

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 276**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04785951 .7**
- 96 Fecha de presentación: **21.06.2004**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1567188**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.08.2005**

54 Título: **Partículas virales modificadas con propiedades inmunogénicas y contenido reducido de lípidos, útiles para el tratamiento y la prevención de enfermedades infecciosas**

30 Prioridad:
20.06.2003 US 601656
01.08.2003 US 491928 P
31.12.2003 US 533542 P
09.02.2004 US 542947 P

73 Titular/es:
**ELI LILLY AND COMPANY
LILLY CORPORATE CENTER
INDIANAPOLIS, IN 46285, US**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.09.2012

72 Inventor/es:
CHAM, Bill, E.;
MALTAIS, Jo-Ann, B. y
BELLOTTI, Marc

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.09.2012

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 387 276 T3

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

Partículas virales modificadas con propiedades inmunogénicas y contenido reducido de lípidos, útiles para el tratamiento y la prevención de enfermedades infecciosas

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método de deslipidación que emplea un sistema disolvente útil para extraer los lípidos de un virus, creando así una partícula viral modificada. El sistema disolvente de la presente invención está óptimamente diseñado de tal forma que después de la deslipidación del virus, la partícula viral permanece sustancialmente intacta. Por medio de la disolución de la envoltura lipídica que rodea a la partícula viral utilizando el método de la presente invención, la partícula viral modificada resultante ha expuesto antígenos (o epítomos), que fomentan y promueven respuestas celulares y la producción de anticuerpos cuando se introduce en un humano o en un animal. La partícula viral modificada resultante de la presente invención inicia una respuesta inmunogénica positiva en las especies en las que es nuevamente introducida. La presente invención se puede aplicar a la deslipidación de virus de un paciente específico para futura reintroducción en el paciente, para deslipidación de cepas de virus, o de virus no específicos de un paciente, para su uso como una vacuna, o para deslipidación y combinación tanto de virus no específicos de un paciente como de virus específicos de un paciente para crear un cóctel terapéutico.

10

15

20 Antecedentes de la invención

Introducción

Los virus, de etiología variada, afectan a miles de millones de animales y de seres humanos cada año y causan una enorme carga económica para la sociedad. Muchos virus contienen lípidos como el principal componente de la membrana que los rodea. Los virus afectan a animales y a seres humanos causando un sufrimiento, morbilidad y mortalidad extremos. Estos virus viajan por todo el cuerpo en fluidos biológicos como la sangre, fluido peritoneal, fluido linfático, fluido pleural, fluido pericárdico, fluido cefalorraquídeo, y en diferentes fluidos del sistema reproductivo. El contacto con el fluido en cualquier sitio promueve la transmisión de la enfermedad. Otros virus residen principalmente en diferentes sistemas de órganos y en tejidos específicos, proliferan y luego entran en el sistema circulatorio para tener acceso a otros tejidos y órganos en sitios remotos. Si el organismo no presenta una respuesta inmune positiva frente a estos patógenos, infectan a muchos tipos de células dentro del organismo, impidiendo que estas células realicen sus funciones normales.

25

30

35

El sistema inmunológico humano está compuesto de varios tipos de células que colectivamente protegen al organismo de diferentes virus. El sistema inmunológico ofrece múltiples medios para elegir un blanco y la remoción de elementos foráneos, incluyendo respuestas inmunes humorales y celulares, que participan principalmente en el reconocimiento y remoción del antígeno. Una respuesta inmune a elementos extraños requiere de la presencia de linfocitos B (células B) o de linfocitos T (células T) en combinación con células presentadoras de antígeno (APC), que son usualmente macrófagos o células dendríticas. Las APC son células inmunes especializadas que capturan antígenos. Una vez dentro de una APC, se rompen los antígenos en fragmentos más pequeños llamados epítomos - los únicos marcadores transportados por la superficie del antígeno. Estos epítomos son posteriormente presentados sobre la superficie de las APC y son los responsables de desencadenar una respuesta de anticuerpos en la defensa contra la infección.

40

45

En una respuesta inmune humoral, cuando una APC presenta antígenos (en forma de marcadores de epítomo únicos) extraños al organismo son reconocidos, se activan las células B, proliferan y producen anticuerpos. Estos anticuerpos se unen específicamente a los antígenos presentes en el virus. Después de que el anticuerpo se une, la APC envuelve al antígeno completo y lo mata. Este tipo de respuesta inmune de anticuerpos está principalmente implicada en la prevención de infecciones virales.

50

En una respuesta inmune celular, las células T se activan para el reconocimiento del antígeno presentado sobre la APC. Hay dos etapas en la respuesta inmune celular. La primera etapa implica la activación de las células T citotóxicas (CTL) o las células asesinas T CD8⁺ que proliferan y matan a las células objetivo que presentan antígenos específicamente. La segunda etapa implica a las células T colaboradoras (HTL) o células T CD4⁺ que regulan la producción de anticuerpos y la actividad de las células CD8⁺. Las células T CD4⁺ proporcionan factores de crecimiento a las células T CD8⁺ lo que permiten que proliferen y actúen de manera eficiente.

55

60

Ciertos patógenos infecciosos son considerados "crónicos" debido a su estructura. Por ejemplo, algunos virus son capaces de evadir una respuesta inmune debido a su capacidad para ocultar algunos de sus antígenos del sistema inmune. Los virus tienen una envoltura exterior compuesta de lípidos y grasas derivados de la membrana de la célula huésped durante el proceso de gemación. Los virus se componen de viriones, agentes infecciosos no celulares que consisten de un solo tipo de ácido nucleico (ya sea ARN o ADN), rodeados por una capa de proteína. La proteína exterior que cubre los virus es llamada una cápside, que está compuesta de subunidades de repetición

llamadas capsómeros.

5 Dado que los virus no tienen metabolismo, únicamente se reproducen dentro de células huésped vivas. El virus codifica las proteínas de la envoltura viral, mientras que la célula huésped codifica los lípidos y carbohidratos. Por lo tanto, el contenido de lípidos y carbohidratos dentro de una envoltura viral dada depende del huésped en particular. Las partículas virales dentro de una envoltura adoptan por lo tanto parcialmente la identidad de la célula huésped, a través del contenido de lípidos y carbohidratos, y son capaces de ocultar los antígenos asociados con ellos, que normalmente habrían iniciado una respuesta inmune. En vez de eso, la partícula viral confunde el sistema inmune del huésped presentándolo con un complejo antigénico que contiene componentes de los tejidos del huésped, y es percibido por el sistema inmune del huésped, como parcialmente "propio" y parcialmente "foráneo". El sistema inmunológico se ve obligado a producir los anticuerpos inefectivos de "compromiso", que no destruyen las partículas virales, lo que les permite proliferar y poco a poco causar daños graves en el organismo, mientras destruyen las células huésped.

15 Las recientes epidemias que afectan el sistema inmune incluyen al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), que se cree que es causado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Los virus relacionados afectan a especies animales, por ejemplo, a los simios y felinos (SIV y FIV, respectivamente). Otras infecciones virales importantes incluyen, pero no se limitan a, meningitis, citomegalovirus, y hepatitis en sus diversas formas.

20 Métodos actuales de tratamiento

25 Un método del estado del arte para tratar virus de etiología variada es a través de terapia con medicamentos. La mayoría de los tratamientos farmacológicos antivirales están destinados a la prevención o inhibición de la replicación viral y parece que se centran en la unión inicial del virus a los linfocitos T4 o macrófagos, a la transcripción de ARN viral en ADN viral y a la formación del nuevo virus durante la replicación. La alta tasa de mutación del virus, especialmente en el caso del VIH, es una dificultad importante con los tratamientos existentes porque las diversas cepas se vuelven resistentes a la terapia con medicamentos antivirales. Además, el tratamiento con terapia antiviral con medicamentos puede causar la evolución de cepas resistentes del virus. Otros inconvenientes con los tratamientos farmacológicos son los efectos secundarios no deseados y los requisitos de cumplimiento por parte del paciente. Además, muchas personas se ven afectadas por múltiples infecciones virales, tales como una combinación de VIH y la hepatitis. Estas personas requieren regímenes incluso más agresivos y costosos de medicamentos para contrarrestar el progreso de la enfermedad, lo que a su vez causa mayores efectos secundarios y una mayor probabilidad de resistencia a múltiples fármacos. El enfoque más efectivo hasta la fecha para tratar el VIH es el uso de una terapia antirretroviral altamente activa (HAART) que es costosa, tóxica para el paciente, y no erradica el virus. La adhesión estricta a régimen HAART sigue siendo un obstáculo importante, y las fallas en su cumplimiento conducen a que se desate una replicación viral, y la selección de cepas resistentes a los medicamentos. Además, el uso a largo plazo de HAART se asocia con efectos secundarios tales como lipodistrofias, metabolismo alterado de la glucosa y colesterol y triglicéridos elevados en plasma. Existe, por tanto, la necesidad urgente de terapias adicionales, ya sea en forma de vacunas preventivas y terapéuticas, o el desarrollo de agentes inmunomoduladores para aumentar la HAART. Los enfoques actuales para el desarrollo de vacunas contra el VIH son revisados por Mwau et al. (2003). Una revisión de las vacunas para la prevención del VIH. *J. Genie Med.* 5: 3). En resumen, las estrategias incluyen una variedad de vectores de expresión, vacunas recombinantes con base en ADN, combinaciones de vacunas con base en ADN y refuerzos de proteína viral con o sin adyuvante. Un reciente ensayo clínico en Fase III con la vacuna recombinante gp120 en Tailandia, por ejemplo, terminó sin éxito (Cohen, J. 2003. *Public health.* La vacuna contra el SIDA sigue viva como refuerzo después de un segundo fracaso en Tailandia. *Science* 302: 1309), posiblemente debido a que las proteínas virales recombinantes necesitan estar en la configuración correcta para que se genere una apropiada respuesta inmunológica. Claramente, otros enfoques novedosos para mejorar la respuesta inmune a antígenos virales deben ser evaluados.

50 También se conoce en el estado del arte la prevención de la enfermedad mediante el uso de vacunas. Las vacunas han sido particularmente responsables de conferir una respuesta inmune contra diferentes patógenos humanos. Están diseñadas para estimular el sistema inmune para proteger contra diversas infecciones virales. En general, una vacuna se produce a partir de un antígeno, aislado o producido a partir del microorganismo causante de la enfermedad, lo que puede provocar una respuesta inmune. Cuando se inyecta una vacuna en el torrente sanguíneo como una medida preventiva para crear una respuesta inmune efectiva, las células B en el torrente sanguíneo perciben los antígenos contenidos por la vacuna como extraños o 'no propios' y responden por medio de la producción de anticuerpos, que se unen a los antígenos y los inactivan. Se producen por lo tanto células de memoria que permanecen dispuestas a montar una rápida respuesta inmune protectora contra una infección posterior con el mismo agente causante de la enfermedad. Así, cuando un patógeno infeccioso que contiene antígenos similares a los de la vacuna entra en el organismo, el sistema inmunitario reconocerá la proteína e instigará una defensa efectiva contra la infección.

65 Los métodos actuales de vacunación tienen inconvenientes, quedando por debajo del óptimo deseable para la inmunización de las personas contra patógenos particulares, especialmente el VIH. Las estrategias de vacunación existentes están destinadas a exponer al organismo a los antígenos asociados con patógenos infecciosos de tal

- manera que el cuerpo desarrolla una respuesta inmune contra estos patógenos. Por ejemplo, los patógenos de la hepatitis B y del VIH son capaces de sobrevivir y de proliferar en el cuerpo humano a pesar de la respuesta inmune. Una explicación ofrecida en el estado del arte es que los antígenos de estos microorganismos cambian constantemente por lo que los anticuerpos producidos en respuesta a un antígeno particular, ya no son eficaces cuando el antígeno muta. Se cree que el virus del SIDA experimenta esta variación antigénica. A pesar de que la variación antigénica ha sido abordada a través del intento de uso de combinaciones de fármacos o antígenos, no existe una vacuna en el estado del arte que haya tenido éxito en el tratamiento de infecciones crónicas tales como el VIH.
- Otro enfoque para el tratamiento de virus de etiología variada es para inactivar el virus. Los métodos del estado del arte para la inactivación de virus utilizando agentes químicos se han basado en disolventes orgánicos tales como cloroformo o glutaraldehído. La inactivación viral presenta problemas ya que la inactivación de un virus no proporciona una respuesta protectora inmune contra la infección viral. Además, está en gran parte orientada a la desnaturalización de las proteínas virales, destruyendo así la estructura de la partícula viral. En resumen, los métodos del estado del arte se han centrado principalmente en destruir, no en modificar adecuadamente las partículas virales para producir una respuesta inmune.
- Métodos actuales de fabricación de los tratamientos virales y medicamentos de inactivación viral (o muerte química)
- En el estado del arte se describen métodos de tratamiento de partículas virales con disolventes orgánicos y altas temperaturas para disolver así las envolturas lipídicas y posteriormente inactivar el virus. En estos métodos, se extrae sangre del paciente y se separa en dos fases - la primera fase que incluye glóbulos rojos y plaquetas y la segunda fase que contiene el plasma, glóbulos blancos, y el virus libre de células (virión). La segunda fase se trata con un disolvente orgánico, matando así las células infectadas y viriones, y posteriormente se los reintroduce en el paciente. Además de la disolución de la envoltura lipídica del virus, las concentraciones altas de disolventes orgánicos causan la muerte celular y el daño a los antígenos. Esencialmente, este método da como resultado la "muerte química" de la célula.
- El glutaraldehído es uno de tales disolventes donde la inactivación de la célula se consigue como lo saben los expertos en la técnica por la fijación con una solución diluida de glutaraldehído hasta aproximadamente 1:250. Aunque el tratamiento del virus con glutaraldehído deslipida efectivamente el virus, también destruye el núcleo. La destrucción del núcleo no es deseable para producir una partícula viral modificada útil para inducir una respuesta inmunitaria en un receptor.
- El cloroformo es otro de tales disolventes. El cloroformo, sin embargo, desnaturaliza muchas proteínas plasmáticas y no es adecuado para su uso con fluidos biológicos, los cuales serán reintroducidos en el animal o el humano. Estas proteínas plasmáticas afectadas nocivamente por el cloroformo, cumplen importantes funciones biológicas, incluyendo la coagulación, la respuesta hormonal, y la respuesta inmune. Estas funciones son esenciales para la vida y por lo tanto el daño a estas proteínas puede tener un efecto adverso sobre la salud de un paciente, lo que puede conducir a la muerte.
- Otros disolventes o detergentes tales como la B-propiolactona, Tween-80, y los fosfatos de dialquilo o trialquilo han sido utilizados, ya sea solos o en combinación. Muchos de estos métodos, especialmente aquellos que implican detergentes, requieren de procedimientos tediosos para asegurar la remoción del detergente antes de la reintroducción de la muestra de plasma tratado en el animal o el humano. Además, muchos de los métodos descritos en el estado del arte implican la exposición extensiva a una temperatura elevada con el fin de matar el virus libre y las células infectadas. Las temperaturas elevadas tienen efectos perjudiciales sobre las proteínas contenidas en los fluidos biológicos, tales como el plasma.
- Métodos actuales de fabricación de vacunas
- Hasta la fecha, se han empleado diferentes métodos de fabricación en la búsqueda de vacunas seguras y efectivas para inmunizar individuos contra los agentes patógenos infecciosos. Para proteger a un individuo de una infección patógena específica, se administra al individuo una proteína o antígeno objetivo asociados con el patógeno infeccioso. Esto incluye la presentación de la proteína como parte de un agente no infeccioso (inactivado) o menos infeccioso (atenuado) agente o como una composición discreta de proteína. Alguien ordinariamente capacitado en el arte conoce los siguientes tipos diferentes de vacunas: vacunas vivas atenuadas, vacunas completamente inactivadas, vacunas de ADN, vacunas de combinación, vacunas recombinantes, vacunas de vectores recombinantes vivos, vacunas de partículas similares a virus y de péptidos sintéticos.
- En las vacunas vivas atenuadas, los virus se vuelven menos patógenos para el huésped, ya sea por manipulación genética específica del genoma del virus, o por el paso en algún tipo de sistema de cultivo de tejidos. A fin de lograr la manipulación genética, se suprime un gen no esencial o se dañan parcialmente uno o más genes esenciales en el virus. Tras la manipulación genética, las partículas virales se vuelven menos virulentas reteniendo aún características antigénicas. Las vacunas vivas atenuadas también se puede utilizar como "vectores vacuna" para

- 5 otros genes, en los cuales actúan como portadores de genes de un segundo virus (u otro patógeno) contra el cual se requiere protección. Las vacunas atenuadas (menos infecciosas y no inactivadas), sin embargo, plantean varios problemas. En primer lugar, es difícil determinar cuando la vacuna atenuada ya no es patógena. El riesgo de infección viral de la vacuna es demasiado grande para probar correctamente una atenuación efectiva. Además, las vacunas atenuadas conllevan el riesgo de volver a una forma virulenta del patógeno.
- 10 Las vacunas completamente inactivadas son conocidas en la técnica para la inmunización contra una infección mediante la introducción de virus muertos o inactivados para introducir proteínas patógenas al sistema inmunológico de un individuo. La administración de agentes patógenos muertos o inactivados, a través de medios térmicos o químicos, en un individuo introduce los patógenos al sistema inmune del individuo en una forma no infecciosa iniciando así una defensa de respuesta inmune. Las vacunas completamente inactivadas proporcionan protección por medio de la generación directa de respuestas inmunes humorales y celulares contra los inmunógenos patógenos. Existe poca amenaza de la infección, debido a que el patógeno viral está muerto o bien inactivado.
- 15 Las vacunas de subunidades son aún otra forma de vacunación bien conocida para un experto ordinariamente capacitado en la técnica. Estas consisten en una o más proteínas aisladas derivadas del patógeno. Estas proteínas actúan como antígenos objetivo contra los cuales se exhibe una respuesta inmune. Las proteínas seleccionadas para la vacuna de subunidades son desplegadas por el patógeno de manera que tras la infección de un individuo por el patógeno, el sistema inmune del individuo reconoce el patógeno e instiga una respuesta inmune. Las vacunas de subunidades no son agentes infecciosos enteros y por lo tanto incapaces de llegar a ser infecciosos. Las vacunas de subunidades son la base de AIDSVAX, la primera vacuna para el VIH que está siendo probada por su efectividad en los seres humanos y que contiene una porción de la proteína de la superficie exterior del VIH (envoltura), llamada gp120.
- 20 La vacuna de ADN es otro tipo conocido en la técnica y utiliza material genético real de patógenos. Además, las vacunas de péptidos sintéticos se componen de partes de proteínas sintéticas del VIH modificadas químicamente llamadas péptidos. Ellos contienen porciones de proteínas del VIH elegidas específicamente para lograr una respuesta inmune anti-VIH. También se menciona en el estado del arte las vacunas de combinación que, cuando se utilizan junto con otra, generan un amplio espectro de respuestas inmunes. Un ejemplo de un virus de combinación es el VIH-S, que es un virus sintético elaborado a partir de la envoltura del VIH y del núcleo del VIS.
- 25 Lo que se necesita es un método terapéutico y un sistema para proporcionar a los pacientes antígenos virales específicos del paciente capaces de iniciar una respuesta inmunológica protectora. En consecuencia, lo que se necesita es un método simple y efectivo, que no desnaturalice o extraiga en forma apreciable proteínas de la muestra biológica que está siendo tratada. Lo que también se necesita es de un proceso efectivo de deslipidación a través del cual se modifique una partícula viral, en lugar de destruirla, con lo cual se reduce y / o elimina tanto la infectividad de la partícula viral como se invoca la respuesta inmune autóloga específica del paciente para reducir aún más la infección viral y evitar una mayor infección.
- 30 Lo que también se necesita es un medio efectivo para inmunizar a los individuos contra una infección patógena viral que sea única para el individuo, debido a las mutaciones virales. Preferiblemente, el medio provocaría una amplia respuesta inmune protectora con un riesgo mínimo de infectar al individuo.
- 35 Resumen de la invención
- 40 La presente invención resuelve los problemas descritos anteriormente proporcionando un método simple, eficiente y efectivo para el tratamiento y la prevención de una infección viral. El método de la presente invención afecta a la envoltura lipídica de un virus mediante la utilización de un sistema disolvente eficiente, que no desnaturaliza o destruye el virus. La presente invención emplea un sistema disolvente óptimo y un sistema energético para crear, a través de deslipidación, una partícula viral no sintética modificada derivada del huésped o no derivada del huésped que tiene su envoltura lipídica al menos parcialmente removida, generando una respuesta inmunológica positiva cuando se administra a un paciente, proporcionándole de este modo a ese paciente algún grado de protección contra el virus. Se cree que estas partículas virales modificadas tienen al menos un antígeno expuesto que no ha sido expuesto antes al proceso de deslipidación. La presente invención también proporciona el uso de estas partículas virales modificadas en la preparación de un medicamento útil para proporcionar protección en un paciente contra un organismo viral infeccioso después de la administración del medicamento al paciente. La presente invención también proporciona el uso de una o más de estas partículas virales modificadas a partir de cepas diferentes de virus o de virus diferentes en la preparación de un medicamento conocido como una vacuna de combinación útil para proporcionar protección en un paciente contra una o más cepas de un organismo viral infeccioso o protección contra uno o más tipos de virus después de la administración del medicamento al paciente. La presente invención también proporciona el uso de estas partículas virales modificadas en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de un paciente con una infección viral causada por un organismo viral infeccioso después de la administración del medicamento al paciente. Este tratamiento reduce la severidad de la infección viral. La presente invención también proporciona el uso de una o más de estas partículas virales modificadas a partir de cepas diferentes de virus o de virus diferentes en la preparación de un medicamento

conocido como una vacuna de combinación útil para el tratamiento de un paciente con una infección viral causada por una o más cepas de un organismo viral y para el tratamiento de un paciente con más de una infección viral después de la administración del medicamento al paciente.

5 La presente invención también es efectiva para la producción de una vacuna terapéutica autóloga, específica del paciente contra el virus, por medio del tratamiento de un fluido biológico que contiene al virus de tal manera que el virus esté presente en una forma modificada, con infectividad reducida, y de tal manera que se inicie una respuesta inmune después de la reintroducción del fluido con el contenido reducido de lípidos en el paciente. Este método
10 autólogo asegura que antígenos específicos del paciente, por ejemplo antígenos virales específicos del paciente, sean introducidos en el mismo paciente del que se obtuvieron para inducir una respuesta inmune. Esta es una característica importante ya que la fisiología de un paciente puede modificar los antígenos presentes en un organismo infeccioso tal como un virus. Para crear la vacuna, se remueve un fluido biológico (por ejemplo, sangre) del paciente, se separa el plasma de la sangre y se lo trata para reducir el contenido en lípidos del virus en el plasma utilizando un sistema disolvente óptimo. Se administra a un paciente, tal como un animal o un humano, un virus que
15 contiene lípidos, tratado de esta manera a fin de reducir su infectividad y crear una partícula viral modificada con un contenido lipídico reducido, opcionalmente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, con el fin de iniciar una respuesta inmune en el animal o en el humano y crear anticuerpos que se unen a los epítomos expuestos de la partícula viral modificada. Se pueden administrar también adyuvantes con la partícula viral modificada en el vehículo farmacéuticamente aceptable o en forma separada.

20 El presente método también se emplea para producir vacunas no autólogas, en donde los fluidos biológicos con virus que contienen lípido de al menos un animal o un ser humano son tratados para producir una partícula viral modificada para administración en un animal o humano diferente (no autólogo). La presente invención también es efectiva para la producción de una vacuna no autóloga contra el virus, por medio del tratamiento de un fluido biológico tal como plasma obtenido de un animal o un humano con el presente método para reducir los niveles de lípido en el fluido y en el virus dentro del fluido. Tal fluido tratado con niveles reducidos de lípidos y que contiene virus modificados con niveles reducidos de lípidos puede ser introducido en otro animal o humano que no sea la fuente del fluido biológico tratado. Este método no autólogo se utiliza para vacunar a un receptor animal o humano
25 contra uno o más organismos infecciosos tales como virus. Se pueden utilizar fluidos biológicos de animales o seres humanos infectados con uno o más organismos infecciosos tales como virus, y tratados con los métodos presentes para producir una vacuna para administración a un receptor animal o humano. Alternativamente, o además, se pueden añadir diferentes suministros de cepas de virus a un fluido biológico antes de tratar el fluido con el método de la presente invención para crear una vacuna.

30 La presente invención abarca las vacunas elaboradas con el método de deslipidación de la presente invención que incluyen más de una cepa del mismo organismo infeccioso, por ejemplo más de un clado de virus VIH (por ejemplo, VIH-1 y VIH-2). Tales vacunas proporcionan una respuesta inmune a más de una cepa del mismo organismo infeccioso. Se puede escoger cualquier cantidad de diferentes cepas infecciosas o clados del mismo virus y tratarlos con el método de deslipidación de la presente invención para formar numerosas vacunas. Alternativamente, o además, se pueden añadir diferentes suministros de existencias de diferentes cepas o clados de virus a un fluido biológico antes de tratar el fluido con el método de la presente invención para crear una vacuna capaz de generar una respuesta inmune. Las existencias de una o más preparaciones virales pueden ser empleadas para elaborar una vacuna no autóloga destinada a uno o más virus. De esta forma se producen vacunas de combinación que proporcionan protección contra las cepas múltiples o clados de un virus o contra múltiples virus.

35 La presente invención abarca las vacunas elaboradas con el método de deslipidación de la presente invención que incluyen más de un organismo infeccioso, tal como más de un virus. Tales vacunas de combinación proporcionan una respuesta inmune a más de un organismo infeccioso, por ejemplo, al VIH y a la hepatitis. Cualquier cantidad de diferentes organismos infecciosos puede ser escogida y tratada con el método de deslipidación de la presente invención para formar numerosas vacunas de combinación.

40 Por lo tanto, se presenta un método efectivo, por medio del cual se pueden desarrollar nuevas vacunas a partir de virus que contienen lípido mediante la remoción del lípido de la envoltura lipídica y exponiendo antígenos ocultos dentro de la envoltura lipídica o debajo de la superficie de la envoltura lipídica, generando a su vez una respuesta inmunitaria cuando se introducen nuevamente en el paciente.

45 La presente invención proporciona una partícula viral modificada que comprende al menos una partícula viral parcialmente deslipidada, en donde la partícula viral parcialmente deslipidada inicia una respuesta inmune en un paciente e incita protección contra un organismo infeccioso en el paciente.

50 La presente invención proporciona un método para crear una partícula viral modificada que comprende las etapas de: recibir una pluralidad de partículas virales, teniendo cada una una envoltura viral, en un fluido; exponer las partículas virales a un proceso de deslipidación; y, la deslipidación parcial de las partículas virales en donde el proceso de deslipidación remueve al menos parcialmente las envolturas virales para crear la partícula viral modificada y en donde la partícula viral modificada es capaz de provocar una respuesta inmune positiva en un
60

65

paciente.

5 La presente invención también proporciona un vehículo para suministro del antígeno y un método para crear un vehículo de suministro del antígeno que comprende las etapas de: recibir una pluralidad de partículas virales, teniendo cada una una envoltura viral, en un fluido; exponer las partículas virales a un proceso de deslipidación; y, la deslipidación parcial de las partículas virales para crear partículas virales modificadas que actúan como vehículos para el suministro del antígeno, en donde el proceso de deslipidación remueve al menos parcialmente las envolturas virales para exponer al menos un antígeno, y en donde al menos un antígeno es capaz de provocar una respuesta inmune positiva en un paciente.

10 Las partículas virales modificadas de la presente invención comprenden al menos una partícula viral parcialmente deslipidada, en donde la partícula viral parcialmente deslipidada se produce mediante la exposición de una partícula viral no deslipidada a un proceso de deslipidación y en donde la partícula viral parcialmente deslipidada comprende al menos un antígeno específico expuesto del paciente que no fue expuesto en la partícula viral no deslipidada.

15 La presente invención también proporciona una composición de vacuna, que comprende al menos una partícula viral parcialmente deslipidada que tiene antígenos virales específicos del paciente y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la partícula viral parcialmente deslipidada es capaz de provocar una respuesta inmune positiva cuando se administra la composición a un paciente.

20 La presente invención también proporciona un método para elaborar una vacuna que comprende: poner en contacto una partícula viral que contiene lípido en un fluido con un primer disolvente orgánico capaz de extraer el lípido de la partícula viral que contiene lípido; mezclar el fluido y el primer disolvente orgánico durante un tiempo suficiente para extraer el lípido de la partícula viral que contiene lípido; permitir que las fases orgánica y acuosa se separen; y recoger la fase acuosa que contiene una partícula viral modificada con contenido lipídico reducido en donde la partícula viral modificada es capaz de provocar una respuesta inmune positiva cuando se la administra a un paciente.

25 La presente invención también proporciona un método para proteger a un paciente contra una partícula viral infecciosa que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de una composición que comprende una partícula viral modificada, en donde la modificación comprende la remoción al menos parcial de una envoltura lipídica de la partícula viral infecciosa y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la cantidad es efectiva para proporcionar un efecto protector contra la infección por la partícula viral infecciosa en el animal o en el humano.

30 La presente invención también proporciona un método para provocar una respuesta inmune positiva en un paciente que tiene una pluralidad de partículas virales que contienen lípido, que comprende las etapas de: obtener un fluido que contiene las partículas virales que contienen lípido a partir del paciente; poner en contacto el fluido que contiene las partículas virales que contienen lípido con un primer disolvente orgánico capaz de extraer lípido de las partículas virales que contienen lípido; mezclar el fluido y el primer disolvente orgánico; permitir que las fases orgánica y acuosa se separen; recoger la fase acuosa que contiene partículas virales modificadas con un contenido reducido de lípido; y la introducción de la fase acuosa que contiene las partículas virales modificadas con un contenido reducido de lípidos en el animal o el humano en donde las partículas virales modificadas con un contenido reducido de lípidos provoca una respuesta inmune positiva en el animal o el humano.

35 La presente invención también proporciona un método para tratar una infección viral en un paciente que comprende: la remoción de la sangre que contiene una pluralidad de partículas virales infecciosas que contienen lípido del paciente; la obtención de plasma de la sangre, conteniendo el plasma las partículas virales infecciosas que contienen lípido; poner en contacto el plasma que contiene las partículas virales infecciosas que contienen lípido con un primer disolvente orgánico capaz de extraer el lípido de las partículas virales infecciosas que contienen lípido para producir partículas virales modificadas que tienen un contenido reducido de lípido; mezclar el plasma y el primer disolvente orgánico; permitir que las fases orgánica y acuosa se separen; recoger la fase acuosa que contiene las partículas virales modificadas; remover el disolvente residual de la fase acuosa; e, introducir la fase acuosa que contiene las partículas virales modificadas en el paciente en donde las partículas virales modificadas tienen al menos un antígeno específico del paciente expuesto que no estaba expuesto en la pluralidad de partículas virales infecciosas que contienen lípido. La introducción de estas partículas virales modificadas en el paciente produce una respuesta inmune para tratar o disminuir la severidad de la infección viral.

40 La presente invención también proporciona un método para tratar una infección viral en un paciente que comprende: la obtención de un fluido que comprende una pluralidad de partículas virales infecciosas que contienen lípido de una pluralidad de pacientes; opcionalmente combinar las partículas virales infecciosas que contienen lípido con un vehículo adecuado biológicamente aceptable; poner en contacto el fluido que contiene partículas virales infecciosas que contienen lípido con un primer disolvente orgánico capaz de extraer lípido de las partículas virales infecciosas que contienen lípido para producir partículas virales modificadas que tienen un contenido reducido de lípido; mezclar el portador y el primer disolvente orgánico; permitir que las fases orgánica y acuosa se separen; recoger la fase

- 5 acuosa que contiene las partículas virales modificadas; e introducir la fase acuosa que contiene las partículas virales modificadas en un paciente diferente en donde las partículas virales modificadas tienen al menos un antígeno expuesto que no estaba expuesto en la pluralidad de partículas virales infecciosas que contienen lípido. En esta realización, las partículas virales infecciosas que contienen lípido representan una o más cepas virales o uno o más tipos de virus y no son específicos del paciente. La introducción de estas partículas virales modificadas en el paciente produce una respuesta inmune para tratar o disminuir la severidad de la infección viral.
- 10 Como se muestra a continuación, las características de la partícula viral modificada se presentan en los datos experimentales, mostrando ratones que tienen una respuesta inmunogénica positiva cuando son vacunados en comparación con una vacuna totalmente inactivada. Además, los datos que presentan la recuperación de proteína indican retención de la integridad estructural de la partícula viral, removiendo únicamente su envoltura que contiene lípido.
- 15 Los fluidos que pueden ser tratados con el método de la presente invención incluyen pero no se limitan a los siguientes: plasma; suero; fluido linfático; fluido cefalorraquídeo; fluido peritoneal; fluido pleural; fluido pericárdico; diversos fluidos del sistema reproductivo, incluyendo pero sin limitarse a semen, fluidos eyaculatorios, fluido folicular y fluido amniótico; reactivos del cultivo de células, tales como sueros normales, suero fetal bovino o suero derivado de cualquier otro animal o humano; y reactivos inmunológicos, tales como diferentes preparaciones de anticuerpos y citoquinas.
- 20 El método de la presente invención puede ser utilizado para tratar los virus que contienen lípido en la envoltura viral. Los virus preferidos para ser tratados con el método de la presente invención incluyen los diferentes virus de inmunodeficiencia, incluyendo pero sin limitarse al humano (VIH) y los subtipos y clados tales como el VIH-1 y el VIH-2, al simio (VIS), al felino (VIF), así como a cualquier otra forma de virus de inmunodeficiencia. Otros virus preferidos para ser tratados con el método de la presente invención incluyen pero no se limitan a hepatitis en sus diferentes formas. Otro virus preferido tratado con el método de la presente invención es el pestivirus bovino. Otro virus preferido tratado con el método de la presente invención es el coronavirus SARS. Debe entenderse que la presente invención no se limita a los virus proporcionados en la lista anterior. Virus específicos adicionales se describen en la descripción detallada de esta solicitud. Todo los virus que contienen lípido, especialmente en su envoltura viral, están incluidos dentro del alcance de la presente invención.
- 25 En consecuencia, un objeto de la presente invención es el de proporcionar un método para tratar virus que contienen lípido con el fin de crear partículas virales modificadas.
- 30 Un objetivo de la presente invención es el de proporcionar un método para tratar virus que contienen lípido con el fin de crear partículas virales modificadas con un contenido reducido de lípido sin afectar sustancialmente los niveles de proteína cuando se compara con las partículas virales no modificadas.
- 35 Incluso otro objetivo de la presente invención es el de proporcionar un método para tratar virus que contienen lípido con el fin de crear partículas virales modificadas con un contenido reducido de lípido, con niveles de proteína sustancialmente no afectados en comparación con las partículas virales no modificadas, y con al menos un antígeno expuesto asociado con las partículas virales que no fue sustancialmente expuesto en partículas virales no modificadas.
- 40 Otro objetivo de la presente invención es el de proporcionar un método para tratar o prevenir una enfermedad viral mediante la administración a un paciente de partículas virales modificadas con contenido reducido de lípido y por lo menos un antígeno expuesto asociado con las partículas virales que no fueron sustancialmente expuestas en partículas virales no modificadas.
- 45 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para tratar un fluido biológico con el fin de reducir o remover la infectividad de los organismos infecciosos virales contenidos allí.
- 50 Aún otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para crear, en un fluido biológico, una pluralidad de partículas virales que contienen lípido modificado que tienen una distribución de contenido reducido de lípido, con un porcentaje sustancial de partículas virales que tienen niveles de proteína sustancialmente afectados cuando se compara con partículas virales sin modificar.
- 55 Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un método para el tratamiento de virus que contienen lípido dentro de un fluido, lo que minimiza los efectos nocivos sobre las proteínas contenidas en el fluido, creando así una partícula viral modificada con propiedades que son capaces de iniciar una respuesta inmune positiva en un paciente.
- 60 Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un método para el tratamiento de virus que contienen lípido dentro de un fluido, lo que minimiza los efectos nocivos sobre las proteínas contenidas en el fluido, creando así una partícula viral modificada con antígenos virales específicos del paciente.
- 65

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para reducir la infectividad de los virus, en donde el método expone determinantes antigénicos sobre la partícula viral modificada.

5 Otro objetivo de la presente invención es deslipidar total o parcialmente las partículas virales, en donde las partículas virales comprenden virus de la inmunodeficiencia, hepatitis en sus diversas formas, coronavirus, o cualquier otro virus que contiene lípido, creando así una partícula viral modificada.

10 Es un objetivo adicional de la presente invención deslipidar parcial o completamente partículas virales, en donde las partículas virales comprenden el virus de la inmunodeficiencia, hepatitis en sus diversas formas, coronavirus, o cualquier otro virus que contiene lípido, mientras que conserva el núcleo de la proteína estructural del virus.

15 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para reducir la infectividad de los virus, en donde la partícula viral recientemente formada puede ser utilizada como un vehículo de suministro del antígeno.

20 Incluso otro objetivo de la presente invención es tratar organismos infecciosos con el método de la presente invención con el fin de reducir su infectividad y proporcionar una vacuna que comprende una partícula viral modificada con contenido lipídico reducido que puede ser administrada a un animal o a un ser humano, opcionalmente con un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, un compuesto inmunoestimulante, para prevenir o minimizar la manifestación clínica de la enfermedad en un paciente después de la exposición al virus.

25 Aún otro objetivo de la presente invención es tratar organismos infecciosos con el método de la presente invención con el fin de reducir su infectividad y proporcionar una vacuna que comprende una partícula viral modificada con contenido lipídico reducido que se puede administrar a un animal o a un ser humano opcionalmente con un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, un compuesto inmunoestimulante, para iniciar una respuesta inmunogénica positiva en el animal o el humano.

30 Aún otro objetivo específico de la presente invención es proporcionar una vacuna antiviral.

Otro objetivo específico de la presente invención es proporcionar una vacuna antiviral que induce respuestas celulares en las células del sistema inmune, en donde las respuestas celulares incluyen, pero no se limitan a la proliferación de las células y la producción de moléculas del sistema inmune, tales como el interferón gamma.

35 Un objetivo específico adicional de la presente invención es disminuir la severidad de una enfermedad causada por un virus que contiene lípido en un animal o en un ser humano que recibe una vacuna que comprende una composición que contiene un virus tratado con el método de la presente invención, combinado opcionalmente con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Otro objetivo de la presente invención consiste es combinar las partículas virales con un contenido reducido de lípidos que tienen los antígenos específicos del paciente con partículas virales deslipidadas en existencia con contenido lipídico reducido para crear una vacuna de combinación terapéutica para el tratamiento o la prevención de más de una enfermedad viral.

45 Estas y otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes después de la revisión de los siguientes dibujos y la descripción detallada de las realizaciones divulgadas. Diversas modificaciones a las realizaciones expuestas serán fácilmente evidentes para aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, y la divulgación expuesta aquí pueden ser aplicable a otras realizaciones y aplicaciones sin apartarse del espíritu y del alcance de la presente invención.

50 Breve descripción de los dibujos

Los dibujos acompañantes, que se incorporan y forman una parte de la memoria descriptiva, ilustran realizaciones preferidas de la presente invención.

55 La Figura 1 representa la densidad de las fracciones del gradiente de sacarosa como se indica por medio de la gráfica de la densidad contra el número fracción para las partículas virales del VIH sometidas a deslipidación usando 1% de DIPE, 1% de butanol / DIPE, 1% de butanol, 2% de butanol, y 5% de butanol, junto con un grupo de control.

60 La Figura 2 representa la concentración de proteína p24 (ng / ml) para cada uno de los números de fracción mostrados en la Figura 1.

La Figura 3 es similar a la Figura 2 y es una representación esquemática de un análisis de gradiente isopícnico de VIH deslipidado sometido a deslipidación utilizando el 1% de DIPE, 1% de butanol / DIPE, 1% de butanol, 2% de butanol, y 5% de butanol, junto con un grupo de control, indicado por una representación gráfica de los niveles de p24 como un porcentaje de la proteína total recuperada p24 contra el número de fracciones.

65

La Figura 4 es una representación esquemática de un análisis de gradiente isopícnico de VIS-mac 251 deslipidado, indicado por un gráfico de la concentración de gag p27 de concentración (ng / ml) contra el número de fracción de acuerdo con las condiciones de deslipidación 1% de DIPE, 5% de DIPE: n-butanol (75 : 25) y 1% de n-butanol.

La Figura 5 es una representación esquemática de una cromatografía líquida de rápido desempaño (FPLC) del control y del VIS mac 521 tratado con 1% de DIPE que muestra los niveles de p27 gag ($\mu\text{g} / \text{ml}$) en cada número de fracción.

La Figura 6 presenta los niveles de colesterol (ng / ml) en las fracciones mostradas en la Figura 5.

La Figura 7 es una representación esquemática de la infectividad de SIV mac 521 (TCID 50/ml) versus los números de copias de ARN viral (copias / mg) después del tratamiento con 1% de DIPE, en virus vivo, y después de tratamiento con AT-2.

Las Figuras 8A y 8B muestran las respuestas de las células T CD4⁺ y CD8⁺ (% de células positivas para interferón gamma) a las reservas de péptido env (8A) del VIS y a las reservas de péptido gag (8B) del VIS en 1 millón de las PMBC de ratones cebados con el VIS inactivado con AT-2 reforzado con el virus, virus inactivado con AT-2 o virus deslipidado (1% de DIPE). Se muestra la media de 6 ratones + o - SEM. ** = valor de $p < 0,01$, * = valor de $p < 0,05$.

La figura 9 es una representación esquemática de los títulos de anticuerpos env gp120 del VIS (O. D. a 450 nm) en ratones inmunizados con virus tratado con AT-2 (VIS mac 251) y reforzado con 1 μg de proteína viral total de virus vivo (VIS mac 251), virus inactivado con AT- 2 o virus deslipidado (1% de DIPE). La dilución serial de plasma de ratón se midió en placas de ELISA recubiertas con proteína gp120 env de VIS mac 251 recombinante.

La Figura 10 es una representación esquemática de los títulos de anticuerpos gag p55 del VIS (O. D. a 450 nm) en ratones inmunizados con virus tratado con AT-2 y reforzado con 1 μg de proteína viral total de virus vivo (VIS mac 251), virus inactivado con AT- 2 o virus deslipidado (1% de DIPE). La dilución serial de plasma de ratón se midió en placas de ELISA recubiertas con proteína gag p55 de VIS mac 251 recombinante.

La Figura 11 es una representación esquemática de una curva de correlación de respuestas de CD4⁺ (% de células gamma IFN) a las reservas del péptido Gag y Env del VIS mac 251 con las respuestas del anticuerpo (O. D. 450 nm) con Gag y Env recombinante. Se observó una correlación fuerte ($R^2 = 0,9993$) entre las respuestas celulares (CD4) a gag VIS mac 251 y las respuestas de anticuerpos anti-gag. Se observó una buena correlación ($R^2 = 0,953$) entre las respuestas celulares (CD4⁺) al env VIS mac 251 y las respuestas de anticuerpos anti-env.

La Figura 12 presenta el porcentaje de células CD4⁺ inmunorreactivas para IFN gamma en respuesta a reservas del péptido gag o env de péptidos en cuatro monos, cada uno cebado con un equivalente de 5 μg de p24 de VIH-III B en adyuvante incompleto de Freund, y posteriormente reforzado con 1 μg del VIH-III B deslipidado con DIPE cada mes (RII y RFo), o con 1 μg del VIH-III B vivo cada mes (RFt & Rom).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Por el término "fluido" se entiende cualquier fluido que contiene un organismo infeccioso, incluyendo pero sin limitarse a, un fluido biológico obtenido a partir de un organismo tal como un animal o un ser humano. Los organismos infecciosos preferidos tratados con el método de la presente invención son los virus. Tales fluidos biológicos obtenidos a partir de un organismo incluyen, pero no se limitan a sangre, plasma, suero, fluido cerebroespinal, fluido linfático, fluido peritoneal, fluido folicular, fluido amniótico, fluido pleural, fluido pericárdico, fluidos del sistema reproductor y cualquier otro fluido contenido dentro del organismo. Otros fluidos pueden incluir muestras de laboratorio que contienen organismos infecciosos suspendidos en cualquier fluido escogido. Otros fluidos incluyen reactivos de cultivo celular, muchos de los cuales incluyen compuestos biológicos tales como fluidos obtenidos a partir de organismos vivos, incluyendo pero sin limitarse a "suero normal" obtenido de diversos animales y utilizado como medio de crecimiento en aplicaciones de cultivo de células y tejidos.

Por los términos "primer disolvente" o "primer disolvente orgánico" o "primer disolvente de extracción" se entiende un disolvente, que comprende uno o más disolventes, que se utilizan para facilitar la extracción de lípido de un fluido o de un organismo biológico que contiene lípido en el fluido. Este disolvente entrará al fluido y permanecerá en él hasta que es removido. Los disolventes adecuados de primera extracción incluyen disolventes que extraen o disuelven lípido, incluyendo pero sin limitarse a alcoholes, hidrocarburos, aminas, éteres, y sus combinaciones. Los primeros disolventes de extracción pueden ser combinaciones de alcoholes y éteres. Los primeros disolventes de extracción incluyen, pero no se limitan a n-butanol, di-isopropil éter (DIPE), éter dietílico, y combinaciones de los mismos.

El término "segundo solvente de extracción" se define como uno o más disolventes que pueden ser empleados para facilitar la remoción de una porción del primer disolvente de extracción. Los disolventes adecuados de segunda extracción incluyen cualquier disolvente que facilite la remoción del primer disolvente de extracción del fluido. Los segundos disolventes de extracción incluyen cualquier disolvente que facilite la remoción del primer disolvente de extracción incluyendo, pero sin limitarse a éteres, alcoholes, hidrocarburos, aminas, y sus combinaciones. Los disolventes preferidos para la segunda extracción incluyen éter dietílico y diisopropil éter, que facilitan la remoción de alcoholes, tales como n-butanol, del fluido. El término "agente desémulsificante" es un segundo disolvente de extracción que ayuda a la remoción del primer disolvente que puede estar presente en una emulsión en una capa

acuosa.

5 El término "deslipidación" se refiere al proceso de remoción de al menos una porción de una concentración total de lípidos en un fluido o en un organismo que contiene lípido. Los organismos que contienen lípido pueden ser encontrados dentro de fluidos que pueden o no contener lípidos adicionales.

10 Los términos "portador farmacéuticamente aceptable" o "vehículo farmacéuticamente aceptable" se utiliza aquí para significar cualquier líquido incluyendo pero sin limitarse a agua o solución salina, un gel, ungüento, disolvente, diluyente, fluido con base en un ungüento, liposomas, micelas, micelas gigantes, y similares, que sea adecuado para su uso en contacto con tejido animal o humano vivo sin causar respuestas fisiológicas adversas, y que no interactúe con los otros componentes de la composición en una forma perjudicial.

El término "paciente" se refiere a animales y a seres humanos.

15 El término "antígeno específico del paciente" se refiere a un antígeno que sea capaz de inducir una respuesta inmune específica del paciente cuando se introduce en ese paciente. Tales antígenos específicos de pacientes pueden ser antígenos virales. Un antígeno específico del paciente incluye cualquier antígeno, por ejemplo un antígeno viral, que ha sido modificado o influenciado dentro del paciente.

20 Una partícula viral modificada

25 La práctica del método de la presente invención para reducir el contenido de lípidos de un virus crea una partícula viral modificada. Estas partículas virales modificadas tienen niveles más bajos de colesterol y son inmunogénicas. Los métodos presentes exponen epítopos que usualmente no son presentados al sistema inmune por el virus sin tratar. Un cambio estructural se produce en las partículas virales modificadas y las proteínas sobre, en o cerca de la superficie del virus se modifican de tal manera que se produce un cambio conformacional. Algunas de estas proteínas también pueden separarse de la partícula viral modificada. Una representación esquemática de las partículas virales del VIH que contienen la envoltura que contiene al lípido o bicapa derivada de una célula huésped, glicoproteínas de superficie, proteínas transmembrana, la cápside, proteínas de la cápside, y material nuclear, se presenta en la página 238 de Robbins Pathologic Basis of Disease (Cotran et al. eds, 6ª edición, W. B. Saunders Co., 1999). El proceso de deslipidación de la presente invención modifica la partícula viral. La partícula viral modificada tiene un contenido de lípido menor en la envoltura, muestra proteínas modificadas, infectividad reducida y es inmunogénica.

35 Partícula viral modificada resultante de la remoción de lípido de los organismos que contienen lípido

40 Los métodos de la presente invención resuelven numerosos problemas encontrados con los métodos del estado del arte. Por medio de la remoción sustancial de la envoltura lipídica del virus, y del mantenimiento de la partícula viral intacta, el método de la presente invención expone antígenos adicionales. El sistema inmune del huésped reconoce la partícula viral como foránea. Utilizando el método de la presente invención, lo que se crea es una partícula viral modificada en la que el núcleo antigénico permanece intacto, utilizando para ello los epítopos de la partícula viral real para iniciar una respuesta inmunogénica positiva en el paciente en el que es reintroducida. Además, el método de la presente invención reduce el efecto perjudicial sobre las otras proteínas plasmáticas, medidas por medio de la recuperación de proteínas, de tal manera que el plasma puede ser reintroducido en el paciente.

45 En la creación de esta partícula viral modificada, lo que también se crea es un antígeno específico del paciente que induce una protección contra la partícula viral en las especies en las que se introduce. El método de la presente invención crea un medio efectivo para inmunizar individuos contra la infección por el patógeno viral y provocar una amplia respuesta inmune protectora biológicamente activa, sin riesgo de infectar al individuo. Nuevas vacunas pueden ser desarrolladas a partir de ciertos virus que contienen lípidos mediante la remoción de la envoltura lipídica y la exposición de antígenos ocultos bajo la envoltura, generando a su vez una respuesta inmune positiva. Estas "vacunas autólogas" pueden ser creadas por medio de la remoción parcial de la envoltura lipídica utilizando sistemas disolventes adecuados (uno que no dañe los antígenos contenidos en la partícula) exponiendo antígenos y / o forzando una modificación estructural en las estructuras de la proteína viral, que cuando se introduce en el organismo, provocaría una respuesta inmune efectiva. Se crean también vacunas no autólogas en la presente invención que se administran a pacientes, que son diferentes de la fuente del virus que se deslipida. Las vacunas de combinación dirigidas contra múltiples virus están también dentro del alcance de la presente invención. Tales vacunas de combinación pueden ser elaboradas a partir de diferentes fluidos biológicos, de suministros en existencia de virus múltiples (por ejemplo, el VIH, la hepatitis y el SARS) y / o de cepas múltiples o clados de un virus (por ejemplo, VIH-1 y VIH-2).

Organismos infecciosos tratados con la presente invención

65 Los virus son el organismo infeccioso preferido tratado con el método de la presente invención. Los organismos infecciosos virales que pueden ser deslipidados por medio de la presente invención para formar partículas virales

modificados incluyen, pero no se limitan a los virus que contienen lípido de los géneros siguientes: *Alphavirus* (alfavirus), *Rubivirus* (virus de la rubéola), *Flavivirus* (flavivirus), *Pestivirus* (virus de la enfermedad de las mucosas), (virus de hepatitis C, sin nombre), *Coronavirus* (coronavirus), síndrome respiratorio severo agudo (SARS), *Torovirus*, (torovirus), *Arteivirus* (arterivirus), *Paramyxovirus* (paramixovirus), *Rubulavirus* (rubulavirus), *Morbilivirus* (morbilivirus), *Pneumovirinae* (los neumovirus), *Pneumovirus* (neumovirus), *Vesiculovirus* (vesiculovirus), *Lyssavirus* (lisavirus), *Ephemerovirus* (efemerovirus), *Cytorhabdovirus* (grupo A de la planta rhabdovirus), *Nucleorhabdovirus* (grupo B de la planta rhabdovirus), *Filovirus* (filovirus), *Influenzavirus A, B* (virus de la influenza A y B), *Influenza virus C* (virus de la influenza C), (virus similares a Thogoto, sin nombre), *Bunyavirus* (buniavirus), *Phlebovirus* (flebovirus), *Nairovirus* (nairovirus), *Hantavirus* (hantavirus), *Tospovirus* (tospovirus), *Arenavirus* (arenavirus), retrovirus tipo B de mamífero, sin nombre, retrovirus tipo C de reptiles y mamíferos, sin nombre, retrovirus tipo D, sin nombre, *Lentivirus* (lentivirus), *Spumavirus* (espumavirus), *Orthohepadnavirus* (hepadnavirus de mamíferos), *Avihepadnavirus* (hepadnavirus de aves), *Simplexvirus* (simplexvirus), *Varicellovirus* (varicelovirus), *Betaherpesvirinae* (los citomegalovirus), *Cytomegalovirus* (citomegalovirus), *Muromegalovirus* (citomegalovirus de murido), *Roseolovirus* (virus del herpes humano 6, 7, 8), *Gammaparvovirinae* (los virus del herpes asociados a linfocitos), *Lymphocryptovirus* (virus del tipo Epstein-Barr), *Rhadinovirus* (los virus del herpes del tipo saimiri-ateles), *Orthopoxvirus* (ortopoxvirus), *Parapoxvirus* (parapoxvirus), *Avipoxvirus* (virus de la viruela aviar), *Capripoxvirus* (virus del tipo de la viruela ovina), *Leporipoxvirus* (mixomavirus), *Suipoxvirus* (virus de la viruela porcina), *Molluscipoxvirus* (virus contagioso del molusco), *Yatapoxvirus* (virus yabapox y tanapox), virus del tipo de la fiebre porcina africana, sin nombre, *Iridovirus* (virus del insecto iridiscente pequeño), *Ranavirus* (iridovirus del frente), *Lymphocystivirus* (virus linfocistis del pez), *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Coronaviridae*, *Enaboviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*, *Retroviridae*, *Hepadyaaviridae*, *Herpesviridae*, *Poxviridae*, y cualquier otro virus que contenga lípido.

Estos virus incluyen a los siguientes patógenos de los humanos y de los animales: el virus del Río Ross, el virus de la fiebre, los virus del dengue, el virus de la encefalitis del Valle Murray, los virus de la encefalitis que transmiten las garrapatas (incluidos los virus de la encefalitis transmitida por la garrapata europea y del extremo oriente, el virus de la encefalitis de California, el virus de la encefalitis de San Luis, el virus de la fiebre de la mosca de la arena, los coronavirus humanos 229-E y OC43 y otros que causan el resfriado común, infección del tracto respiratorio superior, probablemente neumonía y posiblemente gastroenteritis), virus 1 y 3 de parainfluenza humana, virus de las paperas, virus 2, 4a y 4b de la parainfluenza humana, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio humano, virus de la rabia, virus de Marburgo, virus del Ébola, virus de la influenza A y virus de influenza B, *Arenavirus*: virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM); el virus de Lassa, los virus 1 y 2 de inmunodeficiencia humana, o cualquier otro virus de la inmunodeficiencia, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis G, de la subfamilia: virus 1 y 2 del herpes humano, virus del herpes B, virus de Epstein-Barr), virus de la (viruela), virus de la viruela de las vacas, virus de la viruela de los monos, virus contagioso de los moluscos, virus de la fiebre amarilla, virus de la polio, virus de Norwalk, virus orf, y cualquier otro virus que contenga lípido.

Métodos de fabricación de la partícula viral modificada

Una persona ordinariamente capacitada en la materia se dará cuenta que pueden haber múltiples procesos de deslipidación empleados bajo el alcance de esta invención. En una realización preferida, un sistema disolvente junto con energía aplicada, por ejemplo se utiliza un sistema mecánico de mezclado, para deslipidar sustancialmente la partícula viral. El proceso de deslipidación depende de la cantidad total de disolvente y de energía que ingresa en un sistema. Diferentes niveles de disolvente y métodos de mezcla, como se describe a continuación, se pueden utilizar dependiendo de la estructura general del proceso. Aunque se puede utilizar un solo disolvente o múltiples disolventes para deslipidación del virus, se debe entender que se prefiere un solo disolvente ya que hay menos probabilidad de destrucción y desnaturalización de la partícula viral.

Ejemplos de sistemas disolventes para uso en la remoción del lípido de los virus y efectivos para mantener la integridad de la partícula viral

El disolvente o las combinaciones de disolventes que se emplean en el proceso de deslipidación parcial o completa de los organismos que contienen lípido puede ser cualquier disolvente o combinación de los mismos efectiva en la solubilización de los lípidos en la envoltura viral, mientras se mantiene la integridad estructural de la partícula viral modificada, que puede ser medido, en una realización, a través de la recuperación de la proteína. Un proceso de deslipidación que cae dentro del alcance de la presente invención utiliza una combinación óptima de entrada de energía y de disolvente para deslipidar la partícula viral, mientras se la mantiene intacta. Los disolventes adecuados incluyen hidrocarburos, éteres, alcoholes, fenoles, ésteres, hidrocarburos halogenados, halocarbonos, aminas, y sus mezclas. También se pueden utilizar hidrocarburos aromáticos, alifáticos, o alicíclicos. Otros disolventes adecuados, que pueden ser utilizados con la presente invención, incluyen aminas y mezclas de aminas. Un sistema disolvente es DIPE, ya sea concentrado o diluido en agua o un amortiguador tal como un amortiguador fisiológicamente aceptable. Una combinación disolvente comprende alcoholes y éteres. Otro disolvente comprende éter o combinaciones de éteres, ya sea en forma de éteres simétricos, éteres asimétricos, o éteres halogenados.

Los sistemas de disolventes óptimos son aquellos que cumplen dos objetivos: primero, al menos deslipidación

- parcial del organismo infeccioso o partícula viral y segundo, el empleo de un conjunto de condiciones tales que haya pocos o ningún efecto nocivo sobre las otras proteínas plasmáticas. Además, el sistema disolvente debe mantener la integridad de la partícula viral de tal manera que puede ser usado para iniciar una respuesta inmune en el paciente. Por lo tanto, hay que señalar que ciertos disolventes, combinaciones de disolventes, y las concentraciones de disolvente pueden ser demasiado severas para utilizar en la presente invención, ya que traen como resultado una muerte química.
- Se prefiere que el disolvente o la combinación de disolventes tengan un punto de ebullición relativamente bajo para facilitar la remoción a través del vacío y posiblemente calor, sin destruir el núcleo antigénico de la partícula viral. También se prefiere que el disolvente o la combinación de disolventes se empleen a baja temperatura ya que el calor tiene efectos perjudiciales sobre las proteínas contenidas en fluidos biológicos tales como el plasma. También se prefiere que el disolvente o la combinación de disolventes deslípide al menos parcialmente la partícula viral.
- Los hidrocarburos líquidos disuelven compuestos de baja polaridad tal como los lípidos que se encuentran en las envolturas virales de los organismos infecciosos. Particularmente eficaces para romper la membrana lipídica de una partícula viral son los hidrocarburos que sean sustancialmente inmiscibles en agua y líquidos aproximadamente a 37° C. Los hidrocarburos adecuados incluyen, pero no se limitan a los siguientes: hidrocarburos alifáticos C₅ a C₂₀ tales como éter de petróleo, hexano, heptano, octano; hidrocarburos haloalifáticos tales como cloroformo, 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano, 1,1,1-tricloroetano, tricloroetileno, tetracloroetileno, diclorometano, y tetracloruro de carbono; hidrocarburos tioalifáticos cada uno de los cuales puede ser lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado; hidrocarburos aromáticos tales como benceno, cetonas; alquilarenos tales como tolueno; haloarenos; haloalquilarenos; y tioarenos. Otros disolventes adecuados pueden incluir también compuestos heterocíclicos saturados o insaturados tales como piridina y derivados alifáticos, tio o halo derivados de los mismos.
- Los ésteres adecuados para uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de butilo y propionato de etilo. Los detergentes / surfactantes adecuados que pueden usarse incluyen pero no se limitan a los siguientes: sulfatos, sulfonatos, fosfatos (incluyendo fosfolípidos), carboxilatos, y sulfosuccinatos. Algunos materiales aniónicos anfífilos útiles con la presente invención incluyen pero no se limitan a los siguientes: dodecilsulfato sódico (SDS), decil sulfato de sodio, bis-(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT), sulfato de colesterol y laurato sódico.
- Los disolventes pueden ser retirados de las mezclas virales deslípidadas mediante el uso de disolventes adicionales. Por ejemplo, se pueden utilizar los agentes desemulsificantes tales como éteres para remover un primer disolvente tal como un alcohol de una emulsión. La remoción de disolventes también se puede lograr a través de otros métodos, que no empleen disolventes adicionales, incluyendo pero sin limitarse al uso de carbón vegetal. El carbón vegetal puede ser utilizado en una suspensión o alternativamente, en una columna a la que se aplica una mezcla. El carbón vegetal es un método preferido de remoción de disolventes. También se puede emplear pervaporación para remover uno o más disolventes de mezclas virales deslípidadas.
- Los ejemplos de aminas adecuadas para uso en la remoción de lípidos a partir de organismos que contengan lípido en la presente invención son aquellas que son sustancialmente inmiscible en agua. Aminas típicas son las aminas alifáticas, aquellas que tienen una cadena de carbono de al menos 6 átomos de carbono. Un ejemplo no limitante de tal amina es C₆H₁₃NH₂.
- El éter es un disolvente preferido para uso en el método de la presente invención. Se prefieren particularmente los éteres que contienen C₄ - C₈, incluyendo pero sin limitarse a éter etílico, éter dietílico, y éteres de propilo (incluyendo pero sin limitarse a diisopropil éter). También se pueden emplear éteres asimétricos. También se pueden emplear éteres halogenados simétricos y asimétricos.
- Se pueden emplear bajas concentraciones de éteres para remover los lípidos cuando se usan solos y no en combinación con otros disolventes. Por ejemplo, un intervalo de concentración baja de éteres incluye 0,5% a 30%. Tales concentraciones de éteres que pueden ser empleados incluyen, pero no se limitan a las siguientes: 0,625%, 1,0%, 1,25%, 2,5%, 5,0% y el 10% o superiores. Se ha observado que las soluciones diluidas de éteres son efectivas. Tales soluciones pueden ser soluciones acuosas o soluciones en amortiguadores acuosos, tales como solución salina amortiguada de fosfato (PBS). Se pueden utilizar otros amortiguadores fisiológicos, incluyendo pero sin limitarse a bicarbonato, citrato, Tris, Tris / EDTA, y Trizma. Los éteres preferidos son diisopropil éter (DIPE) y éter dietílico (DEE). También se pueden utilizar bajas concentraciones de éteres en combinación con alcoholes, por ejemplo, n-butanol.
- Cuando se utilizan en la presente invención, los alcoholes apropiados son aquellos que no son apreciablemente miscibles con plasma o con otros fluidos biológicos. Tales alcoholes incluyen, pero no se limitan a, alcoholes de cadena lineal y de cadena ramificada, incluyendo pentanoles, hexanoles, heptanoles, octanoles, y aquellos alcoholes que contienen un mayor número de carbonos.
- Cuando se utilizan alcoholes en combinación con otro disolvente, por ejemplo, un éter, un hidrocarburo, una amina,

o una combinación de los mismos, se pueden utilizar alcoholes que contienen C₁ - C₈. Los alcoholes para su uso en combinación con otro disolvente incluyen alcoholes que contienen C₁ - C₈. En consecuencia, los alcoholes que caen dentro del alcance de la presente invención son butanoles, pentanoles, hexanoles, heptanoles y octanoles e isoformas de los mismos, en particular, alcoholes C₄ o butanoles (1-butanol y 2-butanol). La elección del alcohol específico depende del segundo disolvente empleado.

Se pueden utilizar éteres y alcoholes en combinación como un primer disolvente para el tratamiento del fluido que contiene el virus que contiene lípido, o una partícula viral. Se puede utilizar cualquier combinación de alcohol y éter siempre que la combinación sea efectiva para remover al menos parcialmente lípido del organismo infeccioso, sin tener efectos perjudiciales sobre las proteínas plasmáticas. En una realización, el lípido se remueve de la envoltura viral del organismo infeccioso. Cuando se combinan alcoholes y éteres como un primer disolvente para el tratamiento del organismo infeccioso contenido en un fluido, las proporciones de alcohol con respecto a éter en este disolvente están en el rango de aproximadamente 0,01 partes de alcohol a 99,99 partes de éter hasta 60 partes de alcohol a 40 partes de éter, con una relación específica en el rango de aproximadamente 10 partes de alcohol a 90 partes de éter hasta 5 partes de alcohol a 95 partes de éter, con una relación específica en el rango de aproximadamente 10 partes de alcohol a 90 partes de éter hasta 50 partes de alcohol a 50 partes de éter, con una relación específica en el rango de aproximadamente 20 partes de alcohol a 80 partes de éter hasta 45 partes de alcohol a 55 partes de éter, con un rango específico de aproximadamente 25 partes de alcohol a 75 partes de éter.

Una combinación de alcohol y éter es la combinación de butanol y diisopropil éter (DIPE). Cuando se combinan butanol y DIPE como un primer disolvente para el tratamiento del organismo infeccioso contenido en un fluido, las proporciones de butanol con respecto a DIPE en este disolvente son aproximadamente de 0,01 partes de butanol a 99,99 partes de DIPE hasta 60 partes de butanol a 40 partes de DIPE, con una relación específica en el rango de aproximadamente 10 partes de butanol a 90 partes de DIPE hasta 5 partes de butanol a 95 partes de DIPE, con una relación específica en el rango de aproximadamente 10 partes de butanol a 90 partes de DIPE hasta 50 partes de butanol a 50 partes de DIPE partes, con una relación específica en el rango de aproximadamente 20 partes de butanol a 80 partes de DIPE hasta 45 partes de butanol a 55 partes de DIPE, con un rango específico de aproximadamente 25 partes de butanol a 75 partes de DIPE.

Otra combinación de alcohol y éter es la combinación de butanol con éter dietílico (DEE). Cuando se utiliza butanol en combinación con DEE como un primer disolvente, las proporciones de butanol con respecto a DEE son aproximadamente de 0,01 partes de butanol a 99,99 partes de DEE hasta 60 partes de butanol a 40 partes de DEE, con una relación específica en el rango de aproximadamente 10 partes de butanol a 90 partes de DEE hasta 5 partes de butanol a 95 partes de DEE con una relación específica en el rango de aproximadamente 10 partes de butanol a 90 partes de DEE hasta 50 partes de butanol a 50 partes de DEE, con una relación específica en el rango de aproximadamente 20 partes de butanol a 80 partes de DEE hasta 45 partes de butanol a 55 partes de DEE, con un rango específico de aproximadamente 40 partes de butanol a 60 partes de DEE. Esta combinación de aproximadamente 40% de butanol y aproximadamente 60% de DEE (vol: vol) se ha demostrado que no tiene ningún efecto significativo sobre una variedad de parámetros bioquímicos y hematológicos de la sangre, como se muestra por ejemplo en la patente de los Estados Unidos No. 4.895.558.

Fluidos biológicos y su tratamiento para la reducción de la infectividad de los organismos infecciosos que contienen lípido

Como se indicó anteriormente, diversos fluidos biológicos pueden ser tratados con el método de la presente invención con el fin de reducir los niveles de infectividad del organismo que contiene lípido en el fluido biológico y para crear partículas virales modificadas. En una realización preferida, el plasma obtenido a partir de un animal o de un ser humano es tratado con el método de la presente invención con el fin de reducir la concentración y / o la infectividad de los organismos infecciosos que contienen lípido en el plasma y de crear partículas virales modificadas. En esta realización, el plasma puede ser obtenido de un animal o de un paciente humano mediante el retiro de sangre del paciente utilizando métodos bien conocidos y el tratamiento de la sangre con el fin de separar los componentes celulares de la sangre (glóbulos rojos y blancos) del plasma. Tales métodos para el tratamiento de la sangre son conocidos por alguien ordinariamente capacitado en la técnica e incluyen pero no se limitan a centrifugación y filtración. Alguien ordinariamente capacitado en la técnica entiende las condiciones de centrifugación adecuadas para la separación de dichos organismos que contienen lípido de los glóbulos rojos y blancos. El uso de la presente invención permite el tratamiento de los organismos que contienen lípido, por ejemplo aquellos que se encuentran dentro de plasma, sin tener efectos nocivos sobre otras proteínas plasmáticas y el mantenimiento de la integridad del núcleo viral.

Los virus en el plasma se ven afectados por el tratamiento del plasma con el método de la presente invención. El organismo viral que contiene lípido puede ser separado de los glóbulos rojos y blancos utilizando técnicas conocidas por alguien ordinariamente capacitado en la técnica.

Fluidos biológicos incluyen las existencias de preparaciones virales, incluyendo diferentes cepas de virus, así como diferentes tipos de virus. El tratamiento de tales fluidos biológicos con el método de la presente invención produce

- partículas virales modificadas que pueden ser administradas a un paciente como una vacuna no autóloga. Tales vacunas no autólogas proporcionar protección en el paciente contra más de una cepa de un virus y / o contra más de un tipo de virus. El tratamiento de los organismos que contienen lípido puede producirse en otros fluidos biológicos diferentes a la sangre y el plasma. Por ejemplo, se puede tratar fluido peritoneal con la presente invención para afectar los niveles y la infectividad de los organismos que contienen lípido sin efectos nocivos sobre los componentes proteicos. El líquido tratado puede ser reintroducido posteriormente en el animal o el humano del cual se obtuvo. El tratamiento de tipos de fluidos no sanguíneos afecta a los organismos que contienen lípido en el líquido, tal como los virus.
- Una vez que un fluido biológico, tal como plasma, es obtenido bien sea de esta manera o, por ejemplo, a partir de una instalación de almacenamiento que conserva bolsas de plasma, se pone en contacto el plasma con un primer disolvente orgánico, como se ha descrito anteriormente, capaz de solubilizar lípido en el organismo infeccioso que contiene lípido. El primer disolvente orgánico se combina con el plasma en una relación en la que el primer disolvente está presente en una cantidad efectiva para solubilizar substancialmente el lípido en el organismo infeccioso, por ejemplo, disolver la envoltura lipídica que rodea el virus. Los ejemplos de proporciones del primer disolvente con respecto al plasma (expresada como la relación del primer disolvente orgánico con respecto al plasma) se describen en los siguientes rangos: 0,5 - 4,0 : 0,5 - 4,0; 0,8 - 3,0 : 0,8 - 3,0; y 1 - 2 : 0,8 - 1,5. Varias otras relaciones puede aplicarse, dependiendo de la naturaleza del fluido biológico. Por ejemplo, en el caso de fluido de cultivo celular, se pueden emplear los siguientes rangos del primer disolvente orgánico con respecto al fluido de cultivo celular: 0,5 - 4,0 : 0,5 - 4,0; 0,8 - 3,0 : 0,8 - 3,0; y 1 - 2 : 0,8 - 1,5.
- Después de poner en contacto el fluido que contiene el organismo infeccioso con el primer disolvente como se ha descrito anteriormente, el primer disolvente y el fluido se mezclan, utilizando métodos que incluyen pero no se limitan a uno de los siguientes métodos de mezcla adecuados: agitación suave; agitación vigorosa; agitación tipo vórtice; por formación de remolino; homogeneización, y, agitación rotacional tipo noria.
- La cantidad de tiempo requerido para la mezcla adecuada del primer disolvente con el fluido está relacionado con el método de mezcla empleado. Los fluidos se mezclan durante un período de tiempo suficiente para permitir el contacto íntimo entre las fases orgánica y acuosa, y para que el primer disolvente, solubilice al menos parcialmente o completamente el lípido contenido en el organismo infeccioso. Típicamente, la mezcla se producirá durante un período de aproximadamente 10 segundos hasta aproximadamente 24 horas, posiblemente aproximadamente 10 segundos hasta aproximadamente 2 horas, posiblemente aproximadamente 10 segundos hasta aproximadamente 10 minutos, o posiblemente aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 1 hora, dependiendo del método de mezcla empleado. Los ejemplos no limitantes de duraciones de mezcla asociados con diferentes métodos incluyen: 1) agitación suave y rotación completa durante un período de unos 10 segundos hasta aproximadamente 24 horas, 2) agitación vigorosa y agitación tipo vórtice durante un período de aproximadamente 10 segundos hasta aproximadamente 30 minutos, 3) agitación con formación de remolino durante un período de aproximadamente 10 segundos hasta aproximadamente 2 horas, o 4) homogeneización durante un período de aproximadamente 10 segundos hasta aproximadamente 10 minutos.
- Separación de los disolventes
- Después de mezclar el primer disolvente con el fluido, se separa el disolvente del fluido que está siendo tratado. Se pueden separar las fases orgánica y acuosa por cualquier medio adecuado conocido por alguien ordinariamente capacitado en la técnica. Ya que el primer disolvente es típicamente inmiscible en el líquido acuoso, se permite que se separen las dos capas y se elimina la capa no deseada. La capa no deseada es la capa de disolvente que contiene lípidos disueltos y su identificación, como es conocido por alguien ordinariamente capacitado en la técnica, depende de si el disolvente es más o menos denso que la fase acuosa. Una ventaja de la separación de esta manera es que los lípidos disueltos en la capa de disolvente pueden ser removidos.
- Además, la separación se puede conseguir a través de medios, incluyendo pero sin limitarse a los siguientes: remoción de la capa no deseada a través de pipeteo; centrifugación seguida de la remoción de la capa que va a ser separada; creación un camino o un agujero en la parte inferior del tubo que contiene las capas y permitir que la capa inferior pase a través del mismo; utilización de un contenedor con válvulas o puertos situados en sitios específicos a lo largo del eje longitudinal del recipiente para facilitar el acceso y la remoción de las capas específicas; y cualquier otro medio conocido por alguien ordinariamente capacitado en la arte. Otro método para separación de las capas, especialmente cuando la capa de disolvente es volátil, es a través de destilación a presión reducida o evaporación a temperatura ambiente, combinado opcionalmente con calentamiento suave. En una realización que emplea centrifugación, se utilizan fuerzas g relativamente bajas, tales como 900 x g durante aproximadamente 5 a 15 minutos para separar las fases.
- Un método preferido de remoción del disolvente es mediante el uso de carbón vegetal, preferiblemente carbón activado. Este carbón está opcionalmente contenido en una columna. Alternativamente, el carbón puede ser utilizado en forma de suspensión. Diversas formas biocompatibles de carbón pueden ser utilizadas en estas columnas. Los métodos de pervaporación y el uso de carbón para remover los disolventes son los métodos

preferidos para la remoción del disolvente.

Después de la separación del primer disolvente del fluido tratado, algo del primer disolvente puede permanecer atrapado en la capa acuosa como una emulsión. Un método preferido de remoción de un primer disolvente o un agente desémulsificante es mediante el uso de adsorbentes, tales como carbón vegetal. El carbón vegetal es preferiblemente carbón activado. Este carbón está opcionalmente contenido en una columna, como se describió anteriormente. Aún otro método de remoción del disolvente es el uso de contactores de fibra huecos. Los métodos de pervaporación y métodos de adsorción con carbón vegetal para la remoción de disolventes son los preferidos. En otra realización, se emplea un agente desémulsificante para facilitar la remoción del primer disolvente atrapado. El agente desémulsificante puede ser cualquier agente efectivo para facilitar la remoción del primer disolvente. Un agente desémulsificante preferido es éter y un agente desémulsificante más preferido es éter dietílico. El agente desémulsificante puede ser añadido al fluido o alternativamente, el fluido puede ser dispersado en el agente desémulsificante. En la preparación de vacunas, se pueden emplear alcanos en una proporción aproximadamente de 0,5 a 4,0 hasta aproximadamente 1 parte de emulsión (vol:vol) como agente desémulsificante, seguido por un lavado para remover el alcano residual del organismo deslipedado restante utilizado para la preparación de la vacuna. Los alcanos preferidos incluyen, pero no se limitan a, pentano, hexano y alcanos de cadena lineal y ramificada superiores.

El agente desémulsificante, tal como el éter, puede ser retirado a través de medios conocidos para alguien ordinariamente capacitado en el arte, incluidos medios tales como los descritos en el párrafo anterior. Un método conveniente para remover del sistema el agente desémulsificante, tal como éter, es permitir que el éter se evapore del sistema en una campana extractora de humos o de otro dispositivo adecuado para recolectar y remover el agente desémulsificante del medio. Además, los agentes desémulsificantes pueden eliminarse mediante la aplicación de temperaturas más altas, por ejemplo, de aproximadamente 24 a 37° C con o sin presiones de aproximadamente 10 a 20 mbar. Otro método para remover el agente desémulsificante implica la separación por centrifugación, seguido de la remoción del disolvente orgánico a través de aspiración, seguido además por evaporación a presión reducida (por ejemplo 50 mbar), o el suministro adicional de un gas inerte, tal como nitrógeno, sobre el menisco para ayudar en la evaporación.

Métodos de tratamiento de fluidos biológicos (deslipedación)

Se debe entender que el método de la presente invención puede ser empleado ya sea en forma continua o discontinua. Es decir, de una manera continua, un fluido puede ser alimentado a un sistema que emplea un primer disolvente que es luego mezclado con el fluido, separado, y además opcionalmente removido mediante la aplicación de un agente desémulsificante. El método continuo también facilita el retorno posterior del fluido que contiene un organismo infeccioso deslipedado a un lugar deseado. Tales lugares pueden ser recipientes para la recepción y / o almacenamiento de tal fluido tratado, y también puede incluir el sistema vascular de un humano o animal o algún otro compartimento corporal de un humano o animal, tal como el espacio pleural, peritoneal, pericárdico, y abdominopélvico.

En una realización del método continuo de la presente invención, un fluido biológico, por ejemplo, sangre, es removido de un animal o de un humano a través de medios conocidos para alguien ordinariamente capacitado en la técnica, tal como un catéter. Se emplean factores anticoagulantes apropiados conocidos por alguien ordinariamente capacitado en la técnica, tales como ácido heparina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o citrato. Esta sangre se separa luego en sus componentes celulares y plasma mediante el uso de una centrífuga. Luego se pone en contacto el plasma con el primer disolvente y se mezcla con el primer disolvente para efectuar la remoción de lípido del organismo infeccioso contenido dentro del plasma. Después de la separación del primer disolvente del plasma tratado, se emplea opcionalmente carbón vegetal, pervaporación o un agente desémulsificante para remover el primer disolvente atrapado. Después de asegurarse de que se encuentran niveles aceptables (no tóxicos) del primer agente disolvente o desémulsificante, si se emplea, dentro del plasma que contiene el organismo infeccioso deslipedado, se combina luego opcionalmente el plasma con las células previamente separadas de la sangre para formar una nueva muestra de sangre que contiene partículas virales al menos parcialmente deslipedadas, también llamadas aquí partículas virales modificadas.

Mediante la práctica de este método, se reduce grandemente o elimina la infectividad del organismo infeccioso. Después de la recombinación con las células originalmente separadas de la sangre, el fluido con niveles reducidos de lípido y que contiene al virus con niveles reducidos de lípido puede ser reintroducido ya sea en el sistema vascular o en algún otro sistema del animal o el humano. El efecto de tal tratamiento del plasma removido del humano o del animal y el retorno de la muestra que contiene al organismo infeccioso parcial o completamente deslipedado, o de la partícula viral modificada, al humano o al animal provoca una disminución neta en la infectividad del organismo infeccioso contenido dentro el sistema vascular del humano o del animal. La partícula viral modificada también sirve para iniciar una respuesta inmune autóloga en el paciente cuando se administra al paciente. En este modo de operación, el método de la presente invención se emplea para tratar los fluidos corporales en una forma continua, mientras el humano o el animal está conectado a un dispositivo extracorpóreo para dicho tratamiento.

En aún otra realización, el modo discontinuo o por lotes, el humano o animal no es conectado a un dispositivo extracorpóreo para procesamiento de fluidos corporales con el método de la presente invención. En un modo discontinuo de operación, la presente invención emplea un fluido previamente obtenido de un humano o animal, que puede incluir, pero no se limita a plasma, fluido linfático, o fluido folicular. El fluido puede estar contenido dentro de un banco de sangre o en forma alternativa, retirado de un humano o animal antes de la aplicación del método. El fluido puede ser un fluido reproductivo o cualquier fluido utilizado en el proceso de inseminación artificial o fertilización *in vitro*. El fluido puede ser también uno no directamente obtenido de un humano o animal, sino más bien cualquier fluido que contenga un microorganismo potencialmente infeccioso, tal como fluido de cultivo celular. Las existencias de diversas cepas o clados de un virus y también las existencias de múltiples virus pueden ser utilizadas en el presente método para producir vacunas. En este modo de operación, este fluido se trata con el método de la presente invención para producir un nuevo fluido con niveles reducidos de lípido, que contiene al menos organismos infecciosos parcial o completamente deslipidados, o partículas virales modificadas. Una realización de este modo de la presente invención consiste en tratar las muestras de plasma previamente obtenidas a partir de otros animales o seres humanos y se almacenan en un banco de sangre para una transfusión posterior. Este es un método no autólogo de proporcionar protección a la vacuna. Estas muestras pueden ser tratadas con el método de la presente invención para tratar o prevenir una o más enfermedades infecciosas, tales como el VIH, hepatitis y / o citomegalovirus, de la muestra biológica.

La deslipidación de un organismo infeccioso puede conseguirse por diversos medios. Un método por lotes puede ser utilizado para fluidos biológicos frescos o almacenados, por ejemplo, plasma fresco congelado. En este caso se puede utilizar una variedad de disolventes orgánicos descritos o mezclas de los mismos para la inactivación viral. El tiempo de extracción depende del disolvente o de la mezcla de los mismos y del procedimiento de mezcla empleado.

Mediante el uso de los métodos de la presente invención, se reducen los niveles de lípido en los virus que contienen lípido en un fluido, y se puede administrar el fluido, por ejemplo, plasma deslipidado que contiene las partículas virales modificadas al paciente. Tal fluido contiene partículas virales modificadas con infectividad reducida, actúa como una vacuna y proporcionar protección en el paciente contra el virus o proporcionar un tratamiento en un paciente infectado por medio de la generación de una respuesta inmune y la disminución de la severidad de la enfermedad. Estas partículas virales modificadas inducen una respuesta inmune en el receptor a los epítomos expuestos sobre las partículas virales modificadas. Alternativamente, se pueden combinar las partículas virales modificadas con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente un adyuvante, y administrarse como una composición de vacuna a un ser humano o un animal para inducir una respuesta inmune en el receptor.

Producción de vacunas

En una realización, la partícula viral modificada, que está al menos parcialmente o sustancialmente deslipidada y tiene propiedades inmunogénicas, es opcionalmente combinada con un vehículo farmacéuticamente aceptable para hacer una composición que comprende una vacuna. En una realización preferida, la partícula viral modificada es retenida en el fluido biológico, tal como plasma, con niveles de lípido reducidos y se administra a un paciente como una vacuna. Esta composición de vacuna está opcionalmente combinada con un adyuvante o inmunestimulante y se administra a un animal o a un ser humano. Tanto las vacunas autólogas como no autólogas, incluyendo las vacunas de combinación, están dentro del alcance de la presente invención. Se debe entender que las composiciones de vacunas pueden contener más de un tipo de partícula viral modificada o uno de sus componentes, a fin de proporcionar protección contra más de una cepa de un virus o más de una enfermedad viral después de la vacunación. Tales combinaciones pueden ser seleccionadas de acuerdo con la inmunidad deseada. Por ejemplo, las combinaciones preferidas incluyen, pero no se limitan a VIH y hepatitis o influenza y hepatitis. Más específicamente, la vacuna puede comprender una pluralidad de partículas virales modificadas que tienen antígenos específicos del paciente y partículas virales modificadas que tienen antígenos no específicos del paciente o partículas virales en existencia que han sido sometidas al proceso de deslipidación de la presente invención. Las partículas virales modificadas restantes del organismo son retenidas en el fluido biológico deslipidado, y cuando son nuevamente introducidas en el animal o el humano, son presumiblemente ingeridas por fagocitos y generan una respuesta inmune.

Administración de la vacuna producida con el método de la presente invención

Cuando un organismo infeccioso deslipidado, por ejemplo uno en la forma de una partícula viral modificada con determinantes antigénicos expuestos, es administrado a un animal o a un humano, está opcionalmente combinado con un vehículo farmacéuticamente aceptable para producir una vacuna, y opcionalmente combinado con un adyuvante o un inmunestimulante como lo sabe alguien ordinariamente capacitado en el arte. Las formulaciones de vacunas se pueden presentar convenientemente en forma de dosis unitarias y pueden prepararse por medio de técnicas farmacéuticas convencionales conocidas por alguien ordinariamente capacitado en el arte. Tales técnicas incluyen poner en contacto en forma íntima y uniforme al ingrediente activo y los excipientes líquidos (vehículo(s) farmacéutico(s) o excipiente(s)). Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones estériles acuosas y no acuosas inyectables que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos y solutos que vuelven a la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas

y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

5 Las formulaciones pueden presentarse en dosis unitarias o en contenedores para dosis múltiples - por ejemplo, ampollas selladas y viales - y pueden ser almacenadas en forma liofilizada requiriendo solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. La vacuna puede ser almacenada a temperaturas desde aproximadamente 4° C hasta -100° C. La vacuna también puede ser almacenada en forma liofilizada a temperaturas diferentes, incluyendo temperatura ambiente. Las soluciones para inyección extemporánea y las suspensiones pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y tabletas comúnmente utilizados por alguien ordinariamente capacitado en el arte. La vacuna se puede esterilizar a través de medios convencionales conocidos por alguien ordinariamente capacitado en el arte. Dichos medios incluyen, pero no se limitan a filtración, radiación y calor. La vacuna de la presente invención también se puede combinar con agentes bacteriostáticos, tales como timerosal, para inhibir el crecimiento bacteriano.

15 Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis o unidad, o una fracción apropiada de la misma, del ingrediente administrado. Se debe entender que además de los ingredientes, particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes comúnmente utilizados por alguien ordinariamente capacitado en el arte.

20 La vacuna se puede administrar por diferentes rutas, tales como oral, incluyendo bucal y sublingual, rectal, parenteral, en aerosol, nasal, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intravenosa, intraperitoneal, y tópica. La vacuna se puede administrar también en las proximidades del tejido linfático, por ejemplo, mediante la administración a los ganglios linfáticos, tales como los ganglios linfáticos axilares, inguinales o cervicales.

25 La vacuna de la presente invención se pueden administrar en formas diferentes, incluyendo pero sin limitarse a soluciones, emulsiones y suspensiones, microesferas, partículas, micropartículas, nanopartículas y liposomas. Se espera que pueda requerirse aproximadamente de 1 a 5 dosis por régimen de inmunización. Alguien ordinariamente capacitado en las técnicas médicas o veterinarias para la administración de vacunas estará familiarizado con la cantidad de vacuna que se administra en una inyección inicial y en inyecciones de refuerzo, si se requiere, teniendo en consideración, por ejemplo, la edad y el tamaño de un paciente. Las inyecciones iniciales pueden variar aproximadamente desde menos de 1 ng hasta 1 gramo con base en la proteína viral total. Un rango no limitante puede ser de 1 ml hasta 10 ml. El volumen de administración puede variar dependiendo de la vía de administración.

Plan de vacunación

35 Las vacunas de la presente invención se puede administrar antes, durante o después de una infección. La vacuna de la presente invención puede ser administrada a humanos o animales. En una realización, la carga viral (uno o más virus) de un humano o un animal puede ser reducida por medio del tratamiento deslipidación del plasma. El mismo individuo puede recibir una vacuna dirigida a uno o más virus, estimulando así al sistema inmune a luchar contra el virus que permanece en el individuo. El tiempo para la administración de la vacuna antes de la infección inicial es conocido por alguien ordinariamente capacitado en el arte. Sin embargo, la vacuna se puede administrar también después de la infección inicial para mejorar el progreso de la enfermedad o para tratar la enfermedad.

Adyuvantes

45 Una variedad de adyuvantes conocidos por alguien ordinariamente capacitado en la técnica puede ser administrada en conjunto con las partículas virales modificadas en la composición de la vacuna. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a los siguientes: polímeros, copolímeros, tales como copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, incluyendo copolímeros de bloque; polímero P1005; monómero ISA72; adyuvante completo de Freund (para animales); adyuvante incompleto de Freund; monooleato de sorbitán; escualeno; adyuvante CRL-8300; alumbre; QS 21, dipéptido muramilo; trehalosa; extractos bacterianos, incluyendo extractos micobacterianos; endotoxinas desintoxicadas; lípidos de membrana, mezclas de agua en aceite, mezclas de agua en aceite en agua o sus combinaciones.

Fluidos de suspensión y portadores

55 Una variedad de fluidos de suspensión o portadores conocidos por alguien ordinariamente en la técnica puede ser empleada para suspender la composición de la vacuna. Dichos fluidos incluyen, sin limitación: agua estéril, solución salina, amortiguador, o fluidos complejos derivados de medio de crecimiento o de otros fluidos biológicos. Conservantes, estabilizantes y antibióticos conocidos por alguien ordinariamente capacitado en la técnica pueden emplearse en la composición de la vacuna.

60 Los siguientes ejemplos experimentales son ilustrativos para demostrar que se produjo un proceso deslipidación de la partícula viral y, en particular, que la partícula viral fue modificada y se observó que exhibe una respuesta inmunogénica positiva en las especies a partir de las cuales se deriva. Se apreciará que otras realizaciones y usos serán evidentes para aquellos ordinariamente capacitados en la técnica y que la invención no se limita a estos

ejemplos específicos ilustrativos o realizaciones preferidas.

Ejemplo 1

5 A. La deslipidación de suero produce un virus de la hepatitis B de pato (DHBV) que tiene infectividad reducida

Se utilizó un reservorio de suero de pato estándar (Camden), que contiene dosis con un ID₅₀ de 10⁶ de DHBV. ID₅₀ es conocido por alguien ordinariamente capacitado en el arte como la dosis infecciosa (ID) efectiva para infectar 50% de los animales tratados con la dosis. Veintiún patitos fueron obtenidos a partir de un rebaño negativo para DHBV en el día de la eclosión. Estos patitos fueron analizados cuando fueron adquiridos y han demostrado ser negativos para ADN del DHBV por medio de hibridación de transferencias puntuales (dot-blot).

El sistema disolvente orgánico se mezcló en la proporción de 40 partes butanol con 60 partes de éter diisopropílico. El sistema disolvente orgánico mezclado (4 ml) se mezcló con el reservorio de suero estándar (2 ml) y agitó suavemente por rotación durante 1 hora a temperatura ambiente. Se centrifugó la mezcla a 400 x g durante 10 minutos y se removió la fase acuosa inferior (que contiene el plasma) a temperatura ambiente. Se mezcló luego la fase acuosa con un volumen igual de éter dietílico y se centrifugó como antes para remover cualquier mezcla restante de lípido / disolvente. Se removió nuevamente la fase acuosa y mezcló con un volumen igual de éter dietílico y se centrifugó nuevamente. Se removió la fase acuosa y retiró cualquier éter dietílico residual por el respiradero de una campana extractora a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. El plasma deslipidado, con o sin partículas virales, se almacenó a -20° C.

Se diluyeron los sueros de pato de control positivo y negativo en solución salina amortiguada de fosfato (PBS). Los controles positivos: se mezclaron 2 ml del suero reunido que contenía dosis con un ID₅₀ de 10⁶ de DHBV con 4 ml de PBS. Los controles negativos: se mezclaron 2 ml de suero reunido negativo para DHBV con 4 ml de PBS. Se analizó la infectividad residual mediante la inoculación de 100 µl ya sea de la muestra del ensayo (n = 7), el control negativo (n = 7) o el control positivo (n = 7) en las cavidades peritoneales de patos de un día de edad. Se corrieron los controles con suero negativo para DHBV tratado con disolventes orgánicos y se mezcló posteriormente con PBS e inyectó en los patos receptores.

Uno de los patos que sirvió de control positivo murió entre los 4 y 6 días de edad y fue excluido de análisis adicionales. Otros 3 patos de control positivo murieron entre los 9 y 10 días de edad, y dos de tratamiento y un control negativo murieron el día 11. Se decidió dar por terminado el experimento. Los patitos restantes fueron sacrificados en el día 12 con pentobarbitona sódica, en forma intravenosa, y se removieron sus hígados para análisis del ADN del DHBV como lo describe Deva et al (J. Hospital Infection 33: 119 - 130,1996). Los siete patos de control negativo permanecieron negativos para el DHBV. Los hígados de los seis patos de control positivo fueron positivos para el DHBV. Los siete patos de prueba permanecieron negativos para el ADN del DHBV en sus hígados.

La deslipidación del suero utilizando el sistema disolvente anterior resultó en un DHBV con infectividad reducida. Ninguno de los patitos que recibió suero tratado se infectó. Aunque el experimento tenía que ser terminado en el día 12 en lugar del día 14, los patos restantes de control positivo fueron positivos para el DHBV (3/3 fueron positivos para el DHBV para el día 10). Esto sugiere que transcurrió tiempo suficiente para que los patos tratados fueran positivos para el DHBV en el hígado y que el final prematuro del experimento no influyó en los resultados.

45 B. Suero positivo para el DHBV deslipidado como vacuna para prevenir la infección por el DHBV

Se examinó la eficacia del procedimiento de deslipidación para proporcionar una vacuna "autóloga" específica del paciente contra el Virus de la Hepatitis B del Pato (DHBV). Se obtuvieron aproximadamente 16 patitos cruzados de Pekín a partir de una bandada de patitos negativos para el DHBV el día de la eclosión. Los patitos fueron analizados y se determinó que eran negativos para el DHBV por medio del análisis del ADN del DHBV utilizando hibridación dot-blot. Los patos se dividieron en los siguientes tres grupos:

Tabla 1

	# de Patos	Vacuna Administrada	Resultados
GRUPO 1	6	Vacuna de Prueba	5/6 patos permanecieron negativos para el DHBV después de la exposición
GRUPO 2	4	Vacuna de imitación [DHBV inactivado con Glutaraldehído]	4/4 patos se volvieron positivos para el DHBV después de la exposición

55

(continuación)

	# de Patos	Vacuna Administrada	Resultados
GRUPO 3 (Control)	6	Vacuna ficticia [Solución Salina Amortiguada con Fosfato (PBS)]	6/6 patos se volvieron positivos para el DHBV después de la exposición

5 1. Inactivación con glutaraldehído

La inactivación con glutaraldehído se logró como es conocido por aquellos ordinariamente capacitados en la técnica por medio de la fijación con una solución diluida de glutaraldehído en una relación aproximada de 1:250. El glutaraldehído es un agente de entrecruzamiento bien conocido.

10 2. Procedimiento de deslipidación

15 Se empleó un sistema disolvente orgánico para realizar la deslipidación del suero. El sistema disolvente consistió en 40% de butanol (grado reactivo analítico) y 60% de éter diisopropílico y se mezcló con el suero en una proporción de 2:1. En consecuencia, se mezclaron 4 ml del disolvente orgánico con 2 ml del suero y se agitó por rotación durante 1 hora. Esta mezcla se centrifugó aproximadamente a 400 x g durante 10 minutos seguido por la remoción de la fase acuosa. Se mezcló luego la fase acuosa con un volumen igual de éter dietílico y se centrifugó a 400 x g durante 10 minutos. A continuación, se removió la fase acuosa y se mezcló con un volumen igual de éter dietílico y se agitó el tubo en un agitador rotacional tipo noria a 30 rpm durante aproximadamente 1 hora, y se centrifugó a 400 x g durante 10 minutos. Se removió la fase acuosa y se retiró el éter dietílico residual por evaporación en una campana extractora durante aproximadamente 10 a 30 minutos. Quedó el suero tratado después de la remoción del éter dietílico y se utilizó para producir la vacuna. El control del procedimiento de deslipidación implicó someter el suero negativo para el DHBV al mismo procedimiento de deslipidación que el suero positivo para el DHBV.

25 3. Producción de la vacuna

Tabla 2

Tipo de vacuna	Primera dosis	Segunda dosis	Tercera dosis
	(se inyectaron con 200 µl de la respectiva vacuna en la cavidad peritoneal el día 8 después de la eclosión)	(se inyectaron con 300 µl de la respectiva vacuna en forma intramuscular el día 16 después de la eclosión)	(se inyectaron con 300 µl de la respectiva vacuna en forma intramuscular el día 22 después de la eclosión)
De Prueba	Se mezcló una alícuota de 40 µl del suero deslipidado con 1960 µl de solución salina amortiguada con fosfato (PBS)	Se mezcló una alícuota de 40 µl del suero deslipidado con 1960 µl de PBS y luego se emulsionó en 1000 µl de adyuvante incompleto de Freund	Se mezcló una alícuota de 200 µl del suero deslipidado con 1800 µl de PBS y luego se emulsionó en 1000 µl de adyuvante incompleto de Freund
Imitación (control del suero con DHBV)	Se mezcló una alícuota de 200 µl del reservorio de suero # 4 positiva para el DHBV (20.4.99) con 300 µl de PBS y 100 µl de una solución de glutaraldehído al 2% (Aidal Plus de Whiteley Chemicals) y se incubó durante 10 minutos para inactivar el DHBV. Se añadió una alícuota de 40 µl de la mezcla inactivada de suero/PBS a 1960 µl de PBS.	Se mezcló una alícuota de 200 µl del reservorio de suero # 4 positiva para el DHBV (20.4.99) con 300 µl de PBS y 100 µl de Aidal Plus (Whiteley Chemicals) y se incubó durante 10 minutos para inactivar el DHBV. Se añadió una alícuota de 40 µl de la mezcla inactivada de suero/PBS a 1960 µl de PBS y se emulsionó en 1000 µl de adyuvante incompleto de Freund.	Se mezcló una alícuota de 200 µl del reservorio de suero # 4 positiva para el DHBV (20.4.99) con 300 µl de PBS y 100 µl de Aidal Plus (Whiteley Chemicals) y se incubó durante 10 minutos para inactivar el DHBV. Se añadió una alícuota de 40 µl de la mezcla inactivada de suero/PBS a 1960 µl de PBS y se emulsionó en 1000 µl de adyuvante incompleto de Freund.

(continuación)

Ficticia (control negativo para el DHBV)	PBS	Se emulsionó una alícuota de 2000 µl de PBS en 1000 µl de adyuvante incompleto de Freund	Se emulsionó una alícuota de 2000 µl de PBS en 1000 µl de adyuvante incompleto de Freund
--	-----	--	--

4. Procedimiento Experimental

Los patos fueron expuestos con 1000 µl de suero positivo para el DHBV (del reservorio de suero 20.1. 97) el día 29, después de la eclosión. Se demostró que el reservorio de suero 20.1.97 tenía $1,8 \times 10^{10}$ equivalentes de genoma (gev) / ml mediante hibridación dot-blot. Un equivalente del genoma (gev) es aproximadamente una partícula viral. Se hizo una sangría a los patos antes de la vacunación completa los días 1 y 10, antes de la exposición los días 17 y 23, y después de la exposición los días 37, 43 y 52. Su suero se analizó para el ADN del DHBV por medio de hibridación dot-blot como lo describen Deva et al. (1995). Los patos fueron sacrificados en el día 58 y se retiraron sus hígados, se extrajo el ADN y se analizaron por la presencia del DHBV por medio de hibridación dot-blot como lo describen Deva et al. (1995).

5. Análisis de resultados

- a. Patos de prueba. Cinco de los seis patos de prueba vacunados con la vacuna de prueba siguieron siendo negativos para el ADN del DHBV en el suero y el hígado después de la exposición. Un pato de prueba de volvió positivo para el DHBV después de la exposición.
- b. Patos vacunados con un imitación. Todos los 4 patos vacunados con suero inactivado con glutaraldehído se volvieron positivos para el DHBV después de la exposición con el DHBV.
- c. Patos vacunados en forma ficticia. 6 de los 6 patos de control negativo vacunados en forma ficticia se volvieron positivos para el DHBV después de la exposición.

Se utilizó el análisis de chi-cuadrado para comparar las diferencias entre los tratamientos. Un número significativamente mayor de los patos de control (vacunados en forma ficticia) se convirtió en positivo para el DHBV después de la exposición que los patos vacunados con suero deslipidado ($p < 0,05$).

La vacunación de los patitos con suero positivo para el DHBV deslipidado utilizando el protocolo anterior dio lugar a la prevención de la infección por el DHBV después de la exposición al suero positivo para el DHBV en 5 de los 6 patitos. Esto sugiere que la vacuna con suero deslipidado es capaz de inducir una respuesta inmunogénica positiva en patos vacunados. Se cree además que los antígenos específicos del paciente expuestos al proceso de deslipidación que no fueron previamente expuestos y / o provocaron un cambio estructural en la estructura de la partícula viral para permitir la respuesta inmunogénica positiva. En comparación, 6 de los 6 patos vacunados en forma ficticia y 4 de los 4 patos vacunados con placebo se volvieron positivos para el DHBV después de la vacunación sugiriendo que no hay inducción de la inmunidad en estos patos debido a la falta de respuesta inmune.

Ejemplo 2

A. Deslipidación del pestivirus del ganado (virus de la diarrea viral bovina, VDVB), como un modelo para la hepatitis C

Se utilizó un aislado estándar del pestivirus del ganado (VDVB) en estos experimentos. Este aislado, del virus DVB "Numerella", fue aislado en 1987 a partir de una muestra para diagnóstico presentado a partir de un caso típico de 'Enfermedad de la Mucosa' en una granja en el distrito de Bega de Nueva Gales del Sur (NGS), Australia. Este virus no es citopatogénico, y reacciona con todos los 12 de un panel de anticuerpos monoclonales surgidos en el Instituto Agrícola Elizabeth Macarthur (EMAI), NGS, Australia, como reactivos de tipificación. Por lo tanto, este virus representa una 'cepa estándar' de virus DVB australiana.

El virus Numerella fue cultivado en células MDBK de bovino que se probaron libres de agentes virales adventicios, incluyendo el VDVB. El medio utilizado para el crecimiento viral contenía 10% de suero de bovino adulto derivado de ganado del EMAI, todo lo cual fue probado libre del virus VDVB y de anticuerpos del VDVB. Este suero suplementado ha sido empleado durante años para excluir la posibilidad de contaminación adventicia del VDVB de los sistemas de prueba, un defecto común en los laboratorios todo el mundo que no toman precauciones para asegurarse de que el virus de prueba es el único en el sistema de cultivo. El uso de estos sistemas de cultivo ensayados garantizó una replicación de alto nivel del virus y un alto rendimiento de virus infeccioso. La titulación del virus final produjo después de 5 días de cultivo en las células MDBK mostró un título de $10^{6,8}$ partículas virales infecciosas por ml de medio de cultivo clarificado (centrifugado).

1. Tratamiento del VDVB infeccioso

Se recolectaron 100 ml de sobrenadante de cultivo de tejidos, que contenía $10^{6.8}$ partículas virales / ml, a partir de un matraz de cultivo de tejido de 150 cm^2 . El sobrenadante fue clarificado por centrifugación (restos de células precipitados a 3000 rpm, 10 min, 4°C) y se dejaron de lado 10 ml como control positivo para inoculación de los animales (virus no tratado). Los restantes 90 ml, que contenían $10^{7.75}$ virus infecciosos, fueron tratados usando el siguiente protocolo: se añadieron 180 ml de una mezcla disolvente de butanol:éter diisopropílico (DIPE) (2:1) a un matraz cónico de 500 ml y se mezcló por medio de agitación tipo remolino. La mezcla fue luego agitada durante 60 min a 30 rpm a temperatura ambiente en un agitador orbital. Después se centrifugó durante 10 min a $400 \times g$ a 4°C , después de lo cual se removió y descartó la fase del disolvente orgánico. En etapas posteriores, se removió la capa inferior (fase acuosa) desde abajo de la fase orgánica, mejorando considerablemente los rendimientos.

La fase acuosa, después del tratamiento con butanol:DIPE, fue lavada cuatro veces con un volumen igual de éter dietílico fresco (DEE) para remover todas las trazas contaminantes de butanol. Después de cada lavado, se agitaron con agitación tipo remolino los contenidos del matraz para asegurar una mezcla uniforme tanto de la fase acuosa como disolvente antes de la centrifugación como anteriormente ($400 \times g$, 10 min, 4°C). Después de cuatro lavados, se colocó la fase acuosa en un vaso de precipitados estéril cubierto con un tejido estéril fijado a la parte superior del vaso de precipitados con una banda de caucho para evitar la contaminación y se lo colocó en una campana extractora en funcionamiento continuo durante la noche (16 h) para remover todo el residuo volátil de éter restante de la preparación viral inactivada. El cultivo posterior del material tratado no mostró ninguna contaminación. La preparación viral tratada se almacenó entonces a 4°C bajo condiciones estériles hasta la inoculación en el cultivo de tejidos o en animales para analizar cualquier virus infeccioso restante.

2. Análisis de la preparación tratada del VDVB.

a. Inoculación del cultivo de tejidos

Se mezclaron dos mililitros de la preparación viral tratada con disolvente, que se espera que contenga alrededor de $10^{7.1}$ equivalentes virales, con 8 ml del medio de cultivo de tejidos, Medio Mínimo de Eagle (MEM) que contenía 10% de suero de bovino adulto libre de contaminantes y adsorbido durante 60 min sobre una monocapa de células MDBK en un matraz de cultivo de tejidos de 25 cm^2 . Como control positivo, se adsorbieron en forma similar 2 ml de virus infeccioso no tratado o sustancialmente tratado que contenía lípido (conteniendo también aproximadamente $10^{7.1}$ equivalentes virales) sobre células MDBK en un matraz de cultivo de tejidos de 25 cm^2 . Después de 60 min, el sobrenadante fue retirado de ambos matraces y sustituido con medio de cultivo normal (+10% de ABS). Las células fueron luego cultivadas durante 5 días bajo condiciones estándar antes de que las células MDBK fueran fijadas y teñidas utilizando un protocolo estándar de inmunoperoxidasa con una mezcla de 6 anticuerpos monoclonales específicos del VDVB (panel EMAI, reactivo con 2 diferentes proteínas virales DVB).

No hubo células infectadas en la monocapa de células MDBK que se inocularon con el virus tratado con disolvente orgánico. En contraste, aproximadamente el 90% de las células en el matraz de control (que se inoculó con el VDVB no inactivado) fueron positivas para el virus, como se muestra por la tinción específica pesada con inmunoperoxidasa. Estos resultados mostraron que, en condiciones de análisis *in vitro*, no quedó virus infeccioso en la preparación del VDVB tratado, al menos parcialmente deslipidado.

b. Inoculación de animales

Un análisis *in vivo* aún más sensible es para inocular ganado sin tratar (negativo para anticuerpos) con una preparación de virus al menos parcialmente deslipidada. Tan poco como una partícula viral infecciosa inyecta por vía subcutánea en dichos animales se considera que es una dosis infecciosa para una vaca, dado que la entrada en las células y la replicación del virus es extremadamente eficiente para el VDVB. Un grupo de 10 novillos negativos para anticuerpos (10 - 12 meses de edad) fueron asignados aleatoriamente a 3 grupos.

El primer grupo de 6 novillos se utilizó para analizar si el VDVB había reducido la infectividad. Se utilizó en este ejemplo la misma preparación al menos parcialmente deslipidada del VDVB descrita anteriormente. Se inocularon dos novillos con una vacuna que tenía partículas virales al menos parcialmente deslipidadas para actuar como un control positivo para el grupo de la vacuna. Estos dos animales de control positivo fueron tratados bajo condiciones separadas de cuarentena para evitar que infectaran a otros animales cuando se desarrollaron una viremia transitoria después de la infección (normalmente a los 4 - 7 días después de recibir el virus VDVB vivo). Los dos novillos restantes actuaron como animales "centinela" negativos para asegurarse de que no habría transmisión de pestivirus de origen natural en el grupo vacunado de animales. Los niveles de anticuerpo se midieron en todos los 10 animales utilizando un método de ELISA competitivo validado desarrollado en EMAI. Este ensayo ha sido validado independientemente por CSL Ltd. y es comercializado por IDEXX Escandinavia en Europa.

Los seis animales del primer grupo recibieron cada uno una inyección subcutánea de 4,5 ml de la preparación del VDVB al menos parcialmente deslipidado, que se incorpora en un adyuvante comercial. Puesto que cada ml de la preparación al menos parcialmente deslipidada contenía $10^{6.8}$ equivalentes virales, la carga viral total antes del proceso de deslipidación era $10^{7.4}$ dosis infecciosas de cultivo de tejido (TCID)₅₀. Los animales de control positivo

recibieron cada uno 5 ml de la preparación no deslipidada, es decir, $10^{7.5}$ TCID₅₀ inyectadas en forma subcutánea en la misma forma que para el primer grupo. A los dos animales 'centinela' restantes no se les dio ningún antígeno viral, habiendo pastoreado con el primer grupo de animales durante todo el ensayo para asegurar que no habría actividad natural de pestivirus en el grupo, mientras se llevaba a cabo el ensayo.

5 No hubo desarrollo de anticuerpos en ninguno de los novillos vacunados que recibió la preparación del virus DVB al menos parcialmente deslipidado hasta recibir una segunda dosis de la vacuna. Así, a las 2 y 4 semanas después de una dosis única, ninguno de los 6 novillos seroconvertidos mostrando que no había quedado virus infeccioso en un volumen total de 27 ml de la preparación de virus al menos parcialmente deslipidada. Este es el equivalente de una
10 inactivación total de $10^{8.2}$ TCID₅₀. Por el contrario, hubieron niveles altos tanto de anticuerpos anti-E2 (anticuerpos de neutralización) como de los anticuerpos anti-NS3, tanto a las 2 como a las 4 semanas después de la inoculación en los dos novillos que recibieron 5 ml cada uno de la preparación viral antes de la deslipidación. Esto confirmó la naturaleza infecciosa del virus antes de la deslipidación. Estos resultados *in vivo* confirman los hallazgos del ensayo
15 *in vitro* del cultivo de tejidos. Los dos animales 'centinela' permanecieron seronegativos todo el tiempo, mostrando que la manada se mantuvo libre de infecciones por pestivirus naturales.

El panel de anticuerpos monoclonales utilizado detectó anticuerpos huésped dirigidos contra la principal glicoproteína de la envoltura (E2), que es una glicoproteína incorporada en la envoltura lipídica del virus intacto. Los sistemas del ensayo también detectaron anticuerpos dirigidos contra la proteína no estructural, NS3, que se elabora
20 dentro de las células infectadas por el virus. Esta proteína tiene importantes funciones de regulación en la replicación viral y no está presente dentro del virus infeccioso. No hubo evidencia en el ganado vacunado de que estuviera presente virus infeccioso, lo que indica que todas las partículas virales infecciosas habían sido destruidas. Todos los pestivirus son virus de ARN. Por lo tanto, no había presente ADN viral en la preparación deslipidada. Estos resultados demuestran la eficacia del presente método para el virus al menos parcialmente deslipidado de tal
25 manera que sustancialmente no se encontró virus infeccioso en los animales que recibieron el virus deslipidado.

B. Preparación del VDVB deslipidado como vacuna en novillos

30 Todos los seis novillos que habían recibido una dosis inicial de 4,5 ml de la preparación del VDVB al menos parcialmente deslipidado descrita en la Sección A anterior fueron nuevamente inyectados por vía subcutánea con una dosis similar a las 4 semanas después de la primera dosis de cebado. En este momento no hubo respuestas de anticuerpos después de la dosis inicial. Es normal que un animal reaccione después de la segunda dosis. Se observaron fuertes respuestas inmunes secundarias para los niveles de anticuerpos anti-E2 (equivalentes a anticuerpos SNT neutralizantes del suero) en 3 de los 6 novillos a las 2 semanas después de la segunda dosis del
35 virus al menos parcialmente deslipidado. Esta respuesta fue de más del 70% de inhibición en un ELISA competitivo. Los otros 3 animales mostraron respuestas débiles de anticuerpo (inhibición del 23 - 31%).

En contraste con las respuestas del anticuerpo anti-E2, sólo un animal desarrolló una fuerte respuesta del anticuerpo anti-NS3 (93% de inhibición) a las 2 semanas después de la segunda dosis del VDVB al menos parcialmente deslipidado. Un segundo animal tenía una débil respuesta anti-NS3 (29% de inhibición) y cuatro animales no mostraron anticuerpos después de la administración de 2 dosis. Esto no era algo inesperado ya que se habían observado previamente respuestas similares después de la administración de vacunas del VDVB al menos
40 parcialmente deslipidado. Los niveles de anticuerpos en los novillos después de 2 dosis de la preparación del VDVB al menos parcialmente deslipidado preparación VDVB demostraron su potencial como vacuna ya que pudieron medirse niveles de anticuerpo anti-E2 en todos los 6 novillos vacunados a las 2 semanas después de la segunda
45 dosis.

Ejemplo 3

50 Uso del SIV deslipidado para inducir o aumentar las respuestas de memoria de la célula T CD4⁺ y humoral específica del SIV - un modelo para una nueva estrategia de auto-vacunación contra una infección lentiviral

Los siguientes estudios se centraron en el equivalente simio del VIH humano, llamado SIV. El propósito era utilizar SIVmac251 deslipidado (un aislado altamente patógeno no clonado del SIV) para llevar a cabo estudios para
55 determinar la inmunogenicidad relativa del virus deslipidado en ratones. Se determinó la secuencia completa de nucleótidos de un clon infeccioso del virus de inmunodeficiencia simia de macacos, SIVmac239. El virus producido a partir de este clon molecular causante del SIDA en los monos Rhesus en un marco de tiempo adecuado para la investigación de laboratorio. El genoma proviral que incluye ambas repeticiones terminales largas es de 10.279 pares de bases de longitud y contiene marcos de lectura abiertos para gag, pol, vif, vpr, vpx, tat, rev, y env. El gen nef contiene una detención prematura en el marco después del codón 92. A nivel de nucleótidos, SIVmac239 está estrechamente relacionado con SIVmac251 (98%) y SIVmac142 (96%). (Regier D. A., Desrosiers Annual Review
60 Immunology. 1990; 8: 557 - 78).

65 Se realizaron experimentos para determinar la dosis mínima del virus de inmunodeficiencia simia (VIS) deslipidado que produciría un refuerzo fácilmente reconocible de la respuesta inmune humoral y/o celular específica del virus en

ratones Balb/c previamente cebados. Todos los experimentos se llevaron a cabo en una instalación BSL3.

5 La inmunogenicidad de la preparación del virus deslipidado se comparó con una alícuota del mismo virus en su forma nativa. La calidad (título de anticuerpo, la especificidad del epítipo conformacional y lineal del anticuerpo, el contenido de isotipo del anticuerpo y la función del anticuerpo) y cantidad de anticuerpo inducido por inmunización de ratones con cantidades equivalentes de proteína de la preparación viral deslipidada y no deslipidada se determinaron como se describe más adelante. La proteína total de una alícuota del virus tipo silvestre y la proteína total recuperada después de deslipidación de la misma alícuota del virus se determinaron a través de un ensayo estándar cuantitativo de proteína (Biorad, kit de ensayo BCA, Rockford, Illinois). El perfil de proteína total se determinó mediante análisis SDS-PAGE del virus de tipo silvestre y la preparación del virus deslipidado y la preservación relativa del epítipo se comprobó mediante la comparación de transferencias tipo Western del virus de tipo silvestre con el virus deslipidado.

15 Se analizaron cantidades equivalentes de proteína del virus de tipo silvestre tratado químicamente y el virus deslipidado para determinar su capacidad para reforzar la respuesta inmune específica del virus en grupos de ratones. Los sueros de estos ratones inmunizados se analizaron por ELISA y transferencias tipo Western para determinar la reactividad contra el virus de tipo silvestre nativo y para comparación de la preparación del virus deslipidado. Se analizaron células del bazo por su capacidad de mejorar la respuesta inmune específica de env y de gag del virus SIV CD4 y CD8 como se indica a continuación. Se llevaron a cabo análisis estadísticos estándar para el análisis de los datos.

25 Se adquirieron ratones Balb/c hembra sanos de cuatro a seis semanas de edad, de los laboratorios Jackson, Bar Harbor, Me y alojados en las instalaciones para albergar ratones BSL2/3 en la Universidad de Emory. Se inmunizaron veinte ratones Balb/c por vía subcutánea cada con 25 µg de proteína del SIVmac251 inactivado con 2,2-ditiopiridina incorporados en un volumen igual de adyuvante de Freund incompleto.

30 Se deslipidó una cantidad suficiente de SIVmac251 para proporcionar la cantidad necesaria para reforzar estos ratones de acuerdo con una programación. La deslipidación consistió en la incubación de SIVmac251 con 10% de DIPE en solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Se preparó 1,0 ml de una solución DIPE al 10% en PBS y se mezcló en un agitador tipo vórtice, hasta que se tornó turbia.

35 La preparación de virus: se utilizó un tubo de 1 ml con el SIVmac251 de Advanced Biotechnologies como inóculo (1 mg/ml del Virus Purificado en Gradiente de Sacarosa). El proveedor informó de un título de $10^{8.7}$ con proteína total de 1,074 mg / mL (método de proteína BCA de Pierce) y un recuento de partículas virales de 6.95^{10} / ml (EM). Se confirmó que el virus tenía un título de $10^{7.0}$ utilizando CEMx174, la primera vez como un ensayo rápido, y la segunda vez en cultivos / dilución por cuadruplicado. Una medición de p27 en esta preparación reveló un valor de 106 µg / ml. A continuación, se introdujeron 25 µl de la existencia viral no diluida en un tubo Eppendorf 1 de polipropileno con tapa con septa clara de 0,6 ml. Luego, se añadieron 2,5 µl de solución DIPE al 10% en el tubo Eppendorf que contenía el virus y se agitó con agitación tipo vórtice durante 15 segundos. El tubo se centrifugó (utilizando una centrífuga Eppendorf 5810R) a temperatura ambiente a 1000 x g durante 2 minutos. No se removió el volumen de disolvente. Se retiró el disolvente por centrifugación al vacío (Concentrador Speedvac Modelo SVC200H) a 2000 rpm sin calor durante 30 minutos. Se ajustó el volumen en el tubo hasta 25 µl con PBS. Se midió la proteína total recuperada utilizando un protocolo BCA de Pierce. Se emplearon geles (SDS-PAGE al 12%) para la recuperación de proteína específica (proteína env, proteína pol, proteína gp41, p27 y gag) y se tiñeron con Azul de Coomassie y proporcionaron resultados semicuantitativos utilizando OD. Se corrieron transferencias tipo Western utilizando el suero de monos infectados con SIV para medir la proteína de la envoltura, gp66, gp41, p27, gag, y p6 gag. La infectividad viral de la preparación se determinó utilizando un ensayo de luciferasa y células CEM-174. El título del virus fue de $10^{4.5}$, una reducción de 2,5 log de aquella medida en las existencias no deslipidadas. Esta preparación del SIV deslipidado parece retener más del 90% de los constituyentes de la proteína principal de SIVmac251 tales como las proteínas gag y env.

40 A continuación, se determinó la inmunogenicidad de la preparación viral modificada en los veinte ratones Balb / c hembra adultos descritos anteriormente que fueron inmunizados cada uno por vía subcutánea con 25 µg de proteína de SIVmac251 inactivado con 2,2-ditiopiridina. En el día 14, los grupos 3 - 6 fueron reforzados con 10 µg hasta .01 µg (con base en la proteína total de las existencias) del virus deslipidado en 0,5 ml de solución salina normal. El contenido real estimado de proteína viral era igual a 1/10 de la proteína total con base en la relación de proteína total / proteína p27 en existencia. Los ratones fueron inyectados con la composición de la vacuna deslipidada de la siguiente manera:

60

Tabla 3

Grupos (cada uno con 4 ratones)	Inmunización inicial subcutánea con SIVmac251 inactivado con 2,2-ditiopiridina	Día 14 - Inyecciones de refuerzo intravenosas
Grupo 1 - control	No inmunizado	Administradas con solución salina sin virus deslipidado
Grupo 2	Inmunizado	No se administraron
Grupo 3	Inmunizado	0,5 ml de solución salina + 10 µg de virus deslipidado
Grupo 4	Inmunizado	0,5 ml de solución salina + 1,0 µg de virus deslipidado
Grupo 5	Inmunizado	0,5 ml de solución salina + 0,1 µg de virus deslipidado
Grupo 6	Inmunizado	0,5 ml de solución salina + 0,01 µg de virus deslipidado

5 Cuatro días después de la inyección de refuerzo, los ratones fueron anestesiados y se recogió sangre a través de una punción retro-orbital y de una punción intracardiaca. Se recolectaron aproximadamente 0,5 ml de sangre de cada ratón, principalmente de la punción intracardiaca. Se permitió que la sangre se coagulara a temperatura ambiente. Se extrajo el bazo de cada ratón en forma aséptica y se los transportó al laboratorio en bolsas contenedoras dobles. La sangre coagulada de cada ratón se centrifugó a aproximadamente 450 x g a temperatura ambiente, y se recogió el suero del tubo, se lo transfirió a un tubo estéril, y almacenó a -70° C hasta su uso. Se llevó a cabo un ELISA para determinar los títulos de anticuerpo contra el SIV para cada muestra de suero.

10 Protocolo del ELISA para el SIV

15 Las existencias de suero positivo y negativo y los fluidos que iban a ser analizados se congelaron en alícuotas para ser utilizados en cada placa para estandarizar cada procedimiento.

20 Se lavaron las Easy-Plates recubiertas de Corning con 100 µl por pozo de poli-1-lisina a una concentración de 10 µg por ml de PBS, pH 7,2 - 7,4. Se recubrieron las placas y se incubaron durante la noche a 4° C. Varias placas fueron recubiertas a la vez y almacenadas para uso posterior. A continuación, se removió el exceso de polilisina y se secó la placa durante unos pocos minutos. Se añadieron aproximadamente 100 µl de Triton-X al 2% a 100 µl de las existencias de SIVmac251 de ABI. Las muestras se asentaron durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 50 µl del amortiguador de recubrimiento de pH 9.6. Luego, se añadieron 100 µl del antígeno viral a cada pozo de 5 placas, que fueron cubiertos e incubados a 4°C durante la noche.

25 Después de la incubación durante la noche, se lavaron los pozos 3 veces con PBS-T. Los pozos recibieron luego 200 µl por pozo de leche descremada en polvo al 2% en PBS durante una hora a temperatura ambiente para bloquear enlaces no específicos. Se removió el exceso de fluido. Se añadieron aproximadamente 100 µl de suero de ensayo o de control diluido a razón de 1/100 en RPMI 1640 al 10% o PBS con 10% de suero de ternera a los pozos por duplicado y se incubó durante 2 horas a 37° C. Se lavaron los pozos 4 veces con PBS-T. A continuación, se añadieron 100 µl de IgG antirratón fosfatasa alcalina Southern Biotech (de Fisher) (diluido 1/800 en medio o en PBS con 10% de suero de ternera) y se incubó durante 1 hora a 37° C. Se lavaron 4 veces los pozos con PBS-T.

30 Se utilizó el kit del Sustrato de Fosfatasa Alcalina de BIORAD para desarrollar un producto de reacción. Se añadió una tableta de sustrato por cada 5 ml de amortiguador 1X y se mezcló. A continuación, se añadieron 100 µl por pozo y se evaluó en intervalos de aproximadamente 5, 10, 15, 30 min y luego en intervalos de 1 hora para el desarrollo del color.

35 Se obtuvieron lecturas del blanco de los controles de los medios cuando el control positivo estaba por encima de 1,500 y el control negativo era de 0,100 a 0,200 para el suero. Los resultados se registraron a continuación y se calcularon los promedios y las desviaciones estándar del control negativo, del control positivo y de las muestras experimentales. El valor de corte negativo fue el promedio del control negativo más 0,150.

40 Los resultados de inmunogenicidad

Se examinó la inmunogenicidad de la preparación del virus SIV deslipidado en ratones con un ensayo de ELISA. La densidad óptica media (O. D.) se examinó a 405 nm con diferentes diluciones de suero. La Tabla 4 proporciona los resultados del ensayo de ELISA sobre muestras de suero.

5

Tabla 4

Dilución del suero	Sin refuerzo	Refuerzo de 10 µg	Refuerzo de 1 µg	Refuerzo de 0,1 µg	Refuerzo de 0,01 µg
1/100	2,541	3,663	3,289	2,846	2,627
1/500	1,035	2,86	2,055	1,458	1,257
1/2500	0,449	1,239	0,855	0,601	0,445
1/12500	0,194	0,463	0,304	0,229	0,181
1/62500	0,127	0,151	0,153	0,129	0,123
1/312500	0,11	0,116	0,108	0,108	0,107

Análisis de las respuestas de las células de bazo disociadas obtenidas de ratones inmunizados

10 Se preparó una suspensión de células individuales de las células del bazo de cada ratón individual desgarrando suavemente la cápsula esplénica y pasando las células a través de una aguja de calibre 25. Las células del bazo se disociaron en una suspensión de células individuales en medio (RPMI 1640 suplementado con 100 µg / ml de penicilina, 100 µg / ml de estreptomina, L-glutamina 2 mM), se las lavó dos veces en medio y posteriormente se ajustó hasta 10 millones de células / ml. Se dispensaron 0,1 ml de esta suspensión celular de cada ratón en cada pozo de una placa de microtitulación de fondo redondo de 96 pozos que contiene el medio. El resto de las células fueron criopreservadas. Estos cultivos de células de bazo fueron evaluados luego por la capacidad de las células T CD4⁺ y CD8⁺ para sintetizar IFN-gamma por medio de tinción estándar intracelular de citoquina (ICC) y citometría de flujo.

15
20 Dos pozos individuales que contienen los cultivos de células por duplicado de un ratón individual recibieron ya sea a) 0,1 ml de medio que contenía 2 µg / ml de cada uno de los reservorios de péptidos de la envoltura del SIV (SE), que van desde 8 a 9 péptidos por reservorio, dependiendo del reservorio (n = 17 reservorios), o b) 0,1 ml de medio que contenía 2 µg / ml de cada uno de los reservorios de péptidos gag del SIV (SG), que van desde 7 a 8 péptidos por reservorio, dependiendo del reservorio (n = 16 reservorios). Los controles consistieron de cultivos de células de bazo que recibieron únicamente medio (control de fondo) o una concentración óptima previamente determinada de acetato de forbol mirístico (1 µg / ml de PMA) + ionomicina (0,25 µg / ml) para una tinción máxima de IFN-gamma (control positivo). Los péptidos env del SIV (n = 72 péptidos individuales) se mezclaron en una forma de cuadrícula de una matriz de 8 x 9 y los péptidos gag del SIV (n = 62 péptidos con dos reservorios que pierden un péptido cada uno y un reservorio que pierde dos péptidos) se mezclaron en una forma de cuadrícula de una matriz de 8 x 8 que permitió la identificación de respuestas inmunes específicas de péptidos individuales. Los péptidos gag del SIV eran por lo general péptidos sintéticos de 20 mer que se superponen entre sí en 12 aminoácidos, y abarcaron toda la secuencia de gag del SIV. Los péptidos env del SIV eran por lo general péptidos sintéticos de 25 mer que se superponen entre sí en 13 aminoácidos, y abarcaron toda la secuencia de env del SIV. Se elaboraron reservorios de péptidos para contener 2,0 µg / ml de cada péptido. Para cada preparación de células de bazo habían 36 pozos de cultivo. Los componentes de los reservorios de los péptidos que se superponen env y gag se describen más adelante. Se muestran los péptidos que forman los reservorios con su respectiva posición dentro de SIVmac239gag (SG) y env (SE).

40

Tabla 5

Disposición del reservorio de péptidos gag individuales del SIV mac 239 (20 mers) superpuestos por 12								
	Reserv. 1	Reserv. 2	Reserv. 3	Reserv. 4	Reserv. 5	Reserv. 6	Reserv. 7	Reserv. 8
Reserv. 9	Sg 1	Sg 2	Sg 3	Sg 4	Sg 5	Sg 6	Sg 7	Sg 8
Reserv. 10	Sg 9	Sg 10	Sg 11	Sg 12	Sg 13	Sg 14	Sg 15	Sg 16

continuación

Disposición del reservorio de péptidos gag individuales del SIV mac 239 (20 mers) superpuestos por 12								
	Reserv. 1	Reserv. 2	Reserv. 3	Reserv. 4	Reserv. 5	Reserv. 6	Reserv. 7	Reserv. 8
Reserv. 11	Sg 17	Sg 18	Sg 19	Sg 20	Sg 21	Sg 22	Sg 23	Sg 24
Reserv. 12	Sg 25	Sg 26	Sg 27	Sg 28	Sg 29	Sg 30	Sg 31	Sg 32
Reserv. 13	Sg 33	Sg 34	Sg 35	Sg 36	Sg 37	Sg 38	Sg 39	Sg 40
Reserv. 14	Sg 41	Sg 42	Sg 43	Sg 44	Sg 45	Sg 46	Sg 47	Sg 48
Reserv. 15	Sg 49	Sg 50	Sg 51	Sg 52	Sg 53	Sg 54	Sg 55	Sg 56
Reserv. 16	Sg 57	Sg 58	Sg 59	Sg 60	Sg 61	Sg 62		

Tabla 6

Disposición del reservorio de péptidos env individuales del SIV mac 239 (25 mer) superpuestos por 13								
	Reserv. 1	Reserv. 2	Reserv. 3	Reserv. 4	Reserv. 5	Reserv. 6	Reserv. 7	Reserv. 8
Reserv. 9	Se 1	Se 2	Se 3	Se 4	Se 5	Se 6	Se 7	Se 8
Reserv. 10	Se 9	Se 10	Se 11	Se 12	Se 13	Se 14	Se 15	Se 16
Reserv. 11	Se 17	Se 18	Se 19	Se 20	Se 21	Se 22	Se 23	Se 24
Reserv. 12	Se 25	Se 26	Se 27	Se 28	Se 29	Se 30	Se 31	Se 32
Reserv. 13	Se 33	Se 34	Se 35	Se 36	Se 37	Se 38	Se 39	Se 40
Reserv. 14	Se 41	Se 42	Se 43	Se 44	Se 45	Se 46	Se 47	Se 48
Reserv. 15	Se 49	Se 50	Se 51	Se 52	Se 53	Se 54	Se 55	Se 56
Reserv. 16	Se 57	Se 58	Se 59	Se 60	Se 61	Se 62	Se 63	Se 64
Reserv. 17	Se 65	Se 66	Se 67	Se 68	Se 69	Se 70	Se 71	Se 72

5

Tabla 7

Péptidos gag del SIV mac 239.

10

Estos péptidos son generalmente de 20 mers superpuestos por 12 aminoácidos. Se seleccionaron para la síntesis con la condición de que no hubiera Q en el terminal amino, y no hubiera P en la último o antepenúltima posición en el terminal carboxilo.

15	SEQ ID NO: 1	MGVRNSVLSGKKKADELEKIR	SG 1	1-20
	SEQ ID NO: 2	SGKKADELEKIRLRPNGKKK	SG 2	9-28
	SEQ ID NO: 3	EKIRLRPNGKKKYMLKHVVW	SG 3	17-36
	SEQ ID NO: 4	GKKKYMLKHVVWAANELDRF	SG 4	25-44

ES 2 387 276 T3

	SEQ ID NO: 5	HVVWAANELDRFGLAESLLE	SG 5	33-52
	SEQ ID NO: 6	LDRFGLAESLLENKEGCQKI	SG 6	41-60
	SEQ ID NO: 7	SLLLENKEGCQKILSVLAPLV	SG 7	49-68
	SEQ ID NO: 8	CQKILSVLAPLVPTGSENLK	SG 8	57-76
5	SEQ ID NO: 9	APLVPTGSENLKSLYNTVCV	SG 9	65-84
	SEQ ID NO: 10	ENLKSLYNTVCVIWCIHAAE	SG 10	73-92
	SEQ ID NO: 11	TVCVIWCIHAAEEKVKHTEEA	SG 11	81-100
	SEQ ID NO: 12	HAAEKVKHTEEAQIVQRHL	SG 12	89-108
	SEQ ID NO: 13	TEEAQIVQRHLVVETGTT	SG 13	97-115
10	SEQ ID NO: 14	VQRHLVVETGTTETMPKTSR	SG 14	104-123
	SEQ ID NO: 15	GTTETMPKTSRPTAPSSGRG	SG 15	113-132
	SEQ ID NO: 16	TSRPTAPSSGRGGNYPVQQI	SG 16	121-140
	SEQ ID NO: 17	SGRGGNYPVQQIGGNYVHL	SG 17	129-147
	SEQ ID NO: 18	PVQQIGGNYVHLPLSPRTLN	SG 18	136-155
15	SEQ ID NO: 19	YVHLPLSPRTLNAWVKLIEE	SG 19	144-163
	SEQ ID NO: 20	RTLNAWVKLIEEKKFGAEVV	SG 20	152-171
	SEQ ID NO: 21	LIEEKKFGAEVVPGFQALSE	SG 21	160-179
	SEQ ID NO: 22	AEVVPGFQALSEGCTPYDIN	SG 22	168-187
20	SEQ ID NO: 23	ALSEGCTPYDINQMLNCVGD *	SG 23	176-195
	SEQ ID NO: 24	YDINQMLNCVGDHQAAMQII	SG 24	184-203
	SEQ ID NO: 25	CVGDHQAAMQIIRDIINEEA	SG 25	192-211
	SEQ ID NO: 26	MQIIRDIINEEAADWDLQH	SG 26	200-218
	SEQ ID NO: 27	NEEAADWDLQHPQPAPQQGQ	SG 27	208-227
25	SEQ ID NO: 28	LQHPQPAPQQGQLREPSGSDI	SG 28	216-236
	SEQ ID NO: 29	GQLREPSGSDIAGTTSSVDE	SG 29	226-245
	SEQ ID NO: 30	SDIAGTTSSVDEIQWMYRQ	SG 30	234-253
	SEQ ID NO: 31	SVDEIQWMYRQQNPIPVGN	SG 31	242-261
	SEQ ID NO: 32	MYRQQNPIPVGNIYRRWIQL	SG 32	250-269
30	SEQ ID NO: 33	PVGNIYRRWIQLGLQKCVRM	SG 33	258-277
	SEQ ID NO: 34	WIQLGLQKCVRMYNPTNILD	SG 34	266-285

ES 2 387 276 T3

Continuación)

Péptidos gag del SIV mac 239.

5 Estos péptidos son generalmente de 20 mers superpuestos por 12 aminoácidos. Se seleccionaron para la síntesis con la condición de que no hubiera Q en el terminal amino, y no hubiera P en la último o antepenúltima posición en el terminal carboxilo.

	SEQ ID NO: 35	CVRMYNPTNILDVKQGPKE	SG 35	274-292
10	SEQ ID NO: 36	TNILDVKQGPKEPFQSYVDR	SG 36	281-300
	SEQ ID NO: 37	GPKEPFQSYVDRFYKSLRAE	SG 37	289-308
	SEQ ID NO: 38	YVDRFYKSLRAEQTDAAVKN	SG 38	297-316
	SEQ ID NO: 39	LRAEQTDAAVKNWMTQTLI	SG 39	305-324
	SEQ ID NO: 40	AVKNWMTQTLIQNANPDCK	SG 40	313-332
15	SEQ ID NO: 41	TLIQNANPDCKLVKGLGV	SG 41	321-340
	SEQ ID NO: 42	PDCKLVKGLGVNPTLEEML	SG 42	329-348
	SEQ ID NO: 43	GLGVNPTLEEMLTACQGVGG	SG 43	337-356
	SEQ ID NO: 44	EEMLTACQGVGGPGQKARLM	SG 44	345-364
	SEQ ID NO: 45	GVGGPGQKARLMAEALKEAL	SG 45	353-372
20	SEQ ID NO: 46	ARLMAEALKEALAPVIPFA	SG 46	361-380
	SEQ ID NO: 47	KEALAPVIPFAAAQQRGPRK	SG 47	369-389
	SEQ ID NO: 48	PFAAAQQRGPRKPIKCWNCG	SG 48	378-397
	SEQ ID NO: 49	GPRKPIKCWNCGKEGHSARQ	SG 49	386-405
	SEQ ID NO: 50	WNCGKEGHSARQCRRPRRQG	SG 50	394-413
25	SEQ ID NO: 51	SARQCRRPRRQGCWKCGKMD	SG 51	402-421
	SEQ ID NO: 52	RRQGCWKCGKMDHVMACPTA	SG 52	410-430
	SEQ ID NO: 53	KMDHVMACPDQRQAGFLGLG	SG 53	419-438
	SEQ ID NO: 54	CPDRQAGFLGLGPWGKKPRN	SG 54	427-446
	SEQ ID NO: 55	LGLGPWGKKPRNFPMAQVHQ	SG 55	435-454
30	SEQ ID NO: 56	KPRNFPMAQVHQGLMPTA	SG 56	443-460
	SEQ ID NO: 57	MAQVHQGLMPTAPPEDPAVD	SG 57	449-458
	SEQ ID NO: 58	MPTAPPEDPAVDLLKNYML	SG 58	457-476
	SEQ ID NO: 59	PAVDLLKNYMLGKQREKQ	SG 59	465-484
	SEQ ID NO: 60	YMLGKQREKQRESREKPYK	SG 60	473-493

ES 2 387 276 T3

SEQ ID NO: 61 EKQRESREKPYKEVTEDLLH SG 61 482-501

SEQ ID NO: 62 KPYKEVTEDLLHLNSLFGGDQ SG 62 490-510

La secuencia de aminoácidos para gag de SIVmac239 se muestra en la SEQ ID NO: 63.

5

SEC ID NO: 63

1 MGVRNSVLSGKKADELEKIR LRPNGKKKYM LKHVVWAANE LDRFGLAESL
 51 LENKEGCQKI LSVLAPLVPT GSENLKSLYN TVCVIWCIIHA EEKVKHTEEA
 101 KQIVQRHLVV ETGTTETMPK TSRPTAPSSG RGGNYVPVQQI GGNYVHLPLS
 151 PRTLNA WVKL IEEKKFGAEV VPGFQALSEG CTPYDINQML NCVGDHQAAM
 201 QIIRDIINEE AADWDLQHPQ PAPQQGQLRE PSGSDIAGTT SSVDEQIQWM
 251 YRQQNPIVPG NIYRRWIIQLG LQKCVRMYPN TNILDVKQGP KEPFQSYVDR
 301 FYKSLRAEQT DAAVKNWMTQ TLLIQNANPD CKLVKGLGV NPTLEEMLT
 351 CQGVGGPGQK ARLMAEALKE ALAPVPIFPA AAQQRGPKRP IKCWNCGKEG
 401 HSARQCRAPR RQGCWKCGKM DHVMAKCPDR QAGFLGLGPW GKKPRNFPMA
 451 QVHQGLMPTA PPEPDA VDLL KMYMQLGKQQ REKQRESREK PYKEVTEDLL
 501 HLNSLFGGDQ

10

15

20

Los siguientes péptidos están localizados dentro de la SEQ ID NO: 63: p17 (1-35 SG 1-16), p27 (136-354 SG 17-43); péptido x (355-371 SG 44-45); p9 (372-447 SG 46-65); y, p6 (448-510 SG 56-62).

Tabla 8

25

Péptidos que se superponen en Env de SIVmac239 (25 mer con 13 mer que se superponen)

SEQ ID NO: 64 MGCLGNQLLIAILLLSVYGIYCTLY SE1 1-25

SEQ ID NO: 65 LLLSVYGIYCTLYVTVFYGVPAWRN SE2 13-37

SEQ ID NO: 66 YVTVFYGVPAWRNATIPLFCATKNR SE3 25-49

30

SEQ ID NO: 67 NATIPLFCATKNRDTWGTTQCLPDN SE4 37-61

SEQ ID NO: 68 RDTWGTTQCLPDNGDYSEVALNVTE SE5 49-73

SEQ ID NO: 69 NGDYSEVALNVTESFDAWNNTVTEQ SE6 61-85

SEQ ID NO: 70 ESFDAWNNTVTEQAIEDVWQLFETS SE7 73-97

SEQ ID NO: 71 QAIEDVWQLFETSIKPCVKLSPLCI SE8 85-109

35

SEQ ID NO: 72 SIKPCVKLSPLCITMRCNKSETDRW SE9 97-121

SEQ ID NO: 73 TMRCNKSETDRWGLTKSITTTAST SE10 109-133

SEQ ID NO: 74 WGLTKSITTTASTSTTASAKVDMV SE11 121-145

SEQ ID NO: 75 TTSTTASAKVDMVNETSSCIAQDNC SE12 133-157

SEQ ID NO: 76 VNETSSCIAQDNCTGLEQEQMISCK SE13 145-169

40

SEQ ID NO: 77 CTGLEQEQMISCKFNMTGLKRDKKK SE14 157-181

SEQ ID NO: 78 KFNMTGLKRDKKKEYNETWYSADLV SE15 169-193

SEQ ID NO: 79 KEYNETWYSADLVCEQGNNTGNESR SE16 181-205

SEQ ID NO: 80 VCEQGNNTGNESRCYMNHCNTSVIQ SE17 193-217

SEQ ID NO: 81 RCYMNHCNTSVIQESCDKHYWDAIR SE18 205-229

ES 2 387 276 T3

(continuación)

Péptidos que se superponen en Env de SIVmac239 (25 mer con 13 mer que se superponen)

	SEQ ID NO: 82	QESCDKHVWDAIRFRYCAPPGYALL	SE19 217-241
5	SEQ ID NO: 83	RFRYCAPPGYALLRCNDTNYSGFMP	SE20 229-253
	SEQ ID NO: 84	LRCNDTNYSGFMPKCSKVVVSSCTR	SE21 241-265
	SEQ ID NO: 85	PKCSKVVVSSCTRMETQTSTWFGF	SE22 253-277
	SEQ ID NO: 86	RMMETQTSTWFGFNGTRAENRTYIY	SE23 265-289
	SEQ ID NO: 87	FNGTRAENRTYIYWHGRDNRTIISL	SE24 277-301
10	SEQ ID NO: 88	YWHGRDNRTIISLNKYYNLTKCRR	SE25 289-313
	SEQ ID NO: 89	LNKYYNLTKCRRPGNKTVLPVTIM	SE26 301-325
	SEQ ID NO: 90	RPGNKTVLPVTIMSGLVFHSQPIND	SE27 313-337
	SEQ ID NO: 91	MSGLVFHSQPINDRQAWCWFGGK	SE28 325-349
	SEQ ID NO: 92	DRPKQAWCWFGGKWKDAIKEVKQTI	SE29 337-361
15	SEQ ID NO: 93	KWKDAIKEVKQTIWKHPRYTGTNNT	SE30 349-373
	SEQ ID NO: 94	IVKHPRYTGTNNTDKINLTAPGGGD	SE31 361-385
	SEQ ID NO: 95	TDKINLTAPGGGDPEVTFMWTNCRG	SE32 373-397
	SEQ ID NO: 96	DPEVTFMWTNCRGEFLYCKMNWFLN	SE33 385-409
	SEQ ID NO: 97	GEFLYCKMNWFLNWVEDRNTANQKP	SE34 397-421
20	SEQ ID NO: 98	NWVEDRNTANQKPKEQHKRNYVPCH	SE35 409-433
	SEQ ID NO: 99	PKEQHKRNYVPCHIRQIINTWHKVG	SE36 421-445
	SEQ ID NO: 100	HIRQIINTWHKVGKNVYLPPREGDL	SE37 433-457
	SEQ ID NO: 101	GKNVYLPPREGDLTCNSTVTSLIAN	SE38 445-469
25	SEQ ID NO: 102	LTCNSTVTSLIANIDWIDGNQTNIT	SE39 457-481
	SEQ ID NO: 103	NIDWIDGNQTNITMSAEVAELRLE	SE40 469-493
	SEQ ID NO: 104	TMSAEVAELRLELGDYKLVEITPI	SE41 481-505
	SEQ ID NO: 105	ELGDYKLVEITPIGLAPTDVKRYTT	SE42 493-517
	SEQ ID NO: 106	IGLAPTDVKRYTTGGTSRNRKRGVVFV	SE43 505-529
30	SEQ ID NO: 107	TGGTSRNRKRGVFLGFLGFLATAGS	SE44 517-541
	SEQ ID NO: 108	VLGFLGFLATAGSAMGAASLTTLTAQ	SE45 529-553
	SEQ ID NO: 109	SAMGAASLTTLTAQSRTLLAGIVQQQ	SE46 541-565

ES 2 387 276 T3

(continuación)

Péptidos que se superponen en Env de SIVmac239 (25 mer con 13 mer que se superponen)

	SEQ ID NO: 110	QSRTLLAGIVQQQQQLLDVVKRQQE	SE47 553-577
5	SEQ ID NO: 111	QQQLLDVVKRQQELLRLTVWGTKNL	SE48 565-589
	SEQ ID NO: 112	ELLRLTVWGTKNLQTRVTAIEKYLK	SE49 577-601
	SEQ ID NO: 113	LQTRVTAIEKYLKDQAQLNAWGCAF	SE50 589-613
	SEQ ID NO: 114	KDQAQLNAWGCAFRQVCHTTVPWPN	SE51 601-625
	SEQ ID NO: 115	FRQVCHTTVPWPNASLTPKWNNETW	SE52 613-637
10	SEQ ID NO: 116	NASLTPKWNNETWQEWERKVDFFLEE	SE53 625-649
	SEQ ID NO: 117	WQEWERKVDFFLEENITALLEEAQIQ	SE54 637-661
	SEQ ID NO: 118	ENITALLEEAQIQEKNMYELQKLN	SE55 649-673
	SEQ ID NO: 119	QQEKNMYELQKLNSWDVFGNWFDLA	SE56 661-685
	SEQ ID NO: 120	NSWDVFGNWFDLASWIKYIQYGVYI	SE57 673-697
15	SEQ ID NO: 121	ASWIKYIQYGVYIWGVILLRIVY	SE58 685-709
	SEQ ID NO: 122	IVGVILLRIVYIVQMLAKLRQGY	SE59 697-721
	SEQ ID NO: 123	YIVQMLAKLRQGYRPFSSPPSYFQ	SE60 709-733
	SEQ ID NO: 124	YRPVFSPPSYFQQTHIQQDPALPT	SE61 721-745
	SEQ ID NO: 125	QQTHIQQDPALPTREGKERDGGEGG	SE62 733-757
20	SEQ ID NO: 126	TREGKERDGGEGGGNSSWPWQIEYI	SE63 745-769
	SEQ ID NO: 127	GGNSSWPWQIEYIHFLIRQLIRLLT	SE64 757-781
	SEQ ID NO: 128	IHFLIRQLIRLLTWLFSNCRILLSR	SE65 769-793
	SEQ ID NO: 129	TWLFSNCRILLSRVYQILQPILQRL	SE66 781-805
	SEQ ID NO: 130	RVYQILQPILQRLSATLQRIREVLR	SE67 793-817
25	SEQ ID NO: 131	LSATLQRIREVLRTELTYLQYGWSY	SE68 805-829
	SEQ ID NO: 132	RTELTYLQYGWSYFHEAVQAVWRS	SE69 817-841
	SEQ ID NO: 133	YFHEAVQAVWRSATETLAGAWGDLW	SE70 829-853
	SEQ ID NO: 134	ATETLAGAWGDLWETLRRGGRWILA	SE71 841-865
30	SEQ ID NO: 135	WETLRRGGRWILAIARRIRQGLELTLL	SE72 853-877

Los cultivos se incubaron durante la noche a 37°C en un atmósfera húmeda con 7% de CO₂. Las células de cada pozo fueron removidas suavemente, transferidas a tubos de ensayo FACS de 5,0 ml y lavadas. Un conjunto de células fue teñido con anti-CD3⁺ anti-CD4⁺. El otro conjunto duplicado fue teñido con anti-CD3⁺ anti-CD8⁺ (véase más adelante). Estas células teñidas en su superficie fueron luego permeabilizadas y teñidas para el contenido

intracelular de IFN-gamma utilizando un anticuerpo de tinción anti-IFN-gamma utilizando protocolos estándar de tinción intracelular. Cada población de células teñidas (aproximadamente 10.000 células de cada tubo) fue analizada a continuación, utilizando un citómetro de flujo FACS y se determinó la frecuencia de las células T, CD3⁺ CD4⁺ y CD3⁺ CD8⁺ sintetizando IFN-gamma. Se utilizaron los controles negativo y positivo para el control de fondo y para referencias del control positivo. Se llevaron a cabo aproximadamente 1000 análisis de esta manera durante este experimento.

Se determinó la frecuencia de células T CD4⁺ (eje y) que expresó IFN-gamma por medio de las células del bazo de los seis grupos de ratones en respuesta a los reservorios del péptido env del SIV (17 reservorios) y los péptidos gag del SIV (16 reservorios). También se determinó la frecuencia de células T CD8⁺ (eje y) que expresan IFN-gamma por medio de las células del bazo de los mismos seis grupos de ratones en respuesta a los reservorios del péptido env del SIV y de los péptidos gag del SIV. Los datos fueron el valor promedio de 4 ratones/grupo. Los resultados de estos estudios iniciales indicaron que SIVmac251 deslipidado con una dosis de 10 µg o 1,0 µg condujo a un marcado aumento de las respuestas humorales específicas del SIV en ratones BALB/c cebados previamente. Incluso una dosis de 0,1 µg (5 x 10⁶ partículas virales), condujo a una mejora perceptible de las respuestas humorales específicas del SIV en estos ratones. Una dosis de 1,0 µg, pero no de 10 µg, condujo a un alcance notablemente amplio de respuestas de las células T CD4⁺ específicas del péptido gag del SIV y env del SIV de acuerdo a lo medido por medio de la síntesis de IFN-g en ratones BALB/c previamente cebados.

20 **Ejemplo 4**

Deslipidación directa del VIH-1 y remoción de solventes con una columna de carbón vegetal y retención de proteínas del VIH

25 Se mezclaron aproximadamente 25 µl del VIH-1 IIB 1000x con 1) nada; 2) 12,5 µl butanol / DIPE (25:75); 3) 2,5 µl de 100% de DIPE; o 4) 12,5 µl de 1% de DIPE en PBS y se agitaron las muestras con agitación tipo vórtice durante 15 segundos. Se generó una columna de carbón vegetal (0,5 ml) cargando 2 ml de carbón vegetal Hemosorba lavado con PBS en una jeringa BD de 3 ml con cierre tipo Luer que contiene una frita filtrante Whatman. Se lavó la columna con glucosa al 5% / PBS (5 a 10 volúmenes de columna). Se incubó la columna en glucosa al 5% de glucosa / PBS durante 30 min. Esta columna se utilizó para remover los disolventes a partir del plasma tratado. Las mezclas virus-disolvente fueron cargadas individualmente sobre columnas separadas. Las columnas fueron corridas con 1 ml de PBS. Los volúmenes de elución fueron medidos y se analizaron las muestras para p24 por ELISA, proteína, y sometidas a transferencias tipo Western.

35 Las muestras tratadas con 1% de DIPE mostraron una excelente recuperación de p24 comparado con los controles. Las muestras tratadas con 10% de DIPE o butanol / DIPE mostraron una recuperación de p24 ligeramente menor. La recuperación total de proteína fue similar en términos de porcentaje con relación al control, a los resultados de p24 obtenidos en 1% DIPE, 10% de DIPE o butanol / DIPE.

40 El análisis de transferencia tipo Western, realizado en una forma similar al protocolo suministrado más adelante en este ejemplo, reveló numerosas bandas inmunorreactivas cuando se analiza IgG anti-VIH humano con los tratamientos con disolventes butanol / DIPE, 10% de DIPE o 1% de DIPE. Los análisis de transferencias tipo Western también revelaron bandas inmunorreactivas positivas correspondientes a p24 con butanol / DIPE, 10% de DIPE o 1% de DIPE. Las bandas inmunorreactivas positivas fueron observadas para gp41 utilizando el 10% de DIPE o 1% de DIPE. Se observaron bandas inmunorreactivas positivas adicionales para gp120 con butanol / DIPE, 10% de DIPE o 1% DIPE, aunque la intensidad de la tinción fue superior con un 10% de DIPE o 1% de DIPE.

Análisis de transferencias tipo Western del VIH y del SIV

50 Los reactivos para comparación incluían SIVmac251 deslipidado, SIV mac251 inactivado con calor y un anticuerpo policlonal de conejo contra el VIS completo (disponible a través del depósito de reactivos para SIDA, Rockville, MD). Aproximadamente un 1 µg de proteína se requiere para visualizar la mayoría de las bandas de SIV en la transferencia tipo Western. La electroforesis en gel de poli(acrilamida) - SDS (SDS - PAGE) se realizó sobre los lisados virales (amortiguador de lisado: Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; 1% de NP-40; desoxicolato de sodio al 0,25%; NaCl 150 mM, EGTA 1 mM; PMSF 1 mM; 1 µg / ml de aprotinina, leupeptina y pepstatina; vanadato de sodio 1 mM; NaF 1 mM).

60 Se utilizó una tinción de plata para visualizar las bandas que revelan las diferentes proteínas virales presentes después de la deslipidación con respecto a los estándares de peso molecular. Las proteínas SIVmac251 inactivadas por calor proteínas fueron comparadas con las proteínas SIVmac251 deslipidadas sobre los geles. Se corrió una SDS-PAGE similar se transfirieron las proteínas a nitrocelulosa. S lavó dos veces con agua la nitrocelulosa transferida. Se corrieron un mínimo de tres transferencias cada vez para la SIVmac251 deslipidado y la SIVmac251 inactivada por calor.

65 La nitrocelulosa transferida fue bloqueada en PBS recientemente preparada que contenía 3% de leche descremada

en polvo (MLK) durante 20 minutos a 20-25 C con agitación constante. Las tiras de nitrocelulosa se incubaron con una concentración óptima predeterminada recientemente preparada del antisuero anti-SIV policlonal de conejo (aproximadamente 5 ml de una dilución de 1 : 1000 del antisuero en PBS-MLK) durante la noche con agitación. Las tiras de nitrocelulosa se lavaron dos veces con agua. Las tiras se incubaron con una dilución 1:3000 del IgG anticonejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en PBS-MLK durante 90 min a temperatura ambiente con agitación. La nitrocelulosa se lavó con agua dos veces y luego con PBS- Tween 20 al 0,05% durante 3 - 5 min. Las tiras de nitrocelulosa se lavaron con 4 - 5 cambios de agua. La detección de las bandas desarrolladas se logró mediante la detección de las bandas desarrolladas. Se compararon las bandas desarrolladas utilizando el SIV inactivado por calor con el SIV deslipidado.

Un enfoque similar se utilizó para el análisis de transferencias tipo Western del VIH-1 tratado con disolvente pasado a través de columnas de carbón vegetal y se probaron para p24, gp41, gp120, y también para los antígenos del VIH utilizando un IgG anti-VIH humano. La transferencia tipo Western se realizó sobre muestras de virus separadas por SDS-PAGE transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se probaron con anticuerpos policlonales y monoclonales para las proteínas virales y se desarrollaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa y reactivos mejorados de quimioluminiscencia.

Ejemplo 5

Desarrollo de una partícula viral modificada para SARS para ser utilizada como vacuna

A. Optimización de un método de tratamiento con disolvente para el virus del SARS.

Producción de virus semilla del virus. Se obtuvo una existencia del virus del SARS (número de espécimen 809940 cepa 200300592) a partir de los Centros para el Control de Enfermedades (CDC). El virus se cultiva en células Vero E6 (ATCC CRL 1586). La muestra del virus se descongela y se inoculan 0,1 ml con una pipeta en cada uno de 5 tubos de ensayo de células Vero E6 que contienen aproximadamente 2 ml de medio de excrecencia (90% de medio esencial mínimo de Eagle en solución salina equilibrada de Earle con suero fetal bovino al 10%). El resto de la muestra del virus se almacenó a -80°C. Cuando 75-100% de la lámina de células en cada tubo mostró efectos citopáticos (CPE), se recogen las células por medio de congelación y raspado, se agruparon y se congelaron a -80° C en alícuotas de 1 ml. Se obtiene el título del virus en tubos de ensayo de células Vero E6 por medio del método TCID₅₀ (diluciones seriales 1 : 10 del virus por cuadruplicado).

Tratamiento con disolvente del virus. Se trata el virus del SARS con disolvente por diversos métodos utilizados para SIV, DHBV y VDVB como se describe aquí, para optimizar el proceso para una recuperación máxima de la proteína de la envoltura y una infectividad residual mínima. Los parámetros explorados para el tratamiento con disolvente del virus del SARS son: tipo de disolvente o combinaciones; proporciones de disolventes; relación solvente a virus; tiempo de tratamiento; temperatura del tratamiento; método de mezcla; y proceso de remoción del disolvente. Las preparaciones de existencias del virus del SARS en PBS (solución salina amortiguada con fosfato) se combinan con DIPE lo que resulta en aproximadamente 2000 a 10.000 ppm y se mezclan por medio de agitación rotacional tipo noria durante 20 a 60 minutos, seguido por centrifugación a 1000 x g durante 2 minutos. El disolvente residual se remueve ya sea por evaporación al vacío o por adsorción con carbón activado. Además, se prueban combinaciones de DIPE y n-butanol en proporciones de 60: 40 a 95: 5 (vol / vol), lo que resulta en una concentración total de disolvente total de aproximadamente 200 a 40.000 ppm, se mezcla por medio de agitación rotacional tipo noria durante 20 a 60 minutos, seguido por centrifugación a 1000 x g durante 2 minutos. El disolvente residual se remueve por medio de adsorción sobre carbón activado.

Todas las muestras de los diferentes métodos de tratamiento descritos anteriormente se caracterizan por medio de PAGE, incluyendo transferencias tipo Western, para determinar la presencia de proteína viral y de proteína total. La cuantificación de antígenos virales específicos y de proteínas se evalúa por medio de un ensayo inmunoespecífico tal como ELISA. Se evalúa la infectividad utilizando ensayo citopático Vero E6 (Reed y Muench; Am. J. Hygiene 1938; 27: 493 - 497). La selección se realiza con el método más efectivo de tratamiento con disolvente basado en la máxima proteína viral objetivo recuperada, la mayor reducción en infectividad e inmunogenicidad en ratones.

B. Optimización de un método químico de tratamiento para el SARS con base en agentes conocidos de inactivación viral

En situaciones donde el presente método de tratamiento reduce la infectividad hasta un nivel que es insuficiente para una vacuna, puede ser indicada una inactivación química del virus tratado con disolvente. La inactivación química se considera exitosa si se reduce la infectividad en 6 logs.

Métodos. Se utiliza el reactivo psoraleno de entrecruzamiento activado por luz. El sistema anular plano tricíclico del psoraleno se intercala en el ARN monocatenario y es activado por luz. Se disuelve NHS-psoraleno (Pierce Biochemicals, Rockford, IL) en DMSO antes de la adición a una mezcla de reacción acuosa. El éster de NHS se entrelaza con aminas primarias a pH 7 - 9. Se mezcla la solución del virus tratada con disolvente con NHS-psoraleno

(150 mM) en fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2. Se logra un acoplamiento fotorreactivo mediante exposición a la luz > 350 nm durante 30 minutos o 3 Joules/cm².

5 Los criterios de valoración citopáticos (CPE) en células Vero E6 son típicamente observados al quinto día después de la inoculación. Es de apariencia focal, con redondeo de la célula y una refractividad en las células afectadas, que es seguida por el desprendimiento de la célula. Los CPE se extienden rápidamente para involucrar la monocapa celular entera en un lapso de 24 - 48 horas. De este modo, si se destruye la integridad de la célula, esto indica que el virus es infeccioso.

10 C. Evaluación de la estructura de la proteína viral nativa y cambios de la envoltura viral después del tratamiento

Para evaluar el efecto del tratamiento con disolvente sobre las proteínas virales, las muestras de virus se caracterizan por medio PAGE no desnaturizante incluyendo la transferencia tipo Western para determinar la presencia de la proteína viral nativa. La proteína soluble total se mide utilizando SDS-PAGE. El método más efectivo de tratamiento con disolvente se selecciona con base en la máxima proteína viral objetivo recuperada y la mayor reducción de la infectividad. Se utiliza ELISA tipo sándwich de doble anticuerpo para detectar anticuerpos del SRAS (Current Protocols in Immunology, Vol. 1, suplemento 8,1991, John E Coligan, et al. eds., Richard Coico, serie ed., Editor: Current Protocolos, John Wiley and Sons). El anticuerpo policlonal anti-SARS se biotinila y se produce el antígeno del virus del SARS a partir de existencias del virus del SARS.

20 *Electroforesis nativa en gel.* La electroforesis nativa en gel se lleva a cabo a temperatura ambiente en geles de poliacrilamida y las proteínas se visualizan ya sea con tinción de plata o se transfieren a nitrocelulosa para la detección con anticuerpos antirratón de cabra marcados (Transferencia tipo Western). Las muestras del virus del SRAS antes y después del tratamiento con disolvente se analizan utilizando un reservorio de proteínas del virus del SARS como estándar. *Transferencias tipo Western.* Las proteínas sobre los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Para las proteínas de alto peso molecular el tiempo de transferencia es al menos de 90 minutos. Después de bloquear con BSA y con leche, se incuba la nitrocelulosa con anticuerpos policlonales para la punta del virus del SRAS y las proteínas de la membrana. Los anticuerpos de ratón se visualizan con anticuerpos antirratón de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante. Los anticuerpos policlonales del virus del SARS que se encuentran comercialmente disponibles se compran. Alternativamente, los anticuerpos se producen en ratones BALB / c destetados por medio del método descrito a continuación en forma resumida.

25 *Producción de anticuerpos anti-SARS de ratón.* Si los anticuerpos policlonales del SARS no se encuentran comercialmente disponibles, los ratones son inyectados con una preparación concentrada de existencias del virus tratadas con psoraleno que ha sido purificada por medio de centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa. La inactivación se confirmó en células Vero E6. Se dividen 22 ratones BALB / c destetados en 2 grupos de 8 ratones cada uno con los 6 ratones restantes como controles. Los dos grupos de 8 ratones cada uno son inoculados por vía subcutánea (sc) con dosis de 10 µg (baja) o 50ug (alto) de la preparación del virus mezclada con MPL (lípidos A monofosforilado, dicorinomicolato sintético de trehalosa; Ribi Adjuvant System, Corixa Corp. Hamilton, MT). Los 6 ratones de control se inoculan con una cantidad equivalente del medio de cultivo celular mezclado con adyuvante. Las inoculaciones se repiten a las 2 y 4 semanas. A las 6 semanas se anestesian los ratones y se desangran por medio de un sangrado retro-orbital + punción intracardiaca. El suero de cada grupo se reúne para darle título para el anticuerpo neutralizante.

45 Si la punta del virus del SRAS y las proteínas de membrana están en su conformación natural, los anticuerpos que surgieron para estas proteínas intactas en ratones se reconocen en la transferencia tipo Western. Los geles teñidos con plata se espera que muestren la retención de las proteínas virales hasta el punto en donde el tratamiento con disolvente desnaturiza las proteínas de tal manera que ya no puedan ser detectadas por medio de este método.

50 *Métodos adicionales y alternativos.* Se utilizan métodos adicionales para confirmar los resultados de las transferencias tipo Western. Se utiliza microscopía electrónica para evaluar la integridad estructural del virus y para comparar los cambios antes y después del tratamiento con disolvente (Graham DR, et al., (2003) J. Virol. 77 (15): 8237 - 8248). Los virus se inactivan con glutaraldehído antes de removerlos de la instalación BSL-3.

55 **Ejemplo 6**

Capacidad del disolvente y de las partículas virales del SARS tratadas químicamente para producir una respuesta inmune en ratones

60 Los animales se vacunan con preparaciones virales de los métodos de tratamiento con disolventes empleando diversas concentraciones de disolventes, tiempos de mezcla y de energía, así como combinaciones de disolventes que dan como resultado grados desde bajo hasta alto de remoción de lípido. La comparación de los resultados de cada método en los animales vacunados se utiliza para determinar qué preparación viral proporciona la mejor respuesta inmunológica. Para ser útil como una vacuna, el virus del SARS tratado con disolvente debe ser tanto antigénico, como se evidencia por medio de la producción de anticuerpos como provocar un aumento en la

producción de citoquinas.

A. Inyección de ratones con disolvente y con partículas virales del SARS tratadas químicamente para la producción de anticuerpos y para analizar la obtención de anticuerpos neutralizantes

5 Se utilizan ratones Balb / c previamente cebados para determinar la dosis mínima del virus del SARS tratado con disolvente que conduce a una respuesta inmune celular o humoral fácilmente reconocible específica del virus en estos ratones utilizando los métodos descritos por Ansari A., et al. (J. Virology 76 (4): 1731 - 1743, 2002). Veinte ratones Balb / c hembra adultos son inyectados cada uno con 25 µg de proteína del virus del SARS inactivada químicamente incorporada en un volumen igual de adyuvante por vía subcutánea. Cuatro ratones sirvieron como ratones no inmunizados de control (Grupo 1).

15 Suficiente virus del SARS es tratado de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 5, de modo que esté disponible la cantidad necesaria para reforzar a estos ratones de acuerdo con el cronograma. En el día 14 después del cebado inicial, 5 grupos de 4 ratones por grupo son tratados de la siguiente manera: Grupo 2 - 0,5 ml de solución salina, Grupo 3 - 0,5 ml de solución salina que contenía 10 µg del virus tratado con disolvente, Grupo 4 - 0,5 ml de solución salina que contenía 1 µg del virus tratado con disolvente, Grupo 5 - 0,5 ml de solución salina que contenía 0,1 µg del virus tratado con disolvente, Grupo 6 - 0,5 ml de solución salina que contenía 0,01 µg del virus tratado con disolvente. Cuatro días después del refuerzo, todos los ratones son anestesiados y se recolecta su sangre a través de una punción retro-orbital. El suero se obtiene a partir de la sangre recolectada. Los bazo se recogen de cada ratón del ensayo para la preparación de las células de bazo (véase más adelante). El suero y células del bazo recolectados de estos ratones se utilizan como base para los análisis que se describen a continuación en este ejemplo.

25 B. Ensayo para la producción de anticuerpos neutralizantes de ratón en suero utilizando el ensayo citopático de células Vero E6

30 Para determinar si las preparaciones del virus tratado son capaces de elevar los anticuerpos neutralizantes del virus del SARS, las muestras de suero recolectadas de la inmunización de los ratones se analizan para evaluar si estas son capaces de proteger las células Vero E6 de la citólisis.

35 *Purificación de los viriones.* En resumen, se aíslan virus a partir de los sobrenadantes de cultivos celulares clarificados por medio de dos rondas sucesivas de ultracentrifugación en gradientes de densidad de sacarosa de 25 a 50%. Las fracciones que contenían virus se identifican por medio de absorción UV a 254 y 280 nm. Las fracciones con picos de absorción UV se reúnen, se diluyen hasta un contenido de sacarosa por debajo del 20% con amortiguador TNE (Tris-HCl 0,01 M [pH 7,2], NaCl 0,1 M, y EDTA 1 mM), se ultracentrifugó hasta obtener un precipitado, y se resuspende en amortiguador TNE. Las muestras se almacenaron a -80°C. El virus tratado se prepara mediante la incubación del virus a la concentración indicada de proteína de la cápside en presencia del agente apropiado bajo las condiciones de incubación apropiadas. El virus es luego nuevamente purificado a través de una almohadilla de sacarosa al 20% por medio de ultracentrifugación durante 1 hora a 100.000 x g a 4°C.

45 *Ensayo de neutralización del virus.* La existencia del virus del SARS obtenida a partir del CDC se valora por cuadruplicado en tubos de ensayo de células Vero E6 que confluyeron recientemente durante 7 días a 37°C para obtener el TCID₅₀ / 0,1 ml con base en la aparición de CPE. El antisuero anti-SARS inactivado de ratón se diluyó en forma serial 1:10 utilizando medio de cultivo celular sin suero. Volúmenes iguales de antisuero específico diluido se mezclan con 100 TCID₅₀ de las existencias del virus del SARS y se incubó durante 1 hora. Se inocularon células Vero E6 en tubos por duplicado con 0,2 ml de cada mezcla de la dilución del antisuero con el virus y se incubó durante 7 días. Se repitió esta valoración con cada uno de los ensayos de neutralización. La dilución del antisuero que neutraliza al menos 100 TCID₅₀ del virus, con base en la aparición de CPE, representa una unidad de anticuerpo. Además de los ensayos de neutralización, se emplean diluciones seriales 1:10 del virus que va a ser confirmado como SARS y veinte unidades de anticuerpo de suero inmune específico en volúmenes iguales. *Ensayo de infectividad.* Cada muestra tratada con disolvente del virus del SARS se inocula en dos o cuatro tubos de células Vero E6 y se incuba durante al menos 7 días para detectar la presencia de CPE. Las existencias del virus del SARS no tratadas con disolvente se inoculan como anteriormente como control. Los títulos de virus se calculan por medio de TCID₅₀. Se espera que el virus del SARS provoque que las células que se redondean, se vuelvan refringentes y se separen en 24 - 48 horas. Si el anticuerpo neutralizante está presente, las células permanecen intactas. El anticuerpo neutralizante en los sueros del ensayo debe proteger a las células a partir de 100 TCID₅₀ del virus. Si se producen anticuerpos de ratón para las proteínas de células Vero, se utiliza suero de los ratones inyectados con preparaciones virales ficticias partiendo con células Vero E6 como control. Si es necesario, se remueven los anticuerpos de las células anti-Vero de los sueros de ratón mediante purificación por afinidad.

60 C. Evaluación de la respuesta celular de ratón sobre la vacunación con partículas virales SARS tratadas con disolvente

65 Las citoquinas son críticas en la orquestación de las respuestas inmunes. Una respuesta celular es significativa con

relación al abordaje del asunto de la inmunidad transitoria observada con otras vacunas de coronavirus. Como una indicación de la respuesta inmune celular de ratón, se miden el interferón gamma de la citoquina, e interleuquinas tales como IL-2, como se utiliza para los retrovirus en ratones vacunados a partir del método anteriormente descrito en este ejemplo.

5 *Recolección de células de bazo y análisis de tinción intracelular de citoquinas.* Las células del bazo se recogieron en forma aséptica y se elaboró una suspensión de células individuales, forzándolas a través de una aguja de calibre estrecho. Se lleva a cabo el recuento de células. Se resuspendieron las células a razón de un millón de células / ml en medio RPMI 1640 completo (RPMI 1640 + 100 U / ml de penicilina + 100 µg / ml de estreptomina + L-glutamina 2 mM + 10% del lote seleccionado de suero de ternera fetal). La suspensión celular (100.000 células) se dispensa en los pozos de una placa de 96 pozos. Se añade medio a los pozos por triplicado (control negativo) y acetato mirístico de forbol (50 ng / ml de PMA) + ionomicina (1 µg / ml) a 3 pozos adicionales (control positivo). Los reservorios de SARS de péptidos que se superponen (configurados como una rejilla) para cubrir ciertas secuencias que codifican SARS para genes virales estructurales (las secuencias de proteína E, M y S) se añaden luego a los pozos apropiados. Se añade el cóctel de medios y se incuba durante la noche. La adición, incubación, remoción y lavado apropiados para las adiciones de la solución de BrefeldinA, cóctel de anticuerpos de células CD4 marcadas con PerCP y CD8 marcadas con FITC en el lavado con FACS. Los contenidos de cada uno de los pozos se transfieren a tubos FACS seguido por la adición de permanente / fijación. Después de lavar con Perm Wash, se añade ficoeritrina (PE), IFN-gamma antihumano. Se repita la incubación, el lavado y la remoción de la solución de lavado. Se añade para-formaldehído fresco al 1% y se refrigeran las muestras en la oscuridad, hasta que estén listas para el análisis. Se recolectan los datos de todas las muestras y se dibujan los umbrales a partir de la señal obtenida con el control de los medios y PMA + Ionomicina. Se recolectan los datos de los cerca de 100.000 eventos. Se identifican los péptidos que inducen una respuesta positiva de interferón gamma o de interleuquina para los péptidos que se superponen. La presencia de células positivas para citoquinas indica que el virus del SARS tratado con disolvente es efectivo en la obtención de una respuesta inmune celular.

Ejemplo 7

30 El virus SIV deslipidado muestra una infectividad reducida y provoca respuestas inmunológicas de las células T CD4⁺ y CD8⁺ cuando se las administra a los ratones.

35 Una estrategia de inmunización de refuerzo del cebado utilizando SIV deslipidado de conformidad con la presente invención da lugar a respuestas más amplias de las células T CD4⁺ y CD8⁺ (producción de interferón gamma) en ratones que el virus vivo o tratado con aldritol-2 (AT-2). Más específicamente, la presente invención da lugar a una respuesta inmunológica mejorada a través de una gama más amplia de antígenos en comparación con partículas virales no deslipidadas. La presente invención abarca específicamente una partícula viral modificada que tiene un aumento de la respuesta inmunológica a un rango más amplio de antígenos, tales como un rango de un mínimo de 5% mas de antígenos en comparación con las partículas virales no deslipidadas.

40 En el presente ejemplo, la deslipidación de SIVmac251 redujo la infectividad viral, manteniendo las principales proteínas del SIV (env, gag, pol, tat). Los estudios se llevaron a cabo en ratones Balb / c inmunizados con virus tratados con AT-2 por vía subcutánea (sc), más adyuvante y reforzado ya sea con el virus tratado con AT-2, virus vivo o con virus deslipidado. Se evaluaron las vías de administración y los intervalos entre el cebado y el refuerzo y los niveles de las dosis. Se recolectaron las células del bazo y se las cultivó con reservorios individuales de los péptidos env y gag del SIV que se superponen cubriendo toda la secuencia de aminoácidos del SIV para env y gag. Se midió la capacidad de las células de bazo para sintetizar (interferón) IFN-gamma por medio de tinción estándar intracelular de la citoquina (ICC) y de citometría de flujo. Se llevó a cabo la deslipidación utilizando 1% de DIPE.

50 Materiales y métodos: Tratamientos con antígeno SIVmac251

55 Inactivación con AT-2: Con el propósito de una inmunización primaria, así como de un control de refuerzo, se inactivaron alícuotas SIVmac251 en bandas de sacarosa por medio del tratamiento con AT-2 como se describió anteriormente (Rossio et al., J. Virol. 72: 7992,1998). En resumen, se preparo en forma fresca una solución patrón 100 mM de AT-2 (Aldrich, Milwaukee, WI) en sulfóxido de dimetilo (DMSO). Se añadió el AT-2 directamente al virus hasta una concentración final de 300 uM y se incubó durante 1 hora a 37° C antes de tomar alícuotas de l virus y almacenarlas a -70° C, hasta su uso para la inmunización. Tratamiento con disolvente DIPE: Se diluyeron alícuotas de 200 µg de proteína total de SIVmac251 purificada por sacarosa en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y se añadieron diferentes cantidades de éter diisopropílico (DIPE) (VWR, West Chester, PA) para llevar el volumen total hasta 1 mL en tubos Eppendorf de microcentrifuga para lograr diferentes concentraciones de DIPE. El tratamiento con el disolvente de la preparación de antígeno viral se realizó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de una breve centrifugación para recolectar la muestra en la parte inferior de los tubos, se evaporó el disolvente en un evaporador Speedvac (Savant) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Al final de este procedimiento, se reconstituyó el volumen hasta 1 ml utilizando agua grado inyección. Se diluyó una muestra de 25 µl tratada con disolvente con 75 µL de agua destilada y se la envió a análisis por cromatografía de gases para comprobar la remoción del disolvente. El límite aceptable de disolvente residual DIPE en cualquier muestra utilizada

para la inmunización fue ≤ 25 ppm. A continuación se dividió cada muestra en alícuotas, en cantidades apropiadas para la inmunización de refuerzo y se almacenaron a -70° C.

5 Recuperación de la proteína viral y ensayos de infectividad

El efecto del tratamiento con disolvente del SIVmac251 fue comprobado por medio del análisis de proteína total mediante la BCA (Pierce, Rockford, IL) y el ensayo de Lowry (Biorad, Hercules, CA), electroforesis en gel de poliacrilamida seguido por tinción con plata y por análisis de transferencia tipo Western utilizando un reservorio de suero de mono reactivo al SIV. Además, se analizó la recuperación de SIVgag p27 por medio de EIA (Coulter Immunotech, Hialeh, FL) y ARN viral por medio de amplificación en tiempo real (Amara et al., Science 92: 69, 2001). Se evaluó la infectividad viral residual en cada alícuota tratada por medio de titulación estándar sobre células CEMx174 y se monitoreó la producción de p27 en los fluidos sobrenadantes de los pozos individuales. Se calcularon los títulos infecciosas de acuerdo con el método de Spearman-Kärber.

15 Centrifugación por gradiente de densidad isopícnic

Se evaluaron los perfiles de densidad del virus sometidos a centrifugación por gradiente isopícnico. En resumen, se superpusieron 1,3 ml de cada sacarosa 20% - 60% en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), con incrementos del 8% en las concentraciones de sacarosa. Se superpusieron seis concentraciones de sacarosa, desde 60% de sacarosa en el fondo, hasta 20% de sacarosa en la parte superior. Se superpusieron cuidadosamente las muestras del virus (preparadas después de la sedimentación a través de una almohadilla de sacarosa al 20%) en 750 μ l PBS en la parte superior de la sacarosa al 20%. Todos los tubos se centrifugaron en un rotor 80Ti para la ultracentrífuga L8 de Beckman a 40.000 rpm, y a 4° C durante 16 h. Partiendo de la parte superior, se recolectaron 17 fracciones de 525 μ l por tubo. Se analizaron las concentraciones de virus utilizando un kit comercial de ELISA para SIV Gag p27 (Coulter, CA).

Análisis del virus por cromatografía líquida de rápido desempeño (FPLC)

Se analizaron adicionalmente los virus deslipidados por medio de FPLC en un sistema FPLC de Pharmacia. Se inyectaron las muestras de virus (200 μ l) en una columna 10/30 Superdose 6 HR (Pharmacia, Suecia). Se recolectaron 60 fracciones de 500 μ l cada una, con un caudal de 0,4 ml / min en PBS sin Ca ni Mg. La presencia de SIV en las fracciones fue detectado por medio de un ELISA para p27 (Coulter, CA). Se analizaron las cantidades de colesterol en las fracciones del virus por medio del ensayo del colesterol total Amplex Red de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Molecular Probes, OR).

35 Inmunización de los ratones

Ratones Balb / C hembra de 6 - 10 semanas de edad recibieron una inmunización primaria con 10 μ g de SIVmac251 inactivado con AT-2 en bandas de sacarosa (ABI, Columbia, MD) emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (IFA) y administrado por vía subcutánea (sc). Para propósitos de control, algunos ratones fueron cebados únicamente con IFA. A los grupos de 6 animales se les administró luego una inmunización de refuerzo después de 2 semanas de utilizar dosis variables de SIVmac251 tratado vs no tratado en forma intravenosa. Los animales fueron sacrificados después de 4 días de recibir el refuerzo para recolectar sangre y esplenocitos para llevar a cabo los análisis inmunológicos descritos a continuación.

45 Evaluación de la respuesta de IFN- γ intracelular de respuestas mediadas por células

Estos análisis se realizaron utilizando análisis de citoquinas intracelulares (ICC), seguido por una nueva estimulación específica del antígeno de corto plazo en presencia de 5 μ g / mL de Brefeldina A y 1 μ g / ml de cada uno de los anticuerpos monoclonales CD28 y CD49d antirratón seguido por la evaluación de las frecuencias de las células T CD4⁺ y CD8⁺ que producen IFN- γ . El protocolo estándar consistió de una nueva estimulación durante 12 h de 1×10^6 esplenocitos con reservorios de péptidos (que contenían 2 μ g / ml de cada péptido individual) que abarcan todo el gag de SIV (reservorios de 16 péptidos, 20 mers superpuestos por 12 residuos) y env de SIV (reservorios de 17 péptidos, 25 mers superpuestos por 13 residuos), conteniendo cada reservorio 7 - 9 péptidos. Las muestras de control positivo consistían de esplenocitos estimulados con los mitógenos PMA / ionomicina y PHA; los controles negativos no son estimulación del péptido y la estimulación con el péptido específico de ovoalbúmina SYNFEKL (SEQ ID NO: 136). Los cultivos se llevaron a cabo durante 2 horas antes de añadir la Brefeldina A diseñada para evitar la excreción de la citoquina y promover su acumulación intracelular. Los esplenocitos reestimulados son luego teñidos por CD4⁺, CD8⁺ e intracelular por IFN- γ . La evaluación de las frecuencias de células T CD4⁺ y CD8⁺ positivas para IFN- γ fue analizada por medio del recuento de aproximadamente 200.000 eventos por muestra utilizando un FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Serología

65 EIA para SIV: Se evaluaron los anticuerpos de las muestras de suero para los epítomos virales utilizando análisis EIA

y transferencias tipo Western de rutina. En resumen, microplacas para ELISA recubiertas con poli-L-lisina (10 µg por ml de PBS) adsorbieron 2 µg de SIVmac251/pozo purificado durante la noche en amortiguador estándar de recubrimiento de bicarbonato, pH 9,6 a 4°C. Después de 3 lavados con PBS / Tween 20, se bloquearon las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS que contenía leche en polvo desengrasada al 2%. Se añadieron luego diluciones dobles secuenciales del suero a la placa, así como muestras de control positivo y negativo por duplicado y se incubó a 37°C durante 2 h. Después de lavar los anticuerpos no enlazados, se incubaron las placas durante 1 hora a 37°C con un conjugado de IgG anti ratón - fosfatasa alcalina (Southern Biotech, Birmingham, AL), y posteriormente se desarrolló con p-nitrofenilfosfato (BioRad) a temperatura ambiente. Las placas se leyeron a una longitud de onda 450 nm utilizando un lector para ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). *Transferencias tipo Western del SIV*: Para los análisis de las transferencias tipo Western, se utilizaron kits para transferencia tipo western del SIV que se encuentran comercialmente disponibles (Zepetometrix, Buffalo, Nueva York) contra sueros de ratón diluidos 1:100 y desarrollados de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados

Resultados de la deslipidación viral en la remoción de colesterol, sin la pérdida de proteínas virales

Nuestros procedimientos previos de optimización condujeron al hallazgo de que el tratamiento con DIPE efectivamente deslipidó al VIH sin pérdida significativa de las proteínas virales (datos no mostrados). Hemos ampliado estos hallazgos para evaluar si este método podría deslipidar SIV-mac251. Se deslipidó SIV-mac251 utilizando DIPE, sin afectar significativamente la proteína total o proteínas virales (p27). La recuperación tanto de la proteína viral total como de gag p27 viral no fue significativamente diferente cuando se comparó con el SIV vivo. Estos hallazgos fueron confirmados por de la tinción de plata y del análisis de transferencia tipo Western del SIV. El virus deslipidado mostró una reducción reproducible en infectividad de 2 log (Figura 7). La remoción del colesterol del virus utilizando nuestro método reduce la infectividad de una forma similar a la remoción de β-CD del colesterol en el VIH-1 (Nguyen et al., J. Immunol. 168: 4121, 2002; Graham et al., J. Virol. 77: 8237, 2003), sin pérdida del ARN viral o de las proteínas virales. Para caracterizar adicionalmente la pérdida de lípidos para las propiedades físicas del virus tratado, se evaluaron los perfiles de las partículas virales por medio de cromatografía líquida de rápido desempeño (FPLC) (Figura 5). Los perfiles de FPLC de los virus de control y tratados con Aldritiol-2 (AT-2) fueron similares (datos no mostrados). Sin embargo, los viriones tratados con DIPE cambiaron su perfil estructural, comparados con los viriones de control vivos. Para evaluar si nuestro procedimiento de deslipidación conduce a la remoción del colesterol, se analizaron los virus tratados para colesterol, utilizando el ensayo Amplex Red después de la separación por FPLC. Los virus tratados con DIPE tuvieron aproximadamente un 80% de pérdida de colesterol comparado con el virus de control cuando se expresa como la relación de colesterol / proteína gag p27. Se analizaron adicionalmente los virus por medio de centrifugación con gradiente de densidad isopícnico, para evaluar la densidad de las partículas. La deslipidación cambió la flotabilidad de los viriones, resultando en un cambio del rango de densidad de las partículas virales (Figura 4).

Los virus deslipidados son capaces de provocar respuestas inmunes más amplias mediadas por células mediante el refuerzo

Para evaluar si los virus deslipidados tenían una mejor inmunogenicidad en el refuerzo de las respuestas inmunes mediadas por células, se reforzaron los ratones cebados con SIV inactivado con AT-2 (Rossio et al., J. 72: 7992, 1998, Arthur et al., AIDS Res. Human Retroviruses 14: Suppl. 3. S311, 1998) con virus de control y deslipidado. Después de dos semanas, se reforzaron los grupos de ratones inmunizados (6 ratones por grupo) con un 1µg de proteína viral total ya sea SIV vivo, SIV inactivado con AT-2 o SIV deslipidado con DIPE. Se evaluaron las respuestas de células T utilizando reservorios de péptidos que se superponen de la envoltura gpl20 del SIV y Gag del SIV, y las células que responden detectadas por medio de citometría de flujo (ICC) del interferón gamma intracelular (INF-γ). El reforzador DIPE provocó respuestas más amplias de CD4⁺ y CD8⁺, en comparación con los grupos de control o de AT-2 (Figuras 8A y 8B). También se determinaron los péptidos específicos de IFN-γ a partir de las rejillas de los reservorios de péptidos, produciendo patrones similares a aquellos observados cuando se analizan los reservorios de péptidos. SIV tratado con DIPE también provocó nuevos patrones de reconocimiento del reservorio de péptidos, comparado con los otros grupos (Tabla 9). Los datos fueron especialmente sorprendentes para las respuestas de CD4⁺ a los reservorios del péptido env. El grupo de DIPE tuvo un incremento estadísticamente significativo en las respuestas comparado con el grupo reforzado con SIV vivo (p = 0,006), y con el grupo reforzado con SIV tratado con AT-2 (p = 0,0001). Se observaron tendencias similares con el SIV tratado con DIPE para las respuestas del reservorio del péptido env de CD8⁺ (p = 0,001 con respecto al grupo vivo y p = 0,02 con respecto al grupo de AT-2). Las respuestas de gag de CD4⁺ también se incrementaron significativamente, (p = 0,03 con relación al grupo de AT-2). El grupo reforzado con SIV tratado con DIPE también tuvo más células positivas para IFN-γ que los otros dos grupos. Los estudios de la dosis de antígeno indicaron que una dosis sorprendentemente bajo de 1 µg del virus deslipidado con DIPE (que corresponde aproximadamente a 200 ng del p27 de SIV) fue suficiente para provocar respuestas inmunes más amplias de CD4⁺ y CD8⁺ tanto para gag como para env. Se observaron respuestas más amplias de CD4⁺ y CD8⁺ para los reservorios de los péptidos env y gag en ratones reforzados con virus deslipidado en comparación con el refuerzo del virus vivo o tratado con AT-2 (p > 0,001).

5 Predominantemente, las respuestas de las células T CD4⁺ se observaron con dosis de antígeno tan bajas como 0,05 µg del virus deslipidado administrado IV, sin adyuvante, mientras que se requirieron dosis mas altas para la proteína del SIV vivo o con AT-2. Las respuestas preliminares de anticuerpo indican que el virus deslipidado estimula también las respuestas de anticuerpos. Estos hallazgos muestran unas respuestas celulares de CD4⁺ y CD8⁺ para un arreglo más amplio de antígenos del SIV provocados por concentraciones de refuerzo muy bajas del virus deslipidado con el método de la presente invención.

10 En los siguientes pocos párrafos, se define operacionalmente una respuesta como una respuesta celular de CD4⁺ a los péptidos env del SIV en términos de un porcentaje de células CD4⁺ que son positivas para el interferón gamma. Se indican los reservorios de péptidos que provocan respuestas, y los diferentes rangos respuestas (porcentaje de células CD4⁺ que son positivas para el interferón gamma).

15 La respuesta celular CD4 a los péptidos env del SIV no fue significativa en ratones tratados con 5 µg del virus vivo. Después de la administración de diferentes cantidades del virus deslipidado con 1% de DIPE, se observó una respuesta celular CD4⁺ a los péptidos env del SIV. Con una dosis de 0,05 µg, se provocó una respuesta de tres reservorios de péptidos env 5 (0,13 - 0,22%), 6 (-0,3 - 0,13%) y 13 (0,13 - 0,22%). Con una dosis de 1,0 µg, se provocó una respuesta amplia de varias reservorios de péptido env (3, 4, 5 (0,06 - 0, 23%), 8, 11, 12 (0,19 - 0,45%), 13 (0,13 - 0,39%), 14 (0,13 - 0,34%), 15 (-0,03 - 0,24%). Con la dosis más alta de 5 µg, se observó una respuesta al reservorio de péptidos env 5 (0,17 - 0,23%).

20 La respuesta celular CD4⁺ al péptido env del SIV para reforzar con diferentes cantidades del virus tratado con AT-2 reveló una respuesta limitada. Con una dosis de 0,05 µg, se provocó una respuesta de un reservorio del péptido env (10 (0,17 - 0,25%)). Con una dosis de 1,0 µg, se provocó una respuesta aproximadamente de un reservorio del péptido de un péptido env (10 (0,08 - 0,22%)). Con la dosis más alta de 5 µg, la respuesta celular CD4 no fue significativa.

25 La respuesta celular CD4 al péptido env del SIV para refuerzo con diferentes cantidades del virus SIV vivo mostró una respuesta con una dosis de 0,05 µg de los reservorios 1 (- 0,05 - 0,23%), 8 (0,13 - 0,21%), 12 (0,11 - 0, 21%) y 14 (-0,03 - 0,25%). Con una dosis de 1,0 µg, se provocó una respuesta de tres de los reservorios con péptidos env (8 (0,22 - 0,36%), 12 (0,12 - 0, 58%) y 13 (-0,09 - 0,33%)). Con la dosis más alta de 5 µg, la respuesta celular CD4 no fue significativa.

30 En los siguientes pocos párrafos se define operativamente una respuesta como una respuesta celular CD8⁺ a los péptidos env del SIV en términos de un porcentaje de células CD8⁺ que son positivas para el interferón gamma. Se indican los reservorios de péptidos que provocan respuestas y diferentes rangos de respuestas (porcentaje de células CD8⁺ que son positivas para el interferón gamma).

35 Después de la administración de diferentes cantidades del virus deslipidado con 1% de DIPE, se observó una respuesta celular CD8 a los péptidos env del SIV. Con una dosis de 0,05 µg, se provocó una respuesta de dos reservorios de péptido env 5 (0,22 - 1,22%) y 13 (0,43 - 0,92%). Con una dosis de 1,0 µg, se provocó una respuesta mas amplia de diferentes reservorios del péptido env (2 (0,18 - 0,34%), 3 (-0,06 - 0,35%), 4 (-0,03 - 0,15%), 5 (0,06 - 0,25%), 9 (0,24 - 0,41%), 10 (0,34 - 0,87%), 11 (0,22 - 0,71%), 12 (0,19 - 0,53%), 13 (0,11 - 0,35%), 14 (0,19 - 0,32%), 15 (0,98 - 1,35%) y 16 (0,11 - 0,31%). Con la dosis más alta de 5 µg, se observó una respuesta al reservorio de péptidos env 13 (0,27 - 0,41%), 14 (0,28 - 0,48%) y 15 (0,31 - 0,35%).

40 Después de la administración de diferentes cantidades del virus tratado con AT-2, se observó una respuesta celular CD8 limitada a los péptidos env del SIV. Con una dosis de 0,05 µg, se provocó una respuesta celular CD8, del reservorio de péptidos env 16 (0,08 - 0,45%). Con una dosis de 1,0 µg, se provocó una respuesta de los reservorios de péptidos env 7 (0,18 - 0,33%) y 16 (0,29 - 0,88%). Con la dosis más alta de 5 µg, la respuesta celular CD8 no fue significativa.

45 Después de la administración de diferentes cantidades del SIV vivo, se observó una respuesta celular CD8 limitada a los péptidos env del SIV. Con una dosis de 0,05 µg, se provoco una respuesta celular CD8 de los reservorios del péptido 1 (-0,05 - 0,23%), 8 (0,13 - 0,2%), 12 (0,11 - 0,21%) y 14 (-0,03 - 0,25%). Con una dosis de 1,0 µg, se provocó una respuesta de los reservorios de péptidos 8 (0,22 - 0,36%), 12 (0,12 - 0,58%), y 13 (-0,02 - 0,33%). Con la dosis más alta de 5 µg, la respuesta celular CD8 no fue significativa.

50 En los siguientes pocos párrafos se definió operativamente una respuesta como una respuesta celular CD4 a los péptidos gag del SIV en términos de un porcentaje de células CD4⁺ que son positivas para el interferón gamma. Se indican los reservorios de péptidos que provocaron respuestas, y diferentes rangos de respuestas (porcentaje de células CD4⁺ que son positivas para el interferón gamma).

55 Después de la administración de diferentes cantidades del virus deslipidado con 1% de DIPE, se observó una respuesta celular CD4 a los péptidos gag del SIV. Con una dosis de 0,05 µg, se provocó una respuesta de los reservorios del péptidos gag 5 (0,22 - 1,22%) y 13 (0,43 - 0,92%). Con una dosis de 1,0 µg, se provocó una amplia

respuesta de aproximadamente cinco reservorios del péptido gag (3 (0,19 - 0,72%), 5 (0,15 - 0,71%), 7 (0,12 - 0,77%), 10 (0,19 - 0,92%), y 15 (0,42 - 1,35%)). Con la dosis más alta de 5 µg, la respuesta disminuyó hasta aproximadamente cuatro reservorios del péptido gag 3 (0,12 - 0,49%), 5 (-0,04 - 0,48%), 10 (0,11 - 0,52%), 14 (-0,03 - 0,52%), y 15 (0,18 - 0,56%).

5 Después de la administración de diferentes cantidades del virus tratado con AT-2, se observó una respuesta celular CD4 limitada a los péptidos gag del SIV. Con una dosis de 0,05 µg, se provocó una respuesta celular CD4, de tres reservorios del péptido gag (10 (0,19 - 0,59%), 11 (0,11 - 0,39%), y 13 (-0,03 - 0,31%)). Con una dosis de 1,0 µg, se provocó una respuesta limitada del reservorio del péptido gag 7 (-0,05 - 0,27%). Con la dosis más alta de 5 µg, la respuesta celular CD4 no fue significativa.

10 Después de la administración de diferentes cantidades del virus SIV vivo, se observó una respuesta celular CD4 a los péptidos gag del SIV. Con una dosis de 0,05 g, se provocó una respuesta celular CD4, de aproximadamente 2 reservorios del péptido gag (2 (0,59 - 1,23%) y 9 (0,34 - 1,1%)). Con una dosis de 1,0 µg, se provocó una respuesta de aproximadamente cuatro reservorios del péptido gag (2 (0,39 - 1,12%), 3 (0,11 - 0,51%), 6 (0,21 - 0,72%), y 9 (0,15 - 0,51%)). Con la dosis más alta de 5 µg, se provocó una respuesta de aproximadamente dos reservorios del péptido gag (2 (0,16 - 0,51%) y 6 (-0,05 - 0,23%)).

15 En los siguientes pocos párrafos se define operacionalmente una respuesta como una respuesta celular CD8 a los péptidos gag del SIV en términos de un porcentaje de células CD8⁺ que son positivas para el interferón gamma. Se indican los reservorios de péptidos que provocaron respuestas, y diferentes rangos respuestas (porcentaje de células CD8⁺ que son positivas para el interferón gamma).

20 Después de la administración de diferentes cantidades del virus deslipidado con 1% de DIPE, se observó una respuesta celular CD8 a los péptidos gag del SIV. Con una dosis de 0,05 µg, se provocó una respuesta de aproximadamente cinco reservorios del péptido gag (2 (0,19 - 0,92%), 3 (0,19 - 0,94%), 4 (0,18-0,95%), 6 (0,28 - 0,49%), y 13 (0,29 - 0,88%)). Con una dosis de 1,0 µg, se provocó una respuesta de aproximadamente seis reservorios del péptido gag (2 (0,01 - 1,01%), 3 (0,03 - 0,49%), 6 (0,01 - 0,99%), 7 (0,02 - 0,37%), 10 (0,01 - 0,92%), y 15 (0,05 - 0,65%)) Con la mayor dosis de 5 µg, se provocó una respuesta de aproximadamente siete reservorios del péptido gag (2 (0,11 - 0,37%), 3 (0,16 - 0,54%), 4 (0,18 - 0,91%), 5 (0,18 - 0,71%), 10 (0,13 - 0,23%), 14 (0,13 - 0,81%), y 15 (0,2 - 0,56%)).

25 Después de la administración de diferentes cantidades del virus tratado con AT-2, se observó una respuesta celular CD8 a los péptidos gag del SIV. Con una dosis de 0,05 µg, se provocó una respuesta celular CD8, de cinco reservorios del péptido gag (10 (0,28 - 0,71%), 11 (0,3 - 0,91%), 12 (0,23 - 0,76%), 13 (0,15 - 0,61%), y 14 (0,19 - 0,72%)). Con una dosis de 1,0 µg, se observó una respuesta de aproximadamente tres reservorios del péptido gag (10 (0,01 - 0,73%), 11 (-0,02 - 1,1%), y 12 (-0,05 - 0,72%)). Con la dosis más alta de 5 µg, se provocó una respuesta de aproximadamente un reservorio del péptido gag (10 (0,07 - 0,27%)).

30 Después de la administración de diferentes cantidades del virus SIV vivo, se observó una respuesta celular CD8 a los péptidos gag del SIV. Con una dosis de 0,05 µg, se provocó una respuesta celular CD8, de aproximadamente tres reservorios del péptido gag (2 (0,28 - 0,92%), 9 (0,32 - 0,82%), y 15 (0,21 - 0,43%)). Con una dosis de 1,0 µg, se provocó una respuesta de aproximadamente cinco reservorios del péptido gag (2 (0,01 - 0,91%), 3 (0,03 - 0,67%), 6 (0,01 - 0,71%), 9 (-0,25 - 0,8%) y 12(-0,05 - 0,39%)). Con la dosis más alta de 5 µg, se provocó una respuesta de aproximadamente tres reservorios del péptidos gag (2 (0,19 - 0,71%), 9 (0,19 - 0,53%) y 12 (0,04 - 0,87%)).

35 Tomados en conjunto, estos datos demuestran que los ratones inmunizados con el virus SIV tratado con AT-2 muestran respuestas inmunológicas mejoradas con el refuerzo con el virus SIV deslipidado cuando se compara con el refuerzo con el virus tratado con AT-2 tratada o el virus SIV vivo. El virus SIV deslipidado fue más inmunogénico que el virus tratado con AT-2 en términos del porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ con mayor tinción de IFN-γ.

40 Nuestros datos indican que los virus deslipidados provocaron respuestas inmunes más fuertes mediadas por células T, sin el uso de un adyuvante. El incremento en la amplitud y fuerza de la respuesta inmune total mediada por células se observó en el grupo de ratones reforzado con DIPE, comparado con los grupos tratados con AT-2 y con el virus vivo. Las Tablas 9 y 10 presentan un resumen de estos resultados.

45

50

55

TABLA 9

Reservorios de env CD4 que responden a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
0,05 µg de DIPE					+								+				
1 µg de DIPE					+							+	+	+	+		
5 µg de DIPE					+												
Reservorios de env CD8 que responden a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
0,05 µg de DIPE					+								+				
1 µg de DIPE	+	+			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5 µg de DIPE							+						+	+	+		

Reservorios de gag CD4 que responden a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
0,05 µg de DIPE					+								+			
1 µg de DIPE			+		+		+			+					+	
5 µg de DIPE			+		+					+					+	
Reservorios de gag CD8 que responden a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
0,05 µg de DIPE		+	+	+		+							+			
1 µg de DIPE		+	+			+	+			+		+			+	
5 µg de DIPE		+	+	+	+					+	+	+		+	+	

5 TABLA 9. Respuestas del reservorio de péptidos env y gag del SIV para células T CD4⁺ y CD8⁺ en ratones reforzados con 0,05, 1, o 5 µg de proteína total. Se estimularon 1 millón de las PBMC de ratón con diferentes reservorios de péptidos como se indica, durante 2 h. Después de bloquear la secreción de las proteínas por medio de Brefeldina A, se añadieron los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8, se permeabilizaron las células y se tiñeron adicionalmente con Ab anti- IFN-γ. Las células fueron posteriormente analizadas por medio de FACS. Cualquier respuesta por encima de 0,1% de células totales positivas para la coloración con IFN-γ fueron consideradas como una respuesta positiva. Símbolos sombreados representan virus tratados con DIPE con una dosis de 1 µg.

10

TABLA 10

Reservorios de env CD4 que responden a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1% de DIPE					+							+	+	+	+		
Vivo								+				+					
AT-2										+							
Controles	Respuestas no detectables																
Reservorios de env CD8 que responden a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1% de DIPE	+	+						+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Vivo								+				+					
AT-2							+										+
Controles	Respuestas no detectables																

Reservorios de gag CD4 que responden a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1% de DIPE			+		+		+			+						+
Vivo		+	+			+										
AT-2																
Controles	Respuestas no detectables															
Reservorios de gag CD8 que responden a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1% de DIPE		+	+			+	+			+						+
Vivo		+	+			+			+			+				
AT-2										+	+	+				
Controles	Respuestas no detectables															

- 5 TABLA 10. Los ratones fueron inmunizados con 10 µg del SIV incorporado en adyuvante incompleto de Freund por vía subcutánea y 2 semanas más tarde reforzados en forma intravenosa con concentraciones variables de SIV tratado con DIPE, de SIV tratado AT-2 o de SIV vivo sin tratar. Los controles consistieron de grupos de ratones vacunados con solución salina, pero potenciado con DIPE, A-2 o el virus no tratado o grupos de ratones cebados con solución salina pero reforzados con DIPE, AT-2 O virus sin tratar o grupos de ratones cebados con el SIV, pero reforzados con solución salina. Se analizaron las células del bazo para responder a los reservorios de péptidos de superposición gag de SIV o env de SIV utilizando el ensayo ICC para células T CD4⁺ o CD8⁺ que sintetizan IFN-γ, y denota una respuesta neta (se dedujo la respuesta a los medios y al péptido irrelevante) al reservorio de péptidos apropiado.
- 10
- 15 Los títulos de anticuerpos se mejoran en el grupo reforzado del SIV tratado con DIPE

Los títulos del anticuerpo (Ab) para viriones enteros se determinaron para cada grupo. Los títulos de anticuerpo para

gp120 del SIV fueron significativamente menores en el grupo reforzado con AT-2 en comparación con los grupos reforzados con DIPE ($p = 0,02$) (Figura 9). En general, los ratones reforzados con DIPE produjeron lecturas más altas de Ab, en comparación ya sea con el grupo vivo, o el reforzado con AT-2, tanto para gp120 del SIV como para Gag del SIV (Figura 10). Cuando se midieron los títulos de Ab en un experimento posterior a las 4 semanas, se observó un refuerzo para todos los grupos (datos no mostrados). Los títulos del anticuerpo Gag (p55), medidos por medio de ELISA (absorbancia a 450 nm), fueron más altos en el suero de ratones reforzados con SIVmac251deslipidado que con el grupo vivo que con el grupo reforzado con SIV tratado con AT-2. El análisis de transferencias tipo Western respaldó los datos de ELISA para el anticuerpo, ya que se observó una banda más amplia de p27 se observó por medio del suero reforzado con SIV deslipidado, comparado con el suero de un ratón vivo o tratado con AT-2. Esto indica un reconocimiento más amplio del epítipo de p27 por parte de los anticuerpos gag de los ratones reforzados con SIV deslipidado. La maduración de la respuesta del anticuerpo tanto para gag como para env fue observada cuando los ratones fueron reforzados 4 semanas después del cebado comparado con un refuerzo a las 2 semanas después del cebado. La vía de administración, subcutánea (sc) o intravenosa (iv), no afectó los títulos del anticuerpo (ELISA). Se observó una correlación más fuerte entre células T CD4⁺ y las respuestas del anticuerpo tanto para proteínas gag como env de SIVmac251 en ratones reforzados con virus deslipidado en comparación con los refuerzos del virus vivo o tratado con AT-2.

Fuerte correlación entre las respuestas de CD4 y las respuestas de anticuerpos

Se determinó adicionalmente el impacto de la inmunización mediante la comparación de las respuestas de las células CD4⁺ a los reservorios de péptido gag y env con las respuestas de anticuerpos para gag y env recombinantes. Se observó una fuerte correlación entre las respuestas celulares (CD4) y las respuestas humorales (respuestas de anticuerpos) (Figura 11), lo que indica beneficios adicionales de respuesta inmune mejoradas mediadas por células.

El tratamiento con DIPE creó una poderosa respuesta inmune mediada por células, y una buena respuesta humoral en ausencia de un adyuvante. Significativamente, se logró un refuerzo efectivo con tan poco como 1 mg de proteína total de DIPE tratada con VIS, que representa aproximadamente 200 ng de p27 del SIV.

Nuestra capacidad para producir respuestas inmunes específicas del péptido viral con tan poco como 1 µg de la proteína viral total fue tanto sorprendente como inesperada. Este nivel de respuesta inmune logrado con un único refuerzo IV, sin la administración conjunta de adyuvantes sugiere que la naturaleza bioquímica del virus deslipidado está suficientemente alterada para dirigir un procesamiento y presentación eficientes, o el reconocimiento de un mayor número de péptidos virales diferentes de aquellos provocados por el SIV vivo o tratado con AT-2.

En conclusión, hemos comparado la inmunogenicidad del SIV vivo, del SIV tratado con AT-2 y del SIV deslipidado (DIPE) en ratones Balb / c, y se observó una mejora significativa de las respuestas inmunes mediadas por células de los grupos reforzados con virus tratados con DIPE. Sorprendentemente, se logró un refuerzo efectivo con una dosis muy baja de 1 µg de proteína viral total, que corresponde a aproximadamente 200 ng de p27 del SIV. Estos resultados fueron obtenidos sin el uso de adyuvantes en las dosis de refuerzo, lo que indica un aumento sustancial en inmunogenicidad. Nuestros resultados muestran que la deslipidación de los virus mejora la antigenicidad del virus, aunque redujo significativamente su infectividad. Nuestros resultados difieren de los hallazgos previos en que el agotamiento del colesterol del VIH reduce dramáticamente la infectividad del virus (Nguyen et al., J. Immunol. 168: 4121, 2002; Graham et al., J. Virol. 77: 8237, 2003; Liao et al., AIDS Res. Human Retroviruses 19: 675, 2003), debido a que los virus tratados con β-CD dieron como resultado pérdidas dramáticas de ARN viral y de proteínas virales, contribuyendo así a la pérdida de infectividad. Los virus deslipidados tienen una pérdida insignificante de ARN viral y de proteínas virales.

Aunque sin querer quedar vinculado por medio de la siguiente declaración, se cree que el proceso de deslipidación puede crear partículas virales que son mejor procesadas o presentadas por las células que presentan antígeno, lo que lleva a las respuestas observadas por el amplio reservorio de péptidos. Adicionalmente, la deslipidación de virus podría exponer más antígenos celulares (recogidos por el virus cuando ocurre a partir de células CEMx174 infectadas), tales como moléculas MHC II, que podrían actuar como adyuvantes en el mejoramiento de las respuestas celulares. Los títulos de Ab en suero y el análisis de transferencia tipo Western de perfiles de sueros con Ab, indicaron anticuerpos anti-Env mejorados, y una ampliación consistente de las respuestas de anticuerpo específicas de las respuestas de anticuerpos específicas del gag del SIV en grupos reforzados con el SIV tratado con DIPE, indicando quizás un incremento en los títulos de Ab anti-p27, o un incremento en la avidéz de Ab por las proteínas virales. Los presentes resultados demuestran que la deslipidación con DIPE del SIV afecta la inmunogenicidad del virus en ratones. Se cree que este nuevo método de deslipidación contribuirá al diseño y desarrollo de vacunas terapéuticas contra el VIH.

Ejemplo 8

Proteína total y recuperación de la proteína p24 en el virus del VIH tratado con diferentes procedimientos de deslipidación.

Los solicitantes han encontrado que los procesos de deslipidación anteriormente mencionados son capaces de producir partículas virales intactas, según lo medido por medio del grado de recuperación de proteína total y de recuperación de la proteína p24.

- 5 La muestra que contenía el virus VIH se mezcló con disolvente utilizando agitación rotacional tipo noria a temperatura ambiente durante 20 minutos a una velocidad del 70%. A continuación se centrifugó la muestra durante 2 minutos a 1000 x g y luego se la pasó a través de una columna de carbón vegetal. Se midió la proteína total por medio del ensayo de BioRad. La proteína p24 viral fue medida por medio del ELISA tipo sándwich p24 (Coulter).
- 10 La recuperación de proteína total para los procesos de deslipidación utilizando 1% de DIPE, 1% de butanol / DIPE, 1% de butanol, 2 % de butanol, y 5% de butanol están dentro del 10% del control, específicamente en el intervalo del 63% al 75% del ingreso total. La recuperación de la proteína p24 para los procesos de deslipidación utilizando 1% de DIPE, 1% de butanol / DIPE, 1% de butanol, 2 % de butanol, y 5% de butanol están dentro del 40% del control, con 2% de butanol produciendo una recuperación de proteína p24 en un porcentaje de aproximadamente del 78%
- 15 con relación a un porcentaje de recuperación del control de alrededor del 83%.

Ejemplo 9

- 20 Densidad por flotación y perfil de inmunoreactividad (gp120 y p24) de partículas de VIH y de SIV tratadas con diferentes procedimientos de deslipidación.

Los procesos deslipidación antes mencionados modificaron la densidad por flotación de las partículas virales. Los cambios en la densidad son indicadores útiles de una deslipidación exitosa ya que la remoción de los lípidos de partículas virales cambia la relación de proteína con respecto al lípido y, como resultado, la densidad de la partícula.

25 En este experimento, se determinaron las densidades isopícnicas de las partículas de control y del VIH y SIV tratadas con disolvente y se correlacionaron los cambios de densidad con el contenido medido de lípido del virus de control y del virus tratado.

Los tratamientos con disolvente ampliaron el rango de densidad de las partículas del VIH y del SIV y altas concentraciones de disolvente llevaron el virus a una densidad total mayor, con base en los análisis de transferencias tipo Western y los perfiles de proteína, lo cual es consistente con la pérdida de los lípidos. Específicamente, la Figura 1 describe la densidad de las fracciones en gradiente de sacarosa, como se indica por medio del gráfico de densidad contra el número de la fracción para las partículas virales sometidas a deslipidación utilizando 1% de DIPE, 1% de butanol 1% / DIPE, 1% de butanol, 2% de butanol y 5% de butanol, junto con un grupo de control. El VIH fue deslipidado y purificado por sacarosa. Se cargó el virus sobre gradientes de sacarosa y se centrifugó hasta que se alcanzaron densidades en equilibrio. La Figura 2 representa la concentración de proteína p24 para cada uno de los números de fracción. Como se esperaba, la concentración de la proteína para el grupo de control fue el mas alto con 1% de butanol / DIPE demostrando una concentración relativamente mas alta de p24, aunque registrando una densidad más alta que la de control. Otras concentraciones de p24 que modificaron la densidad fueron exhibidas para 5% de butanol, 2% de butanol 1% de butanol y 1% de DIPE. Las modificaciones de la densidad demostraron un grado de éxito en la deslipidación de las partículas virales.

30

35

40

El virus VIH-1 fue corrido sobre un gradiente de sacarosa y se recolectaron diferentes fracciones y luego se le corrió sobre un gel de SDS-PAGE, se lo transfirió a una membrana, y se hizo la transferencia utilizando sueros de control positivo de un individuo infectado con el VIH-1.

45

Los análisis de transferencias tipo Western se realizaron con anticuerpos para la proteína gp120 de la envoltura y la proteína p24 de la cápside para las diferentes fracciones de densidad derivadas para cada uno de los procesos de deslipidación y el control para las partículas virales VIH-1. El análisis de las transferencias tipo Western de las muestras de control revelaron bandas fuertes de proteína p24 y de proteína gp120 con las fracciones de densidad esperada. La mayoría de los viriones intactos eluyeron en las fracciones 5 - 7. Los diferentes procesos de deslipidación produjeron cambios en la ubicación de las fracciones inmunorreactivas de p24 y de gp120, lo que indica alteraciones en la densidad de las partículas virales tratadas. El tratamiento del VIH-1 con 1% de DIPE produjo un desplazamiento de las bandas inmunorreactivas por fracciones de mayor densidad. El tratamiento del VIH-1 con 1% de DIPE / butanol y separadamente con 1% de butanol también produjo un desplazamiento de las bandas inmunorreactivas por fracciones de mayor densidad. El tratamiento del VIH-1 con 2% de butanol resultó en la pérdida de muchas proteínas, incluyendo una disminución en la proteína p24 y en la proteína gp120, y un incremento en la densidad de las partículas virales. El tratamiento del VIH-1 con 5% de butanol resultó en una pérdida casi completa de la inmunoreactividad de la proteína p24 y la proteína gp120, y un marcado incremento en la densidad de las partículas virales.

50

55

60

En la Figura 3, se muestra un análisis del gradiente isopícnico del VIH deslipidado, indicado por medio de un gráfico del porcentaje de proteína p24 total recuperada contra el número de fracción. Una cantidad sustancial de la proteína p24 total recuperada para las muestras sometidas a los procesos de deslipidación se encuentra a densidades mayores. Para cada uno de las muestras deslipidadas con 1%, 1% de DIPE, 1% de butanol / DIPE, 1% butanol, 2%

65

de butanol, y 5% de butanol, se recuperaron mayores cantidades de proteína p24 con los números de fracción más altos (densidades mayores), comparado con el grupo de control. Ese cambio de densidad se muestra además en la Figura 4, en donde se representa la densidad isopícnica de SIV-mac251, indicada por medio de un gráfico de la concentración de gag p27 contra el número de fracción. Con relación a un control, las muestras de deslipidación por 1% de DIPE y 1% de butanol exhibieron ambas un cambio en densidad.

Ejemplo 10

Reducción en el contenido de colesterol de las partículas virales VIH y SIV sometidas a procedimientos de deslipidación.

Los solicitantes han encontrado que los procesos de deslipidación antes mencionados modifican el nivel de colesterol en las partículas virales. Los cambios en colesterol son indicadores útiles de una deslipidación exitosa ya que la remoción de los lípidos de las partículas virales cambia la cantidad de colesterol y la relación del colesterol con respecto a la proteína. La exposición de las partículas del VIH y del VIS a disolventes orgánicos remueve los lípidos, mientras preserva las proteínas, lo que resulta en pérdida de infectividad viral aunque se mantiene o se mejora la inmunogenicidad de las partículas.

En la Tabla 11, se muestra la relación de colesterol con respecto a la proteína total de las partículas virales deslipidadas por medio de 1%, de DIPE 1% de butanol, 1% de butanol / DIPE, 2% de butanol y 5%de butanol, junto con un control. El VIH fue deslipidado y purificado sobre sacarosa al 20%. Se midió el colesterol con el ensayo Amplex Red, un bioensayo comercialmente disponible de proveedores tales como Molecular Probes, Inc., y se midió la proteína total. Los datos muestran un disminución en el contenido de colesterol, con relación a la proteína total, para cada una de las muestras deslipidadas.

Tabla 11

Los niveles de colesterol y proteína en el VIH sometido a diferentes disolventes que remueven lípido

	Colesterol (µg/ml)	SD (µg/ml)	% de control	Proteína (µg/ml)	Colesterol/proteína
Control	11,06	0,31	100,0	75,45	0,15
1% de DIPE	6,49	0,06	49,15	90,03	0,07
1% de But/DIPE	5,87	0,44	48,14	83,18	0,07
1% de Butanol	5,52	0,60	45,90	82,08	0,06
2% de Butanol	5,14	0,16	43,54	80,53	0,06
5% de Butanol	3,86	0,07	35,08	75,01	0,05

El SIV fue deslipidado y purificado sobre sacarosa al 20%. Se midió el colesterol con el ensayo Amplex Red y se midió la proteína Gag p27. Los datos se expresan como la relación de colesterol con respecto a la proteína Gag p27. El virus tratado con DIPE tenía un 80% menos de colesterol que el control, lo que indica una deslipidación efectiva. De manera similar, con respecto al control, la muestra con 1% DIPE tiene una relación menor de colesterol con respecto a la proteína. El tratamiento con 1% de DIPE efectivamente removió el 80% de colesterol mientras se que se mantuvo la integridad estructural del virus medida por medio de la recuperación de p27. El tratamiento con 5% de DIPE: n-butanol, condujo a una pérdida dramática de la proteína viral, de la proteína total, y del colesterol. Este método fue muy agresivo. El tratamiento con 1% de butanol no fue efectivo en la deslipidación el virus, ya que la cantidad medida de colesterol estaba aún intacta. La recuperación del colesterol total es de aproximadamente del 37% y del 78% para 1% de butanol y 1% de DIPE, respectivamente, y la recuperación correspondiente de la proteína p27 es de aproximadamente el 90% y el 15%, respectivamente, indicando además una deslipidación exitosa de las partículas virales, mientras se conserva aún una porción sustancial de tales partículas virales intactas. Con referencia a las Figuras 5 y 6, se muestran los perfiles de FPLC de SIV-mac251 fraccionado para Gag p27 y colesterol. Los gráficos demuestran que, para una deslipidación con 1% de DIPE la concentración de gag p27 se diferencia sustancialmente del control con números de fracción más altos, mientras que la concentración del colesterol es sustancialmente más baja que la del control para casi todas las fracciones.

Ejemplo 11

Los monos reforzados con el VIH deslipidado tienen mayores títulos de Ab comparado con el grupo reforzado con el

VIH vivo.

5 Cuatro monos se cebaron con un equivalente de 5 µg de p24 de VIH-III B en adyuvante incompleto de Freund. Los monos se separaron luego en dos grupos de dos monos. El grupo 1 (Rll y RFo) recibió 1 µg de VIH-III B deslipidado con DIPE cada mes; el grupo 2 (RFt & Rom) recibió 1 µg de VIH III B vivo cada mes. Se midieron los parámetros celulares mediante inmunocitoquímica. La tinción se realizó a los 7 días después de recibir el refuerzo, mientras que los títulos de Ab y el Ab de neutralización se tomaron 4 semanas después del refuerzo. Se midieron los títulos de Ab para el lisado completo de VIH-III B. Los animales del Grupo 1 (que recibió el virus deslipidado) tenían títulos más altos de Ab que los dos monos de control en el Grupo 2. El virus deslipidado refuerza los títulos mejorados de Ab para el virión completo (datos no presentados).

15 Las respuestas de las células T reunidas para todos los reservorios de péptidos se muestran en la Figura 12. En general, todos los animales mostraron una mejor respuesta a los reservorios del péptido ENV que para los reservorios del péptido GAG. Ambos animales en el Grupo 1 (Rll y RFo) tuvieron respuestas acumuladas para Gag (> 1,5%) y para Env (> 1,5%). Sólo uno de los animales en el Grupo 2 de control (RFt) tuvo una respuesta apreciable para Gag (> 0,5%) y para Env (> 1,5%). El otro animal de control, Rom, tuvo respuestas muy bajas a los reservorios de péptidos.

20 En general, los monos que recibieron el virus deslipidado mostraron una mejor respuesta inmune mediada por células (medida por medio de ICC). Los datos de Ab se correlacionan bien con los datos de ICC para las células CD4⁺. Los animales que muestran respuestas por ICC también tienen buenos títulos de Ab. Los datos de las transferencias tipo Western también se correlacionan bien tanto con los datos de Ab como con los resultados de ICC.

25 Ejemplo 12

Las células dendríticas expuestas al SIV deslipidado estimulan una mejor proliferación de células CD4⁺ en comparación con las células dendríticas expuestas al virus vivo

30 Se emplearon las PBMC de un mono al que no le avanza la enfermedad a largo plazo. La PBMC se aislaron utilizando separación por Ficoll, y los monocitos se cultivaron utilizando la adherencia al plástico de 3 x 10⁷ PBMC en 5 ml de RPMI-10% de FCS a 37° C durante 2 h. Se removieron las células no adherentes y se lavaron suavemente los matraces con PBS caliente 1X. Los monocitos se incubaron con 1000 U/ml de IL-4 y 1000 U/ml de GM-CSF durante 4 días en RPMI-15% de FCS. Este procedimiento generó células dendríticas inmaduras (DC).

35 Las DC inmaduras (2 x 10³) se pulsaron con 50 ng de SIV tratado con AT-2, SIV deslipidado (1% de DIPE con agitación rotacional tipo noria durante 20 min) o SIV vivo durante 3 h a 37° C. Las células se lavaron extensivamente para eliminar el exceso virus y fueron revisadas por SIVp27 para la cantidad de virus residual. Las DC (2 x 10³) se resuspendieron durante 3 días en R-15 con 100 U/ml de TNF-α, IL-4, GM-CSF para inducir la maduración de DC. A continuación, se añadieron 2 x 10⁶ linfocitos de sangre periférica (PBL) a los cultivos de DC, durante 24 - 36 h, antes de realizar el ensayo de proliferación utilizando el kit de ensayo de proliferación celular cyQuant (Molecular Probes) [Nota: se redujo el nivel de los PBL a las células CD8⁺ antes de usarlas]. El ensayo de proliferación se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante (CyQuant-Molecular Probes). En resumen, se sembraron en placa las células y se removió el sobrenadante. Se congeló luego el sedimento aproximadamente durante 1 h, y se añadió una concentración de colorante 4X de CyQuant al sedimento. El sobrenadante de las células lisadas se dejó reposar durante unos 10 minutos antes de leer una placa fluorescente en longitudes de onda de 480 para excitación y de 520 para emisión.

50 El % de proliferación se calculó de la siguiente manera: [(proliferación de prueba - proliferación de control) / (proliferación de control)] x 100. La proliferación de control es la proliferación de PBMC + DC sin añadir el antígeno para proporcionar el ruido de fondo.

55 Las células dendríticas (DC) son poderosas células presentadoras de antígenos a las células B CD4, CD8, CD20 y CD20. Los resultados demuestran que las células dendríticas (DC) pulsadas con SIV deslipidado provocaron una respuesta proliferativa superior al 16% en las células CD4⁺ en comparación con las DC pulsadas con el virus vivo (208.672 con el virus deslipidado frente a 165.616 con el virus vivo). Esto sugiere fuertemente un mejor procesamiento / presentación de los antígenos del virus deslipidado por las DC.

60 La proliferación de células CD4 es un índice funcional de las respuestas CD4 a un epítipo dado. Esta es una lectura más específica que la secreción de IFN-γ, puesto que en las personas infectadas con el VIH, sus células CD4 producen IFN-γ, pero no proliferan en respuesta al antígeno.

65 El virus deslipidado con el método de la presente invención puede aumentar la proliferación de las células CD4⁺ específicas del antígeno lo que conduce a una maduración más eficiente de las células CD8⁺ y a la maduración de las células plasmáticas (células B que producen el antígeno específico Ab). Dado que el control de la infección viral

depende de la proliferación celular de CD4⁺, el método de la presente invención proporciona una vacuna funcional efectiva.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de una partícula viral modificada para la fabricación de una composición farmacéutica útil para proveer protección contra un organismo viral infeccioso, en donde la partícula viral modificada comprende al menos una partícula viral parcialmente deslipidada, en donde la partícula viral parcialmente deslipidada:
- 10 incia una respuesta inmune positiva y,
- 10 incita protección contra un organismo infeccioso, en donde la partícula viral modificada tiene un contenido lipídico menor y una densidad de flotación diferente a la de una partícula viral no modificada, en donde la partícula viral modificada es un virus de inmunodeficiencia, y la partícula viral modificada comprende además una proteína y la proteína es al menos una proteína escogida entre gp41, gp120, o p24, o p27, en donde la partícula viral modificada ha sido deslipidada por medio del empleo de 0,5 a 10% de éter, o 0,5% a 10% de éter en combinación con un alcohol.
- 15 2. El uso de la reivindicación 1, en donde la partícula viral tiene una envoltura lipídica.
3. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la partícula viral modificada es VIH o SIV.
- 20 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 para la fabricación de una composición farmacéutica, en donde la composición farmacéutica es para ser administrada a un individuo que no está infectado con el propósito de incitar una respuesta inmune positiva después de la exposición al virus para prevenir la infección.
- 25 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 para la fabricación de una composición farmacéutica, en donde la composición farmacéutica es para ser administrada a un individuo infectado de tal manera que el medicamento disminuya la severidad de la infección por medio del inicio de una respuesta inmune positiva.
- 30 6. Un método para crear una partícula viral modificada que comprende las etapas de:
- 30 recibir una pluralidad de partículas virales, teniendo cada una una envoltura viral que contiene lípido, en un fluido, en donde las partículas virales son virus de inmunodeficiencia;
- 35 exponer las partículas virales a un proceso de deslipidación; y,
- 35 deslipidar parcialmente las partículas virales en donde el proceso de deslipidación reduce al menos parcialmente el contenido de lípido de la envoltura viral para crear la partícula viral modificada y en donde la partícula viral modificada es capaz de provocar una respuesta inmune y la partícula viral modificada comprende además una proteína y la proteína es al menos una proteína escogida entre gp41, gp120, o p24, o p27, en donde el proceso de deslipidación comprende el empleo de éter en una concentración de 0,5% a 10%, o de 0,5% a 10% de éter en combinación con un alcohol.
- 40 7. Un método para crear un vehículo para el suministro de un antígeno que comprende las etapas de:
- 45 recibir una pluralidad de partículas virales, teniendo cada una una envoltura viral que contiene lípido, en un fluido;
- 45 exponer las partículas virales a un proceso de deslipidación, en donde el proceso de deslipidación comprende el empleo de éter en una concentración de 0,5% a 10%, o de 0,5% a 10% de éter en combinación con un alcohol, y,
- 50 deslipidar parcialmente las partículas virales para crear partículas virales modificadas que actúen como vehículos para el suministro de antígeno, en donde el proceso de deslipidación disminuye al menos parcialmente el contenido de lípido de la envoltura viral para exponer al menos un antígeno viral y en donde al menos un antígeno viral expuesto es capaz de provocar una respuesta inmune, en donde la partícula viral modificada es un virus de inmunodeficiencia, y la partícula viral modificada comprende además una proteína y la proteína es al menos una proteína escogida entre gp41, gp120, o p24, o p27.
- 55 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en donde la partícula viral modificada es VIH o SIV.
- 60 9. El uso de una composición de vacuna que comprende una partícula viral modificada que contiene al menos una partícula viral parcialmente deslipidada que tiene al menos un antígeno viral expuesto que no estaba expuesto en una partícula viral no deslipidada y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la partícula viral parcialmente deslipidada es capaz de provocar una respuesta inmune, en donde la partícula viral modificada es un virus de inmunodeficiencia, y la partícula viral modificada comprende además una proteína y la proteína es al menos una proteína escogida entre gp41, gp120, o p24, o p27, en donde la partícula viral al menos parcialmente deslipidada ha sido deslipidada empleando 0,5 a 10% de éter, o 0,5% a 10% de éter en combinación con un alcohol,

para la fabricación de una composición farmacéutica para proporcionar protección contra una partícula viral infecciosa.

- 5 10. El uso de la reivindicación 9, en donde la respuesta inmune es la producción mejorada de interferón gamma por parte de las células T o la proliferación de células del sistema inmune.
11. El uso de la reivindicación 10, en donde la composición de la vacuna comprende partículas virales parcialmente deslipidadas obtenidas a partir de más de una cepa de un virus o más de un tipo de virus.
- 10 12. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde la partícula viral modificada es VIH o SIV.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 9 para la fabricación de una composición farmacéutica, en donde la composición farmacéutica es para ser administrada a un individuo que no está infectado con el propósito de incitar una respuesta inmune positiva después de exposición al virus para prevenir la infección.
- 15 14. El uso de acuerdo con la reivindicación 9 para la fabricación de una composición farmacéutica, en donde la composición farmacéutica es para ser administrada a un individuo infectado de tal manera que la composición farmacéutica disminuya la severidad de la infección por medio del inicio de una respuesta inmune positiva.
- 20 15. El uso de una pluralidad de partículas virales modificadas con un contenido reducido de lípido para la fabricación de una composición farmacéutica para provocar una respuesta inmune, en donde las partículas virales modificadas pueden ser obtenidas por medio de la obtención de un fluido que contenga las partículas virales que contienen lípido, en donde las partículas virales son virus de inmunodeficiencia;
- 25 poner en contacto el fluido que contiene las partículas virales que contienen lípido con un primer disolvente capaz de extraer lípido de las partículas virales que contienen lípido; en donde la deslipidación comprende el empleo de éter en una concentración de 0,5% a 10%, o de 0,5% a 10% de éter en combinación con un alcohol,
- 30 mezclar el fluido y el primer disolvente;
- 35 permitir que se separen una primera y una segunda fases;
recolectar la segunda fase que contiene las partículas virales modificadas con contenido reducido de lípido, en donde las partículas virales modificadas son capaces de provocar una respuesta inmune y las partículas virales modificadas comprenden además una proteína y la proteína es al menos una proteína escogida entre gp41, gp120, o p24, o p27.
- 40 16. El uso de partículas virales modificadas para la fabricación de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, en donde las partículas virales modificadas pueden obtenerse adicionalmente
- 45 poniendo en contacto la segunda fase que contiene las partículas virales modificadas con carbón vegetal capaz de remover el primer disolvente; y,
- eluyendo la segunda fase que contiene niveles reducidos del primer disolvente del carbón vegetal antes de recolectar esta segunda fase.
- 50 17. El uso de una pluralidad de partículas virales modificadas con contenido reducido de lípido para la fabricación de una composición farmacéutica para
- 55 provocar una respuesta inmune, en donde las partículas virales modificadas pueden obtenerse
- obteniendo un fluido que contiene las partículas virales que contienen lípido, en donde las partículas virales que contienen lípido son virus de inmunodeficiencia; poniendo en contacto el fluido que contiene las partículas virales que contienen lípido con un primer disolvente capaz de extraer lípido de las partículas virales que contienen lípido; en donde el primer disolvente contiene éter en una concentración de 0,5% a 10%, o de 0,5% a 10% de éter en combinación con un alcohol; mezclar el fluido y el primer disolvente;
- 60 poner en contacto dicho fluido y el primer disolvente con un filtro en donde dicho filtro remueve sustancialmente el primer disolvente que contiene el lípido extraído de las partículas virales que contienen lípido y eluir (o recolectar) el fluido que contiene las partículas virales modificadas, en donde las partículas virales modificadas comprenden además una proteína y la proteína es al menos una proteína escogida entre gp41, gp120, o p24, o p27, y las partículas virales modificadas son capaces de provocar una respuesta inmune.
- 65 18. El uso de partículas virales modificadas para la fabricación de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el filtro es carbón vegetal, en particular carbón activado.

19. El uso de partículas virales modificadas para la fabricación de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, en donde el carbón vegetal está contenido en una columna.
- 5 20. El uso de partículas virales modificadas para la fabricación de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, en donde el carbón vegetal está en forma de una suspensión.
- 10 21. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 - 20, en donde la composición farmacéutica se administra a un individuo que no está infectado con el propósito de incitar una respuesta inmune positiva después de exposición al virus para prevenir la infección.
- 15 22. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 - 20, en donde la composición farmacéutica se administra a un individuo infectado de tal manera que la composición farmacéutica disminuya la severidad de la infección iniciando una respuesta inmune positiva.
- 20 23. El uso de partículas virales modificadas que tienen al menos un antígeno viral expuesto que no fue expuesto en una pluralidad de partículas virales infecciosas que contienen lípido para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una infección viral, en donde las partículas virales modificadas pueden obtenerse
- 25 obteniendo plasma de sangre que contiene una pluralidad de partículas virales infecciosas que contienen lípido, conteniendo el plasma las partículas virales infecciosas que contienen lípido;
- poniendo en contacto al plasma que contiene las partículas virales infecciosas que contienen lípido con un primer disolvente capaz de extraer lípido de las partículas virales infecciosas que contienen lípido para producir partículas virales modificadas que tienen un contenido reducido de lípido, en donde el primer disolvente contiene éter en una concentración de 0,5% a 10%, o de 0,5% a 10% de éter en combinación con un alcohol;
- mezclar el plasma y el primer disolvente;
- 30 permitir que se separen una primera y una segunda fases;
- recolectar la segunda fase que contiene las partículas virales modificadas, en donde la partícula viral modificada es virus de inmunodeficiencia, y la partícula viral modificada comprende además una proteína y la proteína es al menos una proteína escogida entre gp41, gp120, o p24, o p27.
- 35 24. El uso de la reivindicación 17, en donde el primer disolvente comprende además un alcohol que tiene ≥ 5 átomos de C, una amina, un hidrocarburo, un éster, un surfactante o una combinación de estos disolventes.
- 40 25. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 20, en donde el éter es un éter C4 a C8 y el alcohol es un alcohol C1 a C8.
- 45 26. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 25 que comprende partículas virales parcialmente deslipidadas obtenidas a partir de más de una cepa de un virus o más de un tipo de virus.
- 50 27. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 26, en donde la partícula viral modificada es VIH o SIV.
- 55
- 60

Figura 1

Densidad de las Fracciones en Gradiente de Sacarosa

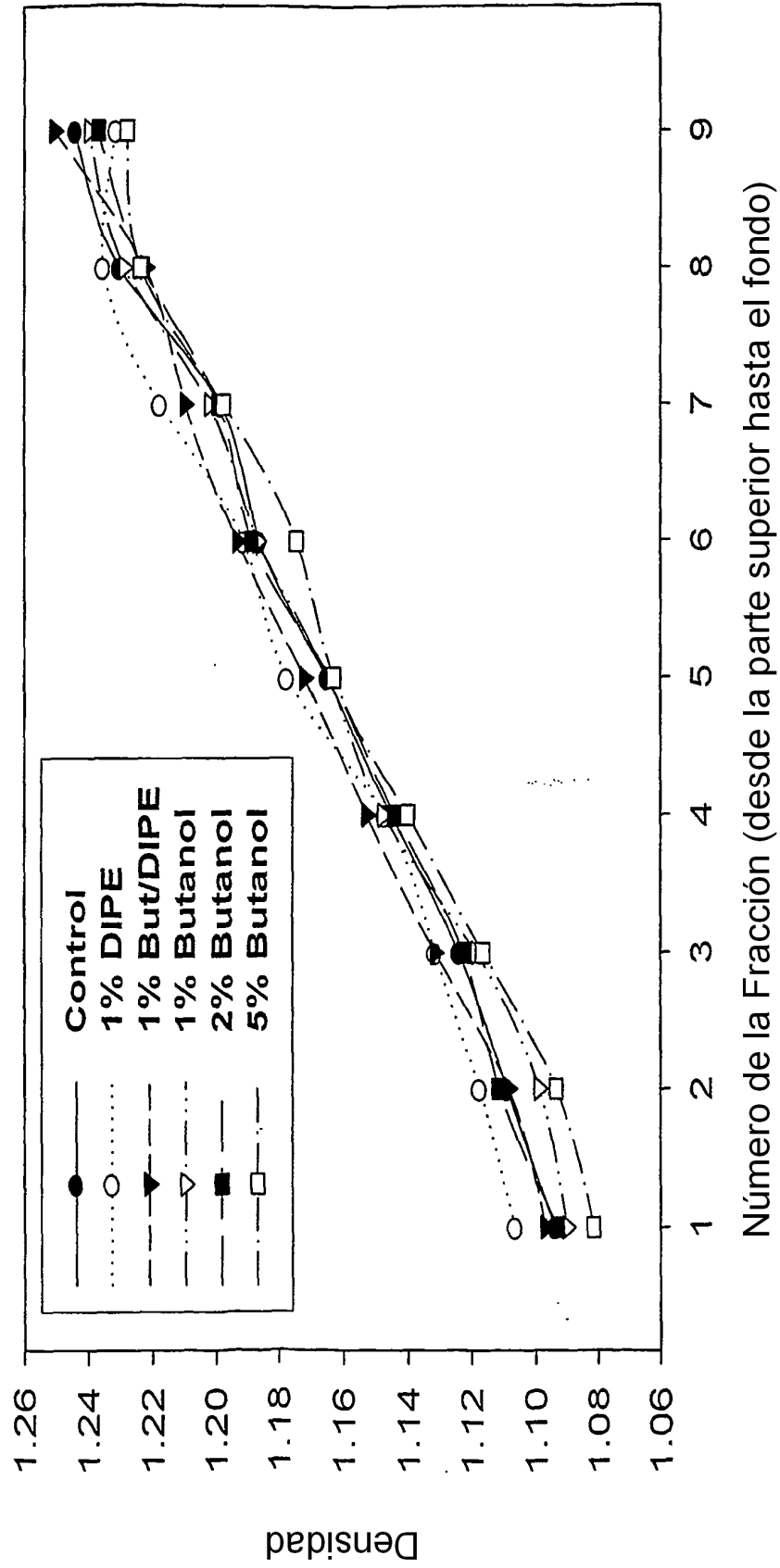


Figura 2
 Densidad de VIH de Control y el Deslipidado

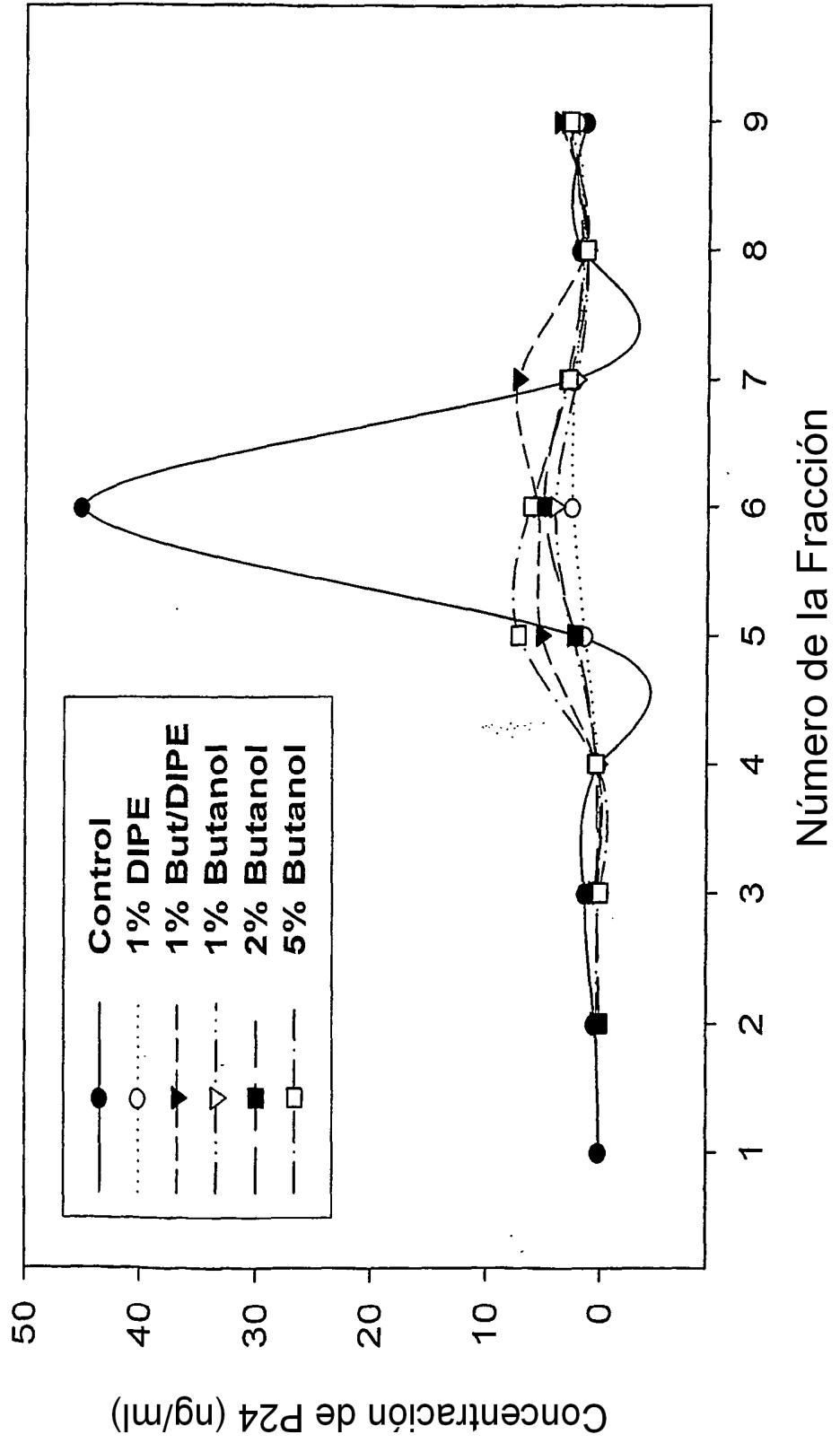


Figura 3
 Análisis del Gradiente Isopícnico del VIH Deslipidado:
 Recuperación de p24 en las Fracciones del Gradiente

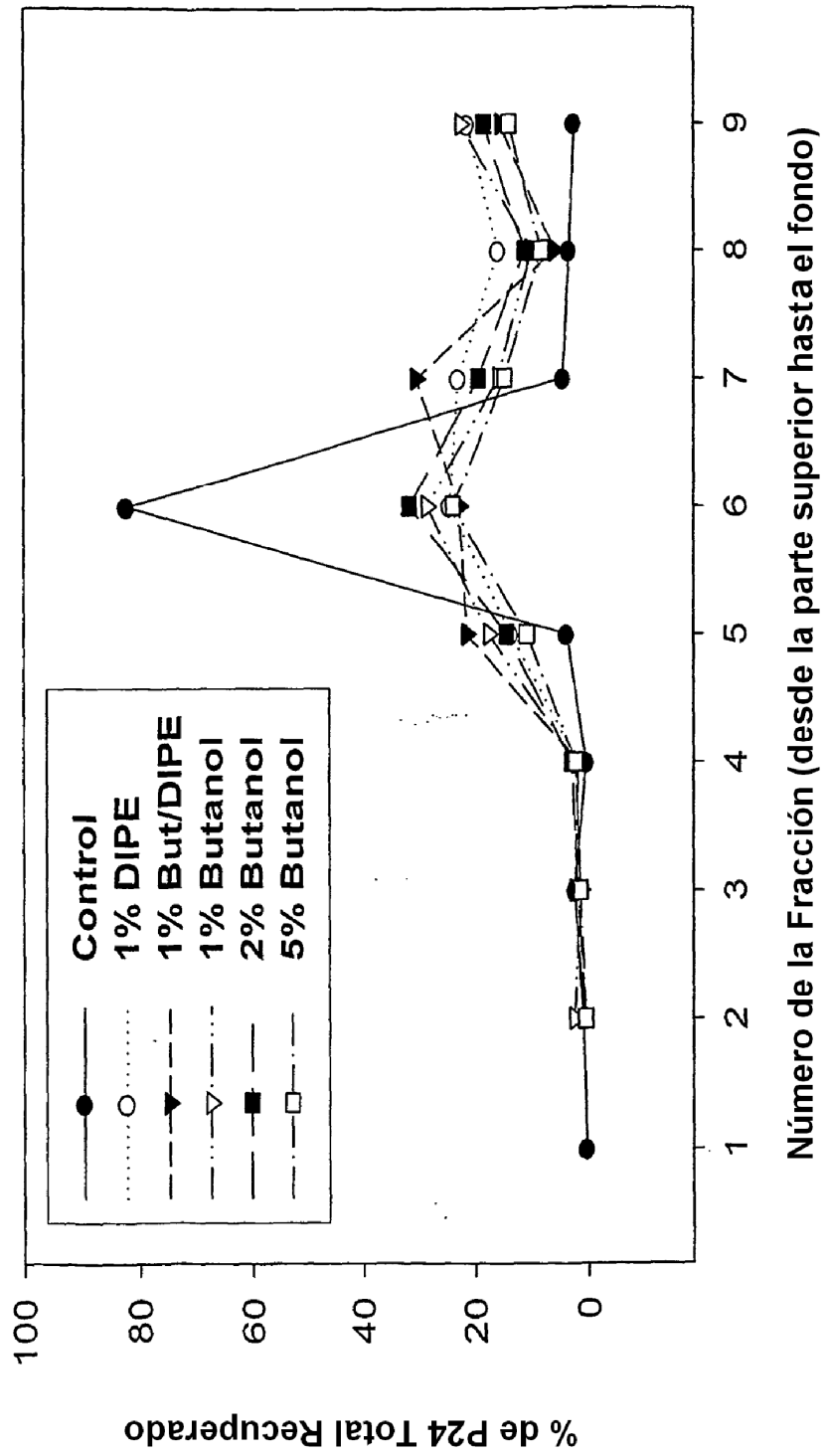


Figura 4
**Centrifugación en Densidad Isopícnica
 del SIV-mac251**

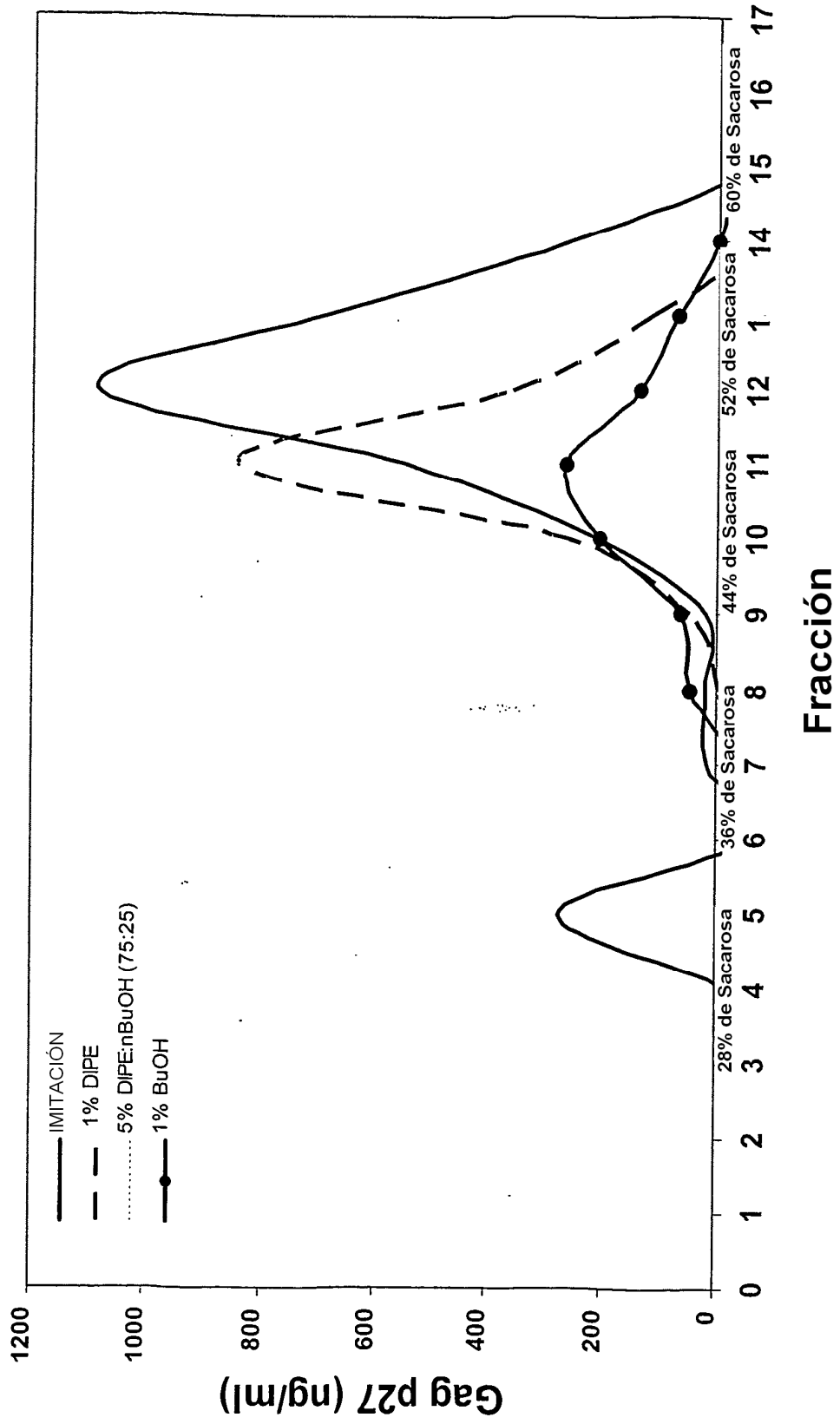


Figura 5
Perfiles de Gag p27 de SIV-mac251
Fraccionado por FPLC

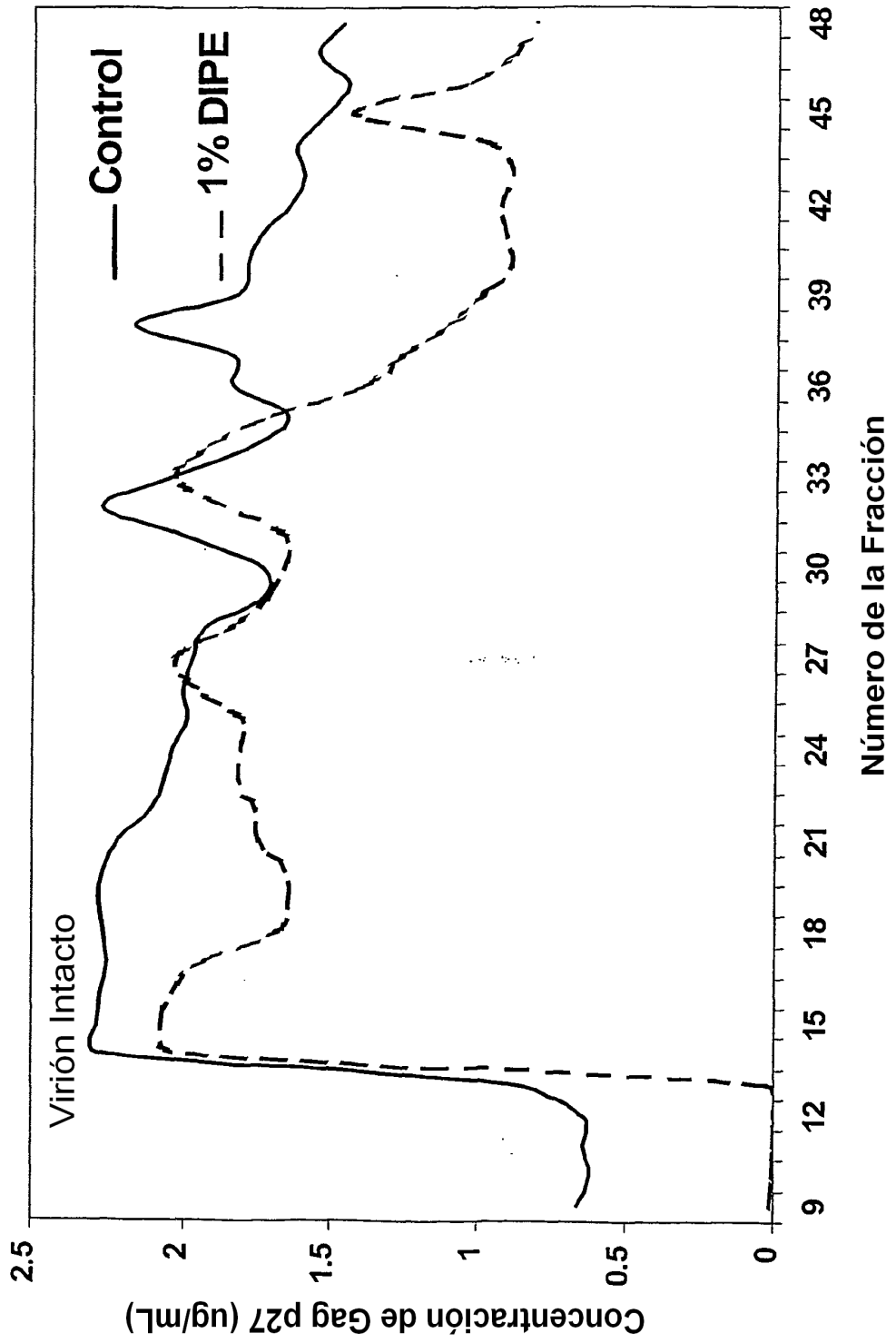


Figura 6

**PERFILES DE COLESTEROL DE SIV-mac251
FRACCIONADO POR FPLC**

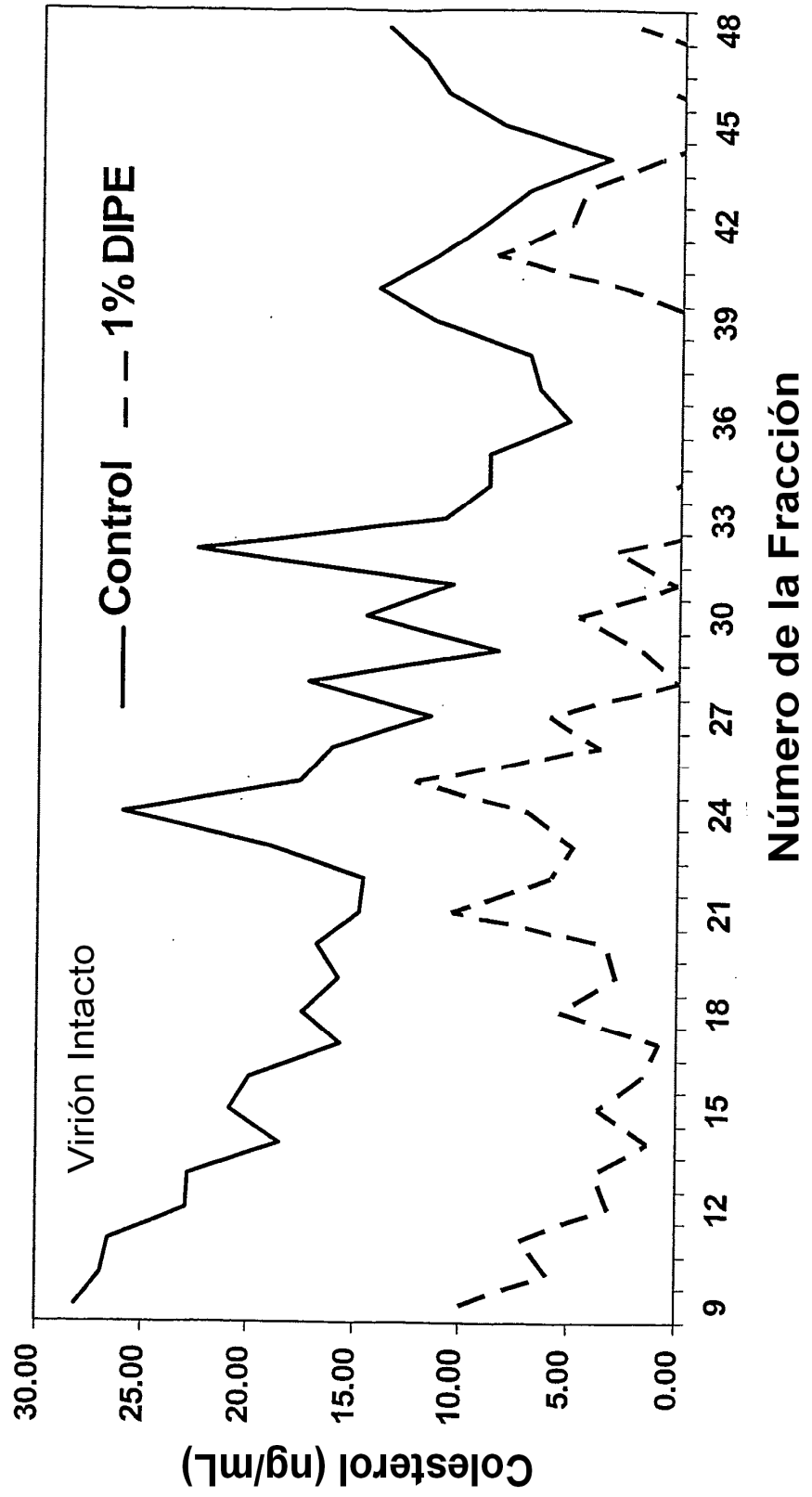


FIGURA 7

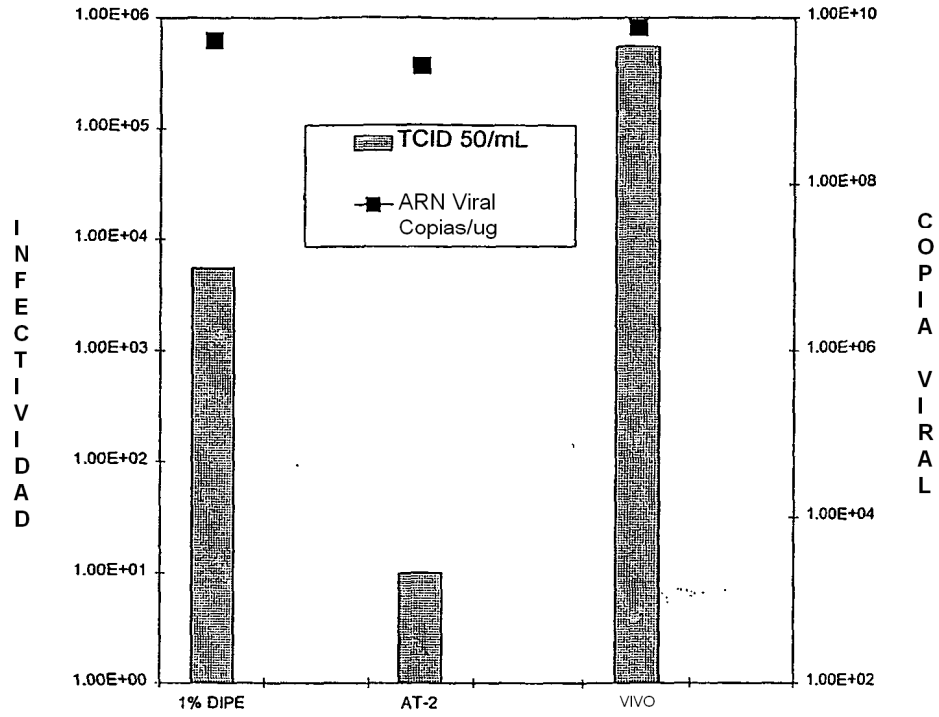


Figura 8A

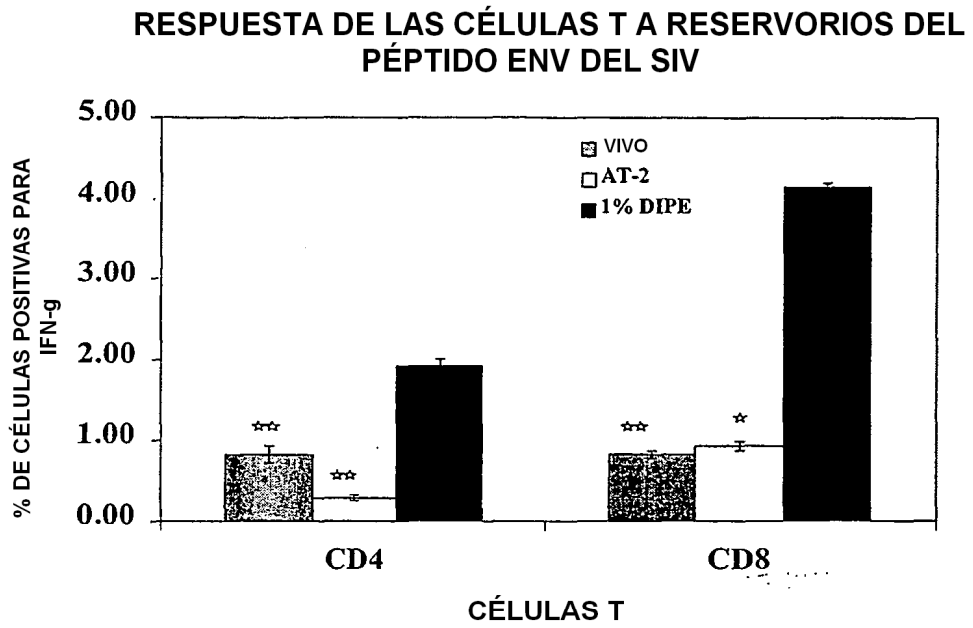


Figura 8B

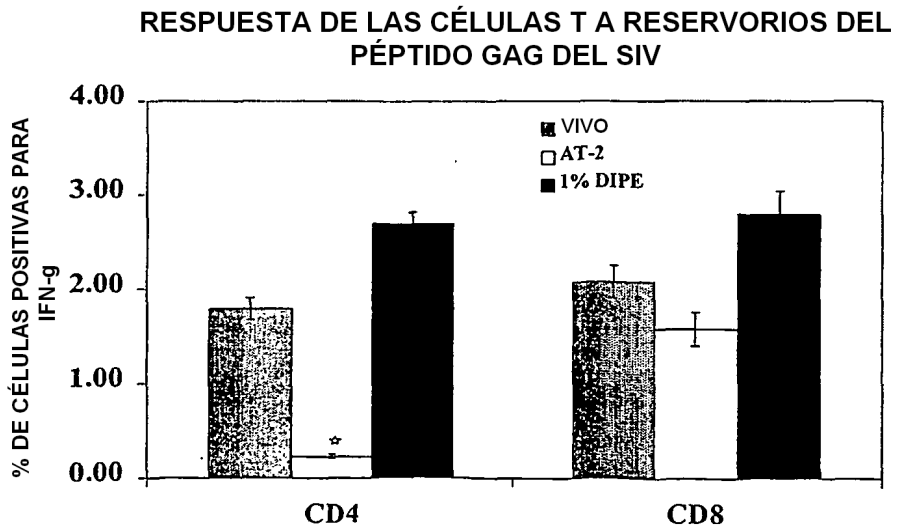


Figura 9

Títulos de Anticuerpo Gp120 de SIVmac251 de Ratones Inmunizados con el Virus Tratado con AT-2

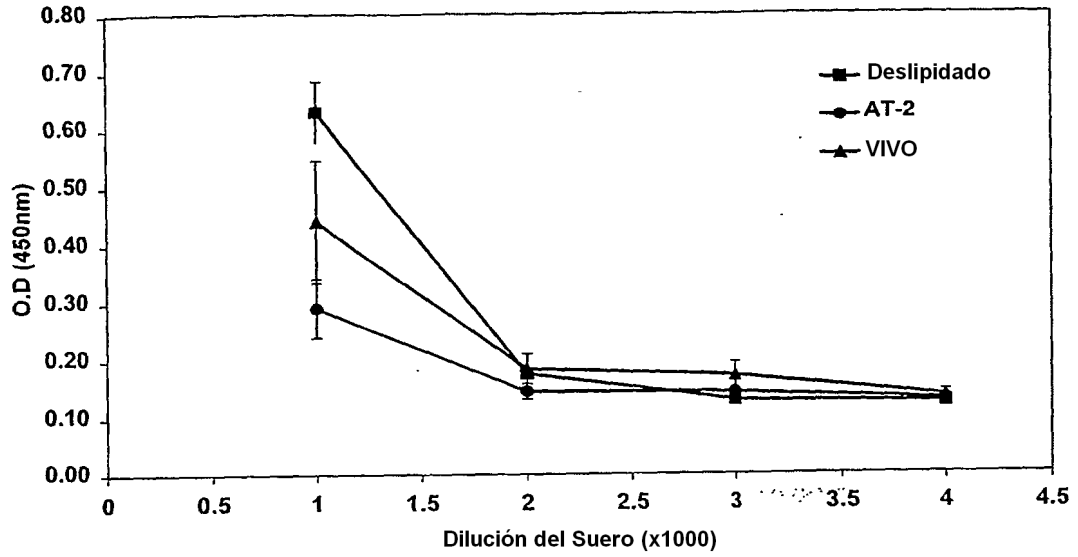


FIGURA 10

Títulos de Anticuerpo Gag p55 de SIVmac251 de Ratones Inmunizados con el Virus Tratado con AT-2

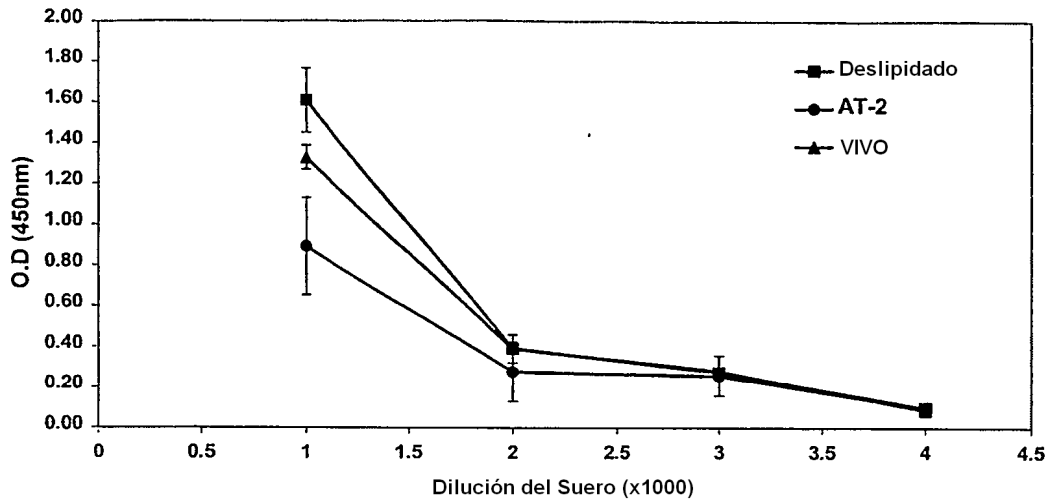


Figura 11

Curva de Correlación del % de IFN-gamma de CD4
VS
OD @ 450 nm de los Títulos de Anticuerpo de la Dilución
más Baja de gp120 & p55

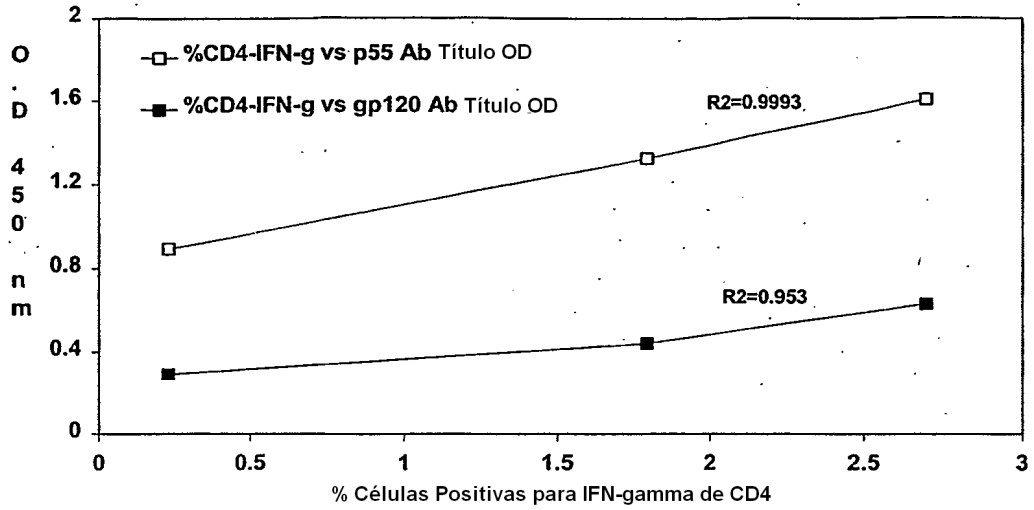


FIGURA 12

% de CÉLULAS POSITIVAS CD4

