

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 441 742**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2003 E 03742468 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 1482971**

(54) Título: **Estrategia para la inmunoterapia retroviral**

(30) Prioridad:

20.02.2002 AU PS065002

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.02.2014

(73) Titular/es:

**IMMUNAID PTY LTD (100.0%)
60-70 HANOVER STREET
FITZROY, VICTORIA 3065, AU**

(72) Inventor/es:

ASHDOWN, MARTIN LEONARD

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 441 742 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

Estrategia para la inmunoterapia retroviral

Campo de la invención:

5 Se divulga aquí un método para tratar una infección retroviral en un sujeto mamífero. Se divulga aquí un método para tratar una infección retroviral que conduce a una enfermedad relacionada con inmunodeficiencia en un sujeto humano.

Antecedentes de la invención:

10 El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) induce una infección persistente y progresiva que conduce, en la gran mayoría de los 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.

15 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 cadena sencilla, y se replican por medio de la inserción de un intermedio de ADN en el ADN anfitrión producido por una transcriptasa reversa codificada viralmente. Otros retrovirus incluyen, por ejemplo, virus oncogénicos tales como virus de la leucemia de células T humanas (HTLV-I, -II, -III), virus de leucemia en felinos, y los retrovirus del tipo C de murino.

20 La partícula viral de VIH consiste de un núcleo viral, compuesto en parte de proteínas cápsidas designadas p24 y p18, junto con el genoma de ARN viral y aquellas enzimas requeridas para eventos replicativos tempranos. La proteínas gag miristiladas forman una cubierta viral externa alrededor del núcleo viral, el cual es, 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 la cual se divide por una proteasa celular durante gemación viral en dos glucoproteínas, gp41 y gp120. El gp41 es una glucoproteína de transmembrana y el gp120 es una glucoproteína extracelular la cual permanece no covalentemente asociada con gp41, posiblemente en una forma trimérica o multimérica.

25 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-retrovirales 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).

30 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 comenzado 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.

35 Se divulga aquí una inmunoterapia alterna para tratar una infección retroviral.

40 La EP0374207 se relaciona a un fármaco que contiene un componente el cual actúa sobre las células T reguladoras y un objetivo el cual activa las células T efectoras. Errante et al. (Ann Oncol 1999, 10: 189-95) se refiere a métodos de tratamiento de pacientes con VIH con cáncer, mediante el cual se provee la terapia antirretroviral para tratar la infección VIH y se administra vinblastina para tratar el cáncer. Lori (AIDS 1999, 13 (12): 1433-42) provee una revisión del uso de la hidroxiurea para tratar el VIH. La WO 02/13828 se relaciona a métodos de restablecer el sistema inmune para tratar una infección retroviral.

45 Resumen de la invención:

La presente invención proporciona métodos y usos tal como se define en las reivindicaciones anexas.

50 El presente inventor ha notado que por lo menos dos poblaciones de células inmunes se producen en respuesta a retrovirus los cuales infectan los mamíferos. Más particularmente, el sistema inmune 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 las cuales 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 retroviral.

5 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 retrovirales 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 inmune. La infección posterior mediante un retrovirus también se puede reconocer parcialmente como "auto", limitando la capacidad del sistema inmune de montar una respuesta inmune exitosa. Este propósito, por lo menos en parte, puede explicar por qué hasta ahora ha sido difícil desarrollar una vacuna efectiva contra el VIH.

10 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 seno 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 los cuales enlazan 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.

15 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, limita la función de, o destruir, las "células reguladoras" mientras mantiene las "células efectoras".

20 Además, el presente inventor también ha encontrado que los niveles de marcadores inflamatorios de fase aguda se pueden utilizar como un indicador de cuándo un agente dirigido contra las "células reguladoras" se puede administrar en el tratamiento de una infección retroviral.

25 Se divulga aquí un método para tratar una infección retroviral en un sujeto mamífero, el método comprende administrar al sujeto una composición la cual incrementa las cifras de, y/o activa, las células efectoras dirigidas contra el retrovirus, y posteriormente administrar al sujeto un agente el cual inhibe la producción de, limita la función 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, y en donde las fluctuaciones en los niveles de un marcador de fase inflamatoria aguda en el sujeto se utiliza para ayudar en la determinación de cuando se administra el agente.

30 Existen muchas formas en las cuales se puede incrementar 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 viral 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

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

40 Los sujetos infectados con un retrovirus se pueden tratar con fármacos antirretrovirales, tales como en el tratamiento TARGA, para mantener baja la carga viral. Dichos sujetos también podrían ser administrados con la composición para iniciar una nueva respuesta inmunológica de célula efectora mientras que la administración subsecuente del agente sometería a ablación a las células reguladoras.

45 Las fluctuaciones en los niveles del marcador de fase inflamatoria aguda son monitoreadas para determinar cuándo se administra el agente.

50 Como es conocido en la técnica, algunos marcadores de fase inflamatoria aguda incrementan inicialmente durante una respuesta inmune (denominado en lo sucesivo como marcadores positivos de fase inflamatoria aguda), mientras que otros inicialmente disminuyen durante una respuesta inmune (denominado en lo sucesivo marcadores negativos de fase inflamatoria aguda).

Preferiblemente, el marcador de fase inflamatoria aguda es un marcador positivo de fase inflamatoria aguda, y el agente se administra aproximadamente cuando los niveles del marcador positivo de fase inflamatoria aguda comienzan a disminuir después de un incremento inicial de los niveles del marcador. En esta instancia, la producción y/o actividad de la célula efectora se indica por el incremento de los niveles del marcador positivo de fase

inflamatoria aguda. Sobre la expansión clonal de células reguladoras, la actividad de las células efectoras se subregulan resultando en una disminución en los niveles del marcador positivo de fase inflamatoria aguda.

Preferiblemente, el marcador positivo de fase inflamatoria aguda es la proteína c reactiva.

En una forma de realización particularmente preferida, el agente se administra aproximadamente cuando los niveles de la proteína c reactiva han alcanzado su punto máximo y comenzado a disminuir.

También se ha descubierto que los marcadores de fase inflamatoria aguda pueden ser un indicador de la carga viral debido a un resultado efectivo en la respuesta inmune en la carga viral más baja la cual a su vez conduce a disminuir los niveles del marcador de fase inflamatoria aguda. Dado que los niveles de marcadores de fase inflamatoria aguda se pueden medir fácilmente en pequeñas muestras de sangre que puede ser utilizado como un indicador de cuándo iniciar la supervisión de la carga viral.

Así, se prefiere que el agente se administre aproximadamente cuando las cifras de partículas virales han empezado a estabilizar o aumentar luego de la administración de la composición

Por lo tanto, en otra realización preferida, el agente se administra aproximadamente cuando el número de partículas virales ha comenzado a estabilizar o incrementar después de la administración de la composición, en donde las pruebas de los niveles de partículas virales en el sujeto comienza cuando los niveles de marcadores positivos de fase inflamatoria aguda se comienzan a incrementar después de la administración de la composición. Cabe señalar que el momento de administrar el agente también puede coincidir con una disminución en el número de partículas virales, después de un pico inicial (como se ve en la Figura 18)

Preferiblemente, el marcador positivo de fase inflamatoria aguda es la proteína c reactiva.

En aún otra realización preferida del primer aspecto, el reestímulo de las células efectoras en un sujeto mamífero infectado se puede lograr por una composición la cual comprende un polipéptido antigénico retroviral. Preferiblemente, el polipéptido antigénico se provee al sujeto mediante la administración de 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 provee al sujeto mediante la administración de una vacuna de ADN que codifica el polipéptido antigénico retroviral

En aún otra realización, el polipéptido antigénico se provee al sujeto mediante el consumo de una planta transgénica que expresa el polipéptido antigénico retroviral.

El retiro del tratamiento antirretroviral causa 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.

Se divulga aquí un método el tratamiento de una infección retroviral en un sujeto mamífero, el método comprende exponer el sujeto a terapia de fármaco antirretroviral, y subsecuentemente administrar al sujeto un agente el cual inhibe la producción de, limita la función de, y/o destruye, células reguladoras, en donde el agente se administra después que ha concluido la terapia de fármaco antirretroviral y una expansión resultante en las cifras retrovirales ha conducido a un incremento 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, y en donde las fluctuaciones en los niveles del marcador de fase inflamatoria aguda se utilizan para ayudar a determinar cuándo se administra el agente

Preferiblemente, el marcador de fase inflamatoria aguda es un marcador positivo de fase inflamatoria aguda. Preferiblemente, el marcador de fase inflamatoria aguda es la proteína c reactiva.

En una realización preferida, el agente se administra aproximadamente cuando los niveles de la proteína c reactiva han alcanzado un pico y comenzado a disminuir.

Preferiblemente, la terapia de fármaco antirretroviral es el TARGA.

Luego de la remoción de la terapia de fármaco antirretroviral incrementa la carga viral (por ejemplo, véase Daar et al., 1998 y la Figura 18). Esto resulta en una expansión y/o activación de células efectoras dirigidas contra el retrovirus el cual empieza a estabilizar la carga viral. Aproximadamente cuando las cifras de retrovirales han alcanzado un pico, o ha comenzado la reducción después de este pico, es cuando se debe administrar el agente.

Como se señaló anteriormente, los niveles de los marcadores de fase inflamatoria aguda pueden ser un indicador de la carga viral.

- 5 De acuerdo con lo anterior, en una realización preferida adicional del segundo aspecto, el agente se administra aproximadamente cuando el número de partículas virales ha alcanzado un pico, o empieza a reducir después de este pico, en respuesta a la conclusión de la terapia de fármacos antirretrovirales, en donde las pruebas de los niveles de partículas virales en el sujeto comienza cuando los niveles de los marcadores positivos de la fase inflamatoria aguda comienzan a incrementar tras la conclusión de la terapia con fármacos antirretrovirales.
- 10 Se divulga aquí el uso de una composición la cual incrementa el número de, y/o activa, las células efectoras dirigidas contra un retrovirus para la manufactura de un medicamento para la administración a un sujeto mamífero con una infección retroviral, en donde el sujeto es administrado subsecuentemente con un agente el cual inhibe la producción de, limita la función de, y/o destruye, células reguladoras, y en donde el momento de la administración del agente se selecciona de manera que la actividad de las células efectoras no se reduce significativamente, y en donde las fluctuaciones en los niveles de un marcador de fase inflamatoria aguda en el sujeto se utiliza para ayudar a determinar cuándo se administra el agente.
- 15 Se divulga aquí el uso de un agente el cual inhibe la producción de, limita la función de, y/o destruye, células reguladoras para la manufactura de un medicamento para la administración a un sujeto mamífero con una infección retroviral, en donde el sujeto ha sido previamente administrado con una composición la cual incrementa el número de, y/o activa, células efectoras dirigidas contra el retrovirus, y en donde el agente se administra en un momento seleccionado de tal manera que la actividad de las células efectoras no se reduce significativamente, y en donde las fluctuaciones en los niveles de un marcador de fase inflamatoria aguda en el sujeto se utiliza para ayudar a determinar cuándo se administra el agente.
- 20 Se divulga aquí el uso de un fármaco antirretroviral para la manufactura de un medicamento para la administración a un sujeto mamífero con una infección retroviral, en donde el sujeto es administrado subsecuentemente con un agente el cual inhibe la producción de, limita la función de, y/o destruye, células reguladoras, y en donde el momento de la administración del agente se selecciona de tal manera que la actividad de las células efectoras dirigidas contra el retrovirus no se reduce significativamente, y en donde las fluctuaciones en los niveles de un marcador de fase inflamatoria aguda en el sujeto se utiliza para ayudar a determinar cuándo se administra el agente.
- 25 Se divulga aquí el uso de un agente el cual inhibe la producción de, limita la función de, y/o destruye, células reguladoras para la manufactura de un medicamento para la administración a un sujeto mamífero con una infección retroviral, en donde el sujeto ha sido previamente administrado con un fármaco antirretroviral, y en donde el agente se administra en un momento seleccionado de tal manera que la actividad de las células efectoras dirigidas contra el retrovirus no se reduce significativamente, y en donde las fluctuaciones en los niveles de un marcador de fase inflamatoria aguda en el sujeto se utiliza para ayudar a determinar cuándo se administra el agente.
- 30 Se divulga aquí el uso de un agente el cual inhibe la producción de, limita la función de, y/o destruye, células reguladoras para la manufactura de un medicamento para la administración a un sujeto mamífero con una infección retroviral, en donde el sujeto ha sido previamente administrado con un fármaco antirretroviral, y en donde el agente se administra en un momento seleccionado de tal manera que la actividad de las células efectoras dirigidas contra el retrovirus no se reduce significativamente, y en donde las fluctuaciones en los niveles de un marcador de fase inflamatoria aguda en el sujeto se utiliza para ayudar a determinar cuándo se administra el agente.
- 35 Preferiblemente, el agente utilizado en la ablación de células reguladoras se selecciona del grupo que consiste de fármacos anti-proliferativas, radiación, y anticuerpos los cuales inhiben la actividad de la subregulación de las células reguladoras. Preferiblemente, el fármaco anti-proliferativo se selecciona entre el grupo que consiste de vinblastina y vinblastina anhidra.
- Ejemplos de anticuerpos preferidos incluyen, pero no se limitan a, anti-CD4+, anti-CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocitos citotóxicos), y anti-CD28.
- 40 Preferiblemente, los retrovirus se seleccionan del grupo que consiste de VIH-1, VIH-2, HTLV-1 y HTLV-2.
- Como se apreciará fácilmente por aquellos expertos en la técnica, los métodos de la presente invención se pueden repetir para proveer un tratamiento más completo
- Preferiblemente, el sujeto mamífero es un humano.
- Se divulga aquí un kit que comprende;
- 45 i) una composición para incrementar el número de, y/o la activación, de células efectoras, dirigidas contra un retrovirus en un sujeto mamífero;
- ii) un agente el cual inhibe la producción de, limita la función de, y/o destruye, células reguladoras; y
- iii) medios para determinar el nivel de un marcador de inflamatoria aguda
- En otro aspecto, la presente invención provee un kit que comprende;
- 50 i) al menos un fármaco antirretroviral;

- ii) un agente el cual inhibe la producción de, limita la función de, y/o destruye, células reguladoras; y
- iii) medios para determinar el nivel de un marcador de fase inflamatoria aguda.

En cada aspecto descrito anteriormente, la ablación de la población "reguladora" permite que la población "efectora" reduzca o erradique la carga retroviral como cualquier la regulación de cualquier baja de efectores

- 5 En cada aspecto descrito anteriormente, ha sido retirada la ablación de la población "reguladora" que permite a la población "efectora" reducir o erradicar la carga retroviral como cualquier regulación por disminución de los efectores (debido a mecanismos de autotolerancia).

Como será evidente, los rasgos y características preferidas de un aspecto de la divulgación pueden ser aplicables a otros aspectos de la divulgación.

- 10 A través de esta especificación la palabra "comprender", 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 a continuación por medio de las siguientes Figuras y Ejemplos no limitantes.

Breve descripción de los dibujos:

- 15 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.

- 20 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.

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

Figura 11: Diagrama de flujo del protocolo para el experimento de transferencia adoptiva descrito en la Sección 4 de los ejemplos.

Figura 12: Resultados de CD4 + CD25 +/- transferencias adoptivas utilizando células de donantes no infectados.

Los pesos del bazo fueron tomadas a las 10 semanas después de la infección MAIDS (n = 5 ratones por grupo).

- 30 Figura 13: IL-4 en el suero de ratones infectados con MAIDS. Cada punto de tiempo representa la media +/-SEM de 9 ratones.

Figura 14: IL-10 en el suero de ratones infectados con MAIDS. Cada punto de tiempo representa la media +/-SEM de 9 ratones.

- 35 Figura 15: Niveles IL-4 e IL-10 tal como se determina por el flujo intracelular en WBC total del bazo. Los datos mostrados son la media +/-SEM de 3 ratones por grupo.

Figura 16: Producción de IL-4 por ELISpot de WBC del bazo de ratones infectados por MAIDS.

Los datos mostrados son la media +/-SEM de 3 ratones por grupo.

Figura 17: Producción de IL-10 por ELISpot de WBCs del bazo de ratones infectados por MAIDS.

Los datos mostrados son la media +/-SEM de 3 ratones por grupo.

Figura 18: ARN del VIH, la proteína c-reactiva y los niveles de células T en respuesta a tomar un paciente humano-sin tratamiento TARGA.

Descripción detallada de la invención:

5 Definiciones

Como se utiliza aquí el término "tratamiento" o "tratar" significa que se logra una reducción en la carga retroviral. Más preferiblemente, la carga retroviral se erradica completamente.

10 "Células reguladoras" incluyen, pero no se limitan necesariamente a, una subpoblación de células T CD4+. Tales células también pueden ser referidas en la técnica como "células supresoras". Células reguladoras o bien pueden actuar directamente sobre las células efectoras o pueden hacer valer su afectación sobre las células efectoras a través de otros mecanismos.

Células CD4+ expresan el marcador conocido en la técnica como CD4. Típicamente, el término "células T CD4+", como se usa aquí no se refiere a las células que también expresan CD8. Sin embargo, este término puede incluir células T que expresan también otros marcadores antigenicos tales como CD25.

15 "Células efectoras" incluyen, la población de células T conocidas 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 las células reguladoras se subregula mediante el agente. Más preferiblemente, el número, y/o actividad, de las células reguladoras se erradica completamente por el agente.

20 A menos que se indique lo contrario, las técnicas de ADN recombinantes e inmunológicas utilizadas en la presente divulgación son procedimientos estándar, bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales técnicas se describen y se explican a lo largo 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 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996), y F.M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, including all updates until present), Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J.E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta el presente).

25 30 Agentes que inhiben la producción de, limita la función de, y/o destruyen, células reguladoras.

El agente 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 dirigirse específicamente a las células T CD4+. Sin embargo, en algunas instancias se puede utilizar un agente no selectivo, tal como un fármaco o radiación antiproliferativo, los cuales destruyen las células divididas.

35 40 45 El término "fármaco antiproliferativo" es un término bien conocido en la técnica y se refiere a cualquier compuesto que destruye las células divididas o las inhibe de someterse a una proliferación adicional. Los fármacos antiproliferativos incluyen, pero no se limitan a, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, hexametil-melamina, tiotepa, busulfán, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, dacarbazine, metotrexato, fluorouracilo, floxuridina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina, vinblastina, vinblastina anhídrico, vincristina, etopósido, tenipósido, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, L-asparaginasa, cisplatino, mitoxantrona, hidroxiurea, procarbazina, mitotano, aminoglutetimida, prednisona, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroprogesterona, acetato de megestrol, dietilestilbestrol, etinil estradiol, tamoxifeno, propionato de testosterona, isótopos radiactivos, cadena A de ricina, taxol, toxina de la difteria y exotoxina A de pseudomonas.

50 El agente puede administrarse como dosis estándar tal como se utiliza en la técnica. En una forma de realización, el agente se administra como una sola inyección de bolo. En otra forma de realización, el agente se administra por infusión durante un período de, por ejemplo, 24 horas.

Tiempo de exposición del sujeto al agente

Como se indicó anteriormente, la presente invención se basa en la observación de que el número relativo de células efectoras se expande en respuesta a un antígeno antes de las células reguladoras. De acuerdo con lo anterior, tal

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.

- 5 Se ha reportado que después de la falla inicial en la carga viral luego de tratamiento anti-retroviral, por ejemplo en sujetos infectados con VIH, existe un incremento en la carga viral y una estimulación subsecuente de la respuesta inmune al incremento en la carga viral 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 antiviral seguido por la remoción de la terapia se puede utilizar para incrementar el número de, y/o activar, las células efectoras dirigidas contra el retrovirus que permite una expansión de célula reguladora que se puede dirigir.

10 Se puede determinar un ejemplo en el momento apropiado para administrar el agente mediante referencia a Daar et al. (1998). Este documento provee la carga viral, y los niveles de células T CD8+ y CD4+, de un paciente quien está tomando terapia antirretroviral altamente activa (también conocido como TARGA). Después del aumento inicial en la carga viral, ocurre una reducción en la carga viral 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 viral se empieza a estabilizar después de declinación.

15 De manera similar, la Figura 18 muestra un incremento inicial en la carga viral en un paciente tras la conclusión de TARGA, seguido por una disminución en el ARN del VIH como un resultado de la actividad de células efectoras, el cual a su vez es seguido por otro incremento en los niveles de ARN del VIH como resultado de regulación de las células efectoras.

20 Los picos se pueden utilizar como un punto de inferencia para predecir la expansión clonal de las células reguladoras subsiguientes y por lo tanto un punto de intervención para la ablación de células reguladoras. El agente debe ser aplicado cuando la mayoría de los reguladores están en expansión clonal (mitosis), lo que generalmente corresponde a cuando la carga viral se ha estabilizado después de un incremento inicial y/o alcanzado su pico tras un incremento inicial, y/o posiblemente reduce la carga viral después de un incremento inicial (como se ve en la Figura 18), y/o, a más tardar en el comienzo de una segunda elevación de la carga viral.

25 En la mayoría de casos, el punto de tiempo de que el agente debe ser administrado tendrá que determinarse empíricamente en sujetos en diferentes etapas de la infección como su cinética de la respuesta inmune puede variar. Otros factores tal como la salud general del sujeto y/o la composición genética del sujeto repercutirán también sobre cuándo es el momento apropiado para administrar el agente.

30 Se ha establecido que los niveles de proteína c reactiva incrementan en aproximadamente el mismo tiempo que aumenta la carga viral (véase la Figura 18). Esto es seguido por una disminución en los niveles de proteína c reactiva como un resultado de la actividad de las células efectoras sobre la carga viral de la reducción de los números retrovirales. De acuerdo con ello, esta información puede utilizarse para determinar el momento correcto de la administración del agente. Por lo tanto, en una realización preferida, el agente se administra aproximadamente cuando los niveles de la proteína c reactiva han alcanzado su punto máximo y comenzado a disminuir.

35 Otra vía de determinar el punto de tiempo para la administración del agente es monitorear la carga viral después de la estimulación de la respuesta inmune. Dado que los ensayos de proteína c reactiva son relativamente simples y sensibles, y los niveles de proteína c-reactiva se correlacionan con la carga viral (véase la Figura 18), dichos ensayos se pueden usar para determinar cuándo comenzar un estrecho seguimiento de la carga viral. Por ejemplo, cuando los niveles de proteína c reactiva han comenzado a aumentar, el seguimiento de la carga viral podría comenzar.

40 Estos métodos descritos anteriormente en relación a la proteína c reactiva se pueden realizar utilizando otros marcadores positivos de fase inflamatoria aguda.

45 Se prevé que la carga viral se reduce debido a la actividad de las células efectoras, sin embargo, el incremento subsecuente en las células reguladoras subregularía las células efectoras lo que resulta en hacer lenta la reducción de la carga viral. De acuerdo con lo anterior, el agente se podría administrar antes de hacer lenta la reducción en la carga viral. Las técnicas conocidas en el arte, por ejemplo RT-PCR, se podrían utilizar para supervisar la carga viral en estas circunstancias.

50 La supervisión puede necesitar ser muy frecuente, por ejemplo tan a menudo como cada pocas horas, para asegurar que el punto de tiempo correcto se seleccione para la administración del agente. Preferiblemente, el monitoreo se lleva a cabo por lo menos cada 48 horas. Más preferiblemente, el monitoreo se lleva a cabo por lo menos cada 24 horas.

55 Óptimamente, se continúa la supervisión para determinar la afectación del agente. Ablación insuficiente, resurgimiento de las células reguladoras o los incrementos en la carga viral interior, por ejemplo, cerca de 7 días de

tratamiento significarán que el método o los usos de la presente invención se deben 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.

Marcadores de fase inflamatoria aguda

- 5 Como se mencionó anteriormente, algunos marcadores de fase inflamatoria aguda aumentan inicialmente durante una respuesta inmune (denominado en lo sucesivo como marcadores positivos de fase inflamatoria aguda), mientras que otros disminuyen inicialmente durante una respuesta inmune (denominado en lo sucesivo como marcadores negativos de fase inflamatoria aguda). A los marcadores de fase inflamatoria aguda también se les conoce en la técnica como reactantes de fase aguda o proteínas de fase aguda.
- 10 Ejemplos de marcadores positivos de fase inflamatoria aguda incluyen, pero no se limitan a, proteína C reactiva, amiloide A sérico, componente amiloide P del suero, proteínas del complemento tales C2, C3, C4, C5, C9, B, inhibidor de C1 y proteína enlazante C4, fibrinógeno, factor de von Willebrand, α 1-antitripsina, α 1-antiquimotripsina, α 2-antiplasmina, cofactor II de la heparina, inhibidor del activador del plasminógeno I, haptoglobina, hemopexina, ceruloplasmina, manganeso superóxido dismutasa, glicoproteína ácida α 1, hemo oxigenasa, proteína enlazante de manosa, proteína de leucocitos I, lipoproteína (a) y proteína enlazante de lipopolisacárido. Ejemplo de marcadores negativos de fase inflamatoria aguda incluyen, pero no se limitan a, albúmina, prealbúmina, transferrina, apoAI, apoAI, α 2 HS glicoproteína, inhibidor de inter- α -tripsina, glicoproteína rica en histidina.

Los niveles séricos de amiloide A se pueden determinar como se conoce en la técnica, véase por ejemplo O'Hara et al. (2000).

- 20 La proteína C-reactiva (CRP) es una importante proteína de respuesta de fase aguda, y su concentración en el suero se puede incrementar tanto como 1, 000 - veces durante la respuesta de fase aguda.

CRP es un pentámero que consiste de cinco subunidades idénticas, cada una con un peso molecular de aproximadamente 23.500.

- 25 Los niveles de proteína C reactiva se pueden determinar usando técnicas conocidas en el arte, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Senju et al. (1983), Price et al. (1987) y EDA et al. (1998).

TARGA

- El término "TARGA" se destina a cubrir cualquier terapia de combinación con al menos tres agentes antirretrovirales, cada uno de los cuales se administra al sujeto en una cantidad terapéuticamente efectiva. Para los propósitos de la presente invención, los agentes antirretrovirales incluyen cualquier sustancia que puede inhibir, reducir, o eliminar la infección retroviral de una célula. Un número de estos agentes están disponibles comercialmente para la administración según la dosis recomendada por el fabricante. Tales agentes antirretrovirales incluyen, pero no se limitan a, las dos clases conocidas como inhibidores de la transcriptasa reversa e inhibidores de proteasa, así como los agentes que son inhibidores de entrada viral. Aunque cualquier combinación de tres o más de estos agentes se puede utilizar, preferentemente TARGA comprende la administración de cantidades terapéuticamente eficaces de al menos un inhibidor de la transcriptasa reversa y al menos un inhibidor de la proteasa en combinación con al menos un agente antirretroviral adicional.

- Un número de inhibidores de la transcriptasa reversa están disponibles comercialmente para su uso en la administración de TARGA. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, la zidovudina (AZT) disponible bajo el nombre comercial de RETROVIR de Glaxo- Wellcome Inc., Research Triangle, NC 27709; didanosina (ddI) disponible bajo el nombre comercial VIDEX de Bristol- Myers Squibb Co., Princeton, NJ 08543; zalcitabina (ddC) disponible bajo el nombre comercial HIVID de Roche Pharmaceuticals, Nutley , N.J. 07110 ; estavudina (d4T) disponible bajo la marca ZERIT de Bristol-Myers Squibb Co., Princeton , N.J 08543 ; lamivudina (3TC) disponible bajo el nombre comercial EPIVIR de Glaxo- Wellcome Research Triangle, N.C. 27709; abacavir (1592U89) divulgado en WO96/30025 y disponible bajo el nombre comercial de ZIAGEN de Glaxo- Wellcome Research Triangle , N.C. 27709 ; adefovir dipivoxil [bis (POM)- PMEA] disponible bajo el nombre comercial PREVON de Gilead Sciences, Foster City, California 94404; lobucavir (BMS- 180194), un inhibidor de la transcriptasa reversa nucleósido divulgado en EP- 0358154 y EP- 0736533 y en desarrollo por Bristol- Myers Squibb, Princeton , N.J. 08543; BCH- 10652 , un inhibidor de transcriptse reversa (en la forma de una mezcla racémica de BCH- 10618 y BCH- 10619) en desarrollo por Biochem Pharma, Laval , Quebec H7V, 4A7, Canada; emtricitabina [(-) - FTC] con licencia de la Universidad de Emory bajo Emory Univ. US 5, 814, 639 y en desarrollo por Triangle Pharmaceuticals, Durham, N.C. 27707; beta- L- FD4 (también llamada beta- L- D4C y denominado beta- L- 2',3'- dicleoxi- 5- fluorocitidena) con licencia por la Universidad de Yale a Vion Pharmaceuticals, New Haven Connecticut 06511; y DAPD, el nucleósido purina, (-) - beta- D-2, 6, -diaminopurina dioxolano divulgada en EP 0656778 y con licencia de la Universidad de Emory y la Universidad de Georgia para Triangle Pharmaceuticals, Durham, N.C. 27707; y Idenosina (FddA), 9- (2, 3- didesoxi- 2-fluoro- b- D- treo- pentofuranosil) adenina, un ácido inhibidor de la

transcriptasa reversa a base de purina descubierto por el NIH y en desarrollo por U.S. Bioscience Inc., West Conshohoken , Pa. 19428.

Ejemplos de inhibidores de la proteasa útiles en la presente invención incluyen , pero no se limitan a , saquinavir (Ro 31-8959) disponible en cápsulas de gel duras bajo el nombre comercial INVIRASE y como cápsulas de gel blandas

5 bajo el nombre comercial FORTOUASE de Roche Pharmaceuticals, Nutley, N.J. 07110- 1199; ritonavir (ABT - 538) disponible bajo el nombre comercial NORVIR de Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60064; indinavir (MK - 639) disponible bajo el nombre comercial CRIXIVAN de Merck & Co., Inc., West Point, Pensilvania 19486- 0004; nelfnavir (AG- 1 343) disponible bajo el nombre comercial de VIRACEPT de Agouron Pharmaceuticals, Inc., LaJolla, California 92037- 1020; amprenavir (141W94), un inhibidor de proteasa no péptido en desarrollo por Vertex Pharmaceuticals, Inc., Cambridge , Mass. 02139- 4211 y disponible de Glaxo-Wellcome, Research Triangle , N.C. en virtud de un programa de acceso expandido; lasinavir (BMS- 234475) disponible de Bristol- Myers Squibb , Princeton, NJ 08543 (originalmente descubierto por Novartis, Basilea, Suiza (CPG- 61755); DMP- 450, una urea cíclica descubierta por Dupont y en desarrollo por Triangle Pharmaceuticals; BMS- 2322623, un azapéptido en desarrollo por Bristol- Myers Squibb, Princeton, NJ 08543 como 2^a generación del VIH- 1 PI ; y ABT- 378 en desarrollo por Abbott , Abbott Park, Illinois 60064, y AG- 1549 un carbamato de imidazol activo por vía oral descubierto por Shionogi (Shionogi # S - 1153) y en desarrollo por Agouron Pharmaceuticals, Inc., La Jolla California 92037- 1020.

10 Dosis humanas adecuadas para estos compuestos pueden variar ampliamente. Sin embargo, tales dosis se pueden determinar fácilmente por los expertos en la técnica. Las cantidades terapéuticamente efectivas de estos fármacos se administran durante la terapia TARGA. Por "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende una cantidad del agente antirretroviral que es suficiente para disminuir los efectos de la infección por VIH, o una cantidad que es suficiente para influir favorablemente en el perfil farmacocinético de uno o más de los otros agentes antirretrovirales usados en el protocolo TARGA. Por "influencia favorable" se entiende que el agente antirretroviral, cuando se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva, afecta el metabolismo de uno o más de los otros agentes antirretrovirales usados en la terapia TARGA, de tal manera que la biodisponibilidad del otro agente u otros agentes se incrementa.

15 La guía para las dosificaciones para cualquier agente antirretroviral dada está disponible en la técnica e incluye la administración de los agentes disponibles comercialmente en sus dosificaciones recomendadas.

Polipéptidos antigenicos

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

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

30 Los polipéptidos antigenicos se pueden proveer en cualquier manera conocida en la técnica la cual conduce a una respuesta inmune. Los polipéptidos antigenicos pueden ser, por ejemplo, naturales, recombinantes o sintéticos. Dichos polipéptidos antigenicos incluyen, pero no se limitan a, proteínas virales que son responsables para adhesión 40 a los receptores de superficie celular para iniciar el proceso de infección tal como glucoproteínas de envoltura.

35 Se pueden preparar polipéptidos antigenicos naturales, por ejemplo, al proveer retrovirus atenuados, retrovirus inactivados por calor o cualquier otro retrovirus muerto.

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

Vacunas

45 Se pueden preparar vacunas a partir de uno o más polipéptidos retrovirales. La preparación de las vacunas que contienen un polipéptido antigenico 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 antigenicos se mezclan frecuentemente con portadores/excipientes los cuales 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 los cuales mejoran la efectividad de la vacuna.

Como se utiliza aquí, el término "adyuvante" significa una sustancia que no mejora específicamente la respuesta inmune a un polipéptido antigénico. Ejemplos de adyuvantes que pueden ser efectivos incluyen pero no se limitan a: 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-L-alanina- 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$, preferiblemente 5 a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, más preferiblemente 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

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 las cuales 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, polialquilen glicoles 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 manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, 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 proveer cápsulas, tabletas 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 hidroxipropilmel celulosa.

40 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 inmune protectora se ha demostrado en numerosos sistemas experimentales (véase, 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 virales 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 inmune provocada mediante inmunización de ADN es el método de suministro de ADN, por ejemplo, las rutas parenterales pueden producir bajas tasas 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 el uso de la vacuna con base en ácido nucleico en la invención 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

- 5 Las plantas transgénicas que producen un polipéptido antigénico retroviral se pueden construir utilizando 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 químéricas que exhiben epítopos antigenicos (Mason et al., 1996; Modelska et al., 1998; 10 Kapustra et al., 1999; Brennan et al., 1999). Se ha sugerido que la forma particulada de estos VLP o virus químéricos 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

Ejemplo 1

- 15 Con el fin de demostrar la presente invención se utilizó 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 20 desarrollo de inmunodeficiencia en las células T y B. In vitro, existe un deterioro progresivo en la capacidad de respuesta de las células T y células B a los estímulos antigenicos o mitogénicos específicos. In vivo, los ratones infectados llegan a ser cada vez más 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 25 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 antimitótico vinblastina (Vb) en diferentes momentos pi es capaz de prevenir 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 horas a 28 días. Claramente, el tratamiento Vb es remarcablemente terapéutico cuando se administra a 6 horas 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. Experimentos adicionales han proporcionado resultados de 100% de los ratones que no tienen signos de desarrollo MAIDS al menos 12 meses después de tratamiento Vb de 14 días pi (datos no mostrados). Aunque no tan pronunciado como la protección vista después del día 14 de tratamiento, aún se observó la protección moderada del desarrollo MAIDS. 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 horas pi no se espera como los replicados de virus en células activamente 30 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 viral 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 35 reguladoras inmunes durante su fase de expansión y por lo tanto altera la respuesta inmunológica a la infección viral. 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. Esto conduce a la enfermedad a largo plazo la supervivencia libre durante muchos meses después de la infección y el tratamiento.

50 2. Caracterización adicional del efecto terapéutico en el día 14

2.1. Histología del 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 pesaron y se examinaron histológicamente. La arquitectura esplénica de todos los ratones infectados MAIDS se desorganizaron 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) fue indistinguible de aquella de ratones de control no infectados (Figura 3).

En apoyo de estos datos histológicos, los resultados preliminares basados en el análisis FACS de células de bazo de día 14 pi Vb de ratones tratados a las 10 semanas pi mostró proporciones celulares (CD4+, CD8+ y células B) y distribuciones como las observadas en ratones normales no infectados normal (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 fueron protegidos completamente del desarrollo de MAIDS o si el tratamiento Vb simplemente retrasó 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) fueron protegidos 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 inmune 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, fueron reexpuestos con el virus MAIDS en post-tratamiento Vb 3 o 8 semanas. Los ratones no fueron protegidos de reexposición viral y desarrollaron esplenomegalia y linfadenopatía que indica desarrollo MAIDS a 20 semanas (Figura 5). Este no es un resultado inesperado como la inmunosupresión dominante mediante la población reguladora de células que habría sido restaurada como una consecuencia de la respuesta efectora inmune a la segunda infección (no tratada).

20 3. Terapia Vb dirigida las células CD4⁺

3.1. Análisis FACS Directo de células de bazo luego de terapia Vb en post infección Día 14

Se realizó análisis FACS de células T CD4+ y CD8+ preparadas de bazos de ratones tratados con Vb en el Día 14 pi (Figura 6). También se examinaron las células T CD25+CD4+ ya que estos se han identificado recientemente como que tienen 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 inmune 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 mostraron que mientras se reducen los subconjuntos de células mediante la terapia Vb, la comparación de las relaciones no infectado a infectado mostraron 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 dirigida a las células CD4⁺

El experimento previo mostró que los subconjuntos de células inmunes principales (células CD4+ y CD8+) 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 diseñaron 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 subregulación regulación y depuración del anfitrión del virus MAIDS.

Los ratones se infectaron con MAIDS, recibieron tratamiento Vb pi día 14 y luego recibieron una transferencia adoptiva de $\sim 10^7$ 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 recibieron bazos completos, de ratones infectados que no habían recibido ningún tratamiento Vb. Los ratones en el Grupo II recibieron preparaciones de células de bazo completas, de ratones infectados, que habían sido disminuidas de células CD4+ utilizando un clasificador de células FACS después de tinción con anticuerpo monoclonal anti-CD4 marcado con fluorocromo. La clasificación celular resultó en la remoción de 99.5 % de células CD4+ de preparaciones de células de bazo. Los ratones en el Grupo III recibieron bazos completos de ratones donantes infectados que también recibieron 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 fueron células CD4+ debido a que cuando las células CD4+ fueron retiradas 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 infectó ratones con células de bazo de ratones

donantes infectados con MAIDS que también habían recibido el día 14 Vb mostró que estos ratones están completamente protegidos del desarrollo MAIDS (Figura 8).

3.3. Disminución 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 coexisten con una población clínicamente expandida de células reguladoras las cuales son CD4+, y que Vb es terapéutico por virtud de su capacidad de destruir el último. Por lo tanto, una disminución in vivo de células CD4+ en el punto de tiempo día 14 pi deben imitar el efecto de Vb. Un diagrama de flujo del experimento se presenta en la Figura 9. Se infectaron grupos de 5 ratones con los virus MAIDS y luego tratados con anticuerpos monoclonales para disminuir el anfitrión del subconjunto de célula T CD4+ o CD8+ en el día 14 pi. Se recolectaron los anticuerpos monoclonales de los sobrenadantes de líneas celulares de hibridoma productoras de anticuerpos y purificados mediante precipitación de sulfato de amonio. La prueba in vivo resultaron 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, el tratamiento en el día 14 pi con el anticuerpo monoclonal anti-CD4+ resultó en la prevención del desarrollo MAIDS en ratones infectados imitando por lo tanto el efecto de una inyección Vb en el día 14 pi (Figura 10). En contraste, la disminución in vivo de células CD8+ en el día 14 pi no tuvieron efecto en la evolución de la enfermedad. Además este resultado apoya la hipótesis de que una población de células T CD4+ es funcionalmente subreguladora de células efectoras inmunes que responden a la infección viral. Adicionalmente, la remoción de las células reguladoras dominantes CD4+ permite que las células efectoras inmunes respondan más efectivamente a la infección viral que resulta en evolución de la enfermedad más lenta o quizás depuración completa del virus MAIDS de su anfitrión.

4. Papel de las células T CD4+CD25+ como células reguladoras

Un experimento de transferencia adoptiva fue diseñado para probar directamente la hipótesis de que las células T CD4+CD25+ están funcionando como las células reguladoras en el modelo murino de SIDA. El mismo enfoque usado para determinar que las células reguladoras son células T CD4+ fue usado para probar si el subconjunto CD4+CD25+ son el objetivo del tratamiento Vinblastina día 14. La Figura 11 muestra el fundamento general detrás del experimento. Las células 2.0×10^6 del fenotipo regulador CD4+CD25+ se purificaron a partir de suspensiones de células individuales de los bazos de los donantes usando perlas MACS (Miltenyi Biotec) utilizando dos etapas de selección positivos. Las células se ensayaron entonces para pureza por citometría de flujo (tanto fracciones CD4+CD25+ y CD4+CD25 fueron de pureza > 90%) y la viabilidad usando exclusión de azul de tripano antes de la transferencia en no infectados (control) y ratones infectados con MAIDS tratados con Vinblastina día 14. Las células CD4+CD25- también fueron transferidos para permitir que las células reguladoras no puedan presentar en la fracción CD25+ y también para permitir la posibilidad de que estas células reguladoras putativas puedan perder la expresión de CD25 como se expanden y se activan como se informó por Gavin et al., 2002.

Los ratones que recibieron la transferencia adoptiva de células fueron ya sea no infectados (control) o infectados de MAIDS y tratados Vinblastina día 14 para examinar si la transferencia de células podría resultar en una progresión de la enfermedad. Básicamente, si las células T CD4+CD25+ funcionan como las células reguladoras entonces la restauración de estas células a través de la transferencia adoptiva debería resultar en la progresión de la enfermedad, abrogando el efecto protector del tratamiento Vinblastina día 14. La progresión de la enfermedad fue evaluada por el peso del bazo a las 10 semanas posteriores de la infección de MAIDS.

Los resultados del experimento de transferencia adoptiva utilizando ratones donantes no infectados se muestran en la Figura 12. En el experimento de control negativo la transferencia de células de donantes no infectados de fenotipo CD4+CD25+-/ no dio lugar a ningún cambio en las 10 semanas pi del peso del bazo de los receptores no infectados. Sin embargo, cuando las células CD4+CD25++/ fueron transferidos a infectados de MAIDS tratados con día 14 Vb la progresión de la enfermedad de los destinatarios era fácilmente evidente. Interesantemente hay una diferencia estadísticamente significativa en los pesos del bazo de estos dos grupos ($p = 0.033$) lo que indica que la enfermedad progresó más marcadamente en el grupo que recibió las células CD4+CD25+. De hecho, el control de bazos MAIDS las 10 semanas PI son aproximadamente 0.5-0.6 g en estos experimentos. Estos resultados sugieren que las células reguladoras existen en tanto la CD4+CD25+ y las fracciones de CD25+, con la porción de CD25+ de ser la más activa en la supresión de células efectoras.

5. Niveles de citoquina después de la infección de MAIDS

5. 1 Suero ELISA

Se ha llevado a cabo un ELISA cuantitativo por la presencia de IL-4 e IL-10 en el suero de los ratones en las primeras tres semanas después de la infección. IL-4 e IL-10 son ambas citoquinas que han sido documentadas como siendo requeridas para la maduración de y producidas por células reguladoras (Gavin et al, 2002, McGuirk and

Mills, 2002). Brevemente, se obtuvo sangre por sangrado de la cola de los ratones en los diferentes días después de la infección y se centrifugó a alta velocidad para recoger el suero. Estas muestras se ensayaron en cuanto a los niveles de citoquinas y los datos resultantes se muestran en las Figuras 13 y 14.

5 Hay dos picos claros de la producción de IL-4, el primer a los 7 días pi y el segundo a las 14-16 días pi antes de incrementar más allá de 21 días pi. El incremento final está probablemente asociado con las expansiones oligoclonales de células B que son la característica dominante del MAIDS en sus últimas etapas.

10 Las mismas muestras de suero también se analizaron por la presencia de IL-10. IL-10 también muestra un patrón de tres picos con un pico temprano en el día 4-5 pi el segundo en los días 12-14 y el tercero en el día 16 pi. Es interesante observar que un pico en el porcentaje de células CD4+CD25+ se produjo en los días 10-12 (datos no mostrados), que solapa el segundo pico de IL-10. En particular, CD25 (es decir, el receptor de IL-2) se expresa de manera transiente antes de la población de células entrando en el ciclo celular y la mitosis (Roitt et al. 1989). El patrón combinado es sugerente de una población pequeña de células reguladoras ampliando y convirtiendo en funcional precisamente en el momento en que Vb o el tratamiento anti-CD4 ablaciona la progresión MAIDS. Es decir este dato está de acuerdo con la hipótesis de la regulación de células T descrito aquí.

15 5.2 Niveles de citoquinas por flujo intracelular

20 EL flujo intracelular es un método que ha sido desarrollado y utilizado para examinar los niveles *ex vivo* de citoquinas presentes en las células individuales mediante citometría de flujo. En este experimento los ratones fueron infectados con MAIDS y los bazos cosechados cada cuarto día después de la infección (días 4, 8, 12, 16 y 20), así como un control día 0 no infectado para obtener los niveles de línea de base de la producción de citoquinas intracelular. Los bazos se prepararon como suspensiones de células individuales, las células rojas de la sangre lisadas y los WBCs luego fijados, se permearon y se tiñeron para una combinación de marcadores de superficie celular y citoquinas. Los resultados del experimento se muestran en la Figura 15.

25 Los niveles de expresión de IL-4 e IL-10 son muy similares con ambos alcanzando un máximo el día 16 pi y luego disminuye por día 20 pi, pero no regresan a los niveles de base. Este dato está de acuerdo con los resultados de las pruebas ELISA en suero (Figuras 13 y 14), donde se observó un pico en la producción de ambas citoquinas en el día 16 pi y, como se señaló anteriormente, se correlaciona bien con el porcentaje de CD4+CD25+ perfil después de la infección de MAIDS.

5.3 Los niveles de citoquinas por ELISpot

30 ELISPOT es una técnica basada en ELISA que permite la producción de citoquinas a ser analizadas en un único nivel celular. Las células de interés se incuban en pozos, la base de que es una membrana previamente recubierta con un anticuerpo monoclonal para la citoquina de interés. Esta etapa de incubación puede ser con o sin un estimulante para las células. A medida que la placa no se mueve durante la incubación la citoquina secretada se localiza en la posición de la célula ya que es capturado por el anticuerpo enlazado a la base de la membrana de tal manera que cada célula que secreta la citoquina deja una mancha en la membrana que es visible tras la detección del anticuerpo. La técnica permite la cuantificación del número de células produciendo una citoquina de interés hasta el nivel de una sola célula. Para este experimento WBCs esplénicos se recogieron a partir de ratones en los días 0, 4, 8, 12, 16 y 20 pi utilizando el mismo protocolo que para el flujo intracelular. Estas células fueron incubadas durante la noche en las placas de IL-4 e IL-10 ELISpot sin estimulación. Las placas se desarrollaron y las manchas se contaron. Los resultados para la IL-4 se muestran en la Figura 16 y para la IL-10 en la Figura 17.

40 De nuevo, como con el flujo intracelular y suero ELISA, una tendencia similar se observa para ambas citoquinas con un número creciente de células que expresan cada uno de citoquinas hasta un pico en el día 16 pi, seguido por una disminución marcada por día 20 pi.

6. Resumen

45 Este ejemplo indica que hay una población de células "reguladoras" que regulan por disminución la respuesta inmune al virus MAIDS, lo que permite que el virus prolifique 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 viral.

50 La modulación de la respuesta inmune 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 crecer 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 da la hipótesis de 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+.

- 5 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 viral se subregula, lo que resulta en una carencia de depuración viral y el desarrollo de la enfermedad.
- 10

Ejemplo 2

- 15 Un sujeto humano que sufre de una infección por el VIH fue objeto de TARGA durante al menos 6 meses y luego se saca del tratamiento. La carga viral y los niveles de proteína c-reactiva se determinaron utilizando técnicas estándar en muestras obtenidas durante y después de la finalización de TARGA

Como puede verse en la Figura 18, los resultados muestran que tras la conclusión de la terapia TARGA aumentó la carga viral. Esto fue seguido por una disminución en la carga viral como resultado de la actividad de células efectoras que a su vez fue seguido por otro incremento de la carga viral resultante de la regulación de las células efectoras. Los niveles de proteína c-reactiva estrechamente reflejan la carga viral lo que indica que los ensayos para esta proteína son útiles como un marcador para la actividad de células efectoras, así como la carga viral.

Ejemplo 3

- 20 Un paciente humano que padece una infección por VIH se administra con una vacuna que comprende polipéptidos antigenicos retrovirales. Los ejemplos de tales vacunas se revisan en Dennehy (2001) and Moore et al. (2001)
- 25 Despues de la administración de la vacuna, los niveles de proteína c-reactiva se analizaron como se describe generalmente en el Ejemplo 2. Preferiblemente, los niveles de proteína C-reactiva se determinan al menos cada 24 horas. Naturalmente, el paciente debe ser examinado para detectar cualquier señal de, por ejemplo, otras infecciones virales o bacterianas que pueden contribuir a la elevación de los niveles de proteína c-reactiva. En la ausencia de tales indicaciones, los niveles de proteína c-reactiva continuaron siendo monitoreados hasta los niveles 30 pico de proteína c-reactiva y comienzan a disminuir. Aproximadamente cuando los niveles de proteína c-reactiva comienzan a disminuir como una indicación de la regulación de las células efectoras se administra al sujeto con anticuerpos anti-CD4+ a una dosis estándar tal como 300 mg.

El paciente entonces se continúa a ser monitoreado para los marcadores de VIH, tales como la determinación de la carga viral. Si hay evidencia de que la infección no se ha controlado adecuadamente el tratamiento se puede repetir.

Ejemplo 4

- 35 Un paciente humano que padece una infección por VIH se somete a tratamiento TARGA estándar. Tras la conclusión del TARGA los niveles de proteína c-reactiva de los sujetos se analizaron como se describe generalmente en el Ejemplo 2. Preferiblemente, los niveles de proteína C-reactiva se determinan al menos cada 24 horas. Aproximadamente cuando los niveles de proteína c-reactiva comienzan a disminuir como una indicación de la regulación de las células efectoras se administra al sujeto con vinblastina en una dosis estándar, tal como 3-4 mg/m² por vía intravenosa (Casciato and Lowitz, 1995). La vinblastina se dirigirá a las células en división, tales como las células reguladoras, que comienzan a expandirse clonalmente para controlar los niveles de células efectoras.

40 El paciente continuó entonces a ser monitoreado para los marcadores de VIH, tales como la determinación de la carga viral. Si hay evidencia de que la infección no se ha controlado adecuadamente el tratamiento se puede repetir.

Referencias:

- Barin, F., McLane, M.F., Allan, J.S., Lee, T.H., Groopman, J.E. and Essex, M. (1985). Virus envelope protein of the HTLV- III represents major target antigen for antibodies in AIDS patients. *Science* 228, 1094- 6.
- 50 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.

- 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.
- 5 Casciato, D.A. and Lowitz, B.B. (1995) Manual of Clinical Oncology. Third Edition. Little Brown and Company, Boston.
- 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.
- 10 Coll, J., Palazon, J., Yazbeck, H., Gutierrez, J., Aubo, C., Benito, P., Jagiello, P., Maldyk, H., Marrugat, J. and Anglada, J. et al. (1995) . Antibodies to human 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.
- Conry, R.M., LoBuglio, A.F., Kantor, J., Schlam, 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.
- 15 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.
- 20 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.
- Dennehy, P.H. (2001) . Active immunization in the United States: Developments over the past decade. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 872- 908.
- 25 Eda, S., Kaufmann, J., Roos, W. and Phol, S. (1998) . Development of a new microparticle- enhanced turbidimetric assay for c- reactive protein with superioir features in analytical sensitivity and dynamic range. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 12, 137- 144.
- 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.
- 30 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.
- Gavin, M.A., Clarke, S.R., Negrou, E., Gallegos, A. and Rudensky, A. (2002) . Homeostasis and anergy of CD4 (+) CD25 (+) suppressor T cells in vivo. *Nature Immunology* 3, 33- 41.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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., Ball J.M., Shi J.J., Jiang X., Estes M.K. and Arntzen C.J. (1996). Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93, 5335-40.
- 5 McGuirk, P. and Mill, K. (2002) . Pathogen- specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends in Immunology* 23, 450- 5.
- Mitsuya, H., Yarchoan, R., Kageyama, S. and Broder, S. (1991) . Targeted therapy of human immunodeficiency virus- related disease. *FASEB Journal* 5, 2369- 81.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 Moore, J.P., Parren, P.W.H.I. and Burton, D.R. (2001) . Genetic subtypes, humoral immunity, and human immunodeficiency virus type 1 vaccine development. *Journal of Virology* 75, 5721- 5729.
- 25 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.
- 30 O'Hara, R., Murphy, E.P., Whitehead, A.S., Fitzgearld, O. and Bresnihan, B. (2000) . Acute- phase serum amyloid A production by rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Research* 2, 142- 144.
- 35 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.
- 40 Price, C.P., Trull, A.K., Berry, D. and Gorman, E.G. (1987) Development and validation of a particleenhanced turbidimetric immunoassay for C- reactive protein. *Journal of Immunological Methods* 99, 205- 211.
- [0163] 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.
- 45 Rakowicz- Szulczynska, E.M., Jackson, B., Szulczynska, A.M. and Smith, M. (1998) . Human immunodeficiency virus type 1- like DNA sequences and immunoreactive viral particles with unique association with breast cancer. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 5, 645- 53.
- Roitt, Brostoff and Male (1989) *Immunology*. Chapter 8, Gower Medical Publishing, London.
- 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.
- 50 Senju, O., Takagi, Y., Gomi, K., Ishii, N., Mochizuki, S. Ishii, N. et al. (1983) . The quantitative determination of CRP by latex agglutination photometric assay. *Japanese Journal of Clinical Laboratory Automation* 8, 161- 165.
- 55 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.
- 60 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.
- 65 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.
- 5 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. Un método para determinar cuando un agente el cual inhibe la producción de, limita la función de y/o destruye, las células T reguladoras, es para ser administrado a un sujeto mamífero con una infección retroviral que ha sido expuesto a un tratamiento que incrementa el número de, y/o activa, células T CD8+ efectoras dirigidas contra el retrovirus, el método que comprende analizar una muestra previamente obtenida del sujeto después del tratamiento para un marcador de fase inflamatoria aguda, en donde las fluctuaciones en los niveles del marcador de fase inflamatoria aguda se utilizan para ayudar en la determinación de cuando el agente se va a administrar, y en donde el momento de la administración del agente se selecciona de tal manera que ejerce un efecto proporcionalmente mayor contra las células T reguladoras que las células T CD8+ efectoras, y en donde el agente se selecciona entre el grupo que consiste de fármacos anti-proliferativos, la radiación y un anticuerpo el cual se enlaza específicamente a las células T CD4+;
- 5 en donde el marcador de fase inflamatoria aguda es un marcador positivo de fase inflamatoria aguda seleccionado del grupo que consiste de: proteína c reactiva, suero amiloide A, componente amiloide P de suero, proteínas del complemento seleccionados de C2, C3, C4, C5, C9, B, inhibidor de C1 y la proteína enlazante C4, fibrinógeno, factor de von Willebrand, α 1-antitripsina, α 1-antiquimotripsina, α 2-antiplasmina, cofactor II de la heparina, inhibidor del activador de plasminógeno I, haptoglobina, hemopexina, ceruloplasmina, manganeso superóxido dismutasa, glicoproteína- α 1 ácida, hemo oxigenasa, proteína enlazante de manosa, proteína de leucocitos I, lipoproteína (a) y proteína enlazante de lipopolisacárido, o en donde el marcador de fase inflamatoria aguda es un marcador negativo de fase inflamatoria aguda seleccionado de entre el grupo que consiste de: albúmina, prealbúmina, transferrina, apoAI, apoAI, glicoproteína α 2 HS, inhibidor de inter- α -tripsina y glicoproteína rica en histidina 2.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde el marcador de fase inflamatoria aguda es un marcador positivo de fase inflamatoria aguda.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, en donde el marcador positivo de fase inflamatoria aguda es proteína c reactiva o amiloide A sérico.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en donde el marcador positivo de inflamatoria aguda es la proteína c reactiva.
- 25 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde la producción de células efectoras después del tratamiento está indicado por el incremento de los niveles de marcadores positivos de fase inflamatoria fase.
- 30 6. El método de la reivindicación 1, en donde marcador de fase inflamatoria aguda es un marcador negativo de fase inflamatoria aguda.
- 35 7. El método de la reivindicación 6, en donde el marcador negativo de fase inflamatoria aguda es albúmina.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el método comprende el análisis de muestras obtenidas por lo menos cada 48 horas del sujeto.
- 35 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el método comprende el análisis de muestras obtenidas por lo menos cada 24 horas del sujeto.
- 40 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el tratamiento que incrementa el número de, y/o activa, células T CD8+ efectoras dirigidas contra el retrovirus es (i) retiro de la terapia de fármacos antirretrovirales o (ii) una composición que incrementa el número de y/o activa las células efectoras dirigidas contra un retrovirus, y en donde la composición comprende un polipéptido antigénico retroviral o ADN que codifica el polipéptido
- 45 11. Uso de una composición la cual incrementa el número de y/o activa las células efectoras dirigidas contra un retrovirus para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de una infección retroviral en un sujeto mamífero, en donde el sujeto se administra subsecuentemente con un agente el cual inhibe la producción de, limita la función de, y/o destruye, las células T reguladoras, y en donde el momento de la administración del agente se selecciona de tal manera que ejerce un efecto proporcionalmente mayor contra las células T reguladoras que las células T CD8+ efectoras, y en donde las fluctuaciones en los niveles de un marcador de fase inflamatoria aguda en el sujeto se utilizan para ayudar a determinar cuándo se administra el agente, y en donde la composición comprende un polipéptido antigénico retroviral o ADN que codifica el polipéptido, y en donde el agente se selecciona de entre el grupo que consiste de fármacos anti-proliferativas, radiación, y un anticuerpo el cual enlaza específicamente a las células T CD4+, en donde el marcador de fase inflamatoria aguda es un marcador positivo de fase inflamatoria aguda seleccionado del grupo que consiste de:
- 50 proteína c reactiva, suero amiloide A, componente amiloide P de suero, proteínas del complemento seleccionados de C2, C3, C4, C5, C9, B, inhibidor de C1 y la proteína enlazante C4, fibrinógeno, factor de von Willebrand, α 1-

- 5 antitripsina, α 1-antitromotripsina, α 2-antiplasmina, cofactor II de la heparina, inhibidor del activador de plasminógeno I, haptoglobina, hemopexina, ceruloplasmina, manganeso superóxido dismutasa, glicoproteína- α 1 ácida, hemo oxigenasa, proteína enlazante de manosa, proteína de leucocitos I, lipoproteína (a) y proteína enlazante de lipopolisacárido, o en donde el marcador de fase inflamatoria aguda es un marcador negativo de fase inflamatoria aguda seleccionado de entre el grupo que consiste de: albúmina, prealbúmina, transferrina, apoAI, apoAI, glicoproteína α 2 HS, inhibidor de inter- α -tripsina y glicoproteína rica en histidina.
- 10 12. El uso de un agente el cual inhibe la producción de, limita la función de, y/o destruye, las células T reguladoras para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de una infección retroviral en un sujeto mamífero, en donde el sujeto ha sido administrado previamente con una composición la cual incrementa el número de y/o activa las células efectoras dirigidas contra un retrovirus, 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 CD8+ efectoras, y en donde las fluctuaciones en los niveles de un marcador de fase inflamatoria aguda en el sujeto se utilizan para ayudar en determinar cuándo se administra el agente, y en donde el agente se selecciona de entre el grupo que consiste de fármacos anti-proliferativos, la radiación y un anticuerpo el cual se enlaza específicamente a las células T CD4+, y en donde la composición comprende un polipéptido antigénico retroviral o ADN que codifica el polipéptido; en donde el marcador de fase inflamatoria aguda es un marcador positivo de fase inflamatoria aguda seleccionado del grupo que consiste de: proteína c reactiva, suero amiloide A, componente amiloide P de suero, proteínas del complemento seleccionados de C2, C3, C4, C5, C9, B, inhibidor de C1 y la proteína enlazante C4, fibrinógeno, factor de von Willebrand, α 1-antitripsina, α 1-antitromotripsina, α 2-antiplasmina, cofactor II de la heparina, inhibidor del activador de plasminógeno I, haptoglobina, hemopexina, ceruloplasmina, manganeso superóxido dismutasa, glicoproteína- α 1 ácida, hemo oxigenasa, proteína enlazante de manosa, proteína de leucocitos I, lipoproteína (a) y proteína enlazante de lipopolisacárido, o en donde el marcador de fase inflamatoria aguda es un marcador negativo de fase inflamatoria aguda seleccionado de entre el grupo que consiste de: albúmina, prealbúmina, transferrina, apoAI, apoAI, glicoproteína α 2 HS, inhibidor de inter- α -tripsina y glicoproteína rica en histidina.
- 15 13. El uso de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en donde el agente se administra aproximadamente cuando el número de partículas virales ha comenzado a estabilizar o incrementar después de la administración de la composición, en donde las pruebas de nivel de la partícula viral en el sujeto comienza cuando el marcador positivo de fase inflamatoria aguda los niveles de marcadores inflamatorios comienza a incrementar después de la administración de la composición.
- 20 14. El uso de un fármaco antirretroviral para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de una infección retroviral en un sujeto mamífero, en donde el sujeto se administra subsecuentemente con un agente el cual inhibe la producción de, limita la función de, y/o destruye, células T reguladoras, en donde el agente se administra después de que ha concluido la terapia con fármacos antirretrovirales y una expansión resultante en números retrovirales ha llevado a un incremento en el número, y/o activación de, células efectoras, dirigidas contra el retrovirus, y en donde el momento de la administración del agente se selecciona de tal manera que ejerce un efecto proporcionalmente mayor contra las células T reguladoras que las células T CD8+ efectoras, y en donde las fluctuaciones en los niveles de un marcador de fase inflamatoria aguda en el sujeto se utilizan para ayudar a determinar cuándo se administra el agente, y en donde el agente se selecciona de entre el grupo que consiste de fármacos anti-proliferativos, radiación y un anticuerpo el cual enlaza específicamente a las células T CD4+;
- 25 en donde el marcador de fase inflamatoria aguda es un marcador positivo de fase inflamatoria aguda seleccionado del grupo que consiste de: proteína c reactiva, suero amiloide A, componente amiloide P de suero, proteínas del complemento seleccionados de C2, C3, C4, C5, C9, B, inhibidor de C1 y la proteína enlazante C4, fibrinógeno, factor de von Willebrand, α 1-antitripsina, α 1-antitromotripsina, α 2-antiplasmina, cofactor II de la heparina, inhibidor del activador de plasminógeno I, haptoglobina, hemopexina, ceruloplasmina, manganeso superóxido dismutasa, glicoproteína- α 1 ácida, hemo oxigenasa, proteína enlazante de manosa, proteína de leucocitos I, lipoproteína (a) y proteína enlazante de lipopolisacárido, o en donde el marcador de fase inflamatoria aguda es un marcador negativo de fase inflamatoria aguda seleccionado de entre el grupo que consiste de: albúmina, prealbúmina, transferrina, apoAI, apoAI, glicoproteína α 2 HS, inhibidor de inter- α -tripsina y glicoproteína rica en histidina.
- 30 15. El uso de un agente el cual inhibe la producción de, limita la función de, y/o destruye, las células T reguladoras para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de una infección retroviral en un sujeto mamífero, en donde ha sido administrado previamente con un fármaco antirretroviral, en donde el agente se administra después de que la terapia con fármacos antirretrovirales ha concluido y una expansión resultante en números retrovirales ha llevado a un incremento en el número, y/o activación de, células efectoras dirigidas contra el retrovirus, 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 CD8+ efectoras, y en donde las fluctuaciones en los niveles de un marcador de fase inflamatoria aguda en el sujeto se utilizan para ayudar en determinar cuándo se administra el agente, y en donde el agente se selecciona de entre el grupo que consiste de fármacos anti-proliferativos, radiación y un anticuerpo el cual enlaza específicamente a las células T CD4+; en donde el marcador de fase inflamatoria aguda es un marcador positivo de fase inflamatoria aguda seleccionado del grupo que consiste de: proteína c

- reactiva, suero amiloide A, componente amiloide P de suero, proteínas del complemento seleccionados de C2, C3, C4, C5, C9, B, inhibidor de C1 y la proteína enlazante C4, fibrinógeno, factor de von Willebrand, α 1-antitripsina, α 1-antiquimotripsina, α 2-antiplasmina, cofactor II de la heparina, inhibidor del activador de plasminógeno I, haptoglobina, hemopexina, ceruloplasmina, manganeso superóxido dismutasa, glicoproteína- α 1 ácida, hemo oxigenasa, proteína enlazante de manosa, proteína de leucocitos I, lipoporoteína (a) y proteína enlazante de lipopolisacárido, o en donde el marcador de fase inflamatoria aguda es un marcador negativo de fase inflamatoria aguda seleccionado de entre el grupo que consiste de: albúmina, prealbúmina, transferrina, apoAI, apoAIi, glicoproteína α 2 HS, inhibidor de inter- α -tripsina y glicoproteína rica en histidina.
- 5
- 10 16. El uso de la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en donde el agente se administra aproximadamente cuando el número de partículas virales ha alcanzado su pico o comenzado a disminuir después de este pico, en respuesta a la conclusión de la terapia de fármacos antirretrovirales, en donde las pruebas de los niveles de partículas virales en el sujeto comienzan cuando los niveles de un marcador positivo de fase inflamatoria aguda comienzan a incrementar tras la conclusión de la terapia de fármacos antirretrovirales.
- 15 17. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en donde la terapia antirretroviral es TARGA.
18. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en donde el marcador de fase inflamatoria aguda es un marcador positivo de fase inflamatoria aguda.
19. El uso de la reivindicación 18, en donde el marcador positivo de fase inflamatoria aguda es la proteína c reactiva.
- 20 20. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, en donde el retrovirus se selecciona del grupo que consiste de VIH-1, VIH-2, HTLV-1 y HTLV-2.
21. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 20, en donde el sujeto mamífero es un ser humano.

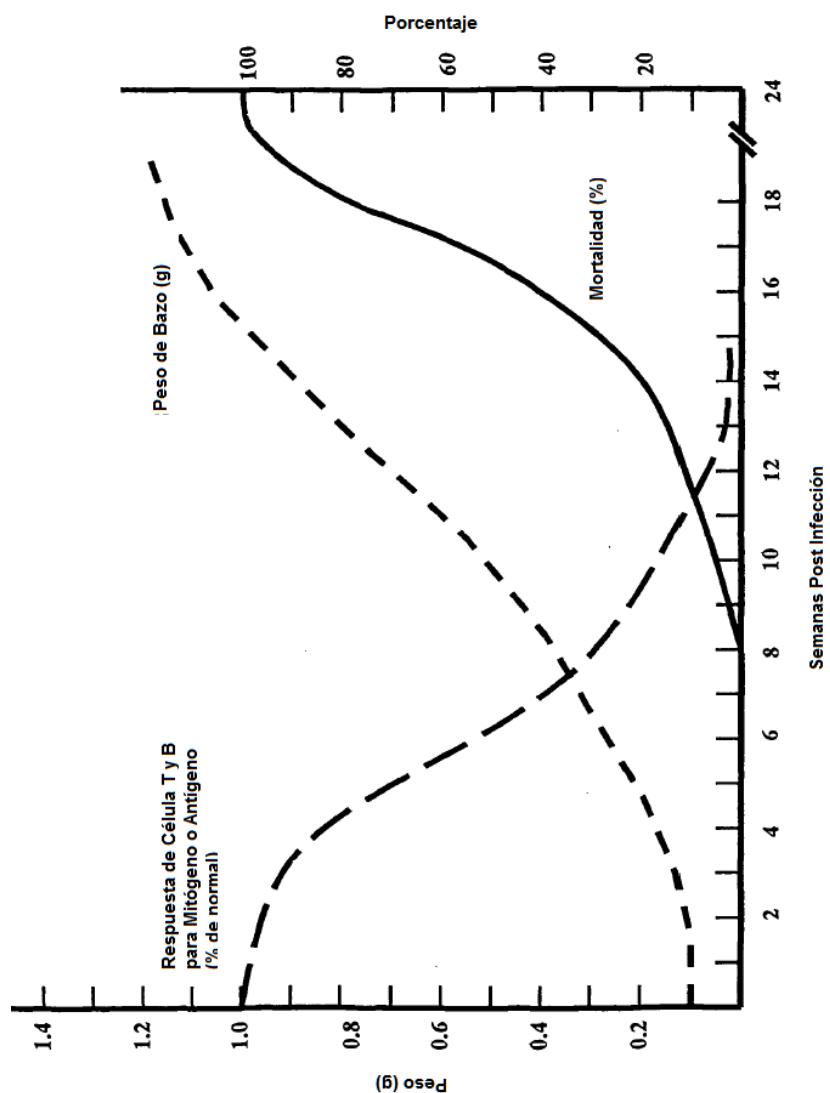


Figura 1.

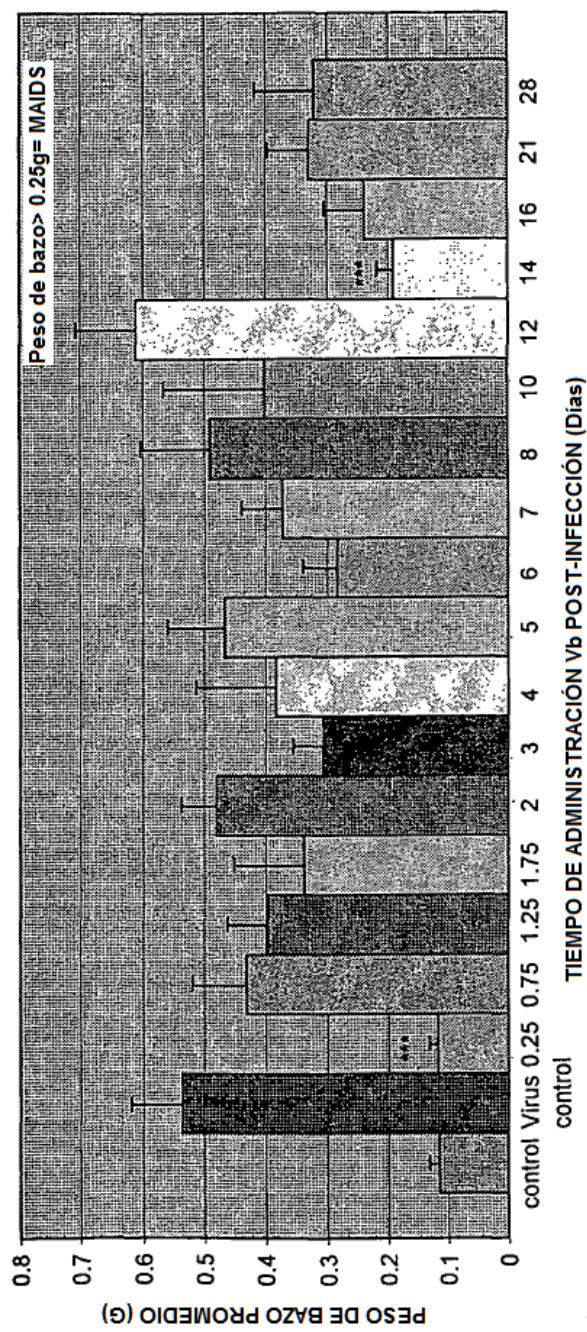


FIGURA 2.

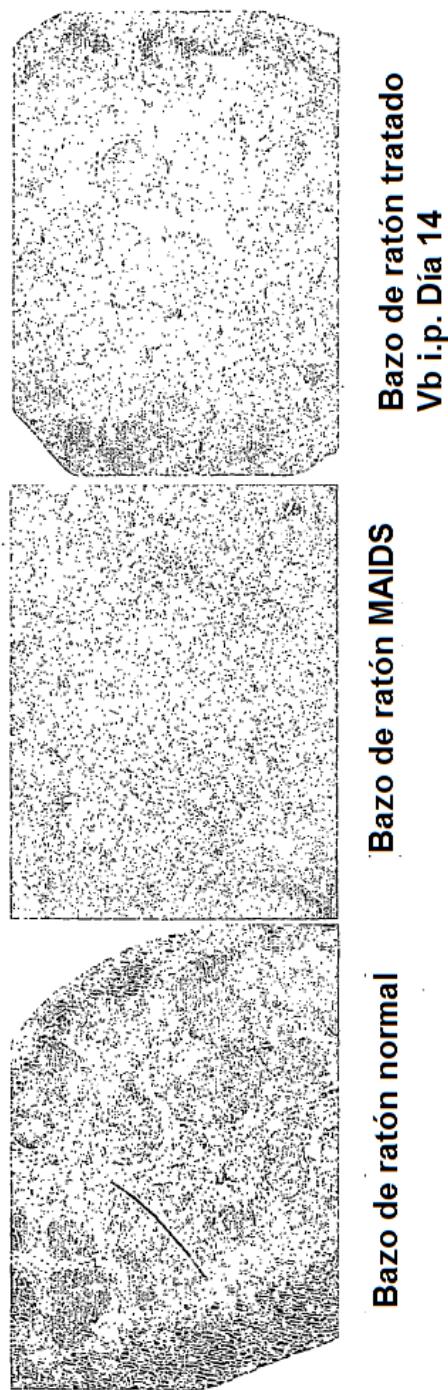


Figura 3.

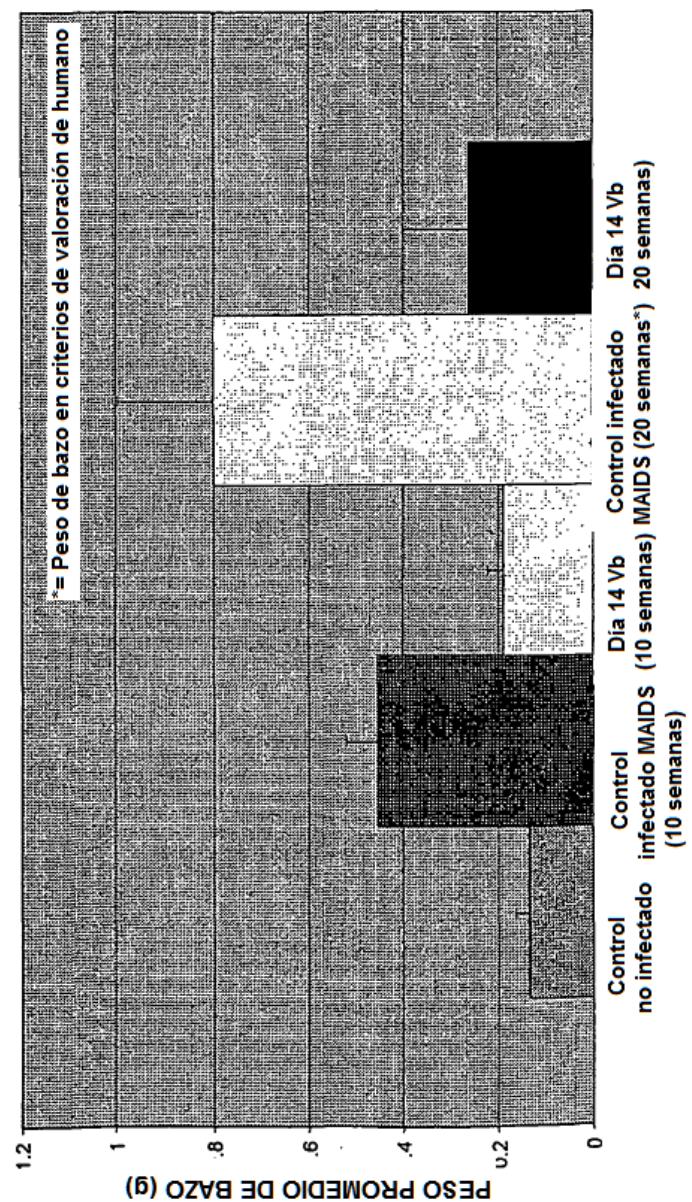


Figura 4.

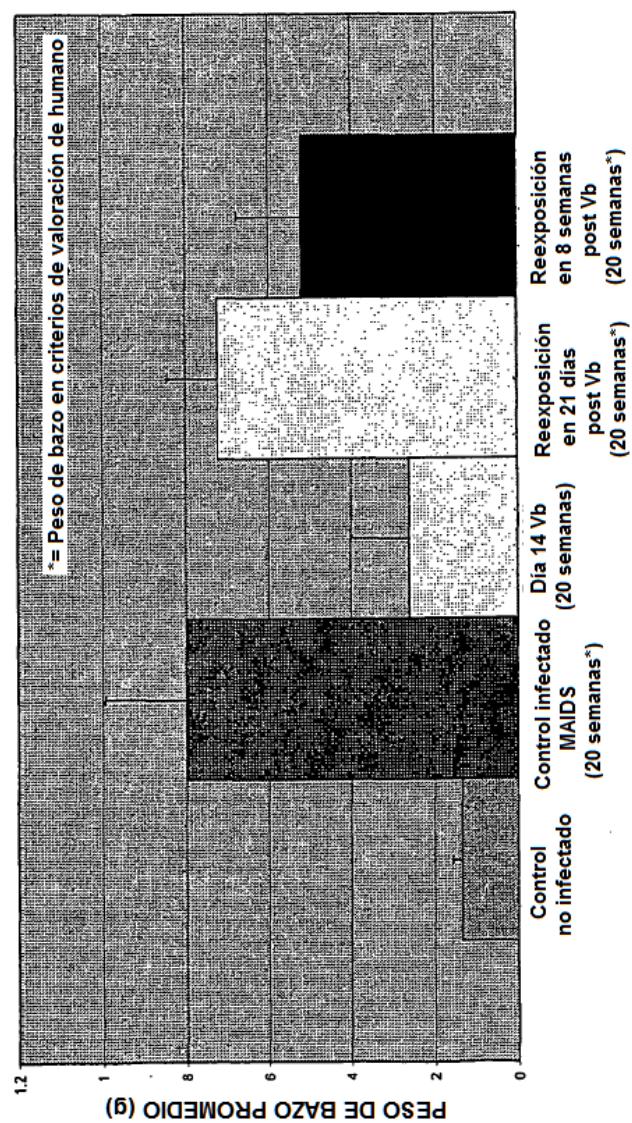


Figura 5.

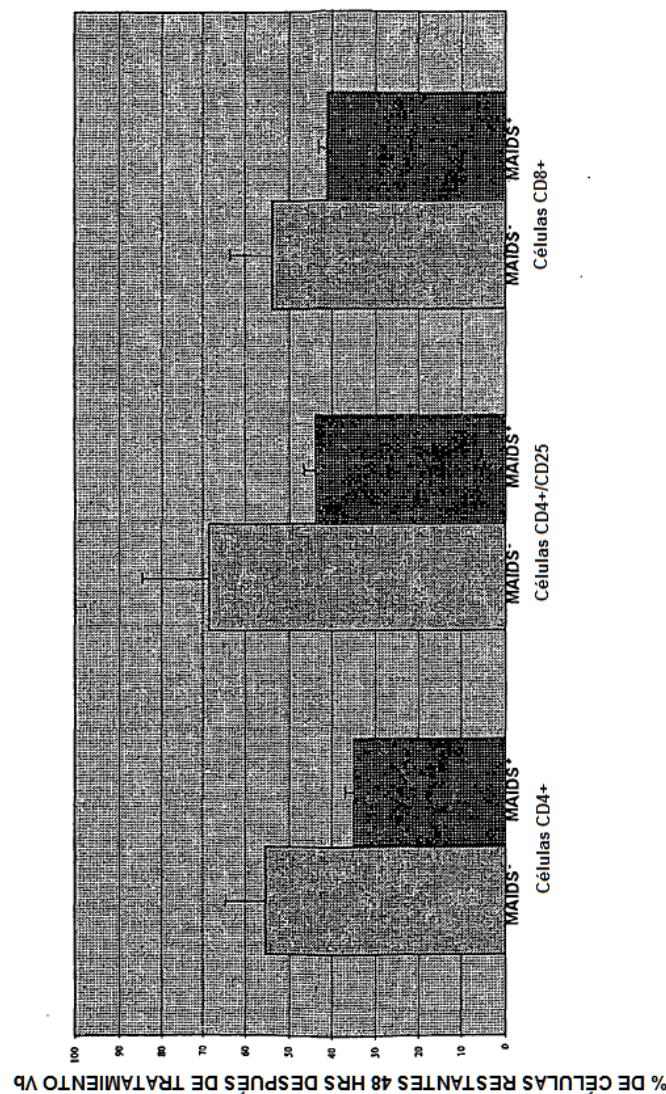
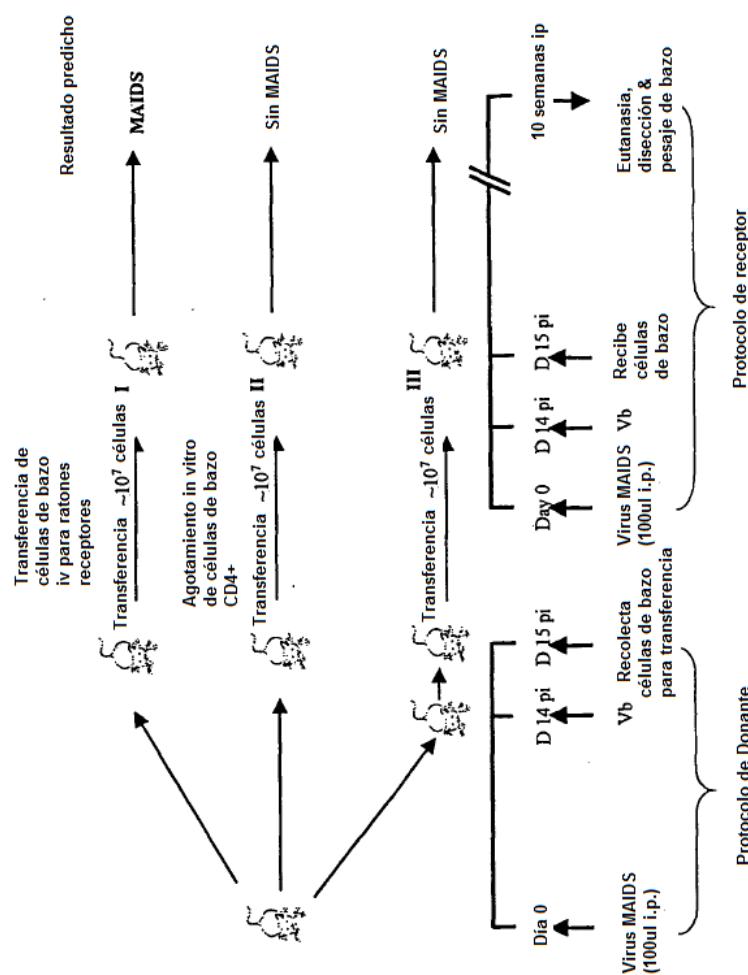


Figura 6.



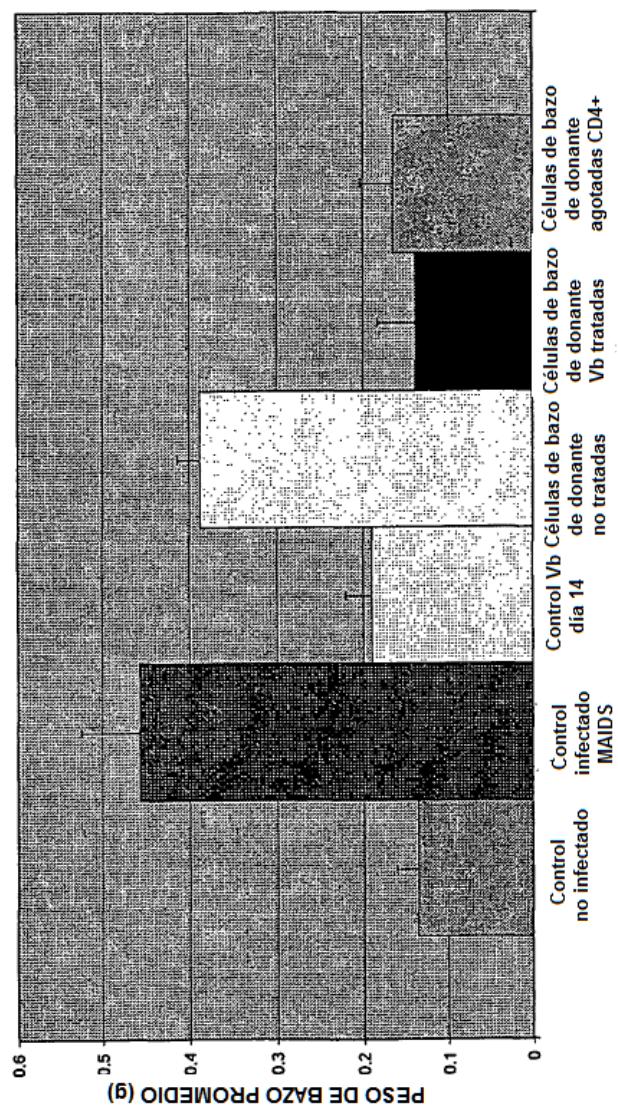
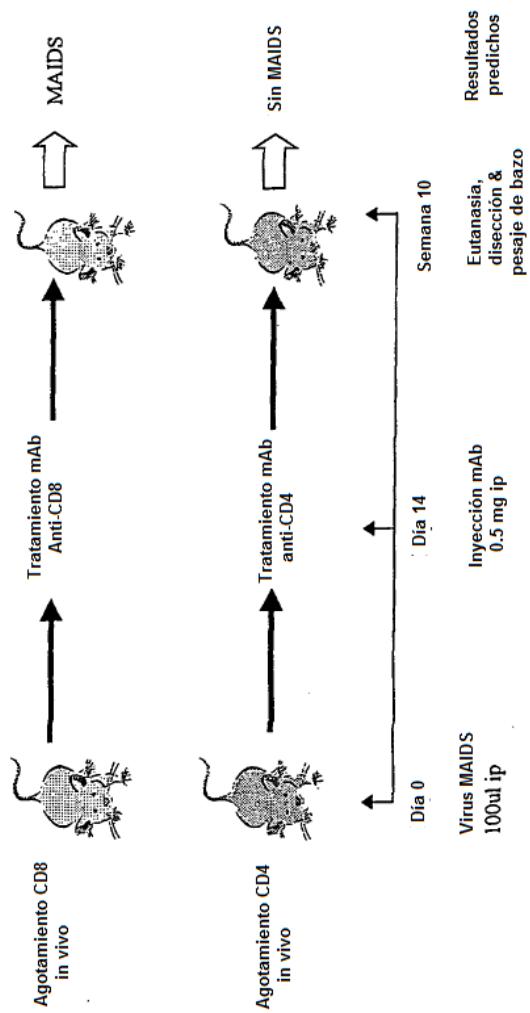


Figura 8.



Controles no reciben tratamiento de anticuerpo monoclonal

Figura 9.

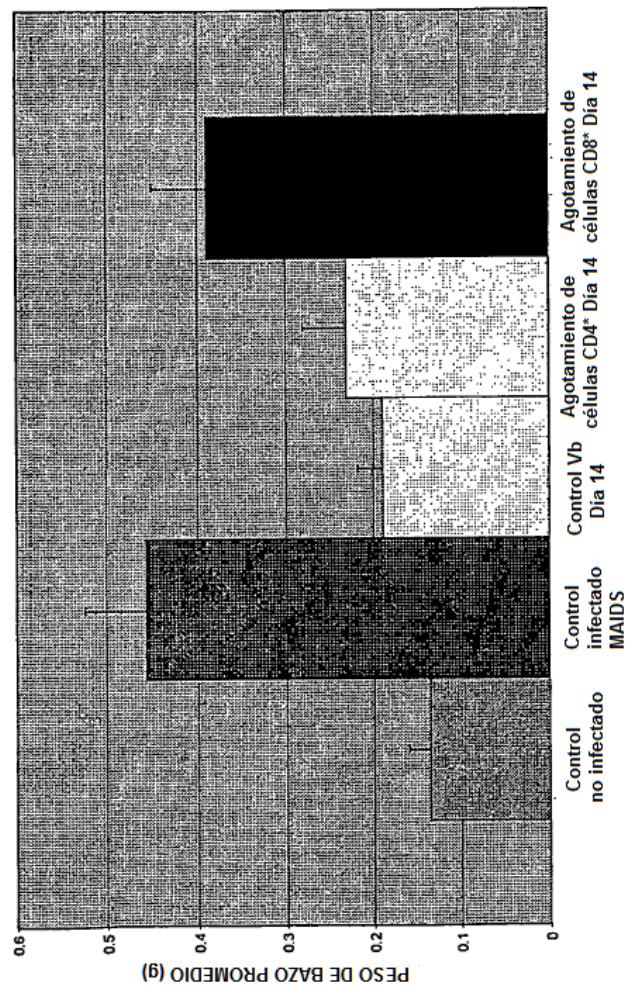


Figura 10.

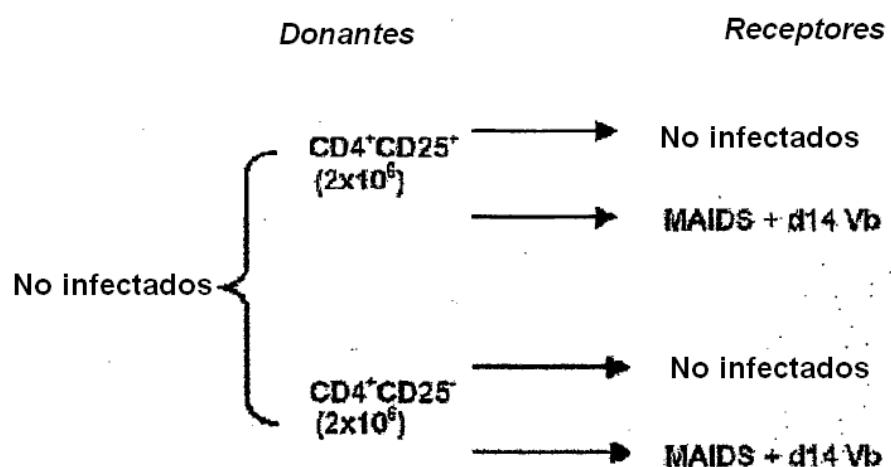


Figura 11

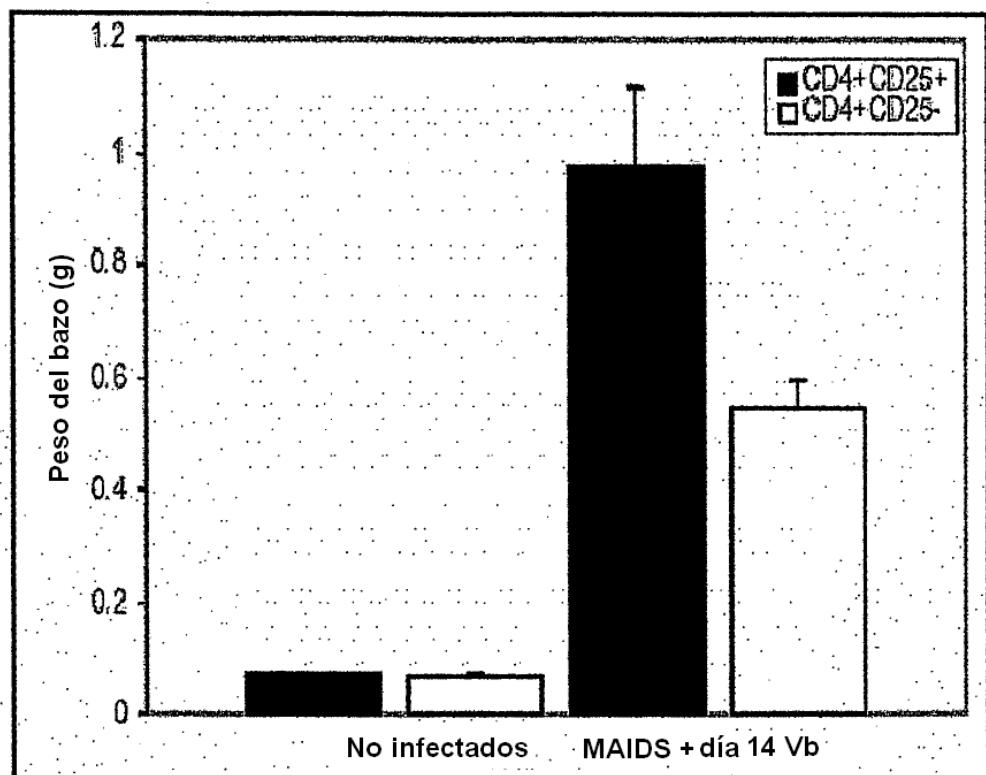


Figura 12

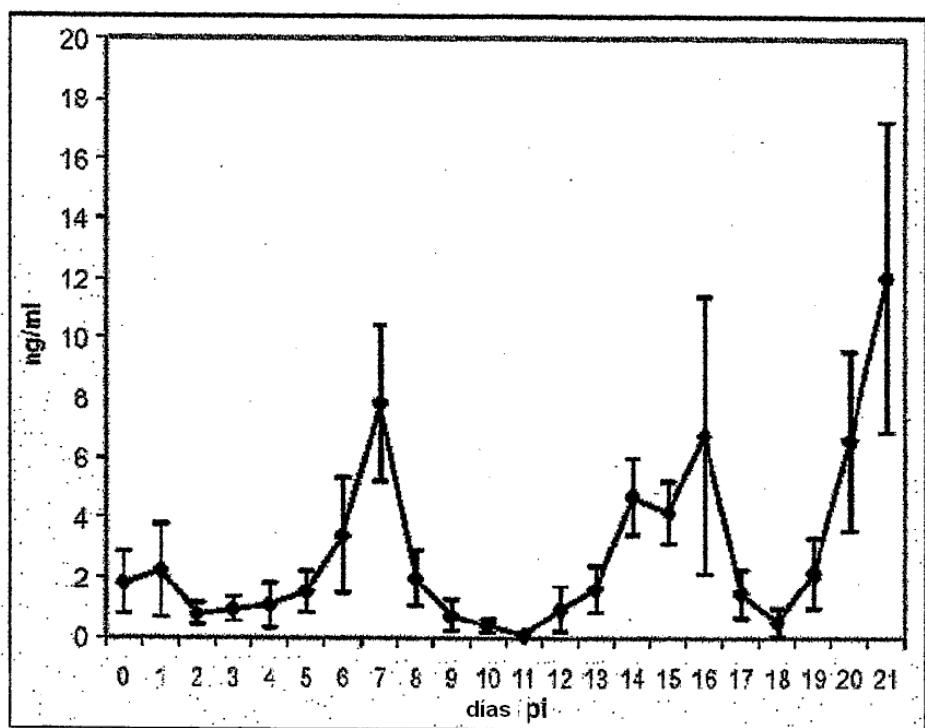


Figura 13

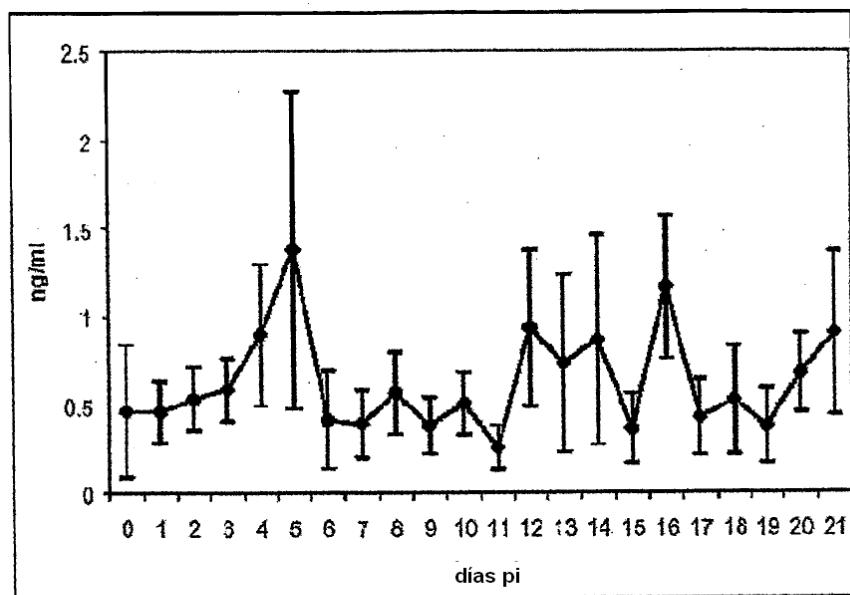


Figura 14

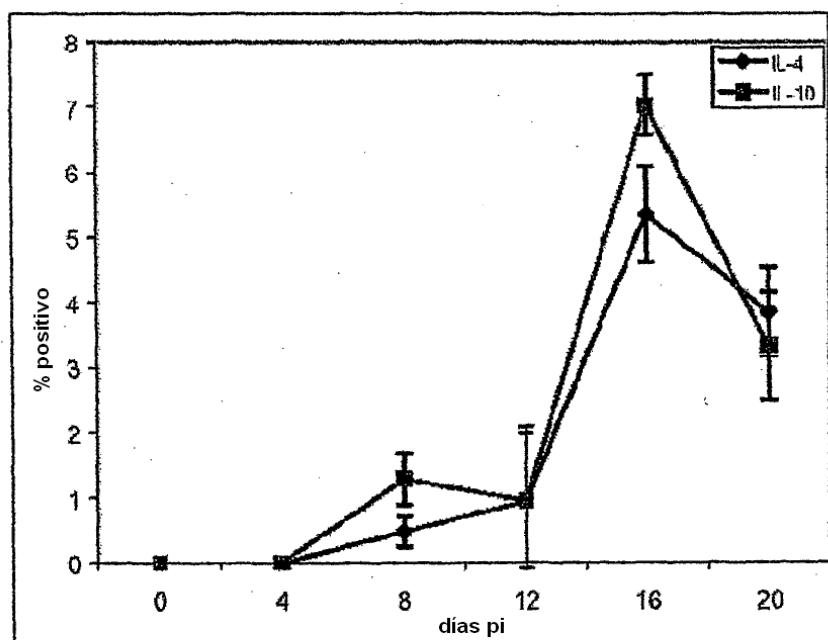


Figura 15

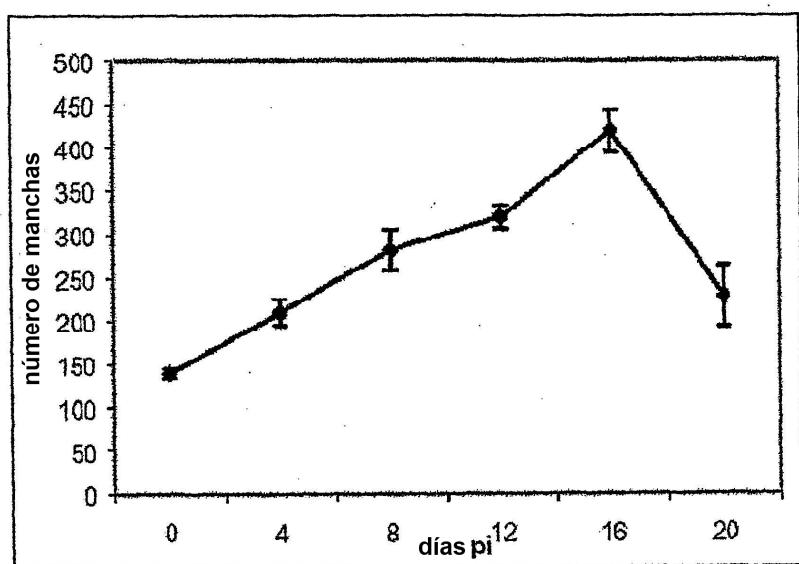


Figura 16

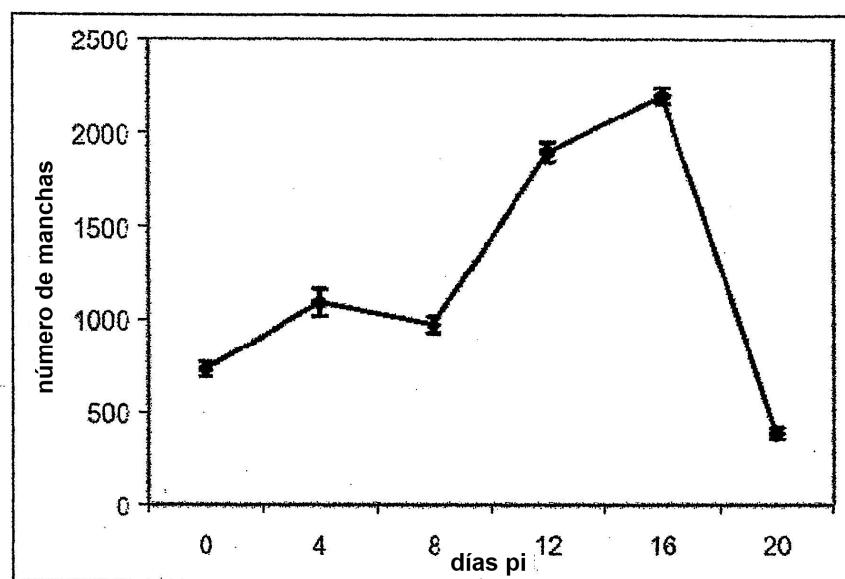


Figura 17

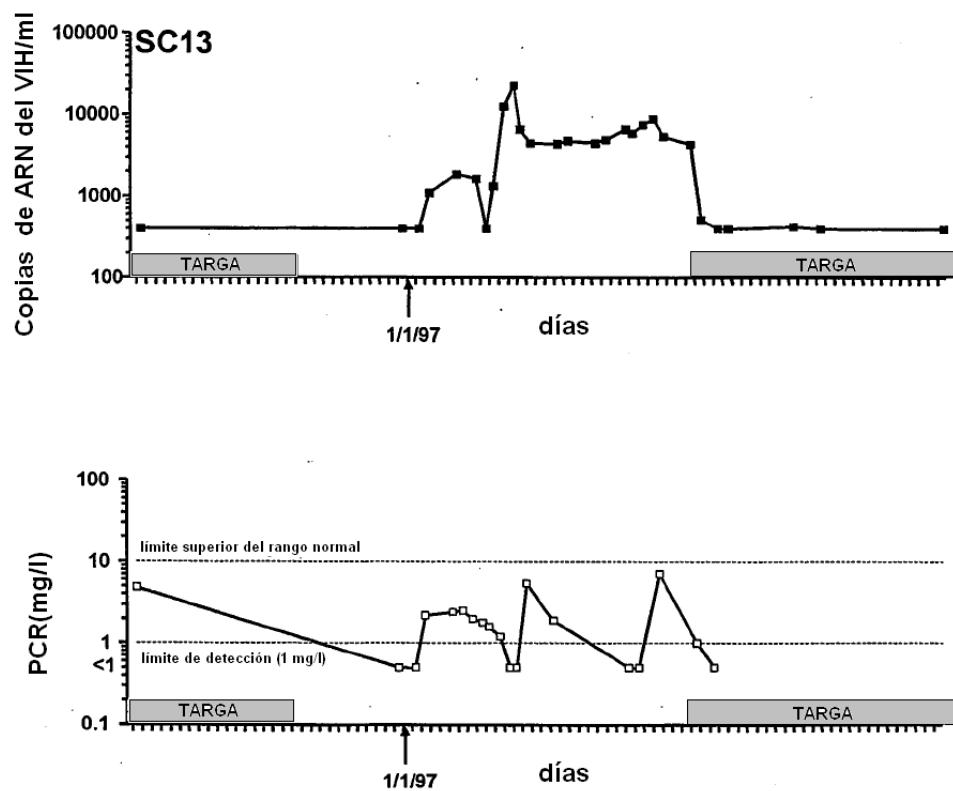


Figura 18