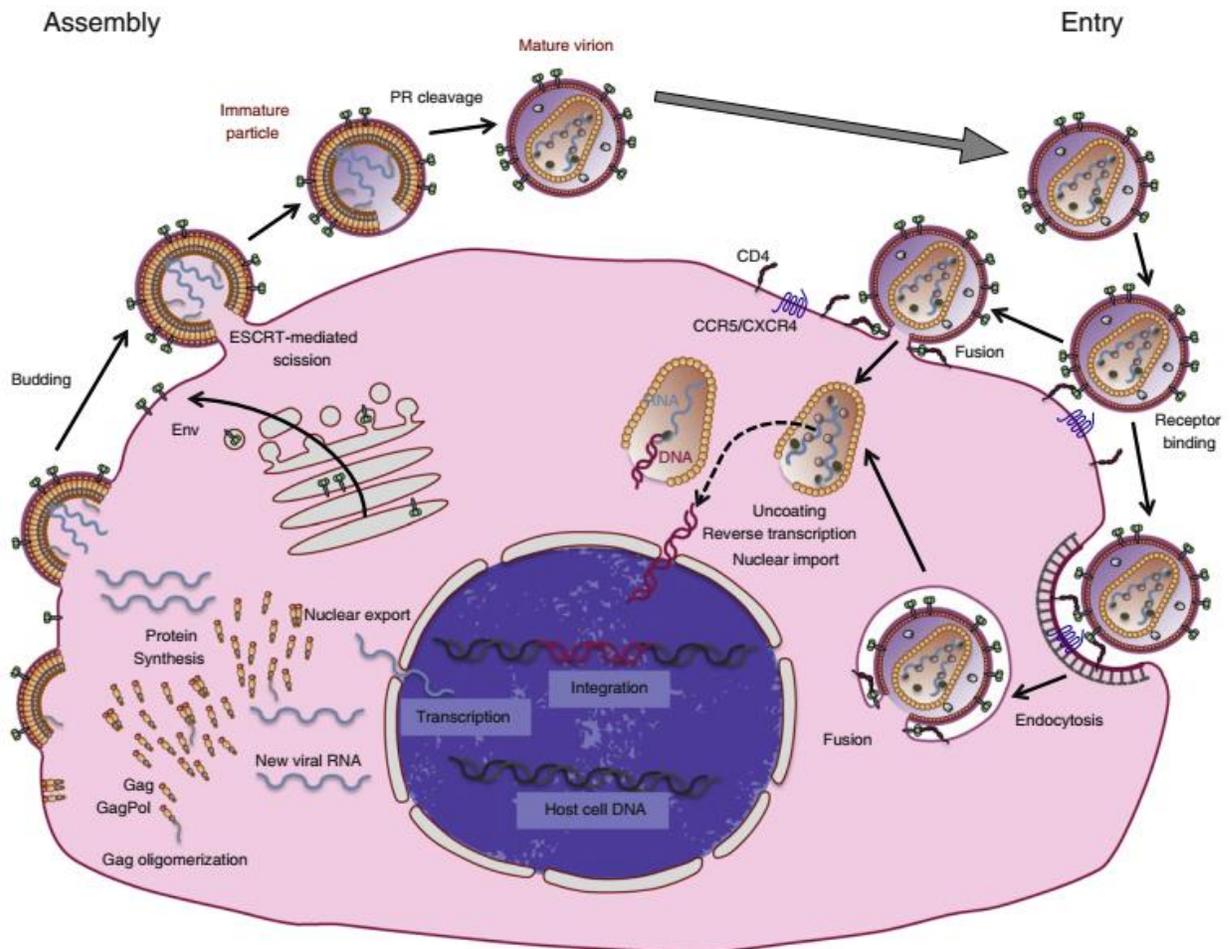


Fig. 1.- Ciclo de vida del HIV. Del lado superior derecho se observa la unión al receptor CD4+ y la internalización del virus, la importación al núcleo del material genético y su posterior integración. Del lado izquierdo se observa la producción de nuevas proteínas virales y la formación y maduración de los viriones.

El virus entra en la célula mediante la unión de la subunidad gp120 de Env al receptor celular CD4, lo cual induce un cambio conformacional que revela el sitio de unión del correceptor en la base del asa V3 de la gp120. Esta segunda interacción inicia cambios conformacionales adicionales en la subunidad gp41 que culminan con la fusión del envoltorio viral con la membrana plasmática de la célula huésped y la liberación del núcleo viral al citoplasma. La retro-transcripción y la degradación de la nucleocápside ocurren al mismo tiempo. Una molécula de tRNA^{Lys3} se une al sitio de unión del primer en el RNA viral y la Transcriptasa Inversa (RT) coordina los procesos de retro-transcripción y polimerización del DNA; sin embargo, su inherente alta tasa de error es una fuente de diversidad

genética que puede alcanzar 20 - 30% de diferencia en la secuencia de Env entre aislados virales. El cDNA viral es importado al núcleo por un mecanismo no totalmente comprendido, en el cual participan proteínas de la cápside en un transporte a través de los complejos de poro nucleares. Una vez en el nucleoplasma la integrasa viral corta algunas bases de los extremos 3' del cDNA viral y el cromosoma de la célula huésped, posteriormente uniendo los extremos cohesivos 3'. Los espacios restantes son rellenados por los mecanismos de reparación de daño al DNA. En células productivamente infectadas, el material genético (y por tanto la transcripción) pueden permanecer en estado de latencia (Darcis *et al.*, 2017) o servir como moldes para la producción de nuevos transcritos.

El ciclo lisogénico del virus comienza con la transcripción del DNA proviral integrado por la RNA polimerasa II del huésped, que se une a la región terminal altamente repetitiva (LTR), río arriba de un promotor tipo caja TATA. Posteriormente, la proteína viral Tat (trans-activadora de la transcripción) se une al elemento de respuesta de la trans-activación (TAR) en los mRNA nacientes, lo cual provoca la unión de la P-TEF-b y un subsecuente aumento en la transcripción. Las concentraciones intracelulares de Tat son críticas.

La generación de nuevos viriones comienza con la traducción del gen Gag, el cual genera la poliproteína que formará la matriz (cápside externa), la cápside (CA), y las subunidades de la nucleocápside (NC) y p6. Adicionalmente, las enzimas virales IN, RT y Proteasa (PR), codificadas por el gen Pol, son producidas por un corrimiento en el marco de lectura durante la transcripción del mismo codón de inicio que el gen Gag, generando así el transcrito GagPol lo cual asegura que los componentes de la cápside se produzcan en cantidades suficientes (Gag), pero las enzimas virales se produzcan en menor cantidad para su incorporación en nuevos viriones. La poliproteína es exportada a la cara interna de la membrana plasmática mediante la miristilación del segundo residuo de glicina en el extremo N-terminal, en donde se acumula en las balsas lipídicas por su unión al Fosfatidil inositol 4,5- bisfosfato (PI(4,5)P₂), su acumulación lleva a su ensamblaje en una estructura hexamérica que produce una evaginación de la membrana. Los peplómeros son protuberancias formadas a partir de la proteína gp160, la cual es sintetizada en retículo endoplásmico, transportada por aparato de Golgi y eventualmente a la membrana plasmática, punto en el cual habrá sufrido extensas modificaciones postraduccionales que incluyen la trimerización de las proteínas, una glicosilación extensiva y el procesamiento proteolítico de furinas celulares (o proteasas tipo furina) que formarán la forma madura de la proteína, compuesta por la subunidad gp120 de superficie, y la s.u. gp41 transmembranal. Actualmente se desconoce el proceso exacto por el cual los peplómeros son reclutados a la MP, sin embargo, se sabe que se pueden encontrar de 4 a 30 espículas por virión. Posteriormente, dos copias de RNA viral son exportadas a la cara citoplásmica de la MP, donde la región señal de empacamiento del RNA interactúa con dedos de zinc de la nucleocápside, permitiendo así empaquetar dos copias del genoma por virión. Finalmente, los nuevos viriones que se han estructurado en las evaginaciones de la membrana son liberados por acción de la maquinaria endosomal de clasificación requerida por el transporte en su forma inmadura y poco tiempo después la activación autocatalítica de la PR lleva al procesamiento de las poliproteínas Gag y GagPol para generar viriones maduros (Darlix *et al.*, 2014).

Historia natural de la infección

Poco después del establecimiento de una infección productiva el individuo entra en la fase aguda de la infección, con una duración promedio de 6 semanas. A partir de la 3ª semana los pacientes desarrollan anticuerpos detectables contra el HIV-1, a este proceso se le llama seroconversión. Alrededor del 50% de los pacientes infectados presentan síntomas con un cuadro clínico similar a la gripe común (dolor de cabeza, fiebre, mialgia, diarrea) con síntomas que se resuelven dentro de un mes. Después de la seroconversión, los niveles de RNA viral en plasma bajan y la cuenta de células T CD4 se recupera (parcialmente, nunca regresa a niveles pre-seroconversión) a niveles entre 350 – 800 células/ μL . Esta etapa suele ser asintomática con la cuenta de células T CD4 decreciendo lentamente con el tiempo a lo largo de un periodo de 6 a 8 años. Existe un pequeño grupo de pacientes (estimado a 1 en 500) cuya carga viral/ cuenta de T CD4+ no progresa con el tiempo o lo hace de forma muy lenta, se les conoce como “controladores de élite” y poseen mutaciones genéticas -generalmente en los correceptores de entrada del virus- o son capaces de desarrollar anticuerpos altamente neutralizantes (bnAbs) que permiten mantener la reproducción viral controlada. Cuando la infección ha progresado al punto en el que la cuenta de células T CD4+ es $\leq 200/ \mu\text{L}$, el huésped se vuelve vulnerable a infecciones oportunistas y se le declara en Síndrome de Inmunodeficiencia. Entre las enfermedades más comunes se encuentran la tuberculosis (por *Mycobacterium tuberculosis*), candidiasis crónica, Sarcomas de Kaposi (asociados a la infección por herpesvirus 8) e infección por *Citomegalovirus* y *Rotavirus* (O'Cofaigh & Lewthwaite). Usualmente los anticuerpos altamente neutralizantes (grupo VRC01) toman de meses a años para aparecer en un curso de infección regular, y sólo aproximadamente el 25% de los pacientes HIV+ desarrollan una respuesta de bnAbs después de dos o más años de infección crónica. Estos anticuerpos presentan regiones variables altamente mutadas, sugiriendo que las células B que los producen pasaron por múltiples rondas de hipermutación somática en centros germinales en respuesta a una exposición persistente a antígenos de HIV (Cobey *et al.*, 2015).

Estrategias de escape inmune del HIV

Durante el transcurso de la infección, el virus despliega una serie de mecanismos que le permiten escapar a los mecanismos de inmunidad innata y humoral, posibilitándole replicarse y diversificarse dentro del huésped. Las proteínas accesorias del HIV (Vpu y Vpr) se encargan de suprimir las respuestas del huésped a los procesos de integración del cDNA viral, de la liberación de viriones acumulados en la membrana plasmática (mediado por teterina), y del arresto del ciclo celular en células de la inmunidad innata (Cohen, 2014; Lahaye & Manel, 2015). Aunado a esto, la alta tasa de mutación del virus le confiere la capacidad de evadir las respuestas celular adaptativa y humoral. En ambos casos, las mutaciones de escape se dan debido a la presión de selección ejercida sobre el virus, en uno por las células T CD8+ específicas para el virus, y en el segundo por los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra Env que la mayoría de los pacientes seropositivos generan en el transcurso de la infección. Tras la infección, el virus transmitido / fundador es capaz de revertir las mutaciones generadas en el huésped previo y que tienen un costo de capacidad replicativa en la replicación en el nuevo huésped. Las primeras variantes de escape viral pueden reemplazar al virus fundador en cuestión de días mediante sustituciones en epítomos inmunodominantes reconocidos

por el TCR. De la misma forma, la respuesta humoral autóloga que se desarrolla después de los 2 años de infección crónica en muchos pacientes falla en controlar la replicación viral porque los anticuerpos están dirigidos contra las asas variables de Env, lo cual permite un alto nivel de variación en la secuencia sin impedir la capacidad de la replicación viral (Bunnik *et al.*, 2010; Ladell *et al.*, 2013).

Perspectiva de tratamiento actual

Desde 1987, año de aprobación del primer anti-retroviral Zidovudine (AZT), más de 25 drogas anti-retrovirales en seis grupos de acción han sido aprobadas, siendo la terapia de combinación anti-retroviral (cART, por sus siglas en inglés) el estándar de tratamiento para los pacientes seropositivos. La misma consiste en dos inhibidores de la transcriptasa reversa (nucleósido / no nucleósido) y una tercera droga de una clase distinta (Inhibidor de la proteasa, inhibidores de la Integrasa, inhibidores de entrada/fusión). Usualmente, las tres drogas son incorporadas en un régimen de una sola tableta (STRs) lo cual simplifica la adherencia del paciente al tratamiento y reduce la posibilidad de escape viral por desarrollo de resistencia al tratamiento. La implementación del cART ha permitido extender la expectativa de vida de los pacientes seropositivos a niveles normales, e incluso ser usada como alternativa de prevención en esquemas profilácticos pre/post-exposición (PREP / PEP). Sin embargo, el uso de anti-retrovirales todavía enfrenta una cantidad de efectos secundarios indeseables (toxicidad del sistema nervioso central, toxicidad gastrointestinal, síndrome de lipodistrofia, y riesgo de eventos cardiovasculares elevado), así como la falta de tolerabilidad a las drogas y enfermedades secundarias asociadas al tiempo de inicio del tratamiento (pacientes que empiezan el tratamiento con cuentas de CD4 <500/ μ L tienen una mejor prognosis de recuperación inmunológica, sin embargo, en la práctica esto no ocurre con frecuencia ya que la mayor parte de los diagnósticos de HIV+ se hacen durante la infección tardía, cuando los pacientes tienen cuentas de CD4 >250 - 300), y elevados costos para el paciente y los sistemas de salud pública encargadas de estos (Group, 2015; Zolopa, 2010).

El principal contratiempo en el desarrollo de una cura ha sido el establecimiento de reservorios virales temprano en la infección en células T CD4 de memoria, las cuales son altamente estables de forma intrínseca y proliferan de forma homeostática periódicamente, además de la inadecuada penetración de las drogas anti-retrovirales en diversos tejidos (p. ej. el cerebro) lo cual genera sitios "santuario" en donde se puede llevar a cabo la replicación viral de bajo nivel a pesar del tratamiento de combinación (cART). Se ha observado que la vida media de las células T CD4 de memoria es de 1-12 meses en células sin infectar, sin embargo, como reservorio viral presentan un tiempo de vida de hasta 44 meses. El segundo tipo celular que actúa como reservorio son las células dendríticas foliculares, las cuales si bien no son sensibles a la infección por el virus mantienen reservas del virus en su superficie -aún en presencia de anticuerpos neutralizantes- y tienen una vida media estimada de 39 meses. A este tipo celular se le atribuye la viremia de bajo grado que se observa durante el tratamiento de combinación (Kandathil *et al.*, 2016). La persistencia de reservorios virales en el cuerpo lleva al "rebote viral" (las copias de HIV RNA vuelven a elevarse en plasma, la cuenta de células CD4+ cae de nuevo) al discontinuar el tratamiento anti-retroviral, lo cual obliga a los pacientes a mantener el tratamiento de por vida. Actualmente se reconocen dos aproximaciones

hacia una cura del HIV. La primera, la “cura esterilizante”, basada en la eliminación de todos los rastros de HIV en un individuo infectado y la consecuente remisión virológica permanente. La segunda, basada en la “remisión virológica sostenida”, en la cual el paciente es capaz de controlar la replicación viral después de la suspensión del tratamiento de combinación. Ambas perspectivas son alcanzables dentro del contexto de una vacuna que ofrezca protección esterilizante (es decir, eliminación del virus antes de la primera ronda de replicación) o en forma terapéutica, como antígeno que estimule la generación de respuestas celulares citotóxicas que eliminen las células infectadas y estimulen la generación de anticuerpos ampliamente neutralizantes (bnAbs) que sean capaces de inactivar la diversidad viral dentro del huésped (Cihlar & Fordyce, 2016; Williams, 2013).

Las vacunas y HIV, una perspectiva histórica

Se pueden identificar tres “oleadas” sobrelapantes en los paradigmas de la vacunología de HIV, comenzando en 1988: 1) inducción de anticuerpos neutralizantes; 2) inducción de respuestas de tipo citotóxico (CTL – CD8); y 3) combinación de distintas respuestas inmunes.

Los primeros esfuerzos consistieron en el uso de formas recombinantes de la proteína Env (gp120 y gp160) expresadas en células de insecto mediante sistemas de baculovirus, levaduras y líneas celulares de mamífero. Estas pruebas demostraron que las moléculas nativas glicosiladas son inmunogénicas y capaces de inducir nAbs, inducir respuestas de tipo CD4+, pero resultan inefectivas para generar respuestas CD8+ CTL.

Posteriormente se desarrollaron estrategias de inmunización basadas en la inmunización secuencial con vectores virales recombinantes vivos y la proteína del envoltorio (Env). Esta clase de regímenes mostraron la capacidad de incrementar la inducción de anticuerpos neutralizantes, además de generar respuestas de tipo citotóxico.

El vector que fue usado con mayor frecuencia está basado en el virus de la viruela de canarios, incapaz de replicarse en células de mamíferos, intentando solucionar el problema de la seguridad de administrar una vacuna terapéutica en poblaciones inmunosuprimidas. Además, consistió en las primeras pruebas clínicas en usar vectores que expresan múltiples genes de HIV (Env, gp120, gag, proteasa viral), aunque su baja efectividad se atribuyó al uso de proteínas del clado B en una población donde los clados circulantes son A y D.

En 1990 fue identificado el “Principal Neutralizing Determinant – determinante neutralizante principal” y fue mapeado a la tercera asa hipervariable de gp120, donde la inmunización de conejillos de india con péptidos de V3 inducía nAbs contra HIV.

En 1993 se prueba la primera vacuna multiepitópica en China, consistiendo en una construcción octamérica de V3 que fue capaz de inducir nAbs cepa – específicos.

Para 1994 las pruebas clínicas de fase I y II de dos productos basados en la gp120 prepararon el terreno para las primeras pruebas internacionales de fase III en humanos. En 1998 comenzaron las pruebas de las formulaciones VAX003 y VAX004 (preparaciones bivalentes de los clados B/E y B/B,

que fueron probadas en Bangkok, Tailandia y Norteamérica, respectivamente) en poblaciones de riesgo (usuarios de drogas intravenosas y hombres que tienen sexo con hombres). En 2003 al término del experimento no se observó protección contra la infección por HIV-1 (Esparza, 2013).

En septiembre del mismo año, comenzó la que sería la prueba clínica con mayor éxito hasta ahora, conocida como “Thai Trial” o RV144, en el estudio estuvieron involucrados más de 16,000 pacientes de 18 - 30 años, y consistió en un régimen de inmunización secuencial con virus de la viruela de canarios (ALVAC) reforzado con la gp120 recombinante AIDSVAX (clados) B/E (ambas formulaciones usadas en pruebas clínicas independientes, con resultados negativos). Sorpresivamente, se encontró que la vacuna confirió un nivel de protección del 60% tras un periodo de 12 meses, que disminuye progresivamente hasta 31.2% tras 3.5 años, por lo cual fue considerado un fallo (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009).

Las vacunas basadas en DNA han sido poco exitosas en generar respuestas protectoras en humanos. Desde 2001 se han registrado 11 pruebas clínicas de fase I, sin embargo, las respuestas generadas fueron muy bajas, a pesar de las distintas vías de administración. La prueba clínica más reciente (HVTN 505) en 2009 exploró una estrategia de inmunización basada en una primera inmunización con varios genes de HIV (gag, pol, nef) y un refuerzo basado en adenovirus (Ad5) que incorporaba las proteínas gag, pol y env de los clados A y B. En 2013 la prueba fue suspendida tras un análisis de efectividad que reveló una falta de protección en los participantes (Esparza, 2013).

Las vacunas hoy, ¿Qué hemos aprendido?

A pesar del modesto éxito del estudio, las muestras generadas durante este permitieron conocer aspectos importantes sobre la biología del HIV y el reto que supondría encontrar una vacuna. Por ejemplo, a partir del suero de las personas que no se infectaron (se protegieron) se establecieron múltiples correlaciones de protección (es decir, factores necesarios para la protección):

- I) Reconocimiento y especificidad de las Inmunoglobulinas A/G a las asas V1/V2 y V3 de gp120;
- II) Magnitud de la proliferación de células T CD4+ y CD8+ específicas hacia Env;
- III) Respuesta de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).

Además, se resalta la importancia de desarrollar anticuerpos contra Env – a pesar de no ser neutralizantes- ya que la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos parece tener un rol en el control prolongado de la viremia en pacientes que no progresan a SIDA (Corey *et al.*, 2015) y el hecho de que los anticuerpos neutralizantes generados por los pacientes de la prueba RV 144 (dirigidos contra el asa V3 de la gp120) sólo eran capaces de neutralizar cepas del virus de nivel 3, es decir con baja resistencia a la neutralización, sugiriendo que una respuesta de anticuerpos neutralizantes robusta no es suficiente para conferir protección contra la infección (Kim *et al.*, 2015). Estudios adicionales mostraron la importancia de dirigir la respuesta inmune por medio de antígenos adecuados. La protección conferida por los Ab anti-V1V2 fue dirigida hacia regiones conservadas; en el curso de la infección normal por HIV-1 los individuos presentan una baja frecuencia de Ab contra V2 (50%) y una alta frecuencia de Ab contra V3 (95%)(Haynes *et al.*, 2012). A pesar de que los

anticuerpos contra el asa V3 también están correlacionados con un menor riesgo de infección, su efecto protector en estos pacientes se vio bloqueado por el desarrollo de anticuerpos de tipo IgA dirigidos a la región C1 de Env, que se sabe pueden impedir la función efectora de los Ab de clase IgG (Kim *et al.*, 2015).

Proteínas multiepitópicas

La baja eficacia de las formulaciones tradicionales (virus inactivado, la proteína Env en su forma soluble o dentro de vectores virales recombinantes) para proteger ha llevado al diseño racional de inmunógenos que sean capaces de generar respuestas hacia epítomos de relevancia biológica (sitios conservados que son reconocidos por anticuerpos neutralizantes o células citotóxicas activadas). De esta forma, en nuestro grupo de trabajo se han explorado los péptidos y proteínas multiepitópicas como modelos de antígenos y se ha demostrado su antigenicidad e inmunogenicidad. Los epítomos seleccionados para estas construcciones están altamente conservados ya que el virus pierde su capacidad infecciosa si presenta mutaciones en estas regiones, además de incluir epítomos de las regiones de C4, V3, V2 y V1 de gp120, y regiones de gp41, descritas como sitio de reconocimiento en el HIV-1 por anticuerpos con capacidad de neutralizar diversos aislados del virus.

Inicialmente, el péptido rC4V3 fue producido de forma recombinante en *E. coli*, es reconocido por sueros de pacientes seropositivos (indicando que la estructura y capacidad de reconocimiento inmune de los epítomos se conservó), y al ser administrado por vía intranasal generó respuestas IgG e IgA específicas a nivel sistémico y mucosal (epitelio vaginal e intestino grueso) e indujo la proliferación de células T CD4+, incluso sin el uso de adyuvantes. Sin embargo, la construcción fue incapaz de generar una respuesta de linfocitos citotóxicos significativa (Varona-Santos *et al.*, 2006). La construcción rC4V3 también fue expresada con éxito en cloroplastos de plantas de tabaco como concepto de vacuna oral, y administrado a ratones generó respuestas humorales y celulares HIV – específicas a nivel sistémico y mucosal-, sin embargo, tampoco indujo la proliferación de células CD8+ específicas (Rubio-Infante *et al.*, 2012). Posteriormente, la construcción fue ampliada incluyendo cinco copias del gen del asa V3 provenientes de distintas cepas virales (CC, RF, MN, RU e IIIB), generando una proteína de 23 kDa que mantuvo la capacidad de ser reconocida por sueros de pacientes seropositivos. La construcción también fue expresada en cloroplastos de tabaco y lechuga, y se encontró que mantenían su antigenicidad (Govea-Alonso *et al.*, 2013).

Subsecuentemente, la construcción fue rediseñada incluyendo más epítomos de anticuerpos neutralizantes y uno de células Th, para un total de 8 epítomos (algunos de los cuales incluían múltiples copias correspondientes a distintas cepas virales) en una construcción de 32 kDa que fue expresada de forma recombinante en *E. coli* y cloroplastos de tabaco denominada “Multi-HIV”. La antigenicidad de la proteína fue confirmada por western blot usando sueros de pacientes seropositivos, y al ser administrada de forma oral a ratones BALB/c generó respuestas específicas humorales y celulares, como proliferación de linfocitos CD4+ y CD8+ productoras de IFN γ (Rosales-Mendoza *et al.*, 2014; Rubio-Infante *et al.*, 2015).

La proteína Multi-HIV comprende los siguientes epítomos: la secuencia KQIINMWQEVGKAMYA (C4)

derivada del cuarto dominio conservado de gp120, que funciona como epítipo de linfocitos T cooperadores y citotóxicos, y cuya configuración se ha asociado con propiedades adyuvantes (Graham *et al.*, 2010; Patterson *et al.*, 2001); RPNNTTRKSIHIGPGRFYATE, secuencia consenso del determinante antigénico neutralizante del asa V3 y que induce anticuerpos neutralizantes hacia el 30% de aislados primarios (B. F. Haynes *et al.*, 2006); El epítipo conservado VD20 de gp41 GIKQLQARVLAVERY es un epítipo de Th que induce respuestas específicas hacia la envoltura de larga duración y puede ser presentado de forma promiscua por HLA de los alelos DR/DQ (Kent *et al.*, 1997; Malhotra *et al.*, 2003); Incluimos la secuencia NWFEDITNWLWKKKK de gp41 entre los epítipos del asa V3 y el epítipo MWQEVGKAMYAPPIEG de gp120, que es la secuencia correspondiente al sitio de unión a CD4 localizada en el asa b20-b21, esta región es reconocida por anticuerpos como 4E10 que es capaz de neutralizar 98% de 108 aislados de HIV1 sin presentar autorreactividad (Kelker *et al.*, 2010; Kwong *et al.*, 1998); También incluimos epítipos de gp41 como 6 variantes del epítipo ELDKWA ubicado en una región altamente conservada y reconocida por anticuerpos con amplia capacidad neutralizante. Por ejemplo, las secuencias EQELLELDKWA y LWNWFEDITNWLWK son reconocidas respectivamente por los anticuerpos 2F5 y 4E10 que neutralizan varias cepas de HIV (Broliden *et al.*, 1992). La importancia de esta región es apoyada por la habilidad anticuerpos anti ELDKWA de bloquear la transmisión viral in vivo, y ha sido evaluada por inmunización pasiva en macacos. Sin embargo, el epítipo lineal ELDKWA es considerado poco inmunogénico, por lo tanto, es importante notar que en estudios previos de nuestro grupo de trabajo inmunizando vía oral con la proteína Multi-HIV expresada en tabaco, logramos inducir respuestas significativas de anticuerpos hacia dicho epítipo (Rubio-Infante *et al.*, 2015). La secuencia RSVNFTDNAKTII gp120 (aa 277–289) de V2 que ha sido identificada como blanco del anticuerpo b12 que tiene amplia capacidad neutralizante (Geretti *et al.*, 1994). La secuencia STSIRGKV correspondiente a un epítipo de las asas V1/V2 de gp120 (aa 162–169) se incorporó en repeticiones en tándem para incrementar la inmunogenicidad, esta secuencia induce anticuerpos con neutralización potente hacia varios aislados la predicción sugiere que se une HLA-DR de forma promiscua (Gaudebout *et al.*, 1997; Geretti *et al.*, 1994; Warrier *et al.*, 1994).

En el presente estudio se buscó no sólo incrementar el potencial inmunogénico de la construcción Multi-HIV, si no también simplificar el método de producción y entrega de la construcción, ya que los sistemas de expresión previos en *E. coli* y plantas de tabaco han sido poco eficientes en sus niveles de expresión correspondientes, y la vía de inmunización mucosal puede ser optimizada si se cuenta con inmunógenos altamente puros.

La ampliación de los epítipos seleccionados en la construcción hizo de su expresión en sistemas recombinantes un reto, además de que la administración oral de antígenos presenta diversos desafíos, por lo cual en el presente trabajo se buscó incrementar el potencial inmunogénico de la construcción Multi-HIV y simplificar el método de producción y entrega de antígeno. Para este fin, recurrimos al modelo de acarreador de la proteína VP2 del parvovirus humano B19. Se ha reportado que las VLPs de VP2 pueden expresarse en altas concentraciones (hasta 70 mg/L cultivo de proteína solubilizada) en un sistema de expresión en *E. coli*, la cual es purificada bajo condiciones desnaturizantes mediante un tag de afinidad polyH (HHHHHH) y posteriormente es dializada contra PBS para remover el agente desnaturizante, lo cual provoca el ensamblaje espontáneo de

las proteínas en cápsides funcionales, las cuales poseen una alta estabilidad bajo diversas condiciones de temperatura (hasta 80° C) y pH, además de ser capaces de encapsular DNA y proteínas pequeñas en su núcleo (Sandra Paola Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2015; Sandra P. Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012). También se ha probado como modelo de acarreador expresando epítomos unidos a asas de superficie, o al extremo N-terminal de la proteína de tal forma que al ensamblarse estos queden expuestos en la cara exterior de las VLPs. Éstas, al ser caracterizadas, resultaron ser más estables que sus contrapartes compuestas únicamente de VP2 nativa (mayor resistencia a la agregación y temperatura). Al ser usados como antígenos, las cápsides de VP2 nativa son capaces de inducir respuestas humorales y celulares específicas, sin embargo, el diseño quimérico implementado no generó respuestas significativas hacia la región insertada (2 epítomos del virus sincitial respiratorio), lo cual podría ser atribuido a una selección pobre de epítomos inmunogénicos o el propio esquema de inmunización (del Carmen Morán-García *et al.*, 2016; Santillán-Uribe *et al.*, 2015).

En el presente proyecto se diseñaron dos construcciones multiepitópicas basándose en los epítomos de la construcción “Multi-HIV”, y se agregó un nuevo epítomo neutralizante recientemente descrito, el 10E8, cuyo anticuerpo es capaz de neutralizar el 98% de 108 aislados virales distintos, y además carece de autorreactividad (NIAID, 2015), por lo cual resulta atractivo para incluir en el diseño. En el presente estudio se examinó la capacidad de estas quimeras de expresarse en altas concentraciones, la optimización del sistema de purificación, y la caracterización de las cápsides generadas.

Justificación

El uso de antígenos convencionales como vacunas (virus atenuado, subunidades virales, vectores virales replicantes) han sido poco efectivos para generar las respuestas protectoras necesarias contra el HIV-1, por lo cual se proponen las construcciones multiepitópicas acopladas al acarreador VP2 como modelos de antígenos capaces de estimular respuestas humorales y celulares protectoras.

Objetivo

Diseñar, producir y purificar dos construcciones multiepitópicas para HIV-1 basadas en el acarreador B19 VP2, para probarlas como candidatos a vacunas contra el HIV-1.

Objetivos particulares

Optimizar las condiciones de expresión de las proteínas quiméricas.

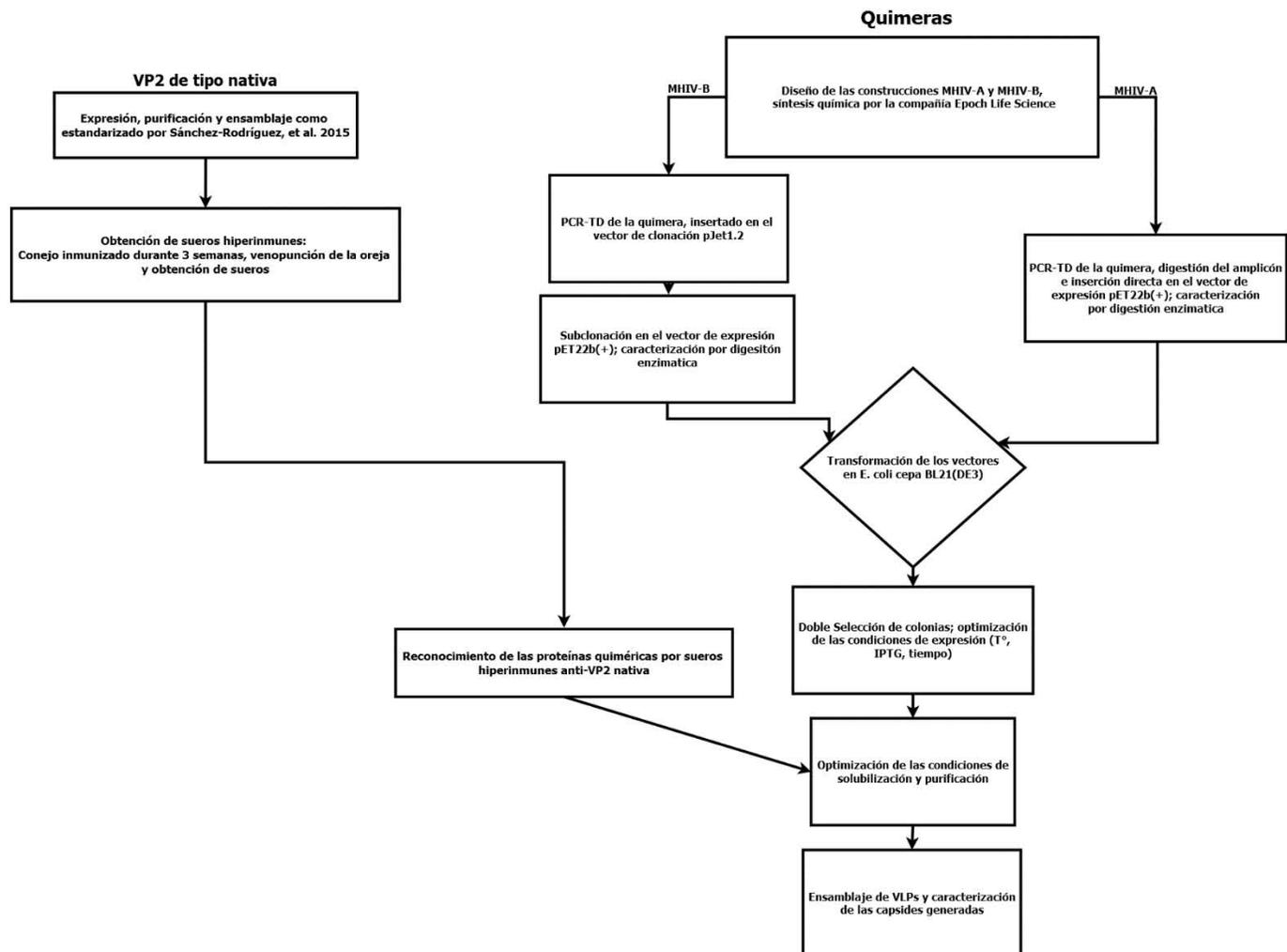
Establecer las condiciones de purificación para cada construcción.

Caracterizar los requerimientos de ensamblaje y las VLPs generadas.

Hipótesis

El diseño de las construcciones multiepitópicas con el acarreador VP2 mejorará su producción de forma recombinante y mantendrá o mejorará su inmunogenicidad.

Estrategia experimental



Metodología

Diseño de las construcciones

Se seleccionaron varios epítomos del HIV para incluir en las proteínas VP2 quiméricas, el criterio de selección se basó en la capacidad de inducir respuestas de anticuerpos neutralizantes, o por ser los sitios de reconocimiento de anticuerpos neutralizantes hacia el HIV, se incluyó también el epítomo C4. En la tabla se describen las características y secuencias de aminoácidos de los epítomos seleccionados.

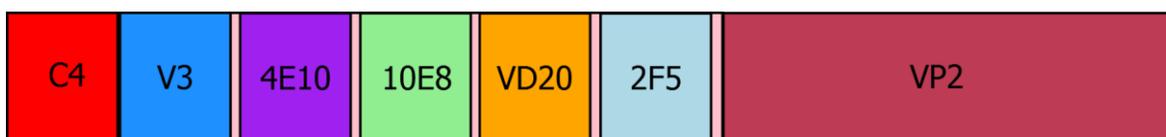
MAb ID	Epítomo	Características	Localización en HXB2
11A8	MWQEVGKAMYAPPIEG	El Ab aislado la neutralización de la cepa viral SF162 (difícil de neutralizar), producción del mAb 11A8	gp160 (426–441) gp120(426-441)
T1	KQIINMWQEVGKAMYA C4 – T helper	Estimula células Th, CTL, B. Genera una respuesta protectora contra reto con SIV en modelos de chimpancé por CTLs.	gp160 (421–436) gp120(421-436)
CBV3	RPNNNTRKSIHIGPGRAFYTE V3 B/CTL epitope	Secuencia consenso del asa V3, el Ab demuestra neutralización de 31 de cepas virales, limitado al subtipo B.	gp160 (297–321) gp120(297-321)
VD20	GIKQLQARVLAVERY	Epítomo de Th. Se predice promiscuidad de HLA para los alelos DR/DQ	gp160 (572–586) gp41(61-75)
2F5	ELDKWA	Suscita una respuesta IgA específica. Reporta alta inmunogenicidad usada como vacuna epitópica.	gp160 (662–667) gp41(151-156)
4E10	NWFDITNWLWKKKK	Induce respuesta de los bnAbs 4E10, 2F5, Z13, IgG1b12.	
C108G	STSIRGKV	Induce C108G, el anticuerpo anti-V2 más potente. Neutraliza las cepas BaL y HXB2	gp160 (162–169) gp120(162-169)

E5	RSVNFTDNAKTII	Reconocido por el bnAb b12.	gp160 (273 -285)
10E8	NWFDISNWLWYIK	Asociado al MAb 10E8, es capaz de neutralizar el 98% de 108 cepas de HIV-1. Ab sin autoreactividad.	gp160 (671–683) gp41(160-172) DNA (8235..8273)

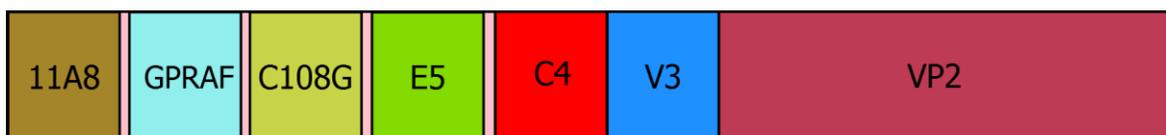
Tabla 1.- Epítomos seleccionados para las construcciones quiméricas MHIV-A y MHIV-B, denotando las características y localización genómica de cada uno.

Debido a las restricciones en número de aminoácidos que se pueden insertar en el extremo N-terminal de la VP2, se diseñaron dos construcciones quiméricas denominadas “MHIV-A” y “MHIV-B”. Los epítomos correspondientes a la región C4V3 (T1-CBV3) se incluyeron en ambas construcciones (debido a la capacidad de esta región de conservar su antigenicidad e inmunogenicidad al ser expresada de forma multiepitópica), en una en el extremo N terminal de la quimera, mientras que en la segunda se encuentra adyacente a la proteína VP2; el resto de los epítomos se dividieron en dos de forma que una construcción agrupa los epítomos de la respuesta humoral y la segunda los epítomos de bnAbs, y se unieron por linkers flexibles ricos en glicina.

El orden de los epítomos en las quimeras MHIV-A y MHIV-B se indica en la figura



Quimera “MHIV-A”



Quimera “MHIV-B”

Ambas construcciones fueron sintetizadas químicamente por la compañía Epoch LifeScience y enviadas dentro del vector de clonación pBlueScript II+ (pBSK), flanqueado por los sitios de restricción XbaI y XhoI, sin embargo, este no es un vector apropiado para la expresión de alto nivel de proteínas recombinantes, por lo que se procedió a subclonar los fragmentos de las quimeras MHIV-A-VP2 y MHIV-B-VP2 en el vector de expresión pET22b+.

Amplificación de las quimeras MHIV-VP2

Para amplificar las construcciones se usó la polimerasa de alta fidelidad Pfu, la cual posee actividad de corrección de errores por lo que posee una tasa de error más baja y además genera amplicones con extremos romos (que permiten dirigirlos al vector de clonación). Para la construcción MHIV-A-VP2 se usaron los primers Forward: GGAGATATACATATGGGCTGGTAAACAGATC y Reverse: CGCAAGCTTGAATTCAGTATTAGTGGTGATGGTGGTGATG, mientras que para la construcción MHIV-B-VP2 se usaron los primers Forward: GGAGATATACATATGTGGCAAGAAGTTGGCA y Reverse: CGCAAGCTTGAATTCAGTATTAGTGGTGATGGTGGTGATG. Ambos pares de primers poseen una

$T_m \approx 60^\circ \text{C}$, pero se optó por emplear la metodología de PCR-Touchdown (PCR-TD) para remover las bandas inespecíficas generadas durante la amplificación normal. Este consiste en usar un gradiente de temperatura para generar amplicones con mayor afinidad. Los primeros 15 ciclos de la PCR-TD comienzan a 61°C con una reducción de 0.2°C cada ciclo, y los 12 ciclos remanentes se realizan a 55°C , de esta forma asegurando una alta especificidad y tasa de amplificación.

Clonación de la quimera MHIV-B en el vector de expresión pET22b+

A partir del inserto amplificado de la construcción MHIV-B-VP2 se utilizó el kit de clonación CloneJet, el cual consiste en el vector linealizado pJET 1.2 con extremos romos a ambos lados del sitio múltiple de clonación. Este paso se llevó a cabo para complementar los sitios de restricción que flanqueaban la construcción “MHIV-B” y poder dirigirla al vector pET22b+. La introducción del inserto se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Brevemente, para la ligación se usaron 50 ng ($1 \mu\text{L}$) del vector pJET1.2/blunt, $1 \mu\text{L}$ de PCR (aproximadamente 500 ng de inserto) y $1 \mu\text{L}$ de ligasa T4 (5U), incubados durante una hora a 22°C y el producto de la ligación usado para transformar bacterias *E. coli* genotipo químicamente competentes, generando la construcción CloneJet-MHIV-B. La comprobación de la identidad de la clonación fue efectuada mediante cortes las enzimas de restricción incorporadas al inserto.

La subsecuente clonación de la quimera en el vector de expresión pET22b+ se llevó a cabo a partir del vector CloneJet-MHIV-B. La quimera y el vector de expresión fueron cortados con las enzimas de restricción NdeI y EcoRI (los cortes se realizaron de manera simultánea con 1 U ($0.25 \mu\text{L}$) de cada enzima en 4x Buffer Tango de Thermo Fisher Scientific, el cual posibilita la doble restricción de DNA sin pérdida de actividad) durante 2 horas a 37°C e inactivadas a 65°C durante 20 minutos, corridas en un gel de 1% agarosa, la banda correspondiente al peso cortada y recuperada mediante el kit GeneJet Gel Purification de Thermo Fisher (que permite extraer DNA embebido en agarosa). Para la clonación se usaron 100 ng de vector cortado, y una proporción 1 a 3 de inserto (121 ng); se usaron 5U ($1 \mu\text{L}$) de ligasa T4 y se incubó la reacción durante 18 h a 22°C . El total del volumen de la ligación se usó para transformar *E. coli* genotipo DH5 α químicamente competentes.

Clonación de la quimera MHIV-A en el vector de expresión pET22b+

Para la subclonación de la quimera MHIV-A se cortaron 500 ng del amplicón MHIV-A y vector pET22b+ con las enzimas NdeI y EcoRI, usando 1U ($0.25 \mu\text{L}$) de cada una e incubando durante 2 h a 37°C e inactivadas a 65°C por 20 minutos. Los fragmentos cortados fueron corridos en un gel de agarosa 1% y purificados con el kit GeneJet Gel Purification. Para la clonación se emplearon 20 ng del vector pET22b+ y una proporción 1:3 del vector a inserto (148 ng), incubados a 22°C durante 18 h con 5U ($1 \mu\text{L}$) de ligasa T4. El total del volumen de la ligación fue usado para transformar *E. coli* DH5 α .

Generación de bacterias competentes

Se generaron bacterias *E. coli* competentes de las cepas de clonación DH5 α y la cepa de expresión BL21(DE3). Un cultivo de 200mL de cada cepa es crecido en medio LB durante 90 min a 37°C en una

incubadora orbital a 220 rpm, las bacterias empastilladas a 4,500 rpm por 15 min en una centrífuga Zetich, el sedimento lavado con cloruro de magnesio 0.1M (MgCl₂) una vez y una vez con cloruro de calcio 0.1M (CaCl₂). Tras los lavados, las bacterias son incubadas en hielo durante una hora, centrifugadas y resuspendidas en 2 mL de CaCl₂ 0.1 M fresco, alicuotadas en volúmenes de 50 µL y congeladas a -70° C inmediatamente.

Separación de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE)

La electroforesis hace uso de una matriz de poliacrilamida para separar mezclas complejas de proteínas, las cuales migran en respuesta a un campo eléctrico a través de los poros de la matriz, separándose por tamaño. El dodecilsulfato sódico (SDS) es usado para generar condiciones desnaturizantes para las proteínas, que tienden a auto-ensamblarse y agregarse en reguladores libres de agentes desnaturizantes. La preparación de los geles al 10% se llevó a cabo según (Gallagher, 2008).

Western blot: reconocimiento de proteínas por anticuerpos

La metodología de western blot consiste en la transferencia de proteínas separadas por SDS-PAGE a una matriz de nitrocelulosa, en donde la mezcla es puesta a interactuar con anticuerpos específicos para detectar la presencia de las proteínas de interés. Según el método de (Ni *et al.*, 2008), las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, bloqueadas con leche durante 1 h e incubadas con el anticuerpo primario (suero de conejos inmunizados con VLPs de VP2 nativa) durante 16 h. Como anticuerpo secundario se usó el IRDye 680 anti-conejo de la compañía Li-Cor, incubado durante una hora en dilución 1: 10,000. Para revelar la membrana se usó el equipo de escaneo infrarrojo Odyssey CLx Imaging system.

Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* y doble selección de colonias

Una vez confirmadas las construcciones en el vector de expresión, estas fueron transformadas en *E. coli* con genotipo BL21(DE3) el cual contiene una copia del gen para la polimerasa T7, compatible con el promotor T7 presente en el vector pET22b+. El método de doble selección de colonias se realizó como descrito por (Sivashanmugam *et al.*, 2009). Brevemente, se seleccionaron 5 colonias transformantes con la proteína de interés y se inocularon en 2 mL de medio Luria-Broth (LB) con 100 µg/µL de Ampicilina, incubadas hasta O.D. 0.4 e inducidas con 0.2 mM IPTG. Los resultados de la expresión confirmados por SDS-PAGE y la colonia con el mayor nivel de expresión de la proteína de interés era sembrada y el procedimiento repetido por segunda ocasión, lo cual permitió una expresión consistente y de alto nivel para todas las proteínas. Para escalar el cultivo a 1 L, se prepara un preinoculo en 5 mL de medio LB adicionado con 100 µg/µL de Amp de cada una de las construcciones y son incubados por una noche a 37° C en una incubadora de agitación orbital a 180 rpm. El preinoculo es adicionado al matraz con 1L de medio de cultivo (también con Amp 100µg/µL) en una dilución 1:1000 e incubado a 37° C por aproximadamente 4 h o hasta alcanzar una densidad óptica (O.D.) de 0.6-0.8 leído a 580-600nm, lo cual corresponde a la mitad de la fase exponencial de

crecimiento de las bacterias y el momento en el que se agrega el Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en una concentración de 0.3 mM. Habiendo agregado el agente inductor el cultivo se incuba por 24 h a 30° C (esto con el propósito de aumentar la solubilidad de las proteínas recombinantes).

Purificación de cuerpos de inclusión de la proteína B19 VP2 WT

El cultivo celular fue cosechado por centrifugación a 10,000 rpm por 20 min. El sedimento resultante es resuspendido en 15mL de buffer de lisis (50mM NaH₂PO₄, 0.3M Urea, pH 6.3) colocado en baño de hielo y sometido a sonicación durante 30 min en pulsos de 5 s. El lisado es centrifugado a 8,000 rpm por 20 min y los cuerpos de inclusión localizados en el sedimento son lavados una vez con buffer de lisis, tres veces con buffer de lavado (50mM NaH₂PO₄, 0.3M NaCl, 3M Urea, 2% Tritón X-100) y una vez con buffer de lavado adicionado con 2mM Ditiotreitól (DTT) para remover proteínas solubles y contaminantes de membrana.

Finalmente, los cuerpos de inclusión son solubilizados en buffer de lavado adicionado con 2mM DTT y 6M GuHCl durante 72 h en una incubadora orbital a 37° C a 180 rpm y la porción insoluble removida por centrifugación a 10,000 rpm por 30 min (Sandra P. Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012).

Purificación de cuerpos de inclusión de las proteínas quiméricas MHIV-A y MHIV-B

Para las construcciones quiméricas el cultivo es cosechado por centrifugación a 10,000 rpm por 20 min. El sedimento resultante es resuspendido en 10-15 mL de regulador de lisis, colocado en baño de hielo y sometido a sonicación durante 15 minutos en pulsos de 5 segundos. El lisado es centrifugado a 8,000 rpm por 20 min y los cuerpos de inclusión localizados en el sedimento son lavados tres veces con buffer de lisis adicionado con 2% Tritón X-100 para remover la membrana celular y la pastilla con los cuerpos de inclusión solubilizados en buffer de lisis adicionado con 6 M GuHCl durante 24 h y la porción insoluble removida por centrifugación a 10,000 rpm por 30 min.

Purificación de la proteína VP2 WT

Para la purificación de la VP2 nativa por cromatografía de afinidad se usaron 5 mL de resina empaquetada de cobalto HisPur de Thermo Fisher Scientific, la cual tiene una capacidad de unión >10 mg/mL. La columna es equilibrada con 2 volúmenes de columna de Buffer A (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 3 M GuHCl, pH 7.5), las proteínas solubilizadas son agregadas a la columna y se colecta el volumen muerto (proteínas no unidas) para posterior análisis. Se pasan \approx 7 volúmenes de buffer de lavado B (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 3 M GuHCl, Imidazol 10 mM, pH 7.5) o hasta alcanzar una O.D. cercana a 0 (leído a 280 nm), indicando la remoción de las proteínas no específicas (sin tag polyH). Finalmente, la proteína VP2 nativa es eluida de la columna usando buffer de elución (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 3 M GuHCl, Imidazol 150 mM, pH 7.5) y monitoreando la presencia de la fracción de interés por SDS-PAGE y cuantificación por reactivo de Bradford.

Inmunización de conejo y obtención de sueros hiperinmunes anti-VP2 de tipo nativa

Para la obtención de sueros se inmunizó a un conejo una vez por semana durante tres semanas con 100 – 300 µg de VLPs de VP2 tipo nativa ensambladas. En la primera inmunización se hizo uso de adyuvante completo de Freund (volumen 1:1 con la muestra) y en las dos inmunizaciones posteriores se usó adyuvante incompleto de Freund. La obtención de suero se realizó mediante venopunción de la oreja y centrifugación de las muestras para sedimentar eritrocitos.

Purificación de las quimeras MHIV-A y MHIV-B

Alternativamente para la purificación de las quimeras se usaron 5 mL de resina empaquetada de níquel NiNTA de Thermo Fisher Scientific, con una capacidad de unión de 5-10 mg/mL. La columna se equilibra con 2 volúmenes de buffer de equilibrio/lavado (50mM NaH₂PO₄, 0.3M NaCl, 4M Urea, Imidazol 10 mM, pH 7.4), las quimeras solubilizadas se pasan por la columna a una tasa de flujo de 0.5 mL/min y las proteínas no unidas almacenadas para analizarlas por SDS-PAGE. Las proteínas no específicas son removidas con ≈14 volúmenes de buffer de lavado hasta alcanzar una O.D. a 280 nm cercana a 0. Las quimeras son eluidas de la columna con buffer de elución (50 mM NaH₂PO₄, 0.3M NaCl, 3 M GuHCl, 150 mM Imidazol, pH 7.5) y los frentes de elución analizados por SDS-PAGE y cuantificados por reactivo de Bradford.

Ensamblaje de las VLPs de VP2 WT y quimeras MHIV-A y MHIV-B

Para el ensamblaje de las VLPs de VP2 tipo nativa se colocaron las proteínas purificadas en bolsas de diálisis a una concentración de 0.5 µg/µL en un volumen de 1.2 mL. Para las construcciones quiméricas se probaron distintas aproximaciones de ensamblaje: 100% quimera, proporciones 1:1 quimera: VP2 WT, 1:3 quimera : VP2 WT y 1:1 quimera MHIV-A : MHIV-B. La concentración de ensamblaje de las proteínas quiméricas fue estandarizada a 0.1-0.2 µg/µL en un volumen de 500-700 µL debido a problemas de agregamiento a mayores concentraciones. Las bolsas con las construcciones se dializan contra 50 mL de PBS pH 7.4 filtrado por 0.22 µm previamente, durante 24 h totales con cambios cada 8 h. Para la caracterización de las VLPs se utilizó el equipo Zetasizer de Malvern Instruments. Las VLPs ensambladas son filtradas por 0.22 µm antes de la lectura y el volumen ajustado con PBS pH 7.4 filtrado previamente.

Resultados

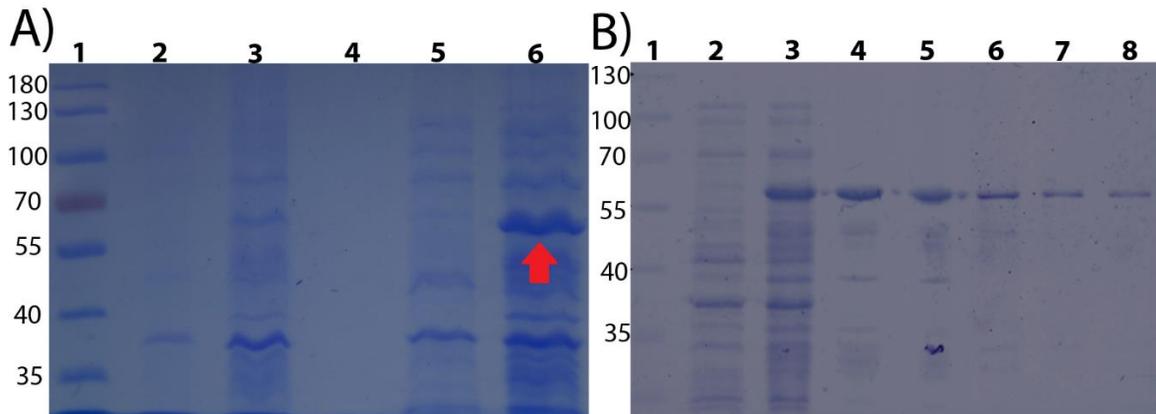


Fig. 2.- Expresión y purificación de la proteína VP2 de tipo nativa. A) SDS-PAGE de la doble selección de colonias de la B19 VP2 tipo nativa, antes de la inducción (carriles 2 y 5) y después de la inducción (carriles 3 y 6). Señalado en rojo la banda correspondiente a la VP2 (60 kDa). B) Pasos sucesivos de purificación de la proteína VP2. Carril 1: MWM, carril 2: lisado pre-inducción, carril 3: lisado post-inducción, carril 4: VP2 solubilizado, carril 5 y 6: primer y último lavado, carril 7 y 8: eluciones.

La proteína B19 VP2 WT es expresada en altas concentraciones y purificada vía cuerpos de inclusión.

La proteína VP2 WT se expresó en altas concentraciones mediante el método de doble selección de colonias, como señala la flecha roja en la figura 1A. Los cuerpos de inclusión fueron purificados del lisado celular, solubilizados y purificados mediante cromatografía de afinidad por columna de cobalto según el método estandarizado por Sánchez Rodríguez et al. (2012). Brevemente, los cuerpos de inclusión fueron aislados del paquete celular mediante lavados con buffer fosfatos y buffer adicionado con urea, tritón y DTT para remover proteínas contaminantes y remanentes de membrana celular. La baja solubilidad de las proteínas VP2 WT permite obtener cuerpos de inclusión altamente puros, que posteriormente son solubilizados en un buffer con clorhidrato de guanidina (GuHCl) con un rendimiento promedio de 63 mg de proteína recombinante por litro de cultivo, cuantificado mediante reactivo de Bradford.

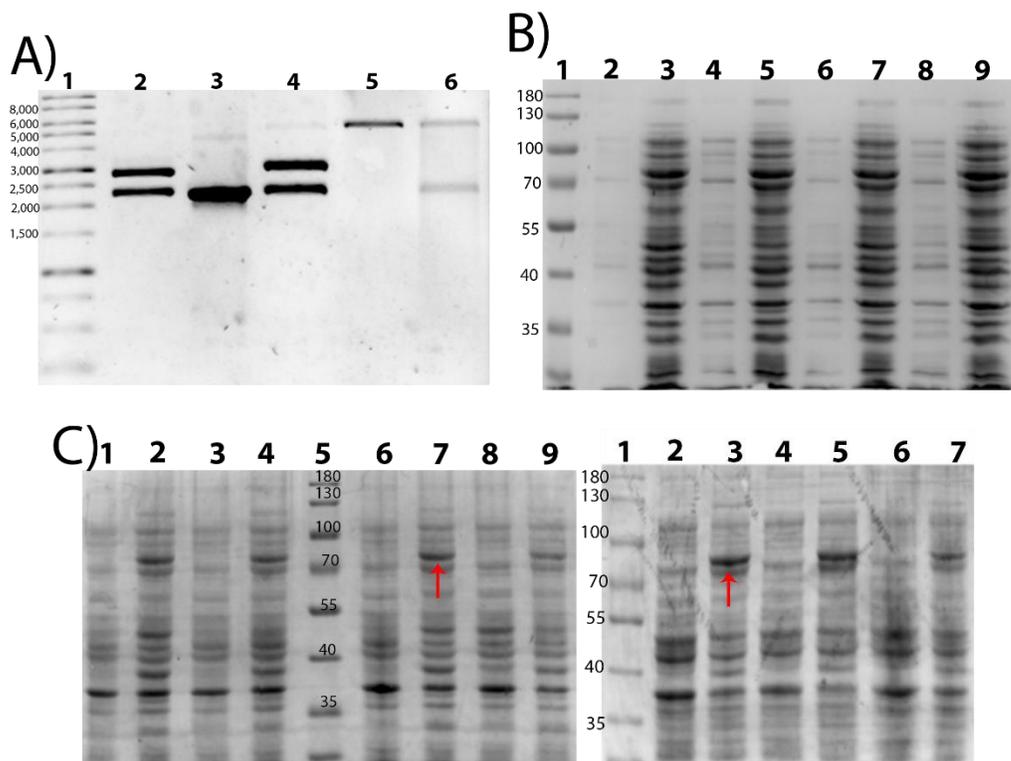


Fig. 3.- Clonación y doble selección de colonias de la quimera MHIV-B. A) Perfil de restricción de los pasos de clonación de la quimera; carril 1: MWM, carril 2: vector pBSK cortado con las enzimas NdeI-EcoRI, carril 3: PCR del gen MHIV-B, generado con la polimerasa Pfu, carril 4: vector de clonación CloneJet-B cortado con las enzimas NdeI-EcoRI, carriles 5 y 6: vector de expresión y construcción quimerica pET22b-MHIV-B, ambos cortados con las enzimas NdeI-EcoRI. B) Selección de transformantes positivos para la construcción MHIV-B C) Doble selección de colonias de dos experimentos de transformación independientes (panel izq. y der., respectivamente).

Para la clonación de la quimera MHIV-B se amplificó el inserto con la polimerasa de alta fidelidad Pfu, que genera extremos romos compatibles con el vector de clonación CloneJet (kit de vector linealizado con extremos romos en el MCS) además de agregar los sitios de restricción NdeI y EcoRI para dirigir la subclonación al vector de expresión pET22b+. La construcción pET22b+ - MHIV-B fue cortada con las mismas enzimas de restricción generando dos bandas del peso esperado correspondientes al vector pET22b+ (≈ 5500 pb) e inserto (≈ 2200 pb). Las bacterias transformantes fueron analizadas por inducción de IPTG y SDS-PAGE (Fig. B) mostrando una banda en el peso esperado (81 kDa) en los carriles de lisado post-inducción (3, 5, 7, 9). La cepa de expresión de *E. coli* BL21(DE3) químicamente competente generada en el laboratorio resultó en una eficiencia de transformación baja, por lo cual la doble selección de colonias se llevó a cabo a partir de dos ensayos de transformación separados para asegurar una expresión de alto nivel consistente (Fig. C, señalado en flechas rojas paneles izq. y der.). Los cursos de inducción se realizaron con una concentración de 0.3mM de IPTG a 30°C durante 24 h.

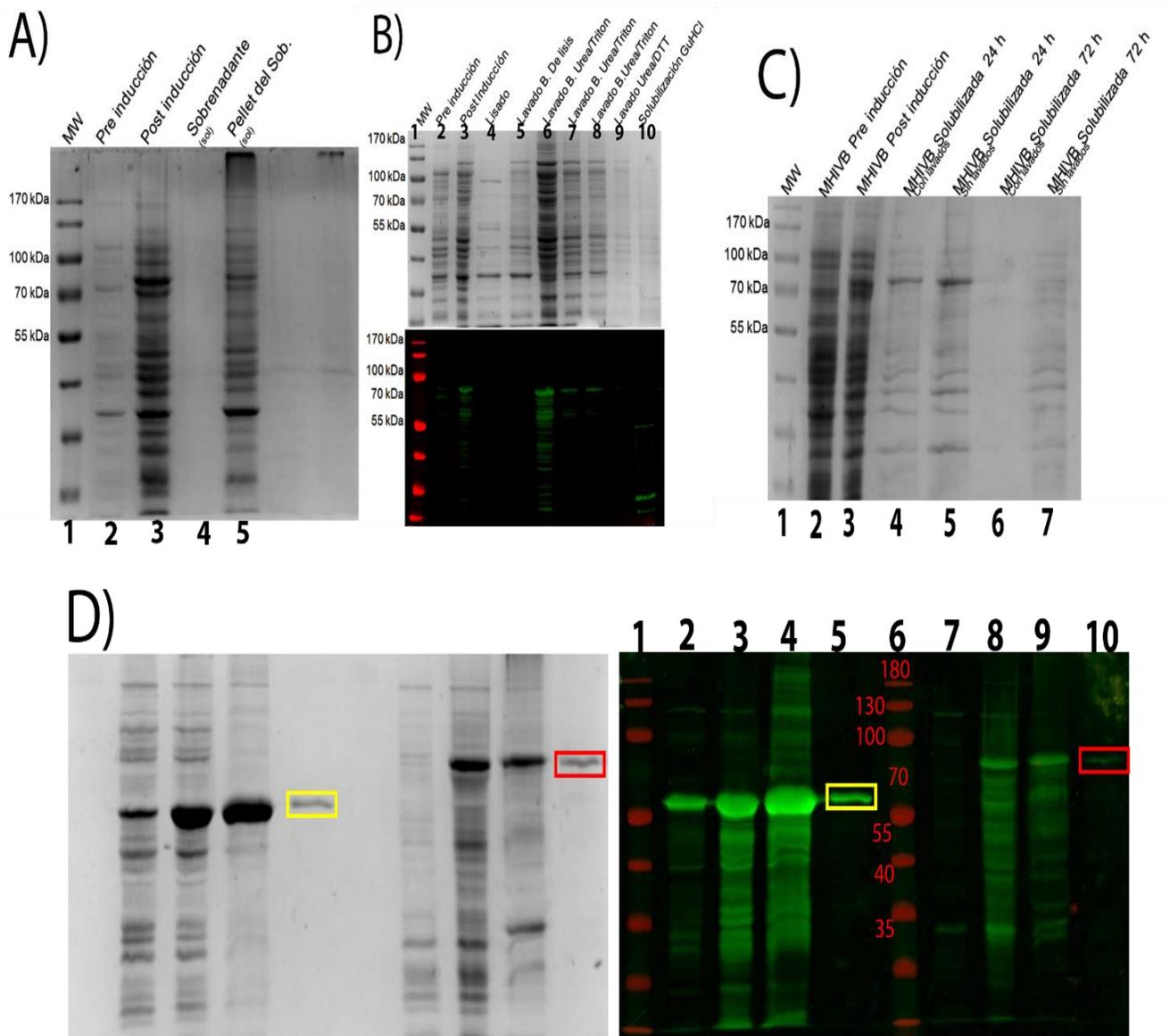


Fig. 4.- Estandarización de las condiciones de purificación de la construcción quimérica MHIV-B. A) SDS – PAGE del sobrenadante (carril 4) y sedimento (carril 5) solubilizados después de la lisis. B) SDS-PAGE y Western blot de la purificación de la quimera usando el protocolo estandarizado para la VP2 WT. C) Condiciones de solubilización de los cuerpos de inclusión aislados. D) Western blot de las proteínas VP2 WT (carriles izquierdos) y la quimera MHIV-B (carriles derechos).

La proteína quimérica MHIV-B es procesada en cuerpos de inclusión con una solubilidad incrementada, y es reconocida por los anticuerpos policlonales anti-VP2 generados en conejo

La solubilidad de la quimera MHIV-B fue determinada mediante la solubilización del sobrenadante y sedimento celular después de la lisis, mostrando así que la proteína es procesada a cuerpos de inclusión (Fig. A, carril 5). Al efectuar el protocolo de purificación estandarizado para la proteína VP2 WT se observó que los cuerpos de inclusión formados por la quimera, tenían una solubilidad elevada en comparación al control WT ya que se solubilizaron al lavarse con buffer adicionado con urea (Fig. B panel superior, carriles 6, 7 y 8). Así mismo, en el Western blot se puede observar el reconocimiento de los anticuerpos a las bandas enriquecidas en los mismos carriles (Fig. B panel inferior).

A partir de esto, se optó por lavar los cuerpos de inclusión con buffer de lisis sin agentes desnaturalizantes y se realizó un curso de solubilización a 24 y 72 h. según el protocolo estandarizado de la VP2 WT, brevemente: los cuerpos de inclusión son obtenidos mediante la lisis de las bacterias por sonicación, y los remanentes celulares removidos por centrifugación y extensivos lavados con buffer de lisis (50 mM Na₂HPO₄, 0.3 M NaCl pH 7.4). Posteriormente, la pastilla que contiene los cuerpos de inclusión son solubilizados en buffer (50 mM Na₂HPO₄, 0.3 M NaCl 6 M GuHCl pH 7.4) durante un periodo de 24 o 72 h. El SDS-PAGE muestra que el tiempo óptimo de solubilización es a las 24h. (Fig. C, carriles 4 y 5) sin lavados; sin embargo, esta aproximación genera cuerpos de inclusión solubilizados que contienen una alta proporción de contaminantes de membrana, lo cual dificulta su purificación por cromatografía IMAC, por lo cual para la purificación se emplearon cuerpos de inclusión lavados con buffer de lisis. A pesar de una pérdida notoria de la proteína de interés, el rendimiento de expresión de las proteínas quiméricas una vez purificadas es comparable con la VP2 WT (alrededor de 60 mg de proteína recombinante por litro de cultivo). Finalmente, se probó el reconocimiento de la quimera MHIV-B por los anticuerpos policlonales anti-VP2 generados en conejo por western blot (Fig D., panel derecho) y la señal detectada por la quimera MHIV-B (carriles derechos, recuadro rojo superior) indica que la integridad estructural de la proteína se mantuvo durante la inducción y purificación.

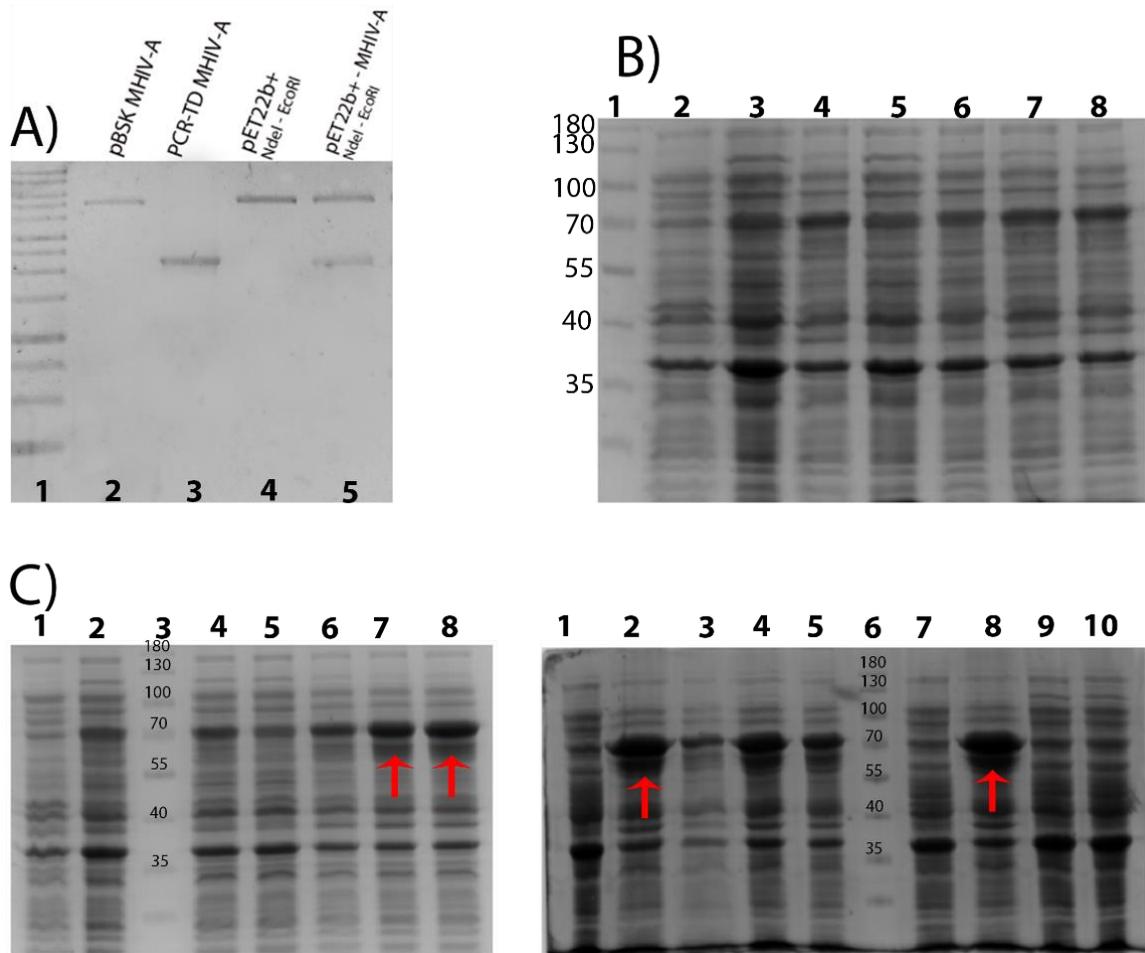


Fig. 5.- La quimera MHIV-A es expresada en altos niveles después de la doble selección de colonias. A) Subclonación del gen MHIV-A. Carril 1: MWM, carril 2: pBSK linearizado por la enzima EcoRI, carril 3: PCR-TD del gen MHIV-A, carril 4: vector de expresión pET22b+ cortado a ambos lados del MCS por las enzimas EcoRI y NdeI, carril 5.- construcción quimérica pET22b – MHIV-A ligados por los extremos cohesivos NdeI – EcoRI. B) Selección positiva de colonias que expresan la construcción pET22b-MHIV-A; se muestra la pre-inducción (carril 2) y post-inducción (carriles 3-8). C) Doble selección de colonias; se muestran geles de la primera ronda (panel izquierdo) y la segunda ronda (panel derecho).

La quimera MHIV-A fue subclonada al vector de expresión pET22b+, y las colonias transformadas seleccionadas para un alto nivel de expresión.

La construcción MHIV-A fue amplificada mediante PCR-TD a partir del vector pBSK MHIV-A, y posteriormente ligado mediante extremos cohesivos (EcoRI - NdeI) al vector de expresión pET22b+. El producto de la clonación fue confirmado por corte con enzimas de restricción (EcoRI – NdeI) produciendo dos bandas de los pesos esperados (vector pET22b+ ≈5400 pb, e inserto ≈2200 pb). Los cursos de inducción se realizaron con una concentración de 0.3 mM de IPTG durante 24 h. El análisis por SDS-PAGE mostró una alta eficiencia de transformación en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) (fig B), mientras que el protocolo de doble selección de colonias obtuvo como resultado dos clones con alta expresión de la proteína quimérica MHIV-A (Fig. C, panel derecho).

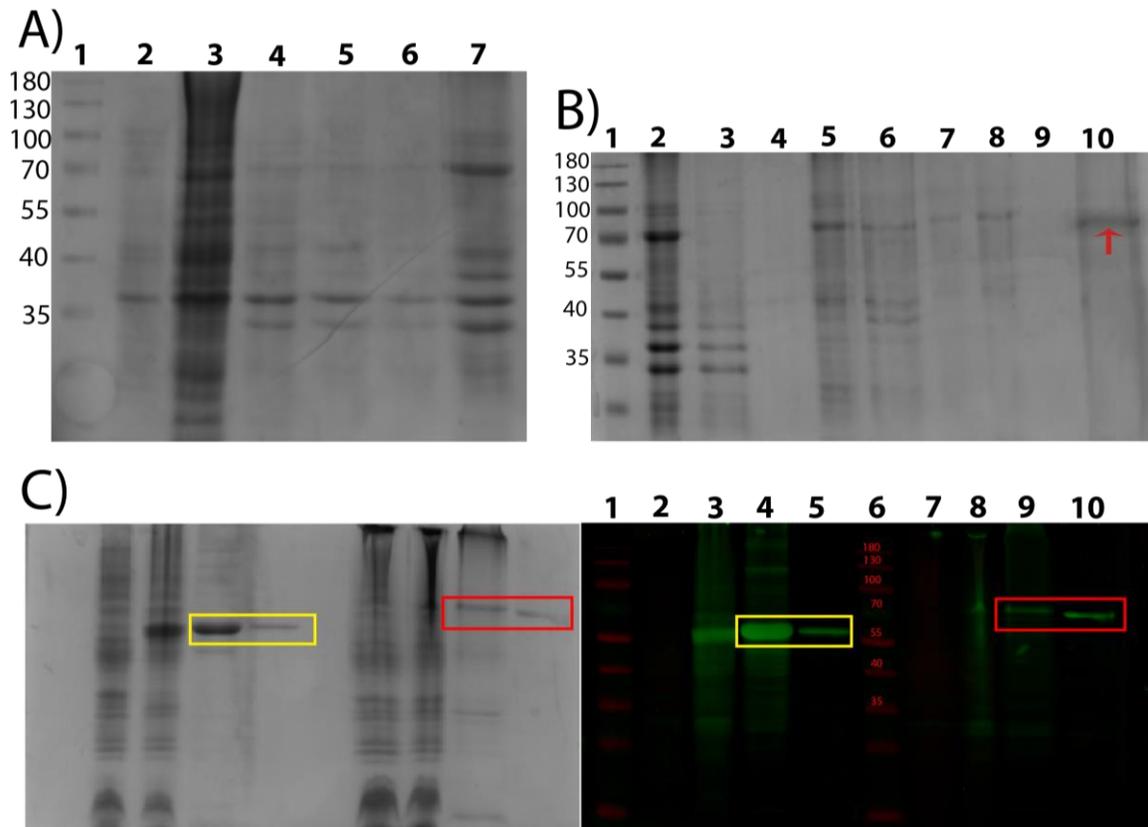


Fig. 6.- A) Sobre-expresión y solubilización de la proteína MHIV-A; carril 1: MWM, carril 2: pre-inducción, carril 3: lisado post-inducción, carriles 4-6: lavados de los cuerpos de inclusión con buffer de lisis, carril 7: cuerpos de inclusión solubilizados. B) Purificación por columna de afinidad de la proteína solubilizada; carril 1: MWM, carril 2: cuerpos de inclusión solubilizados, carril 3: proteína no unida a la columna, carril 4: último lavado, carril 5-9: elución de la proteína de interés. C) Western blot de las proteínas B19 VP2 WT (carriles izquierdos) y la quimera MHIV-A (carriles derechos), señalado en el recuadro rojo los cuerpos de inclusión solubilizados

(izq.) y la proteína purificada (der.).

La proteína quimérica MHIV-A es expresada en altas concentraciones, procesada en cuerpos de inclusión y reconocida por el suero de conejos inmunizados con B19 VP2 WT

Tras la inducción de las bacterias estas son lisadas por medio de sonicación, el paquete celular que contiene los cuerpos de inclusión fue lavado con regulador de lisis adicionado con tritón para remover remanentes de la membrana celular, y los cuerpos de inclusión solubilizados en buffer con GuHCl por 24 h. (panel A). La purificación se realizó por IMAC con la resina NiNTA (Niquel). Se puede notar la desaparición de nuestra banda de interés en las proteínas no unidas a la columna y lavados siguientes (carriles 3-5). Las eluciones (carriles 6-9) muestran una banda consistente con el peso teórico de la construcción MHIV-A (79 kDa) (panel B, flecha roja). Se realizó un western blot comparando el reconocimiento de las proteínas VP2 de tipo nativo (carriles 2-5) y la quimera MHIV-A (carriles 7-10). Como se observa en el recuadro rojo (izq: cuerpos de inclusión solubilizados, der: proteína purificada) la quimera es reconocida por los anticuerpos policlonales generados en conejo (esimulados con VP2 pura) de forma específica, lo cual sugiere que las quimeras conservaron su integridad estructural durante la expresión y purificación:

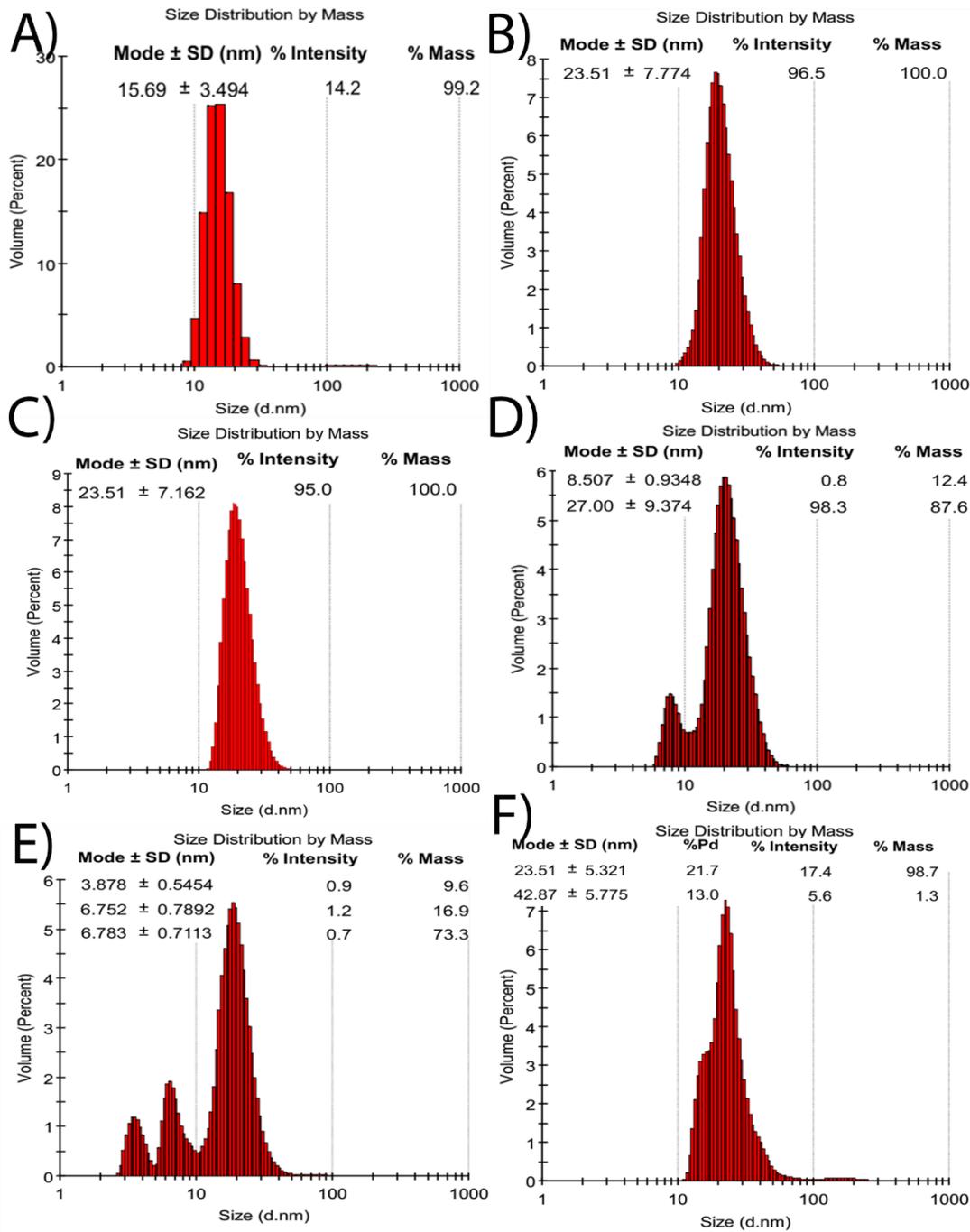


Fig. 7.- Las proteínas quiméricas MHIV-A y MHIV-B se ensamblan en cápsides completas a distintas proporciones. Análisis por DLS de las cápsides ensambladas en distintos radios. A) cápsides de VP2 WT; B) cápsides de la quimera MHIV-A en proporción 1:3 WT; C) cápsides de la quimera MHIV-B 1:3 WT; D) cápsides en proporción 15:15:70 MHIV-A : MHIV-B : VP2 WT; E) cápsides 100% MHIV-A. F) cápsides 100% MHIV-B.

Las VLPs quiméricas se ensamblan en cápsides funcionales en distintas proporciones

Las VLPs fueron mezcladas en distintas proporciones molares y ensambladas mediante diálisis contra PBS pH 7.4 adicionado con 0.2 M L-Arginina, a excepción de las VLPs de VP2 WT, las cuales se ensamblaron contra PBS sólo, ya que la diálisis con buffer de arginina generó el ensamblaje de oligocapsómeros únicamente (6-9 nm) (no se muestran los datos), mientras que el PBS generó capsómeros con tamaños promedio de 15.69 ± 3.49 nm (Fig. 6 panel A). Las VLPs en proporciones 1:3 y 15:15:70 muestran una distribución similar con cápsides en el rango de los 23 – 35 nm. Las quimeras en proporción 1:3 mostraron picos monodispersos (es decir, sin intermediarios de ensamblaje) (Fig. 6 paneles B y C), mientras que las VLPs en proporción 15:15:70 muestran oligocapsómeros intermediarios con un tamaño promedio de 8.57 nm (Fig. 6 panel D). El ensamblaje de la quimera MHIV-A al 100% sólo genera oligocapsómeros en el rango de los 3 – 6 nm, el pico que se observa en ≈ 20 nm representa el 0% de la masa, mientras que el pico en ≈ 6 nm es monodisperso y representa $>80\%$ del volumen de la muestra, por lo cual se considera que se generaron oligómeros altamente puros. El mismo comportamiento se observó al dializar contra PBS sin arginina (no se muestran los datos), lo cual podría sugerir que la estructura nativa de la región multiepitópica interfiere con el ensamblaje al plegarse hacia el interior de la oquedad de la VP2, impidiendo la correcta interacción entre subunidades y por tanto generando sólo intermediarios de ensamblaje. El caso no fue el mismo para la quimera MHIV-B al 100%, ya que muestra un pico monodisperso con un tamaño promedio de 23.51 ± 5 nm, el cual representa $>98\%$ de la muestra. Tomados en conjunto, estos resultados indican que las construcciones quiméricas MHIV-A y MHIV-B son capaces de formar cápsides de tamaño completo, en proporciones 1:3, 15:15:70 y 100% (sólo la MHIV-B).

Discusión

Los resultados del presente trabajo demostraron que:

(A) las construcciones quiméricas fueron clonadas exitosamente en el vector de expresión, y su integridad demostrada por PCR y restricción enzimática.

(B) La doble selección de colonias es un paso crucial en la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, ya que permite la expresión de alto nivel de la proteína recombinante en cuerpos de inclusión, lo cual facilita el proceso de ensamblaje y abarata los costos, en comparación con modelos de expresión en células eucariontes.

(C) Las construcciones quiméricas MHIV-A y MHIV-B poseen una mayor sensibilidad a la solubilización en comparación con la VP2 Wild type, como se demostró por SDS-PAGE y Western Blot. Los cuerpos de inclusión quiméricos comienzan a ser solubilizados por agentes desnaturizantes suaves como SDS y urea, y son completamente solubilizados en buffer 6M GuHCl, por lo cual el lisado celular de las quimeras sólo se lava con buffer de fosfatos adicionado con tritón para remover los remanentes de la membrana plasmática.

(D) Las quimeras son reconocidas por el suero hiperinmune anti-VP2 producido en conejos, como se observó por Western Blot. El reconocimiento implica que las construcciones conservaron su antigenicidad y por tanto su estructura en la región de VP2.

(E) Las quimeras pudieron ser ensambladas exitosamente en cápsides con tamaños promedio concordantes con lo previamente reportado para estas partículas como acarreadoras.

El objetivo principal del estudio consistió en expresar construcciones quiméricas con múltiples epítomos de anticuerpos neutralizantes y CTL contra HIV-1 en un modelo de acarreador con la proteína VP2, y caracterizar las partículas tipo virus generadas, de las cuales pudimos observar cápsides correctamente ensambladas y que mantuvieron su antigenicidad ante suero de conejos inmunizados con VP2 WT.

La historia natural de la infección por HIV-1 y las características innatas del virus para evadir las respuestas inmunes del huésped han hecho el diseño de inmunógenos apropiados un reto. El descubrimiento de anticuerpos en pacientes no-progresores capaces de neutralizar múltiples aislados virales dieron lugar al desarrollo de estrategias para guiar el desarrollo de inmunógenos capaces de inducir respuestas similares basados en los epítomos reconocidos por estos anticuerpos. Esta aproximación se conoce como “diseño de vacunas guiado por anticuerpos o basado en la estructura” (antibody-guided / structure-based vaccinology). Una aproximación general para guiar las respuestas inmunes hacia epítomos protectores implica generar dominios estables de proteína que contengan los epítomos de interés y, al mismo tiempo, carezcan de epítomos no protectores o indeseados (Kulp & Schief, 2013). Las construcciones multiepitópicas constituyen un sistema robusto capaz de dirigir las respuestas hacia sitios conservados que, normalmente, pueden resultar no

accesibles o poco inmunogénicos (Rathore *et al.*, 2014). En el diseño de las construcciones quiméricas MHIV-A y MHIV-B se tomó en cuenta el tamaño de la región multiepitópica a insertar en el acarreador B19 VP2, la distribución de los epítomos y la secuencia de los linkers para maximizar la expresión e inmunogenicidad de la construcción, así como la optimización de codones de la secuencia para maximizar la compatibilidad con el sistema de expresión en *E. coli*.

Los epítomos seleccionados para la construcción representan secuencias conservadas del virus, los cuales son usualmente poco accesibles en el transcurso normal de la enfermedad o generan respuestas inmunes sub-dominantes (es decir, la respuesta inmune es dirigida contra los epítomos no protectores que los rodean), sin embargo, también se han identificado como potentes blancos para el desarrollo de respuestas inmunológicas protectoras en pacientes seropositivos, ensayos *in vitro* y en modelos animales. Dada la complejidad de los factores necesarios para generar una protección “esterilizante” (es decir, el virus transmisor/fundador es eliminado del cuerpo antes de la primera ronda de replicación y establecimiento de reservorios virales) se incluyeron en el diseño epítomos de anticuerpos ampliamente neutralizantes, linfocitos T cooperadores y linfocitos citotóxicos con el propósito de cubrir todas las “bases” necesarias para una respuesta protectora. Si bien una respuesta neutralizante de los anticuerpos sería ideal, el uso de epítomos conservados también conlleva la posibilidad de desarrollar efectos de citotoxicidad celular asociada a anticuerpos (CCDA), la cual ha sido asociada a un riesgo de infección reducido en los pacientes de la prueba Thai RV144 que carecían de respuestas IgA en suero, un riesgo de mortalidad reducido en un modelo de transmisión vertical (madre a hijo durante el parto), y protección en forma de una carga viral reducida y progresión retrasada de la infección por el virus de inmunodeficiencia en simios inducidos por vacunación (Haynes *et al.*, 2012; Lewis, 2014; Milligan *et al.*, 2015).

La parte medular de ambas construcciones consiste en los epítomos del mAb T1 (epítomo “C4” de secuencia KQIINMWQEVGKAMYA) y la secuencia consenso del asa V3 (RPNNNTRKSIHIGPGRAFYATE). Estos epítomos han sido ampliamente caracterizados como blancos de anticuerpos neutralizantes, estimulando respuestas de células Th, linfocitos B, y una respuesta importante de CTLs en humanos y primates, la cual podría contribuir a la protección contra el reto de SIV a pesar de no desarrollar anticuerpos neutralizantes, además de que en nuestro grupo de trabajo se observó que el péptido C4V3 es inmunogénico aún sin necesidad de adyuvante (Lubeck *et al.*, 1997; Varona-Santos *et al.*, 2006). El resto de los epítomos fueron seleccionados por estimular el brazo humoral del sistema inmune, entre los cuales se incluyen algunos de los sitios de reconocimiento de los anticuerpos neutralizantes más potentes identificados. 4E10 y 10E8, ambos epítomos pertenecientes a la “región externa próxima a la membrana” (MPER), la cual es altamente conservada entre clados y es esencial para la fusión de la cápside-huesped. Los nAbs asociados a estos epítomos son capaces de neutralizar el 98% de un panel de 180 pseudoviriones distintos (IC₅₀<50µg/mL), y en el caso de 10E8 también se observó actividad de ADCC al unirse a Env expuesto en membrana e interesantemente falta de autorreactividad, una característica común en otros bnAbs (Haynes *et al.*, 2012; Barton F. Haynes *et al.*, 2014).

En nuestro grupo de trabajo se han desarrollado otras partículas tipo virus dirigidas hacia epítomos

de cáncer (trabajo no publicado), sin embargo, se usaron secuencias linkers que actuaron como sitios de corte en proteosoma para eficientizar el proceso de presentación de epítomos. En el presente estudio los epítomos seleccionados fueron unidos por secuencias flexibles ricas en residuos de glicina con el propósito de conseguir estructuras lo más similares a las nativas posible. (Yang *et al.*, 2015) describen el método por el cual diseñaron una vacuna multiepitépica con restricción de HLA para la población China; tras confirmar la conservación de los epítomos, se procedió a analizar el diseño en relación a los linkers, de los cuales describen dos secuencias (GGGS) y (AAY); Linkers ricos en residuos G pueden incrementar la flexibilidad de la secuencia, sin afectar la función de las proteínas a las que unen, mientras que AAY actúa como sitio de corte cuando se encuentra en proteosoma; sin embargo, también reduce el número de hélices y vueltas B, y regiones alfa incrementadas, lo cual significa que la construcción sería menos estable y menos inmunogénica. De acuerdo a los autores, el uso del linker AAY afectó negativamente la expresión en una línea celular COS-7 (células tipo fibroblasto), además, ratones BALB/c fueron inmunizados con el DNA desnudo por vía intramuscular y desarrollaron Ab específicos a los péptidos de las construcciones con los linkers GGGS en el orden de 10^3 , mientras que las construcciones basadas en el linker (AAY) fueron incapaces de generar respuestas IgG específicas.

El sistema de expresión de quimeras en *E. coli* BL21(DE3) representa múltiples ventajas sobre otros sistemas de producción de proteínas recombinantes. La doble selección de colonias permite obtener un nivel alto y consistente de expresión, manteniendo bajos costos de producción en relación a otros sistemas de expresión recombinante. Las construcciones quiméricas tuvieron un rendimiento promedio de $\approx 65\text{mg/L}$ cultivo, nivel comparable con la expresión de otros péptidos pequeños más solubles en nuestro grupo de trabajo (Govea-Alonso *et al.*, 2013; Rubio-Infante *et al.*, 2015). La proteína Gag de HIV también tiene la capacidad de acumularse en la cara interna de las membranas celulares, ensamblarse y ser liberada como VLPs vacías, no obstante, deben ser expresadas en células de mamífero o en un contexto de fermentación en levaduras, dada la necesidad de modificaciones post-traduccionales de las proteínas para adoptar una conformación nativa (trimerización en el caso de Env) (Fuenmayor *et al.*, 2017). Empero, estos modelos enfrentan limitaciones similares al usar pseudoviriones o Env soluble: los epítomos conservados y de relevancia biológica muchas veces resultan inaccesibles o subdominantes (Low & Tarlinton, 2017), además, se sabe que las VLPs de parvovirus generados en células de mamíferos tienden a no exponer la región N-terminal en viriones vacíos, haciéndolos poco efectivos para la presentación y entrega de inmunógenos adicionales (Reguera *et al.*, 2004).

En una nota de importancia, el agente caotrópico usado durante la purificación de las quimeras es de vital importancia. En datos no mostrados, las quimeras fueron solubilizadas en buffer de fosfatos adicionado con 6M GuHCl, pasados por la columna de níquel o cobalto, y eluidos en buffer adicionado con 3-6M Urea. Al momento del ensamblaje, la remoción del agente desnaturante sólo generó intermediarios de ensamblaje (oligocapsómeros y capsómeros $<9\text{nm}$). Esto puede ser atribuido a que la GuHCl es un agente cargado y la urea es neutral, haciendo del primero un agente desnaturante más fuerte y que permite lograr una conformación desdoblada más extendida. El desdoblamiento y plegamiento de proteínas pequeñas usualmente puede visualizarse como una transición de dos estados, pero en el caso de proteínas más complejas el proceso de plegamiento implica la formación de estados intermediarios como los observados por

DLS (Rashid *et al.*, 2005).

Para el ensamblaje de las VLPs se realizó la diálisis del agente desnaturante contra PBS pH 7.4 adicionado con 0.2M Arginina en ratios 1:3 (quimera : VP2 WT), 15:15:70 (quimera A: quimera B: VP2 WT) y 100% quimera, en una concentración final de 0.5µg en un volumen de 1.2 mL. El análisis por DLS mostró un ensamblaje exitoso para ambas quimeras en proporción 1:3, 15:15:70, y 100% (sólo para la quimera MHIV-B). Todas produjeron cápsides completas con tamaños promedios entre 15-25 nm, con distribuciones monodispersas indicando cápsides altamente puras. En el caso de la quimera 100% MHIV-A (que sólo produjo oligocapsómeros) podría asociarse a la distribución de los epítomos en la región multiepitópica. Se sabe que los epítomos C4V3, al expresarse de forma recombinante y purificarse por cromatografía IMAC tiende a formar agregados de mayor peso molecular que explican en parte su inmunogenicidad. La construcción MHIV-A al tener esta región en su extremo N-terminal y, por tanto, más accesible podría estar formando estos agregados que evitan la formación de cápsides completas.

La generación de cápsides quiméricas basadas en B19 VP2 como acarreador de epítomos ha sido explorado por su capacidad de exponer los residuos insertados en el extremo N-terminal hacia la superficie de cápsides ensambladas (Gilbert *et al.*, 2005; Michel *et al.*, 2008) sin afectar su capacidad de ensamblaje. También han sido conjugados con epítomos protectores en modelos de herpes simple I, virus del dengue, virus sincitial respiratorio y poliovirus, generando respuestas humorales específicas y neutralización del virus en contexto nativo en el caso de dengue y herpes (Zolopa, 2010) (Brown *et al.*, 1994) (Sedlik *et al.*, 1995).

En el presente trabajo se diseñaron dos construcciones basadas en el acarreador B19 VP2 acoplando múltiples epítomos asociados a anticuerpos neutralizantes y respuestas celulares, con el fin de caracterizarlas como modelos de vacuna contra HIV. La producción y ensamblaje exitoso de las quimeras sienta las bases para avanzar los estudios de inmunogenicidad y seguridad en mamíferos.

Conclusiones

- Las construcciones quiméricas MHIV-A y MHIV-B son expresadas en altos niveles, y procesadas en cuerpos de inclusión con solubilidad alterada con respecto a VP2 WT
- Las proporciones de ensamblaje ideales para ambas quimeras son 1:3 y 15:15:70 para la combinación de ambas
- Las quimeras produjeron cápsides completas con tamaños promedio de $23\pm\text{nm}$

Bibliografía

Uncategorized References

- Broliden, P. A., von Gegerfelt, A., Clapham, P., Rosen, J., Fenyo, E. M., Wahren, B., & Broliden, K. (1992). Identification of human neutralization-inducing regions of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(2), 461-465.
- Brown, C. S., Welling-Wester, S., Feijlbrief, M., Van Lent, J. W. M., & Spaan, W. J. M. (1994). Chimeric Parvovirus B19 Capsids for the Presentation of Foreign Epitopes. *Virology*, *198*(2), 477-488. doi:<http://dx.doi.org/10.1006/viro.1994.1059>
- Bunnik, E. M., Lobbrecht, M. S. D., van Nuenen, A. C., & Schuitemaker, H. (2010). Escape from autologous humoral immunity of HIV-1 is not associated with a decrease in replicative capacity. *Virology*, *397*(1), 224-230. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.009>
- CENSIDA. (2016). Vigilancia Epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México Registro Nacional de Casos de SIDA Actualización al 15 de noviembre de 2016.
- Cihlar, T., & Fordyce, M. (2016). Current status and prospects of HIV treatment. *Current Opinion in Virology*, *18*, 50-56. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2016.03.004>
- Cobey, S., Wilson, P., & Matsen, F. A. (2015). The evolution within us. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1676). doi:10.1098/rstb.2014.0235
- Cohen, Éric A. (2014). From Arrest to Escape: HIV-1 Vpr Cuts a Deal. *Cell Host & Microbe*, *15*(2), 125-127. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.012>
- Corey, L., Gilbert, P. B., Tomaras, G. D., Haynes, B. F., Pantaleo, G., & Fauci, A. S. (2015). Immune correlates of vaccine protection against HIV-1 acquisition. *Science Translational Medicine*, *7*(310), 310rv317-310rv317. doi:10.1126/scitranslmed.aac7732
- Darcis, G., Van Driessche, B., & Van Lint, C. (2017). HIV Latency: Should We Shock or Lock? *Trends in Immunology*, *38*(3), 217-228. doi:<https://doi.org/10.1016/j.it.2016.12.003>
- Darlix, J.-L., de Rocquigny, H., Mauffret, O., & Mély, Y. (2014). Retrospective on the all-in-one retroviral nucleocapsid protein. *Virus Research*, *193*, 2-15. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.05.011>
- del Carmen Morán-García, A., Rivera-Toledo, E., Echeverría, O., Vázquez-Nin, G., Gómez, B., & Bustos-Jaimes, I. (2016). Peptide presentation on primate erythrovirus 1 virus-like particles: In vitro assembly, stability and immunological properties. *Virus Research*, *224*, 12-18. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.08.007>
- Esparza, J. (2013). A brief history of the global effort to develop a preventive HIV vaccine. *Vaccine*, *31*(35), 3502-3518. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.018>
- Fuenmayor, J., Gòdia, F., & Cervera, L. (2017). Production of Virus-Like Particles for Vaccines. *New Biotechnology*. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.010>
- Gallagher, S. R. (2008). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*: John Wiley & Sons, Inc.
- Gaudebout, P., Zeliszewski, D., Golvano, J. J., Pignal, C., Le Gac, S., Borrás-Cuesta, F., & Sterkers, G. (1997). Binding analysis of 95 HIV gp120 peptides to HLA-DR1101 and -DR0401 evidenced many HLA-class II binding regions on gp120 and suggested several promiscuous regions. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, *14*(2), 91-101.
- Geretti, A. M., Van Baalen, C. A., Borleffs, J. C., Van Els, C. A., & Osterhaus, A. D. (1994). Kinetics and specificities of the T helper-cell response to gp120 in the asymptomatic stage of HIV-1

- infection. *Scand J Immunol*, 39(4), 355-362.
- Giese, S., Pelchen-Matthews, A., & Marsh, M. (2016). HIV – The Cell Biology of Virus Infection and Replication *Encyclopedia of Cell Biology* (pp. 828-838). Waltham: Academic Press.
- Gilbert, L., Toivola, J., White, D., Ihalainen, T., Smith, W., Lindholm, L., . . . Oker-Blom, C. (2005). Molecular and structural characterization of fluorescent human parvovirus B19 virus-like particles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(2), 527-535. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.208>
- Govea-Alonso, D. O., Gómez-Cardona, E. E., Rubio-Infante, N., García-Hernández, A. L., Varona-Santos, J. T., Salgado-Bustamante, M., . . . Rosales-Mendoza, S. (2013). Production of an antigenic C4(V3)6 multiepitopic HIV protein in bacterial and plant systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 113(1), 73-79. doi:10.1007/s11240-012-0252-4
- Graham, B. S., McElrath, M. J., Keefer, M. C., Rybczyk, K., Berger, D., Weinhold, K. J., . . . Haynes, B. F. (2010). Immunization with cocktail of HIV-derived peptides in montanide ISA-51 is immunogenic, but causes sterile abscesses and unacceptable reactogenicity. *PLoS ONE*, 5(8), e11995. doi:10.1371/journal.pone.0011995
- Group, T. I. S. S. (2015). Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *New England Journal of Medicine*, 373(9), 795-807. doi:10.1056/NEJMoa1506816
- Haynes, B. F., Gilbert, P. B., McElrath, M. J., Zolla-Pazner, S., Tomaras, G. D., Alam, S. M., . . . Kim, J. H. (2012). Immune-Correlates Analysis of an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial. *New England Journal of Medicine*, 366(14), 1275-1286. doi:10.1056/NEJMoa1113425
- Haynes, B. F., Ma, B., Montefiori, D. C., Wrin, T., Petropoulos, C. J., Sutherland, L. L., . . . Liao, H. X. (2006). Analysis of HIV-1 subtype B third variable region peptide motifs for induction of neutralizing antibodies against HIV-1 primary isolates. *Virology*, 345(1), 44-55. doi:10.1016/j.virol.2005.08.042
- Haynes, B. F., Moody, M. A., Alam, M., Bonsignori, M., Verkoczy, L., Ferrari, G., . . . Kelsoe, G. (2014). Progress in HIV-1 vaccine development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(1), 3-10. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.04.025>
- Kandathil, A. J., Sugawara, S., & Balagopal, A. (2016). Are T cells the only HIV-1 reservoir? *Retrovirology*, 13(1), 86. doi:10.1186/s12977-016-0323-4
- Kelker, H. C., Itri, V. R., & Valentine, F. T. (2010). A strategy for eliciting antibodies against cryptic, conserved, conformationally dependent epitopes of HIV envelope glycoprotein. *PLoS ONE*, 5(1), e8555. doi:10.1371/journal.pone.0008555
- Kent, S. J., Greenberg, P. D., Hoffman, M. C., Akridge, R. E., & McElrath, M. J. (1997). Antagonism of vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells by primary HIV-1 infection: potential mechanism of vaccine failure. *J Immunol*, 158(2), 807-815.
- Kim, J. H., Excler, J. L., & Michael, N. L. (2015). Lessons from the RV144 Thai phase III HIV-1 vaccine trial and the search for correlates of protection. *Annu Rev Med*, 66, 423-437. doi:10.1146/annurev-med-052912-123749
- Kulp, D. W., & Schief, W. R. (2013). Advances in structure-based vaccine design. *Current Opinion in Virology*, 3(3), 322-331. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2013.05.010>
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., & Hendrickson, W. A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 393(6686), 648-659. doi:10.1038/31405
- Ladell, K., Hashimoto, M., Iglesias, Maria C., Wilmann, Pascal G., McLaren, James E., Gras, S., . . . Appay, V. (2013). A Molecular Basis for the Control of Preimmune Escape Variants by HIV-Specific CD8+ T Cells. *Immunity*, 38(3), 425-436. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.021>
- Lahaye, X., & Manel, N. (2015). Viral and cellular mechanisms of the innate immune sensing of HIV.

- Current Opinion in Virology*, 11, 55-62. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2015.01.013>
- Lewis, G. K. (2014). Role of Fc-mediated antibody function in protective immunity against HIV-1. *Immunology*, 142(1), 46-57. doi:10.1111/imm.12232
- Low, M. S. Y., & Tarlinton, D. (2017). HIV Vaccines: One Step Closer. *Trends in Molecular Medicine*, 23(1), 1-3. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2016.10.006>
- Lubeck, M. D., Natuk, R., Myagkikh, M., Kalyan, N., Aldrich, K., Sinangil, F., . . . Robert-Guroff, M. (1997). Long-term protection of chimpanzees against high-dose HIV-1 challenge induced by immunization. *Nature Medicine*, 3(6), 651-658. doi:10.1038/nm0697-651
- Malhotra, U., Holte, S., Zhu, T., Delpit, E., Huntsberry, C., Sette, A., . . . McElrath, M. J. (2003). Early induction and maintenance of Env-specific T-helper cells following human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, 77(4), 2663-2674.
- Michel, P. O., Mäkelä, A. R., Korhonen, E., Toivola, J., Hedman, L., Söderlund-Venermo, M., . . . Oker-Blom, C. (2008). Purification and analysis of polyhistidine-tagged human parvovirus B19 VP1 and VP2 expressed in insect cells. *Journal of Virological Methods*, 152(1), 1-5. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.06.006>
- Milligan, C., Richardson, Barbra A., John-Stewart, G., Nduati, R., & Overbaugh, J. (2015). Passively Acquired Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) Activity in HIV-Infected Infants Is Associated with Reduced Mortality. *Cell Host & Microbe*, 17(4), 500-506. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2015.03.002>
- Ni, D., Xu, P., Sabanayagam, D., & Gallagher, S. R. (2008). Protein Blotting: Immunoblotting *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*: John Wiley & Sons, Inc.
- NIAID. (2015). *HIV Molecular Immunology 2015* (D. B. Karina Yusim, Richard Koup, Bette Korber, Rob de Boer, John Moore, Christian Bander, Barton Haynes, Bruce Walker Ed.). Los Alamos, New Mexico: Theoretical Biology and Biophysics Group T-6.
- O'Cofaigh, E., & Lewthwaite, P. Natural history of HIV and AIDS. *Medicine*, 41(8), 411-416. doi:10.1016/j.mpmed.2013.05.009
- O'Cofaigh, E., & Lewthwaite, P. (2013). Natural history of HIV and AIDS. *Medicine*, 41(8), 411-416. doi:10.1016/j.mpmed.2013.05.009
- Patterson, L. J., Robey, F., Muck, A., Van Remoortere, K., Aldrich, K., Richardson, E., . . . Robert-Guroff, M. (2001). A conformational C4 peptide polymer vaccine coupled with live recombinant vector priming is immunogenic but does not protect against rectal SIV challenge. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 17(9), 837-849. doi:10.1089/088922201750252034
- Rashid, F., Sharma, S., & Bano, B. (2005). Comparison of Guanidine Hydrochloride (GdnHCl) and Urea Denaturation on Inactivation and Unfolding of Human Placental Cystatin (HPC). *The Protein Journal*, 24(5), 283-292. doi:10.1007/s10930-005-6749-5
- Rathore, U., Kesavardhana, S., Mallajosyula, V. V. A., & Varadarajan, R. (2014). Immunogen design for HIV-1 and influenza. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1844(11), 1891-1906. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.05.010>
- Reguera, J., Carreira, A., Riobos, L., Almendral, J. M., & Mateu, M. G. (2004). Role of interfacial amino acid residues in assembly, stability, and conformation of a spherical virus capsid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2724-2729. doi:10.1073/pnas.0307748101
- Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., . . . Kim, J. H. (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *New England Journal of Medicine*, 361(23), 2209-2220. doi:10.1056/NEJMoa0908492
- Rosales-Mendoza, S., Rubio-Infante, N., Monreal-Escalante, E., Govea-Alonso, D. O., García-Hernández, A. L., Salazar-González, J. A., . . . Moreno-Fierros, L. (2014). Chloroplast expression of an HIV envelop-derived multiepitope protein: towards a multivalent plant-

- based vaccine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 116(1), 111-123. doi:10.1007/s11240-013-0387-y
- Rubio-Infante, N., Govea-Alonso, D. O., Alpuche-Solís, Á. G., García-Hernández, A. L., Soria-Guerra, R. E., Paz-Maldonado, L. M. T., . . . Rosales-Mendoza, S. (2012). A chloroplast-derived C4V3 polypeptide from the human immunodeficiency virus (HIV) is orally immunogenic in mice. *Plant Molecular Biology*, 78(4), 337-349. doi:10.1007/s11103-011-9870-1
- Rubio-Infante, N., Govea-Alonso, D. O., Romero-Maldonado, A., García-Hernández, A. L., Ilhuicatzí-Alvarado, D., Salazar-González, J. A., . . . Moreno-Fierros, L. (2015). A Plant-Derived Multi-HIV Antigen Induces Broad Immune Responses in Orally Immunized Mice. *Molecular Biotechnology*, 57(7), 662-674. doi:10.1007/s12033-015-9856-3
- Sánchez-Rodríguez, S. P., Enríquez-Avila, J. V., Soto-Fajardo, J. M., Peña-Montes, C., & Bustos-Jaimes, I. (2015). In Vitro Encapsulation of Heterologous dsDNA Into Human Parvovirus B19 Virus-Like Particles. *Molecular Biotechnology*, 57(4), 309-317. doi:10.1007/s12033-014-9823-4
- Sánchez-Rodríguez, S. P., Münch-Anguiano, L., Echeverría, O., Vázquez-Nin, G., Mora-Pale, M., Dordick, J. S., & Bustos-Jaimes, I. (2012). Human parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability. *Biochimie*, 94(3), 870-878. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2011.12.006>
- Santillán-Urbe, J. S., Valadez-García, J., Morán-García, A. d. C., Santillán-Urbe, H. C., & Bustos-Jaimes, I. (2015). Peptide display on a surface loop of human parvovirus B19 VP2: Assembly and characterization of virus-like particles. *Virus Research*, 201, 1-7. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.011>
- Sedlik, C., Sarraseca, J., Rueda, P., Leclerc, C., & Casal, I. (1995). Immunogenicity of poliovirus B and T cell epitopes presented by hybrid porcine parvovirus particles. *J Gen Virol*, 76 (Pt 9), 2361-2368. doi:10.1099/0022-1317-76-9-2361
- Sivashanmugam, A., Murray, V., Cui, C., Zhang, Y., Wang, J., & Li, Q. (2009). Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 18(5), 936-948. doi:10.1002/pro.102
- UNAIDS. (2016). AIDS DATA.
- Varona-Santos, J. T., Vazquez-Padrón, R. I., & Moreno-Fierros, L. (2006). Production of a Short Recombinant C4V3 HIV-1 Immunogen That Induces Strong Anti-HIV Responses by Systemic and Mucosal Routes Without the Need of Adjuvants. *Viral Immunology*, 19(2), 237-249. doi:10.1089/vim.2006.19.237
- Warrier, S. V., Pinter, A., Honnen, W. J., Girard, M., Muchmore, E., & Tilley, S. A. (1994). A novel, glycan-dependent epitope in the V2 domain of human immunodeficiency virus type 1 gp120 is recognized by a highly potent, neutralizing chimpanzee monoclonal antibody. *J Virol*, 68(7), 4636-4642.
- Williams, I. G. (2013). Treatment strategies for HIV infection. *Medicine*, 41(8), 470-473. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2013.05.017>
- Yang, Y., Sun, W., Guo, J., Zhao, G., Sun, S., Yu, H., . . . Zhou, Y. (2015). In silico design of a DNA-based HIV-1 multi-epitope vaccine for Chinese populations. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 11(3), 795-805. doi:10.1080/21645515.2015.1012017
- Zolopa, A. R. (2010). The evolution of HIV treatment guidelines: Current state-of-the-art of ART. *Antiviral Research*, 85(1), 241-244. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.018>