(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 389 897**

(51) Int. CI.:

A61K 31/475 (2006.01)
A61K 39/21 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **01962453 .5**
(96) Fecha de presentación: **16.08.2001**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1311267**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **21.05.2003**

(54) Título: **Inmunoterapia retrovírica**

(30) Prioridad:
18.08.2000 AU PQ048800

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2012

(73) Titular/es:
IMMUNAID PTY LTD (100.0%)
60-66 HANOVER STREET
FITZROY, VICTORIA 3065, AU

(72) Inventor/es:
ASHDOWN, MARTIN, LEONARD

(74) Agente/Representante:
CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

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

Inmunoterapia Retrovírica

CAMPO DE LA INVENCIÓN:

La presente invención proporciona un método para tratar una infección retrovírica en un sujeto mamífero. Más particularmente, la presente invención proporciona un método para tratar una infección retrovírica que conduce a una enfermedad relacionada con inmunodeficiencia en un sujeto humano.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN:

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) induce una infección persistente y progresiva que conduce, en la gran mayoría de casos, al desarrollo del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Existen por lo menos dos tipos distintos de VIH: VIH-1 y VIH-2. En los humanos, la infección por VIH conduce eventualmente a incompetencia inmunológica, infecciones oportunistas, disfunciones neurológicas, crecimiento neoplásico, y finalmente la muerte.

El VIH es un miembro de la familia lentivirus de retrovirus. Los retrovirus son virus de envoltura pequeña que contienen un genoma de ARN de hebra sencilla, y se replican por medio de la inserción de un intermedio de ADN en el ADN anfitrión producido por una transcriptasa inversa codificada víricamente. Otros retrovirus incluyen, por ejemplo, virus oncogénicos tales como virus de la leucemia de células T humanas (HTLVI,- II, -III), virus de leucemia en felinos, y los retrovirus del tipo C de murino.

La partícula vírica de VIH consiste de un núcleo vírico, compuesto en parte de proteínas cápsidas designadas p24 y p18, junto con el genoma de ARN vírico y aquellas enzimas requeridas para eventos replicativos tempranos. La proteínas gag miristiladas forman una cubierta vírica externa alrededor del núcleo vírico, que, a su vez, está rodeado por una envoltura de membrana de lípido derivado de membrana celular infectada. Las glucoproteínas de superficie de envoltura de VIH se sintetizan como una proteína precursora única de 160 kilodalton que se divide por una proteasa celular durante gemación vírica en dos glucoproteínas, gp41 y gp120. El gp41 es una glucoproteína de transmembrana y el gp120 es una glucoproteína extracelular que permanece no covalentemente asociada con gyp41, posiblemente en una forma trimérica o multimérica.

La infección por VIH es pandémica y las enfermedades asociadas con VIH representan un problema de salud mundial principal. Aunque se hacen esfuerzos considerables en el diseño de terapéuticos efectivos, actualmente existen fármacos anti-retrovíricos no curativos o terapias contra el SIDA. En intentos para desarrollar tales fármacos, se han considerado diversas etapas del ciclo de vida del VIH como objetivos para intervención terapéutica (Mitsuya et al., 1991).

Se ha puesto atención al desarrollo de vacunas para el tratamiento de infección por VIH. Se ha mostrado que las proteínas de envoltura VIH-1 (gp160, gp120, gp41) son los antígenos principales para anticuerpos anti-VIH presentes en pacientes con SIDA (Barin et al., 1985). Por lo tanto, hasta ahora, estas proteínas parecen ser candidatos más promisorios que actúan como antígenos para el desarrollo de la vacuna de anti-VIH. Diversos grupos han empezado a utilizar varias porciones de gp160, gp120, y/o gp41 como objetivos inmunogénicos para el sistema inmunológico anfitrión (US 5,141,867; WO 92/22654; WO 91/09872; WO 90/07119; US 6,090,392). A pesar de estos esfuerzos, no se ha desarrollado una estrategia de vacuna efectiva para el tratamiento de infección por VIH.

La presente invención proporciona una inmunoterapia alterna para tratar una infección retrovírica.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN:

El presente inventor ha notado que por lo menos dos poblaciones de células inmunes se producen en respuesta a retrovirus que infectan los mamíferos. Más particularmente, el sistema inmunológico de un mamífero infectado con un retrovirus es capaz de montar una respuesta inmune contra el virus a través de un grupo de células aquí denominado de manera general como “células efectoras”, sin embargo, también se produce una segunda población de células que regulan las “células efectoras”, denominado de manera general aquí como “células reguladoras”, que limitan la capacidad del mamífero para controlar efectivamente o erradicar la infección retrovírica.

Aunque no se desea estar limitado por la teoría, se propone que los humanos contienen muchas secuencias que son homólogas o casi homólogas a las secuencias retrovíricas fragmentadas a través de su genoma como elementos heredables estables. De acuerdo con lo anterior, las proteínas codificadas por estas secuencias se pueden reconocer como “auto’ durante el desarrollo de la respuesta inmunológica. La infección posterior mediante un retrovirus también se puede reconocer parcialmente como “auto”, limitando la capacidad del sistema

inmunológico de montar una respuesta inmunológica exitosa. Este propósito, por lo menos en parte, puede explicar porqué hasta ahora ha sido difícil desarrollar una vacuna efectiva contra el VIH.

Se ha proporcionado soporte para esta hipótesis por Rakowicz-Szulczynska y colaboradores (1998 y 2000) quienes han mostrado que algunos antígenos asociados con cáncer de mama son molecularmente e inmunológicamente similares a las proteínas codificadas por VIH-1. Se han hecho observaciones similares para otros cánceres. Adicionalmente, Coll et al. (1995) ha reportado anticuerpos que unen VIH-1 en pacientes con enfermedades autoinmunes tales como síndrome de Sjogren y lupus eritematoso sistémico. Adicionalmente, una búsqueda BLAST de la base de datos del genoma humano con las secuencias del genoma del virus de inmunodeficiencia humana indica muchas regiones de identidad significativas entre los dos genomas.

También se ha notado que el número relativo de células efectoras se expande en respuesta a un antígeno antes que se expandan las células reguladoras. Esto proporciona una oportunidad para evitar la producción de, o destruir, las "células reguladoras" mientras mantiene las "células efectoras".

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona usos y un método como se define en las reivindicaciones adjuntas. En un primer aspecto se describe aquí un método para tratar una infección retrovírica en un sujeto mamífero, el método comprende administrar al sujeto una composición que aumenta las cifras de, y/o activa, las células efectoras dirigidas contra el retrovirus, y posteriormente administrar al sujeto un agente que inhibe la producción de, y/o destruye, las células reguladoras, en donde el tiempo de administración del agente se selecciona de tal manera que la actividad de las células efectoras no se reduce significativamente.

Existen muchas formas en las que se puede aumentar el número, y/o actividad, de las células efectoras dirigidas contra un retrovirus. En algunos casos, esto ocurriría por una infección inadvertida con el retrovirus, por ejemplo, un pinchazo de aguja de una jeringa que contiene el virus. Como se sabe, los trabajadores e investigadores de la salud corren el riesgo de infección vírica a través de lesión por pinchazo de aguja. De manera similar, el público en general también está expuesto a este peligro a través de jeringas desechadas, particularmente en la playa, y los asaltos con dichas jeringas. Por lo tanto, luego de exposición sospechosa a un retrovirus, particularmente VIH, el sujeto mamífero puede utilizar el método de la presente invención.

El método también se puede utilizar para tratar un sujeto mamífero que se ha infectado con un retrovirus durante algún tiempo. Aunque el sistema inmunológico de dicho sujeto que ya se ha expuesto al retrovirus, la adición de antígenos retrovíricos adicionales puede conducir a una respuesta de célula efectora adicional con oportunidad posterior a la ablación de los reguladores de estos nuevos efectores.

Los sujetos infectados con un retrovirus se pueden tratar con fármacos antiretrovíricos para mantener baja la carga vírica. Dichos sujetos también se pueden administrar con la composición para iniciar una nueva respuesta inmunológica de célula efectora mientras que la administración posterior del agente sometería a ablación a las células reguladoras.

En una realización preferida del primer aspecto, el agente se administra aproximadamente cuando las cifras de célula T CD8+CD4 han alcanzado un pico en la respuesta a la administración de la composición.

Adicionalmente, se prefiere que el agente se administre aproximadamente cuando las cifras de partículas víricas ha empezado a estabilizar o aumentar luego de la administración de la composición.

En todavía otra realización preferida del primer aspecto, el reestímulo de las células efectoras en un sujeto mamífero infectado se puede lograr por una composición que comprende un polipéptido antigénico retrovírico. Preferiblemente, el polipéptido antigénico se proporciona al sujeto al administrar una vacuna que comprende el polipéptido antigénico de retrovirus y un portador farmacéuticamente aceptable. Más preferiblemente, la vacuna comprende adicionalmente un adyuvante

En otra realización el polipéptido antigénico se proporciona al sujeto al administrar una vacuna de ADN que codifica el polipéptido antigénico retrovírico.

En todavía otra realización, el polipéptido antigénico se proporciona al sujeto mediante el consumo de una planta transgénica que expresa el polipéptido antigénico retrovírico.

El retiro del tratamiento antiretrovírico provoca normalmente una re-expansión rápida de células efectoras contra el virus re-emergente en un sujeto infectado. De acuerdo con lo anterior, en el momento apropiado el agente se puede administrar para ablación de las células reguladoras sin la necesidad de administrar una composición como se define aquí.

Por lo tanto, en un segundo aspecto descrito aquí es un método para tratar una infección retrovírica en un sujeto mamífero, el método comprende exponer el sujeto a terapia de fármaco antiretrovírica, y posteriormente administrar al sujeto un agente que inhibe la producción de, y/o destruye, células reguladoras, en donde el agente se administra después que ha concluido la terapia de fármaco antiretrovírica y una expansión resultante en las cifras retrovíricas ha conducido a un aumento en las cifras, y/o activación, de células efectoras dirigidas contra el retrovirus, y en donde el tiempo de administración del agente se selecciona de tal manera que la actividad de las células efectoras no se reduce significativamente.

En una realización preferida del segundo aspecto, el agente se administra aproximadamente cuando las cifras de célula T CD8+CD4 han alcanzado un pico en respuesta a la conclusión de la terapia de fármaco antiretrovírica.

Luego de la remoción de la terapia de fármaco antiretrovírica aumenta la carga vírica (por ejemplo, ver Daar et al., 1998). Esto resulta en una expansión y/o activación de células efectoras dirigidas contra el retrovirus que empieza a estabilizar la carga vírica. Aproximadamente cuando las cifras de retrovíricos han alcanzado un pico, o ha comenzado la reducción después de este pico, es que se debe administrar el agente.

De acuerdo con lo anterior, en una realización preferida adicional del segundo aspecto, el agente se administra aproximadamente cuando las cifras de partículas víricas han alcanzado un pico, o empieza a reducir después de este pico, en respuesta a la conclusión de la terapia de fármaco antiretrovírica.

Preferiblemente, el agente utilizado en la ablación de la célula reguladora se selecciona del grupo que consiste de fármacos anti-proliferativos, radiación, y un anticuerpo que se une específicamente a células T CD4+. Preferiblemente, el fármaco anti-proliferativo se selecciona del grupo que consiste de vinblastina y vinblastina anhidra.

Preferiblemente, los retrovirus se seleccionan del grupo que consiste de H1V-1, VIH-2, HTLV-1 y HTLV-2.

Como se apreciará fácilmente por aquellos expertos en la técnica, los métodos se pueden repetir para proporcionar un tratamiento más completo.

Preferiblemente, el sujeto mamífero es un humano.

En un tercer aspecto, se describe aquí el uso de un agente que inhibe la producción de, y/o destruye, células reguladoras en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección retrovírica en un sujeto mamífero.

En una realización preferida del tercer aspecto, el agente se selecciona del grupo que consiste de fármacos antiproliferativos, y un anticuerpo que se une específicamente a células T CD4+.

En cada aspecto descrito anteriormente, se ha retirado la ablación de la proteína “reguladora” que permite que la población “efectora” reduzca o erradique la carga retrovírica como cualquier regulación por disminución de los efectores (debido a mecanismos de autotolerancia).

A través de esta especificación la palabra “comprende”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, se entenderá que implica la inclusión de un elemento indicado, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas.

La invención se describirá aquí adelante por vía de las siguientes Figuras y Ejemplos no limitantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS:

Figura 1: Curso de tiempo de MAIDS en ratones B6 infectados con LP-BM5.

Figura 2: Efecto de una dosis única de vinblastina (6 mg/kg i.p.) en progresión MAIDS a 10 semanas post-infección.

Figura 3: Histología de bazo de ratones tratados con vinblastina de 10 semanas post infección.

Figura 4: Protección de MAIDS en 20 semanas post-infección seguido por terapia con vinblastina. n=5.

Figura 5: Reexposición con virus MAIDS luego de terapia protectora con vinblastina. n=5.

Figura 6: Efecto de vinblastina en el día 14 en porcentajes de célula de bazo en MAIDS de ratones infectados (MAIDS+) y de control (MAIDS-). n=3.

Figura 7: Protocolo experimental de transferencia de bazo.

Figura 8: Transferencias de célula de bazo de ratones donantes infectados con MAIDS. n=7.

Figura 9: Protocolo experimental de agotamiento in vivo.

Figura 10. Agotamiento in vivo de células CD4+ o CD8+ en el día 14 post infección. n=5.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN:

Respuesta inmunológica a Infección Retrovírica

Como se utiliza aquí el término “tratar” o “treta” significa que se logra una reducción en la carga retrovírica. Más preferiblemente, la carga retrovírica se erradica completamente.

Aunque aún no se ha determinado la naturaleza precisa de las “células reguladoras” se ha establecido que estas células incluyen una subpoblación de células CD4+.

Las células CD4+ expresan el marcador conocido en la técnica como CD4. Normalmente, el término “células T CD4+” como se utiliza aquí no se refiere a células que también expresan CD8. Sin embargo, este término puede incluir células T que también expresan otros marcadores antigénicos tales como CD25.

Aunque aún no se ha determinado la naturaleza precisa de las “células efectoras”, se sabe que estas células incluyen la población de células T conocida como células CD8+.

Como se utiliza aquí, el término “por ablación” o “ablación” cuando se refiere a la exposición de las “células reguladoras” al agente significa que el número, y/o actividad, de la células reguladoras se regula por disminución mediante el agente. Más preferiblemente, el número, y/o actividad, de las células reguladoras se erradica completamente por el agente.

Agentes que Inhiben la Producción de, y/o Destruyen, las Células Reguladoras

El agente puede ser cualquier factor o tratamiento que resulta selectivamente o no selectivamente en la destrucción, o la inhibición de la producción, de las células reguladoras. Por ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo específico CD4+ para activar específicamente las células T CD4+. Sin embargo, en algunos casos se puede utilizar un agente no selectivo, tal como un fármaco antiproliferativo o radiación, los cuales destruyen las células divididas.

El término “fármaco anti-proliferativo” es un término que se entiende bien en la técnica y se refiere a cualquier compuesto que destruye las células divididas o las inhibe a partir de la proliferación adicional experimentada. Los fármacos anti-proliferativos incluyen, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan, clorambucilo, hexametil-melamina, tiotepa, busulfan, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, dacarbazina, metotrexato, fluorouracilo, floxuridina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina, vinblastina, vinblastina anhidra, vincristina, etoposida, teniposida, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, L-asparaginasa, cisplatina, mitoxantrona, hidroxiurea, procarbazina, mitotano, aminoglutetimida, prednisona, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroprogesterona, acetato de megestrol, dietilstilbestrol, etinil estradiol, tamoxifen, propionato de testosterona, isótopos radioactivos, cadena A de ricino, taxol, toxina difteria y exotoxina A seudomonas.

Tiempo de Exposición del Sujeto al Agente

Como se describió anteriormente, la presente invención se basa en la observación que el número relativo de células efectoras se expande en respuesta a un antígeno antes de las células reguladoras. De acuerdo con lo anterior, como se utiliza aquí, el término “la actividad de las células efectoras no se reduce significativamente” significa que el tiempo de administración del agente es tal que el agente ejerce un efecto proporcionalmente mayor contra las células reguladoras que las células efectoras. Se prefiere claramente que el agente se administre en un momento en donde la relación del efecto contra las células reguladoras al efecto contra las células efectoras es mayor.

Se ha reportado que después de la falla inicial en la carga vírica luego de tratamiento anti-retrovírico, por ejemplo en sujetos infectados con VIH, existe un aumento en la carga vírica y un estímulo posterior de la respuesta inmunológica al aumento en la carga vírica luego del retiro del tratamiento (Oritz et al., 1999; Kilby et al., 2000; Lifson et al., 2000). De acuerdo con lo anterior, la exposición del sujeto a la terapia anti-vírica seguido por la remoción de la terapia se puede utilizar para aumentar las cifras de, y/o activar, las células efectoras dirigidas contra el retrovirus que permite una expansión de célula reguladora que se puede dirigir.

Se puede determinar un ejemplo en el momento apropiado para administrar el agente mediante referencia a Daar et al. (1998). Este documento proporciona la carga vírica, y los niveles de células T CD8+ y CD4+, de un paciente quien está tomando terapia antiretrovírica altamente activa (también conocida como HEART). Después del aumento inicial en la carga vírica, ocurre una reducción en la carga vírica (hombro en el día ~225) cuando las células T CD8+ han alcanzado números máximos, y por lo tanto efecto (ver Figura 1 de Daar et al., 1998). Inmediatamente más allá de este punto de tiempo (unos pocos días) las células T CD8+ empiezan a disminuir y la carga vírica se empieza a estabilizar después de declinación. Se puede utilizar este punto (los picos) como un punto de inferencia para predecir la expansión clónica de las células reguladoras posteriores y por lo tanto un punto de intervención para ablación de la célula reguladora. Es cuando la carga vírica detiene la disminución que las células reguladoras han regulado por disminución las células efectoras, pero es antes de este punto que se debe aplicar el agente, a saber cuando la mayor parte de reguladores están en expansión clónica (mitosis).

Se pueden utilizar técnicas conocidas en el arte para supervisar la población que crece de las células reguladoras luego el estímulo de una respuesta inmunológica.

Se pueden recolectar muestras de sangre serial y se detectan cuantitativamente para todos los subgrupos CD4+ mediante análisis FACS. Esta supervisión FACS necesitará ser mantenida hasta que las células reguladoras se expandan clónicamente en respuesta al estímulo. En la mayoría de casos, este punto de tiempo se necesitará determinar empíricamente en los sujetos en diferentes etapas de infección cuando pueden varias las cinéticas de la respuesta inmunológica. Otros ensayos posibles incluyen ensayos de proliferación/activación de linfocito y diversos ensayos de nivel de citoquina (por ejemplo un ensayo para IL-6).

Otra vía para determinar el punto de tiempo para administrar el agente es para supervisar la carga vírica luego del estímulo de la respuesta inmunológica. Se prevé que la carga vírica se reduce debido a la actividad de las células efectoras, sin embargo, el aumento posterior en las células reguladoras regularía por disminución las células efectoras lo que resulta en hacer lenta la reducción de la carga vírica. De acuerdo con lo anterior, el agente se puede administrar antes de hacer lenta la reducción en la carga vírica. Las técnicas conocidas en el arte, por ejemplo RT-PCR, se pueden utilizar para supervisar la carga vírica en estas circunstancias.

La supervisión puede necesitar ser muy frecuentemente, por ejemplo cada pocas horas, para asegurar que el punto de tiempo correcto se seleccione para la administración del agente.

Óptimamente, se continúa supervisión para determinar el efecto de la ablación insuficiente del agente, re-emergencia de las células reguladoras o aumentos en la carga vírica dentro de, por ejemplo, aproximadamente 7 días de tratamiento necesitará que el método se deba repetir. Dichos ciclos repetidos de tratamiento pueden generar memoria inmunológica. Por lo tanto es posible que la presente invención, utilizada en modo repetitivo, pueda proporcionar algún efecto protector profiláctico.

Polipéptidos Antigénicos

Como se utiliza aquí, un polipéptido “antigénico” es cualquier secuencia de polipéptidos que contiene un epítopo que es capaz de producir una respuesta inmunológica contra el retrovirus. Típicamente, el polipéptido antigénico comprenderá una secuencia que es altamente conservada en la mayor parte de aislados retrovíricos. Sin embargo, se prevé que un retrovirus particular que infecta un individuo se puede caracterizar y un polipéptido antigénico producido que coincide con las secuencias del aislado maximiza la posibilidad de una respuesta inmunológica efectiva.

La información con respecto a los antígenos de VIH tales como gp120 y otros candidatos se puede encontrar en Stott et al (1998).

Los polipéptidos antigénicos se pueden proporcionar en cualquier forma conocida en la técnica que conduce a una respuesta inmunológica. Los polipéptidos antigénicos pueden ser, por ejemplo, naturales, recombinantes o sintéticos. Dichos polipéptidos antigénicos incluyen, pero no se limitan a, proteínas víricas que son responsables para adhesión a los receptores de superficie celular para iniciar el proceso de infección tal como glucoproteínas de envoltura.

Se pueden preparar polipéptidos antigénicos naturales, por ejemplo, al proporcionar retrovirus atenuados, retrovirus inactivados por calor o cualquier otro retrovirus muerto.

Los polipéptidos antigénicos se pueden proporcionar como polipéptidos aislados en una composición de vacuna. En este caso el polipéptido se puede purificar de células infectadas retrovíricas, expresadas y aisladas de células recombinantes, o se produce sintéticamente utilizando un sintetizador de péptido.

A menos que se indique otra cosa, las técnicas de ADN recombinante utilizadas en la presente invención son procedimientos estándar, bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Dichas técnicas se describen y explican a través de la literatura en fuentes tales como, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), t.a. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M. Glover y B.D. Hames (editors), ADN Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F.M. Ausubel et al. (Editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, que incluyen todas las actualizaciones hasta la fecha).

Vacunas

Se pueden preparar vacunas a partir de uno o más polipéptidos retrovíricos. La preparación de las vacunas que contienen un polipéptido antigénico se conoce por un experto en la técnica. Típicamente, dichas vacunas se preparan como inyectables, u orales, como soluciones o suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de inyección o también se puede preparar para consumo oral. La preparación también se puede emulsificar, o la proteína se encapsula en liposomas. Los polipéptidos antigénicos se mezclan frecuentemente con portadores/excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los portadores/excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos.

Adicionalmente, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsificantes, agentes que regulan el pH, y/o adyuvantes que mejoran la efectividad de la vacuna.

Como se utiliza aquí, el término “adyuvante” significa una sustancia que no mejora específicamente la respuesta inmunológica a un polipéptido antigénico. Ejemplos de adyuvantes que pueden ser efectivos incluyen pero no se limitan a: hidróxido de aluminio, N-acetil-muramil-L-treonil- D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado como nor- MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-Lalanina- 2-(1’-2’-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)- etilamina (CGP 19835A, denominado como MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, lípido A monofosforilo, dimicolato de trehalosa y el esqueleto de pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de 2% de escualeno/Tween 80. Ejemplos adicionales de adyuvantes incluyen hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de potasio y aluminio (alum), endotoxina bacteriana, lípido X, Corynebacterium parvum (Propionobacterium acnes), Bordetella pertussis, poliribonucleótidos, alginato de sodio, lanolina, lisolecitina, vitamina A, saponina, liposomas, levamisol, DEAE-dextrano, copolímeros de bloque u otros adyuvantes sintéticos. Dichos adyuvantes están comercialmente disponibles de diversas fuentes, por ejemplo, Adyuvante Merck 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.) o Adyuvante Completo y Adyuvante Incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan).

La proporción del polipéptido antigénico y el adyuvante puede variar sobre un rango amplio mientras que ambos están presentes en cantidades efectivas. Por ejemplo, puede estar presente hidróxido de aluminio en una cantidad de aproximadamente 0.5% de la mezcla de vacuna (base Al_2O_3). De manera conveniente, se formulan vacunas que contienen una concentración final de polipéptido antigénico en el rango de 0.2 a 200 µg/ml, preferiblemente 5 a 50 µg/ml, más preferiblemente 15 µg/ml.

Después de formulación, la vacuna se puede incorporar en un recipiente estéril que luego se sella y se almacena a una temperatura baja, por ejemplo 4°C, o se puede secar por congelado. La liofilización permite almacenamiento a largo plazo en una forma estabilizada.

Las vacunas se administran convencionalmente parenteralmente, mediante inyección, por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales. Para los supositorios, los aglutinantes y portadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios se pueden formar de mezclas que contienen el ingrediente activo en el rango de 0.5 % a 10 %, preferiblemente 1 % a 2 %. Las formulaciones orales incluyen dichos excipientes normalmente empleados como, por ejemplo, grados farmacéuticos de mannitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10 % a 95 % del ingrediente activo, preferiblemente 25 % a 70 %. Cuando se liofiliza la composición de vacuna, el material liofilizado se puede reconstituir antes de administración, por ejemplo como una suspensión. La reconstitución se efectúa preferiblemente en regulador.

Se pueden proporcionar cápsulas, comprimidos y píldoras para administración oral a un paciente con un recubrimiento entérico que comprende, por ejemplo, Eudragit “S”, Eudragit “L”, acetato de celulosa, ftalato de acetato de celulosa o hidroxipropilmetil celulosa.

Vacunación de ADN

La vacunación de ADN implica la introducción directa del ADN in vivo que codifica un antígeno en los tejidos de un sujeto para la expresión del antígeno mediante las células del tejido del sujeto. Dichas vacunas se pueden denominar aquí como “vacunas de ADN” o “vacunas con base en ácido nucleico”. Las vacunas de ADN se describen en US 5,939,400, US 6,110,898, WO 95/20660 y WO 93/19183.

La capacidad del ADN inyectado directamente que codifica un antígeno para provocar una respuesta inmunológica protectora se ha demostrado en numerosos sistemas experimentales (ver, por ejemplo, Conry et al., 1994; Cardoso et al., 1996; Cox et al., 1993; Davis et al., 1993; Sedegah et al., 1994; Montgomery et al., 1993; Ulmer et al., 1993; Wang et al., 1993; Xiang et al., 1994; Yang et al., 1997).

Hasta la fecha, la mayoría de vacunas de ADN en sistemas de mamífero se han basado en promotores víricos derivados de citomegalovirus (CMV). Estos tienen buena eficiencia en la inoculación de músculo y piel en un número de especies de mamífero. Un factor conocido para afectar la respuesta inmunológica provocada mediante inmunización de ADN es el método de suministro de ADN, por ejemplo, las rutas parenterales pueden producir bajos índices de transferencia de gen y producen variabilidad considerable de la expresión de gen (Montgomery et al., 1993). La inoculación de alta velocidad de plásmidos, utilizando una pistola de genes, mejora las respuestas inmunes de los ratones (Fynan et al., 1993; Eisenbraun et al., 1993), presumiblemente debido a una mayor eficiencia de transfección de ADN y presentación de antígeno más efectiva mediante células dendríticas. Los vectores que contienen la vacuna con base en ácido nucleico también se puede introducir en el anfitrión deseado mediante los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, dextrano DEAE, precipitación de fosfato de calcio, lipofección (fusión de lisosoma), o un transportador del vector de ADN.

Vacunas Derivadas de Plantas Transgénicas

Las plantas transgénicas que producen un polipéptido antigénico retrovírico se pueden construir utilizando los procedimientos bien conocidos en la técnica. Un número de vacunas comestibles derivadas de planta se han desarrollado actualmente para patógenos de animales y humanos (Hood and Jilka, 1999). Las respuestas inmunes también han resultado de la inmunización oral con plantas transgénicas que producen partículas similares a virus (VLP), o virus de plantas quiméricas que exhiben epítopos antigénicos (Mason et al., 1996; Modelska et al., 1998; Kapustra et al., 1999; Brennan et al., 1999). Se ha sugerido que la forma particulada de estos VLP o virus quiméricos puede resultar en mayor estabilidad del antígeno en el estómago, aumentando efectivamente la cantidad de antígeno disponible para la captación en el intestino (Mason et al. 1996, Modelska et al. 1998).

EJEMPLOS

Con el fin de demostrar la presente invención se utiliza un modelo de SIDA de murino.

Una patología de SIDA en murino (MAIDS) inducida por virus de leucemia de murino LP-BM5 (MuLV) en ratones susceptibles es una herramienta efectiva para investigar mecanismos de inmunodeficiencia inducida por retrovirus. El modelo de animal MAIDS exhibe un número de características de SIDA humano. La infección de una cepa susceptible tal como ratones C57BL/6 con LP-BM5 conduce a esplenomegalia crónica, hipergamaglobulinemia y desarrollo de inmunodeficiencia en las células T y B. In vitro, existe un deterioro progresivo en la respuesta de las células T y células B a los estímulos antigénicos o mitogénicos específicos. In vivo, los ratones infectados llegan a ser incrementadamente susceptibles a exposición con una variedad de organismos oportunistas y pueden desarrollar linfoma de célula B. Las muertes primero se observaron en 8-10 semanas post-infección (pi), y todos los ratones murieron dentro de 24 semanas (Figura 1). Estas alteraciones en la función inmune reflejan los cambios complejos en el fenotipo y función de todos los componentes de la red inmune.

1. Efecto Terapéutico de una Dosis Única de Vinblastina Administrada en Diferentes Momentos Post Infección

El tratamiento con una dosis única del agente mitótico vinblastina (Vb) en diferentes momentos pi es capaz de evitar el desarrollo/progresión de MAIDS. La Figura 2 muestra el efecto en el desarrollo de MAIDS (representado por peso de bazo promedio a 10 semanas pi) de una dosis única i.p. de 6 mg/kg de Vb dado en varios tiempos pi que varían de 6 hr a 28 días. Claramente, el tratamiento Vb es remarcablemente terapéutico cuando se administra a 6 hr o 14 días pi con 100 % (10/10) y 74 % (20/27) de los ratones, respectivamente, no se muestran signos de desarrollo MAIDS en 10 semanas pi (como se determina mediante el peso de bazo, histología y análisis FACS). Se observa un efecto protector similar en algunos ratones tratados en 6 días (6/13 o 46 %) pi. Aunque no tan pronunciado como la protección vista después del día 14 de tratamiento, aún se observa la protección moderada del desarrollo MAINS. Sin embargo, también es importante notar que el tratamiento en muchos otros puntos de tiempo, tal como día 2 y día 7 pi, resulta en no protección contra desarrollo de MAIDS. La protección total del desarrollo de MAIDS visto en ratones a los que se les da Vb a 6 hrs pi no se espera como los replicados de virus en células activamente

replicantes que son el objetivo del fármaco anti-mitótico así cualesquier células infectadas con el virus se matan mediante la prevención Vb del virus de establecer rápidamente una infección en el anfitrión. Sin embargo, el efecto altamente protector observado después de un tratamiento único con Vb en 14 días pi es notable que, en esta etapa, la infección vírica esté bien establecida y los procesos de enfermedad temprana estén muy avanzados. Proponemos que este efecto altamente terapéutico se puede deber al Vb que dirige un subconjunto particular de células reguladoras inmunes durante su fase de expansión y por lo tanto altera la respuesta inmunológica a la infección vírica. Se hace hipótesis de que la regulación por disminución de células efectoras inmunes se retira mediante tratamiento Vb que dirige las células reguladoras, permitiendo así depuración más efectiva y posiblemente completa del virus mediante las células efectoras del sistema inmunológico.

2. Caracterización adicional del Efecto Terapéutico en el Día 14

2.1. Histología de Bazo en ratones tratados Vb en 10 semanas post infección

Los bazos de los ratones tratados Vb pi en el día 14 pi así como también ratones de control infectados y no infectados se pesan y se examinan histológicamente. La arquitectura esplénica de todos los ratones infectados MAIDS se desorganiza profundamente como se reportó previamente (Hartley et al., 1989). En contraste, la arquitectura esplénica de los ratones tratados Vb con pesos de bazo normales (por debajo de 0.25 g) es indistinguible de aquel de ratones de control no infectados (Figura 3).

En el soporte de estos datos histológicos, los resultados preliminares con base en análisis FACS de células de bazo de ratones tratados Vb pi del día 14 en proporciones celulares mostradas pi de 10 semanas (células CD4+, CD8+ y B) y las distribuciones como aquellas observadas en ratones no infectados normales (datos no mostrados).

2.2. Protección a largo plazo de desarrollo MAIDS luego de terapia Vb

Con el fin de determinar si los ratones infectados se protegen completamente del desarrollo de MAIDS o si el tratamiento Vb únicamente retrasa el inicio y la progresión de la enfermedad tratamos ratones con Vb en el día 14 pi y esperamos hasta 20 semanas pi para examinar los ratones. Los resultados de este experimento (Figura 4) muestran que 80 % (4/5 ratones) se protegen de cualquier esplenomegalía en 20 semanas pi que confirman la acción altamente efectiva del régimen de tratamiento 14 Vb.

2.3. No hay protección de reexposición de virus luego de terapia Vb

Para determinar si los ratones protegidos de MAIDS mediante el desarrollo de tratamiento Vb pi día 14 una respuesta inmunológica que luego los protegería de una reexposición posterior con los grupos de virus MAIDS de ratones, que se les da terapia Vb en el día 14 pi, exponemos con el virus MAIDS en post-tratamiento Vb 3 o 8 semanas. Los ratones no se protegen de reexposición vírica y desarrollan esplenomegalia y linfadenopatía que indica desarrollo MAIDS a 20 semanas (Figura 5). Este no es un resultado no esperado como la inmunosupresión dominante mediante la población reguladora de células que habrán restaurado como una consecuencia de la respuesta efectora inmune a la segunda infección (no tratada).

3. Terapia Vb activa las células cD4+

3.1. Análisis FACS Directo de Células de Bazo Luego de Terapia Vb en Post-Infección Día 14

Se realiza análisis FACS de células CD4+ u CD8+ T preparadas de bazos de ratones tratados con Vb en el Día 14 pi (Figura 6). También se examinan las células T CD25+CD4+ cuando estos se han identificado recientemente que tiene una función reguladora importante en modelos de ratón de enfermedad autoinmune e inmunología de tumor (Takahashi et al., 1998; Shimizu et al., 2000). Es posible que estas células puedan cumplir una función en la regulación de la respuesta inmunológica a MAIDS. A los ratones de control no infectados y pi Día 14 se les da terapia Vb y los bazos se recolectan en 48 horas post-tratamiento Vb. El análisis de los datos muestran que mientras se reducen los subconjuntos de células mediante la terapia Vb, la comparación de las relaciones no infectado a infectado muestran que es las células T CD4+ y las células T CD25+CD4+ que se activan preferiblemente mediante el tratamiento Vb en ratones infectados MAIDS.

3.2. Experimentos de transferencia de células de bazo: terapia Vb activa las células CD4+

El experimento previo muestra que los subconjuntos de células inmunes principales (células CD4+ y CD8+s) residentes en el bazo todas se afectan por tratamiento Vb, sin embargo, parece que las células CD4+ se activan preferiblemente que un subconjunto de estas células se pueden expandir clónicamente en el día 14 pi. Los experimentos ilustrados en la Figura 7 se diseñan para determinar si una dosis única de Vb, administrado a 14 días pi, se elimina una población para expandir las células T reguladoras CD4+ y por lo tanto liberan las células efectoras de la regulación por disminución y depuración del anfitrión del virus MAIDS.

Los ratones se infectan con MAIDS, reciben tratamiento Vb pi día 14 y luego reciben una transferencia adoptiva de ~10^7 de células de bazo de ratones donantes preparados como se destaca en la Figura 7. Para cada experimento [designado grupos (I), (II) y (III)] que consiste de 7 ratones receptores y 9 ratones donantes. Los ratones en el Grupo I reciben bazos completos de ratones infectados que no reciben ningún tratamiento Vb. Los ratones en el Grupo II reciben preparaciones de células de bazo completas, de ratones infectados, que habían agotado células CD4 + utilizando un clasificador de células FACS después de tinción con anticuerpo monoclonal anti-CD4 marcado con fluorocromo. La clasificación celular resulta en la remoción de 99.5 % de células CD4+ de preparaciones de células de bazo. Los ratones en el Grupo III reciben bazos completos de ratones donantes infectados que también reciben tratamiento Vb en el día 14 pi.

La infusión de ratones infectados MAIDS tratados Vb con células de bazo de donantes infectados MAIDS evita completamente que los ratones se protejan del Vb del desarrollo de MAIDS (Figura 8). Más aún, las células de bazo que superaron el efecto protector de Vb son células CD4+ debido a que cuando las células CD4+ se retiran de las células de bazo donantes antes de transferencia, mediante clasificación FACS, el efecto protector de Vb no se superó. Adicionalmente, la infusión de MAIDS tratado con Vb infectan ratones con células de bazo de ratones donantes infectados con MAIDS que también se les da en el día 14 Vb muestran que estos ratones están completamente protegidos del desarrollo MAIDS (Figura 8).

3.3. Agotamiento in vivo de células CD4+ en el día 14 post-infección resulta en protección de desarrollo MAIDS

Los resultados de transferencia de bazo son consistentes con la interpretación que, en el día 14 pi, las células efectoras inmunes co-existen con una población clónicamente expandida de células reguladoras que son CD4+, y que Vb es terapéutico por virtud de su capacidad de destruir el último. Por lo tanto, un agotamiento in vivo de células CD4+ en el punto de tiempo pi 14 día deben imitar el efecto de Vb. Un diagrama de flujo del experimento se presenta en la Figura 9. Se infectan grupos de 5 ratones con los virus MAIDS y luego se tratan con anticuerpos monoclonales para agotar el anfitrión del subconjunto de célula T CD4+ o CD8+ en el día 14 pi. Se recolectan los anticuerpos monoclonales de los sobrenadantes de estirpes celulares de hibridoma que produce un hibridoma y se purifican mediante precipitación de sulfato de amonio. La prueba in vivo resulta en una reducción 98 % en células CD4+ y una reducción del 95 % en células CD8+ de una inyección única (0.5 mg i.p.) de la preparación de anticuerpo monoclonal concentrado apropiado.

Claramente, en tratamiento en el día 14 pi con el anticuerpo monoclonal anti- CD4+ resulta en la prevención de MAIDS en ratones infectados imitando por lo tanto el efecto de una inyección Vb en el día 14 pi (Figura 10). En contraste, el agotamiento in vivo de células CD8+ en el día 14 pi no tienen efecto en la evolución de la enfermedad. Esta resulta la hipótesis que una población de células T CD4+ se regula funcionalmente por disminución de células efectoras inmunes que responden a la infección vírica. Adicionalmente, la remoción de las células reguladoras dominantes CD4+ permite que las células efectoras inmunes respondan más efectivamente a la infección vírica que resulta en evolución de la enfermedad más lenta o quizás depuración completa del virus MAIDS de su anfitrión.

4. Resumen

Los presentes ejemplos indican que existe una población de células “reguladoras” que regulan por disminución la respuesta inmunológica al virus MAIDS, lo que permite que el virus prolifere y provoque enfermedad. La remoción de las células reguladoras en los momentos apropiados después de infección permite que las células efectoras (tal como células B y células T CD8+) depuren más efectivamente el virus, evitando el desarrollo de la enfermedad. Se proponen estas células reguladoras para controlar la activación y/o función de las células tal como células T CD8+ y células B, que actúan como células efectoras, para combatir la infección vírica.

La modulación de la respuesta inmunológica al eliminar específicamente una población de células reguladoras inmunes se ha investigado previamente por Robert North y colegas utilizando un modelo de linfoma de célula T de murino (North and Awwad, 1990). North propone que el tumor inmunogénico es capaz de establecer y crece debido a la regulación por disminución de la respuesta inmunológica mediante una población de células T reguladoras CD4+. Esta regulación no permite que se regule la respuesta inmunológica para desarrollarse suficientemente en magnitud para provocar evolución de tumor. Se nota que el tratamiento con una dosis única de Vinblastina (Vb) en diferentes momentos luego de inoculación de tumor que resulta en mejora (día 10) o regresión (días 4, 6, 13 y 15) del tumor. North hipotetiza que la regresión observada se debe a eliminación de las células T reguladoras CD4+ en aquellos puntos de tiempo. En una serie de experimentos que implican el agotamiento selectivo de células T CD4+ y CD8+ se identifican las células reguladoras como es del fenotipo CD4+.

El ADN cromosómico de ratones silvestres y de criadero contiene múltiples copias de las secuencias reactivas con sondas de ácido nucleico MuLV. Entre estas secuencias que son completas, los genomas potencialmente infecciosos de numerosos MuLV (Chattopadhyay et al., 1980). Todos los MuLV comparten alta homología de secuencia. Hacemos hipótesis de que cuando estas proteínas MuLV endógenas se expresan durante desarrollo estos se reconocen como autoantígenos mediante el sistema inmunológico. Debido al alto nivel de homología entre las secuencias de aminoácido y ácido nucleico endógeno y exógeno MuLV un MuLV infectado también se puede

reconocer parcialmente como auto mediante el sistema inmunológico, y cualquier respuesta inmunológica a la infección vírica se regulan por disminución, lo que resulta en una carencia de depuración vírica y el desarrollo de la enfermedad.

REFERENCIAS:

Barin, F., McLane, M.F., Allan, J.S., Lee, T.H., Groopman, J.E. y Essex, M. (1985). Virus envelope protein of the HTLV-III represents major target antigen for antibodies in AIDS patients. Science 228,1094-6.

Brennan, F.R., Bellaby, T., Helliwell, S.M., Jones, T.D., Kamstrup, S., Dalsgaard, K., Flock, J-I. and Hamilton, W.D.O. (1999). Chimeric plant virus particles administered nasally or orally induce systemic and mucosal immune responses in mice. Journal of Virology 73, 930-8.

Coll, J., Palazon, J., Yazbeck, H., Gutierrez, J., Aubo, C., Benito, P., Jagiello, P., Maldyk, H., Marrugat, J. y Anglada, J. et al. (1995). Antibodies to humano immunodeficiency virus (HIV-1) in autoimmune diseases: primary Sjogren's syndrome, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and autoimmune thyroid diseases. Clinical Rheumatology 14,451-7.

Cardoso, A.I., Blixenkrone-Moller, M., Fayolle, J., Liu, M., Buckland, R. and Wild, T.F. (1996). Immunization with plasmid DNA encoding for the measles virus hemagglutinin and nucleoprotein leads to humoral and cell-mediated immunity. Virology 225, 293-9.

Chattopadhyay, S.K., Lander, M.R., Rands, E. and Lowy, D.R. (1980). Structure of endogenous murine leukemia virus DNA in mouse genomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 77,5774-8.

Conry, R.M., LoBuglio, A.F., Kantor, J., Schlom, J., Loechel, F., Moore, S.E., Sumerel, L.A., Barlow, D.L., Abrams, S. and Curiel, D.T. (1994). Immune response to a carcinoembryonic antigen polynucleotide vaccine. Cancer Research 54,1164-68.

Cox, G.J., Zamb, T.J. and Babiuk, L.A. (1993). Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. Journal of Virology 67, 5664-7.

Daar, E.S., Bai, J., Hausner, M.A., Majchrowicz, M., Tamaddon, M. and Giorgi, J.V. (1998). Acute HIV syndrome after discontinuation of antiretroviral therapy in a patient treated before seroconversion. Annals of Internal Medicine 128,827-9.

Davis, H.L., Michel, M.L. and Whalen, R.G. (1993). DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. Human Molecular Genetics 2, 1847-51.

Eisenbraun, M.D., Fuller, D.H. and Haynes, J.R. (1993). Examination of parameters affecting the elicitation of humoral immune responses by particle bombardment-mediated genetic immunization. DNA and Cell Biology 12,791-7.

Fynan, E.F., Webster, R.G., Fuller, D.H., Haynes, J.R., Santoro, J.C. and Robinson, H.L. (1993). DNA vaccines: protective immunization by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 90,11478-82.

Hartley, J.W., Fredrickson, T.N., Yetter, R.A., Makino, M. and Morse, H.C.D. (1989). Retrovirus-induced murine acquired immunodeficiency syndrome: natural history of infection and differing susceptibility of inbred mouse strains. Journal of Virology 63,1223-31.

Hood, E.E. and Jilka, J.M. (1999). Plant-based production of xenogenic proteins. Current Opinions in Biotechnology 10, 382-6.

Kapustra, J., Modelska, A., Figlerowicz, M., Pniewski, T., Letellier, M., Lisowa, O., Yusibov, V., Koprowski, H., Plucienniczak, A. and Legocki, A.B.

(1999). A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. FASEB Journal 13,1796-99.

Kilby, J.M., Goepfert, P.A., Miller, A.P., Gnann Jr, J.W., Sillers, M., Saag, M. and Bucy, R.P. (2000). Recurrence of the acute HIV syndrome after interruption of antiretroviral therapy in a patient with chronic HIV infection: A case report. Annals of Internal Medicine 133,435-8.

Lifson, J.D., Rossio, J.L., Arnaout, R., Li, L., Parks, T.L., Schneider, D.K., Kiser, R.F., Coalter, V.J., Walsh, G., Imming, R.J., Fisher, B., Flynn, B.M., Bischofberger, N., Piatak Jr, M., Hirsch, V.M., Nowak, M.A. and Wodarz, D. (2000). Containment of simian immunodeficiency virus infection: cellular immune responses and protection from rechallenge following transient postinoculation antiretroviral treatment. Journal of Virology 74,2584-93.

Mason, H.S., Haq, T., Clements, J. D., and Arntzen, C.J. (1998). Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. Vaccine 16,1336-43.

Mitsuya, H., Yarchoan, R., Kageyama, S. and Broder, S. (1991). Targeted therapy of human immunodeficiency virus-related disease. FASEB Journal 5,2369-81.

Modelska, A., Dietzschold, B., Sleysh, N., Fu, Z.F., Steplewski, K., Hooper, D.C., Koprowski, H. and Yusibov, V. (1998). Immunization against rabies with plant-derived antigen. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 95,2481-85.

Montgomery, D.L., Shiver, J.W., Leander, K.R., Perry, H.C., Friedman, A., Martinez, D., Ulmer, J.B., Donnelly, J.J. and Lui, M.A. (1993). Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. DNA and Cell Biology 12,777-83.

North, R.J. and Awwad, M. (1990). Elimination of cycling CD4+ suppressor T cells with an anti-mitotic drug releases non-cycling CD8+ T cells to cause regression of an advanced lymphoma. Immunology 71, 90-5.

Ortiz, G.M., Nixon, D.F., Trkola, A., Binley, J., Jin, X., Bonhoeffer, S., Kuebler, P.J., Donahoe, S.M., Demoitie, M.-A., Kakimoto, W.M., Ketas, T., et al. (1999). HIV-1-specific immune responses in subjects who temporarily contain virus replication after discontinuation of highly active antiretroviral therapy. Journal of Clinical Investigation, published online, September 1999.

Rakowicz-Szulczynska, E.M. (2000). Relevance of the viral RAK alpha gene in diagnosis of malignant versus nonmalignant tumors of the ovary and uterus. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 7,360-5.

Rakowicz-Szulczynska, E.M., Jackson, B., Szulczynska, A.M. and Smith, M. (1998). Human immunodeficieny virus type 1-like DNA sequences and immunoreactive viral particles with unique association with breast cancer. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 5,645-53.

Sedegah, M., Hedstrom, R., Hobart, P. and Hoffman, S.L. (1994). Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91,9866-70.

Shimizu, J., Yamazaki, S. and Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. Journal of Immunology 163,5211-8.

Stott, J., Hu, S.L., and Almond, N. (1998). Candidate vaccines protect macaques against primate immunodeficiency viruses. AIDS Research and Human Retroviruses. Suppl 3,S265-70.

Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J. and Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. International Immunology 10, 1969-80.

Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A. et al. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science 259,1745-49.

Wang, B., Ugen, K.E., Srikantan, V., Agadjanyan, M.G., Dang, K., Refaeli, Y., Sato, A.I., Boyer, J., Williams, W.V. and Weiner, D.B. (1993). Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA

90, 4156-60.

Xiang, Z.Q., Spitalnik, S., Tran, M., Wunner, W.H., Cheng, J. and Ertl, H.C. (1994). Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. Virology 199,132-40.

Yang, K., Mustafa, F., Valsamakis, A., Santoro, J.C., Griffin, D.E. and Robinson, H.L. (1997). Early studies on DNA-based immunization for measles virus. Vaccine 15,888-91.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende un polipéptido antigénico retrovírico o ADN que codifica el polipéptido para la fabricación de un medicamento para administrar a un sujeto mamífero una infección retrovírica, en donde al sujeto se le administra posteriormente un agente que inhibe la producción de, y/o destruye, las células T reguladoras, y en donde el tiempo de administración del agente se selecciona de tal manera que ejerce un efecto proporcionalmente mayor contra las células T reguladoras que las células T efectoras, y en donde el agente se selecciona del grupo que consiste de fármacos anti-proliferativos, radiación y un anticuerpo que se une específicamente a células T CD4+.

2. Uso de un agente que inhibe la producción de, y/o destruye, las células T reguladoras para la fabricación de un medicamento para administrarle a un sujeto mamífero una infección retrovírica, en donde el sujeto se le ha administrado previamente una composición que comprende un polipéptido antigénico retrovírico o ADN que codifica el polipéptido, y en donde el agente se administra en un momento seleccionado de tal manera que ejerce un efecto proporcionalmente mayor contra las células T reguladoras que las células T efectoras, y en donde el agente se selecciona del grupo que consiste de fármacos anti-proliferativos, radiación y un anticuerpo que se une específicamente a células T CD4+.

3. Uso de una composición que comprende un polipéptido antigénico retrovírico o ADN que codifica el polipéptido, y un agente que inhibe la producción de, y/o destruye, las células T reguladoras para la fabricación de un medicamento para administrarle a un sujeto mamífero una infección retrovírica, en donde el sujeto se le administra la composición antes del agente, y en donde el tiempo de administración del agente se selecciona de tal manera que ejerce un efecto proporcionalmente mayor contra las células T reguladoras que las células T efectoras, y en donde el agente se selecciona del grupo que consiste de fármacos anti-proliferativos, radiación y un anticuerpo que se une específicamente a células T CD4+.

4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente se administra aproximadamente cuando las cifras de célula T CD8+CD4 han alcanzado un pico en respuesta a la administración de la composición.

5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente se administra aproximadamente cuando la cifra de partículas víricas ha empezado a estabilizarse o aumentarse luego de la administración de la composición.

6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el polipéptido antigénico retrovírico se proporciona al sujeto al administrar una vacuna que comprende el polipéptido antigénico de retrovirus y un portador farmacéuticamente aceptable.

7. El uso de la reivindicación 6, en donde la vacuna comprende adicionalmente un adyuvante.

8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el polipéptido antigénico se proporciona al sujeto al administrar una vacuna de ADN que codifica el polipéptido antigénico retrovírico.

9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el polipéptido antigénico se proporciona al sujeto mediante el consumo de una planta transgénica que expresa el polipéptido antigénico retrovírico.

10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el sujeto se ha expuesto a terapia de fármaco antiretrovírica antes de que se administre la composición.

11. Uso de un fármaco antiretrovírico para la fabricación de un medicamento para administrarle a un sujeto mamífero una infección retrovírica, en donde el sujeto se expone a terapia de fármaco antiretrovírica, y se administra posteriormente con un agente que inhibe la producción de, y/o destruye, las células T reguladoras, en donde el agente se administra después que ha concluido la terapia de fármaco antiretrovírica y una expansión resultante en las cifras retrovíricas ha conducido a un aumento en las cifras, y/o activación, de células T efectoras dirigidas contra el retrovirus, y en donde el tiempo de administración del agente se selecciona de tal manera que ejerce un efecto proporcionalmente mayor contra las células T reguladoras que las células T efectoras, y en donde el agente se selecciona del grupo que consiste de fármacos anti-proliferativos, radiación y un anticuerpo que se une específicamente a células T CD4+.

12. Uso de un agente que inhibe la producción de, y/o destruye, las células T reguladoras para la fabricación de un medicamento para administrarle a un sujeto mamífero una infección retrovírica, en donde el sujeto se ha

expuesto a terapia de fármaco antiretrovírica, y en donde el agente se administra después que ha concluido la terapia de fármaco antiretrovírica y una expansión resultante en las cifras retrovíricas ha conducido a un aumento en las cifras, y/o activación, de células T efectoras dirigidas contra el retrovirus, y en donde el tiempo de administración del agente se selecciona de tal manera que ejerce un efecto proporcionalmente mayor contra las células T reguladoras que las células T efectoras, y en donde el agente se selecciona del grupo que consiste de fármacos anti-proliferativos, radiación y un anticuerpo que se une específicamente a células T CD4+.

13. Uso de un fármaco antiretrovírico, y un agente que inhibe la producción de, y/o destruye, las células T reguladoras para la fabricación de un medicamento para administrarle a un sujeto mamífero una infección retrovírica, en donde el sujeto se expone a terapia de fármaco antiretrovírica, y se le administra posteriormente el agente, y en donde el agente se administra después que ha concluido la terapia de fármaco antiretrovírica y una expansión resultante en las cifras retrovíricas ha conducido a un aumento en las cifras, y/o activación, de células T efectoras dirigidas contra el retrovirus, y en donde el tiempo de administración del agente se selecciona de tal manera que ejerce un efecto proporcionalmente mayor contra las células T reguladoras que las células T efectoras, y en donde el agente se selecciona del grupo que consiste de fármacos anti-proliferativos, radiación y un anticuerpo que se une específicamente a células T CD4+.

14. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde el agente se administra aproximadamente cuando las cifras de célula T CD8+CD4 han alcanzado un pico en respuesta a la conclusión de la terapia de fármaco antiretrovírica.

15. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde el agente se administra aproximadamente cuando las cifras de partículas víricas han alcanzado un pico, o se empiezan a reducir después de este pico, en respuesta a la conclusión de la terapia de fármaco antiretrovírica.

16. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el fármaco anti-proliferativo se selecciona del grupo que consiste de vinblastina y vinblastina anhidra.

17. El uso de de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el retrovirus se selecciona del grupo que consiste de HTV-1, VIH-2, HTLV-1 y HTLV-2.

18. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde el método se repite por lo menos una vez.

19. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde el sujeto mamífero es un humano.

20. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 en donde el fármaco anti-proliferativo se selecciona de mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan, clorambucilo, hexametil-melamina, tiotepa, busulfan, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, dacarbazina, metotrexato, fluorouracilo, floxuridina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina, vinblastina, vinblastina anhidra, vincristina, etoposida, teniposida, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, L-asparaginasa, cisplatina, mitoxantrona, procarbazina, mitotano, aminoglutetimida, prednisona, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroprogesterona, acetato de megestrol, dietilstilbestrol, etinil estradiol, tamoxifen, propionato de testosterona, isótopos radioactivos, cadena A de ricino, taxol, toxina difteria y exotoxina A seudomonas.

21. Un método para determinar cuándo un agente que inhibe la producción de, y/o destruye, las células T reguladoras, se va a administrar a un sujeto mamífero una infección retrovírica que ha sido expuesto a un tratamiento que aumenta las cifras de, y/o activa, las células T efectoras dirigidas contra el retrovirus, el método comprende

(i) analizar una muestra previamente obtenida del sujeto para (a) las cifras de célula T efectora y/o (b) cifras o actividad de célula T reguladora, o un marcador de la misma, o

(ii) supervisar la carga vírica en el sujeto; en donde el agente se selecciona del grupo que consiste de fármacos anti-proliferativos, radiación y un anticuerpo que se une específicamente a células T CD4+.

22. El método de la reivindicación 21, en donde el método incluye determinar las cifras de célula T CD8+CD4.

23. El método de la reivindicación 21, en donde el método incluye determinar números de célula T CD4+CD8.

24. El método of la reivindicación 21, en donde el método incluye determinar las cifras de partículas víricas.

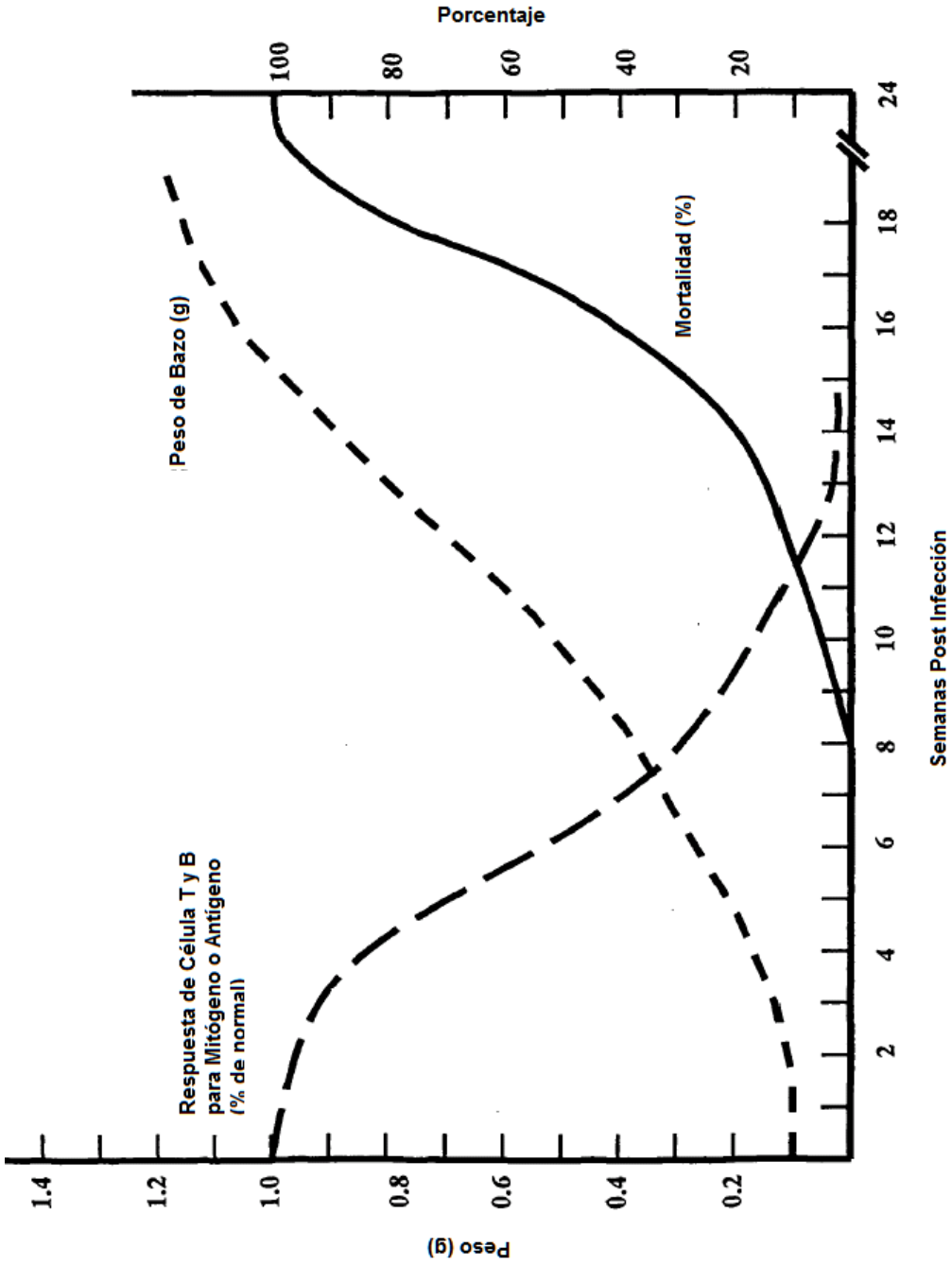
Porcentaje
100
80
60
40
20
Mortalidad (%)
Peso de Bazo (g)
Respuesta de Célula T y B para Mitógeno o Antígeno (% de normal)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
Peso (g)
2
4
6
8
10
12
14
16
18
24
Semanas Post Infección

Figura 1.

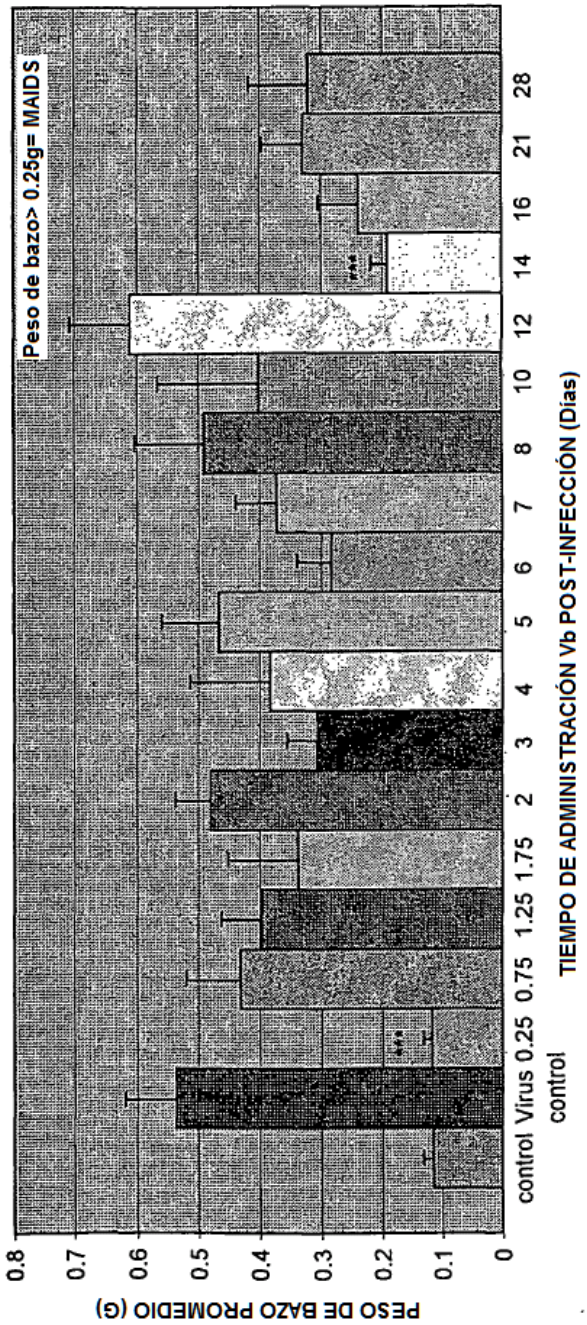
Peso de bazo> 0.25g= MAIDS
PESO DE BAZO PROMEDIO (G)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
control Virus 0.25 0.75 1.25 1.75 2 3 4 5 6 7 8 10 12 14 16 21 28
control
TIEMPO DE ADMINISTRACIÓN Vb POST-INFECCIÓN (Dias)

FIGURA 2.

Bazo de ratón normal
Bazo de ratón MAIDS
Bazo de ratón tratado
Vb i.p. Día 14

Figura 3.

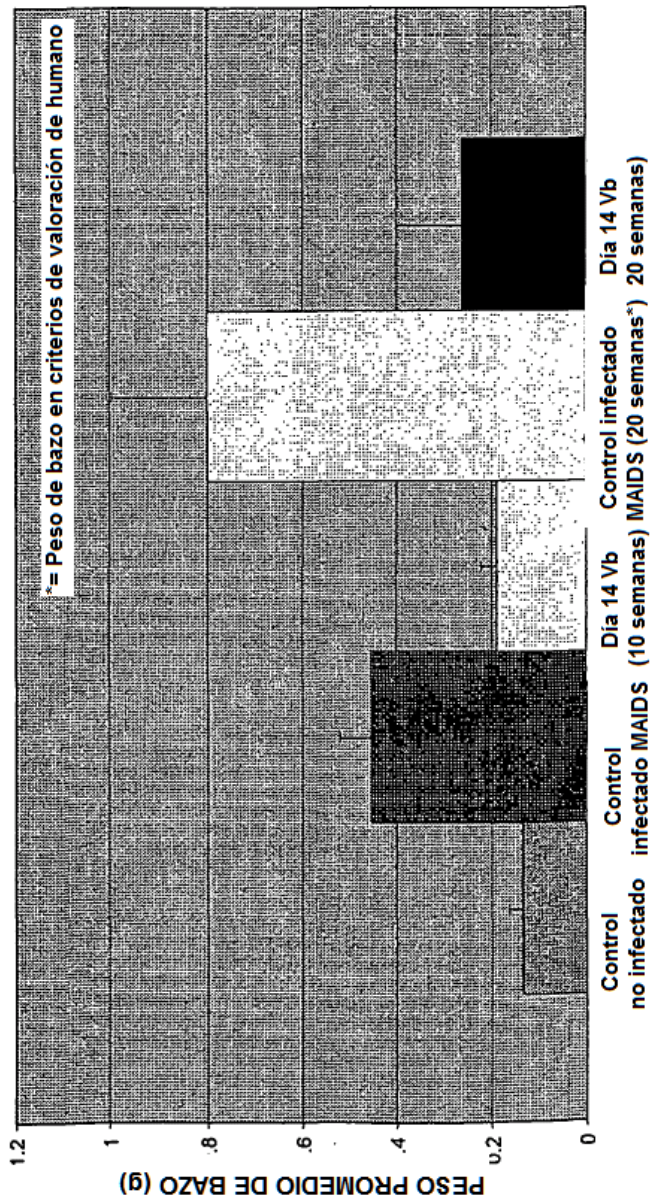
*= Peso de bazo en criterios de valoración de humano
PESO PROMEDIO DE BAZO (g)
1.2
1
.8
.6
.4
.2
0
Control no infectado
Control infectado MAIDS (10 semanas)
Día 14 Vb (10 semanas)
Control infectado MAIDS (20 semanas*)
Día 14 Vb 20 semanas)

Figura 4.

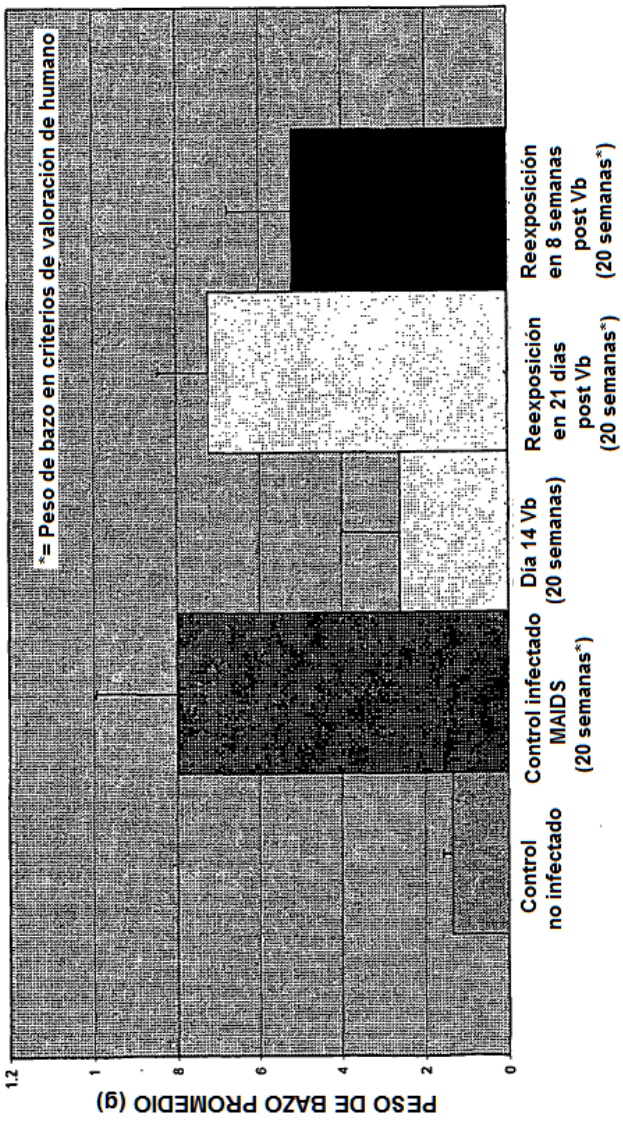
*= Peso de bazo en criterios de valoración de humano
PESO DE BAZO PROMEDIO (g)
1.2
1
.8
.6
.4
.2
0
Control no infectado
Control infectado MAIDS (20 semanas*)
Día 14 Vb (20 semanas)
Reexposición en 21 días post Vb (20 semanas*)
Reexposición en 8 semanas post Vb (20 semanas*)

Figura 5.

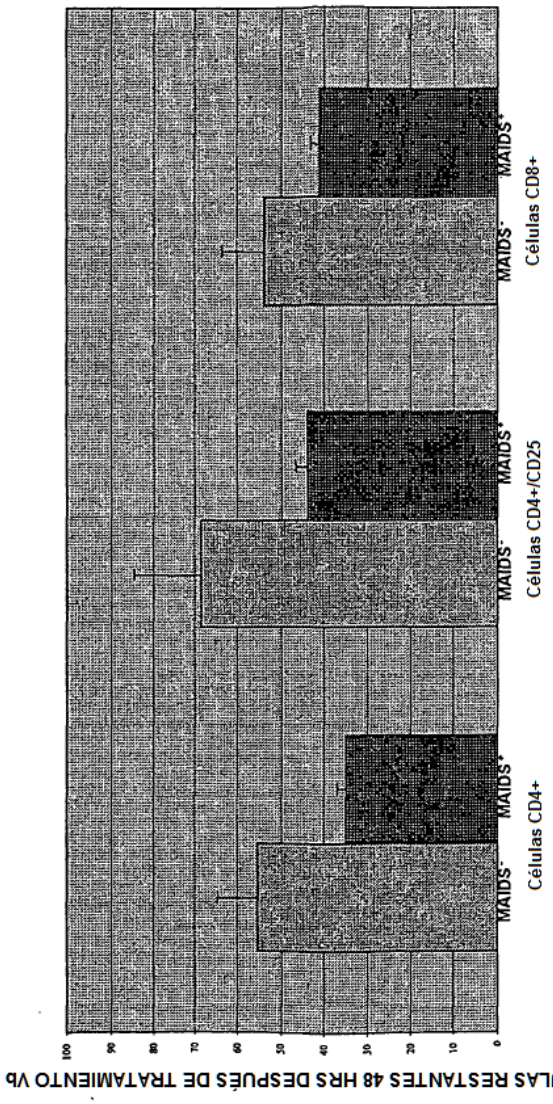
% DE CÉLULAS RESTANTES 48 HRS DESPUÉS DE TRATAMIENTO Vb
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
MAIDS-
MAIDS+
Células CD4+
Células CD4+/CD25
Células CD8+

Figura 6.

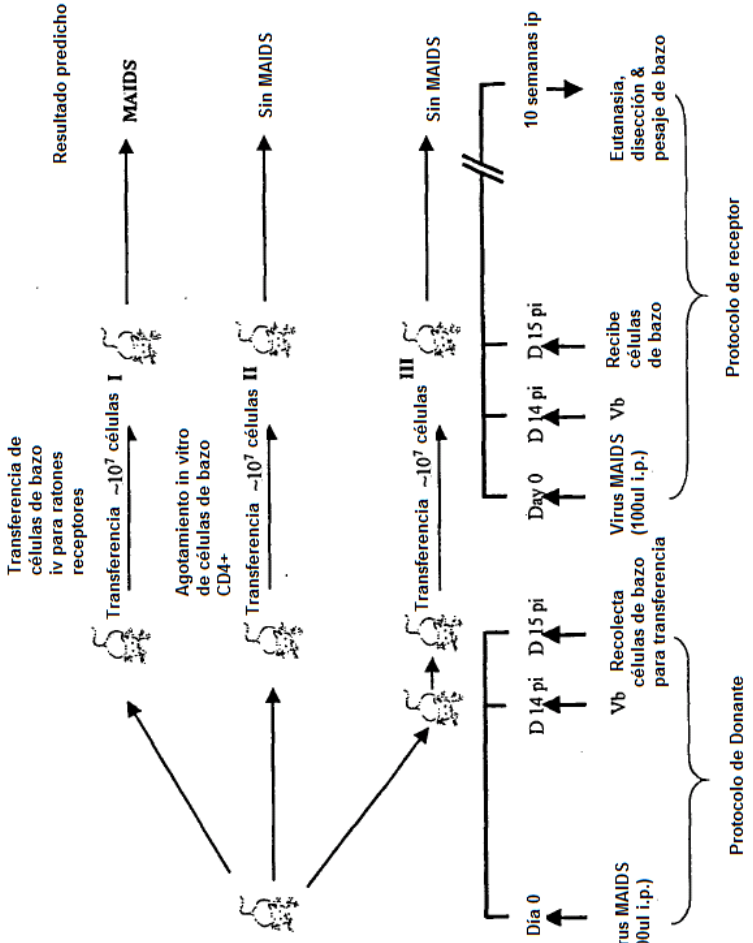
Resultado predicho
Transferencia de células de bazo iv para ratones receptores
Transferencia ~10⁷ células I
MAIDS
Agotamiento in vitro de células de bazo CD4+
Transferencia ~10⁷ células II
Sin MAIDS
Transferencia ~10⁷ células III
Sin MAIDS
Día 0
Virus MAIDS (100ul i.p.)
D 14 pi
Vb
D 15 pi
Recolecta células de bazo para transferencia
Protocolo de Donante
Day 0
Virus MAIDS (100ul i.p.)
D 14 pi
Vb
D 15 pi
Recibe células de bazo
10 semanas ip
Eutanasia, disección & pesaje de bazo
Protocolo de receptor

Figura 7.

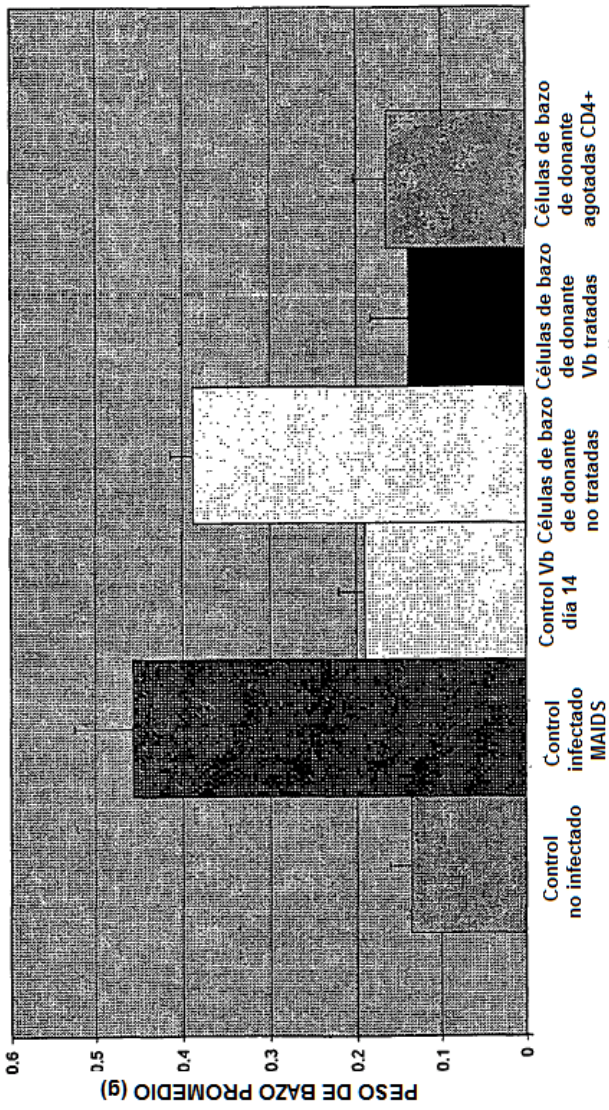
PESO DE BAZO PROMEDIO (g)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Control no infectado
Control infectado MAIDS
Control Vb día 14
Células de bazo de donante no tratadas
Células de bazo de donante Vb tratadas
Células de bazo de donante agotadas CD4+

Figura 8.

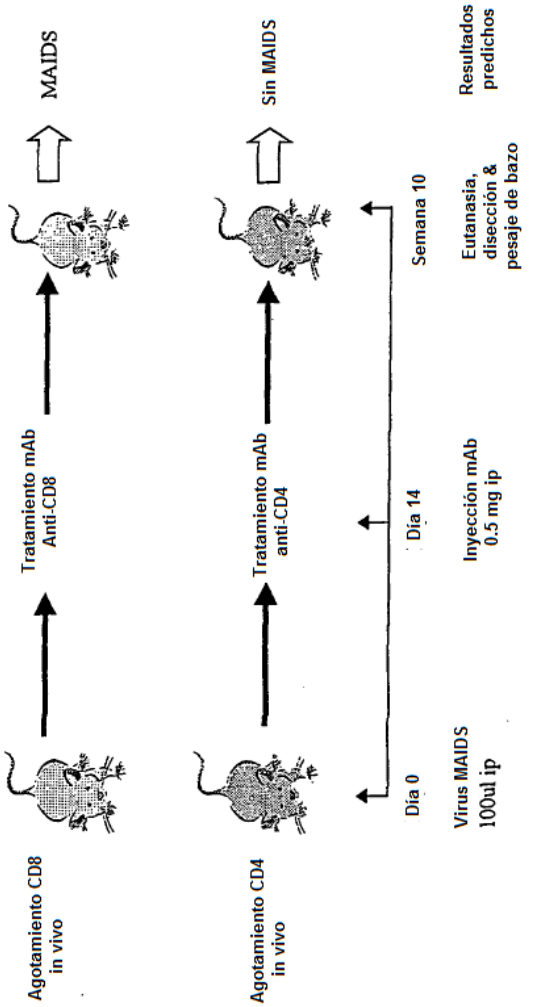
MAIDS
Sin MAIDS
Resultados predichos
Tratamiento mAb Anti-CD8
Tratamiento mAb anti-CD4
Agotamiento CD8 in vivo
Agotamiento CD4 in vivo
Día 0
Día 14
Semana 10
Virus MAIDS 100ul ip
Inyección mAb 0.5 mg ip
Eutanasia, disección & pesaje de bazo
Controles no reciben tratamiento de anticuerpo monoclonal

Figura 9.

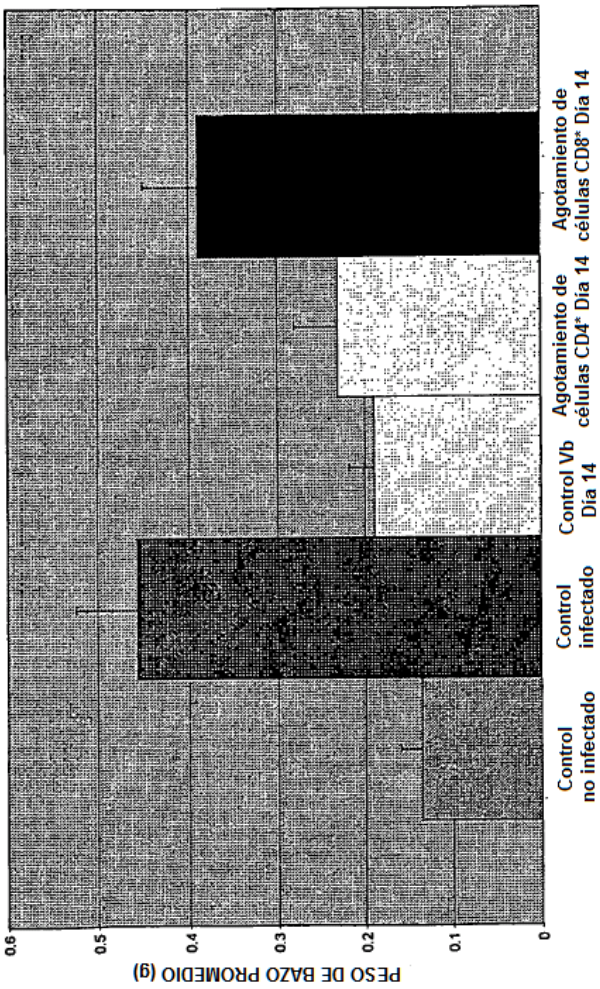
PESO DE BAZO PROMEDIO (g)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Control no infectado
Control infectado MAIDS
Control Vb Día 14
Agotamiento de células CD4+ Día 14
Agotamiento de células CD8+ Día 14

Figura 10.