



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 293 700**

51 Int. Cl.:

A61K 39/21 (2006.01)

C12N 15/49 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98966601 .1**

86 Fecha de presentación : **30.11.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1035865**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.09.2000**

54 Título: **Tat HIV-1 o sus derivados para vacunación terapéutica y profiláctica.**

30 Prioridad: **01.12.1997 IT RM97A0743**

73 Titular/es: **Istituto Superiore di Sanità
299 Viale Regina Elena
00161 Roma, IT**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

72 Inventor/es: **Ensoli, Barbara**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tat HIV-1 o sus derivados para vacunación terapéutica y profiláctica.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una vacuna profiláctica y/o terapéutica anti-HIV, anti-SIDA y contra los tumores y síndromes asociados con la infección de HIV, que utiliza como inmunógenos Tat HIV, sola o asociada con proteínas, péptidos o DNA de otros productos virales (Nef, Rev, Gag) o citocinas que potencian la respuesta inmunitaria antiviral.

La invención se refiere también a la inmunización con Tat como se define en las reivindicaciones, usando la inmunización mucosal, o la inmunización *ex-vivo* de células de la sangre periférica expandidas por co-estimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 y a la administración de los inmunógenos mencionados antes usando eritrocitos o nanopartículas.

15 **Antecedentes de la invención**

El SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) es causado por el HIV (virus de inmunodeficiencia humana) y se caracteriza por inmunodeficiencia, tumores, tales como el sarcoma de Kaposi (KS) y los linfomas de las células B, infecciones oportunistas y trastornos del sistema nervioso central. Puesto que el SIDA está extendido por todo el mundo y tiene una alta mortalidad, uno de los objetivos más importantes de salud pública es desarrollar una vacuna profiláctica y/o terapéutica contra el HIV o SIDA. La mayoría de las estrategias pasadas y actuales han usado la envuelta viral o sus sub-unidades como inmunógenos, pero con resultados insatisfactorios debido a la alta variabilidad de la envuelta viral (ref. 162, 112 - a lo largo de esta memoria descriptiva, se mencionan diferentes referencias entre paréntesis para describir más en detalle el estado de los conocimientos en el campo al que pertenece la presente invención. Una información bibliográfica completa para cada cita se encuentra al final de la memoria descriptiva; inmediatamente antes de las reivindicaciones). Por tanto, como una alternativa a la inmunidad esterilizante, existe la opinión común de que podría ser suficiente bloquear la evolución de la infección y la aparición de la enfermedad. Además, se pueden obtener respuestas inmuno-protectoras utilizando regiones del DNA de HIV como inmunógenos (ref. 91, 17). Debido a los datos experimentales publicados, el inventor cree que es necesario producir una vacuna que utilice productos virales distintos de *env*. En particular, las proteínas virales a ser usadas como inmunógenos deben ser más conservadas entre los aislados de HIV, capaces de inducir una respuesta inmunitaria eficaz, tanto humoral como celular, y deben tener una función vital para el virus. Se deben experimentar dichos productos en el modelo de primates no humanos (debido a que su sistema inmunitario es más similar al de los seres humanos comparado con el de animales filogenéticamente más distantes) en los que se puede desarrollar el SIDA después de una infección del virus.

La proteína Tat de HIV-1 tiene todas las características para ser un buen inmunógeno para una vacuna: está conservada, es inmunogénica y es esencial en las fases iniciales de la infección viral. Además, Tat tiene un papel esencial no sólo en la replicación viral, transmisión y progresión de la infección, sino también en la aparición y progresión de los tumores asociados al SIDA, por ejemplo KS, que es el tumor más frecuente asociado al SIDA, y de otros síndromes y síntomas que se desarrollan después de la infección de HIV.

Tat es una proteína de 86-102 aminoácidos, dependiendo de la cepa viral, codificada por dos exones. Tat es producida rápidamente después de la infección, se localiza en el núcleo y transactiva la expresión de todos los genes virales interactuando con el "elemento respondedor a la Tat" (TAR) presente en la secuencia LTR (Ref. 25). Tat tiene también un papel en la virulencia del HIV (Ref. 63, 113, 60, 84). El producto del primer exón (aminoácidos 1-72) está conservado entre diferentes aislados virales (Ref. 112) y es suficiente para la transactivación de los productos de HIV-1 (Ref. 25). Contiene 4 dominios. El dominio ácido (aminoácidos 1-21) es importante para la interacción de Tat con las proteínas celulares; la región rica en cisteína (aminoácidos 22-37) representa el dominio de transactivación. Esta región es la más conservada entre los aislados primarios (Ref. 108) de cisteína 22 con una glicina, suprime la capacidad de Tat para transactivar la HIV-LTR (Ref. 166); el dominio central (aminoácidos 38-48) está también conservado y es importante para la función. La sustitución de lisina 41 con una treonina inactiva la actividad de transactivación de Tat sobre la LTR de HIV (Ref. 70); el dominio básico (aminoácidos 49-57), rico en arginina y lisina, es necesario para la localización nuclear de Tat y se une específicamente a su RNA objetivo (TAR) (Ref. 25). Además, la región básica es responsable de la unión de Tat extracelular a la heparina y a los proteoglicanos de heparansulfato (HSPG) (Ref. 26). Las mutaciones en la región básica eliminan tales interacciones. La porción carboxi-terminal de Tat no es necesaria para la transactivación de LTR, pero contiene una secuencia de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), usualmente presente en las proteínas de la matriz extracelular (ECM), que es responsable de la unión de Tat a los receptores de las integrinas $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_v\beta_3$. Estas interacciones median en los efectos de Tat sobre los tumores asociados con el SIDA y sobre el sistema inmune, vascular y nervioso (Ref. 11, 42, 170, 25). Durante la infección aguda de las células T con HIV-1, o después de la transfección del gen *tat* a células COS-1, se libera la proteína Tat en ausencia de muerte celular en el entorno extracelular (Ref. 40, 41, 25). La liberación de Tat desde las células infectadas ocurre también *in vivo* ya que la Tat extracelular está presente en el suero de los sujetos infectados (Ref. 164) y en las lesiones de SIDA-KS (Ref. 42). Después de la liberación, parte de la proteína permanece en una forma soluble, y parte se une a los HSPG de la ECM. La Tat unida a los HSPG puede ser recuperada en una forma soluble mediante la adición de heparina. La unión con heparina es debida a la región básica de Tat; evita los efectos de Tat extracelular y protege a la proteína de la oxidación. Esta característica ha sido usada en esta invención para purificar Tat con una alta actividad biológica (Ref.

26). La Tat extracelular puede ser internalizada por las células, puede migrar al núcleo y transactivar la expresión del gen viral (Ref. 49, 98, 100, 41). La internalización de Tat tiene lugar por endocitosis mediada por la unión de la región RGD de Tat a $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha v\beta_3$ (Ref.10, 42, Ensoli *et al.*, datos no publicados) y/o por la región básica que se une a los HSPG.

La Tat puede activar la replicación viral y la transmisión del virus también a través de mecanismos indirectos que implican la modulación de la expresión de los genes celulares que tienen un papel clave en el control de la supervivencia celular, y en la expresión de citocinas inflamatorias (IC) con un efecto sobre la replicación viral (Ref. 25).

Aparte de su importancia en la replicación viral, la Tat desempeña un importante papel en la patogénesis del SIDA. La Tat es capaz de modular la supervivencia y la proliferación de las células infectadas y no infectadas al causar activación o represión de citocinas, tales como IL-2 (Ref. 123, 163, 31), o de genes con un papel clave en el ciclo celular (Ref. 145, 169, 164, 173). Los efectos anti- o pro-apoptóticos de Tat dependen de una serie de factores tales como el tipo de célula, el hecho de que Tat sea expresada por la célula o añadida a la célula y de su concentración (Ref. 40, 41, 171).

Tat es el factor responsable del aumento de la frecuencia y agresividad de KS en los sujetos infectados por HIV-1 (Ref. 43, 33). El KS es un tumor de origen vascular y es la neoplasia más frecuente en los individuos infectados por HIV. La Tat induce a las células de KS y a las células endoteliales activadas por IC a migrar, a expresar colagenasa tipo IV, a invadir la ECM y a proliferar, siendo necesarios tales mecanismos para la angiogénesis y la invasión tumoral (Ref. 40,41, 42, 2, 46). Tales efectos de Tat son inducidos por las IC, puesto que éstas estimulan la expresión de los receptores de Tat, $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha v\beta_3$ (Ref. 10). Tat imita el efecto de las proteínas de la ECM, tales como fibronectina y vitronectina y tanto la región RGD como la región básica son necesarias para los efectos de la Tat extracelular sobre las células de KS, sobre la angiogénesis y sobre la progresión de KS. La capacidad de Tat extracelular de unirse *in vivo* a sus receptores en las lesiones de KS en el SIDA (Ref. 40) apoyan la idea de que Tat está implicada en la aparición y el mantenimiento de KS asociado al SIDA. Además los ratones transgénicos para el gen *tat* desarrollan KS u otros fenotipos que dependen del nivel de expresión del transgén (Ref. 160, 34).

Se ha sugerido que Tat desempeña un papel en los fenómenos hiperproliferativos y en la patogénesis de los linfomas B, frecuentemente observados en los sujetos seropositivos y en los ratones *tat*-transgénicos (Ref. 157), a través de mecanismos que implican el aumento de la expresión de bcl-2 y de citocinas (Ref. 122). Otros indicios confirman un probable papel de Tat en la oncogénesis (Ref. 72).

La Tat puede activar también la expresión de promotores virales, tales como los de herpesvirus y de otros virus que se reactivan en los individuos con SIDA, estimulando la aparición y la progresión de infecciones oportunistas (Ref. 25).

La Tat también parece capaz de ejercer efectos neurotóxicos tanto directos (a través de la región básica y las regiones RGD) como indirectos mediante la inducción de IC que tienen un efecto tóxico sobre las neuronas del sistema nervioso central o sobre la barrera hematoencefálica (Ref. 25). Con respecto a la respuesta inmunitaria a Tat, una serie de estudios sugieren que los anticuerpos anti-Tat desempeñan un papel protector en el control de la evolución de la enfermedad *in vivo* (Ref. 130, 135, 136, 149, 127). Además, *in vitro*, los anticuerpos anti-Tat no sólo suprimen la internalización, la activación transcelular de Tat y la infección viral (Ref. 41, 127), sino que también inhiben la proliferación y la migración inducida por Tat de las células KS y la formación de lesiones semejantes a KS en ratones (Ref. 40, 41, 42). Finalmente, los resultados preliminares demuestran que los anticuerpos anti-Tat están ausentes en los sujetos con KS-SIDA, lo que da a entender que tales sujetos no pueden bloquear la actividad de la Tat extracelular.

El desarrollo de una respuesta anti-Tat mediada por las células en la fase inicial de la infección es importante para el control de la propia infección (Ref. 161, 133, 59) y existe una correlación inversa entre la presencia de CTL (linfocitos T citotóxicos) específicos anti-Tat y la progresión de la enfermedad (Ref. 156). Se obtuvieron estos resultados en estudios sobre macacos inoculados con SIVmac (Ref. 91, 158). Además, datos recientes en ratones de diferentes especies a los que se inoculó Tat o bien como un plásmido o bien como una proteína han demostrado que es posible inducir una respuesta, tanto humoral como celular, a la proteína (Ref. 61). Sin embargo, se ha observado variabilidad entre varias especies de ratones y tales resultados no han sido reproducidos con los mismos inmunógenos en los primates no humanos (Ref. 124). La falta de reproducibilidad en un modelo de primate no humano de los resultados de los experimentos de vacunación realizados en ratones es frecuente y posiblemente debida al diferente sistema inmunitario de estas dos especies que pueden producir diferentes respuestas inmunitarias con el mismo inmunógeno, como se ha demostrado para la proteína Env de HIV. Por tanto, las vacunas candidatos para los seres humanos deben ser ensayadas en primates no humanos y no solamente en especies inferiores.

El inventor cree que otras proteínas virales, o partes de las mismas, podrían ser asociadas con Tat para aumentar una respuesta inmunitaria específica contra HIV y podría ser beneficioso también en la vacunación contra la aparición de tumores y de otras patologías y síntomas asociados con la infección de HIV. Tales productos son las proteínas Nef, Rev y Gag de HIV.

Nef es otra proteína viral reguladora importante para el desarrollo de la enfermedad (Ref.3, 48, 58). Nef es producida pronto después de la infección y es liberada en el entorno extracelular (Ensoli, datos no publicados). En el sistema

SIVmac/macaco la presencia de Nef guarda correlación con una alta replicación viral y con la progresión hacia el SIDA (Ref. 71). Nef es más variable que Tat (Ref. 112). Nef es una proteína inmunogénica (Ref. 53, 32, 35, 151) y es capaz de inducir CTL (Ref. 16, 36). En particular, se ha identificado una región inmunodominante de Nef (región 73-144) que es reconocida por los CTL en la mayoría de los pacientes infectados por HIV.

Rev es una proteína viral reguladora producida pronto durante la infección (Ref. 51, 119) y liberada en el entorno extracelular (Ensoli *et al.*, datos no publicados). Rev es esencial para la replicación del HIV y para la progresión de la enfermedad, y es codificada por dos exones, solapando parcialmente las regiones que codifican a Tat. Rev es una proteína nuclear (Ref. 44) necesaria para la expresión de los RNA virales mensajeros que codifican las proteínas tardías (Ref. 97). Rev es una proteína altamente conservada entre los diferentes aislados virales de HIV-1 (Ref. 111) y es inmunogénica. De hecho, induce la producción de anticuerpos específicos dirigidos contra los dos dominios funcionales de la proteína (Ref. 120) durante la infección natural en el hombre (Ref. 131) y después de la inoculación en los ratones (Ref. 61). Los niveles más bajos de anticuerpos anti-Rev en los sueros de individuos infectados parecen guardar correlación con la progresión hacia el SIDA (Ref. 131). Rev puede inducir los CTL tanto en el hombre como en el mono (Ref. 156, 158) y se ha publicado que una respuesta de CTL específica anti-Rev, tempranamente durante la infección, está inversamente correlacionada con la progresión de la enfermedad (Ref. 156, 158).

Otro objetivo viral es el gen *gag*, que se expresa tardíamente durante la infección y que codifica un grupo de proteínas estructurales de la cápsida altamente inmunogénicas (Ref. 18, 147). Los títulos de anticuerpos anti-Gag son altos y estables durante la fase asintomática de la infección, y alcanzan niveles muy bajos cuando progresa la infección hasta la fase terminal del SIDA, en combinación con la caída de los linfocitos CD4+ y la presencia del virus en la sangre periférica (Ref. 174, 73). Las proteínas Gag inducen la actividad de los CTL tempranamente durante infección, tanto en el hombre como en los primates (Ref. 103, 168), y su presencia está relacionada significativamente con el control de la viremia inicial y con la progresión de la enfermedad (Ref. 175, 6, 134, 167, 92). Finalmente, las proteínas p17 y p24 contienen epítomos inmunodominantes que se mantienen en diferentes aislados de HIV-1 y HIV-2 y son reconocidos por los CTL (Ref. 89, 19, 114, 155, 115).

El inventor cree que las citocinas o partes de las mismas, tales como IL-12 e IL-15, u otras citocinas inmunomoduladoras tales como IFN α o IFN β u otras proteínas que aumentan el efecto inmunogénico de Tat, se pueden utilizar como adyuvantes en la formulación de la vacuna anti-Tat. La IL-12 es una citocina inmunorreguladora fuerte producida por células presentadoras de antígeno (APC) tales como las células B y las células dendríticas (Ref. 154). La IL-12 es producida pronto después de la infección por HIV y tiene una acción pro-inflamatoria que induce a las células NK y a los linfocitos T a producir IFN γ que activa los fagocitos y promueve la inducción de los linfocitos Th1. La IL-12 desempeña un papel fundamental en la resistencia a una serie de infecciones causadas por bacterias, hongos y virus y presenta una alta actividad anti-tumoral. Varios indicios sugieren que los virus que inducen la inmunodepresión, tales como el HIV y el virus de sarampión, actúan también a través de mecanismos que deprimen la producción de IL-12 (Ref. 57, 50, 144).

La IL-15 es una citocina pleiotrópica expresada por tejidos no linfoides, por monocitos/macrófagos activados y por células dendríticas (DC) (Ref. 125, 66). La IL-15 desempeña un importante papel en la regulación de la actividad de las células NK, en la proliferación de linfocitos T y en la actividad de los CTL (Ref. 67, 24). La IL-15 induce la expresión de los CTL contra los antígenos HIV, en ausencia de IL-2 y linfocitos T CD4+ funcionales (Ref. 68, 1). Además, similarmente a la IL-2, la IL-15 induce la expansión de los linfocitos con actividad citotóxica ("destructores activados por linfocina", LAK) y estimula la producción de IFN γ en las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de los pacientes seropositivos (Ref. 93). La IL-15 activa los monocitos para producir quimiocinas, que desempeñan un papel en la aparición de procesos inflamatorios (Ref. 8).

Recientes estudios han demostrado que la co-estimulación de los linfocitos CD4+ con perlas paramagnéticas, recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 determina una expansión logarítmica y policlonal de los linfocitos en los sujetos infectados por HIV (Ref. 82) sin activar la replicación ni la transmisión del virus. Tal actividad antiviral es una consecuencia tanto de la modulación negativa de la expresión de CCR5, el co-receptor de cepas monolitótropas de HIV-1 (Ref. 23) como en menor medida, de los altos niveles de quimiocinas inducidas por la co-estimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 (Ref. 132). El inventor cree que la posibilidad de expandir los linfocitos autólogos de los sujetos infectados por HIV en ausencia de replicación/transmisión viral, permite obtener una inmunización eficaz *ex vivo*, descrita en los ejemplos, que puede ser muy útil en el desarrollo de una vacuna anti-Tat.

Dentro de los diferentes sistemas propuestos para la generación de vacunas antivirales y anti-tumorales eficaces, el inventor cree que la utilización de células dendríticas podría ser clave en la inducción de una respuesta inmunitaria a Tat. Esto es debido al hecho de que estas células son las más eficaces en la presentación de antígeno y las únicas capaces de estimular los linfocitos naturales, en ausencia de adyuvantes (Ref. 150). El uso de células dendríticas reemplaza la función de varios adyuvantes que consiste en la inducción de una respuesta inmunitaria no específica (inmunidad natural) que, a su vez, genera una fuerte respuesta específica primaria en presencia del antígeno.

Puesto que la transmisión de la infección de HIV tiene lugar principalmente a nivel mucosal (genital y rectal en el adulto, oral en el recién nacido), el inventor cree que la inducción de inmunidad protectora a nivel mucosal es un objetivo principal. Muchos estudios han demostrado recientemente la posibilidad de inducir la inmunización mucosal, local y sistémica. Particularmente, las vías nasal y oral han demostrado ser las más eficientes para inducir

una respuesta inmunitaria mucosal eficaz, incluso en sitios distantes, tales como la mucosa genital (Ref. 138, 118). En particular, el inventor cree que el uso de las bacterias *S. Gordonii* y *Lactobacillus*, modificadas para expresar los antígenos virales mencionados antes, podría ser una estrategia válida para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria específica a nivel de la mucosa en los monos y en el hombre. Estas bacterias, de hecho, son capaces de colonizar la mucosa oral y vaginal del ratón, y de inducir una respuesta de anticuerpos específica, local y sistémica, contra los antígenos heterólogos expresados en la superficie de bacterias recombinantes (Ref. 116, 104, 106, 121, 117, 139, 105, 107). Finalmente, estas bacterias actúan como vectores vivos y pueden inducir una estimulación prolongada del sistema inmunitario. Además, el inventor cree que los vectores virales recombinantes no replicantes y no patógenos, tales como el virus de herpes simplex tipo-1 (HSV-1) (Ref. 99), se pueden usar para expresar proteínas virales para la inmunización sistémica (intradérmica) y mucosal (vías oral, vaginal y nasal). De hecho, estos vectores pueden alojar grandes secuencias exógenas (Ref. 52, 64), tales como varios genes de HIV (reguladores, suplementarios y estructurales). Además, los vectores herpes se pueden administrar también por vía oral, nasal o vaginal (Ref. 176, 75).

El inventor cree que Tat (ya sea como proteína o como DNA), sola o en combinación con los otros inmunógenos descritos antes, se puede inocular también usando nuevos sistemas de administración, tales como eritrocitos o nanopartículas. En particular, el inventor cree que es posible administrar antígenos unidos a la membrana de los eritrocitos autólogos (Ref. 95, 96). Puesto que estos eritrocitos son separados de la sangre por los macrófagos, células profesionales que presentan antígeno, solamente después de 120 días, se puede usar esta característica para los fines de la vacuna. Finalmente, otra estrategia de administración es el uso de nanopartículas que pueden llevar proteínas y DNA (Ref. 27, 172). Las nanosferas son partículas coloidales poliméricas de diversa composición química, variables de 10-1000 nm. Diferentes sustancias (oligonucleótidos, fármacos, proteínas, péptidos, DNA) pueden ser cargadas sobre su superficie o absorbidas en la partícula y administradas al citoplasma o al núcleo de las células de donde son liberadas lentamente. Esto permite la utilización de muy pequeñas cantidades de la sustancia a ser administrada.

Basándose en los resultados descritos antes, el inventor cree que la inmunización con Tat, sola o en combinación con otros productos virales o citocinas inmunomoduladoras, o partes de las mismas, en presencia o no de adyuvantes, podría bloquear la replicación viral en los sujetos expuestos después de la vacunación y en los sujetos infectados, manteniendo la infección en una fase frustrada, que puede ser controlada más fácilmente por el sistema inmunitario. Por tanto, el inventor cree que una vacuna basada en Tat sería capaz de inducir una respuesta inmunitaria, tanto humoral como celular, suficiente para bloquear o reducir la replicación o la transmisión del virus y por tanto capaz de controlar la replicación del virus y de bloquear la infección productiva, la progresión a la enfermedad y la aparición de tumores y otros síndromes y síntomas asociados al SIDA. Es posible, por tanto, usar la vacuna anti-Tat con fines tanto preventivos como terapéuticos. De hecho, una respuesta humoral contra Tat podría neutralizar los efectos de la Tat extracelular reduciendo y limitando la infección, mientras que la respuesta inducida por las células contra Tat así como contra otras proteínas virales incluidas en la formulación de la vacuna, podría destruir las células infectadas por el virus llevando al control de la infección. Esto deja al sistema inmunitario el periodo de tiempo necesario para desarrollar una respuesta completa frente a todos los componentes virales del virus infectante en ausencia de daños irreversibles debidos a la replicación viral.

Ha sido descrito el uso de Tat como un inmunógeno (WO 95/31999). Sin embargo, se describe el uso de una proteína biológicamente inactiva; además, en la misma solicitud de patente no se muestran pruebas de la actividad biológica de la proteína Tat "originaria".

El documento WO9415634 se refiere a oligopéptidos sintéticos homólogos de las secuencias señales de las proteínas Tat y Rev, que se pueden usar en el tratamiento de infecciones por HIV. Sin embargo no se dan ni indicaciones de la preparación ni ensayos para demostrar la eficacia de las proteínas descritas.

Hinkula *et al.*, Vaccine, Vol. 15, 8, 874-878 (1997) describe ensayos de vacunaciones en ratones basados en vacunas que contienen Tat, sin embargo los resultados obtenidos allí en especies inferiores no se pueden trasladar directamente a los primates no humanos.

En adición, existe un fuerte prejuicio técnico contra el uso de una proteína Tat biológicamente activa, porque se cree que aumenta la replicación viral en los sujetos infectados y/o que produce inmunodepresión en los individuos seronegativos o seropositivos (A. Tonelli: Aids, un vaccino per sperare. "La Repubblica", pag. 10, 24 Oct. 1998).

Como queda claro de lo anterior, a pesar de los esfuerzos realizados, todavía no se ha desarrollado una vacuna anti-HIV eficaz basada en Tat

Sumario de la invención

Es objeto de la presente invención proporcionar una proteína Tat para uso como una vacuna, como se define en las reivindicaciones.

Otro objeto de la invención es una vacuna proteica para ser usada en los seres humanos, profiláctica o terapéutica contra el SIDA, tumores asociados con el SIDA y síndromes y síntomas asociados con el HIV, que comprende una proteína Tat de tipo natural recombinante (Seq. ID 1), expresada y purificada como se describe, administrada sola o conjugada con un epítipo de toxoide tetánico T ayudador u otros epítopos T ayudadores.

ES 2 293 700 T3

Otro objeto de la invención es una vacuna como se ha descrito antes, en combinación con las proteínas recombinantes de HIV Nef, Rev y/o Gag o péptidos de Nef, Rev y Gag administrados como proteínas de fusión Tat/Nef, Tat/Rev, Tat/Gag o como partes de estas proteínas.

Otro objeto de la invención es una vacuna como se ha descrito antes, en combinación con proteínas recombinantes de citocinas inmunomoduladoras como IL-12, IL-15 u otras moléculas o parte de estas, capaces de aumentar la respuesta inmunitaria antiviral, o una vacuna constituida por Tat/IL-12, Tat/IL-15 o Tat/otras proteínas de fusión, o parte de éstas, capaces de aumentar la respuesta inmunitaria antiviral.

Otro objeto de la invención es una vacuna anti-Tat, como una proteína, sola o combinada como se ha descrito antes para la inmunización con células dendríticas autólogas mediante tratamiento *ex vivo*.

Otro objeto de la invención es una vacuna anti-Tat como una proteína, sola o combinada como se ha descrito antes, para la inmunización mucosal (nasal, oral, vaginal o rectal).

Otro objeto de la invención es una vacuna anti-Tat como una proteína, sola o combinada como se ha descrito antes, para la inmunización *ex vivo* de células de la sangre periférica de sujetos infectados expandidas por co-estimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 conjugados con perlas paramagnéticas y re-infundidas en el hospedante.

Otro objeto de la invención es una vacuna anti-Tat, como una proteína como se ha descrito antes, combinada con inhibidores de la replicación viral.

Otro objeto de la invención es una vacuna anti-Tat como se ha descrito ya, en combinación con adyuvantes que aumentan la respuesta inmunitaria.

Otro objeto de la invención es una vacuna anti-Tat, sola o en combinación como se ha descrito ya, administrada mediante sistemas de administración específicos, tales como nanopartículas, vectores herpes, glóbulos rojos sanguíneos, bacterias o cualquier otro sistema de administración por el cual se puede administrar la vacuna descrita antes, en todas sus combinaciones.

Objetos adicionales quedarán claros de la descripción detallada de la invención.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1A. Inhibición de la absorción de proteína Tat rodaminada a 10 ng/ml mediante preincubación de células endoteliales activadas por citocinas con anticuerpos anti-integrinas.

Fig.1A. *Panel A*, células pre-incubadas con tampón, incubadas con BSA.

Fig.1A. *Panel B*, células pre-incubadas con tampón, incubadas con Tat.

Fig. 1A. *Panel C*, células pre-incubadas con anticuerpos monoclonales CDw49e y CD29, incubadas con Tat.

Fig. 1A. *Panel D*, células pre-incubadas con anticuerpos monoclonales CD51 y CD61, incubadas con Tat.

Fig. 1A. *Panel E*, células pre-incubadas con anticuerpos anti-factor VIII humano (anticuerpos control), incubadas con Tat.

Fig. 1B. Capacidad de la proteína Tat-cys22 (Tat22) purificada para competir en la actividad de transactivación de la proteína Tat tipo natural monitorizada por ensayos cat.

Fig. 2A. Producción de IgG anti-Tat específica en monos vacunados con la proteína Tat, determinada por ensayo inmuno-enzimático (ELISA). Resultados obtenidos en dos monos inoculados subcutáneamente con 10 o 100 μ g de proteína Tat recombinante re-suspendida en 250 μ l de suero autólogo y 250 μ l de RIBI.

Fig. 2B. Producción de IgG anti-Tat específica en monos vacunados con la proteína Tat, determinada por ensayo inmuno-enzimático (ELISA). Resultados para el mono control (M3).

Fig. 3. Titulación de anticuerpos anti-Tat en plasma de monos inoculados con 100 (M1) y 10 (M2) μ g de proteína Tat recombinante, descrita en la Fig. 2A y Fig. 2B.

Fig. 4A. Cartografía de los epítomos Tat reconocidos por la IgG anti-Tat de monos inyectados con 100 (M1) y 10 (M2) μ g de proteína Tat recombinante, descrita en la Fig. 2A y Fig. 2B. Se muestra el promedio de los resultados de plasma diluido 1:50 para cada péptido ensayado por duplicado.

Fig. 4B. Cartografía según la Fig. 4A. Se muestran los títulos de anticuerpos en plasma, expresados como el recíproco de la dilución más alta a la cual el ensayo era todavía positivo.

ES 2 293 700 T3

Fig. 5. Análisis de la respuesta específica de IgM anti-Tat humoral en los monos inoculados con proteína Tat, determinada por ELISA.

Fig. 6. Análisis de la producción específica de IgG anti-Tat en los monos inoculados con proteína Tat, determinada por ELISA.

Fig. 7. Titulación de anticuerpos anti-Tat en el plasma de los monos inoculados con Tat recombinante (10 μ g) en presencia de RIBI (M1-3) o Alum (M4-6) descrita en la Figura 6.

Fig. 8A. Epítomos de Tat reconocidos por la IgG anti-Tat de los monos inoculados como se describe en la figura 6. Los resultados se refieren a muestras diluidas 1:50 y son la media de pocillos duplicados.

Fig. 8B. Epítomos de Tat según la Fig. 8A. Los resultados se refieren a la titulación de plasma mostrada en la Fig. 8A y se expresan como el recíproco de la dilución más alta a la cual el ensayo era todavía positivo.

Fig. 9. Análisis de los CTL específicos de Tat.

Fig. 10. Análisis de la respuesta de retraso de la hipersensibilidad a Tat mediante la prueba de sensibilidad (skin test).

Fig. 11A. Respuesta IgG humoral a Tat en los monos vacunados con DNA de Tat. Se muestran los resultados obtenidos de dos monos vacunados con 200 (M1) y 500 (M2) μ g de plásmido pCV-Tat.

Fig. 11B. Respuesta IgG humoral a Tat en los monos vacunados con DNA de Tat. Resultados para el mono control (M3).

Fig. 12. Titulación de anticuerpos anti-Tat en el plasma del mono M2 inoculado i.d. con 200 μ g de pCV-Tat.

Fig. 13. Análisis de la producción de IgG anti-Tat en tres monos (M9 a M11) inoculados con 1 mg de pCV-Tat y en un mono control (M12), inoculados con 1 mg del vector control pCV-0.

Fig. 14. Cinética de la respuesta proliferativa de las PBMC de *Macaca fascicularis* a la co-estimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 sobre perlas paramagnéticas (perlas anti-CD3/28).

Fig. 15A. Efecto antiviral de la co-estimulación con perlas anti-CD3/28 sobre las PBMC de *Macaca fascicularis*. Mono MK 193.

Fig. 15B. Efecto antiviral de la co-estimulación con perlas anti-CD3/28 sobre las PBMC de *Macaca fascicularis*. Mono MK D91.

Fig. 15C. Efecto antiviral de la co-estimulación con perlas anti-CD3/28 sobre las PBMC de *Macaca fascicularis*. Mono MK 9301.

Fig. 15D. Efecto antiviral de la co-estimulación con perlas anti-CD3/28 sobre las PBMC de *Macaca fascicularis*. Mono MK 9401.

Fig. 16A. Caracterización funcional de las células dendríticas (DC) obtenidas de la sangre periférica de mono. Incorporación de 3 H-timidina el día 4 de cultivo alogénico de leucocitos mixtos (AMLR).

Fig. 16B. Caracterización funcional de las células dendríticas obtenidas de la sangre periférica de mono. Los APC, tales como DC y M ϕ , obtenidas como se indica en la figura 16A, se enfrentaron con linfocitos T de otro mono.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a Tat, como se define en las reivindicaciones, como el principio activo para una vacuna profiláctica y/o terapéutica contra la infección por HIV, la progresión hacia el SIDA y el desarrollo de tumores y otros síndromes y síntomas en sujetos infectados por HIV. La Tat, o Tat tipo natural, está en su forma activa o, más correctamente, en su forma biológicamente activa (como se explica aquí más adelante) como proteína recombinante. Más particularmente, la invención se refiere a una vacuna basada en Tat de HIV-1 como inmunógeno, inoculada como proteína recombinante, sola o en combinación con otros genes o productos génicos virales (Nef, Rev, Gag) o partes de los mismos, o en combinación con diferentes citocinas inmunomoduladoras (IL-12, IL-15) o con el gen que codifica una citocina inmunomoduladora o parte de los mismos. Tat, Nef, Rev, Gag y las citocinas inmunomoduladoras se administran tanto como una mezcla de proteínas recombinantes, péptidos o proteínas de fusión (Tat/Nef, Tat/Rev, Tat/Gag, Tat/IL-12, Tat/IL-15) o como un DNA plásmido.

En la presente descripción "Tat de tipo natural" y "Tat en su forma activa" tienen que ser considerados sinónimos de "Tat biológicamente activa". Por "Tat biológicamente activa" se pretende indicar la proteína que, a concentraciones de picomolares a nanomolares (de 10 ng/ml o menos a 1 μ g/ml, preferiblemente de 0,1 ng/ml a 100 ng/ml) es capaz de:

(i) entrar y localizarse en los núcleos de células endoteliales o células dendríticas activadas, como se mide en el Ejemplo 1A;

(ii) activar la proliferación, migración e invasión de las células del sarcoma de Kaposi (KS) y la proteína de las células endoteliales activadas por citocinas (Ref. 40, 2);

(iii) activar la replicación del virus cuando se añade a células infectadas como se mide a) por el rescate de provirus deficientes en Tat en células HLM-1 después de la adición de proteína exógena (Ref: 41); b) por la transactivación de la expresión del gen HIV-1 en las células transfectadas con un plásmido-proteína promotor-informador de HIV-1 (Ref. 41);

(iv) inducir en ratones el desarrollo de lesiones tipo KS en presencia de factores angiogénicos o citocinas inflamatorias (Ref. 42).

El inventor considera que es fundamental para la Tat biológicamente activa que sea confirmado uno de los puntos (i) o (ii), preferiblemente deben ser confirmados ambos, más preferiblemente el punto (i) o el punto (ii) o ambos en combinación con el punto (iii)a) y/o (iii)b) deben ser confirmados. Los mejores resultados se obtendrán cuando todos los puntos (i) a (iv) son confirmados. Una proteína Tat con estas características es capaz de inducir *in vivo* una respuesta inmunitaria citotóxica y antiviral. De hecho, una Tat biológicamente activa con las características mencionadas antes es capaz de unirse a los receptores específicos de la superficie celular y es absorbida desde estos receptores. La absorción de Tat es esencial para inducir una respuesta citotóxica.

Los estudios previos o en realización, que se refieren al desarrollo de una vacuna basada en Tat, no han utilizado la proteína Tat biológicamente activa con las características mencionadas antes.

Un método para obtener y manejar una Tat biológicamente activa según la presente invención se describe en el Ejemplo 1.

También se describe un método de inmunización utilizando células dendríticas autólogas tratadas *ex vivo* con proteína Tat recombinante, o péptidos de la misma, sola o con una mezcla de proteínas o péptidos recombinantes (Tat, Nef, Rev, Gag) o con la proteína Tat y una o más citocinas inmunomoduladoras, o partes de las mismas, o transducida con vectores eucarióticos que contienen el gen *tat* solo o en combinación con genes virales que codifican Nef, Gag o Rev, o *tat* y el gen que codifica una citocina inmunomoduladora o parte del mismo.

Se describen también estrategias para inducir una respuesta inmunitaria al nivel mucosal. La Tat, sola o en combinación con proteínas virales y/o citocinas, es inoculada a nivel mucosal para aumentar e inducir la respuesta inmunitaria local. La proteína Tat de HIV-1 se utilizará también para la inmunización *ex vivo* de los linfocitos CD4+ y CD8+ aislados de la sangre periférica de sujetos infectados. Las células específicas del antígeno Tat se expandirán entonces *in vitro* por co-estimulación con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD3 y CD28 y se volverán a infundir. Finalmente, se describe también el uso de mutantes de Tat, identificados en los ejemplos, para ser utilizados como inmunógenos, como una alternativa a la Tat de tipo natural. Los mutantes de Tat son i) en la región de cisteína (cys22) y ii) en la región central (lys41), iii) el mutante con la secuencia RGD delecionada; iv) el doble mutante con lisina 41 y RGD delecionadas. Alternativamente al uso de mutantes Tat o péptidos Tat (tipo natural o mutados como la proteína) en el caso de la vacunación terapéutica, se utilizarán inhibidores de la replicación viral junto con el inmunógeno.

A este respecto, como "inhibidores de la replicación viral" se entienden todas las moléculas conocidas actualmente, o las que serán descubiertas en el futuro (inhibidores nucleósidos y no nucleósidos de la transcriptasa reversa, inhibidores de la proteasa, RNA antisentido y, en general, todas las moléculas capaces de bloquear la expresión del gen de HIV) capaces de reducir o bloquear la replicación de HIV. Como se ha dicho previamente, se describen diferentes métodos de inmunización, que utilizan la proteína Tat, los péptidos y DNA de Tat en asociación con otros genes o proteínas virales, o parte de los mismos, o citocinas inmunomoduladoras o genes que codifican las citocinas inmunomoduladoras, o parte de ellos. Por "parte de ellos" se entienden segmentos de genes o de proteínas, descritos antes, cuya eficacia para inducir los mismos efectos inmunogénicos del gen o proteína completos está demostrada. Además, puesto que es conocida la eficacia de los adyuvantes en las estrategias de vacuna, la presente invención se refiere al uso de adyuvantes conocidos y de los que serán descubiertos en el futuro, administrados conjuntamente con Tat (proteína o DNA) y con combinaciones de Tat y otros genes o proteínas virales o celulares. Similarmente, se plantea como hipótesis la eficacia de diferentes sistemas de administración de Tat (proteína o DNA) y combinaciones de Tat y otros genes o proteínas virales o celulares para inducir una respuesta inmunitaria tanto sistémica como local frente a Tat (inmunización mucosal).

Los resultados obtenidos por el inventor (no publicados), indican que solamente la proteína Tat, en su forma biológicamente activa, es capaz de unirse a receptores celulares específicos y entrar en la célula. Esta característica es la base de la respuesta inmunitaria de las células suplementarias y de las células inmunes más en general y, según el inventor, tiene una importancia fundamental para inducir una respuesta inmunitaria mucho más fuerte que la que es capaz de provocar la proteína inactivada. En conclusión, a diferencia del uso de la Tat inactivada como inmunógeno, propuesto por algunos científicos, el inventor intenta utilizar la Tat de HIV-1 en su forma biológicamente activa, con el fin de inducir una respuesta inmunitaria muy fuerte contra HIV, capaz de evitar la infección o el desarrollo de la enfermedad y de permitir estrategias terapéuticas eficientes en los individuos infectados por HIV-1. Según el inventor, la vacuna

se puede administrar por vía sistémica (intramuscular, i.d., subcutánea, etc.) o por vía local (mucosal). Se prefiere la última vía cuando se utilizan bacterias (véase más adelante) como sistemas de administración. Se puede producir la vacuna como sigue. Se puede preparar Tat según el Ejemplo 1, se puede liofilizar y conservar. En el momento del uso, se puede resuspender en un fluido biológicamente aceptable, tal como suero, plasma, o sus fracciones.

Las células transformadas, que comprenden un vector que expresa Tat, o partes del mismo, como se ha descrito previamente, y las células que se cultivan para expresar la proteína Tat, que serán aisladas para el uso, están todas incluidas en el alcance de la presente patente.

Es la intención que todas las variantes de Tat (incluyendo todos los tipos y subtipos de cepas HIV), con actividad análoga o mayor que las descritas anteriormente, estén incluidas en esta invención.

La presente invención será descrita ahora por medio de sus ejemplos específicos ilustrativos y no restrictivos, en los cuales se hará referencia a las figuras adjuntas.

Descripción detallada de las figuras

Fig. 1A. Inhibición de la absorción de proteína Tat rodaminada a 10 ng/ml mediante preincubación de células endoteliales activadas por citocinas con anticuerpos anti-integrinas. Se pre-incubaron células de la vena umbilical humana (HUV) activadas con citocina, tratadas como se describe en la leyenda de la Tabla 2A, en medio libre de suero que contiene tampón o anticuerpos y se incubaron después durante 15 minutos a 37°C con 10 ng/ml de Tat rodaminada o BSA rodaminada.

Panel A, células pre-incubadas con tampón, incubadas con BSA.

Panel B, células pre-incubadas con tampón, incubadas con Tat.

Panel C, células pre-incubadas con los anticuerpos monoclonales CDw49e (anti- $\alpha 5$) y CD29 (anti- $\beta 1$), incubadas con Tat.

Panel D, células pre-incubadas con los anticuerpos monoclonales CD51 (anti- αv) y CD61 (anti- $\beta 3$), incubadas con Tat.

Panel E, células pre-incubadas con anticuerpos anti-factor VIII humano (anticuerpos control), incubadas con Tat.

Fig. 1B. Se muestra la capacidad de la proteína Tat-cys22 (Tat22) purificada para competir en la actividad de transactivación de la proteína Tat tipo natural monitorizada por ensayos cat. Las células H3T1, que contienen el gen informador LTR-CAT de HIV-1 (Ref. 148), se incubaron con proteína Tat tipo natural (100 ng), sola o en presencia de un exceso molar de proteína Tat-cys22 (1 μ g). La actividad de transactivación de LTR de HIV-1 de la Tat y la capacidad de la proteína Tat-cys22 de competir con la Tat tipo natural han sido determinadas a las 48 h después de la transfección mediante la determinación de la actividad cat en extractos citoplásmicos (que corresponden a 200 μ g de proteína), como se ha descrito (Ref. 41). Se indican los porcentajes (%) en acetilación de 14 C-cloranfenicol.

Fig. 2. Producción de IgG específica anti-Tat en monos vacunados con la proteína Tat, determinada por ensayo inmuno-enzimático (ELISA). (A) muestra los resultados obtenidos en dos monos inoculados subcutáneamente con 10 o 100 μ g de proteína Tat recombinante re-suspendida en 250 μ l de suero autólogo y 250 μ l de RIBI; (B) muestra los resultados para el mono control (M3). Los monos fueron inoculados al tiempo 0 y después a las 2, 5, 10, 15, 22, 27, 32 y 37 semanas. Los anticuerpos anti-Tat se evaluaron también en la semana 41 en el mono M2, inoculado con 10 μ g de proteína Tat, y en el mono M3.

La presencia de los anticuerpos anti-Tat en el plasma de los animales vacunados se evaluó por ELISA preparado y caracterizado como sigue. La proteína Tat fue adsorbida en placas de PVC de 96 pocillos (100 ng/pocillo) en 200 μ l de tampón carbonato 0,05 M pH 9,6 durante 12 h a 4°C. Después de 3 lavados con PBS 1x sin Ca^{++} ni Mg^{++} (PBS-A) que contenía Tween 20 (0,05%), se añadió el plasma diluido 1:50 en 200 μ l de tampón carbonato (por duplicado) y se incubaron las placas a 37°C durante 90 min. Se lavaron después los pocillos con PBS-A 1x/Tween 0,05%, seguido por la adición de 100 μ l del anticuerpo secundario (diluido 1:1000 en PBS-A 1x/Tween 0,1%/BSA 1%) conjugado con peroxidasa de rábano, durante 90 min a temperatura ambiente. Después de 5 lavados de los pocillos, se añadieron 100 μ l de sustrato (ABTS 1 mM, Amersham) durante 30-45 min a temperatura ambiente. Se realizó la lectura en el espectrofotómetro (405 nm). Cada ensayo ELISA incluía un suero policlonal anti-Tat de conejo (control positivo) diluido 1:200 a 1:6400, y el plasma preinmune (control negativo) diluido 1:50. Se calculó el valor del punto de corte como la media de las densidades ópticas (O.D.) del plasma del mono negativo +3 desviaciones estándar (S.D.), obtenida en todos los experimentos con el plasma preinmune. Los resultados mostrados son la media de pocillos duplicados. Un valor $>2,7$ indica que los valores de la densidad óptica estuvieron fuera de escala.

Fig. 3. Titulación de anticuerpos anti-Tat en el plasma de monos inoculados con 100 (M1) y 10 (M2) μ g de proteína Tat recombinante, descrita en la Fig. 2.

Se llevaron a cabo ensayos Elisa como se describe en la figura 2 y se ensayó el plasma (por duplicado) a diluciones en escala de 1:50 a 1:25.600.

Los valores en el eje de ordenadas representan la inversa de la dilución más alta de plasma a la que el ensayo era todavía positivo. Se calculó el valor del punto de corte para cada dilución y correspondió a la O.D. media del plasma preinmune de todos los monos en todos los experimentos, + 3 S.D.

Fig. 4. Cartografía de los epítomos Tat reconocidos por la IgG anti-Tat de los monos inyectados con 100 (M1) y 10 (M2) μ g de proteína Tat recombinante, descrita en la Fig. 2. Para la cartografía del epítopo se realizaron ensayos Elisa usando 8 péptidos sintéticos que corresponden a aminoácidos Tat (aa) 1-20, 21-40, 36-50, 46-60, 52-72, 56-70, 65-80, 73-86. Cien microlitros de cada péptido (10 μ g/ml en PBS-A/0,1% de BSA) fueron absorbidos sobre una placa de PVC de 96 pocillos durante 12 horas a 4°C. Se lavaron después las placas y se incubaron con 100 μ l de PBS-A/3% de BSA durante 2 horas a 37°C. Después de incubación, se lavaron las placas con PBS-A/0,05% de Tween 20 y después se añadieron a cada pocillo 50 μ l de plasma, diluidos con PBS-A y BSA al 3%. Se continuaron entonces los ensayos Elisa como se describe en la figura 2. Se obtuvieron los plasmas en la semana 37 después de la inmunización primaria. Los valores del punto de corte calculados para cada péptido y para cada dilución de plasma, corresponden a la O.D. media del plasma preinmune en todos los experimentos + 3 S.D. (A) muestra los resultados medios de plasma diluido 1:50 para cada péptido ensayado por duplicado; (B) muestra los títulos de anticuerpos del plasma mostrado en (A), expresados como el recíproco de la dilución más alta a la cual el ensayo era todavía positivo.

Fig. 5. Análisis de la respuesta específica de IgM anti-Tat en los monos inoculados con Tat y determinada por ELISA. Se inocularon tres monos (M1-3) subcutáneamente con 10 μ g de proteína Tat recombinante re-suspendida en 250 μ l de suero autólogo y 250 μ l de RIBI; se inocularon 3 monos (M4-6) subcutáneamente con 10 μ g de proteína Tat recombinante re-suspendida en 250 μ l de suero autólogo y 250 μ l de Alum; se inocularon 2 monos control subcutáneamente con RIBI (250 μ l y 250 μ l de suero autólogo) (M7) o con Alum (250 μ l y 250 μ l de suero autólogo) (M8). Se inocularon los monos al tiempo 0 y después a las 2, 6, 11 y 15 semanas. Se investigó la presencia de anticuerpos a las 2, 6, 11 y 15 semanas. El método ELISA se describe en la fig. 2. En este caso el plasma de los animales se ensayó (por duplicado) a dilución 1:100 y se usó un suero anti-mono IgM de cabra (diluido a 1:1000) conjugado con peroxidasa con rábano como el anticuerpo secundario.

Se calculó el valor del punto de corte como la media (+2 S.D.) de los valores O.D. del plasma preinmune. Los resultados son la media de los valores O.D. (a 405 nm) de dos pocillos a los que se ha restado el valor del punto de corte (Δ O.D. 405).

Fig. 6. Análisis de la producción específica de IgG anti-Tat en los monos inoculados con Tat, determinada por ELISA. Se inocularon tres monos (M1-3) con 10 μ g de proteína Tat recombinante re-suspendida en 250 μ l de suero autólogo y 250 μ l de RIBI; se inocularon 3 monos (M4-6) con 10 μ g de proteína Tat recombinante re-suspendida en 250 μ l de suero autólogo y 250 μ l de Alum; se inocularon 2 monos control con RIBI (250 μ l y 250 μ l de suero autólogo) (M7) o con Alum (250 μ l y 250 μ l de suero autólogo) (M8). Se inocularon los monos al tiempo 0 y después a las 2, 6, 11, 15, 21, 28 y 32 semanas. En la semana 36, se inocularon los monos M1 a M6 con 16 μ g de proteína Tat resuspendida en 200 μ l de ISCOMs y 300 μ l de PBS. Se evaluaron también los anticuerpos en las semanas 40 y 44. El método ELISA y el valor del punto de corte se describen en la fig. 2. Los resultados mostrados se refieren a muestras diluidas 1:50. Un valor >2,7 indica que el valor de la densidad óptica estaba fuera de escala.

Fig. 7. Titulación de anticuerpos anti-Tat en el plasma de los monos inoculados con Tat recombinante (10 μ g) en presencia de RIBI (M1-3) o Alum (M4-6) descritos en la Figura 6. Los resultados se muestran para cada plasma como la inversa de la dilución más alta de suero a la que el ensayo era todavía positivo.

Fig. 8. Epítomos de Tat reconocidos por IgG anti-Tat de los monos inoculados con proteína Tat recombinante (10 μ g) en la presencia de RIBI (M1 a M3) o Alum (M4 a M6), descritos en la figura 6. Se obtuvieron los plasmas en la semana 21 después de la inmunización primaria. El método ELISA y la determinación del punto de corte se describen en la figura 4. Los resultados en (A) se refieren a muestras diluidas 1:50 y son la media de pocillos duplicados. Los resultados en (B) se refieren a la titulación de plasma mostrada en (A) y se expresan como el recíproco de la dilución más alta a la cual el ensayo era todavía positivo.

Fig. 9. Análisis de CTL específicos de Tat. Se realizó el ensayo como se describe en la Tabla 5. Se muestra un ejemplo en la semana 36 para el mono M1, inyectado subcutáneamente con 10 μ g de Tat y RIBI como se describe en figura 6. Los cuadrados (control) corresponden a las células incubadas con células objetivo BLCL no pulsadas; los rombos corresponden a las células incubadas con las células objetivo BLCL pulsadas con Tat (1 μ g/250.000 células).

Fig. 10. Análisis de la respuesta de retraso de la hipersensibilidad a Tat mediante la prueba de sensibilidad (skin test). La proteína Tat (5, 1 y 0,2 μ g), re-suspendida en 150 μ l de PBS que contiene 0,1% de BSA o el tampón en el que estaba resuspendida la Tat se inocularon intradérmicamente (i.d.) en un área afeitada de la espalda del animal. Se fotografió el área al tiempo 0 y después a las 24, 48 y 72 horas. Los monos control se inocularon solamente con tampón. Se muestra un ejemplo de mono M2 (semana 15), inoculado con 10 μ g de Tat y RIBI, descrito en la Fig 6. La reacción positiva a Tat fue evidente a las 48 horas después de la prueba de sensibilidad (skin test).

Fig. 11. Respuesta IgG humoral a Tat en un mono (M1) inoculado i.d. con 200 μ g del plásmido pCV-Tat resuspendido en 150 μ l de PBS-A, en dos sitios próximos a los nódulos linfáticos axilares; se inyectó un mono (M2) con 500 μ g de pCV-Tat, resuspendido en 250 μ l de PBS-A, intramuscularmente en dos sitios de la espalda; el mono control (M3) no fue inoculado con DNA de Tat pero recibió, como un control de especificidad, repetidas pruebas de sensibilidad (skin tests) con Tat. Se inyectaron los monos con pCV-Tat al tiempo 0 y después a las 5, 10, 15, 22, 27, 32 y 37 semanas. Finalmente, después de 42 semanas, los monos recibieron dosis de refuerzo con proteína Tat recombinante (16 μ g) resuspendida en 200 μ l de ISCOMs y 300 μ l de PBS. Se evaluaron los anticuerpos a las semanas 2, 5, 10, 15, 22, 27, 32, 37, 42, 48 y 58. Se analizó la respuesta de anticuerpos anti-Tat en plasma (diluido 1:50) por Elisa como se describe en figura 2. Los resultados son la media de las OD de pocillos duplicados. (A) muestra los resultados obtenidos de los dos monos vacunados con 200 (M1) y 500 (M2) μ g de plásmido pCV-Tat. (B) muestra los resultados del mono control (M3).

Fig. 12. Titulación de anticuerpos anti-Tat en el plasma del mono M2 inoculado i.d. con 200 μ g de pCV-Tat. El ensayo Elisa se describe en la figura 2. Los resultados en el eje de ordenadas se expresan como el recíproco de la dilución más alta a la que el ensayo era todavía positivo.

Fig. 13. Análisis de la producción de IgG anti-Tat en tres monos (M9 a M11) inoculados con 1 mg de pCV-Tat y en un mono control (M12), inoculado con 1 mg del vector control pCV-0. Se resuspendió el DNA en 1 ml de PBS-A y se inyectó intramuscularmente en dos sitios de la espalda. Se inocularon los monos al tiempo 0 y después a las 6, 11, 15, 21, 28 y 32 semanas. En la semana 36, los monos M9 a M11 recibieron una dosis de refuerzo con 16 μ g de proteína Tat recombinante resuspendida en 200 μ l de ISCOMs y 300 μ l de PBS. Se evaluó la presencia de anticuerpos anti-Tat a las semanas 2, 6, 11, 15, 21, 28, 32, 36, 40 y 44. El ensayo Elisa y la determinación del punto de corte se describen en la figura 2.

Fig. 14. Cinética de la respuesta proliferativa de PBMC de *Macaca fascicularis* a la co-estimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 sobre perlas paramagnéticas (perlas anti-CD3/28). Las PBMC fueron agotadas de la sub-población CD8-positiva por métodos inmuno-magnéticos. Después, la mitad de los linfocitos agotados de anti-CD8 se estimularon con PHA e IL-2 (40 U/ml) empezando el día 3; se dejó que la parte restante se adhiriera sobre las perlas recubiertas con anticuerpos anti-CD3/28, obteniendo de este modo una población de linfocitos CD8-agotados y CD3/28-positivos. Se añadió IL-2 (40 U/ml) a esta fracción celular empezando el día 10 de cultivo. Se contaron las células y se determinó su viabilidad cada 2-3 días. La relación perlas:células se mantuvo constante. Se indica el número de células a diferentes puntos de tiempo.

Fig. 15. Efecto antiviral de la co-estimulación con perlas anti-CD3/28 sobre las PBMC de *Macaca fascicularis*. Los linfocitos CD8-agotados y CD8-agotados CD3+/CD28+ obtenidos de 4 monos (Figuras 15A a 15D) por los métodos descritos en la Figura 14, fueron estimulados como se describe en el ejemplo 7. Las dos fracciones fueron infectadas *in vitro* el día 0 con M.O.I. (multiplicidad de infección) de 0,1 de SIVmac251/63M. Se realizó la estimulación con PHA e IL-2, añadidos desde el día 3, y con las perlas anti-CD3/28 sin la adición de IL-2 exógena. Se evaluó la producción viral determinando los niveles de p27 (ng/ml) en los sobrenadantes celulares los días 6 y 12 después de la infección como se describe en el ejemplo 7. (En gris claro PHA+IL-2, en gris oscuro perlas anti-CD3/28 sobre PBMC CD8-/CD3+/CD28+).

Fig. 16. Caracterización funcional de las células dendríticas (DC) obtenidas de sangre periférica de mono. (A) incorporación de 3 H-timidina el día 4 de cultivo alogénico de leucocitos mixtos (AMLR) para comparar la función presentadora de antígeno (APC, determinada como la inducción de proliferación de células T alogénicas) de las DC y los macrófagos (M ϕ) obtenidos de PBMC de *Macaca fascicularis* después de separación con gradiente de Percoll y adherencia sobre plástico. Se separaron las células no adherentes y las células adherentes fueron inducidas a madurar en las DC añadiendo GM-CSF (200 ng/ml) e IL-4 (200 unidades/ml) cada 3 días. Se separó la mitad del medio de cultivo (RPMI, 10% de FCS) y se sustituyó con medio fresco cada 3 días. Después de 6-7 días se observó un cambio morfológico de las células inducidas por citocinas, que adquirieron un fenotipo DC típico (pérdida de adherencia, agregación, *spines*), verificado también determinando los marcadores de membrana típicos (no se muestran datos). Los monocitos no fueron inducidos por las citocinas y fueron cultivados en el mismo medio, que era reemplazado cada 3 días. Las células mantuvieron las características de los monocitos-macrófagos, tales como la adherencia. El día 7 ambas poblaciones de células se enfrentaron con los linfocitos T de un donante de sangre humano, se purificaron por gradiente de Ficoll y Percoll y por adherencia y después se congelaron. Se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular en una placa de 48 pocillos. Se estimularon quinientos mil linfocitos T con 5000 DC o M ϕ (relación T:APC = 100:1). Se mantuvo el cultivo durante 4 días y se transfirieron alícuotas fijas de la suspensión celular a placas de 96 pocillos, por triplicado. Se añadió entonces 1 μ Ci de 3 H-timidina durante 16 horas, y se determinaron las cuentas por minuto (cpm) del precursor incorporado con un contador β .

(B) Las APC, tales como DC y M ϕ , obtenidas como se detalla en la figura 16A, se enfrentaron con linfocitos T de otro mono, obtenidos como se ha indicado antes para el donante humano. La mayor capacidad para presentar el antígeno es una característica típica de las DC en comparación con los M ϕ . Señalaron las APC en concentraciones a escala a los linfocitos T con el fin de evaluar las respuestas proliferativas obtenidas a diferentes relaciones T:APCs (DC o M ϕ).

Los siguientes ejemplos deben ser considerados ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Expresión, purificación y caracterización de la proteína Tat de tipo natural (aislado IIIB), proteínas Tat mutadas y péptidos Tat de tipo natural

Se han encontrado muchas dificultades en el pasado para purificar y mantener la actividad biológica de la proteína Tat debido a su facilidad para oxidarse, agregarse y perder actividad. Esto es debido a las grandes cantidades de residuos de cisteína que pueden formar enlaces intra- e inter-moleculares, modificando de este modo la conformación de la proteína originaria (Ref. 159, 41). Para la expresión de la proteína en *E. coli* se ha usado el cDNA o el gen *tat* (Seq. 1, ejemplo 2), que ha sido clonado en el vector pL-syn, proporcionado por Dr. J. F. DeLamarter and B. Allet (Glaxo Institute for Molecular Biology S.A., Ginevra, Svizzera).

Con el fin de alcanzar una inmunización eficiente con Tat para propósitos de vacuna, el inventor considera fundamental obtener una proteína Tat biológicamente activa como se describe en la sección "Descripción detallada de la invención". Por tanto, los métodos de producción y purificación de Tat, descritos en este ejemplo y en los ejemplos siguientes 1B, 2 y 3, describen los procedimientos y controles necesarios para obtener una proteína Tat biológicamente activa, que es un inmunógeno eficaz para proteger de la infección por HIV, del SIDA o del desarrollo de enfermedades relacionadas con el HIV.

Un primer método que se usó en esta invención para obtener una proteína activa, se basó en etapas sucesivas de cromatografía de líquidos de alta presión y cromatografía de líquidos y de intercambio iónico (Ref. 15, 41). La proteína obtenida por estos métodos tiene más del 95% de pureza y es activa (Ref. 41, 42).

Sin embargo no se obtuvo una buena reproducibilidad lote a lote, debido a la oxidación de la proteína, que es el principal problema en las preparaciones comerciales de Tat. Debido a las observaciones de esta invención de que la región básica de la proteína Tat tiene una fuerte afinidad por la heparina y que la heparina evita su oxidación, se utilizó la cromatografía de afinidad con heparina y se definió un nuevo protocolo de purificación de Tat, como está descrito por Chang *et al.*, (Ref. 26). Se sonicaron las células (10 g en peso) de *E. coli* que expresan Tat en 40 ml de tampón de lisis (fosfato disódico 20 mM, pH 7,8; glicerol al 2,5%; PMSF 0,2 mM; DTT 5 mM; manitol 50 mM; ácido ascórbico 10 mM; NaCl 500 mM) usando un Ultrasonic Liquid Processor (Model XL2020, Heat System Inc) con tres descargas, de 20 segundos cada una. Se centrifugó el lisado a 12.000 g durante 30 min y se incubó el sobrenadante durante una hora a temperatura ambiente con 2 ml de resina heparina-sefarosa, pre-lavada con el tampón de lisis. Se cargó la resina sobre una columna de vidrio y se lavó con el tampón de lisis hasta que la proteína no fue detectable en el medio de lavado. Se eluyó el material unido con el tampón de lisis que contenía NaCl 2 M y se recogió el eluato en fracciones de 1 ml. Se analizó la homogeneidad de la proteína eluida por electroforesis en gel (SDS-PAGE). La proteína purificada se almacenó liofilizada a -70°C y se resuspendió en un tampón desgasificado antes de su uso.

La actividad biológica de la proteína Tat purificada, según el protocolo anterior, se evaluó por un ensayo de "rescate" de la infección viral en células HLM-1, derivadas de células HeLa-CD4+, que contienen provirus defectuosos en el gen *tat*, obtenidas y descritas por Sadaie *et al.* (Ref. 140). El ensayo de "rescate" de la infección viral, descrito por En-soli *et al.* (Ref. 41), consistió en complementar la falta de expresión de Tat en las células HLM-1 (2×10^5) con la adición de proteína Tat exógena (2 µg/ml) y en evaluar la replicación viral mediante la determinación del antígeno p24 liberado en el medio de cultivo 48 horas después de la adición de la proteína Tat exógena mediante kits comerciales. Los resultados de los experimentos de "rescate", descritos por Chang *et al.* (Ref. 26), demuestran que la proteína Tat, purificada con este método, es activa y que este método de purificación es mejor, más fácil y menos costoso tanto para la pureza como para la actividad biológica de Tat en comparación con los métodos descritos previamente (Ref. 40, 41, 42).

Diferentes preparaciones de Tat recombinante, purificada como se ha descrito antes, se inocularon en presencia de adyuvante de Freund a ratones y conejos, según protocolos estándar (Ref. 4). Los resultados de la respuesta de anticuerpos inducida por la inmunización se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Análisis de la respuesta de anticuerpos específicos anti-Tat en suero de ratones y conejos inmunizados con la proteína Tat recombinante

Anticuerpo anti-Tat	OD-ELISA/Tat			Transferencia Western
	1:500	1:1000	1:2000	
Conejo	0,651	0,400	0,175	+
Ratón	0,502	0,240	0,150	+

Se utilizó la proteína Tat recombinante producida en *E. coli* para inmunizar ratones y conejos según protocolos de inmunización estándar (Ref. 4). Se analizaron los sueros de los animales inmunizados por ELISA para determinar la presencia de anticuerpos anti-Tat usando tres diluciones del suero (1:500 a 1:2000). Los resultados son la media de las lecturas a 405 nm de dos conejos y tres ratones. Además, se analizaron los sueros por transferencia Western con la proteína Tat recombinante (100 ng).

ES 2 293 700 T3

Los resultados de la Tabla 1 demuestran que la Tat recombinante, preparada en esta invención, fue capaz de inducir una respuesta de anticuerpos en ambas especies animales, como se determina con ELISA y transferencia Western que utiliza la proteína Tat recombinante. Dichos anticuerpos fueron capaces de inhibir la internalización y las actividades biológicas de Tat (Ref. 40. 41. 42). El vector pL-syn y el protocolo de purificación de la proteína Tat se usan para expresar y purificar los mutantes de Tat descritos en el Ejemplo 2. La actividad biológica de las proteínas Tat mutadas y purificadas se mide por ensayos de "rescate" de la infección viral en células HLM-1, ensayos de proliferación de células KS y en ratones *in vivo*, como se ha descrito antes para la proteína Tat de tipo natural. Además, las proteínas Tat mutadas se analizan en la presencia de Tat de tipo natural (a concentraciones en serie) para verificar el efecto transdominante negativo sobre la replicación viral. El vector pL-syn y el protocolo de purificación se usan para expresar y purificar proteínas de fusión de este tipo: Tat (tipo natural o sus mutantes)/IL-12 o Tat (tipo natural o sus mutantes)/IL-15 o partes de la misma o Tat (tipo natural o sus mutantes)/otras moléculas (o partes de las mismas) capaces de mejorar la respuesta inmunitaria a Tat sola o asociada con otros productos virales. Se preparan moléculas de fusión recombinantes utilizando las secuencias y los cebadores descritos en los ejemplos 2 y 3. Como una alternativa, se utilizan como inmunógenos, péptidos sintéticos, que corresponden a regiones de Tat o de otros productos virales o de citocinas a ser usadas en combinación con Tat. Las secuencias peptídicas de Tat son:

Pep. 1.	MEPVDPRLEPWKHPGSQPKT	(Seq ID No 11)
Pep. 2.	ACTNCYCKKCCFHCQVCFIT	(Seq ID No 12)
Pep. 3.	QVCFITKALGISYGRK	(Seq ID No 13)
Pep. 4.	SYGRKKRRQRRPPQ	(Seq ID No 14)
Pep. 5.	RPPQGSQTHQVSLSKQ	(Seq ID No 15)
Pep. 6.	HQVSLSKQPTSQSRGD	(Seq ID No 16)
Pep. 7.	PTSQSRGDPTGPKE	(Seq ID No 17)

Los péptidos mutantes de Tat contendrán las mismas sustituciones de aminoácidos de las proteínas Tat mutadas, descritas en el Ejemplo 2. Los péptidos serán utilizados en combinación con el péptido que representa el epítipo T ayudador universal del toxoide tetánico o con otros péptidos que representan epítopos T ayudadores (Ref. 77).

Ejemplo 1A

La absorción de concentraciones picomolares (10 a 100 ng/ml) de Tat biológicamente activa por células endoteliales activadas es mediada por los receptores de integrinas

Cuando se activan células endoteliales normales *in vitro* con citocinas inflamatorias, se convierten en respondedoras para los efectos de la Tat extracelular y esto es debido a la inducción de las integrinas $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha\nu\beta_3$ (Ref. 9, 10). Similarmente, las citocinas inflamatorias (IC) o el bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico) aumentan la expresión de las integrinas en las células endoteliales *in vivo* y esto lleva a un efecto sinérgico que estimula el KS cuando se inocula una Tat biológicamente activa en ratones simultáneamente o después del bFGF (Ref. 42). En adición, las células endoteliales activadas por IC adquieren la función APC.

En este ejemplo se muestra que las células endoteliales activadas con IC absorben la proteína Tat rodaminada biológicamente activa más eficientemente y que esto está mediado por los receptores de integrinas.

Debido a la dificultad de observar la internalización de concentraciones muy bajas de la crio-Tat, se marcó la proteína con rodamina (Ref. 98). La Tat rodaminada todavía mostró la activación de la proliferación de células de KS en el mismo intervalo de concentración que la Tat no marcada, lo que indica que el procedimiento de marcado no puso en peligro su función biológica. Se realizaron experimentos de absorción de Tat como sigue: se cultivaron células de la vena umbilical humana (HUVE) y se trataron durante 5 días con IC como se ha descrito (Ref. 9, 46). Se tripsinaron entonces las células, se extendieron en placas de 8 pocillos (Nunc Inc., Naperville, IL) a $0,5 \times 10^5$ células por pocillo y se incubaron durante 18 horas en medio que contiene 15% de suero fetal bovino (FBS), en presencia de IC. Se añadieron medios libres de suero (SF, RPMI, 1% de BSA, 0,1% de antibióticos, fungizon) y se pre-incubaron las placas durante 2 h a 4°C. Se añadió a las células medio fresco, que contenía una dilución en serie de Tat rodaminada, y se incubaron las células a 37°C durante el tiempo indicado. Los controles negativos fueron BSA rodaminada en el mismo tampón que Tat. Se fijaron las células en acetona-metanol (1:1) enfriado en hielo y la absorción y localización de Tat se visualizó y fotografió usando un microscopio de fluorescencia. Se evaluaron los resultados comparando la fluorescencia de las muestras con el control negativo y se puntuaron de 0 a ++++ sobre la cantidad de absorción sin conocimiento previo del código de la muestra.

Para investigar las rutas por las que Tat es absorbida por las células endoteliales activadas, se realizaron experimentos usando células HUVE activadas con un amplio intervalo de concentraciones de Tat exógena, tales como las previamente usadas para inducir el crecimiento de las células HUVE o KS (10-50 ng/ml), o la transactivación de HIV-1 añadiendo la proteína a las células que llevan el promotor de HIV-1 o el provirus (0,5 a 1 µg/ml).

En estos experimentos, por consistencia con los experimentos de inhibición de la absorción (véase más adelante), se pre-incubaron las células a 4°C durante 2 horas con medio que carecía de suero fetal de ternera. Esta pre-incubación no afecta a la subsiguiente absorción de Tat rodaminada.

Con la Tat rodaminada, la absorción y translocación de la proteína al núcleo o nucleolos de las células HUVE activadas empezó a ser evidente antes de 15 minutos de incubación con una cantidad de Tat rodaminada tan baja como 10 ng/ml. La densidad de Tat absorbida en las células aumentó de una manera dosis-dependiente y tiempo-dependiente. Ni la BSA rodaminada ni el tampón presentaron señales y fueron usados rutinariamente como negativos controles.

Para determinar si la absorción de Tat por las células HUVE activadas estaba mediada por las mismas integrinas que se encontraron expresadas en las células KS, se realizaron experimentos de inhibición pre-incubando las células endoteliales activadas con IC con crio-Tat (competidor), los ligandos fisiológicos para estos receptores tales como fibronectina (FN) o vitronectina (VN), o pre-incubando las células con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las regiones de unión RGD de los receptores $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha v\beta_3$. Se detalla brevemente el procedimiento experimental. Después de extendidas en placas de 8 pocillos, las células HUVE se incubaron con medio que contenía 15% de FBS durante 18 h y después se incubaron con medio SF que contenía Tat no marcada (crio-competidor) (Tabla 1A), FN, VN (Tabla 1B), o anticuerpos monoclonales dirigidos contra la secuencia de unión RGD de los receptores FN o VN ($\alpha_5\beta_1$ y $\alpha v\beta_3$, respectivamente), o anticuerpos monoclonales dirigidos contra el factor VIII humano (anticuerpos control) (Fig. 1A) durante 2 h a 4°C. Se incubaron entonces las células con Tat rodaminada durante los periodos de tiempo indicados. El control consistió en células tratadas con medio SF solo durante 2 h a 4°C e incubadas con BSA rodaminada. Se fijaron las células, se visualizaron, se fotografiaron y los resultados se puntuaron como se ha indicado antes.

TABLA 1A

Inhibición de la absorción de 100 ng/ml y 1 µg/ml de Tat rodaminada por las HUVE activadas por citocinas mediante la pre-incubación de las células con 1 µg/ml de Tat no marcada^a

Pre-incubación	Tat rodaminada	Absorción de Tat
Medio libre de suero	100 ng/ml	+++
1 µg/ml de Tat no marcada	100 ng/ml	+/-
Medio libre de suero	1 µg/ml	++++
1 µg/ml de Tat no marcada	1 µg/ml	+/-

^a Las células HUVE se cultivaron como se ha descrito previamente (Ref. 40). Se obtuvieron IC a partir de células T CD4+ transformadas por el virus T-linfotrófico tipo-II humano (HTLV-II) o células T estimuladas por fitohemaglutinina y se utilizaron los sobrenadantes (1:8) para activar las células HUVE (pases 8-14) durante 5 días como se ha descrito previamente (Ref. 9, 46). Este sobrenadante contiene interleucina-1 α (IL-1 α) y - β (IL-1 β), factor- α y factor- β de necrosis tumoral (TNF- α) y (TNF- β), e interferón- γ (IFN- γ), (Ref. 9).

La proteína Tat fue rodaminada en los residuos de lisina esencialmente como se ha descrito (Ref. 98). Brevemente, 50 µg de Tat recombinante (2 mg/ml), se llevaron a pH 9,0 mediante la adición de 2,5 µl de Na₂CO₃ 1 M. Se añadieron 2,5 µl de TRITC a 1 mg/ml en dimetilsulfóxido (DMSO) y se dejó que la reacción se llevara a cabo durante 8 h a 4°C. Se sofocó el TRITC sin reaccionar por la adición de 2,5 µl de NH₄Cl 0,5 M, se redujo el pH a 7,0, usando HCl 1 M, y se dializó la Tat rodaminada frente a dos cambios de Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, ditiotreitól (DTT) 1 mM para separar la TRITC sofocada. Se utilizaron como controles negativos BSA o PBS, rodaminados del mismo modo. La Tat rodaminada se analizó en cuanto a la actividad de crecimiento de células KS-SIDA como se ha descrito para asegurar que se mantenía la actividad biológica (Ref. 40).

Se pre-incubaron las células HUVE durante 2 horas con medio libre de suero o 1 µg/ml de Tat sin marcar en medio libre de suero, se incubaron con 100 ng/ml o 1 µg/ml de Tat rodaminada durante 60 minutos y se visualizó la absorción de Tat por microscopio de fluorescencia. Se preincubaron los controles negativos (+/- absorción) con medio libre de suero, seguido por incubación con BSA rodaminada.

TABLA 1B

Inhibición de la absorción de 10 ng/ml de Tat rodamina por células HUVE activadas por citocinas mediante la pre-incubación de las células con un exceso de FN o VN^a

Pre-incubación	Absorción de Tat rodamina
Medio libre de suero	++++
100 ng/ml de FN	+/-
100 ng/ml de VN	+/-

^a Se pre-incubaron las células HUVE durante 2 horas con medio libre de suero o FN o VN en medio libre de suero, se incubaron con 10 ng/ml de Tat rodamina durante 60 minutos y se visualizó la absorción de Tat por microscopio de fluorescencia. Se preincubaron los controles negativos (+/- absorción) con medio libre de suero, seguido por incubación con BSA rodamina.

La absorción de Tat fue inhibida por crio-Tat (Tabla 1A), por FN o VN (Tabla 1B) o por tratamiento previo de las células con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las regiones de unión RGD tanto del receptor FN, $\alpha_5\beta_1$, como del receptor VN, $\alpha v\beta_3$ (Fig. 1A). Se redujo la intensidad de fluorescencia en las células hasta los niveles vistos con el control negativo y no se observó ninguna inhibición por incubación previa de las células con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el factor VIII humano, usados como control negativo, lo que indica que la inhibición era específica (Fig. 1A).

La absorción y localización nuclear de 100 ng/ml de Tat fue inhibida por la pre-incubación de las células con los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la región de unión RGD del receptor $\alpha_5\beta_1$ y del receptor $\alpha v\beta_3$. Sin embargo, en ambos casos la inhibición no fue completa. Estos resultados indican que la absorción de concentraciones picomolares de Tat está mediada por las mismas integrinas implicadas en la adhesión celular a Tat (Ref. 10). Sin embargo, a una concentración más alta de Tat extracelular (tal como ≥ 100 ng/ml), una ruta no mediada por integrinas es responsable de la absorción de parte de la proteína.

En contraste con estos resultados, la absorción de Tat yodada por los linfocitos y líneas de células epiteliales se ha visto que es lineal y en función de la concentración de Tat en el medio y que no es afectada o es poco afectada por un exceso de crio-Tat, indicativo de la falta de implicación del receptor (Ref. 98). Sin embargo, el intervalo de concentración de Tat en el medio en dicho estudio fue aproximadamente 1-100 μ g/ml (Ref. 98), mucho más alto que lo necesario para observar la absorción de Tat por las células que responden a su actividad biológica, tales como las células endoteliales primarias activadas. En adición, la yodación de Tat puede obstaculizar su estructura y su absorción por las células y no han sido mostrados por dichos autores resultados de actividad biológica de la Tat yodada.

Estos resultados, que están sin publicar, demuestran que la absorción de Tat tiene lugar al menos por dos rutas dependiendo de la concentración de la proteína. A bajas concentraciones (10-100 ng/ml) de Tat, la absorción de Tat está mediada por los receptores $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha v\beta_3$ a través de la interacción con la secuencia RGD de la proteína, mientras que a una concentración más alta de Tat extracelular es más importante una ruta independiente de las integrinas. La absorción mediada por integrinas de concentraciones picomolares de Tat por las células endoteliales activadas por IC indica una proteína completamente activa capaz de entrar en las células presentadoras de antígeno, tales como las células endoteliales activadas y las células dendríticas, que inician la respuesta inmunitaria.

Ejemplo 2

Construcción y caracterización de genes tat mutados (no reivindicada)

Se produjeron 19 mutantes en diferentes regiones de Tat por medio de mutagénesis específica del sitio o por delección. La secuencia de cada DNA mutado fue controlada por secuenciación. Los cDNA de los genes *tat* mutados fueron clonados en el sitio PstI del vector pCV0, descrito en el Ejemplo 3. Cada mutante fue co-transfectado, como está descrito por Ensoli *et al.* (Ref. 41) en células COS-1 o en la línea de células T de Jurkat con el plásmido LTR-CAT de HIV-1, en el cual el gen informador CAT es dirigido por la LTR de HIV-1. Los resultados de estos experimentos, no publicados, se detallan en la Tabla 2.

TABLA 2

Efecto de los mutantes de Tat sobre la transactivación de LTR-CAT de HIV-1 y efecto bloqueante (transdominante negativo) sobre la actividad de Tat tipo natural

MUTANTES	Actividad transactivante ^a		Actividad transdominante ^b
	Media (veces)	(valores min-max)	(% de inhibición) Media
CYS 22	0,09	(0,021-0,22)	21
THR 23	0,36	(0,16-1)	
THR 23A	0,30	(0,16-0,78)	
ASN 24	0,34	(0,34-0,82)	
ASN 24A	0,42	(0,45-0,95)	46
TYR 26	0,14	(0,08-0,19)	
LYS 28/29	0,52	(0,19-1,04)	
CYS 30	0,30	(0,045-0,65)	
CYS 31	0,60	(0,27-1,09)	98
PHE 32	0,31	(0,077-0,097)	
LYS 33	0,04	(0,0027-0,068)	
GLU 35	0,31	(0,19-0,43)	
PHE 38	0,05	(0,043-0,057)	97
LYS 41	0,04	(0,025-0,061)	
TYR 47	0,58	(0,31-0,8)	
57 A	0,35	(0,26-0,44)	
TAT-RGD	0,94	(0,73-1,15)	1
TAT-KGE	1,11	(0,67-1,49)	
TAT tipo natural	1	1	

^aLos resultados se dan como el incremento de la activación de los valores de actividad CAT inducida por la Tat de tipo natural (Veces=1). ^bLos resultados se expresan como porcentaje (%) de inhibición de la actividad de Tat de tipo natural.

De los resultados presentados en la Tabla 2 queda claro que para la mayoría de los mutantes el efecto de transactivación de la LTR de HIV-1 estaba reducido o ausente, con la excepción del mutante RGD, que tenía una actividad similar a la Tat de tipo natural. Se seleccionaron los 4 mutantes (cys22, lys33, phe38, lys41) que tienen la actividad de transactivación más baja (casi cero) y se determinó el efecto transdominante negativo sobre la actividad de transactivación de la Tat de tipo natural. Con este fin, se co-transfectaron células COS-1 con cada vector que contiene un mutante de Tat y el vector pCV-Tat (en una relación molar de 10:1) en presencia del vector LTR-CAT de HIV-1. Como se muestra en la Tabla 2, los mutantes lys41 y phe38 inhibieron casi completamente la actividad de Tat, mientras que los mutantes lys33 y cys22 inhibieron parcialmente la actividad de Tat. Sin embargo, la proteína cys22 recombinante (descrita en el siguiente Ejemplo 3) compitió con la proteína Tat de tipo natural en la transactivación de la LTR-CAT de HIV-1 (fig. 1B). Se seleccionaron, un mutante en la región de cisteína (cys22), uno en la región central (lys41), uno que tiene deleciónada la secuencia RGD (RGDΔ) y un doble mutante que contiene la mutación en lys41 y la deleción de la secuencia RGD (lys41-RGDΔ).

La secuencia del inserto *tat* y de los mutantes seleccionados para la vacunación se detalla aquí más adelante. Se describe una serie de mutantes *tat* preparada por 1) sustitución de una base para obtener una sustitución aminoácida y 2) deleción de una base para obtener una deleción de los correspondientes aminoácidos. Las sustituciones y deleciones se obtuvieron por mutagénesis directa en el sitio. Las secuencias del gen *tat* de tipo natural y de los mutantes del gen *tat*, detalladas aquí más adelante, se insertaron en el vector plásmido pCV0 como se ha descrito antes.

Con la Seq. 1 se indica la secuencia del gen *tat* de HIV-1, a partir de un clon BH-10 y su proteína derivada. Con la Seq. 2 se indica la secuencia del mutante cys22 (y su proteína derivada), representada por una sustitución de nucleótido Timina (T) en la posición 64 partiendo del extremo 5' con el nucleótido Guanina (G). Esta sustitución origina, en la secuencia aminoácida derivada, una sustitución de una Cisteína (C en código de una letra) en la posición 22 en el extremo amino-terminal, con una Glicina (G en código de una letra). Con la Seq. 3 se indica la secuencia del mutante lys41 (y su proteína derivada), representada por una sustitución del nucleótido Adenina (A) en la posición 122 a partir del extremo 5' con el nucleótido Citosina (C). Esta sustitución origina, en la secuencia aminoácida derivada, una sustitución de una Lisina (K en código de una letra) en la posición 41 a partir del extremo amino-terminal, con una

Treonina (T en código de una letra). Con la Seq. 4 se indica una secuencia del mutante RGD (y su proteína derivada), representada por la delección de la secuencia nucleotídica CGAGGGGAC, desde el nucleótido 232 al nucleótido 240, partiendo del extremo 5' del gen *tat* de tipo natural. Esto da una delección de los aminoácidos Arginina-Glicina- ácido Aspártico (RGD en código de una letra) en las posiciones 78-80 a partir del extremo amino-terminal. Con la Seq. 5 se indica una secuencia del doble mutante lys41-RGDΔ (y su proteína derivada), originado por la combinación de los mutantes descritos antes.

Secuencia nucleotídica de tat tipo natural (Seq. 1) (Seq. ID No 1)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCA
GCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTTCATTGCCA
AGTTTGTTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
AGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTAT
CAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAAT
AG 3'

Secuencia de aminoácidos (Seq. ID No 2)

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKALG
ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Secuencia nucleotídica del mutante Cys22 (Seq. 2) (Seq. ID No 3)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCA
GCCTAAAACTGCTGGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTTCATTGCCA
AGTTTGTTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
AGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTAT
CAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAAT
AG 3'

Secuencia de aminoácidos (Seq. ID No 4)

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTAGTNCYCKKCCFHCQVCFITKA
LGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Secuencia nucleotídica del Lys41 (Seq. 3) (Seq. ID No 5)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCA
GCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTTCATTGCCA
AGTTTGTTTCATAACAACAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
AGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTAT
CAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAAT
AG 3'

Secuencia de aminoácidos (Seq. ID No 6)

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG
 ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Secuencia nucleotídica del mutante RGDA (Seq. 4) (Seq. ID No 7)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCA
 GCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTTCATTGCCA
 AGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
 AGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTAT
 CAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Secuencia de aminoácidos (Seq. ID No 8)

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKALG
 ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

Secuencia nucleotídica del mutante Lys41- RGDA (Seq. 5) (Seq. ID No 9)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCA
 GCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTTCATTGCCA
 AGTTTGTTCATAACAACAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
 AGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTAT
 CAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Secuencia de aminoácidos (Seq. ID No 10)

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG
 ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

Ejemplo 3*Construcción y caracterización de los inmunógenos de DNA*

Las moléculas de DNA para la inoculación de animales se insertan en el vector plásmido pCV0 de 6,4 kb (Ref. 5). Este plásmido comprende dos orígenes de replicación de SV40, el principal promotor tardío del adenovirus (AdMLP) y las secuencias de corte y empalme del adenovirus y de los genes de la inmunoglobulina de los ratones, el cDNA del gen de la dihidrofolato-reductasa de los ratones (dhfr) y la señal de poliadenilación de SV40. El sitio PstI de la enzima de restricción está localizado en el 3' del AdMLP, y representa el sitio en el que es clonado el gen exógeno de interés. El cDNA del gen *tat* (261 pares de bases) (Seq. 1, ejemplo 2) de HIV-1 fue derivado del clon BH10 de HIV-1 (Ref. 126) y codificó una proteína de 86 aminoácidos. El vector pCV-Tat (Ref. 5) se obtuvo clonando el cDNA de *tat* en el sitio PstI de pCV0, dirigido por el AdMLP. La elección de este vector se basa en que el AdMLP indujo una expresión y liberación de Tat más altas, con respecto a otros promotores eucarióticos, tales como, por ejemplo, el promotor inmediato temprano de la región del citomegalovirus (CMV) como ha sido demostrado por Ensoli *et al.* (Ref. 41), y como se detalla en la Tabla 3.

TABLA 3

Expresión, localización subcelular, liberación y actividad de Tat en células COS-1 transfectadas con pCV-Tat y CMV-Tat^a

Vectores	Expresión de Tat			Contenido en Tat ^b			Actividad de Tat	
	Núcleo ^c	Citoplasma		Total	Intracelular	Extracelular	Intracelular ^d	Extracelular ^e
Células Positivas	%				%	%	(veces)	(cpm)
PCV-Tat	5-10	++	++	25	63,5	36,5	50	2,478
CMV-Tat	3-5	++	+	14,6	92,2	7,8	72	2,254
Control	0	-	-	0	0	0	1	1,400

^aLas células COS-1 (5×10^6) fueron transfectadas por electroporación con 30 µg de pCV-Tat, CMV-Tat o un DNA control. Se evaluó la expresión de Tat 48 horas después de la transfección, por inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales anti-Tat (los valores dados son la media de los porcentajes de los valores de las células positivas) y por localización de Tat nuclear y citoplásmica. La presencia de Tat intra- y extra-celular se analizó mediante radioinmunoprecipitación en los extractos celulares (500 µl) y en el medio de cultivo (4 ml) y la subsiguiente lectura densitométrica (Gelscan XL; Pharmacia) de las bandas de Tat precipitadas. La actividad de Tat intracelular se midió en los extractos celulares de células COS-1 co-transfectadas con vectores que expresan Tat, o con el vector control, y el plásmido LTR-CAT HIV-1; la actividad de Tat extracelular sobre la proliferación de las células KS-SIDA (determinada por un ensayo de incorporación de ³H-timidina) se midió en el medio de cultivo (diluido 1:2 y 1:4) de las células transfectadas con plásmidos que expresan Tat o con el plásmido control. Los resultados son la media de cinco experimentos independientes.

^bAnálisis densitométrico de la banda de proteína Tat inmunoprecipitada. Los valores se expresan en una escala arbitraria, siendo 10 el valor mínimo total detectado (Tat intra- y extracelular).

^c -, negativos; +, 50% de células Tat-positivas; ++, 50-100% de células Tat-positivas.

^dActividad CAT después de 20 minutos de incubación con respecto al vector control, siendo considerado 1 el valor de activación de éste.

^eEl crecimiento de las células KS-SIDA se midió por un ensayo de incorporación de ³[H]-timidina (desviación estándar, SD: 12%). Los sobrenadantes de las células transfectadas con el DNA control tuvieron una incorporación de ³[H]-timidina de 1.400 cpm (SD: 11,5%). El medio de cultivo derivado de los linfocitos T activados (control positivo) tuvo una incorporación de ³[H]-timidina de 2.400 cpm (SD: 10%).

La Tabla 3 muestra que en las células transfectadas con pCV-Tat, comparadas con las células transfectadas con CMV-Tat, el porcentaje de células Tat-positivas y el contenido total de Tat son más altos, la cantidad de Tat liberada es mucho más alta y está relacionada con el contenido total y citoplasmático de Tat, y la actividad biológica de la Tat extracelular sobre el crecimiento de las células KS-SIDA es por tanto más alto. Tales resultados demuestran que el vector pCV-Tat codifica una proteína biológicamente activa, induce altos niveles de expresión del gen *tat* y puede liberar de las células cantidades mucho más altas de Tat que el vector CMV-Tat.

El vector pCV0 se utiliza también para la expresión de los genes *nef*, *rev* y *gag* de HIV-1 y de los genes que codifican las citocinas IL-12 e IL-15. Los cDNA de los genes *nef* (618 pares de bases, cepa NL43) (Ref. 112) *rev* (348 pares de bases, cepa NL43) (Ref. 95) y *gag* (1500 pares de bases, cepa NL43) (Ref. 95), o los cDNA de los genes de IL-12 (Ref. 165) o IL-15 (Ref. 56) son amplificados por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos complementarios con los primeros 15 nucleótidos de la región 5' (cebador directo) (Seq. P1, P3, P5, P7, P9) o con los últimos 15 nucleótidos de la región 3' del gen (cebador inverso) (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). Además, cada cebador, tanto directo como inverso, comprende la secuencia de la enzima de restricción PstI para acceder a la clonación del producto amplificado en el vector pCV0. Después de la clonación, la secuencia de los genes insertados se controla por la secuenciación del DNA. El vector pCV0 se usa también para la co-expresión de Tat con otros genes virales de HIV-1 (*rev*, *nef* o *gag*) o con los genes que codifican las citocinas IL-12 o IL-15. Con este fin, el cDNA del gen *tat* de HIV-1 de 261 pares de bases (Seq. 1, ejemplo 2) es amplificado por la PCR con un cebador directo que incluye la secuencia para la enzima de restricción PstI (Seq. P11) y un cebador inverso complementario con los últimos 15 nucleótidos del gen *tat* (Seq. P12). Los genes virales (*nef*, *rev* o *gag*) o los genes que codifican las citocinas IL-12 o IL-15 son amplificados con un cebador directo que incluye también una secuencia de 15 bases complementaria con la región *tat* 3', permitiendo que el gen esté en el marco del gen *tat* (Seq. P13, P14, P15, P16, P17), y un cebador inverso que incluye la secuencia para la enzima de restricción PstI (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). Después, se realiza una tercera reacción de PCR en la cual el modelo de DNA se representa por los productos amplificados del gen *tat* y del gen de interés. El cebador directo se representa por el cebador utilizado para amplificar *tat* (Seq. P11) y el cebador inverso por el utilizado en la amplificación del gen de interés (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). El *tat*/gen de interés amplificado se purifica con gel de agarosa, se digiere con PstI y se clona en pCV0. Después de

ES 2 293 700 T3

la clonación, la secuencia de los genes insertados se controla mediante la secuenciación del DNA, mientras que la expresión de la proteína se determina por medio de transfección como se ha descrito antes (Ref. 41).

Las secuencias de los cebadores mencionados antes son:

Seq. P1. Cebador directo Rev: 5'ATGGCAGGAAGAAGC3'	(Seq ID No 18)
Seq. P2. Cebador inverso Rev: 5'CTATTCTTTAGTTCC3'	(Seq ID No 19)
Seq. P3. Cebador directo Net: 5'ATGGGTGGCAAGTGG3'	(Seq ID No 20)
Seq. P4. Cebador inverso Nef: 5'TCAGCAGTCCTTGTA3'	(Seq ID No 21)
Seq. P5. Cebador directo Gag: 5'ATGGGTGCGAGAGCG3'	(Seq ID No 22)
Seq. P6. Cebador inverso Gag: 5'TTATTGTGACGAGGG3'	(Seq ID No 23)
Seq. P7. Cebador directo IL-12: 5'ATGTGGCCCCCTGGG3'	(Seq ID No 24)
Seq. P8. Cebador inverso IL-12: 5'TTAGGAAGCATTTCAG3'	(Seq ID No 25)
Seq. P9. Cebador directo IL-15: 5'ATGAGAATTTGAAA3'	(Seq ID No 26)
Seq. P10. Cebador inverso IL-15: 5'TCAAGAAGTGTTGAT3'	(Seq ID No 27)
Seq. P11. Cebador directo Tat: 5'ATGGAGCCAGTAGAT3'	(Seq ID No 28)
Seq. P12. Cebador inverso Tat: 5'CTATTCTTCGGGCC3'	(Seq ID No 29)
Seq. P13. Cebador directo Tat/Rev: 5'GGCCCGAAGGAAATGGCA GGAAGAAGC3'	(Seq ID No 30)
Seq. P14. Cebador directo Tat/Nef: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGT GGCAAGTGG3'	(Seq ID NO 31)
Seq. P15. Cebador directo Tat/Gag: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGTGCG AGAGCG3'	(Seq ID NO 32)
Seq. P16. Cebador directo Tat/IL-12: 5' GGCCCGAAGGAAATGTGGC CCCCTGGG3'	(Seq ID NO 33)
Seq. P17. Cebador directo Tat/IL-15: 5' GGCCCGAAGGAAATGAGAAT TTCGAAA3'	(Seq ID NO 34)

Ejemplo 4

Inoculación en monos Macaca fascicularis sanos de una vacuna anti-proteína Tat: evaluación de seguridad, tolerabilidad, respuesta inmunitaria específica y eficacia protectora frente al enfrentamiento con el virus

La tolerabilidad, la seguridad y la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria específica (humoral y celular) y la protección frente al enfrentamiento con el virus de la vacuna recombinante anti-proteína Tat, producida por el método descrito y purificada a través de columnas de afinidad con heparina, fueron evaluadas en el modelo experimental de mono cinomolgus (*Macaca fascicularis*). Con el fin de inducir una respuesta inmunitaria amplia se utilizó fosfato de aluminio (Alum) que había sido ensayado en numerosos modelos y que es el único aprobado para uso humano. Entre los adyuvantes en forma de partículas se utilizó RIBI (que pertenece al grupo de emulsionantes compuesto por lípido monofosforílico A, trehalol dimicólico y el esqueleto de la pared bacteriana del bacilo de Calmette-Guerin) (Ref. 7, 109).

En el primer experimento piloto se evaluaron la tolerabilidad, la seguridad y la capacidad para provocar una respuesta inmunitaria específica (humoral y celular). Así, se inocularon 3 monos según el siguiente programa: se inoculó el mono 1 (M1) con la proteína Tat recombinante (100 µg), resuspendida en 250 µl de suero autólogo y 250 µl de RIBI, por vía subcutánea en un sitio; se inoculó el mono 2 (M2) con la proteína Tat recombinante (10 µg), resuspendida en 250 µl de suero autólogo y 250 µl de RIBI, por vía subcutánea en un sitio; y el mono 3 (M3) fue el mono control no inoculado. Se sacaron 10 ml de sangre de todos los monos los días -42 y -35 precedentes a la primera inoculación de la vacuna con el fin de determinar los parámetros basales. Se congelaron muestras de suero y plasma a -20°C o -80°C

y se usaron más tarde para resuspender el inóculo de proteína. Se inocularon los monos 1 y 2 al tiempo 0 y después a las 2, 5, 10, 15, 22, 27, 32 y 37 semanas. Se interrumpió el programa de inmunización la semana 37 para el mono M1 y la semana 41 para el mono M2. Se sacrificaron los animales para estudiar los parámetros inmunológicos en varios órganos y tejidos (bazo y nódulos linfáticos), tales como la evaluación de la presencia de una respuesta proliferativa a Tat, y de actividades CAF y CTL contra Tat. La actividad CAF es la actividad antiviral mediada por los linfocitos CD8+, ni restringida por MHC ni citolítica. En los mismos días de la inoculación del inmunógeno, se extrajeron 10 ml de sangre de cada animal para realizar pruebas de laboratorio (análisis físico-químicos, electrolitos, recuentos de leucocitos y plaquetas y cuantificación de hemoglobina), la evaluación de los parámetros inmunológicos, tales como la presencia de inmunoglobulinas específicas (IgM, IgG, IgA), los niveles de citocinas tipo Th1 (IL-2, IFN γ) y citocinas tipo Th2 (IL-4, IL-10), la producción de quimiocinas (RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β), el fenotipo linfocítico (CD4, CD8, CD3, CD14, CD20, CD25, CD56, HLA-DR, CD45RA), la respuesta proliferativa a Tat, la presencia de actividad citotóxica específica (CTL), la presencia de actividad antiviral (CAF); y la presencia de actividad antiviral total (TAA) mediada por las PBMC y por el suero autólogo. Además, para evaluar la presencia *in vivo* de una respuesta inmunitaria mediada por las células, todos los monos vacunados y los monos control se sometieron a una prueba de sensibilidad a Tat (skin test).

Los resultados de este experimento son los siguientes. No se observaron alteraciones de los parámetros físico-químicos, hematológicos ni de comportamiento. En los monos vacunados y en los monos control, no se detectaron signos de inflamación ni de neo-vascularización en los sitios de inoculación. Estos resultados indican que la proteína Tat fue bien tolerada por los animales y que no fue tóxica a las dosis administradas y en la vía de inoculación dada. En los monos M1 y M2 se detectó la presencia de anticuerpos del tipo IgG específicos para Tat en la semana 5 después de la primera inoculación. En la semana 37, las IgG anti-Tat fueron detectables hasta una dilución del plasma 1:6400 en ambos monos, y, en la semana 41, hasta una dilución del plasma 1:12.800 en el mono M2. Los resultados se muestran en las figuras 2 y 3. En el mono control M3, se detectaron anticuerpos anti-Tat con títulos bajos, probablemente provocados por las inoculaciones repetidas de baja cantidad de Tat que fue inyectada a este mono para controlar la especificidad de las reacciones de la prueba de sensibilidad (skin test). En los monos M1 y M2, los anticuerpos anti-Tat estaban principalmente dirigidos contra la región amino-terminal (aa 1-20) de Tat, con un título de 1:3200 (figura 4). En el mono M2, vacunado con 10 μ g de Tat, se detectaron también anticuerpos dirigidos contra los aa 36-50 y 46-60 de Tat, con títulos de 1:50 y 1:100, respectivamente (figura 4). Se determinó la capacidad del suero de los monos para neutralizar a Tat por medio de ensayos *in vitro* que medían la inhibición del rescate de la replicación de HIV-1 en células HLM-1 después de la adición de proteína Tat exógena, como se ha descrito previamente (Ref. 41). Estos ensayos demostraron que el plasma de los monos M1 y M2, en la semana 27 después de la primera inoculación, bloqueaba la replicación del virus inducida por la Tat exógena, como se determina por la cuantificación del antígeno p24 en los sobrenadantes del cultivo. A la inversa, el plasma preinmune de los mismos monos no bloqueó la actividad de Tat (Tabla 4).

TABLA 4

Actividad neutralizante del plasma de monos sobre el rescate de la replicación viral inducida por Tat extracelular^a

Muestras	Inhibición (%)
Tat (30 ng/ml) + M1 preinmune	0
Tat (30 ng/ml) + M2 preinmune	0
Tat (39 ng/ml) + M1 inmune	79,12
Tat (30 ng/ml) + M2 inmune	100

^aLa actividad neutralizante del plasma se determinó en células HLM-1 (células HeLa-CD4+ que contienen una copia integrada de un provirus HIV-1 defectuoso en el gen *tat*). Se sembraron las células HLM-1 a 6×10^5 células/pocillo en placas de 24 pocillos y se incubaron a 37°C durante 16 horas. Se lavaron las células dos veces con PBS, que contenía 0,1% de seroalbúmina bovina (BSA), y se cultivaron durante 48 horas con medio fresco (0,3 ml) en presencia de proteína Tat recombinante y se extrajo un volumen igual de plasma del animal, a tiempo 0 (plasma preinmune) o a la semana 27 (plasma inmune). Los controles negativos estuvieron representados por células tratadas solamente con el plasma preinmune conjuntamente reunido, con el plasma inmune conjuntamente reunido o con PBS que contiene 0,1% de BSA (PBS + 0,1% de BSA), sin Tat. En todas las muestras control no se observaron efectos sobre el rescate de la replicación viral. Se analizó cada plasma por duplicado. Se analizó la presencia de virus liberado por las células por cuantificación del antígeno p24 Gag, usando un kit comercial ELISA de captura de antígeno p24 (NEN-Dupont). Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición del rescate de virus [medido para cada plasma como el valor medio de p24 (pg/ml) en dos pocillos] por el plasma inmune en comparación con el plasma preinmune (0% de inhibición). Los monos M1 y M2 fueron vacunados con la proteína Tat recombinante (100 μ g y 10 μ g, respectivamente) resuspendida en 250 μ l de suero autólogo y 250 μ l de RIBI, e inyectados por vía subcutánea en un sitio.

Los resultados indican la presencia de una respuesta proliferativa a Tat en la semana 22 (Tabla 5) en los monos vacunados con la proteína Tat recombinante, siendo más alta en el mono M2 que recibió 10 μ g de proteína Tat recombinante en cada dosis de refuerzo.

ES 2 293 700 T3

TABLA 5

Respuesta proliferativa a Tat^a

Mono	Estímulo	Semanas desde la inmunización primaria				
		15	22	27	32	37
M1	PHA	15,3	13,9	19,9	40,6	3,2
	TT	1,2	4,7	2,1	3,8	2
	Tat	0,8	2,4	1,1	1,3	0,6
M2	PHA	8,1	11,6	17,1	16,8	1,7
	TT	2	3,8	1,7	1	0,6
	Tat	0,9	3	1,4	1,2	0,6
M3	PHA	5,1	19,9	18,2	6,6	8,1
	TT	7,2	6,2	5,5	2,8	5,6
	Tat	2,1	1,4	1,3	0,7	0,9

^aSe extendieron en placas las PBMC aisladas por gradiente de densidad de Ficoll a una concentración de 2×10^5 células/pocillo por triplicado en una placa de fondo plano de 96 pocillos, se cultivaron en RPMI-1640 suplementado con suero fetal de ternera (FCS) al 10% y se estimularon con Tat (1 o 5 $\mu\text{g/ml}$), PHA (4 $\mu\text{g/ml}$) o toxoide tetánico (TT) para aquellos monos que estaban vacunados. Los controles no estimulados se incubaron en medio RPMI, con FCS al 10%. Se midió el incremento de la proliferación celular el día 5 mediante la incorporación de ^3H -timidina como se ha descrito previamente (Ref. 39, 22). Los resultados se expresan como índice de estimulación y se calcularon como sigue: media de la muestra de ensayo (cpm)/media de control (cpm). Los valores mayores de 2,5 fueron considerados positivos. Los monos M1 y M2 se inmunizaron subcutáneamente con 100 μg o 10 μg de Tat recombinante resuspendida en 250 μl de suero autólogo y 250 μl de RIBI. M3 representa un mono control.

Como se muestra en la Tabla 6 no se detectó actividad citotóxica frente a Tat en los monos M1 y M2 inmunizados con Tat recombinante.

TABLA 6

Análisis de la actividad citotóxica frente a Tat (CTL)^a

Mono	Semana	Relación objetivo:efector					Actividad CTL	
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Media	
M1	41	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M2	41*	0	0	0	0	0	0	-
M3	41	0	0	0	0	0	0	-

^aSe resuspendieron las PBMC aisladas por centrifugación por densidad de Ficoll a una concentración de 1×10^7 células/ml en RPMI 1640 suplementado con FCS al 10% inactivado por calor y se sembraron en una placa de 24 pocillos (500 μl por pocillo) durante 12 horas a 37°C en presencia de 1 μg de Tat. Un día más tarde, las células incubadas sin Tat se centrifugaron a 1500 rpm y se resuspendieron en 50 μl de RPMI 1640 suplementado con FCS al 10%, se incubaron durante 3 horas a 37°C con 1 μg de Tat, se lavaron, se resuspendieron en 500 μl de medio fresco y se añadieron a los pocillos que contienen las PBMC estimuladas previamente. El día 2 se diluyeron las células con 1 ml de medio que contiene IL-2 (2 IU/ml) y se cultivaron durante 14 días. Los linfocitos B autólogos aislados de cada mono antes del protocolo de la vacuna se usaron como células objetivos (BLCL). Con este fin, las PBMC aisladas por centrifugación por densidad de Ficoll el día 35 se sembraron a una concentración de 3×10^5 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 2 o 3 semanas en presencia de 50% de un medio recogido de una línea celular que produce Papiovirus como se ha descrito previamente (Ref. 28). Diez líneas de células B obtenidas para cada animal se expandieron y congelaron. Para probar la toxicidad, se usó el Delfia Cytotoxic Test (Wallac, Turku, Finland) basado en fluorescencia de resolución en el tiempo (Ref. 12, 13, 14). Con este fin, se cultivaron las BLCL a una concentración de 1×10^6 células/200 μl de RPMI 1640 suplementado con FCS al 10% que contiene 4 μg de Tat durante 12 horas a 37°C. Como control, se incubó otra alícuota de BLCL autólogas con el mismo medio sin Tat. Se lavaron las BLCL y se resuspendieron en 1 ml de RPMI 1640 suplementado con FCS al 10% que contiene 5 μl de ligando potenciador de la fluorescencia y se incubaron durante 15 min a 37°C según las instrucciones del fabricante. Después de 5 lavados, se resuspendieron las BLCL a una concentración de 5×10^4 células/ml y seguidamente se centrifugaron con el fin de recoger el sobrenadante que se usó para medir el nivel basal. Se sembraron las PBMC (efectores) por duplicado a una concentración de $2,5 \times 10^4$ células/100 μl en medio

que contiene IL-2 y se diluyeron apropiadamente en una placa de 96 pocillos. Se añadieron a cada pocillo 5×10^3 células objetivo /100 μ l (se cultivaron con o sin Tat). Las relaciones objetivo:efector fueron 1:50, 1:25, 1:12,5, 1:6,25, 1:3,125. Las PBMC y las células objetivo (pulsadas con Tat o no pulsadas) se incubaron durante 2 horas a 37°C con i) 20 μ l de Triton al 5% para medir la liberación máxima, ii) 100 μ l de medio de crecimiento para detectar la liberación espontánea, iii) 200 μ l de sobrenadante de las células objetivo para detectar el nivel basal. Al final del periodo de incubación se centrifugaron las placas, se transfirieron 20 μ l de cada sobrenadante a una nueva placa y se incubaron en presencia de 200 μ l de una solución de europio incluida en el kit. Se midió la fluorescencia después de 20 min de incubación con un lector de fluorescencia de resolución en el tiempo (Victor; Wallac, Turku, Finland). Se midió la actividad CTL específica como sigue: % de liberación específica = [(media de detección de la muestra - base) - (liberación espontánea - base)] / [(liberación máxima - base) - (liberación espontánea - base)] x 100. Se consideró positivo el ensayo cuando la liberación específica de Tat fue más alta del 4% en la mayor parte de las relaciones efector:objetivo ensayadas. El 4% es un valor arbitrario establecido basándose en experimentos previos de control. ND, no determinado. El mono M2 fue inmunizado subcutáneamente con 10 μ g de Tat recombinante resuspendida en 250 μ l de suero autólogo y 250 μ l de RIBI. M3 representa un mono control.

ND: no realizado.

* Se aislaron las PBMC de los nódulos linfáticos periféricos cuando M2 había sido sacrificado.

Además, los resultados demuestran, a las semanas 22, 27 y 37, la presencia de actividad antiviral soluble mediada por los linfocitos T CD8+ (CAF), medida como la capacidad de los sobrenadantes celulares de los linfocitos T CD8+ de los monos para inhibir la infección aguda del virus quimérico SHIV 89.6P en células CEM x 174, o para controlar la reactivación de la infección crónica de HIV-1 en células OM-10-1 (Tabla 7). La actividad CAF fue observada en general en los monos vacunados en comparación con los animales control.

TABLA 7

Análisis de la presencia de actividad antiviral soluble mediada por linfocitos T CD8+ (CAF)^a

Mono ID	Semanas después de la inmunización primaria	% de inhibición de la replicación viral	
		Infección aguda	Infección crónica
M1	22	89,5	ND
	27	62	61,7
	37	ND	ND
M2	22	44	ND
	27	54	27
	37	48	53
M3	22	24	ND
	27	37	22
	37	75	23

^a Se aislaron por gradiente de densidad de Ficoll, PBMC de monos vacunados con 100 μ g (M1) y 10 μ g (M2) de proteína Tat recombinante y de un mono control (M3), que no había sido vacunado, pero que había repetido las pruebas de sensibilidad (skin test) con Tat. Se aislaron de las PBMC cultivos enriquecidos en linfocitos T CD8+ mediante perlas magnéticas anti-CD8 (Dynabeads, Dynal, Norway) según las instrucciones del fabricante. Se controló la pureza de los cultivos mediante análisis FACS usando una serie de anticuerpos dirigidos contra marcadores celulares específicos (CD3, CD4, CD8). Se sembraron (por duplicado) cultivos enriquecidos en CD8+ a 5×10^5 células/500 μ l por pocillo en placas de 48 pocillos, previamente recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (2,5 μ g/ml, BioSource International, Camarillo, CA) durante 12 horas a 4°C, y se cultivaron en RPMI 1640, que contenía 10% de suero fetal bovino e IL-2 (20 U/ml). Se recogieron 250 μ l de medio cada tres días, durante dos semanas, y se sustituyeron con un volumen igual de medio fresco. Se centrifugaron los sobrenadantes celulares, se filtraron (0,45 μ m) y se almacenaron a -80°C. Los sobrenadantes celulares obtenidos en todos los puntos de tiempo, con la excepción del primero, se reunieron y se ensayó la presencia de actividad antiviral como su capacidad para inhibir la replicación viral en dos sistemas, representados por la infección aguda y crónica, respectivamente. Para el sistema de infección aguda, se usó la línea de células CEM x 174, que se deriva de la línea de células B humanas 721.174 fusionada con la línea de células T humanas CEM (Ref. 143). Se incubaron las células (2×10^5) en tubos de polipropileno con o sin 200 μ l de sobrenadantes CD8+, preparados como se ha descrito antes, durante 2 horas a 37°C. Se lavaron las células 3 veces con medio fresco, se sembraron a 2×10^4 células por pocillo, en placas de 96 pocillos, y se incubaron en 200 μ l con (células tratadas) o sin (células no tratadas) diferentes volúmenes (50 μ l, 5 μ l y 0,5 μ l) de sobrenadantes de cultivo derivados de linfocitos T CD8+ de los monos inyectados con la vacuna o del mono control. Después de la infección,

se recogieron alícuotas de sobrenadantes de cultivo cada tres días y se sustituyeron con un volumen igual de medio completo al que se había añadido previamente el sobrenadante de cultivo CD8+ procedente de los monos vacunados y de los monos control. Los resultados mostrados en la Tabla corresponden al día 7 después de la infección y se expresan en porcentaje (%) de inhibición de la replicación viral de las células tratadas con sobrenadantes de cultivo CD8+ derivados de los monos vacunados en comparación con las células no tratadas. Se determinó la replicación viral midiendo los valores RT, como se describe (Ref. 54), o los valores p27 Gag por ELISA, en los sobrenadantes celulares recogidos a cada punto de tiempo. Para el sistema de infección crónica se usó la línea de células OM-10-1 (Ref. 20, 21), que representa una línea humana de linfocitos T infectados crónicamente por HIV-1. Se sembraron (por duplicado) las células a 5×10^4 células/200 μ l por pocillo, en placas de 96 pocillos, en presencia de anticuerpos anti-TNF β (40 μ g/ml), con o sin diferentes volúmenes (50 μ l, 5 μ l, 0, 5 μ l) de sobrenadante celular procedente de linfocitos T CD8+ derivados de los monos vacunados o de los monos control. Se activaron las células para proliferar mediante PMA (10⁻⁷ M). Después de 24 horas, se recogieron alícuotas del medio de cultivo para determinar la replicación viral midiendo los niveles de RT o p24 Gag mediante ELISA. Los resultados se representan como % de inhibición de la reactivación de la infección en células tratadas en comparación con las células no tratadas. Los resultados de la infección aguda y crónica mostrados en la Tabla se refieren a células tratadas con 5 μ l de sobrenadante derivado de cultivos celulares CD8+. ND: no realizado.

El análisis del retraso de la hipersensibilidad (DTH) mediante una prueba de sensibilidad (skin test) demostró que tanto los monos vacunados (M1 y M2) como el mono control (M3) fueron negativos (Tabla 8).

TABLA 8

Prueba de sensibilidad (skin-test) a Tat^a

Semanas después de la inmunización primaria	Monos		
	M1	M2	M3
10	-	-	-
15	-	-	-
22	-	-	-
27	-	-	-
32	-	-	-
37	-	-	-

^aSe inocularon Tat (1 y 5 μ g) en 150 μ l de PBS-0,1% de BSA o el tampón solo por vía intradérmica, en un área dorsal previamente afeitada de los monos vacunados y el mono control (control de la especificidad de la respuesta), a las semanas 10, 15, 22, 27, 32 y 37 después de la primera inmunización. Se vacunaron los monos M1 y M2 con proteína Tat recombinante (100 μ g y 10 μ g, respectivamente) en 250 μ l de suero autólogo y 250 μ l de RIBI, inyectados por vía subcutánea en un sitio. El mono M3 es un mono control que no ha sido vacunado. La aparición de un eritema nodular después de 48-72 horas parece indicar un retraso de la reacción de hipersensibilidad (DTH): ++, $\varnothing \geq 5$ mm; +, $\varnothing \geq 1-4$ mm; +/-, eritema sin endurecimiento; -, $\varnothing < 1$ mm.

Los resultados de este experimento piloto indican que la proteína Tat recombinante, producida y purificada según un protocolo descrito por los inventores, no fue tóxica a la dosis de 100 y 10 μ g administrada por vía subcutánea. En adición, la proteína Tat provocó una respuesta inmunitaria específica y amplia con actividades antivirales, tanto humorales como mediadas por las células. Se observó una respuesta inmunitaria anti-Tat más fuerte y específica en el mono M2, vacunado con 10 μ g de proteína Tat recombinante. Además, el adyuvante RIBI no mostró ningún signo aparente de toxicidad en los monos vacunados.

Basándose en estos resultados, se diseñó un segundo experimento piloto con el fin de determinar los efectos de la inmunización con 10 μ g de Tat combinada con adyuvantes RIBI o Alum. Se inyectaron los monos por vía subcutánea en un sitio según el siguiente programa. Monos M1-3: 10 μ g de proteína Tat recombinante en 250 μ l de suero autólogo y 250 μ l de RIBI. Monos M4-6: 10 μ g de proteína Tat recombinante en 250 μ l de suero autólogo y 250 μ l de Alum. Mono M7: RIBI 250 μ l y 250 μ l de suero autólogo (mono control). Mono M8: Alum 250 μ l y 250 μ l de suero autólogo (mono control). Se extrajeron 10 ml de sangre de cada mono el día -9 precedente a la primera inmunización con el fin de llevar a cabo los exámenes descritos en el experimento piloto anterior y para determinar los parámetros basales de cada animal. Se inocularon los monos al tiempo 0 y después a las 2, 6, 11, 15, 21, 28 y 32 semanas. En la semana 36 los monos M1-6 recibieron la última dosis de refuerzo con proteína Tat recombinante (16 μ g) en 200 μ l de ISCOM (complejo estimulante inmune) y 300 μ l de PBS. El ISCOM es un adyuvante que consiste en saponina quil A, colesterol y fosfolípidos que aumenta la respuesta inmunitaria humoral y mediada por las células (Ref. 109, 90). Se inyectaron los monos M7 y M8 a los mismos puntos de tiempo solamente con adyuvantes. En cada punto de vacunación y en las semanas 40, 44 y 50, se extrajeron 10 ml de sangre de los animales para analizar los parámetros

clínicos e inmunológicos descritos en el experimento piloto previo. Además, se recogieron muestras de orina y frotis vaginales para analizar la presencia de IgA secretora específica de Tat. Con el fin de evaluar el efecto protector de la inmunización con Tat contra la infección, los monos vacunados y los monos control se enfrentaron con el “virus de la inmunodeficiencia simia/humana” quimérico (SHIV), cepa 89.6P, que contiene el gen *tat* de HIV-1, previamente cultivado y titulado en *Macaca fascicularis* (Ref. 128, 129, 69). Después del enfrentamiento, se hizo seguimiento de los animales (cada dos semanas durante el primer mes, cada cuatro semanas durante los tres meses siguientes y cada 8 semanas hasta 6-12 meses) para los parámetros virológicos, tales como antigenemia p27 en plasma y carga viral plasmática y celular. Para confirmar que la infección había tenido lugar, se buscaron también anticuerpos anti-SIV por medio de un kit comercial usado para la detección de anticuerpos anti-HIV-2 que reconoce también los anticuerpos anti-SIV (Elavia Ac-Ab-Ak II kit, Diagnostic Pasteur, Paris, France).

En este momento, los resultados del segundo experimento piloto son los siguientes. No se observaron alteraciones de los parámetros físico-químicos, hematológicos ni de comportamiento. Los monos no presentaron ningún signo inflamatorio ni de neovascularización en el sitio de la inoculación. Se observó una respuesta de anticuerpos específicos (IgM, IgG). En la semana 15 los títulos del anticuerpo anti-Tat (IgG) alcanzaron altos niveles, variando de 1:6400 a 1:25600 (figuras 5-7). Los anticuerpos reaccionaron esencialmente con la región amino-terminal (aa 1-20) de Tat, con títulos que varían de 1:1600 a 1:3200 (figura 8) como se muestra en la semana 22. Además, se detectaron también anticuerpos dirigidos contra los aa 46-60 de Tat, con títulos que varían de 1:100 a 1:200 (figura 8). La capacidad del plasma de los monos para neutralizar la actividad de Tat se determinó ensayando la inhibición del rescate viral en células HLM-1 incubadas con cantidades en serie de Tat exógena, como se ha descrito previamente en el primer experimento piloto. Los resultados de estos experimentos han demostrado que el plasma inmune (diluido 1:2) de los monos M1-6 en la semana 15 bloqueaba la replicación viral inducida por 30 ng/ml de Tat exógena, como se determina por la medida del antígeno p24 liberado en el medio de cultivo. A la inversa, el plasma preinmune de los monos M1-6 o el plasma de los monos control (M7, M8) no bloquearon la actividad de Tat (Tabla 9). Además, el plasma inmune (diluido 1:2) de los monos M1-6, extraído en la semana 21, bloqueó la replicación viral inducida por 60 ng/ml, 120 ng/ml, 240 ng/ml y 500 ng/ml de Tat exógena. En particular, estos plasmas determinaron una reducción de 10 veces en la replicación viral inducida por dosis muy altas de Tat extracelular (240 ng/ml y 500 ng/ml) (Tabla 9).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 293 700 T3

TABLA 9

Actividad neutralizante de plasma inmune sobre el rescate de la replicación viral inducida por Tat extracelular ^a

Muestras	Inhibición (%)
Tat (30 ng/ml)+ M1 preimmune	0
Tat (30 ng/ml)+ M2 preimmune	0
Tat (30 ng/ml)+ M3 preimmune	0
Tat (30 ng/ml)+ M4 preimmune	0
Tat (30 ng/ml)+ M5 preimmune	0
Tat (30 ng/ml)+ M6 preimmune	0
Tat (30 ng/ml)+ M1 inmune (semana 15)	89,8
Tat (30 ng/ml)+ M2 inmune (semana 15)	78,7
Tat (30 ng/ml)+ M3 inmune (semana 15)	100
Tat (30 ng/ml)+ M4 inmune (semana 15)	100
Tat (30 ng/ml)+ M5 inmune (semana 15)	70,8
Tat (30 ng/ml)+ M6 inmune (semana 15)	94,2
Tat (60 ng/ml)+ M1 preimmune	0
Tat (60 ng/ml)+ M2 preimmune	0
Tat (60 ng/ml)+ M3 preimmune	0
Tat (60 ng/ml)+ M4 preimmune	0
Tat (60 ng/ml)+ M5 preimmune	0
Tat (60 ng/ml)+ M6 preimmune	0
Tat (60 ng/ml)+ M1 inmune (semana 21)	96,3
Tat (60 ng/ml)+ M2 inmune (semana 21)	100
Tat (60 ng/ml)+ M3 inmune (semana 21)	100
Tat (60 ng/ml)+ M4 inmune (semana 21)	98,7
Tat (60 ng/ml)+ M5 inmune (semana 21)	99
Tat (60 ng/ml)+ M6 inmune (semana 21)	98,8
Tat (120 ng/ml)+ Conjunto M1-6 preimmune	0
Tat (120 ng/ml)+ M1 inmune (semana 21)	59,2
Tat (120 ng/ml)+ M2 inmune (semana 21)	90,4
Tat (120 ng/ml)+ M3 inmune (semana 21)	96,8
Tat (120 ng/ml)+ M4 inmune (semana 21)	98,3
Tat (120 ng/ml)+ M5 inmune (semana 21)	100
Tat (120 ng/ml)+ M6 inmune (semana 21)	97,8
Tat (240 ng/ml)+ Conjunto M1-6 preimmune	0
Tat (240 ng/ml)+ M1 inmune (semana 21)	26,1
Tat (240 ng/ml)+ M2 inmune (semana 21)	49,4
Tat (240 ng/ml)+ M3 inmune (semana 21)	70,3
Tat (240 ng/ml)+ M4 inmune (semana 21)	91,2
Tat (240 ng/ml)+ M5 inmune (semana 21)	94,5
Tat (240 ng/ml)+ M6 inmune (semana 21)	86
Tat (500 ng/ml)+ Conjunto M1-6 preimmune	0
Tat (500 ng/ml)+ M1 inmune (semana 21)	32,7
Tat (500 ng/ml)+ M2 inmune (semana 21)	38,9
Tat (500 ng/ml)+ M3 inmune (semana 21)	57,5
Tat (500 ng/ml)+ M4 inmune (semana 21)	89,4
Tat (500 ng/ml)+ M5 inmune (semana 21)	72
Tat (500 ng/ml)+ M6 inmune (semana 21)	71,8

^a Se determinó la capacidad del plasma anti-Tat para neutralizar la actividad de Tat en células HLM-1, como se describe en la leyenda de la Tabla 4. Se añadió proteína Tat recombinante (30 ng/ml, 60 ng/ml, 120 ng/ml, 240 ng/ml y 500 ng/ml) sola o junto con un volumen igual de plasma preimmune de mono en la semana 15 o 21 (plasma inmune). Se vacunaron los monos M1-3 con 10 µg de Tat en 250 µl de suero autólogo y 250 µl de RIBI; se vacunaron los monos M4-6 con 10 µg de Tat en 250 µl de suero autólogo y 250 µl de Alum; se inyectaron dos monos control con RIBI (250 µl y 250 µl de suero autólogo) (M7) o con Alum (250 µl y 250 µl de suero autólogo) (M8). Los resultados se representan como se describe en la leyenda de la Tabla 4.

ES 2 293 700 T3

La capacidad del plasma de mono para neutralizar la actividad de Tat extracelular liberada por las células durante la infección aguda se analizó en células CEM x 174 infectadas con el virus quimérico SHIV 89.6P. El día 7 después de la infección se observó replicación viral en el 50% de las células control infectadas con SHIV y cultivadas con el plasma preinmune de los monos M1-6. A la inversa, la replicación viral no fue detectada en las células infectadas que fueron cultivadas en presencia del plasma inmune extraído de los monos M1-6 en la semana 44 (Tabla 10).

TABLA 10

Actividad neutralizante del plasma inmune en la transmisión de la infección viral^a

Muestra	p27 (pg/ml)
SHIV + M1 preinmune	Neg
SHIV + M2 preinmune	Neg
SHIV + M3 preinmune	1,080
SHIV + M4 preinmune	0,602
SHIV + M5 preinmune	1,169
SHIV + M6 preinmune	Neg
SHIV + M1 inmune	Neg
SHIV + M2 inmune	Neg
SHIV + M3 inmune	Neg
SHIV + M4 inmune	Neg
SHIV + M5 inmune	Neg
SHIV + M6 inmune	Neg

^a Se infectaron células CEM x 174 (3×10^4 células/150 μ l) en placas de 96 pocillos con el virus quimérico SHIV 89.6P (5×10^{-5} TCID₅₀/célula) durante 2 horas a 37°C en RPMI 1640 que contenía 10% de FCS. Se lavaron las células dos veces con RPMI 1640 y se resuspendieron en 150 μ l de medio completo que llevaba añadido 5% del plasma preinmune o plasma inmune de mono (semana 44) de los animales vacunados con Tat recombinante (10 μ g) y RIBI (M1-3) o Alum (M4-6). Los plasmas de los animales se calentaron previamente a 56°C durante 30 min y se analizaron por ELISA para controlar los títulos de anticuerpos anti-Tat. Se ensayó cada suero por duplicado. Los días 3, 5 y 7 después de la infección se recogieron 120 μ l de medio de cultivo y se sustituyeron con igual volumen de medio fresco que contenía 5% de plasma preinmune o de plasma inmune de los monos M1-6. Se determinó la capacidad del plasma para neutralizar la Tat extracelular, liberada durante la infección aguda, y para controlar la transmisión de la infección *in vitro* mediante la detección del Gag p27 viral en el medio de cultivo por ELISA (Coulter International, Miami, FL). Los resultados, representados como valores p27 (pg/ml), corresponden al valor medio de dos pocillos para cada suero el día 7 después de la infección.

Además, se observó una respuesta proliferativa a Tat desde la semana 11 (Tabla 11).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 293 700 T3

TABLA 11

Respuesta proliferativa a Tat^a

Mono	Estimulo	Semanas desde la inmunización primaria									
		0	11	15	21	28	32	36	40	44	50
M1	PHA	16,96	10,50	15,27	33,8	7,2	51,5	64,3	36,05	24	65,7
	TT	11,69	1,96	3,01	1,2	1,2	1,3	0,93	1,4	10,05	7,2
	Tat	1,12	1,55	0,52	1,7	0,8	0,8	0,6	0,7	9,27	4,7
M2	PHA	31,27	25,75	21,28	87,1	25,7	56	38,2	40,3	29,03	26
	TT	1,12	1,8	0,57	1,7	1,15	1,6	4,95	1,2	1,51	2,9
	Tat	1,08	3,65	6,22	14,14	3,5	1,8	4,1	1,9	7,67	13,2
M3	PHA	22,42	7,89	16,88	36,3	148,5	42	78,9	27	53,71	ND
	TT	11,43	0,95	1,71	1,25	1,2	1,1	1	1	1,81	ND
	Tat	1,65	2,69	18,82	23,51	12,03	0,9	1,3	0,5	23,85	ND
M4	PHA	3,88	20,77	15,22	83,7	18,6	35	38,2	45,2	57,47	15,8
	TT	2,85	4,49	9,07	6,9	15,8	3,7	3,8	5	19,77	6,6
	Tat	1,29	3,01	3,24	7,9	10,1	2,6	1,5	3,9	33,61	4,7
M5	PHA	6,25	5,74	16,74	72,2	7,45	41	56,5	32,9	33,85	12
	TT	2,31	1,07	4,84	3,9	0,9	0,83	1,4	1,24	10,22	1,95
	Tat	1,80	0,66	1,76	3,6	2,22	0,8	1,14	1,3	1,33	1,4
M6	PHA	11,96	17,94	2,77	29,4	7,3	25	8,3	6,85	18,01	5,2
	TT	4,14	1,71	0,13	1,7	10,34	1,3	1,8	1,1	2,49	0,9
	Tat	1,37	1,06	0,11	2,95	9,3	1,13	1,3	1	5,8	0,3
M7	PHA	21,65	20,30	37,93	17,6	17,9	75	12,9	34,8	41,81	27,5
	TT	0,97	0,80	0,88	1	0,6	1,04	0,6	0,4	1,11	1,1
	Tat	1,78	0,68	0,73	1	0,42	0,9	0,5	0,8	1,07	0,4
M8	PHA	26,51	67,09	16,38	14,9	17,2	28,2	18,95	20,6	28,61	13,6
	TT	1,20	10,78	0,20	1,6	0,62	0,8	1,2	0,9	1,11	2,1
	Tat	1,12	0,00	0,21	1,03	0,57	0,6	0,5	0,9	1,04	1

^a Se aislaron linfocitos de la sangre periférica, se activaron con PHA (4µg/ml), toxoide tetánico (TT) (10 µg/ml) y Tat (5 µg/ml) y se ensayaron como se describe en la leyenda de la Tabla 5. Se inocularon los monos M1-3 con 10 µg de proteína Tat recombinante en 250 µl de suero autólogo y 250 µl de RIBI; se inocularon los monos M4-6 con 10 µg de Tat recombinante en 250 µl de suero autólogo y 250 µl de Alum; se inocularon dos monos control con RIBI (250 µl y 250 µl de suero autólogo) (M7) y con Alum (250 µl y 250 µl de suero autólogo) (M8). ND, no realizado.

Se detectó una fuerte respuesta de células T citotóxicas (CTL) en un mono vacunado con la proteína Tat y RIBI (M1) y en dos monos vacunados con la proteína Tat y Alum (M4 y M5), mientras que se observó una respuesta CTL más débil en el mono M6 inmunizado con Tat y Alum (figura 9 y Tabla 12).

ES 2 293 700 T3

TABLA 12

Análisis de la respuesta CTL

Mono	Semana	Relación objetivo:efector						Actividad CTL
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Media	
M1	28	5,9	4,7	4,1	7,9	5,3	5,5	+
	36	ND	14,4	8,8	4,9	6,7	8,7	+
M2	28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M3	28	0	0	0	0	0	0	-
	36	ND	0	0,6	0,5	2,0	0,7	-
M4	28	0	0	1,1	1,1	2,6	0,9	-
	36	ND	2,7	8,3	15	1,9	6,9	+
M5	28	4,9	3,9	4,7	5,5	1,7	4,1	+
	36	0	1	0	0	0	0,2	-
M6	28	0	2,6	1,1	7,2	7,2	3,6	+/-
	36	ND	0	0	0	0	0	-
M7	36	0	0	0	0	0	0	-
	36	0	0	0	0	0	0	-

^a Se realizó el ensayo como se describe en la Tabla 6. Se inmunizaron los monos M1-3 con 10 µg de Tat recombinante en 250 µl de suero autólogo y 250 µl de RIBI; se inocularon los monos M4-6 con 10 µg de Tat recombinante en 250 µl de suero autólogo y 250 µl de Alum; se inocularon dos monos control con RIBI (250 µl y 250 µl de suero autólogo) (M7) y Alum (250 µl y 250 µl de suero autólogo) (M8). ND, no realizado.

En la semana 44, se determinó la presencia de la actividad antiviral total (TAA). Se midió la TAA como la capacidad de las PBMC de los monos vacunados con proteína Tat recombinante, cultivadas en presencia de suero autólogo, para ser resistentes a la infección con SHIV 89.6P (Tabla 13).

TABLA 13

Análisis de la presencia de actividad antiviral total (TAA)^a

ID del mono	Días después de la infección	
	7	17
	Dosis infecciosa mínima (TCID ₅₀ /célula)	Dosis infecciosa mínima (TCID ₅₀ /célula)
M1	10 ⁻²	10 ⁻²
M2	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
M3	10 ⁻³	10 ⁻³
M4	10 ⁻²	10 ⁻²
M5	10 ⁻²	10 ⁻²
M6	10 ⁻³	10 ⁻³
M7	10 ⁻³	10 ⁻³
M8	10 ⁻⁴	10 ⁻³

^a Se recogieron en la semana 44 las PBMC de los monos vacunados con la proteína Tat recombinante (10 µg) y RIBI (M1-3) o Alum (M4-6) y de los monos control inoculados con RIBI (M7) o Alum (M8). Las PBMC, purificadas por gradiente de Ficoll y sembradas por triplicado a 5 x 10⁵/200 µl por pocillo en placas de 48 pocillos, se cultivaron en RPMI 1640 que contenía 10% de FCS y 5% de plasma autólogo previamente calentado a 56°C durante 30 min, en presencia de un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (5 ng/ml) e IL-2 (2 U/ml), durante 48-72 horas a 37°C. Se infectaron las células con diluciones en serie del virus quimérico SHIV 89.6P (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ TCID₅₀/célula) durante 2 horas a 37°C, se lavaron 3 veces con PBS-A y se resuspendieron en 50% de medio acondicionado y 50% de medio fresco a 5 x 10⁵ células/ml/pocillo. En los días 3, 7, 10, 14 y 17 después de la infección, se recogieron alícuotas de medio de cultivo y se sustituyeron con volúmenes iguales de medio fresco. Se determinó la replicación viral en los sobrenadantes celulares por p27 Gag ELISA (Coulter International, Miami, FL). Los resultados se muestran como la dosis infecciosa mínima de SHIV (TCID₅₀/célula) en los días 7 y 17 después de la infección capaz de infectar los linfocitos del mono.

ES 2 293 700 T3

Los resultados demuestran la presencia de actividad antiviral soluble mediada por los linfocitos T CD8+ (CAF) (Tabla 14). Se observó un incremento global de la actividad CAF en los monos vacunados en comparación con los animales control.

TABLA 14

Análisis de la presencia de actividad antiviral soluble mediada por linfocitos T CD8+ (CAF) ^a

Mono ID	Semanas después de la inmunización primaria	% de inhibición de la replicación viral	
		Infección aguda	Infección crónica
M1	0	8	30
	32	53	53
M2	0	36	0
	32	60	27
M3	0	0	37
	32	55	29
M4	0	45	0
	32	85	66
M5	0	41	0
	32	ND	ND
M6	0	49	18
	32	34	41,4
M7	0	39	39
	32	71	44
M8	0	37	0
	32	76	26,8

^aAnálisis de la presencia de actividad antiviral soluble mediada por linfocitos T CD8+ (CAF) de los monos vacunados con proteína Tat recombinante (10 µg) y RIBI (M1-3) o Alum (M4-6), y de los monos control inoculados con RIBI (M7) o Alum (M8). Se analizó la infección aguda sobre células CEM x 174 infectadas con SHIV 89.6P. Se realizó el ensayo como se describe en la Tabla 7 y los resultados se refieren al día 7 después de la infección. La presencia de CAF sobre el sistema de infección crónica se analizó en la línea de células U1 (Ref. 47), que es una línea de células humanas promonocíticas infectadas crónicamente por HIV-1. Las células U1 sembradas a 10^4 células/200 µl por pocillo en placas de 96 pocillos, se incubaron con PMA (10^{-8} M) para inducir la reactivación de la infección por HIV-1, con o sin diferentes volúmenes (50 µl, 5 µl, 0,5 µl) de sobrenadantes del cultivo procedentes de linfocitos T CD8+ derivados de los monos vacunados y de los monos control. Tres días después de tratamiento con PMA, se determinó la presencia de HIV-1 en el medio de cultivo por ensayo RT o p24 Gag ELISA. Los resultados se muestran como % de inhibición de la replicación de HIV-1 en células tratadas con sobrenadantes de células T CD8+ en comparación con las células no tratadas. Los resultados de la inhibición de la infección aguda y crónica se refieren a las células tratadas con 5 µl de sobrenadantes CD8+.

Se determinó también la producción de citocinas (γIFN, IL-4, TNFα) y de la quimiocina RANTES a partir de las PBMC de monos vacunados con Tat y RIBI (M1-3) o Tat y Alum (M4-6) y de los monos control M7 y M8 (Tabla 15).

TABLA 15

Análisis de la producción de citocinas y quimiocinas

Mono	Control				PHA				TT			
	γIFN	IL-4	TNFα	RANTES	γIFN	IL-4	TNFα	RANTES	γIFN	IL-4	TNFα	RANTES
M1	-/-	-/-	-/-	-/-	988/1096	-/-	948/-	1788/2564	-/-	-3,8	-/-	Nd/Nd
M2	-/-	-/-	126/-	-/-	325/280	-/-	244/172	292/284	86/66	-/-	-/-	Nd/Nd
M3	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd
M4	-/-	-/-	-/-	-/-	426/66	-/-	98/-	-/284	-/-	-/-	-/224	Nd/Nd
M5	-/-	-/-	48/-	-/-	279/303	-/-	416/-	536/608	-/-	-/-	-/-	Nd/Nd
M6	-/-	-/-	-/-	246/-	255/137	-/-	-/-	1124/268	-/-	-/-	-/266	Nd/Nd
M7	-/-	-/-	-/-	-/-	150/169	-/-	40/-	1228/976	-/-	-/4	-/nd	Nd/Nd
M8	-/-	-/-	-/-	-/-	0/0	20/32	60/-	2160/1588	-/-	-/-	-/nd	Nd/Nd

Mono	Tat (1 µg)				Tat (5 µg)			
	γIFN	IL-4	TNFα	RANTES	γIFN	IL-4	TNFα	RANTES
M1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	16/-	-/-
M2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
M3	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd
M4	-/-	-/-	378/430	-/-	-/-	-/-	344/352	-/-
M5	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	150/-	-/-
M6	-/-	-/-	-/-	-/-	-78	-/-	-/-	-/-
M7	-/40	-/3,3	84/-	-/-	-/-	-/3,2	-/-	-/-
M8	-/-	-/4,8	-/-	-/-	-/-	-/10	-/-	726/528

^aAnálisis de la producción de citocinas y quimiocinas después de 48 y 96 horas de cultivo (48/96) a partir de las PBMC de monos vacunados con 10 µg de Tat y RIBI (M1-3) o Alum (M4-6). Se inocularon los monos control (M7 y M8) con adyuvantes RIBI o Alum, respectivamente. Las PBMC, extraídas en la semana 44 y purificadas por gradiente de Ficoll, se sembraron a 1×10^6 células/ml por pocillo en placas de 24 pocillos y se cultivaron en RPMI 1640 que contenía el 10% de FCS. Las PBMC permanecieron sin estimular (control), para evaluar la liberación espontánea de citocinas y quimiocinas, o se estimularon con PHA (2 µg/ml), toxoide tetánico (TT, 5 µg/ml) o Tat (1 o 5 µg/ml). Se recogieron alícuotas de los sobrenadantes de cultivo a las 48 y 96 horas después de la estimulación para determinar la presencia de citocinas y quimiocinas, por medio de kits comerciales ELISA de BioSource International (Camarillo, CA, USA) para ensayar la producción de citocinas, y de R&D Systems (Abingdon, Oxon, UK) para evaluar la producción de RANTES. Los resultados se muestran como pg/ml a las 48 y 96 horas de cultivo (48/96), respectivamente. Los valores de corte fueron (pg/ml): γ IFN, 31,2; IL-4, 3,12; TNF α , 15,6; RANTES, 6,25. Los valores (-), fueron más bajos que los correspondientes valores de corte. Nd: no realizado.

Por otra parte, en la semana 15 cinco monos vacunados con la proteína recombinante (M2- 6), presentaron una reacción positiva a la prueba de sensibilidad (skin test) frente a Tat, con un fuerte retraso de la reacción de hipersensibilidad (Tabla 16 y figura 19). En los monos 4 y 5 la reacción del skin test fue incluso más fuerte en las siguientes semanas (Tabla 16).

TABLA 16

Prueba de sensibilidad (skin-test) a Tat^a

Mono	Semanas desde la inmunización primaria						
	11	15	21	28	32	36	44
M1	-	-	-	-	-	-	-
M2	-	+	+	+/-	+/-	+	+/-
M3	+/-	+	+/-	+/-	-	-	-
M4	-	+	++	++	++	++	++
M5	+/-	+	++	+	++	++	+
M6	-	+	+/-	+/-	-	-	-
M7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^aSe inocularon Tat (1 y 5 µg) en 150 µl de PBS-0,1% de BSA o el tampón solo por vía intradérmica en un área afeitada de la espalda de los monos vacunados. Los animales control no fueron inoculados (ND, no realizado) en las semanas 11, 15, 21, 28, 32, 36 y 44 después de la primera inmunización. Se vacunaron los monos M1-3 con 10 µg de proteína Tat recombinante en 250 µl de suero autólogo y 250 µl de RIBI; se vacunaron los monos M4-6 con 10 µg de proteína Tat recombinante en 250 µl de suero autólogo y 250 µl de Alum; se inocularon dos monos control con RIBI (250 µl y 250 µl de suero autólogo) (M7) o Alum (250 µl y 250 µl de suero autólogo) (M8). La presencia de un nódulo eritematoso después de 48-72 horas parece indicar un retraso de la reacción de hipersensibilidad (DTH): ++, $\varnothing \geq 5$ mm; +, $\varnothing \geq 1-4$ mm; +/-, eritema sin endurecimiento; -, $\varnothing < 1$ mm.

Los resultados post-enfrentamiento indican que 4 de 6 (67%) monos vacunados estaban protegidos contra la infección con 10 MID₅₀ de SHIV 89.6P, como se muestra por los resultados de los ensayos virológicos (Tabla 17). Particularmente, no se detectó el antígeno p27 Gag en el plasma de los monos M1, M2, M4 y M6, no se encontró el DNA proviral mediante la PCR en los linfocitos de estos monos y la citoviremia fue negativa. Los monos M3 y M5 estaban infectados como se muestra por la presencia de antígeno p27 Gag en el plasma, por la detección de DNA proviral en las células y por una citoviremia positiva (Tabla 17). Ambos controles (M7 y M8) resultaron infectados, basándose en los mismos ensayos virológicos. Para controlar adicionalmente la infectividad de la dosis viral usada para el enfrentamiento, se añadió otro mono natural (M13) a los animales control y se infectó con 2,85 MID₅₀ de SHIV 89.6P (correspondiente a una dosis de virus 3,5 veces más baja que la dosis usada para el enfrentamiento de los animales en el protocolo). El mono M13 resultó que estaba infectado basándose en todos los ensayos virológicos. Para confirmar que los animales habían estado expuestos al virus, se analizó la presencia de anticuerpos contra los antígenos SIV, codificados por el virus quimérico SHIV 89.6P (Gag, Pol, RT, Nef), como ya se ha descrito en este Ejemplo. La presencia de anticuerpos anti-SIV en los monos que fueron negativos para los parámetros virológicos (M1, M2, M4 y M6) confirma que estos animales estuvieron expuestos al virus e indica que en estos monos había tenido lugar una infección frustrada de SHIV. Se estudiaron los monos que presentaban títulos bajos de anticuerpos anti-SIV en cuanto a la producción *in vitro* de IgG antiviral específica (IVAP) (Ref. 177, 178) según el siguiente método. Se sembraron PBMC (2×10^6 /pocillo) en placas de 24 pocillos y se estimularon con PWM (2 µg/ml, Sigma, St. Louis, USA). Después de 7 días de incubación (a 37°C en presencia de 5% de CO₂ y 95% de humedad) se recogieron los sobrenadantes del cultivo para ensayar la producción de anticuerpos anti-HIV mediante un kit Elisa comercial para la detección de anticuerpos HIV-1 y HIV-2 (Abbott, HIV-1/HIV-2 EIA Third Generation Plus). Todos los monos enfrentados resultaron positivos en cuanto a la producción de anticuerpos anti-HIV Env, puesto que HIV-1 Env está presente en el SHIV 89.6P.

TABLA 17

Días después del enfrentamiento con SHIV89.6P

ES 2 293 700 T3

Análisis de los parámetros virológicos después del enfrentamiento de los monos vacunados con 10 µg de proteína Tat recombinante y RIBI (M1-3) o Alum (M4-6). Los monos control (M7 y M8) se inocularon con RIBI o Alum, respectivamente. El mono M13 era un animal natural infectado con 2,85 MID₅₀ de SHIV 89.6P.

5 ^aSe evaluó la antigenemia plasmática por p27 Gag ELISA (Innogenetics, Belgium) y se expresa como valores p27 (pg/ml). Neg, el valor fue más bajo que el correspondiente valor de corte (18 pg/ml).

10 ^bSe purificó el DNA de la sangre entera usando el kit QIAamp blood kit (Angiogen GmbH and Qiagen Inc., Hilden, Germany). La calidad del DNA se controló mediante amplificación por PCR del gen β-globina, como se ha descrito previamente (Ref. 141). La presencia de DNA proviral se analizó mediante amplificación semicuantitativa por PCR de SIV gag. Se realizó la PCR sobre 1 µg de DNA celular usando cebadores SG 1096Ngag (que corresponden a los nucleótidos 1096-1119 del genoma SIVmac251: 5'TTAGGCTACGACCCGGCGGAAAGA3') (Seq ID No 35) y SG1592CgagD (cartografía en los nucleótidos 1569-1592 del genoma SIVmac251: 5'ATAGGGGGTGCAGCCTTCTGACAG3') (Seq ID No 36) que amplifican un fragmento de 496 pares de bases del gen gag de SHIV, como ha sido descrito (Ref.153). Para cuantificar el número de copias de DNA proviral, se preparó en cada experimento una curva estándar usando el plásmido pCMRII-Δgag (que contiene una delección de 100 pares de bases en el gen gag de SIVmac251) como un modelo de DNA y los cebadores descritos antes que amplifican un fragmento de DNA de 396 pares de bases. Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis y se cuantificaron por análisis densitométrico (Ultrascan LX Enhancer Laser, LKB, Bromma, Sweden). La relación entre los valores OD y el número de moléculas del plásmido Δgag se correlacionó por medio de análisis de regresión lineal (Statgraphics, Manugistics, Inc. Cambridge, MA). Los valores OD eran lineales hasta 1000 moléculas (coeficiente de correlación = 0,954± 0,026). Se determinó el número de copias de DNA proviral de SHIV/µg de DNA celular extrapolando los valores OD de cada muestra a la curva estándar. La sensibilidad del ensayo fue 1 copia de provirus/µg de DNA.

25 ^cSe determinó la citoviremia en ensayos de co-cultivo. A este fin, se cultivaron 1 x 10⁴ células CEM x 174 en presencia de diluciones en serie de PBMC con CD-8 agotado bajo estudio (un total de 12 diluciones, de 1 x 10⁶ a 3,9 x 10³ células por pocillo) en placas de 96 pocillos. En los días 3, 7 y 10 después de la infección, se separaron 150 µl para ensayar la presencia de p27 Gag por ELISA (Innogenetics, Belgium) y se sustituyeron con un volumen igual de medio fresco. Se analizaron los resultados por medio de la fórmula de Reed and Muench para determinar el número de PBMC infectadas productivamente por millón de células totales.

30 ^dSe determinó la presencia de anticuerpos contra SHIV en diluciones en serie de plasma del animal ensayado por duplicado usando el kit Elavias Ac-Ab-Ak II (Diagnostic Pasteur, Paris, France), según las instrucciones del fabricante. Se muestra la dilución más alta a la que los valores plasmáticos fueron más altos que el valor de corte.

35 ^eSe realizó el aislamiento del virus, en lugar de la citoviremia, para el mono M13. Con este fin, se cultivaron las PBMC (3 x 10⁶) de los monos infectados con diferentes dosis de SHIV 89.6P, purificadas por Ficoll, con células CEM x 174 (1 x 10⁶) en 1 ml de medio que contenía 10% de FCS. Después de 24 horas, se diluyeron las células a 1 x 10⁶/ml y se cultivaron durante tres días. Se recogieron entonces 2 ml de medio y se volvieron a sembrar las células a 3 x 10⁵/ml en 7 ml. Se despreció el exceso de células. Este procedimiento se repitió dos veces por semana durante 4 semanas. Se determinó la presencia de virus por p27 Gag ELISA (Innogenetics, Belgium) y después por ensayo RT. El aislamiento del virus se consideró positivo (+) cuando ambos ensayos (p27 y RT) fueron positivos en 3 muestras secuenciales.

40 A la inversa, el aislamiento del virus se consideró negativo (-).

45 ^fSe realizó una PCR cualitativa de DNA para el mono M13.

50 Los datos virológicos se solapan con el número absoluto de linfocitos CD4 que resultó espectacularmente reducido en los monos infectados (M3, M5, M7, M8) y fue alto y estable en los animales virus-negativos (M1, M2, M4, M6) como se muestra en la Tabla 18.

55

60

65

TABLA 18

Análisis FACS de linfocitos CD4+ y CD8+^a

Mono	Días post-enfrentamiento con SHIV89.6P											
	0				15				30			
	%				%				%			
	(células/ μ l)		(células/ μ l)		(células/ μ l)		(células/ μ l)		(células/ μ l)		(células/ μ l)	
	CD4+	CD8+	CD4+/ CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/ CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/ CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/ CD8+
M1	32,1 (1490)	53 (2460)	0,6	ND	ND	ND	30,8 (2420)	57,3 (4500)	0,54	30,6 (2460)	57,9 (4670)	0,53
M2	27,7 (1550)	45,3 (2530)	0,6	ND	ND	ND	35,5 (2120)	43,7 (2610)	0,81	29,6 (2000)	42,4 (2870)	0,7
M3	33 (1120)	39,3 (1340)	0,84	ND	ND	ND	3,1 (190)	75,6 (4660)	0,04	6,2 (240)	70 (2750)	0,09
M4	16,6 (670)	68,3 (2740)	0,24	ND	ND	ND	17,25 (2050)	68,7 (8180)	0,25	15,5 (1520)	75 (7350)	0,21
M5	36,3 (2770)	43,9 (3350)	0,83	ND	ND	ND	1,1 (90)	82,3 (1300)	0,01	4,1 (480)	75,5 (8730)	0,05
M6	35,3 (1210)	43,4 (1490)	0,81	ND	ND	ND	35,9 (1240)	45,5 (1570)	0,79	37,8 (3700)	43,7 (4280)	0,86
M7	36,1 (1610)	31,3 (1400)	1,15	ND	ND	ND	7,4 (480)	66,1 (4260)	0,11	13,7 (860)	56,7 (3550)	0,24
M8	25,7 (850)	51,3 (1710)	0,5	ND	ND	ND	3,3 (210)	76,2 (4840)	0,04	8,1 (590)	64,9 (4670)	0,13
M13	40,5 (2590)	39,7 (2544)	1,01	38,4 (434)	33,6 (380)	1,14	35,1 (1721)	32,2 (1479)	1,16	3,1 (111)	62,3 (2225)	0,05

^aAnálisis FACS de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ de los monos vacunados con 10 µg de proteína Tat recombinante y RIBI (M1-3) o Alum (M4-6). Los monos control (M7 y M8) fueron inoculados solamente con los adyuvantes RIBI o Alum, respectivamente. El mono M13 era un animal natural infectado con 2,85 MID₅₀ de SHIV 89.6P. Se llevó a cabo el análisis por separación celular activada por fluorescencia (FACS) como está descrito (Ref. 137), usando anticuerpos monoclonales marcados (anti-CD4-FITC, BioSource; anti-CD8-PerCp, Becton-Dickinson). ND, no realizado.

Los resultados antes del enfrentamiento indican que Tat como inmunógeno, así como RIBI y Alum como adyuvantes (o ISCOM que fue usado como adyuvante en la última dosis de refuerzo), fueron bien tolerados por los animales y no fueron tóxicos, confirmando los resultados de seguridad y tolerabilidad de la inmunización con Tat obtenidos en el primer experimento piloto. Además, estos datos confirman las observaciones del primer experimento piloto, apoyando signos adicionales del hecho de que la proteína Tat recombinante provoca una fuerte respuesta humoral y celular específica para Tat con efectos antivirales *in vitro* e *in vivo*. Los resultados post-enfrentamiento (4 de 6 de los monos protegidos) confirman la expectación de los resultados *in vitro* e indican que una vacuna anti-Tat induce la protección contra la infección y por tanto contra la enfermedad. El seguimiento de los dos monos vacunados e infectados aclarará los efectos de la vacunación sobre la progresión de la enfermedad.

Ejemplo 5

20 *Inoculación en Macaca fascicularis de una vacuna anti-DNA Tat: análisis de seguridad, tolerabilidad, respuesta inmunitaria específica y eficacia de la protección contra el enfrentamiento viral (no reivindicada)*

Se propone la inoculación directa de DNA del plásmido pCV-Tat, que contiene el cDNA del gen *tat*, y del plásmido pCV0 como DNA control. Los DNA plásmidos a ser administrados a los animales se amplifican en *E. coli* (cepa DH5) según procedimientos estándar (Ref. 110) y protocolos establecidos por la "Agencia Europea para la evaluación de medicamentos; Unidad de Evaluación de Medicina Humana" (Technical Report Series No. 17 January 1997), se purifican por dos gradientes CsCl y se dializan durante 48-72 horas frente a 100 volúmenes de PBS. Se chequean entonces los DNA mediante digestión con la enzima de restricción. La funcionalidad del DNA plásmido se controla mediante la transfección de 5-10 µg de DNA usando técnicas de fosfato de calcio (Ref. 110) en células H3T1 (1 x 10⁶), que contienen una copia integrada del plásmido informador LTR-CAT de HIV-1, y 48 horas más tarde, mediante el análisis de la actividad CAT (Ref. 55). Se evaluaron la tolerabilidad, la seguridad, la capacidad para provocar una respuesta inmunitaria específica (tanto humoral como celular) y la eficacia de la protección contra el enfrentamiento al virus después de la inmunización con el DNA plásmido pCV-Tat en monos cinomolgus (*Macaca fascicularis*). En un primer experimento piloto, se inmunizaron tres monos según el siguiente programa: se inoculó el mono M1 con 200 µg de pCV-Tat en 300 µl de PBS por vía i.d. en 2 sitios de la espalda, cerca de los nódulos linfáticos axilares (150 µl/sitio); se inoculó el mono M2 con 500 µg de pCV-Tat en 500 µl de PBS por vía i.m. en 2 sitios de la espalda (250 µl/sitio). En los días 1 o 5 antes de la inoculación i.m., se inyectaron 250 µl de solución fisiológica, que contiene 0,5% de bupivacaína y 0,1% de metilparabeno, en los dos sitios, previamente marcados, donde el DNA plásmido tenía que ser inoculado. Esto se realizó con el fin de incrementar la absorción y expresión de DNA en el músculo (Ref. 37, 45). El mono M3 no fue inoculado y se usó como un animal control. Sin embargo, a partir de la semana 10, este mono fue inoculado con 6 µg (5 + 1 µg) i.d. de Tat como un control para las pruebas de sensibilidad (skin tests). Se extrajeron 10 ml de sangre de todos los monos en los días 42 y 35 precedentes a la primera inoculación para análisis de los parámetros basales. Se inocularon los monos al tiempo 0 y después a las 5, 10, 15, 22, 27, 32 y 37 semanas. Finalmente, en la semana 42, los animales recibieron la última dosis de refuerzo con la proteína Tat recombinante (16 µg) en 200 µl de ISCOM y 300 µl de PBS. Se observaron los animales diariamente en cuanto a los parámetros clínicos como se describe en el Ejemplo 4. Además, se extrajeron 10 ml de sangre el mismo día de la inoculación como se describe en el Ejemplo 4. Se determinó el efecto protector de la vacunación después del enfrentamiento de los monos con 10 MID₅₀ de SHIV89.6P, que fue inyectado por vía intravenosa en la semana 65. El seguimiento del post-enfrentamiento, todavía en curso, se realizó como se describe en el Ejemplo 4. Los resultados de este experimento son como sigue. En dos monos vacunados y en el mono control no se observaron alteraciones de los parámetros clínicos, hematológicos ni de comportamiento. No se observaron signos inflamatorios ni de neovascularización en el sitio de la inyección. Estos resultados indican que el DNA pCV-Tat fue bien tolerado por los animales y no fue tóxico a la dosis y vías de inoculación usadas en el experimento. El mono M1, vacunado con 200 µg de DNA por vía i.d., desarrolló anticuerpos IgG específicos de Tat desde la semana 32 (Figura 11). Los títulos de anticuerpos (desde la semana 32 a la semana 58) variaron entre 1:100 y 1:800 (Figura 12). En la semana 37, el análisis de la cartografía del epítipo (realizada como se describe en la leyenda de la Figura 4) demostró que estos anticuerpos estaban dirigidos contra regiones específicas de Tat, cartografía en los aa 1-20, aa 46-60 y aa 65-80, con títulos de 1:200, 1:100 y 1:50, respectivamente (no se muestran datos). En el mono M2, vacunado con 500 µg de DNA por vía i.m., apenas se detectaron anticuerpos anti-Tat (con un título 1:50, que no se muestra) durante todo el periodo del estudio. Los resultados se muestran en la Figura 11. Se determinó la capacidad del plasma del mono M1, vacunado con 200 µg de DNA por vía i.d., para neutralizar la actividad Tat ensayando la inhibición del rescate de la replicación viral en células HLM1 incubadas con proteína Tat exógena, como se describe en el Ejemplo 4. Este ensayo demostró que el plasma del mono M1, diluido 1:2, y obtenido en la semana 37, redujo la replicación viral inducida por 30 ng/ml de Tat exógena. A la inversa, el plasma del mismo mono obtenido al tiempo 0 (preinmune) no bloqueó la Tat extracelular (Tabla 19).

ES 2 293 700 T3

TABLA 19

Actividad neutralizante del plasma sobre el rescate de la infección viral inducida por Tat extracelular^a

Muestras	Inhibición
Tat + M1 preimmune	0
Tat + M1 immune	51

^aSe determinó la capacidad de los anticuerpos anti-Tat para neutralizar la actividad Tat en las células HLM1 añadiendo 30 ng/ml de proteína Tat recombinante, previamente incubada con un volumen igual de plasma obtenido en el tiempo 0 (preimmune) o en la semana 37 (immune) del mono M1, vacunado con 200 µg de DNA plásmido pCV-Tat por vía i.d. Se llevó a cabo el ensayo y se expresaron los resultados como se describe en la Tabla 4.

Los resultados mostrados en la Tabla 20 demuestran la presencia de una respuesta proliferativa a Tat en la semana 42 en el mono M1 inmunizado con 200 µg de DNA por vía i.d., mientras que en el mono M2 este tipo de respuesta celular no fue detectado.

TABLA 20

Respuesta proliferativa a Tat^a

Mono	Estímulo	Semanas después de la inmunización primaria							
		15	22	27	32	37	42	48	58
M1	PHA	32,9	45	89,3	40,5	3,1	13,3	ND	13,1
	TT	0,8	2,7	1,5	1,3	0,6	9	1,2	1,6
	Tat	0,9	1,7	1,2	1,1	1,1	5,9	1	1
M2	PHA	11,7	18,5	21,8	32,2	1,1	6,2	7	18,9
	TT	0,9	1,8	0,8	1,1	1	1,5	1,1	1
	Tat	0,8	1,4	0,9	1,1	1,1	1,3	1,1	1
M3	PHA	5,1	19,9	18,2	6,6	8,1	77,8	ND	2,1
	TT	7,2	6,2	5,5	2,8	5,6	36,8	1	2,1
	Tat	2,1	1,4	2,2	0,7	1,5	2,8	0,8	0,9

^aSe aislaron PBMC, se estimularon con PHA (4 µg/ml), toxoide tetánico (TT) y Tat (1 o 5 µg/ml) y se analizaron como se describe en la Tabla 5. Se vacunaron los monos con 200 µg (M1) de pCV-Tat por vía i.d. o con 500 µg (M2) de pCV-Tat por vía i.m. El mono (M3) no fue vacunado pero fue inoculado desde la semana 10 con 6 µg (5 + 1 µg) i.d. de Tat como un control para las pruebas de sensibilidad. ND: no realizado.

Se detectó la actividad citotóxica anti-Tat (CTL) en el mono M1 en las semanas 42 y 48 y en el mono M2 en la semana 48. Además, se observó una respuesta CTL positiva en la semana 48 en el mono M3 que fue inoculado desde la semana 10 con 6 µg de Tat como un control para las pruebas de sensibilidad (Tabla 21).

TABLA 21

Análisis de la actividad citotóxica específica de Tat (CTL)^a

Mono	Semana	Relación objetivo:efector						Actividad CTL
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Media	
M1	42	27,4	27,8	17,1	9,8	3,9	17,2	+
	48	ND	ND	21,3	0	11,7	11	+
M2	42	1,2	5,9	2,4	1	0	2,1	-
	48	ND	ND	ND	57	25,1	41	+
M3	42	0	0	0	1,2	0	0,6	-
	48	ND	12,4	4,2	0	0	0	+

^aSe realizó el ensayo como se describe en la Tabla 6. Se vacunaron los monos con 200 µg (M1) de pCV-Tat por vía i.d. o con 500 µg (M2) de pCV-Tat por vía i.m. El mono (M3) no fue vacunado pero fue inoculado desde la semana 10 con 6 µg (5 + 1 µg) i.d. de Tat como un control para las pruebas de sensibilidad. ND: no realizado.

ES 2 293 700 T3

Los resultados mostrados en la Tabla 22 indican en la semana 52 la presencia de actividad antiviral total (TAA) en ambos monos vacunados con 200 y 500 µg de DNA.

TABLA 22

Análisis de la actividad antiviral total (TAA)^a

Mono	Días post-infección	
	7	17
	Dosis infecciosa mínima (TCID ₅₀ /célula)	Dosis infecciosa mínima (TCID ₅₀ /célula)
M1	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
M2	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
M3	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸

^aSe realizó el ensayo como se describe en la Tabla 6. Se inocularon los monos con 200 µg (M1) de pCV-Tat por vía i.d. o con 500 µg de pCV-Tat por vía i.m. El mono (M3) no fue inoculado pero desde la semana 10 recibió 6 µg (5 + 1 µg) i.d. de Tat como un control para las pruebas de sensibilidad. Se recogieron las PBMC en la semana 52 desde la inmunización primaria y se infectaron con SHIV 89.6P (10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸ TCID₅₀/célula) Los resultados se representan como la dosis infecciosa mínima de SHIV (TCID₅₀/célula) que todavía era capaz de infectar las células.

Los resultados mostrados en la Tabla 23 indican la presencia de actividad antiviral soluble (CAF) mediada por los linfocitos T CD8+, en la semana 22 y 27, en ambos monos vacunados. Esta actividad fue más baja en el mono control.

TABLA 23

Análisis de la actividad antiviral soluble (CAF) mediada por las células CD8+^a

Mono	Semanas desde la inmunización primaria	% de inhibición de la replicación viral	
		Infección aguda	Infección crónica
M1	22	62	27
	27	56	25
M2	22	74	ND
	27	28	ND
M3	22	24	ND
	27	37	22

^aAnálisis de la presencia de actividad antiviral soluble producida por linfocitos T CD8+ (CAF) derivados de los monos inoculados con 200 µg (M1) y 500 µg (M2) de pCV-Tat y del mono M3. La actividad antiviral se ensayó con infección aguda y crónica en células CEM x 174 infectadas con SHIV 89.6P y en células OM-10-1 infectadas crónicamente con HIV-1, como se describe en la Tabla 7. Los resultados se representan como el porcentaje (%) de inhibición de la replicación viral en células tratadas con sobrenadantes de los linfocitos T CD8+ en comparación con las células no tratadas. Los resultados de la infección aguda y crónica mostrados en la tabla se refieren a muestras tratadas con 5 µl de sobrenadantes de cultivo CD8+. ND, no realizado.

Los resultados mostrados en la Tabla 24 demuestran que el mono M1, inoculado con 200 µg de DNA por vía i.d., tiene una prueba de sensibilidad (skin test) positiva a Tat en la semana 22.

ES 2 293 700 T3

TABLA 24

Prueba de sensibilidad (skin test) a Tat^a

Semanas post-inmunización	Mono		
	M1	M2	M3
10	-	-	-
15	-	-	-
22	+	-	-
27	-	-	-
32	-	-	-
37	-	-	-
42	-	-	-
48	-	-	-
52	-	-	-
58	-	-	-

^a Se inocularon Tat (1 y 5 µg) en 150 µl de PBS-0,1% de BSA o el tampón solo (control) i.d. en un área previamente tricotomizada de la parte superior de la espalda de los animales vacunados y en el mono control (control para la especificidad de la respuesta) en las semanas 10, 15, 22, 27, 32, 37, 42, 48, 52, y 58 desde la inmunización primaria. El mono M1 fue inoculado i.d. con 200 µg de DNA del plásmido pCV-Tat, mientras que el macaco M2 recibió 500 µg del mismo plásmido, i.m. El mono M3 (control) no fue vacunado pero desde la semana 10 recibió 6 µg (5 + 1 µg) i.d. de Tat como un control para las pruebas de sensibilidad. La aparición de un nódulo eritematoso, 48 a 72 horas más tarde, indicó la presencia de una hipersensibilidad de tipo retrasado (DTH): ++, Ø ≥ 5 mm; +, Ø ≥ 1-4 mm; +/-, eritema sin endurecimiento; -, Ø < 1 mm.

Estos resultados indican que el plásmido pCVTat (pCVTat-DNA) fue bien tolerado y seguro tanto intradérmicamente como intramuscularmente a la dosis dada. Además, estos resultados demuestran que la inmunización con el pCVTat-DNA induce una respuesta inmunitaria anti-Tat tanto humoral (aunque más baja que la inducida por la inmunización con la proteína Tat recombinante) como celular con efectos antivirales. En lo que concierne a la eficacia protectora después del enfrentamiento (realizado en la semana 65 desde la inmunización inicial), los datos virológicos, incluyendo las medidas de antigenemia y citoviremia, y la determinación del número de copias de DNA proviral (DNA-PCR) en las PBMC, indican que el mono M2, inmunizado i.m. con Tat-DNA, resultó protegido tras el enfrentamiento con 10 MID₅₀ de SHIV-89.6P, mientras que el macaco M1, inmunizado i.d. con una dosis más pequeña de Tat-DNA (200 µg) resultó infectado, lo que sugiere que, con respecto a la inmunización con DNA, la vía i.m. es más eficaz que la inoculación i.d. El mono control M3 también resultó resistente a la infección. Sin embargo, como se ha descrito previamente, este mono, a diferencia de los controles de los otros protocolos experimentales, recibió repetidas pruebas de sensibilidad (skin-tests) para Tat con el fin de controlar la especificidad del test (Tabla 24), y se detectaron anticuerpos anti-Tat, aunque a bajos títulos (1:100), a partir de la semana 32 desde el comienzo de la inmunización (no se muestran datos). Además, la respuesta proliferativa a Tat en este mono demostró una reactividad débil y esporádica al antígeno (Tabla 20). Finalmente, el mono M3 mostró la presencia de CTLs específicos anti-Tat (Tabla 21). Aunque de forma preliminar, estos datos indican que la inyección i.d. repetida de 6 µg de Tat podría haber dado como resultado la inmunización del animal y la protección del enfrentamiento. Así, el mono M3 será considerado vacunado i.d. con la proteína Tat y estudiado como tal.

TABLA 25
Análisis de los parámetros virológicos

Mono	Días post-enfrentamiento con SHIV89.6P											
	15				30				60			
	p27 ^a (pg/ml)	DNA PCR (copias/ μ g) ^b	Citoviremia ^c	IgG ^d anti-SIV	P27 (pg/ml)	DNA PCR (copias/ μ g) ^b	Citoviremia ^c	IgG ^d anti-SIV	P27 (pg/ml)	DNA PCR (copias/ μ g) ^b	Citoviremia ^c	IgG ^d anti-SIV
M1	1796	1278	>2818,3	1:10	68,6	1048	353,9	1:50	<20	8	21,3	1:800
M2	<20	<1	Neg	1:10	<20	<1	Neg	1:50	<20	<1	Neg	1:10
M3	<20	<1	Neg	>1:50	<20	<1	Neg	>1:50	<20	<1	Neg	1:100

El mono M1 había sido inmunizado i.d. con 200 μ g de pCVTat, el mono M2 con 500 μ g de pCVTat, i.m. El macaco M3 fue inyectado varias veces con 6 pg de proteína Tat, intradérmicamente, con el fin de controlar la especificidad de la prueba de sensibilidad (skin test). Por tanto, desde el tiempo del enfrentamiento, el mono M3 es considerado como un mono vacunado. Los parámetros virológicos se evaluaron como se describe en la leyenda de la Tabla 17.

El análisis se realizó como se indica en la leyenda de la Tabla 18. El mono M1 había sido inmunizado i.d. con 200 µg de DNA plásmido pCVTat, el mono M2 con 500 µg de pCVTat-DNA, i.m. El macaco M3 fue vacunado con 6 µg de proteína Tat intradérmicamente.

El análisis se realizó como se indica en la leyenda de la Tabla 18. El mono M1 había sido inmunizado i.d. con 200 µg de DNA plásmido pCVTat, el mono M2 con 500 µg de pCVTat-DNA, i.m. El macaco M3 fue vacunado con 6 µg de proteína Tat intradérmicamente.

El análisis se realizó como se indica en la leyenda de la Tabla 18. El mono M1 había sido inmunizado i.d. con 200 µg de DNA plásmido pCVTat, el mono M2 con 500 µg de pCVTat-DNA, i.m. El macaco M3 fue vacunado con 6 µg de proteína Tat intradérmicamente.

El análisis se realizó como se indica en la leyenda de la Tabla 18. El mono M1 había sido inmunizado i.d. con 200 µg de DNA plásmido pCVTat, el mono M2 con 500 µg de pCVTat-DNA, i.m. El macaco M3 fue vacunado con 6 µg de proteína Tat intradérmicamente.

ES 2 293 700 T3

Basándose en estos resultados se diseñó un segundo experimento en el que se evaluaron los efectos de la inmunización con el pCVTat-DNA en 3 monos (M9-M11) en comparación con el mono control (M12) que recibió el pCV0-DNA. Todos los animales fueron inoculados i.m. en 2 sitios en la espalda con un total de 1 mg de pCVTat (M9-M11) o de pCV0 (M12). 1 o 5 días antes de la vacunación, se inocularon 250 μ l de solución salina que contenía 0,5% de bupivacaína y 0,1% de metilparabeno en los dos sitios marcados en los que había sido inyectado sucesivamente el plásmido. Se vacunaron los macacos al tiempo 0 y a las semanas 6, 11, 15, 21, 28, y 32. Se llevó a cabo una dosis final de refuerzo en la semana 36 con la proteína Tat recombinante (16 μ g) resuspendida en 200 μ l de ISCOM y 300 μ l de PBS. Se controlaron los animales cada día en cuanto a los parámetros clínicos como se describe en el Ejemplo 4. Además, se sacaron 10 ml de sangre 9 días antes de la inmunización primaria y en cada inmunización, como se describe en el Ejemplo 4. Con el fin de evaluar los efectos protectores de la vacunación, se sometieron a enfrentamiento los monos en la semana 50 desde el principio de la inmunización mediante inyección intravenosa (i.v.) de 10 MID₅₀ de SHIV-89.6P. El seguimiento del post-enfrentamiento está todavía en curso y se realiza como se describe en el Ejemplo 4.

Los resultados de este experimento son los siguientes. No se observaron modificaciones en términos de comportamiento, parámetros clínicos, y química de la sangre ni en los animales vacunados ni en los animales control. No se detectaron signos de inflamación ni de neo-formaciones vasculares en los sitios de la inyección. Estos resultados confirman que 1 mg del DNA plásmido pCVTat, inyectado i.m., fue bien tolerado y no fue tóxico. Se detectaron IgG anti-Tat desde la semana 15 (figura 13), con títulos que varían desde 1:50 a 1:100 (no se muestran datos). Además, se detectó una respuesta proliferativa a Tat tan pronto como en la semana 2 en un mono (M11) (tabla 27).

TABLA 27

Respuesta proliferativa a Tat^a

Mono	Estímulo	Semanas desde la inmunización primaria										
		2	6	11	15	21	28	32	36	40	44	50
M9	PHA	8,9	9,2	17,1	58,2	18	47,1	43,4	3,1	72,6	64,6	7
	TT	2,9	1,7	0,9	1	1,8	0,7	1,1	0,8	1	7	2,7
	Tat	0,4	0,5	0,6	1,5	1,6	0,9	1	0,7	1,1	7	1,9
M10	PHA	8,5	18	19,8	ND	10,1	2,2	14,7	15,2	4,4	8,4	ND
	TT	2,4	0,3	0,8	ND	1,1	0,6	1	0,9	0,6	6,4	ND
	Tat	1	0,3	0,7	ND	1,1	0,5	1	0,9	0,7	4,2	ND
M11	PHA	25,7	43,3		12,1	27,8	3,4	21,3	14,1	15,9	25,8	ND
	TT	4,2	1,9	1,3	0,9	1,1	3,6	1,2	0,8	0,3	1,8	ND
	Tat	5,1	0,8	1,6	0,7	1,1	1,1	1,2	0,7	0,7	3	ND
M12	PHA	28,7	30,9	41	50,7	30,8	7,6	43	22,6	34,6	19,9	55,1
	TT	3,2	1,6	0,9	5,2	1,6	1,6	1,3	1,1	1	0,7	3,1
	Tat	3,2	1,4	0,8	1,3	1	1,6	1	0,8	1	1,6	1,3

^a Se aislaron PBMC, se estimularon con PHA (4 μ g/ml), o toxoide tetánico (TT, 10 μ g/ml), o Tat (1 y 5 μ g/ml) y se ensayaron como se describe en la tabla 5. Se inyectaron los monos i.m. con 1 mg de pCVTat (M9-M11) o pCV0 (M12, control). ND, no determinado.

Se detectaron CTLs anti-Tat en la semana 32 post-inmunización (Tabla 28).

TABLA 28

Análisis de la actividad citotóxica anti-Tat (CTLs)^a

Mono	Semana	Relación objetivo :efector						Actividad CTL
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Media	
M9	32	0	0	0	0	0	0	-
	50	4,2	0	0	0	0,9	1	-
M10	32	0	0	9,9	2,7	0	2,5	-
	50	3,5	0	2,3	0	0	1,1	-
M11	32	0	10,5	8,9	3,5	0,9	4,7	+
	50	0	0	0	3,8	0,3	0,8	-
M12	32	0	0	0	0	0	0	-
	50	0	0	0	0	0	0	-

^a Se realizó el ensayo como se describe en la Tabla 6. Se inyectaron los macacos i.m. con 1 mg de pCVTat (M9-M11) o pCV0 (M12, control).

ES 2 293 700 T3

Las PBMC obtenidas del mono M11 en la semana 44 resultaron resistentes a la infección *in vitro* con diluciones en serie del virus SHIV-89.6P quimérico por un ensayo descrito previamente que detecta la presencia de actividad antiviral total (TAA). De hecho, se evalúa la TAA como la capacidad de las PBMC de los monos vacunados con pCVTat-DNA, cultivadas en presencia de suero autólogo, para resistir a la infección con diluciones en serie de virus.

(Tabla 29)

TABLA 29

Análisis de la actividad antiviral total (TAA)

Mono	Días post-infección	
	7	17
	Dosis infecciosa mínima (TCID ₅₀ /célula)	Dosis infecciosa mínima (TCID ₅₀ /célula)
M9	10 ⁻²	>10 ⁻² **
M10	10 ⁻³	10 ⁻²
M11	>10 ⁻² *	>10 ⁻² *
M12	10 ⁻²	>10 ⁻² **

^aSe realizó el ensayo como se describe en la Tabla 13. Se inyectaron los macacos i.m. con 1 mg de pCVTat (M9-M11) o de pCV0 (M12, control). Se extrajeron las PBMC en la semana 44 desde la primera inmunización y se infectaron *in vitro* con 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ TCID₅₀ del SHIV-89.6P. Los resultados se expresan como la dosis infecciosa mínima del SHIV (TCID₅₀/célula) todavía capaz de infectar las células.

*Ningún cultivo resultó infectado a la concentración más alta de SHIV usada en el ensayo (10⁻² TCID₅₀/célula). **Los cultivos se hicieron negativos el día 17 post-infección.

Los resultados mostrados en la tabla 30 demuestran la presencia de la actividad antiviral soluble (CAF) mediada por los linfocitos T CD8+ en los monos vacunados y en el mono control (M12) inyectado con el vector vacío (pCV0).

TABLA 30

Análisis de la actividad antiviral soluble (CAF) mediada por los linfocitos T CD8+ (CAF)^a

Mono	Semanas desde la inmunización primaria	% de inhibición de la replicación viral	
		Infección aguda	Infección crónica
M9	0	21	14,6
	36	77	2,6
M10	0	40	13,8
	36	67	25
M11	0	49	19
	36	42	14
M12	0	65	23
	36	62	14

^aAnálisis de la presencia de la actividad antiviral soluble mediada por los linfocitos T CD8+ (CAF). Se obtuvieron las PBMC de los tres monos (M9-M11) inyectados con 1 mg de pCVTat y del mono control (M12) inoculado con 1 mg de pCV0. El ensayo de infección aguda se llevó a cabo en células CEM x 174 infectadas con el SHIV-89.6P, como se describe en la Tabla 14. El ensayo de infección crónica se llevó a cabo en células UI infectadas crónicamente con el HIV-1, como se describe en la Tabla 14. Los resultados se expresan como el porcentaje (%) de inhibición de la replicación viral en células cultivadas en presencia o en ausencia (control) de 5 µl de sobrenadantes de las células T CD8+.

Se evaluó la producción de citocinas (γIFN, IL-4, TNFα) y de la quimiocina RANTES en la semana 44 en las PBMC tanto de los monos vacunados como de los monos control (Tabla 31).

TABLA 31
Análisis de la producción de citocinas y de RANTES^a

Mono	Control				PHA				TT			
	yIFN	IL-4	TNF α	RANTES	yIFN	IL-4	TNF α	RANTES	yIFN	IL-4	TNF α	RANTES
M9	-/-	-/3,5	-/-	-/-	312/204	-/-	250/-	536/2288	-/-	-/-	-/-	nd/nd
M10	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd
M11	-/-	-/-	-/-	-/-	420/183	-/-	388/-	4336/3124	-/-	-/-	nd/nd	nd/nd
M12	-/-	-/3,2	-/-	-/-	430/932	-/-	-/-	1936/2576	-/-	-/-	218/nd	nd/nd

Mono	Tat (1 μ g)				Tat (5 μ g)			
	yIFN	IL-4	TNF α	RANTES	yIFN	IL-4	TNF α	RANTES
M9	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
M10	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd
M11	-/-	-/4	-/-	544/368	-/-	-/3,5	-/-	2124/-
M12	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

^aSe realizó el ensayo como se describe en la Tabla 15. Se inyectaron los macacos i.m. con 9 mg de pCVTat (M9-M11) o de pCV0 (M12, control). Se extrajeron las PBMC en la semana 44 después de la primera inmunización. Los resultados se muestran como pg/ml de citocinas y RANTES detectados a las 48 y 96 horas (48/96) respectivamente.

- 5 (-), los valores estuvieron por debajo del valor de corte. Los valores de corte (pg/ml) fueron: γ IFN: 31,2; IL-4: 3,12; TNF- α : 15, 6; RANTES: 62,5. ND: no realizado.

10 Los resultados muestran la presencia de una débil reactividad a las pruebas de sensibilidad (skin tests) con Tat en un mono (M9) en la semana 11 (Tabla 32)

TABLA 32

15 Prueba de sensibilidad (skin test) a Tat ^a

Mono	Semanas desde la inmunización primaria						
	11	15	21	28	32	36	44
20 M9	+/-	-	-	-	-	-	-
M10	-	-	-	-	-	-	-
M11	-	-	-	-	-	-	-
25 M12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

25

^aSe inocularon Tat (1 y 5 μ g) en 150 μ l de PBS-A, 0,1% de BSA o el tampón solo (control) i.d. en un área previamente tricotomizada de la parte superior de la espalda de los animales vacunados pero no en los monos control en las semanas 11, 15, 21, 28, 32, 36, y 44 desde la inmunización inicial. Se inyectaron los macacos i.m. con 1 mg de pCVTat (M9-M11) o de pCV0 (M12, control). La aparición de un nódulo eritematoso, 48 a 72 horas más tarde, indicó la presencia de una hipersensibilidad de tipo retrasado (DTH): ++, $\varnothing \geq 5$ mm; +, $\varnothing \geq 1-4$ mm; +/-, eritema sin endurecimiento; -, $\varnothing < 1$ mm.

30

35 Los resultados post-enfrentamiento indican que todos los animales vacunados estuvieron protegidos de la infección con 10 MID₅₀ del SHIV-89.6P, como se indica por las pruebas virológicas (antigenemia del plasma, determinación del número de copias del DNA proviral, citoviremia) que fueron todas negativas (Tabla 33). Además, la presencia de anticuerpos anti-SIV en el mono M11 indicó la exposición al virus o una infección frustrada. Por el contrario, no se detectaron éstas en los monos restantes, por lo que se decidió llevar a cabo el ensayo de producción de anticuerpos *in vitro* (IVAP) así como la respuesta linfoproliferativa a los antígenos SIV. Estos ensayos están en curso y los datos

40 preliminares indican la presencia de anticuerpos anti-HIV Env en todos los monos inoculados con DNA. Los macacos serán inoculados con una dosis más alta del virus, ya que incluso el animal control M12 resultó resistente a la infección. Este mono había sido vacunado con el vector vacío pCV0. Datos recientes de las publicaciones científicas han demostrado el papel adyuvante desempeñado por ciertas secuencias de DNA que son mucho más frecuentes en las bacterias que en las células eucarióticas, y que, similarmente a LPS y manosa, representan un fuerte estímulo para

45 la inmunidad natural (Ref. 179). Por tanto, cabe la posibilidad de que la protección observada en el mono M12 pueda ser debida a la inducción de una inmunidad antiviral no específica por estas secuencias bacterianas, tal como la producción de IFN α , IFN β , IL-12, e IL-18, que se sabe que ejercen funciones inmunomoduladoras y antivirales. Esto es fuertemente sugerido por la presencia en este macaco de actividades antivirales TAA (Tabla 29) y CAF (Tabla 30) en ausencia de inmunidad anti-Tat específica humoral y celular. De hecho, estos ensayos miden también las actividades

50 antivirales específicas no antigénicas. El mono natural M13, inoculado con una dosis de virus 3,5 veces más baja que la inyectada en el macaco M12, resultó infectado. Estos resultados confirman que dosis de enfrentamiento de 10 MID₅₀ con la que se inoculó el mono M12 fueron infecciosas (Tabla 33). Basándose en este resultado el inventor planifica utilizar el vector pCV0 o partes del mismo como un adyuvante.

55

60

65

Análisis de los parámetros virológicos

^{a,b,c,d}Se realizaron los ensayos como se describe en la Tabla 17. Se inyectaron los macacos i.m. con 1 mg de pCVTat (M9-M11) o de pCv0 (M12, control). El mono M13 era un animal natural infectado con 2,85 MID₅₀ de SHIV89.6P. ^eSe llevó a cabo el aislamiento viral en lugar de citoviremia y resultó positivo. ^fDNA PCR no fue cuantitativo y resultó positivo.

El análisis FACS de los subconjuntos CD4 y CD8 (Tabla 34) confirmó los datos virológicos.

De hecho, se observó un significativo descenso del porcentaje y número absoluto de los linfocitos CD4 a los 15 y 60 días post-enfrentamiento solamente para el mono natural M13, que resultó infectado como se indica por los datos positivos de antigenemia plasmática, DNA proviral, y aislamiento del virus. (Tabla 33).

TABLA 34
Análisis FACS de linfocitos CD4 y CD8.

Mono	Días post-enfrentamiento con SHIV89.6P														
	0				15				30				60		
	%				%				%				%		
	(células/ μ l)				(células/ μ l)				(células/ μ l)				(células/ μ l)		
	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+		CD4+	CD8+	CD4+/CD8+		CD4+	CD8+	CD4+/CD8+		CD4+	CD8+	CD4+/CD8+
M9	21,5 (1500)	37,6 (2630)	0,57	ND	ND	ND	ND	ND	26,4 (1340)	51,6 (2610)	0,51	30,6 (2000)	45,5 (2980)	0,67	
M10	39,5 (1050)	36,3 (960)	1,1	ND	ND	ND	ND	ND	34,8 (1730)	41,8 (2080)	0,83	31,6 (3760)	52,2 (6200)	0,61	
M11	35,8 (1080)	37,7 (1140)	0,95	ND	ND	ND	ND	ND	28,7 (1330)	36,7 (1710)	0,78	24,5 (890)	48,7 (1770)	0,5	
M12	30,9 (1860)	46 (2760)	0,67	ND	ND	ND	ND	ND	26,7 (1300)	49,6 (2420)	0,54	23,7 (2620)	52,1 (5760)	0,45	
M13	40,5 (2590)	39,7 (2544)	1,01	38,4 (434)	33,6 (380)	1,14			35,1 (1721)	32,2 (1479)	1,16	3,1 (111)	62,3 (2225)	0,05	

^aSe realizó el ensayo como se describe en la Tabla 18. Se inyectaron los macacos i.m. con 1 mg de pCVTat (M9-M11) o de pCV0 (M12, control). El mono M13 era un animal natural infectado con 2.85 MID₅₀ de SHIV89.6P.

Estos resultados demuestran que la vacunación con el plásmido pCVTat fue bien tolerada y no tóxica y confirman los resultados de seguridad y tolerabilidad de la vacunación con DNA, obtenidos en el primer estudio piloto. En adición, estos datos dejan claro que el plásmido pCVTat-DNA induce una respuesta inmunitaria específica humoral (aunque más débil que la inducida por la proteína Tat) y celular con efectos antivirales, parte de los cuales pueden ser debidos a las secuencias particulares de DNA presentes en el vector pCV0 que podrían funcionar como adyuvantes.

Serán evaluados los protocolos de inmunización que pueden incluir las combinaciones del DNA que codifica otros genes de HIV-1 y citocinas descritos en el Ejemplo 3. En estos experimentos se utilizará SHIV que contiene los genes *tat*, *rev*, y *nef* de HIV (Ref. 146, 85, 142, 65, 94, 129).

Los plásmidos pCV0 y pCVTat serán inoculados en los animales utilizando otros sistemas de administración que pueden mejorar la eficacia de la inmunización, tales como liposomas, nanopartículas, eritrocitos, administración por pistola de genes, o el DNA de Tat será administrado a través de la utilización de vectores herpes como se describe en los Ejemplos predictivos 9 y 10.

Ejemplo 6

20 Vacuna terapéutica

Se preparó un protocolo de vacunación, basado tanto en la proteína Tat como en el DNA Tat, para evaluar la seguridad y la toxicidad de la vacuna anti-Tat en individuos ya infectados. Se llevó a cabo el experimento en monos infectados con dosis decrecientes de SHIV89.6P y con la enfermedad de inmunodeficiencia (SIDA). El stock viral usado para la infección se obtuvo del bazo y nódulos linfáticos de un mono cinomolgus infectado 14 días antes. Los linfocitos, purificados por separación mecánica, se dividieron en dos alícuotas ($1,5 \times 10^6$ células/ml cada una). En una alícuota se eliminaron las células T CD8+ usando perlas inmuno-magnéticas (Dynal, Norway). Se estimularon ambos cultivos con PHA ($1 \mu\text{g/ml}$) durante tres días y se sembraron a la concentración de 1×10^6 células/ml en presencia de 50 U/ml de IL-2. Se detectó la replicación viral por la presencia de la transcriptasa inversa (RT) en el medio de cultivo recogido después de tres días. Antes del ensayo, se clarificó el sobrenadante y se ultracentrifugó a 100.000 rpm, durante 11 minutos a $+4^\circ\text{C}$ (ultracentrífuga Beckman TL-100) y se lisó el sedimento. Se añadieron 30 μl de la suspensión a la mezcla de reacción (TRIS HCl 1 M, pH 8; MgCl₂ 0,5 M; KCl, 1 M; Poli A 1 mg/ml; oligo-dT 12-18 100 $\mu\text{g/ml}$; DTT 0,02 M; 1,2 $^3\text{[H]}$ -metil-timidina-tri-fosfato 1 mCi/ml) y se incubaron a 37°C durante 60 minutos. Se paró la reacción añadiendo 500 μl de pirofosfato de Na 0,1 M pH 5 y 600 μl de ácido tricloroacético (TCA) al 20% y se aplicó la muestra sobre un filtro de 0,45 μm (Millipore) y después se leyó con un contador β después de la adición de 5 ml de cocktail de centelleo (Filter Count, Packard).

Se centrifugaron los medios de cultivo que contienen más de 20.000 cpm y se suplementaron con 10% de suero humano AB. Se concentró el virus por ultra-centrifugación a 30.000 rpm (90 minutos a 4°C), se resuspendió en RPMI 1640 que contenía 10% de suero humano (grupo AB) y después se almacenó en pequeñas alícuotas en nitrógeno líquido. El stock viral se tituló *in vitro* sobre las líneas de células humanas CEM x 174 y C8166 (3×10^3 TCID₅₀/célula), e *in vivo* sobre monos cinomolgus ($3,17 \times 10^{5,69}$ MID₅₀/ml).

Se ha realizado un primer experimento piloto en 7 monos infectados i.v. con SHIV89.6P preparado como se ha descrito antes. Cada mono recibió 1 ml de SHIV diluido en tampón salino suplementado con 2% de suero humano (AB, Rh-) según el siguiente protocolo. Se inoculó un mono (IM1) con 1:500 de dilución viral; dos monos (IM2, IM3) recibieron la dilución 1:5.000; dos monos (IM4, IM5) se inocularon con 1:50.000; el mono IM6 recibió la dilución 1:500.000; el último mono (IM7) recibió la dilución 1:5.000.000. Se sangró cada mono el día 7 antes de la infección con SHIV para determinación de los parámetros basales. Las muestras de suero y plasma se congelaron a -20°C o -80°C y después se usaron para re-suspender el inóculo de la proteína. Al tiempo 0 todos los monos se inocularon con SHIV89.6P. Se chequearon los monos diariamente. Además, el día 0 y después de 2 y 4 semanas se sangraron y se utilizaron 10 ml de sangre para determinaciones hematológicas (análisis químico-clínicos, electrolitos, recuentos de glóbulos blancos y plaquetas, hemoglobina) y análisis virológico e inmunológico (esto es determinación de p27 Ag en plasma y carga viral en plasma y células). En la semana 4 post-infección, estaban infectados 6 monos (IM1-6). El mono IM7, que recibió la dilución viral más baja (1:5.000.000) fue SHIV-negativo (Tabla 35).

TABLA 35

Detección de la presencia de SHIV89.6P en monos infectados con diluciones virales en serie

Mono	Dilución de SHIV 89.6P	Semanas post-infección					
		0		2		4	
		Aislamiento viral ^a	p27 (pg/ml) ^b	Aislamiento viral	p27 (pg/ml) ^b	Aislamiento viral	p27 (pg/ml) ^b
IM1	1:500	ND	ND	+	>450	+	47
IM2	1:5.000	ND	ND	+	>450	+	161,8
IM3	1:5.000	ND	ND	+	>450	+	6,67
IM4	1:50.000	ND	ND	+	<20	+	>450
IM5	1:50.000	ND	ND	+	>450	+	166,7
IM6	1:500.000	ND	ND	-	>450	+	0
IM7	1:5.000.000	ND	ND	-	0	-	0

^aEl aislamiento del virus y ^b el p27 Ag (pg/ml) en plasma se realizaron como se describe en la leyenda de la tabla 17. Se inocularon los monos i.v. con diluciones en serie del stock de virus, como se describe en el texto.

Después de 7 semanas de la infección, todos los animales que presentaban síntomas graves de inmunodeficiencia fueron vacunados con ambos la proteína Tat y el DNA del plásmido pCVTat según el siguiente protocolo. Los monos IM1, IM3, IM5 y IM6 recibieron la proteína Tat (20 µg), disuelta en 250 µl de PBS-A suplementado con 0,1% de BSA y 20% de plasma autólogo y después se añadieron a 250 µl de adyuvante Alum. El inóculo de proteína se realizó subcutáneamente en un único sitio de la parte superior de la espalda del mono, mientras que el plásmido pCVTat (1 mg), resuspendido en 1 ml de PBS-A, se inyectó i.m. en un sitio diferente en la espalda. Los monos IM2 y IM4 (controles) fueron inyectados con 250 µl de Alum y 250 µl de PBS-A, 0,1% de BSA y 20% de plasma autólogo, s.c., en un sitio de la parte superior de la espalda y con pCV-0 (1 mg) resuspendido en 1 ml de PBS-A, i.m., en un sitio de la parte superior de la espalda diferente del sitio anterior. El mono IM7 no infectado no fue vacunado. El programa de vacunación consistió en el tiempo 0, que corresponde a 7 semanas después de la infección por SHIV, y 1, 4, 5, 10, 11, 13, 14, 17, 18 semanas después. Para evaluar los efectos de esta vacunación sobre la progresión de la enfermedad, cada macaco fue chequeado diariamente en cuanto a la presencia o signos de la enfermedad y al tiempo 0 y después a las 3, 8, 12, 16 y 21 semanas, se extrajeron 10 ml de sangre para pruebas de laboratorio (análisis químico-clínicos, electrolitos, recuentos de glóbulos blancos y plaquetas, hemoglobina), para la evaluación del estado inmunológico (presencia de inmunoglobulinas específicas, medida de citocinas Th1 y Th2, producción de quimiocinas), para la caracterización de linfocitos por análisis FACS (CD4, CD8, CD28, CD40, CD86, CD20, CD2, CD26 y CD20), y finalmente para la evaluación de parámetros virológicos (detección de DNA proviral por PCR semicuantitativa, carga viral plasmática por RT-PCR competitiva, antígeno p27 Gag en plasma por ELISA y presencia de Ab anti-SHIV, como se ha descrito previamente). Se realizarán otras dosis de refuerzo basándose en los resultados inmunológicos, virológicos y clínicos.

Después del último inóculo, se programará una monitorización mensual y a la aparición de modificaciones clínicas, se congelarán en cada punto de tiempo muestras de PBMC, suero, plasma y orina para futuras pruebas como se ha descrito previamente.

Se describen los resultados ya disponibles de este experimento, obtenidos en la semana 8 después de inmunización. Tanto en los monos vacunados asintomáticos como en los monos control no se observaron signos de inflamación ni de neo-angiogénesis en los sitios de inoculación ni síntomas generales de la enfermedad. No hubo modificaciones claras del estado clínico en los monos ya sintomáticos. Por otra parte, no se detectó activación de la replicación viral. Considerados juntos estos resultados indican la ausencia de toxicidad o incremento de la replicación viral en los monos vacunados con una proteína o DNA Tat biológicamente activa (Tabla 36).

TABLA 36

Análisis de parámetros virológicos

Mono	Semanas desde el comienzo de la vacunación					
	0		3		8	
	p27 (pg/ml)	DNA PCR copias/μg	p27 (pg/ml)	DNA PCR copias/μg	p27 (pg/ml)	DNA PCR copias/μg
IM1	12,3	68	17,3	52	141	41
IM3	0	61	0	48	0	71
IM5	97,1	20	21,7	15	23,6	95
IM6	0	43	0	55	0	24
IM2	21,2	ND	36,6	53	27,4	78
IM4	81	195	22	288	15,4	135
IM7	ND	ND	ND	ND	0	>1

Los ensayos se realizaron como se describe en la Tabla 17. Se inyectaron los monos IM1, IM3, IM5 y IM6 con proteína Tat (20 μg) y adyuvante Alum s.c. y con pCVTat (1 mg) i.m. Se inyectaron los monos IM2 y IM4 (controles infectados) con adyuvante Alum s.c. y pCV0 (1 mg) i.m. El mono IM7 era un mono natural no infectado.

Las análisis FACS indican que no se observaron modificaciones en los linfocitos T CD4+ y CD8+ después de la vacunación (Tabla 37).

(Tabla pasa a página siguiente)

Análisis FACS de linfocitos CD4+ y CD8+

Mono	Tiempo 0				Semanas desde el comienzo de la vacunación							
	0				3				8			
	%				%				%			
	(células/μl)				(células/μl)				(células/μl)			
	CD4+	CD8+	CD4/CD8	CD4+	CD8+	CD4/CD8	CD4	CD8	CD4/CD8	CD4	CD8	CD4/CD8
IM1	25,39 (1264)	36,8 (1831)	0,69	3,3 (101)	64,16 (1963)	0,05	2,32 (52)	63,34 (1431)	0,04	3,41 (96)	55,41 (1559)	0,06
IM3	19,26 (869)	26,45 (1193)	0,73	2,84 (74)	58,22 (1526)	0,05	3,21 (92)	58,16 (1663)	0,05	3,18 (91)	50,12 (1434)	0,06
IM5	24,75 (580)	58,04 (1361)	0,42	2,28 (38)	57,3 (946)	0,04	2,89 (48)	55,6 (917)	0,05	2,15 (60)	54,3 (1527)	0,04
IM6	40,46 (2590)	39,74 (2544)	1,01	3,12 (111)	62,3 (2225)	0,05	2,75 (138)	65,40 (3290)	0,04	2,3 (73)	52,18 (1659)	0,04
IM2	42 (1787)	34,7 (1476)	1,21	2,41 (68)	58,12 (1632)	0,03	2,7 (121)	57,6 (2580)	0,05	1,89 (66)	50,6 (1763)	0,04
IM4	30,72 (1589)	27,76 (1680)	1,10	2,12 (113)	61,13 (3248)	0,03	1,92 (90)	60,3 (2828)	0,03	3,12 (164)	53,12 (2790)	0,06
IM7	17,02 (871)	55,8 (2857)	0,30	ND	ND	ND	20,26 (770)	51,40 (1957)	0,39	24,1 (868)	50,43 (1842)	0,48

El análisis FACS se realizó como se describe en la leyenda de la Tabla 18. Los monos IM1, IM3, IM5 y IM6 fueron inyectados con proteína Tat (20 µg) y adyuvante Alum s.c. y con pCVTat (1 mg) i.m. Los monos IM2 y IM4 (controles infectados) fueron inyectados con adyuvante Alum s.c. y pCV0 (1mg) i.m. El mono IM7 era un mono natural no infectado.

Estos datos confirman que tanto la proteína Tat como el plásmido pCVTat, a las dosis y vías de inoculación usadas, fueron bien tolerados y sin ningún efecto tóxico en los monos vacunados y, además, no aumentaron la replicación viral ni la disminución de células T CD4 en los animales infectados.

5 Ejemplo 7

La co-estimulación de linfocitos CD4+ purificados procedentes de monos infectados con SIV, con perlas recubiertas anti-CD3/28 da como resultado una expansión logarítmica del número de células sin replicación ni transmisión viral significativas

En las células mononucleares de sangre periférica se eliminó la población celular CD8+ usando perlas inmuno-magnéticas anti-CD8 (Dynal, Oslo; Dynabeads M-450 CD8). Se evaluó el grado de purificación por análisis FACS y se consideró como aceptable si era superior al 95%. Las células agotadas de CD8 (denominadas PBMC CD8-) se cultivaron en presencia de PHA (2 µg/ml) e IL-2 (40 U/ml) o perlas inmuno-magnéticas previamente recubiertas con dos anticuerpos monoclonales contra los antígenos CD3 (Clone FN18, BioSource) y CD28 (Clone 9,3) (perlas anti-CD3/28). Para mejorar la unión de las perlas anti-CD3/28 con las células objetivo, se realizó la incubación en un dispositivo con rueda rotatoria. Después, se seleccionaron las células unidas (denominadas CD8-CD3+CD28+) con un imán y se sembraron en cultivo. Tres veces a la semana, se ajustaron las concentraciones de células al nivel de partida y se añadió IL-2 cuando está indicado; por otra parte, con respecto a las células estimuladas con perlas anti-CD3/28, los resultados preliminares sugieren que el régimen continuo de estimulación acoplado con un control constante de la relación perlas:células, ajustada en cada punto de tiempo, es altamente eficaz para la inducción de la respuesta proliferativa. Los estudios previos han demostrado que en ausencia de IL-2 exógena, la población de células CD8-CD3+CD28+ prolifera mejor que las PBMC CD8- estimuladas con perlas anti-CD3/28. Además, la adición de IL-2 exógena (40 U/ml, tres veces por semana) aumenta significativamente la cinética de proliferación tanto en términos de número de células como de duración del efecto (Figura 14).

Para evaluar la actividad antiviral de esta estimulación, las células CD8-CD3+CD28+ purificadas procedentes de 4 monos no infectados, se infectaron el día 0 con 0,1 M.O.I. de SIV y después se cultivaron bajo estimulación continua. Las PBMC CD8- estimuladas con PHA e IL-2 fueron el control del experimento. La infección viral fue seguida a través de la detección del antígeno p27 Gag en el sobrenadante del cultivo mediante un ELISA comercial (Coulter, Hialeah, FL). Los niveles de antígeno p27 Gag (ng/ml) se midieron los días 6 y 12 después de la infección. Como se muestra en la figura 15, hay una diferencia significativa en la infección en los dos regímenes de estimulación. De hecho, el día 6 después de la infección, el antígeno p27 en los cultivos estimulados por perlas CD3/28 fue de 40% a 87% más bajo que en los cultivos estimulados con PHA más IL-2, y el día 12 esta diferencia aumentó en 2 de los 4 monos. Esto sugiere una reducción de la susceptibilidad a la infección viral. Solamente en un caso (MK 9401) se observó una propagación viral en ambos regímenes de estimulación.

Los resultados descritos aquí demuestran que el *Macaca fascicularis* es un buen modelo para la expansión *ex vivo* de la sub-población de linfocitos mediante la co-estimulación con perlas anti-CD3/28, sin replicación viral. Esto representa la justificación de la vacuna terapéutica que se propone, basada en la expansión y re-infusión de linfocitos autólogos específicos anti-virales, en individuos infectados por HIV.

Ejemplo 8

45 *Uso de células dendríticas para la vacunación (no reivindicado)*

Las células dendríticas (DC) y los macrófagos, en menor extensión, son capaces de presentar eficazmente antígenos a los linfocitos T e inducir, en este subconjunto de células, la proliferación o adquisición de actividades citotóxicas específicas. Estas células se denominan "células presentadoras de antígeno" (APCs) y pueden empezar la respuesta inmunitaria. Por tanto, se pueden utilizar las DC en protocolos de inmunización *ex vivo*. Por esta razón, se aislaron precursores de las DC de la sangre periférica de *Macaca fascicularis* cultivando *in vitro* células adherentes después de siete días de estimulación con GM-CSF e IL-2. Alternativamente, se purificaron las células CD34+ con perlas inmuno-magnéticas y después se cultivaron *in vitro* con GM-CSF y TNF-α durante 14 días. Para confirmar que se habían aislado las DC, se realizaron análisis morfológicos y caracterización fenotípica (análisis FACS e inmunohistoquímica). El análisis funcional se basó en la capacidad única de las DC para inducir la proliferación de los linfocitos alogénicos.

Los resultados obtenidos confirman completamente la eficacia de la purificación y la caracterización funcional de las DC. En detalle, para aislar los precursores de DC, las PBMC, obtenidas por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll, se estratificaron de nuevo sobre gradiente discontinuo de Percoll (50% y 42,5%). La fracción celular que, después de centrifugación a 500 g durante 30 min, estaba entre los dos gradientes estaba principalmente constituida por monocitos (como se confirma por análisis FACS, no se muestran datos). Estas células se mantuvieron a 4°C para evitar la adhesión de las células a los tubos de plástico, después se recogieron, se lavaron, se contaron y se sembraron en cultivo a 37°C. El día siguiente, se lavaron las células no adherentes con 4 lavados suaves. Para inducir la diferenciación a DC, se añadió a las células adherentes un medio completo suplementado con GM-CSF (200 ng/ml, Leucomax, Sandoz, Milan, Italy) e IL-4 (200 U/ml, Pepro tech, London, England). Como control, se añadió un medio completo sin citocinas para inducir la diferenciación normal de los monocitos en la línea de macrófagos. Dos veces a la semana, se reemplazó la mitad del sobrenadante con medio fresco idéntico al utilizado el día 0. Se detectó

la maduración de las DC en los pocillos tratados con citocinas por los cambios morfológicos típicos, tales como agregación, pérdida de adherencia y desarrollo de retoños celulares. Las células adherentes monocitos/macrófagos cultivadas sin citocinas fueron separadas por tratamiento con EDTA (0,5 mM en PBS-A), se lavaron dos veces, se contaron y se resuspendieron en medio fresco a diferentes concentraciones dependiendo del experimento realizado.

5 Para las reacciones de leucocitos alogénicos mixtos (AMLR), se analizaron las APC (DC o macrófagos) obtenidas con una cantidad fija de linfocitos T alogénicos, se purificaron por gradientes de Ficoll y Percoll y por adhesión, y después se congelaron. Se realizó la AMLR en placas de 48 pocillos con $0,5 \times 10^6$ linfocitos T y diluciones en serie de las APC. El día 4 de cultivo, se sembró una cantidad fija de la suspensión de células en una placa de 96 pocillos por triplicado. Se añadió $1 \mu\text{Ci}$ de ^3H -timidina a cada pocillo y después se cultivó la placa a 37°C durante 16 horas. Al final

10 de la incubación, se midió la cantidad de ^3H -timidina incorporada por las células con un contador β y se expresó como cuentas por minuto (cpm). Los resultados indican que las DC obtenidas son potentes APC como se demuestra por la inducción más alta de la proliferación de linfocitos alogénicos humanos en comparación con la estimulación de los macrófagos, y por la capacidad para inducir la proliferación de linfocitos T en los monos a todas las concentraciones usadas (Figura 16B).

15 Para uso en la vacunación, las DC serán resuspendidas a la concentración de 1×10^5 células/100 μl en RPMI 1640 suplementado con 5% de suero autólogo, tampón de Hepes 10 mM, 100 U/ml de penicilina-estreptomicina, 0,5 mg/ml de anfotericina B y 0,03% de glutamina, y después serán incubadas durante 2 horas a 37°C en presencia de proteína Tat o péptidos Tat o una combinación de Tat, Rev, Nef, Gag y/o citocinas. Después, estas DC tratadas serán

20 inoculadas dos veces o más en 2-4 semanas desde la primera inyección, intravenosamente. Alternativamente, las DC serán transducidas con vectores que contienen el gen *tat* solos o asociados con otros vectores mencionados antes y después inyectadas intravenosamente.

Ejemplo predictivo 9

25 Los inmunógenos descritos serán utilizados con el fin de inducir y/o potenciar una respuesta inmunitaria específica al nivel de la mucosa. Uno de los métodos se basa en el uso de bacterias (*S. Gordonii* y *Lactobacillus*) "transformadas por ingeniería genética" para expresar los antígenos virales mencionados antes. Estas bacterias colonizan la mucosa oral y vaginal de los ratones e inducen una respuesta específica tanto local como sistémica de anticuerpos contra antígenos heterólogos expresados en la superficie de las bacterias recombinantes (Ref. 116, 104, 106, 121, 117, 139, 105, 107). Estas bacterias pueden trabajar como vectores vivos de vacunas y tienen la ventaja de causar una estimulación

30 prolongada del sistema inmunitario. Además, se evaluará la posibilidad de co-expresar, sobre la superficie bacteriana, antígenos y moléculas virales implicados en la respuesta inmunitaria, tales como la sub-unidad B de la toxina sensible a la temperatura de *E. coli* o citocinas. La preparación de las cepas recombinantes de *S. Gordonii* se llevará a cabo como se ha descrito previamente (Ref. 116). Brevemente, (i) integración cromosómica de moléculas de DNA recombinante; (ii) fusiones transcripcionales con fuertes promotores cromosómicos; (iii) fusiones transcripcionales con el gen que codifica la proteína M6, una proteína de superficie del *Streptococcus*. Las cepas recombinantes de *S. Gordonii* se utilizarán para colonizar la mucosa vaginal de los monos. Se ha demostrado que las cepas recombinantes de *S. Gordonii* que expresan la región V3 de gp120 de HIV-1 y la proteína E7 de HPV-16, colonizan permanentemente la mucosa

40 vaginal del ratón después de un único inóculo, induciendo una respuesta tanto local como sistémica de anticuerpos específicos del antígeno. La respuesta sistémica está compuesta predominantemente de anticuerpos IgG2a, lo que sugiere una respuesta tipo Th1 (Ref. 105, 106). Se seleccionarán cepas vaginales humanas de *Lactobacillus*, que son capaces de colonizar la mucosa vaginal de los monos. Después, se utilizará un sistema genético ya desarrollado, que permite la expresión de antígenos heterólogos sobre la superficie de *Lactobacillus* (Rush, 1997). Este estrategia se basa en: (i) clonación de fusiones genéticas (emm6/gen heterólogo) en vectores de inserción que tienen homología con el transposón conjugativo Tn916; (ii) transformación de los vectores en cepas bacterianas que trabajan como un hospedante intermedio (*Bacillus Subtilis*); (iii) movilización conjugativa de los transposones recombinantes de *B. subtilis* a *Lactobacillus*. Las cepas recombinantes de *Lactobacillus* se utilizarán para colonizar la mucosa vaginal de los monos.

50 Se obtendrán muestras vaginales utilizando filtros absorbentes especiales (Ref. 38, 105, 106). La colonización será evaluada extendiendo las muestras vaginales en placas selectivas y la expresión de antígenos HIV *in vivo* será monitorizada por inmunofluorescencia sobre frotis vaginales (Ref: 105). Usando métodos ya estandarizados (Ref. 38), los frotis vaginales serán utilizados para i) test de Papanicolau, en el caso de vacunación vaginal; ii) presencia de antígenos de la vacuna en las células; iii) caracterización fenotípica de las células por análisis citofluorométrico (CD1, CD2, CD4, CD5, CD8, CD11c, CD14, CD20, CD28, CD40, CD25, HLA-DR); iv) evaluación de la producción

55 de citocinas (IL-2, IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, IL-15, RT-PCR semi-cuantitativa), determinación de la presencia de citocinas y β -quimiocinas en los fluidos mucosales, por ensayos Elisa; v) dosificación de las inmunoglobulinas totales y específicas (IgA e IgG) en el fluido mucosal por Elisa [Di Fabio *et al.*, Vaccine 15: 1 (1997)]. Un mes después del último inóculo del inmunógeno, los monos serán infectados intravenosamente o a través de la vía mucosal con el SHIV 89.6P. El seguimiento de los monos se realizará como se describe en el Ejemplo 4. Se obtendrán muestras de

60 sangre con el fin de realizar los exámenes rutinarios de laboratorio, la evaluación de los parámetros inmunológicos, tanto humorales como celulares, como se describe en el Ejemplo 4. El inventor cree que este método se puede utilizar satisfactoriamente para inducir la inmunización específica en los monos, usando la vía vaginal. Alternativamente, se puede inducir la inmunidad mucosal administrando los inmunógenos proteínicos, descritos antes, directamente a

65 través de la vía mucosal en presencia de adyuvantes, tales como la toxina termosensible de *E. coli* y la toxina cólica, o utilizando otros sistemas de administración bacterianos y no bacterianos, tales como citofectinas y liposomas o a través de la inoculación por otras vías que son capaces de inducir la respuesta inmunitaria más eficiente y protectora (Ref. 83, 81, 62).

Por otra parte, el inventor cree que los vectores herpes recombinantes, que expresan las proteínas virales descritas antes, pueden ser excelentes sistemas para inducir una respuesta inmunitaria mucosal eficaz. Se utilizarán los vectores virales recombinantes del virus de herpes simplex tipo 1 (HSV-1) para expresar las proteínas virales para la inducción, de una respuesta sistémica (a través de inmunización cutánea, i.d.) y mucosal (a través de la vía oral, vaginal o nasal). Se utilizarán los vectores herpes no patogénicos, no replicativos (Ref. 99) por su capacidad para incluir grandes secuencias exógenas, sin interferir con la eficacia de la infección (Ref. 52, 64). Por tanto, se construirán vectores capaces de contener más de un gen HIV (suplementario, regulador y estructural). La inmunidad mucosal puede ser inducida por una vacuna oral, vaginal o nasal. Se pueden usar los vectores herpes en estos métodos vacunales, puesto que el HSV-1 puede ser administrado directamente por vía mucosal (Ref. 176, 75). Los virus recombinantes serán

construidos utilizando un método de dos etapas que facilita la inserción de secuencias exógenas en el genoma viral. La primera etapa requiere la inserción de una casette de expresión con un gen informador (β -galactosidasa, LacZ) clonado en el sitio de restricción *PacI*, que no está presente en el genoma de HSV-1, flanqueado por la secuencia objetivo deseada de HSV-1, usando el procedimiento estándar para la recombinación de homólogos, para interrumpir el gen HSV-1. El virus recombinante se selecciona por la formación de placas con un fenotipo azul, usando "tinción por x-gal". La digestión de DNA viral con *PacI* libera el gen marcador y genera dos grandes fragmentos de DNA viral, que no son capaces de producir partículas virales infecciosas. La segunda etapa consiste en una co-transfección del DNA viral, digerido con el mismo plásmido usado para crear la delección, en la que el gen informador es sustituido por el gen deseado. El virus recombinante será identificado a través de la selección de placas con un fenotipo blanco después de "tinción por x-gal". Esta recombinación llevará a la eliminación de los sitios *PacI* permitiendo el uso de este método para insertar muchos genes en diferente *loci* del genoma de HSV-1 (Ref. 74). Cruzando los diferentes vectores que contienen los genes individuales, se pueden crear todas las diferentes combinaciones genéticas. El vector que contiene todos los genes deseados será aislado por el cribado con diferentes marcadores, fenotipos y por crecimiento selectivo en células competentes. Todas las combinaciones serán creadas alternando transfecciones de DNA y recombinaciones virales.

Los vectores que expresan los genes individuales *tat*, *rev*, *nef* o *gag*, serán construidos utilizando, como vector básico, aquel que contiene las mutaciones en los genes 4-/22-/27-/41, que es mejor para la baja toxicidad y la fuerte expresión del gen exógeno, comparado con los otros vectores HSV-1 no replicativos. Se usarán promotores constitutivos, tales como los de HCMV (promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano), o como *lep* ICP0 (promotor temprano inmediato de la proteína celular infectada) y LTR del virus de leucemia murina de Moloney, para inducir la expresión de los genes mencionados antes. Se construirán vectores HSV-1 no replicativos que expresan proteínas HIV en diferentes combinaciones. La producción de estos virus que contienen más genes diferentes se obtendrá por un cruzamiento genético de los vectores que contienen los genes individuales descritos en el punto anterior. Se crearán vectores dobles, triples y cuádruples. Los vectores serán inoculados en los monos i.d. o a través de la vía mucosal (oral, vaginal o nasal) con particular atención a este último tipo de administración (Ref. 176, 101, 102). El programa de vacunación consiste en múltiples inóculos a diferentes puntos de tiempo, que deben ser determinados en relación con el inmunógeno o la combinación de inmunógenos. Durante la inmunización los animales deben ser monitorizados para la evaluación de parámetros hematológicos e inmunológicos como se describe en el Ejemplo 4. Se obtendrán muestras vaginales por métodos ya estandarizados, que serán estudiadas como se ha descrito previamente en este Ejemplo.

Ejemplo predictivo 10

45 *Sistemas de administración*

Usando nuevos sistemas de administración, tales como eritrocitos o nanopartículas será inoculada la Tat (proteína y/o DNA) sola o en combinación (como se ha descrito antes).

El sistema de administración que implica el uso de eritrocitos se basa en la posibilidad de administrar el antígeno unido a eritrocitos autólogos. De hecho los eritrocitos, al final de su ciclo de vida (alrededor de 120 días en los seres humanos), son separados de la circulación por los macrófagos, conocidos por tener la función de células profesionales presentadoras de antígeno. Esta propiedad se puede utilizar para estrategias de preparación de vacunas. De este modo, los antígenos se unirán a los eritrocitos con una técnica particular (Ref. 95, 96), que permite la conservación de las propiedades inmunogénicas del antígeno (Ref. 29,30). A través de este procedimiento, se puede realizar la biotinylation de los eritrocitos en ausencia de una modificación significativa de sus propiedades y ciclo de vida (Ref. 95). La fagocitosis de los eritrocitos viejos por las células de macrófagos empezará una respuesta inmunitaria. La opsonización de anticuerpos de los eritrocitos que llevan el antígeno ayudará a la separación del antígeno de la circulación. Las principales ventajas de esta metodología son: 1) una pequeña cantidad de antígeno necesaria para inducir una respuesta inmunitaria humoral y celular, 2) larga duración de la inmunización debido a la presencia prolongada de antígenos llevados por los eritrocitos de la periferia, 3) funciones de adyuvante proporcionadas por el propio sistema.

De hecho, se ha demostrado en estudios animales que la administración de antígenos unidos a la membrana de eritrocitos autólogos induce una respuesta inmunitaria similar o más alta comparada con la respuesta inmunitaria obtenida con el mismo antígeno administrado con adyuvante de Freund (Ref. 29). Estas propiedades son muy útiles para desarrollar una vacuna anti-HIV, en particular cuando se necesita aumentar la inmunogenicidad del antígeno y la disponibilidad del antígeno y cuando se requiere un número bajo de inmunizaciones. En adición, se puede usar esta

estrategia cuando no hay adyuvantes incluidos en el protocolo de vacunación. De hecho, se ha demostrado en el modelo de ratón que los antígenos administrados a través de eritrocitos autólogos inducen respuestas inmunitarias similares o más altas en comparación con las obtenidas con el mismo antígeno administrado con adyuvante de Freund conocido como el adyuvante más potente disponible comercialmente (Ref. 29), aunque no está aprobado para estudios humanos debido a importantes efectos secundarios. Por tanto, el efecto adyuvante de los eritrocitos que llevan la proteína Tat, sola o en combinación con otros inmunógenos previamente descritos, será analizado en primates no humanos. Se realizará la comparación entre estos datos y los obtenidos con la administración de la proteína Tat en presencia de Alum, RIBI o ISCOM.

El uso de nanopartículas puede representar una estrategia adicional de administración. Las nanopartículas funcionales representan un importante sistema para el transporte y liberación de proteínas y DNA (Ref. 27, 172). Las nanosferas son partículas poliméricas coloidales de diferente composición química, con una amplia variación de diámetro de 10 a 1000 nm. Es posible adsorber diferentes clases de sustancias sobre la superficie o dentro de las nanosferas (oligonucleótidos, fármacos, proteínas, péptidos, DNA) que son llevadas entonces al citoplasma o al núcleo de las células donde son liberadas lentamente. En adición, es necesario que se administre una pequeña cantidad del inmunógeno debido a las características de las nanosferas. Las nanopartículas son un buen sistema de administración especialmente para moléculas con baja estabilidad en el entorno extracelular o cuando la administración se dirige a una célula objetivo específica.

El inventor cree que las nanosferas se pueden usar para administrar los antígenos virales descritos antes. Es posible preparar y caracterizar tres tipos de nanosferas diseñados para la administración y liberación controlada de DNA (nanosferas tipo 1 y 2) y proteínas (nanosferas tipo 3).

Para la administración de DNA, hay disponibles dos tipos de nanosferas (nanosferas tipo 1 y 2). El primer tipo de nanosferas (nanosferas tipo 1) tiene una estructura de triple capa con una capa externa de poli-oxi-etilen-glicol (PEG). Recientes informes basados en estudios de sistemas cautelosos (Ref. 180, 78), muestran que el PEG forma nanosferas invisibles para las células Kupfer. Por contraste, la capa más interna está hecha de monómeros con características tensioactivas que contienen grupos de amonio cuaternario que adsorben de forma reversible el DNA a través de un mecanismo de intercambio iónico y un núcleo interno hecho de metacrilato de metilo como monómero. Estas nanosferas se obtienen por polimerización en microemulsión que implica la polimerización de un monómero vinílico o vinilidénico en presencia de una mezcla de reactivos tensioactivos. Estos reactivos son capaces por tanto de polimerizar el monómero. De estos, uno tiene un grupo de amonio cuaternario que interactúa con oligonucleótidos y el otro tiene una larga cadena de PEG.

El segundo tipo de sistemas de administración de DNA está hecho de nano y microsferas (nanosferas tipo 2) funcionales con características de hidrogel. Estas nanosferas deben ser preparadas en presencia de DNA para atrapar a éste dentro del sistema de administración. Son necesarios los núcleos-cubiertas de las nanosferas para administrar las proteínas (nanosferas tipo 3). Las nanosferas están hechas de un núcleo interno de poli-metacrilato de metilo y una cubierta externa de copolímero estadístico hidrosoluble de ácido acrílico y metacrilato de metilo, conocido por tener un alto grado de afinidad para las proteínas (Ref. 79, 80). Este copolímero está comercialmente disponible (EUDRAGIT) y se obtiene con diferentes porcentajes de los dos co-monómeros. El procedimiento de preparación que lleva a la fabricación de este segundo tipo de nanosferas implica la polimerización en dispersión. La síntesis implica la polimerización radical de un monómero vinílico o vinilidénico en presencia de EUDRAGIT que tiene funciones estabilizantes estéricas. Después de nucleación de las nanosferas, el EUDRAGIT se ordena fuera de las partículas. De este modo, modificando la concentración del iniciador radical la relación entre el monómero y EUDRAGIT y el tiempo de reacción, se obtienen numerosas muestras de nanosferas con diferentes características morfológicas y químicas.

Por tanto, se puede evaluar si la administración de proteína Tat o DNA Tat mediante nanopartículas, solas o en combinación con los inmunógenos mencionados antes (proteína o DNA) inducirá una respuesta inmunitaria contra HIV. En particular, serán evaluadas las respuestas inmunitarias humores o mediadas por las células y serán comparadas con las obtenidas con los inmunógenos no administrados en el modelo del mono.

El inventor cree que la información derivada de estos estudios puede ser útil para desarrollar una vacuna anti-HIV. En adición, la información derivada de este protocolo experimental será transferida también a otros estudios de vacunas, en particular a aquellos estudios que se ocupan de proteínas o péptidos recombinantes de baja inmunogenicidad. La posibilidad de desarrollar una vacuna con una única administración llevará a enormes ventajas en términos de eficacia de la vacuna y disminución de los costes de manejo de los programas de vacunación.

Referencias

1. **Agostini et al.**, *Blood* 90:1115 (1997)
- 5 2. **Albini et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4838 (1995)
3. **Allan et al.**, *Science* 230:813 (1985)
- 10 4. Antibodies - A laboratory manual, Eds. Harlow E., Lane D., *Cold Spring Harbor Laboratory* (1988)
5. **Arya et al.**, *Science* 229:69 (1985)
6. **Aryoshi et al.**, *AIDS* 9:555 (1995)
- 15 7. **Audibert et al.**, *Immunol. Today* 14:281 (1993)
8. **Badolato et al.**, *Blood* 90:2804. (1997)
9. **Barillari et al.**, *J. Immunol.* 149:3727 (1992)
- 20 10. **Barillari et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7941 (1993)
11. **Barillari et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 149:3727 (1993)
- 25 12. **Blomberg et al.**, *J. Immunol. Methods* 160:27-34 (1993)
13. **Blomberg et al.**, *J. Immunol. Methods* 168:267-273 (1994)
14. **Blomberg et al.**, *J. Immunol. Methods* 193: 199-206 (1996)
- 30 15. **Bohan et al.**, *Gene Expr.* 2:391 (1992)
16. **Bourgault et al.**, *J. Virol.* 66:75 (1992)
- 35 17. **Boyer et al.**, *Nature Med.* 3:526 (1997)
18. **Bruisten et al.**, *J. Infect. Dis.* 166:620 (1992)
19. **Buseyne et al.**, *J. Virol.* 67:694 (1993)
- 40 20. **Butera et al.**, *J. Virol.* 65:4645 (1991)
21. **Butera et al.**, *J. Virol.* 68:2726 (1994)
- 45 22. **Cafaro et al.**, *AIDS Res. Hum. Retrov.* 7:204 (1991)
23. **Carrol et al.**, *Science.* 276: 273-276, (1997)
24. **Carson et al.**, *J. Clin. Invest.* 99:937 (1997)
- 50 25. **Chang et al.**, *J. Biomed. Sci.* 2:189 (1995)
26. **Chang et al.**, *AIDS* 11: 1421 (1997)
- 55 27. **Chavany et al.**, *Phar. Res.* 9: 441 (1994)
28. **Chen et al.**, *J. Immunol.* 149:4060 (1992)
29. **Chiarantini et al.**, *Vaccine* 15: 276 (1997)
- 60 30. **Chiarantini et al.**, *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 5: 235 (1998)
31. **Chirmule et al.**, *J. Virol.* 69:492 (1995)
- 65 32. **Choppin et al.**, *J. Immunol.* 147:569 (1991)
33. **Corallini et al.**, *Cancer Res.* 53: 1 (1993)

34. **Corallini et al.**, *Cancer Res.* 53: 5569 (1993)
35. **Culman et al.**, *J. Immunol.* 146:1560 (1991)
- 5 36. **Couillin et al.**, *J. Exp. Med.* 180:1129 (1994)
37. **Danko et al.**, *Vaccine* 12:1499 (1994)
38. **Di Fabio et al.**, *Vaccine* 15: 1 (1997)
- 10 39. **Ensoli et al.**, *IV International Conference on AIDS, Stockholm*, 1:241 (1988)
40. **Ensoli et al.**, *Nature* 345:84 (1990)
- 15 41. **Ensoli et al.**, *J. Virol.* 67:277 (1993)
42. **Ensoli et al.**, *Nature* 371:674 (1994)
- 20 43. **Ensoli et al.**, *AIDS Updates*, Eds. V. De Vita, Jr., Hellman S., Rosenberg S.A., Lippincott J.B., Philadelphia; 7: 1 (1994)
44. **Felber et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:1495 (1989)
45. **Fine et al.**, *Ann. Plast. Surg.* 20:6 (1988)
- 25 46. **Fiorelli et al.**, *J. Clin. Invest.* 95:1723 (1995)
47. **Folks et al.**, *Science* 238:800 (1987)
- 30 48. **Franchini et al.**, *Virology* 155:593 (1986)
49. **Frankel et al.**, *Cell* 55:1189 (1988)
50. **Fugier-Vivier et al.**, *J. Exp. Med.* 186: 813 (1997)
- 35 51. **Gait et al.**, *Trends Biochem. Sci.* 18:255 (1993)
52. **Glorioso et al.**, *Ann. Rev. Microbiol.* 49:675 (1995)
- 40 53. **Gobert et al.**, *Virology* 176:458 (1990)
54. **Goletti et al.**, *J. Virol.* 69:2540 (1995)
55. **Gorman et al.**, *Mol. Cell. Biol.* 2:1044 (1982)
- 45 56. **Grabstein et al.**, *Science* 264:965 (1994)
57. **Grosjean et al.**, *J. Exp. Med.* 186: 801 (1997)
- 50 58. **Guy et al.**, *Nature* 330:266 (1987)
59. **Harrer et al.**, *AIDS Res. Hum. Retrov.* 12:585 (1996)
60. **Harrich et al.**, *EMBO J.* 16:6 (1997)
- 55 61. **Hinkula et al.**, *J. Virol.* 71:5528 (1997)
62. **Honenbang et al.**, *Infect. Immun.* 62:15 (1994)
- 60 63. **Huang et al.**, *EMBO J.* 13:2886 (1994)
64. **Huard et al.**, *Gene Ther.* 2:385 (1995)
- 65 65. **Igarashi et al.**, *AIDS Res. Hum. Retrov.* 10:1021 (1994)
66. **Jonuleit et al.**, *J. Immunol.* 158:2610 (1997)
67. **Jullien et al.**, *J. Immunol.* 158:800 (1997)

68. **Kanai et al.**, *J. Immunol.* 157:3681 (1996)
69. **Karlosson et al.**, *J. Virol.* 71:4218 (1997)
- 5 70. **Kashanchi et al.**, *J. Virol.* 70:5503 (1996)
71. **Kestler et al.**, *Science* 248:1109 (1991)
72. **Kim et al.**, *Oncogene* 7: 1525 (1992)
- 10 73. **Koup et al.**, *J. Virol.* 68:4650 (1994)
74. **Krisky et al.**, *Gene Ther.* 4:1120 (1997)
- 15 75. **Kuklin et al.**, *J. Virol.* 240:245 (1998)
76. **Landes, Austin**, p. 107 (1997)
77. **Lanzavecchia**, *Science* 260: 937 (1993)
- 20 78. **Lasic et al.**, *Chemical Reviews* 95: 2601 (1995)
79. **Laus et al.**, *Polimer* 37: 343 (1996)
- 25 80. **Laus et al.**, *Polimers for Adv. Techn.* 7: 548 (1996)
81. **Lehnen et al.**, *Vaccine Research* 1:319 (1992)
82. **Levine et al.**, *Science.* 272: 1939-1943 (1996)
- 30 83. **Lewis et al.**, *Vaccine Press*, Ed. Robinson, Farrar, Wiblin; Human Press, Totowa, New Jersey (1996)
84. **Li et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8116 (1997)
- 35 85. **Li et al.**, *J. AIDS* 5:639 (1992)
86. **Li et al.**, *Science* 268:229 (1995)
87. **Li et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8116 (1997)
- 40 88. **Lippincott J.B.**, Stockholm, Sweden, May 31-June 3 (1997)
89. **Littaua et al.**, *J. Virol.* 65:40 (1991)
- 45 90. **Lövgren et al.**, *Vaccine* 14:753 (1996)
91. **Lu et al.**, *J. Virol.* 70:3978 (1996)
92. **Lubaki et al.**, *J. Infect. Dis.* 175:1360 (1997)
- 50 93. **Lucey et al.**, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4:43 (1997)
94. **Luciw et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:7490 (1995)
- 55 95. **Magnani et al.**, *Biotech. Appl. Biochem.* 16: 188 (1992)
96. **Magnani et al.**, *Biotech. Appl. Biochem.* 20: 335 (1994)
97. **Malim et al.**, *Nature* 338:254 (1989)
- 60 98. **Mann et al.**, *EMBO J.* 10:1733 (1991)
99. **Marconi et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci* 93:11319 (1996)
- 65 100. **Marcuzzi et al.**, *J. Virol.* 66:4228 (1992)
101. **McLean et al.**, *J. Infect. Dis.* 66:341 (1994)

102. **McLean** *et al.*, *Vaccine* 14:987 (1996)
103. **Mcfarland** *et al.*, *J. Inf. Dis.* 170:766 (1994)
- 5 104. **Medagliani** *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6868 (1995)
105. **Medagliani** *et al.*, *Biotech. Annu. Rev.* 3:297 (1997)
106. **Medagiini** *et al.*, *Vaccine* 15:1330 (1997)
- 10 107. **Medagliani** *et al.*, *Am. J. Reprod. Immunol.* 39:199 (1998)
108. **Meyerhans** *et al.*, *Cell* 58:901 (1989)
- 15 109. **Morein** *et al.*, *AIDS Res. Hum. Retrov.* S10:S109 (1994)
110. Molecular cloning - A laboratory manual; Eds. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J., Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor*, New York (1992)
- 20 111. **Myers** *et al.*, *Human Retroviruses and AIDS*: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences, Los Alamos Laboratory, Los Alamos, NM p.1 (1993)
112. **Myers** *et al.*, *Human Retroviruses and AIDS*. Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos, NH (1995)
- 25 113. **Neuvet** *et al.*, *J. Virol.* 70:5572 (1996)
114. **Nietfield** *et al.*, *J. Immunol.* 154:2189 (1995)
- 30 115. **Nixon** *et al.*, *Nature* 336:484 (1988)
116. **Oggioni** *et al.*, *Vaccine* 13:775 (1995)
117. **Oggioni**, *et al.*, *Gene* 169:85 (1996)
- 35 118. **O'Hagan** *et al.*, *Novel Delivery Systems for Oral Vaccines*, Eds. O'Hagan, D.T. *CRC Press Boca Raton, FL*, p. 176 (1994)
119. **Parslow**, *Human Retroviruses*, Ed. B.R. Cullen, *IRL press*, Oxford, England, p. 101 (1993)
- 40 120. **Pilkington** *et al.*, *Mol. Immunol.* 33:439 (1996)
121. **Pozzi** *et al.*, en "Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization", eds. Pozzi G. & Wells, J.M. - *Landes, Austin*, p. 35 (1997)
- 45 122. **Puri** *et al.*, *Cancer Res.*, 52:3787 (1992)
123. **Puri** *et al.*, *AIDS Res.* 11:31 (1995)
- 50 124. **Quesada-Rolander** *et al.*, *ABS 6-S1, 2nd European Conference on Experimental AIDS Research*, Stockholm, Sweden, May 31-June3 (1997)
125. **Quinn** *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239:6 (1997)
- 55 126. **Ratner** *et al.*, *Nature* 313:277 (1985)
127. **Re** *et al.*, *J. Acquir. Immun. Defic. Syndr.* 10:408 (1995)
128. **Reimann** *et al.*, *J. Virol.* 70:3189 (1996)
- 60 129. **Reimann** *et al.*, *J. Virol.* 70:6922 (1996)
130. **Reiss** *et al.*, *J. Med Virol.* 30:163 (1990)
- 65 131. **Reiss** *et al.*, *AIDS Res. Hum. Retrov.* 5:621 (1989)
132. **Riley** *et al.*, *J.Immunol.* 158: 5545-5553, (1997)

133. **Rinaldo et al.**, *AIDS Res. Hum. Retrov.* 11:481 (1995)
134. **Rinaldo et al.**, *J. Virol.*, 69:5838 (1995)
- 5 135. **Rodman et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7719 (1993)
136. **Rodman et al.**, *J. Exp. Med.* 175:1247 (1992)
137. **Rosenberg et al.**, *Int. Immunol.* 9 (5):703 (1997)
- 10 138. **Rosenthal et al.**, *Seminars in Immunology* 9:303 (1997)
139. **Rush, et al.**, en "Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization", eds. Pozzi G. & Wells, J.M. - *Landes, Austin*, p. 107 (1997)
- 15 140. **Sadaie et al.**, *New Biol.* 2:479 (1990)
141. **Saiki et al.**, *Science* 230:1350 (1985)
- 20 142. **Sakuragi et al.**, *J. Gen. Virol.* 73:2983 (1992)
143. **Salter et al.**, *Immunogenetics* 21:235 (1985)
144. **Schnorr et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 5326 (1997)
- 25 145. **Sharma et al.**, *Biochem. Biophys. Res. Co.* 208:704 (1995)
146. **Shibata et al.**, *J. Virol.* 65:314 (1991)
- 30 147. **Sipsas et al.**, *J. Clin. Invest.* 99:752 (1997)
148. **Sodroski et al.**, *Science* 227:171, (1985)
149. **Steinaa et al.**, *Arch. Virol.* 139:263 (1994)
- 35 150. **Steinman R.M.**, *Exp. Hematol.* 24: 859 (1996)
151. **Tahtinen et al.**, *Virology* 187:156 (1992)
- 40 152. *Theoretical Biology and Biophysics*, Los Alamos, NH, (1995)
153. **Titti et al.**, *Cell. Pharmacol. AIDS* 3:123 (1996)
154. **Trinchieri**, *Curr. Opin. Hematol.* 4:59 (1997)
- 45 155. van **Baalen et al.**, *J. Gen. Virol.*, 77:1659 (1996)
156. van **Baalen et al.**, *J. Gen. Virol.* 78:1913 (1997)
- 50 157. **Vellutini et al.**, *AIDS Res. Hum. Retrov.* 11:21 (1995)
158. **Venet et al.**, *J. Immunol.* 148:2899 (1992)
159. **Viscidi et al.**, *Science* 246:1606 (1989)
- 55 160. **Vogel et al.**, *Nature* 335: 601 (1988)
161. **Voss et al.**, *Virology* 208:770 (1995)
- 60 162. **Wain-Hobson**, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:878 (1993)
163. **Westendorp et al.**, *J. Virol.* 68:4177 (1994)
164. **Westendorp et al.**, *Nature* 375:497 (1995)
- 65 165. **Wolf et al.**, *J. Immunol.* 146:3074 (1991)
166. **Yang et al.**, *J. Virol.* 70:4576 (1996)

167. **Yang et al.**, *J. Virol.* 70:5799 (1996)
168. **Yasutomi et al.**, *J. Virol.* 70:678 (1996)
- 5 169. **Zauli et al.**, *Blood* 86:3823 (1995)
170. **Zauli et al.**, *Blood* 80:3036 (1996)
171. **Zauli et al.**, *J. Immunol.* 157:2216 (1996)
- 10 172. **Zobel et al.**, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7: 483 (1997)
173. **Gibellini et al.**, *Blood* 89:1654 (1997)
- 15 174. **Bauer et al.**, *J. Infect. Dis.* 165:419 (1992)
175. **Klein et al.**, *J. Exp. Med.* 181:1365 (1995)
176. **Bowen et al.**, *Res. Virol.* 143:269 (1992)
- 20 177. **Zamarchi et al.**, *AIDS Res. Human Retrov.* 9:1139 (1993)
178. **Fiore et al.**, *AIDS* 5:1034 (19912)
- 25 179. **Roman et al.**, *Nature Med.* 3:849 (1997)
180. **Allen et al.**, *Biochim. Biophys. Acta* 1237:99 (1995).

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna para uso como un medicamento en un ser humano, comprendiendo dicha vacuna una proteína Tat aislada, en la que dicha proteína Tat aislada está en su forma no oxidada.
2. La vacuna según la reivindicación 1, en la que dicha proteína Tat aislada es una proteína Tat tipo natural.
3. La vacuna según la reivindicación 2, en la que dicha proteína Tat tipo natural comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia nucleotídica de Seq. ID 1.
4. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha proteína Tat aislada está en combinación con un antígeno de HIV que es Nef, Rev, Gag, o una parte de ellos.
5. La vacuna según la reivindicación 4, en la que dicha combinación es una proteína de fusión Tat/Nef, Tat/Rev, o Tat/Gag.
6. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que dicha proteína Tat aislada está en combinación con una citocina inmuno-moduladora.
7. La vacuna según la reivindicación 6, en la que dicha citocina inmuno-moduladora es IL-12 o IL-15.
8. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dicha proteína Tat aislada está conjugada con un epítipo T ayudador.
9. La vacuna según la reivindicación 8, en la que dicho epítipo T ayudador es un epítipo T ayudador de toxoide tetánico.
10. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que dicha vacuna se formula para administración al ser humano mediante administración mucosal, nasal, oral, vaginal, rectal, intramuscular, subcutánea, intradérmica, sistémica o local.
11. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que dicho ser humano está infectado con HIV.
12. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que dicha proteína Tat aislada está purificada.
13. La vacuna según la reivindicación 12, en la que dicha proteína Tat aislada se purifica por un método que comprende realizar una cromatografía de afinidad con heparina.
14. La vacuna según la reivindicación 13, en la que dicha etapa de purificación es seguida por las etapas de (a) liofilización de dicha proteína Tat aislada, y (b) resuspensión de la proteína Tat liofilizada en un tampón desgasificado.
15. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que dicha proteína Tat aislada está presente en una cantidad desde aproximadamente 10 ng/ml hasta aproximadamente 1 µg/ml.
16. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que dicha proteína Tat aislada está en una forma liofilizada.
17. La vacuna según la reivindicación 13, en la que dicha etapa de purificación es seguida por la etapa de (a) liofilización de dicha proteína Tat aislada, y (b) resuspensión de la proteína Tat liofilizada en un fluido biológicamente aceptable.
18. La vacuna según la reivindicación 17, en la que el fluido biológicamente aceptable es suero, plasma, o una fracción de los mismos.
19. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en la que dicha proteína Tat aislada es transportada en un fluido biológicamente aceptable.
20. La vacuna según la reivindicación 19, en la que dicho fluido biológicamente aceptable es suero, plasma, o una fracción de los mismos.
21. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-20, que comprende además un adyuvante.
22. La vacuna según la reivindicación 21, en la que dicho adyuvante es Alum, RIBI, ISCOM, o una mezcla de los mismos.

23. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, que comprende además un inhibidor de la replicación viral.

24. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, que comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

25. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en la que dicha proteína Tat aislada se formula para administración mediante un sistema de administración.

26. La vacuna según la reivindicación 25, en la que dicho sistema de administración es un eritrocito, nanopartícula, o bacteria.

27. La vacuna según la reivindicación 26, en la que dicho sistema de administración es una bacteria que es *Streptococcus gordonii* o *Lactobacillus*.

28. La vacuna según la reivindicación 26, en la que dicho sistema de administración es una bacteria que está modificada para expresar un antígeno viral.

29. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en la que dicha proteína Tat aislada es para administración intradérmica a 1-6 μ g sin adyuvantes.

30. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-29, en la que dicha proteína Tat aislada se administra en la mucosa.

31. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-30, para uso en la inducción de una respuesta inmunitaria específica en el ser humano.

32. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-30, para uso en la inmunización de células de la sangre periférica de un sujeto infectado con HIV, expandidas por co-estimulación con perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28.

33. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-30, para uso en el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un tumor asociado con la infección de HIV, un síndrome asociado con la infección de HIV, un síntoma asociado con la infección de HIV, o SIDA.

34. Un procedimiento para preparar la vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-30, que comprende la liofilización y resuspensión de dicha proteína Tat aislada en un fluido biológicamente aceptable.

35. El procedimiento según la reivindicación 34, en la que dicho fluido biológicamente aceptable es suero, plasma, o una fracción de los mismos.

36. Un procedimiento para preparar la vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-30, que comprende (a) purificar dicha proteína Tat aislada por un método que comprende realizar una cromatografía de afinidad con heparina; (b) liofilizar dicha proteína Tat aislada y (c) resuspender la proteína Tat liofilizada en un tampón desgasificado.

37. El uso de una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1-33, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un tumor asociado con la infección de HIV, un síndrome asociado con la infección de HIV, un síntoma asociado con la infección de HIV, o SIDA.

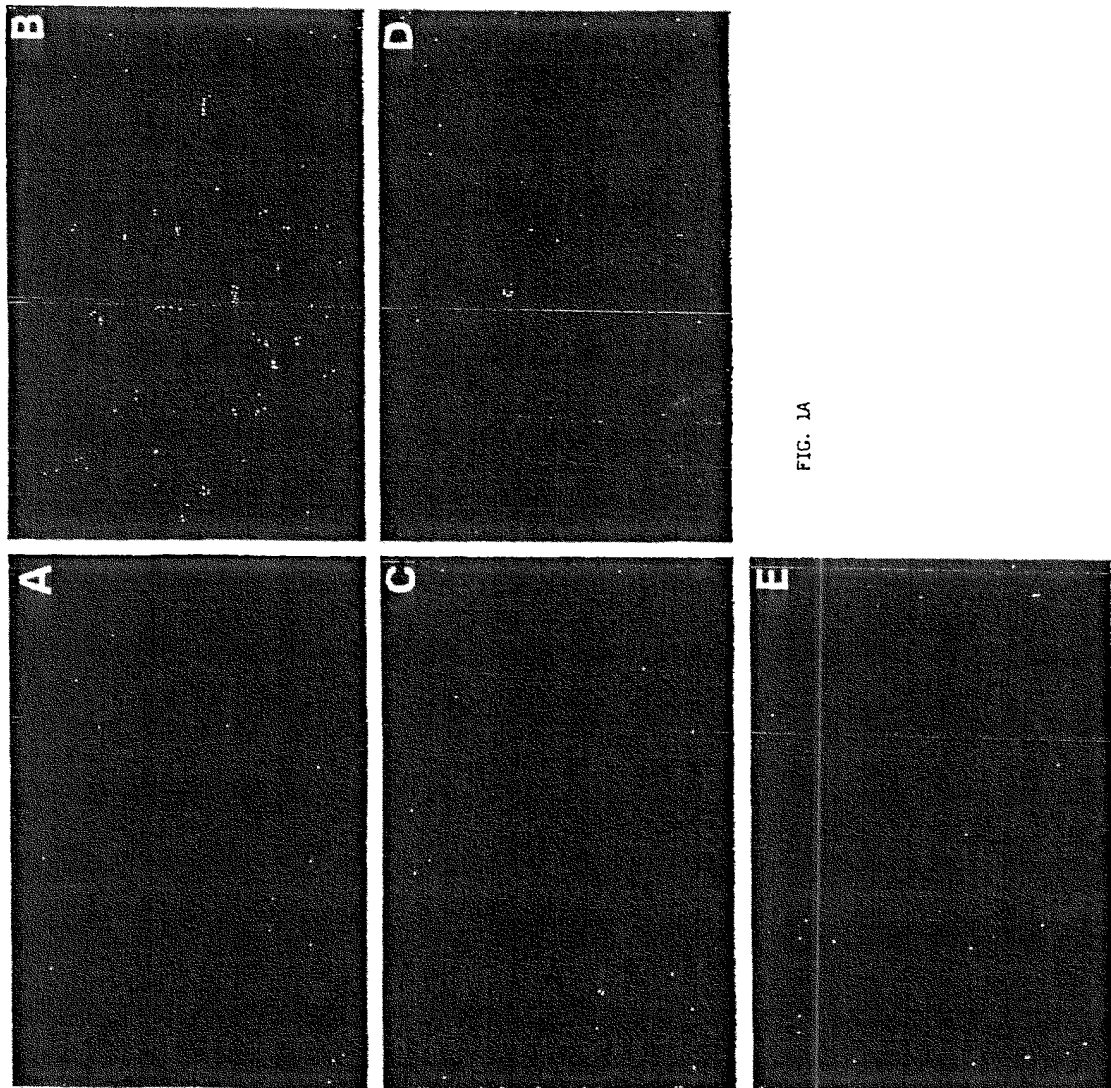


FIG. 1A

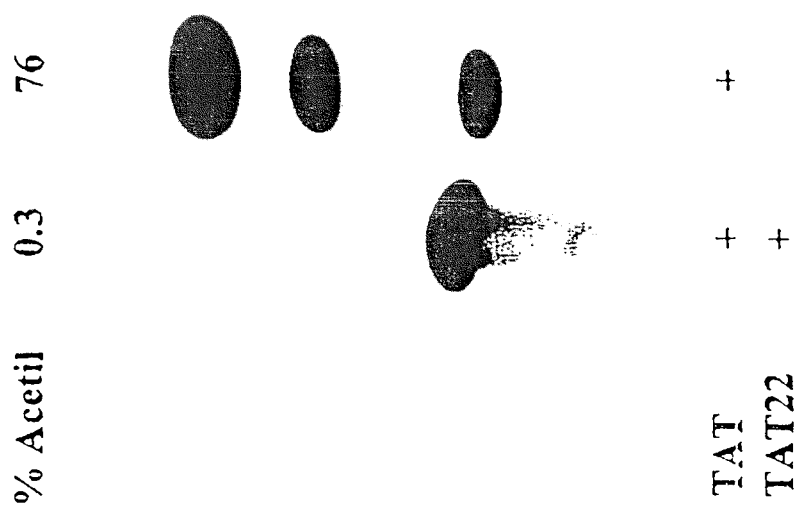
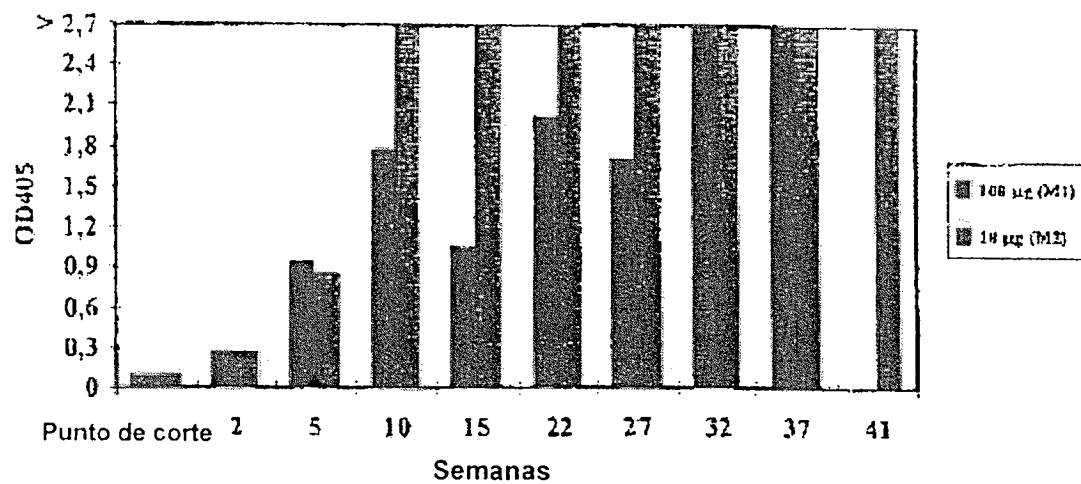


FIG. 1B

A



B

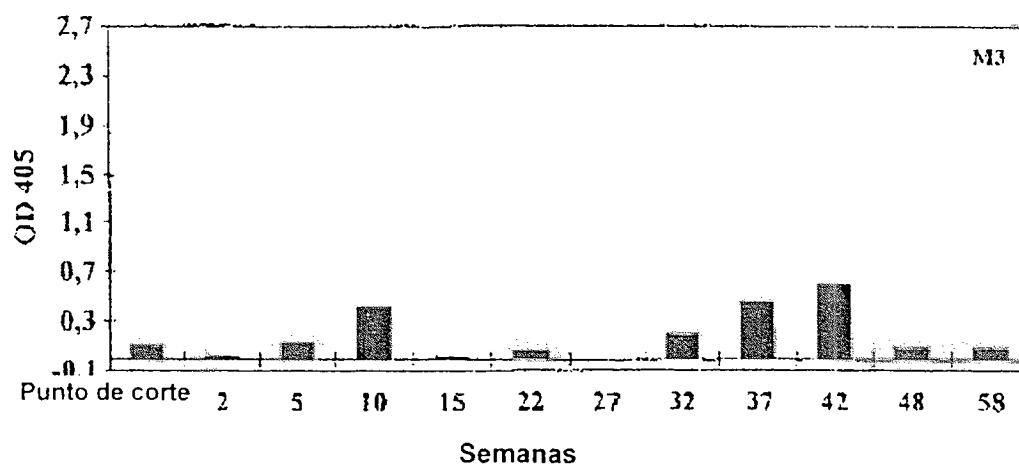


FIG. 2

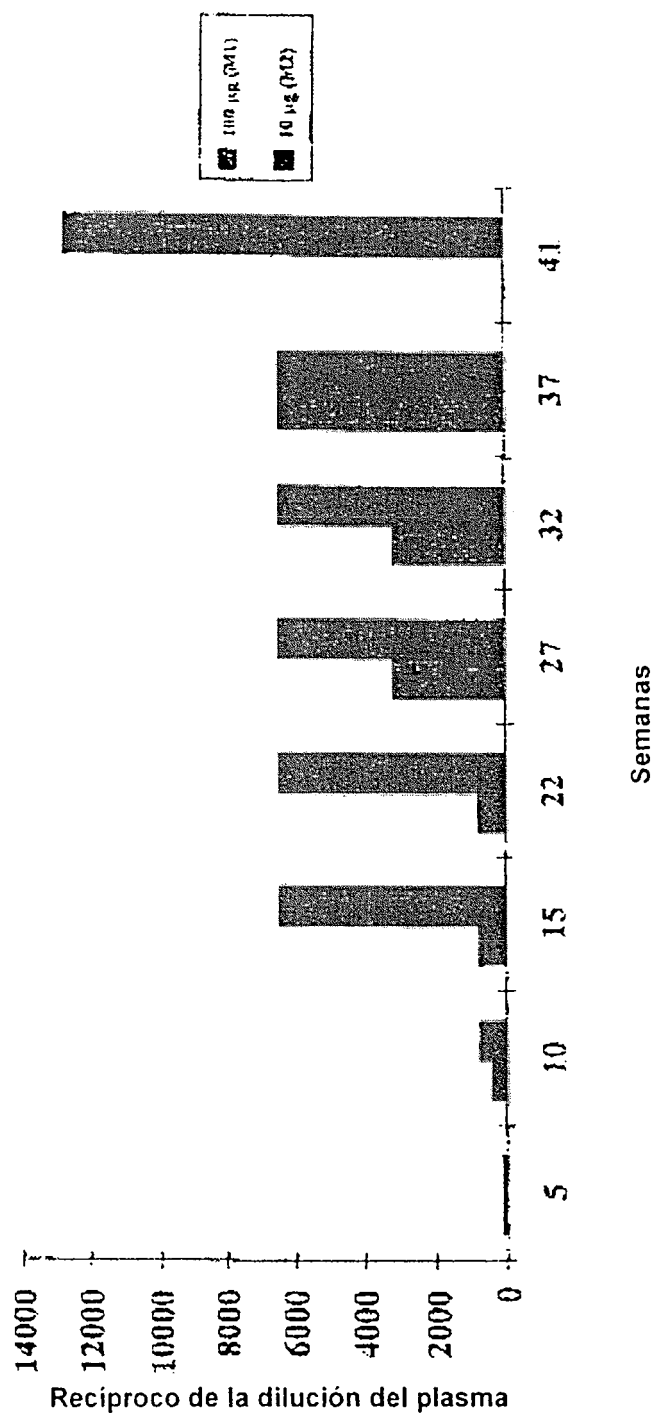


FIG. 3

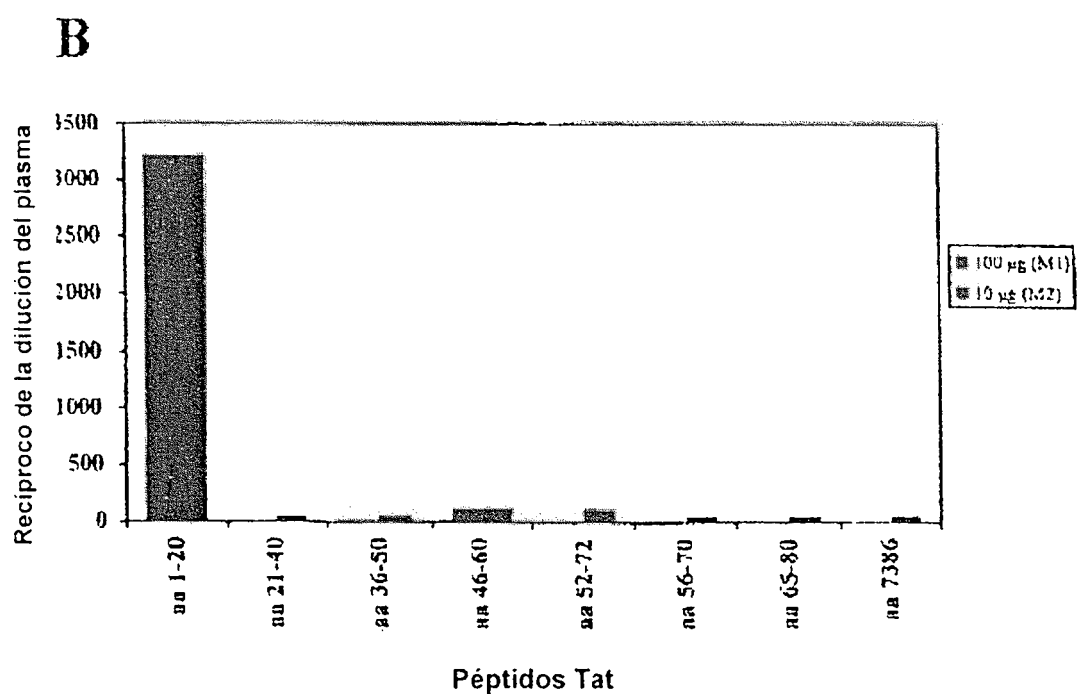
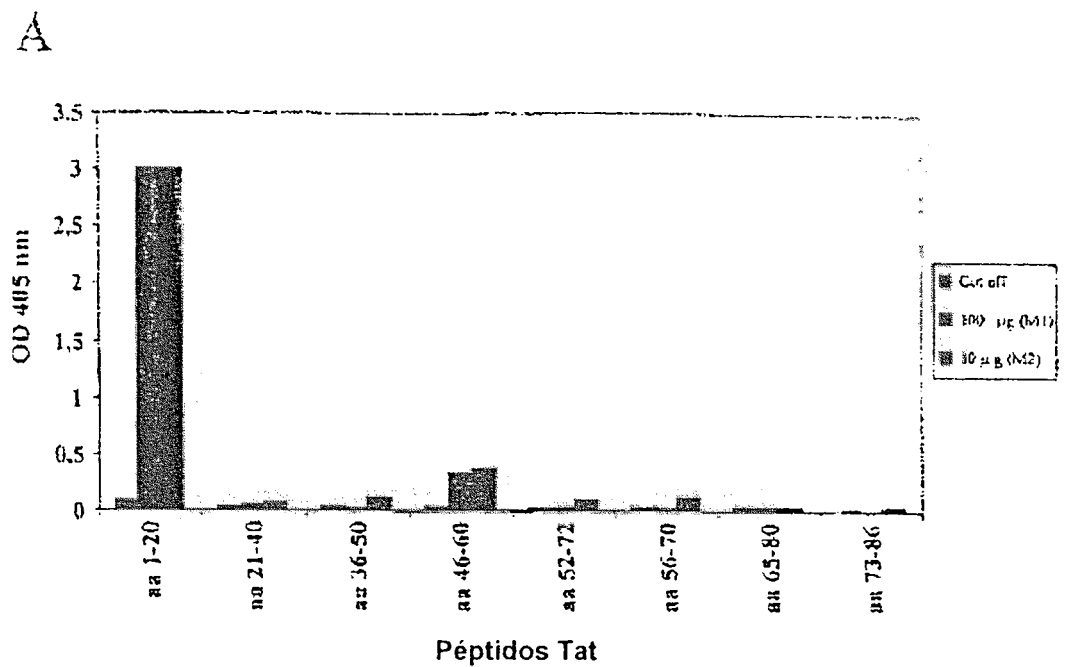


FIG. 4

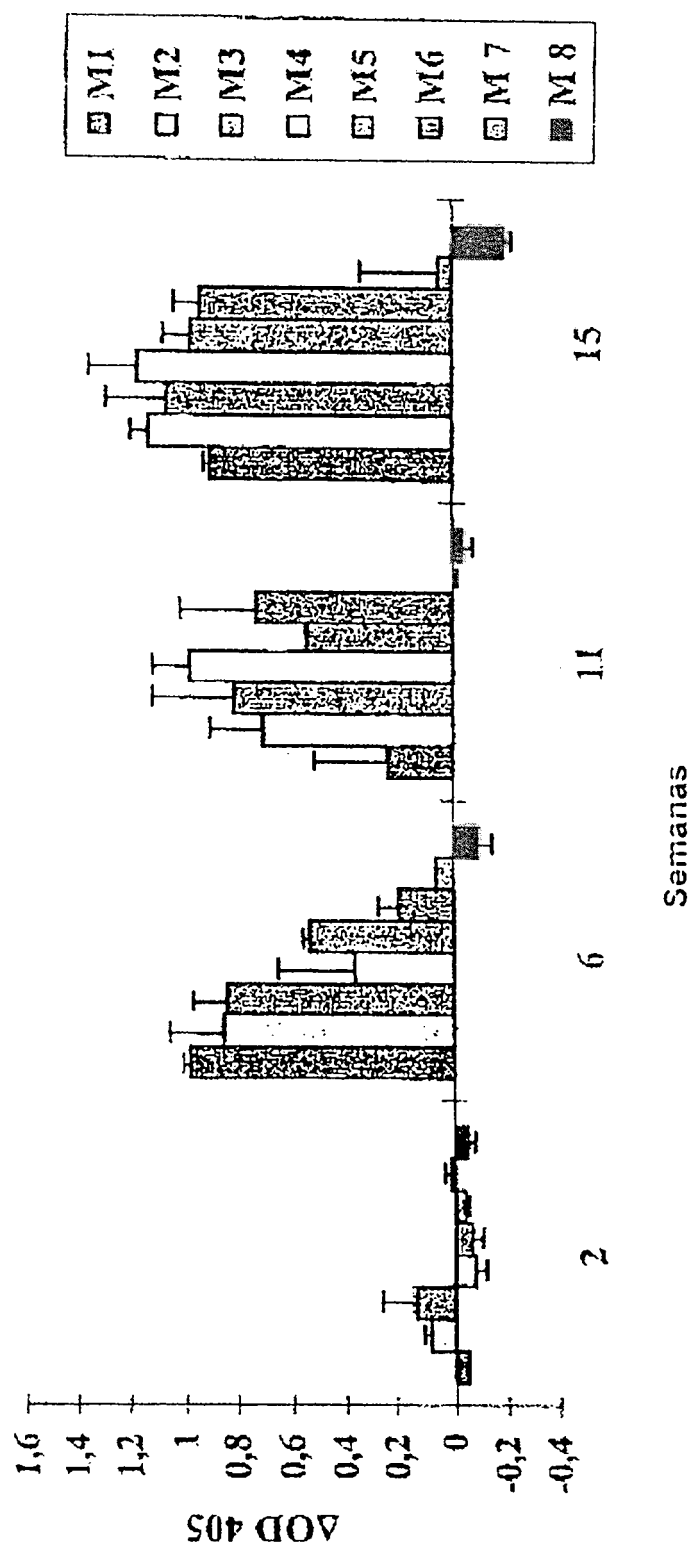


FIG. 5

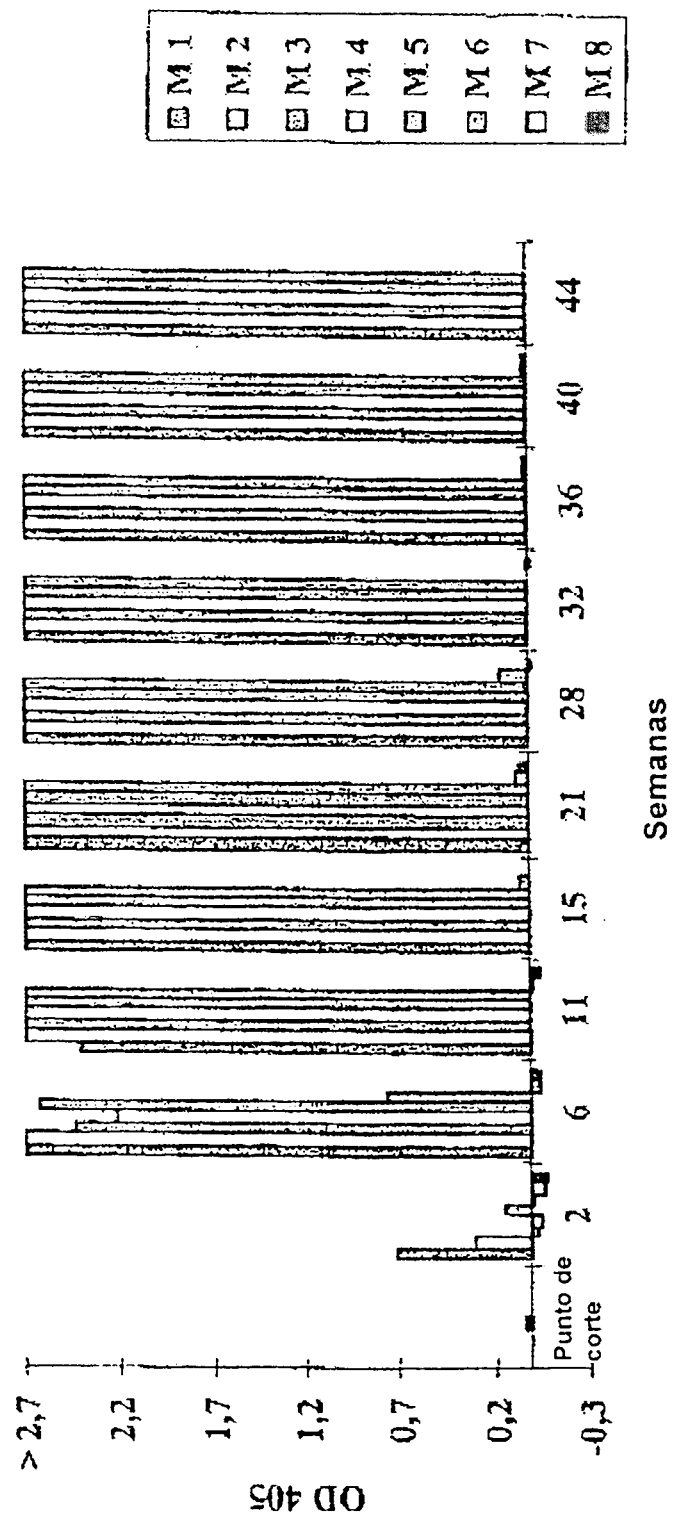


FIG. 6

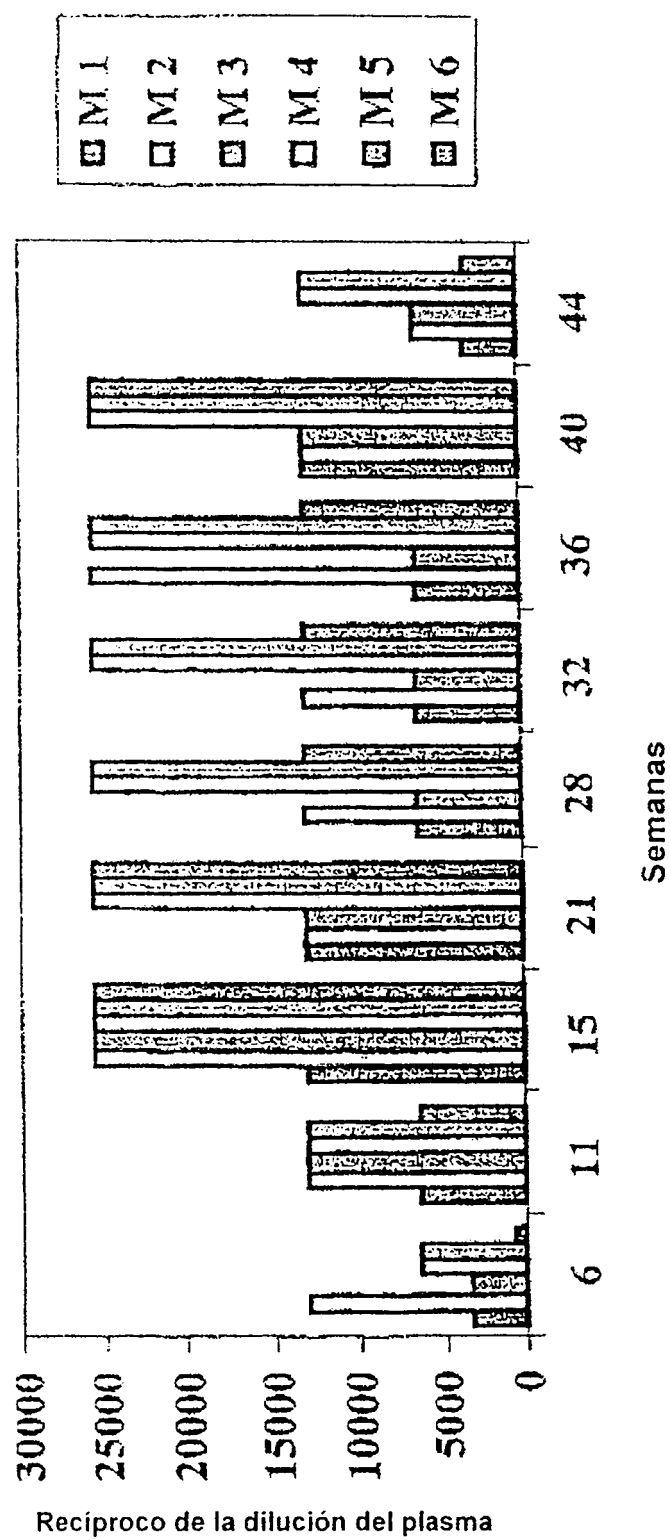
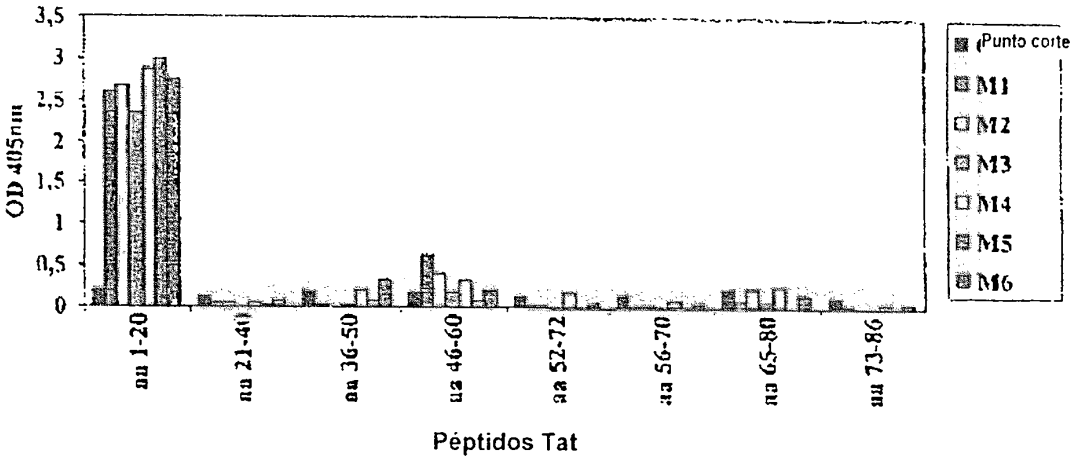


FIG. 7

A



B

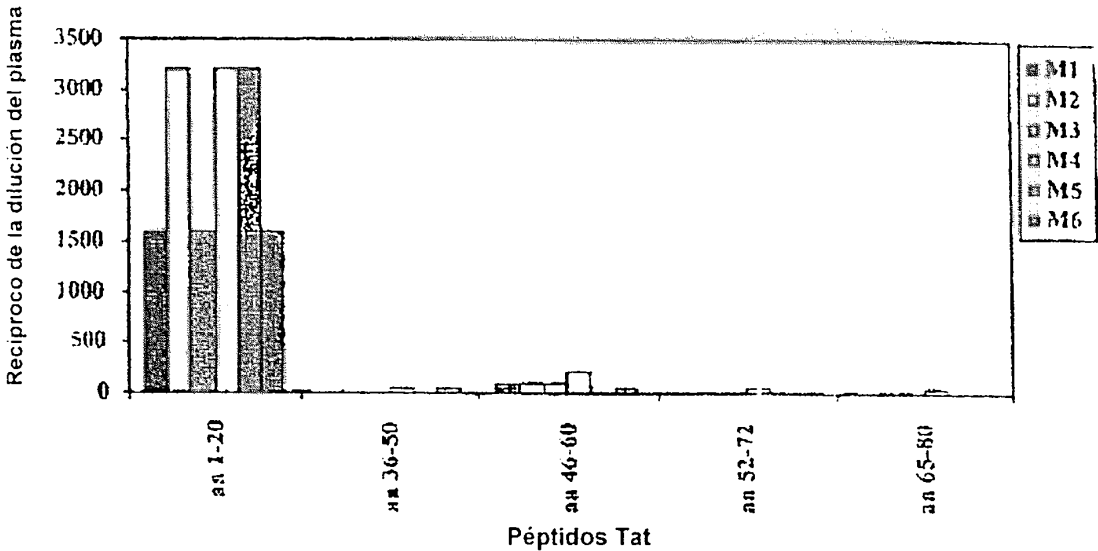


FIG. 8

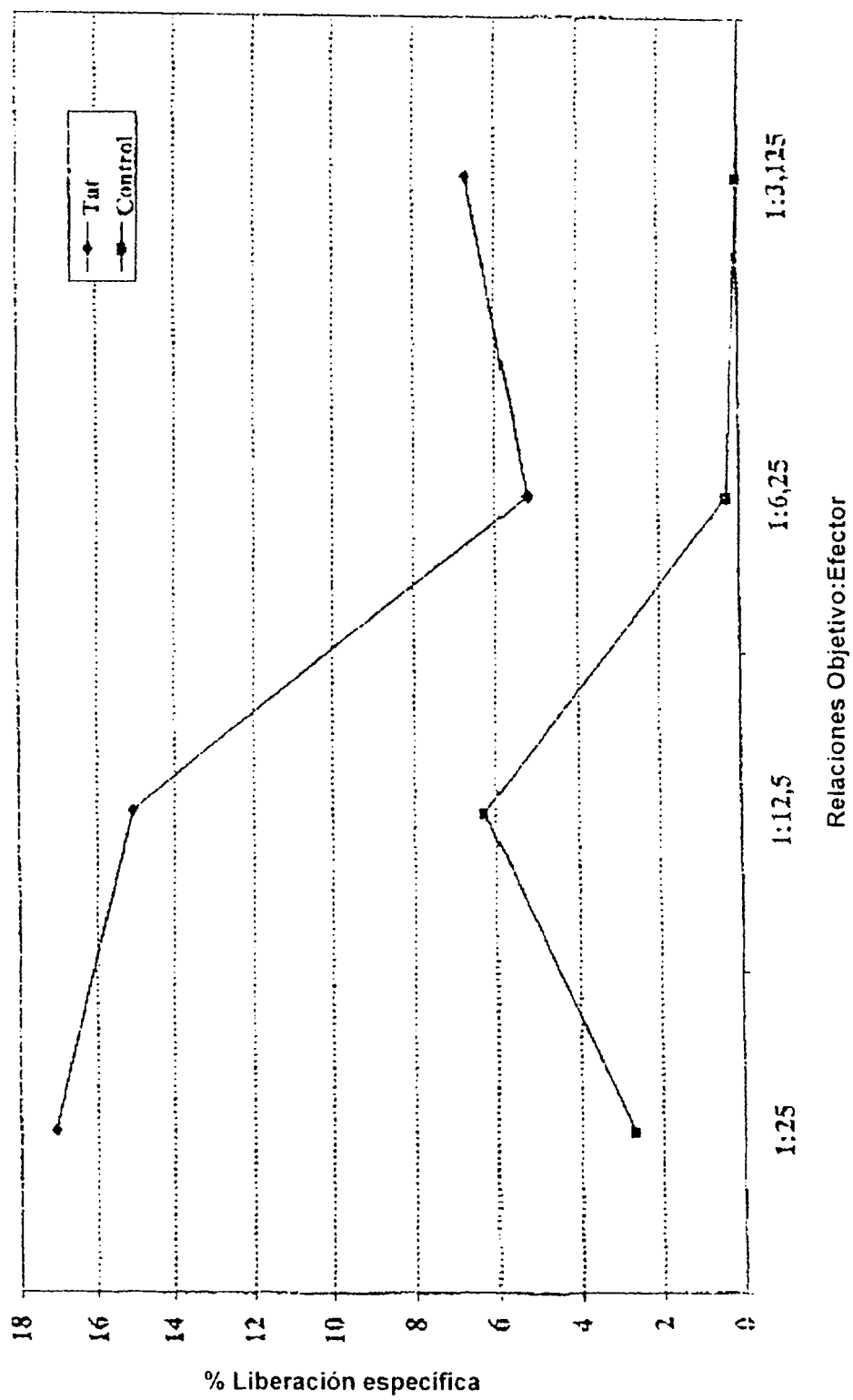


FIG. 9

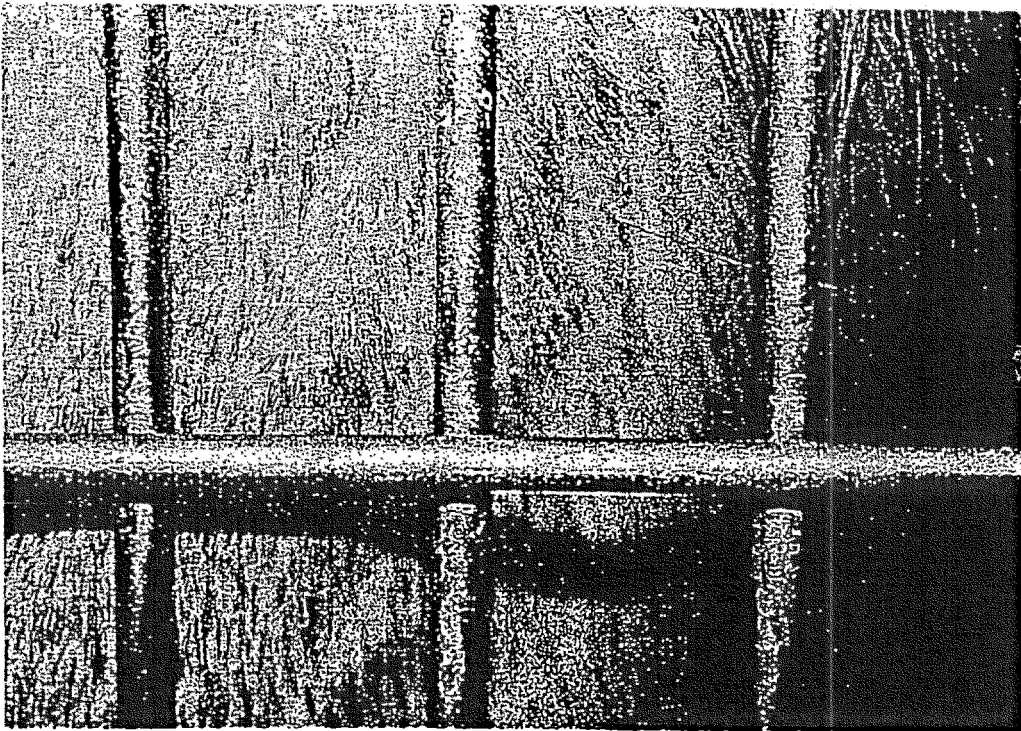


FIG. 10

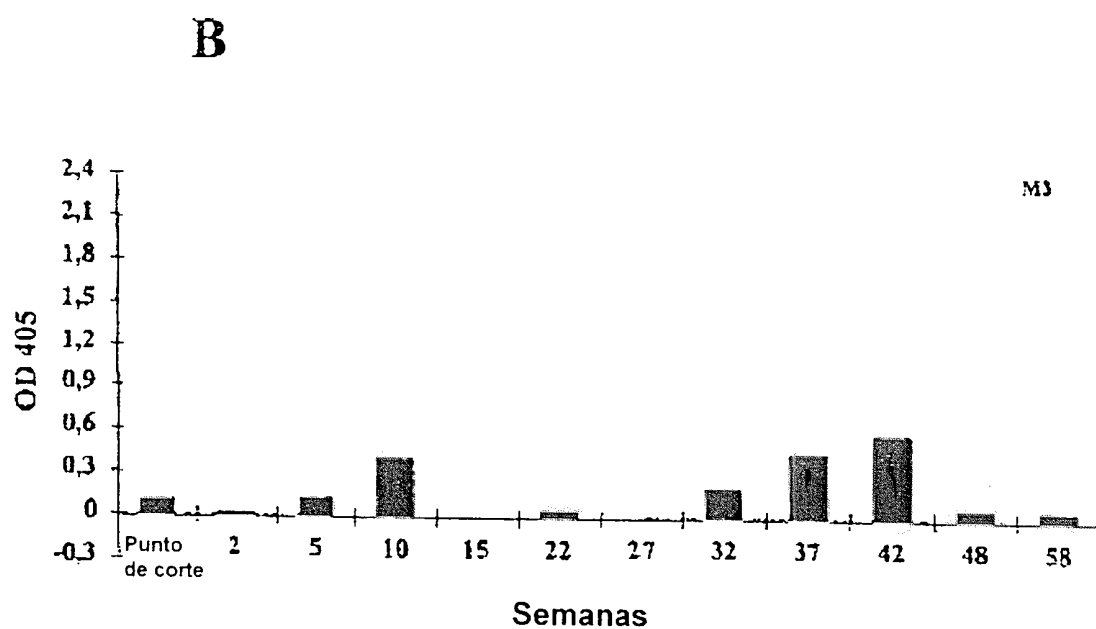
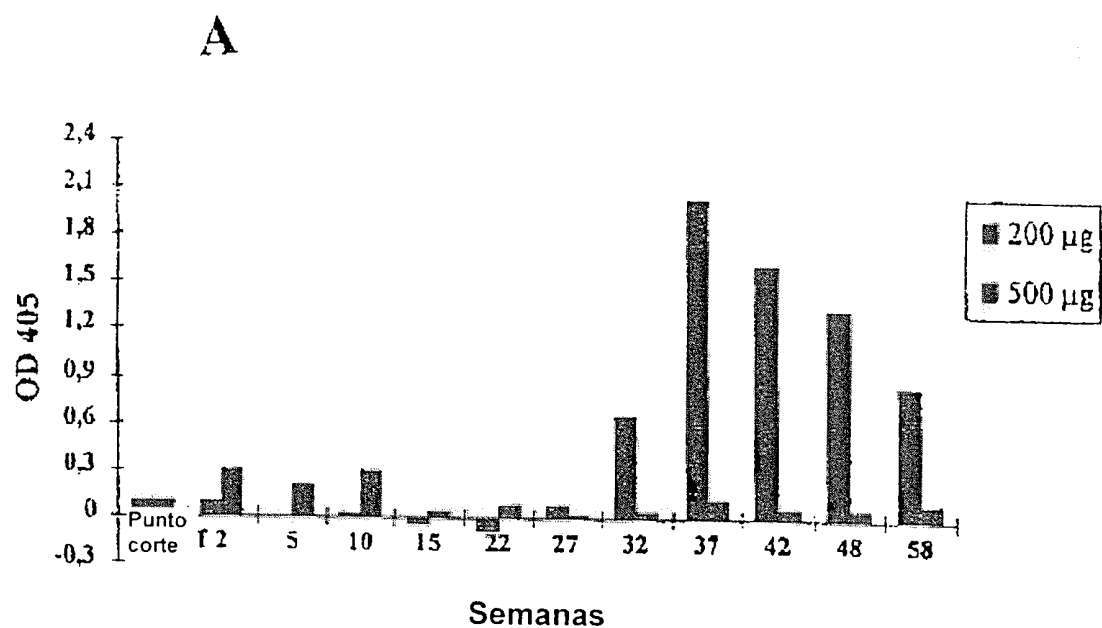


FIG. 11

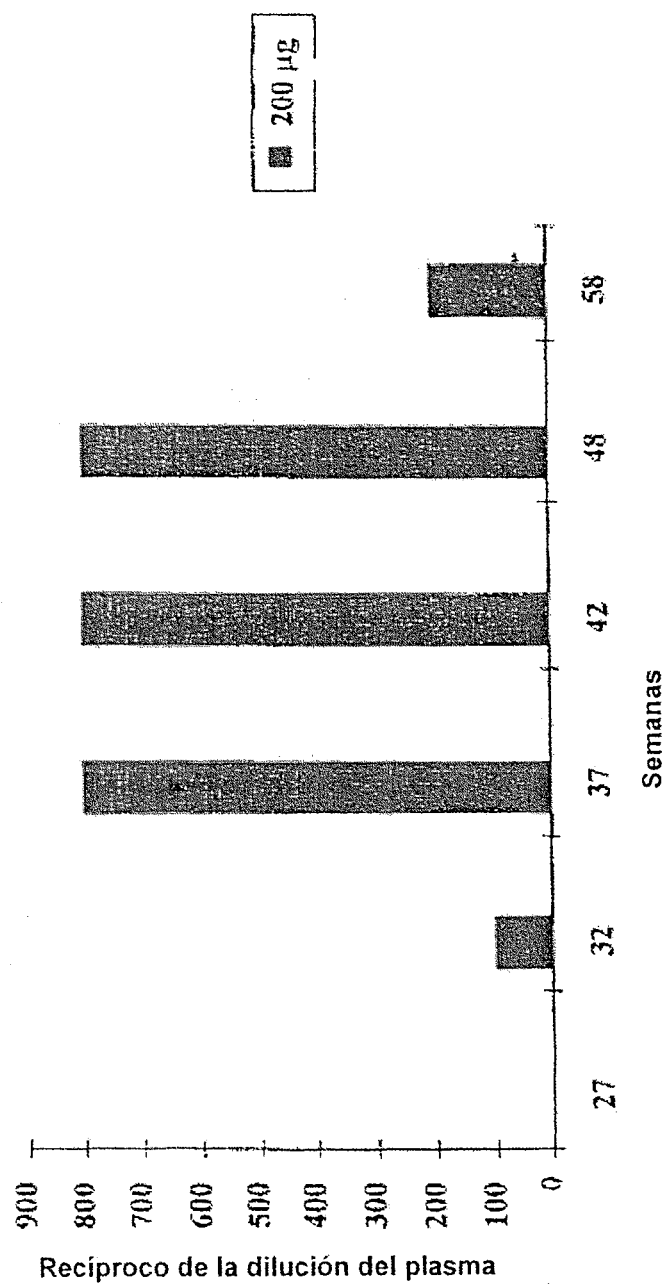


FIG. 12

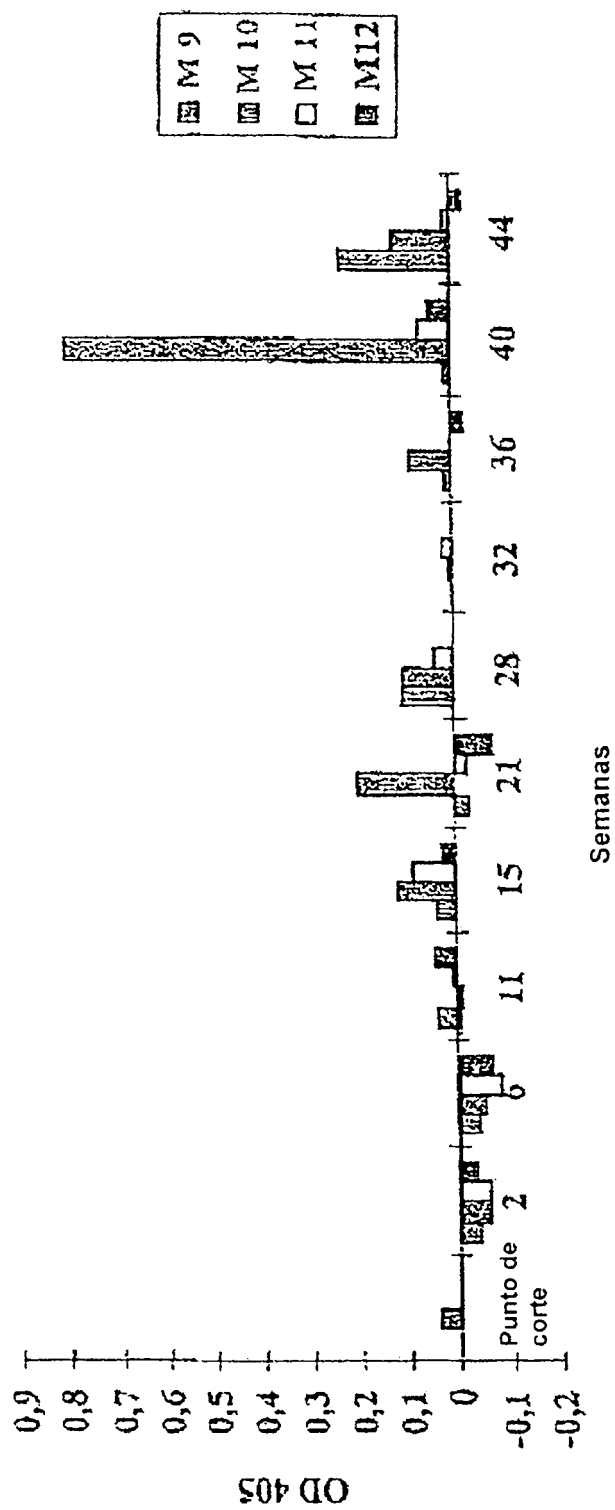


Fig. 13

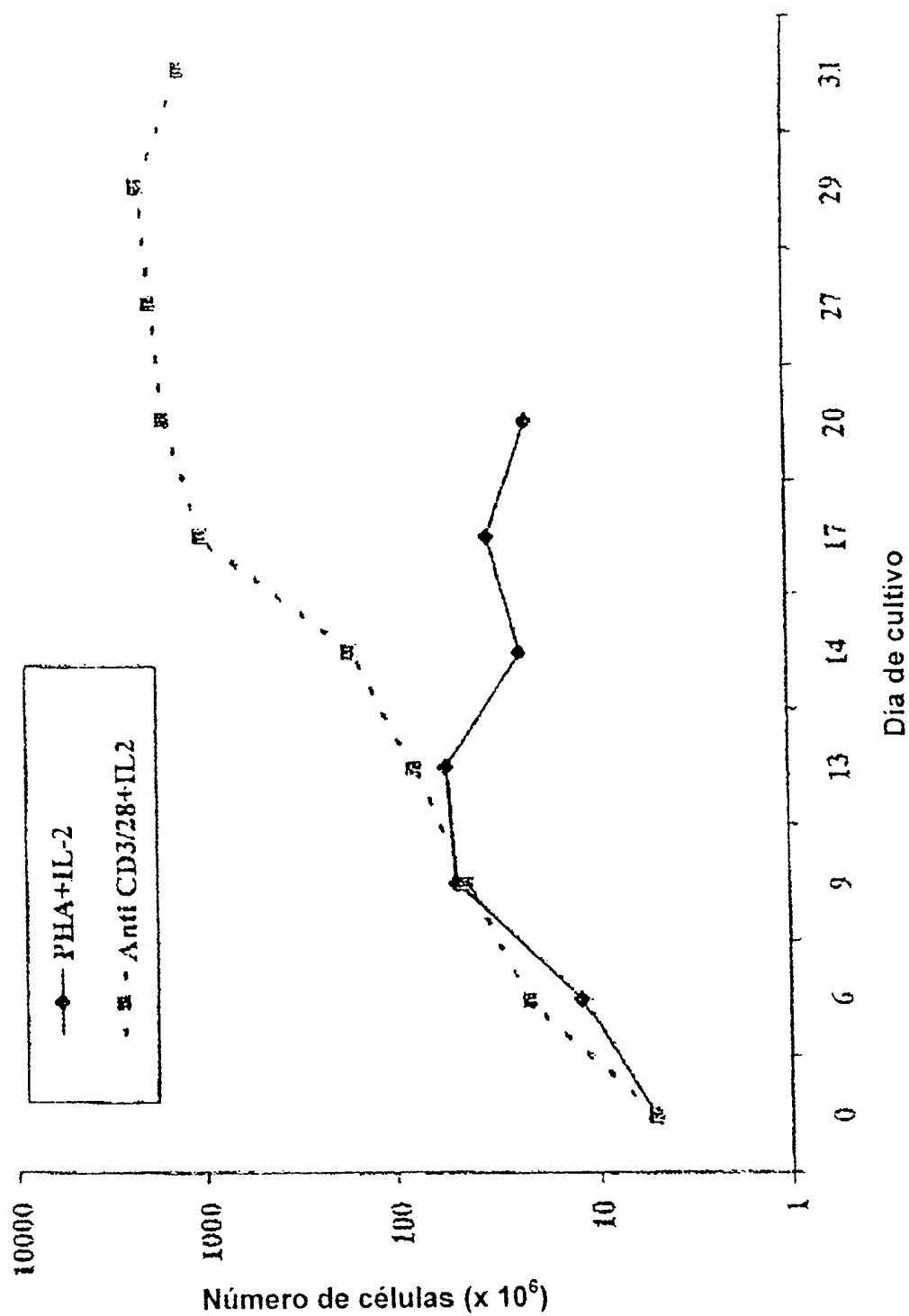
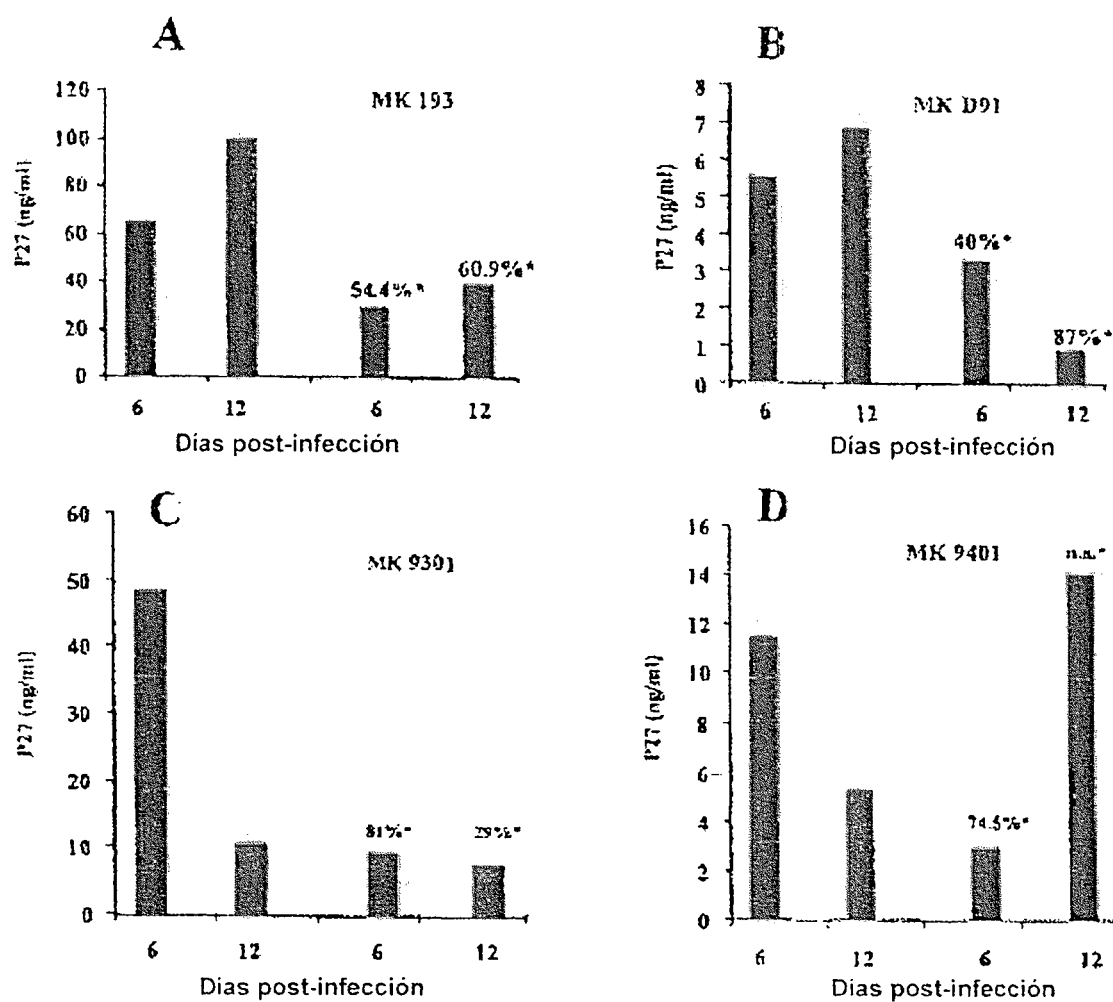


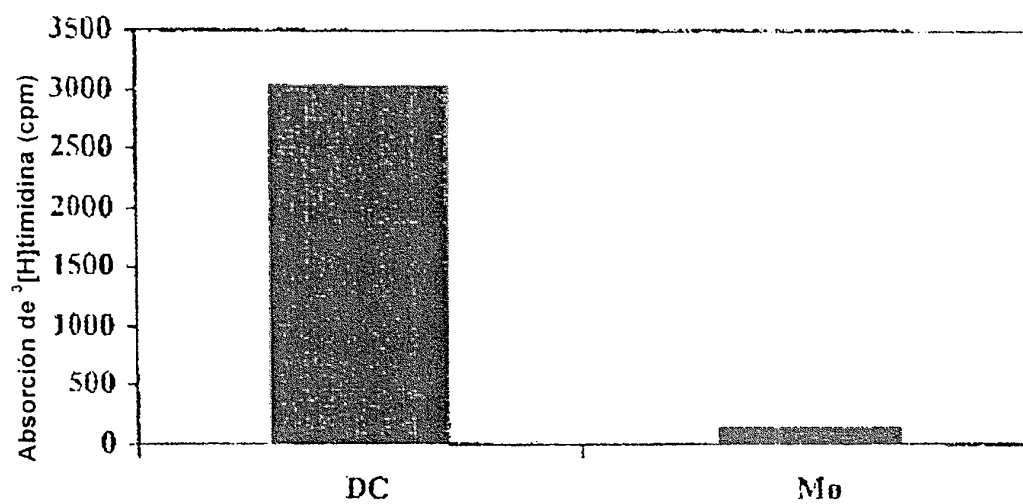
FIG. 14



*:Porcentaje de inhibición

FIG. 15

A



B

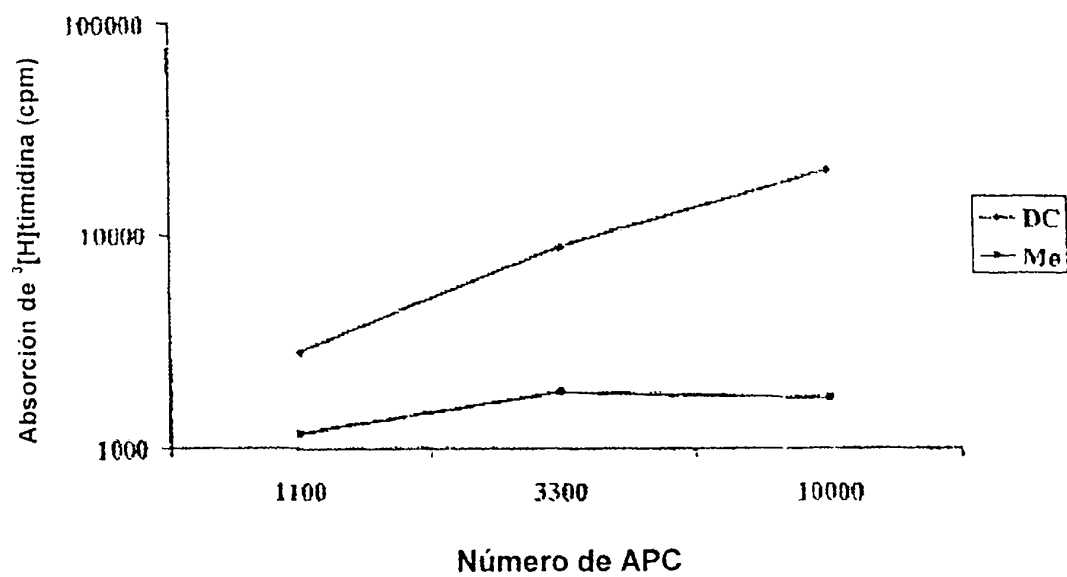


FIG. 16

ES 2 293 700 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Ensoli, Barbara

5 <120> TAT DE HIV-1, O SUS DERIVADOS PARA LA VACUNACIÓN PROFILÁCTICA Y TERAPÉUTICA

<130> 11340-003-999

10 <140> 09/555,534

<141>

15 <150> RM97A000743

<151> 1997-12-01

<160> 36

20 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 261

25 <212> DNA

<213> Retrovirus asociado con SIDA

<220>

30 <221> CDS

<222> (1)...(261)

<223> tat tipo natural

35

<400> 1

40	atg gag cca gta gat cct aga cta gag ccc tgg aag cat cca gga agt	48
	Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser	
	1 5 10 15	
	cag cct aaa act gct tgt acc aat tgc tat tgt aaa aag tgt tgc ttt	96
	Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe	
	20 25 30	
45	cat tgc caa gtt tgt ttc ata aca aaa gcc tta ggc atc tcc tat ggc	144
	His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly	
	35 40 45	
50	agg aag aag cgg aga cag cga cga aga cct cct caa ggc agt cag act	192
	Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr	
	50 55 60	
55	cat caa gtt tct cta tca aag cag ccc acc tcc caa tcc cga ggg gac	240
	His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp	
	65 70 75 80	
	ccg aca ggc ccg aag gaa tag	261
	Pro Thr Gly Pro Lys Glu *	
	85	

60

<210> 2

<211> 86

<212> PRT

65

<213> Retrovirus asociado con SIDA

ES 2 293 700 T3

<400> 2

```

5      Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
      1      5      10      15
      Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
      20      25      30

10     His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
      35      40
      Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
      50      55      60
      His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp
      65      70      75      80
15     Pro Thr Gly Pro Lys Glu
      85

```

<210> 3

20 <211> 261

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(261)

<223> tat Cys22

30

<400> 3

```

35     atg gag cca gta gat cct aga cta gag ccc tgg aag cat cca gga agt 48
      Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
      1      5      10      15

40     cag cct aaa act gct ggt acc aat tgc tat tgt aaa aag tgt tgc ttt 96
      Gln Pro Lys Thr Ala Gly Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
      20      25      30

45     cat tgc caa gtt tgt ttc ata aca aaa gcc tta ggc atc tcc tat ggc 144
      His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
      35      40      45

50     agg aag aag cgg aga cag cga cga aga cct cct caa ggc agt cag act 192
      Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
      50      55      60

55     cat caa gtt tct cta tca aag cag ccc acc tcc caa tcc cga ggg gac 240
      His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp
      65      70      75      80

      ccg aca ggc ccg aag gaa tag 261
      Pro Thr Gly Pro Lys Glu *
      85

```

<210> 4

60 <211> 86

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65

ES 2 293 700 T3

<400> 4

```

5      Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
      1      5      10      15
      Gln Pro Lys Thr Ala Gly Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
      20      25      30
      His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
      35      40      45
10     Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
      50      55      60
      His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp
      65      70      75      80
      Pro Thr Gly Pro Lys Glu
      85
15

```

<210> 5

<211> 261

20 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <221> CDS

<222> (1)...(261)

<223> tat Lys41

30 <400> 5

```

35     atg gag cca gta gat cct aga cta gag ccc tgg aag cat cca gga agt 48
      Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
      1      5      10      15
      cag cct aaa act gct tgt acc aat tgc tat tgt aaa aag tgt tgc ttt 96
      Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
      20      25      30
40     cat tgc caa gtt tgt ttc ata aca aca gcc tta ggc atc tcc tat ggc 144
      His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Thr Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
      35      40      45
45     agg aag aag cgg aga cag cga cga aga cct cct caa ggc agt cag act 192
      Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
      50      55      60
50     cat caa gtt tct cta tca aag cag ccc acc tcc caa tcc cga ggc gac 240
      His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp
      65      70      75      80
      ccg aca ggc ccg aag gaa tag 261
      Pro Thr Gly Pro Lys Glu *
      85
55

```

<210> 6

<211> 86

60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

65

ES 2 293 700 T3

<400> 6

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10
 5 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Thr Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
 50 55 60
 10 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu
 85

15

<210> 7

<211> 252

<212> DNA

20

<213> Retrovirus asociado con SIDA

<220>

<221> CDS

25

<222> (1)...(252)

<223> tat RGD

30

<400> 7

atg gag cca gta gat cct aga cta gag ccc tgg aag cat cca gga agt 48
 35 Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 cag cct aaa act gct tgt acc aat tgc tat tgt aaa aag tgt tgc ttt 96
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 40 cat tgc caa gtt tgt ttc ata aca aaa gcc tta ggc atc tcc tat ggc 144
 His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 45 agg aag aag cgg aga cag cga cga aga cct cct caa ggc agt cag act 192
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
 50 55 60
 50 cat caa gtt tct cta tca aag cag ccc acc tcc caa tcc ccg aca ggc 240
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Pro Thr Gly
 65 70 75 80
 ccg aag gaa tag 252
 Pro Lys Glu *

55

<210> 8

<211> 83

60

<212> PRT

<213> Retrovirus asociado con SIDA

65

ES 2 293 700 T3

<400> 8

```

5      Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
      1      5      10      15
      Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
      20      25      30
      His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
      35      40      45
10     Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
      50      55      60
      His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Pro Thr Gly
      65      70      75      80
      Pro Lys Glu

```

15

<210> 9

<211> 252

<212> DNA

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> CDS

25

<222> (1)...(252)

<223> tat Lys41 RGD

30

<400> 9

```

35     atg gag cca gta gat cct aga cta gag ccc tgg aag cat cca gga agt      48
      Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
      1      5      10      15
      cag cct aaa act gct tgt acc aat tgc tat tgt aaa aag tgt tgc ttt      96
      Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
      20      25      30
      cat tgc caa gtt tgt ttc ata aca aca gcc tta ggc atc tcc tat ggc      144
      His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Thr Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
      35      40      45
      agg aag aag cgg aga cag cga cga aga cct cct caa ggc agt cag act      192
      Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
      50      55      60
      cat caa gtt tct cta tca aag cag ccc acc tcc caa tcc ccg aca ggc      240
      His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Pro Thr Gly
      65      70      75      80
      ccg aag gaa tag
      Pro Lys Glu *

```

55

<210> 10

<211> 83

<212> PRT

60

<213> Secuencia artificial

65

ES 2 293 700 T3

<400> 10

	Met	Glu	Pro	Val	Asp	Pro	Arg	Leu	Glu	Pro	Trp	Lys	His	Pro	Gly	Ser
	1				5					10					15	
5	Gln	Pro	Lys	Thr	Ala	Cys	Thr	Asn	Cys	Tyr	Cys	Lys	Lys	Cys	Cys	Phe
				20					25					30		
	His	Cys	Gln	Val	Cys	Phe	Ile	Thr	Thr	Ala	Leu	Gly	Ile	Ser	Tyr	Gly
			35					40					45			
	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Pro	Pro	Gln	Gly	Ser	Gln	Thr
		50					55					60				
10	His	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Lys	Gln	Pro	Thr	Ser	Gln	Ser	Pro	Thr	Gly
	65					70					75					80
	Pro	Lys	Glu													

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Retrovirus asociado con SIDA

20 <400> 11

	Met	Glu	Pro	Val	Asp	Pro	Arg	Leu	Glu	Pro	Trp	Lys	His	Pro	Gly	Ser
	1				5					10					15	
25	Gln	Pro	Lys	Thr												
				20												

<210> 12

30 <211> 20

<212> PRT

<213> Retrovirus asociado con SIDA

35 <400> 12

	Ala	Cys	Thr	Asn	Cys	Tyr	Cys	Lys	Lys	Cys	Cys	Phe	His	Cys	Gln	Val
	1			5						10					15	
40	Cys	Phe	Ile	Thr												
				20												

<210> 13

45 <211> 16

<212> PRT

<213> Retrovirus asociado con SIDA

50 <400> 13

	Gln	Val	Cys	Phe	Ile	Thr	Lys	Ala	Leu	Gly	Ile	Ser	Tyr	Gly	Arg	Lys
	1				5					10					15	

55 <210> 14

<211> 15

<212> PRT

60 <213> Retrovirus asociado con SIDA

<400> 14

	Ser	Tyr	Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Pro	Pro	Gln	
65	1				5					10					15	

ES 2 293 700 T3

<210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> Retrovirus asociado con SIDA

 <400> 15
 10 Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln
 1 5 10 15

 <210> 16
 15 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Retrovirus asociado con SIDA

 20 <400> 16
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp
 1 5 10 15

 25 <210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 30 <213> Retrovirus asociado con SIDA

 <400> 17
 35 Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp Pro Thr Gly Pro Lys Glu
 1 5 10

 <210> 18
 40 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Cebador Rev. directo

 <400> 18
 50 atggcaggaa gaagc

 <210> 19
 55 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Cebador Rev. inverso

 <400> 19
 65 ctattcttta gttcc

15

15

ES 2 293 700 T3

	<210> 20	
	<211> 15	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Nef. directo	
10	<400> 20	
	atgggtggca agtgg	15
15	<210> 21	
	<211> 15	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Nef. inverso	
25	<400> 21	
	tcagcagtcc ttgta	15
30	<210> 22	
	<211> 15	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Gag. directo	
40	<400> 22	
	atgggtgcga gagcg	15
45	<210> 23	
	<211> 15	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Gag. inverso	
55	<400> 23	
	ttattgtgac gaggg	15
60	<210> 24	
	<211> 15	
	<212> DNA	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 293 700 T3

	<220>	
	<223> Cebador IL-12 directo	
5	<400> 24	
	atgtggcccc ctggg	15
10	<210> 25	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador IL-12 inverso	
20	<400> 25	
	ttaggaagca ttcag	15
25	<210> 26	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador IL-15 directo	
35	<400> 26	
	atgagaattt cgaaa	15
40	<210> 27	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador IL-15 inverso	
50	<400> 27	
	tcaagaagtg ttgat	15
55	<210> 28	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador Tat directo	
65	<400> 28	
	atggagccag tagat	15

ES 2 293 700 T3

	<210> 29	
	<211> 15	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Tat inverso	
10	<400> 29	
	ctattccttc gggcc	15
15	<210> 30	
	<211> 27	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Tat/Rev directo	
25	<400> 30	
	ggcccgaagg aaatggcagg aagaagc	27
30	<210> 31	
	<211> 27	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Tat/Nef directo	
40	<400> 31	
	ggcccgaagg aaatgggtgg caagtgg	27
45	<210> 32	
	<211> 28	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Tat/Gag directo	
55	<400> 32	
	ggccctgaag gaaatgggtg cgagagcg	28
60	<210> 33	
	<211> 27	
	<212> DNA	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 293 700 T3

	<220>		
	<223> Cebador Tat/IL-12 directo		
5	<400> 33		
	ggcccgaagg aaatgtggcc ccctggg		27
10	<210> 34		
	<211> 27		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador Tat/IL-15 directo		
20	<400> 34		
	ggcccgaagg aaatgagaat ttcgaaa		27
25	<210> 35		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador SG1096Ngag		
35	<400> 35		
	ttaggctacg acccggcgga aaga		24
40	<210> 36		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador SG1592 CgagD		
50	<400> 36		
	atagggggtg cagccttctg acag		24
55			
60			
65			