

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 511**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2012 PCT/IB2012/000857**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12137071**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2012 E 12721921 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2694101**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas para prevenir y/o tratar una enfermedad por VIH en seres humanos**

30 Prioridad:

06.04.2011 WO PCT/CN2011/072481

13.09.2011 US 201161534088 P

30.01.2012 WO PCT/CN2012/070761

09.03.2012 US 201261609051 P

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

24.03.2017

73 Titular/es:

BIOVAXIM LIMITED (33.3%)

Finsgate 5-7 Cranwood Street

London EC1V 9EE, GB;

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (33.3%) y

INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE

DÉVELOPPEMENT (IRD) (33.3%)

72 Inventor/es:

ANDRIEU, JEAN-MARIE y

LU, LOUIS

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 606 511 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

Composiciones farmacéuticas para prevenir y/o tratar una enfermedad por VIH en seres humanos.

5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una mezcla de antígeno de VIH específico y una bacteria no patógena como se define en las reivindicaciones. Dicho antígeno de VIH específico comprende uno o más epítomos de proteínas Gag y/o Pol y son partículas de virus de VIH inactivadas. Dicha bacteria es preferentemente *Lactobacillus plantarum*. Estas composiciones son útiles para evitar y/o tratar una enfermedad por VIH en humanos.

10

Antecedentes de la invención

Hace más de veinticinco años después del descubrimiento del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), las recientes proyecciones de la Organización Mundial de la Salud y el Joint United Nations Program en VIH/SIDA indican que si la pandemia progresa a su actual velocidad habrá más de 30 millones de infecciones para el 2011.

15

Sin embargo, a pesar de esfuerzos considerables de investigación para encontrar tratamientos eficaces para evitar infecciones de VIH, las dos vacunas preventivas recientemente probadas ya han fallado (Mc Elrath et al., 2008) o han producido resultados modestos (Rerks-Ngarm et al., 2009).

20

Jae-Sung Yu et al. (Clinical and Vaccine Immunology, Nov. 2006, vol 13, No. 11, 1204-1211) describe vectores de *Mycobacterium smegmatis* recombinantes contruidos para expresar el grupo VIH-1 M consenso *env* gene CON6 ya sea como una proteína de superficie, intracelular o secretada. Los autores pueden demostrar que en ratones, *M. smegmatis* recombinante fue inmunógeno para la inducción de respuesta de células T de VIH-1 en superficies de mucosas.

25

Ke-Qin Xin et al. (Blood, 1 July 2003, vol 102, No. 1, 223-228) describe un vector de *Lactococcus lactis* recombinante que expresa el bucle V2-V4 de VIH-1 Env en su superficie celular. La inmunización oral de ratones con este vector induce:

30

- tanto respuestas inmunitarias mucosas y humorales como se muestra al detectar altos niveles de IgG de suero específico de VIH y anticuerpos IgA fecales; y
- una respuesta inmunitaria celular como se muestra por un número incrementado de células que secretan IFN-gamma específicas de VIH.

35

Para expresarse adecuadamente en la superficie de célula de *L. lactis*, unos segmentos de genes de 1 kb o menos pueden ser utilizados.

40

La mayoría de los científicos implicados en patogénesis y prevención de VIH consideran que antes de probar vacunas preventivas de VIH u otras composiciones biológicas para evitar o tratar infección de VIH en seres humanos, sería más constructivo probar sus equivalentes en primates no humanos (Morgan C, et al., 2008). El primate no humano de selección es el macaco rhesus y entre los macacos, se ha mostrado en forma concluyente que macacos de origen chino infectados por el virus de inmunodeficiencia simia (SIV; "VIS") 239 son el mejor modelo que imitan la mayoría de los aspectos clínicos, virológicos e inmunitarios de la evolución de la infección VIH en humanos (Marcondes MC, et al. 2006; Stahl-Hennig C, et al. 2007; Chen S, et al. 2008).

45

Finalmente, la comunidad científica está de acuerdo en que, una vez que una composición o vacuna biológica preventiva efectiva contra VIS 239, se descubra en el macaco, deberá con toda probabilidad ser adaptable en forma exitosa a humanos para protegerlos contra el SIDA.

50

A pesar de esfuerzos de investigación constantes de la comunidad científica, todavía se esperan estrategias eficaces preventivas y terapéuticas para combatir la pandemia del SIDA en todo el mundo.

55

Diversas bacterias se ha descrito que presentan propiedades interesantes como coadyuvantes e inmunomoduladoras ante administración a sujetos. En particular, bacterias de ácido láctico se han informado de que promueven un efecto de tolerancia en el sistema inmunitario.

60

Por ejemplo, el documento WO 2006/123230 publicado el 23 de noviembre de 2006 a nombre de Stallergenes S.A., describe el uso de una bacteria seleccionada de Bifidobacteria y bacterias de ácido láctico como un adyuvante en una composición inmunógena capaz de inducir tolerancia específica de antígeno ante administración sublingual, perlingual u oral a un sujeto. La composición inmunógena se propone para utilizarse en tratar alergias, enfermedades autoinmunitarias o para evitar rechazos de injertos.

65

Sin embargo por ejemplo, el documento WO 2009/093900 publicado el 30 de julio del 2009 a nombre de Stichting Top Institute Food and Nutrition, describe una composición tolerogénica que contiene una cantidad sustancial de

bacterias de ácido láctico en la fase media-log. Esta composición induce una inmunotolerancia no específica de antígeno cuando se administra a un sujeto. La composición se propone que se utilice para evitar, retrasar y/o tratar afecciones o enfermedades asociadas con respuestas inflamatorias que puedan llevar a daño de tejido tales como alergias, enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias del intestino.

5

Sumario de la invención

Los inventores pudieron demostrar que de manera sorprendente, composiciones farmacéuticas originales como se describen en los Ejemplos a continuación, inducen una protección inmunitaria específica de antígeno eficaz contra VIS en macacos. Aún más, cuando la protección inmunitaria específica de VIS se induce, los inventores mostraron que evita replicación/diseminación de VIS y el establecimiento subsecuente de la infección *in vivo*.

10

De hecho, los inventores han mostrado de manera sorprendente que ante administración de una composición farmacéutica como se describe en la presente memoria, ya sea por la vía de las mucosas o por la ruta intradérmica o intraepitelial, la replicación de virus fue inhibida significativamente o incluso eliminada o evitada.

15

De hecho, los inventores pudieron observar por primera vez que una respuesta celular CD8+T no citotóxica suprime la activación temprana de células CD4+T que presentan antígeno VIS en macacos. De esta manera, sin desear estar limitados a la teoría, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención inducen un tipo inesperado nuevo de inmunotolerancia específica de virus ante administración por la vía de las mucosas o intradérmica o intraepitelial a los sujetos. Esta inmunotolerancia parece ser una inmunotolerancia inducida por células T CD8+ de supresión específica de antígeno VIH Gag y/o Pol (denominada asimismo en la presente memoria inmunotolerancia "Ts" para inmunotolerancia "T supresiva"), que es MHC (para "complejo de histocompatibilidad mayor")-Ib/E-restringido y no citotóxico.

20

25

A partir de los resultados de los que se informa en la presente memoria, se proporciona mediante la presente invención una composición farmacéutica nueva que puede lograr una inmunotolerancia "Ts" como se define anteriormente para evitar y/o tratar una enfermedad por VIH en humanos.

Un objetivo de la presente invención de esta manera es proporcionar una composición farmacéutica que comprende una mezcla de un antígeno y bacteria viva no patógena. Dicho antígeno son partículas de virus de VIH inactivadas, y dicha bacteria viva no patógena es seleccionada de entre bacterias de ácido láctico no patógenas y BGG, en la que dicha bacteria de ácido láctico es preferentemente *Lactobacillus plantarum*.

30

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica como se describe anteriormente, para su utilización como un medicamento, en particular como vacuna.

35

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente, para su utilización en un procedimiento para prevenir y/o tratar una enfermedad por VIH en un ser humano necesitado del mismo.

40

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para prevenir y/o tratar una enfermedad por VIH en un humano que lo requiere, que comprende por lo menos la etapa de administrar al humano por la vía de las mucosas (preferentemente oral) o intradérmica o intraepitelial, una cantidad eficaz de una composición farmacéutica como se mencionó anteriormente.

45

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente, para su utilización en un procedimiento para proteger a un ser humano contra el VIH.

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para proteger a un humano contra VIH, que comprende por lo menos la etapa de administrar por la vía de las mucosas (preferentemente oral) o intradérmica o intraepitelial, una cantidad eficaz de una composición farmacéutica como se mencionó anteriormente al humano.

50

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente, para la utilización para proteger a un humano de una seroconversión de VIH.

55

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para proteger a un humano de seroconversión de VIH, que comprende por lo menos la etapa de administrar al humano por la vía de las mucosas (preferentemente oral) o intradérmica o intraepitelial, una cantidad eficaz de una composición farmacéutica como se mencionó anteriormente.

60

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar unas partículas de virus de VIH inactivadas y una bacteria no patógena como se ha descrito anteriormente, para la utilización como una composición farmacéutica combinada para la utilización simultánea, separada o secuencial en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad por VIH en un humano necesitado de la misma.

65

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar un kit farmacéutico para evitar y/o tratar una enfermedad por VIH en un humano que lo requiere, que comprende:

- 5 - en un primer recipiente, unas partículas de virus de VIH inactivadas; y
 - en un segundo recipiente, una bacteria no patógena como se ha descrito anteriormente,
- 10 en el que dichas bacterias de virus de VIH inactivadas y dicha bacteria están en portadores farmacéuticos aceptables para administración oral, en el que dicha bacteria es preferentemente *Lactobacillus plantarum*.

Breve descripción de los dibujos

15 La presente invención se ilustra mediante las siguientes figuras a las que se hace referencia en los siguientes ejemplos no limitativos.

- Figura 1: Prueba intravenosa (i.v.) de SIVmac239 de macacos rhesus tratados previamente con iSIV/BCG intravaginal.
- 20 Figura 2: Prueba Intrarrectal (i.r.) SIVmac239 de macacos rhesus tratados previamente con iSIV/BCG intravaginal.
- Figura 3: Pruebas SIVmac239 repetidas (3 veces por i.v. y 2 veces por i.r.) de macacos rhesus pretratados con iSIV/BCG intravaginal.
- 25 Figura 4: Prueba SIVmac239 intravenosa de macacos rhesus tratados previamente con iSIV/BCG intravaginal más un refuerzo intradérmico.
- Figura 5: Prueba SIVmac239 intrarrectal de macacos rhesus tratados previamente con iSIV/BCG intravaginal mediante un refuerzo intradérmico.
- 30 Figura 6: Prueba SIVmac239 intrarrectal de macacos rhesus tratados previamente con iSIV/BCG oral.
- Figura 7: Actividad antiviral *in vitro* de células T CD8+ que se obtienen de macacos rhesus tratados previamente con iSIV/BCG intravaginal.
- 35 Figura 8: Actividad antiviral *in vitro* de células T CD8+ que se obtienen de 4 macacos rhesus tratados previamente con iSIV/BCG oral.
- Figura 9: Supresión específica de VIS de activación de células T CD4+ por células T CD8+ autólogas que se obtienen de 4 macacos rhesus tratados previamente con iSIV/BCG oral.
- 40 Figura 10a: Títulos de anticuerpo Anti-SIV IgG en muestras de plasma que se toman de macacos rhesus tratados previamente con iSIV/LP, iSIV o LP.
- 45 Figura 10b: Proliferación de células T específicas de VIS en muestras PBMC tomadas de macacos rhesus tratados previamente con iSIV/LP, iSIV o LP.
- Figura 10c: Células T que secretan IFN-gamma específico de VIS ante estímulo *in vitro* en la presencia o ausencia de células T CD8 o CD25.
- 50 Figura 10d: Supresión específica de VIS de activación de células T de CD4+ por células T CD8+ autólogas que se obtienen de 8 macacos rhesus tratados previamente con iSIV/LP oral como se compara con animales tratados previamente LP (n = 4) oral o iSIV (n = 3).
- 55 Figura 10e: Células T CD8+ específicas de VIS después de 60 días posterior a administración intragástrica de una preparación iSIV/LP: citotoxicidad de células T CD4+ pulsadas AT-2 VIS en la presencia de células T CD8+ o de K562 en la presencia de células destructoras naturales humanas (hNK) (controles) con o sin SEB y estímulo anti-CD3/CD28.
- 60 Figura 11a: Actividad antiviral *in vitro* (en células CD4) de células T CD8+ autólogas que se obtienen de los 8 macacos rhesus tratados previamente con iSIV/LP oral en comparación con animales tratados previamente con LP (n = 4) oral o iSIV (n = 3).
- 65 Figura 11b: Actividad antiviral *in vitro* (en células CD4) de células T CD8+ heterólogas o alogénicas que se obtienen de 4 de los 8 macacos rhesus, 80 días después de tratamiento de un iSIV/LP oral.

- Figuras 11c-g: Actividad anti-SIV de células T CD8⁺ después de 60 días posteriores a inmunización oral en un sistema de cultivo retrasado (c), inserto (d), alogénico (e), en la presencia de anticuerpos anti-MHC-la/ABC o anti-MHC-lb/E (f), y en células T de CD8⁺ agotadas de subconjunto TCR $\gamma\delta^+$ o V $\beta 8^+$ (g).
- Figura 12a: Niveles de carga viral en plasma (copias VIS ARN por ml de plasma) después de pruebas SIVmac239 intravenosas e intrarrectales en los macacos rhesus tratados previamente con iSIV/LP oral en comparación con animales tratados previamente con LP oral o iSIV.
- Figura 12b: Niveles de carga viral celular (copias VIS ADN por millón de PBMCs) después de pruebas SIVmac239 intrarrectales e intravenosas en los macacos rhesus tratados previamente iSIV/LP oral en comparación con animales tratados previamente con LP oral o iSIV.
- Figura 13: Agotamiento de células T CD8⁺ de nodos linfáticos y sangre periférica de los 8 macacos tratados con iSIV/LP por infusión del anticuerpo anti-CD8 cMT807. a, Recuentos de células T CD8⁺ en sangre periférica antes y después de recibir tres inyecciones de cMT807; b, % de células T CD8⁺ de nodo linfático antes y después de recibir tres inyecciones de cMT807; c, Carga viral en plasma y después de recibir tres inyecciones de cMT807; d, Carga PBMC ADN VIS antes o después de recibir tres inyecciones de cMT807; e, Carga ADN VIS de nodos linfáticos antes y después de recibir tres inyecciones de cMT807.
- Figura 14: Plasma (a) y PBMC (b) cargas virales después de una tercera prueba intrarrectal realizada intrarrectalmente con SIVB670 en 8 macacos rhesus inmunizados con una preparación oral elaborada de iSIV y LP y 2 monos sin tratamiento previo adicionales.
- Figura 15: Actividad antiviral mediada por célula T CD8⁺ *in vitro* e *in vivo* después de inmunización intragástrica con iSIV y LP (inmunización iSIV/LP No. 2). a, Actividad anti-SIV (veces de supresión viral) de células T CD8⁺ durante 60-420 días posterior a inmunización en 8 macacos rhesus que se someterán a prueba intrarrectalmente; b y c, Cargas virales en plasma y celulares siguiendo prueba SIVmac239 intrarrectal de esos 8 macacos rhesus inmunizados con iSIV/LP oral y de 8 monos de control tratados con LP solo (n = 4) o iSIV (n = 4) solo.
- Figura 16: Cargas VIS ADN y ARN en linfocitos intraepiteliales de mucosa rectal (IPLs) (a-b), células de de lámina propia (LPC) (c-d), y en nodos linfáticos pélvicos (PLN) (e) post prueba intrarrectal de SIVmac239 en 8 macacos (inmunización iSIV/LP No. 2).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una mezcla de un antígeno y una bacteria viva no patógena.

La invención se refiere a una composición farmacéutica particular que comprende dicha mezcla, en la que el antígeno son partículas de VIH inactivadas, y la bacteria es seleccionada de entre el grupo que consiste en bacterias de ácido láctico no patógenas y BCG.

El antígeno

Debido a la gran variabilidad en el genoma de VIH, que resulta de mutación, recombinación, inserción y/o delección, VIH se ha clasificado en grupos, subgrupos, tipos, subtipos y genotipos. Existen dos principales grupos VIH (VIH-1 y VIH-2) y muchos subgrupos debido a que el genoma VIH muta constantemente. La mayor diferencia entre los grupos y subgrupos se asocia con la cubierta vírica. VIH-1 se clasifica como un subgrupo principal (M), el subgrupo M se divide en nueve subtipos (clados o subtipos) designados A a J (Hu et al., JAMA 275:210-216, 1996; Korber et al., Science 280: 1868-1871, 1998), y un 10^o subgrupo extremo (O). Muchos otros subgrupos que resultan de recombinaciones *in vivo* de los previos también existen (Papatathanasopoulos MA, et al. Virus Genes 2003, 26: 151-163). Preferentemente, el virus VIH es VIH-1 o VIH-2, incluyendo todos sus clados conocidos y hasta la fecha desconocidos. Sin embargo es preferentemente VIH-1.

En el contexto de la presente invención, un "antígeno" es de origen VIH, lo que significa que se relaciona a un grupo VIH específico, subgrupo, tipo, subtipo o a una combinación de varios subtipos. Preferentemente, el antígeno VIH es un antígeno VIH-1 o VIH-2.

Dicho antígeno no es infeccioso.

Se sospechó durante mucho tiempo en la comunidad científica que la activación de las células T CD4⁺, el objetivo principal tanto de VIH-1 y VIS, contribuye directamente a la replicación viral (Andrieu and Lu, 1995; Korin and Zack, 1999). Sin embargo, solo recientemente se aclaró que la interacción entre la activación de células T CD4⁺ y etapas

subsecuentes del proceso infeccioso de VIS o VIH. En células T CD4⁺ inactivas, la penetración de virus se siguió dentro de las 2 horas posteriores a entrada por la presentación en la membrana de plasma de epítomos derivados de proteína Gag y Pol de viriones de ingreso mientras que las proteínas Env y Nef requieren síntesis de *novo* (Sacha et al., 2007). Sin embargo, las fases subsecuentes del proceso infeccioso, es decir transcripción inversa seguida por integración de virus, se desarrollaron de manera muy ineficaz en células inactivas (Vatakis et al., 2009a and 2009b). En contraste, cuando células T CD4⁺ se activaron antes o dentro de las 48 horas después de la presentación de epítomos Gag y Pol en la membrana de plasma, la transcripción inversa de VIH/SIV y la integración de ADN fueron extremadamente activas lo que permite una replicación y liberación de virus muy eficiente (Vatakis et al., 2009a and 2009b).

Por lo tanto, los inventores postularon que el bloqueo específico *in vivo* del desarrollo temprano de la activación de célula T CD4⁺ específica de VIH/SIV Gag o Pol después de exposición a VIH/SIV resultará en la prevención de replicación viral activa.

Considerando esto, a fin de inducir la supresión de activación de células T CD4⁺ que presentan antígeno VIH Gag y/o Pol, y a su vez para evitar replicación y diseminación de VIH *in vivo* en humanos expuestos al virus, la composición farmacéutica como se describe en la presente memoria comprende un antígeno VIH que preferentemente presenta uno o más epítomos de las proteínas VIH Gag y/o Pol. Este antígeno ventajosamente ya contiene o se deriva de VIH Gag y/o Pol.

Las expresiones "un antígeno que contiene, o deriva de, Gag y/o Pol de un virus de VIH" significa un antígeno de VIH:

- que comprende por lo menos Gag y/o Pol (como "antígeno que contiene Gag y/o Pol"); o
- que comprende una o más proteínas codificadas por GAG tal que la proteína de cápside (p24) y la proteína matriz (p17), y/o una o más proteínas codificadas por POL tal como la integrasa, transcriptasa inversa y proteasa (como un "antígeno derivado de Gag y/o Pol"); o
- que comprenden uno o más epítomos de estas proteínas (también un "antígeno derivado de Gag y/o Pol").

En particular, cualquier otra proteína o epítomos virales de los mismos seleccionados en el grupo que consiste en ENV, VIF, VPR, VPU para VIH-1, VPX para VIH-2, REV, NEF, TAT y similares, no son componentes esenciales del antígeno comprendido en la composición farmacéutica divulgada en la presente memoria. Cualquiera de estas proteínas, de estar presente, es solo un componente opcional del antígeno que debe utilizarse en la composición farmacéutica divulgada en la presente memoria.

El antígeno es un antígeno en partículas. Esto significa que se selecciona preferentemente de partículas de virus, partículas de virus recombinantes, partículas tipo virus, bacterias recombinantes que expresan Gag y/o Pol u hongos, micropartículas poliméricas que presentan en su superficie una o más proteínas o péptidos o epítomos virales (que contienen o se derivan de VIH Gag y/o Pol). Preferentemente, uno o más epítomos de Gag y/o Pol se producen por o expresan por o contienen en el antígeno. Cuando partículas de virus recombinantes o partículas de virus o bacterias u hongos recombinantes que expresan Gag y/o Pol se utilizan, estos son preferentemente microorganismos inactivados.

El antígeno utilizado en la composición farmacéutica de la invención es una partícula de virus. Es divulgado asimismo en la presente memoria que dicho antígeno puede ser una/o o más proteínas o péptidos virales (que contienen o se derivan de VIH Gag y/o Pol), recombinante o no, ya sea en la forma de conjugados o de concatámeros. El antígeno es entonces independiente de ácido nucleico viral, es decir es dependiente de ADN no viral – o de ARN no viral.

El antígeno puede resultar de la expresión de una secuencia de ácido nucleico viral contenido ventajosamente en un microorganismo recombinante apropiado.

Si el antígeno contenido en la composición farmacéutica de la presente invención es una bacteria recombinante que expresa Gag y/o Pol, entonces la bacteria recombinante preferentemente es diferente de la bacteria viva no patógena que también está comprendida en la composición.

Cuando el antígeno en la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención es una/o o más proteínas o péptidos virales (que contienen o se derivan de VIH Gag y/o Pol), es preferido bajo una forma de partículas. En la práctica, antígenos de partículas apropiados pueden ser producidos por microorganismos vivos tales como levaduras, en la misma forma que para vacunas de hepatitis B de ADN recombinante, en donde el polipéptido HBsAg expresado se autoensambla en partículas esféricas inmunógenas que se asemejan estrechamente a las partículas naturales de 22-nm que se encuentran en el suero de pacientes con infección crónica de HBV (Plotkin et al., 2008).

Alternativamente, cuando el antígeno en la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención es una/o o más proteínas o péptidos virales (que contienen o se derivan de VIH Gag y/o Pol), está en la forma de conjugados. En esta forma de realización, como es bien conocido en la técnica, proteínas o péptidos de interés se conjugan covalentemente a un portador apropiado. Portadores convencionales que están comercialmente disponibles son

5 proteínas *inter alia* tales como proteína de hemocianina de lapa californiana (KLH), la proteína de albúmina de suero bovino (BSA), la proteína OVA (ovalbúmina), y semejantes (que preferentemente pueden ser administrables de manera segura de manera oral a los humanos). Los procedimientos para producir conjugados apropiados son familiares para un experto en la materia.

10 Todavía de manera alternativa, cuando el antígeno en la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención es una/o o más proteínas o péptidos virales (que contienen o se derivan de VIH Gag y/o Pol), está en la forma de concatámeros. Como es bien conocido en la técnica, los concatámeros se elaboran de múltiples copias de proteínas o péptidos de interés que se ligan físicamente en conjunto en una macromolécula. En los concatámeros, una copia de la proteína o péptido de interés puede ligarse a otra ya sea en forma directa o pueden separarse por un

15 brazo o ramificación sintética. Un concatámero de esta manera comprende por lo menos dos copias, preferentemente hasta 10 copias o más de la proteína o péptido de interés. Los procedimientos para producir concatámeros apropiados pertenecen al conocimiento general de un experto en la materia.

20 Como es divulgado en la presente memoria, una "partícula de tipo virus" (VLP), significa una partícula que se asemeja estrechamente a los viriones maduros, pero no contiene material genómico viral del virus. De manera más precisa, las VLP que también se denominan pseudoviriones, representan estructuras subunitarias compuestas por múltiples copias de una cápside viral y/u otras proteínas virales. Estas proteínas virales son capaces de autoensamblar en VLP de simetría esférica definida *in vivo*. Estas VLP no comprenden ningunas moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de virus, y en forma más precisa no contienen ningunas moléculas de ácido

25 nucleico. Por lo tanto, las VLP no son replicantes y no son infecciosas en naturaleza, lo que las hace seguras para administración en la forma de una composición farmacéutica. Los procedimientos para producir VLP son bien conocidos un experto en la materia (ver, por ejemplo Liew et al., 2010; Plummer and Manchester, 2010). Los ejemplos no limitativos de procedimientos apropiados para producir VLP se describen en la patente US nº 5.919.458, en los documentos EP 0 386 882, WO 91/07425, la patente US nº 5.861.282 y el documento WO 91/05864 que describen VIH VLP (pseudoviriones) que no comprenden genoma de VIH ni ninguna molécula de ácido nucleico.

30 Como es divulgado en la presente memoria, "una partícula de virus recombinante" significa una partícula de virus que contiene, o expone en su superficie, proteínas de diferentes virus. Además de una partícula de virus recombinante también puede significar una bacteria u otra célula hospedadora que contiene, que produce o que expone en su superficie, una o más proteínas o péptidos virales o epítomos que contienen o se derivan de VIH Gag y/o Pol.

35 De hecho, la mayoría de las partículas de virus recombinantes son partículas de virus en donde parte de proteínas estructurales originales (es decir, primordialmente proteínas de cubierta y proteínas núcleo) se reemplaza por proteínas equivalentes de otro virus. Como un ejemplo, las proteínas de cubierta pueden intercambiarse. En este caso, partículas de virus recombinantes contienen un genoma "quimérico" que consiste en genoma de un virus que tiene la secuencia que codifica proteínas de cubierta intercambiadas con codificación de secuencia para proteínas de cubierta de otro virus. La mayoría de las partículas de virus recombinantes son replicantes e infecciosas.

40 Como es divulgado en la presente memoria, un virus recombinante que comprende proteínas de otro virus significa que las partículas de virus recombinante contienen una o más proteínas o péptidos o epítomos virales que contienen o se derivan de VIH Gag y/o Pol, ya sea en forma interna o presente en su superficie. Unos ejemplos no limitativos de procedimientos para producir partículas de virus recombinantes se describen para:

45 * Alfavirus: en WO 02/053757 describe un alfavirus recombinante que expresa VIH (proteína ENV)

* Retrovirus: en EP 1 499 736 describen vectores lentivirales que expresan glucoproteínas quiméricas.

50 * Adenovirus (tal como tipo 5, 7 o 35): en los documentos US 2007/077257, US 2007/054395, JP 2007037402, WO 2006/120034, US 2004/253210, US 2004/170647, US 2005/070017, US 2003/228329, US 2004/101957, US 2003/219458, US 2004/009936, US 2004/028652, WO 03/050238, WO 03/038057, WO 03/020893, WO 02/31168, WO 02/22080, WO 01/02607, y la patente US nº 6.716.823 que describen adenovirus recombinantes que expresan proteínas VIH.

55 * Virus de viruela (viruela de canarios, vaccinia, vaccinia Ankara, y virus de viruela aviar): en la patente US 5.766.598, los documentos EP 0 592 546, US 2007/048861, US 2006/188961, US 2006/134133, EP 1 789 438, WO 2005/017208, WO 2004/035006, US 2004/146528, JP 2003321391, EP 1 378 516, WO 95/07099, JP 7170982, DE 4141741, EP 0 449 116, JP 1148183, JP 1085072, EP 0 592 546, EP 0 243 029, US 2005/287162, JP 2004105187, JP 2004089185, WO 03/095656, EP 0 592 546, WO 96/40880, las patentes US 6.136.318, US 5.670.367 que describen proteínas virales que expresan virus de viruela recombinante incluyendo proteínas VIH.

* Bacterias que contienen, que producen o que exponen en su superficie, por lo menos una proteína de un virus: en la patente US nº 7.189.402 y el documento WO 96/11708 que divulgan glicoproteínas VIH que expresan *Salmonella* o *E. coli* (es decir, proteínas de envoltura).

5 Es divulgado además en la presente memoria un virus recombinante corresponde a un virus de viruela, este virus de viruela preferentemente se selecciona de entre el grupo que comprende viruela de canarios (por ejemplo, vectores virales ALVAC tal como el descrito en la patente US nº 5.766.598 y el documento EP 0 592 546), vaccinia (por ejemplo, el virus vaccinia descrito en la solicitud de patente internacional WO 95/07099), vaccinia Ankara (por ejemplo, vectores virales NYVAC tales como el descrito en la solicitud de patente EP 1 789 438), y virus de viruela aviar (por ejemplo, vectores virales TROVAC tales como el descrito en la solicitud de patente internacional WO 03/095656).

15 Más preferentemente, el virus de viruela es un virus de viruela de canarios. Como un ejemplo de partículas de virus recombinantes correspondiente al virus de viruela de canarios y que expresa péptido/proteína VIH, se pueden citar los vectores virales ALVAC descritos en la patente US nº 5.766.598, (incorporada en la presente memoria como referencia de la columna 6, línea 18 a la columna 82, línea 36), estos vectores ALVAC expresan como un ejemplo VIH-1 gp120, VIH-1 gp160, forma secretada no disociable de VIH-1 env, VIH-1 gp120 anclado con una secuencia de transmembrana, VIH-1 gag/pol, VIH-1 gag/pol y env (gp120), VIH-1 gag/pol y env (gp160), y VIH-1 gag/pol y env (gp120 con ancla de transmembrana). Preferentemente, el vector ALVAC expresa VIH-1 gag/pol y env (gp120), y más preferentemente el vector ALVAC es ALVAC VCP1521.

25 Una "partícula de virus" preferentemente una partícula de VIS o VIH tal como partícula de virus VIS o VIH que puede contener un genoma viral mutado (por ejemplo, por mutación, sustitución o inserción de ácido nucleico) resulta en la producción de partícula virales no infecciosas.

Partículas virales que contienen un genoma viral mutado se describen en las patentes US nº 7.229.625, US nº 6.121.021, US nº 6.923.970, US nº 6.544.527, US nº 6.451.322, y US nº 6.080.408.

30 Ventajosamente, y para presentar partículas de virus o partículas de virus recombinantes seguras para administración a un humano, las partículas de virus o partículas de virus recombinantes se inactivan antes de ser administradas. Esta inactivación puede ser necesaria para partículas de virus recombinantes incluso para las no replicantes.

35 Como se utiliza en la presente memoria "una partícula de virus inactivada", siendo dicha partícula de virus recombinante o no, significa una partícula viral, que no es más infecciosa y preferentemente no es más replicante.

40 Los procedimientos para inactivación de partículas virales o partículas de virus recombinantes son bien conocidos por un experto en la materia. Los ejemplos no limitativos de inactivación viral incluyen inactivación química tal como tratamiento con formalina, taurina cloramina, formaldehído, paraformaldehído, propiolacteno, beta-propiolactona (REMUNE) o alditriol-2 (AT-2, ver patente US nº 6.001.155), inactivación térmica, inactivación física tal como U.V o irradiación gamma o exposición a microondas, y sus combinaciones. Para una referencia para inactivación VIH, ver RAVIV *et al.* (*J. Virol.*, vol. 79 (19), p: 12.394-12.400, 2005).

45 De acuerdo con una forma de realización, la inactivación es una inactivación química seleccionada de entre el grupo que comprende inactivación con formalina, taurina cloramina, formaldehído, paraformaldehído, propiolacteno, beta-propiolactona (REMUNE) o alditriol-2.

50 Alternativa o adicionalmente, la inactivación es una inactivación térmica. Esta inactivación es bien conocida por el experto en la materia y como un ejemplo de este procedimiento, se puede citar el descrito en los ejemplos. Sin duda, los inventores han establecido de manera sorprendente los macacos que virus inactivados químicamente (i.e., AT-2) y/o térmicamente, inducen una inmunotolerancia protectora cuando se asocian con una bacteria viva no patógena.

55 Ventajosamente, para propósitos de administración a humanos, partículas de virus al menos se inactivan dos veces, típicamente utilizando al menos dos procedimientos de inactivación mencionados anteriormente.

60 Preferentemente, como ya se mencionó anteriormente, las partículas de virus (recombinantes o no, VLP o no) que se utilizan como antígenos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, no son dependientes de ácido nucleico (es decir ADN o ARN), lo que significa que las partículas de virus no contienen ningún ADN o ARN viral, o si contienen ADN o ARN, no tienen papel en la inmunogenicidad.

65 Alternativamente, micropartículas poliméricas (bajo la forma de microcápsulas, microesferas y semejantes) de diversas estructuras y que presentan en su superficie una o más proteínas o péptidos o epítomos virales que contienen o derivados de VIH Gag y/o Pol, pueden utilizarse como antígenos en las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención. Estas micropartículas pueden elaborarse a partir de polímeros biológicos o químicos apropiados, tales como dextrano metacrilado, poli(etilenglicol) metacrilato y/o gelatina, en las cuales el

virus VIH o proteínas o péptidos o epítomos virales que contienen o se derivan de VIH Gag y/o Pol pueden adherirse. Ejemplos de micropartículas poliméricas pueden encontrarse en la literatura (por ejemplo, en Wei Li Lee *et al.* (2010), Sandri *et al.* (2007), Goldberg *et al.* (2003), Delie F. (1998), Ponchel *et al.* (1998), Mathiowitz *et al.* (1997), Fasano *et al.* (1997), Chickering *et al.* (1997)).

En una forma de realización preferida, el antígeno en una composición farmacéutica VIH-1 de acuerdo con la presente invención es una o más partículas virales capaces de expresar una o más proteínas o péptidos o epítomos virales que contienen o se derivan de VIH-1 Gag y/o Pol. Alternativamente, el antígeno en una composición farmacéutica de VIH-1 de acuerdo con la presente invención es una o más micropartículas poliméricas que presentan en su superficie una o más proteínas o péptidos o epítomos virales que contienen o se derivan de VIH-1 Gag y/o Pol.

Preferentemente, el antígeno que debe utilizarse en la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención es al menos de aproximadamente 110 kDa en tamaño. Preferentemente tiene al menos aproximadamente 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 kDa o incluso más en tamaño.

Una cantidad eficaz del antígeno viral que va a utilizarse en el contexto de la invención puede determinarse fácilmente por el experto en la materia, utilizando el conocimiento general común y a partir de los Ejemplos descritos a continuación, en conexión con virus VIS o VIH.

Como un ejemplo, cuando el antígeno es un antígeno de partículas y más específicamente una partícula de virus, la cantidad de partículas de virus es de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} por ml de la mezcla.

La bacteria no patógena

Como se muestra por los inventores con VIS en macacos, cuando se administran por la ruta de mucosa o intradérmica o intraepitelial junto con un antígeno apropiado como se define anteriormente, la bacteria viva no patógena comprendida en la composición farmacéutica es capaz de inducir y preferentemente mantener un estado de inmunotolerancia al antígeno anteriormente mencionado. En humanos, esto hace posible evitar y/o tratar una enfermedad por VIH.

La bacteria de esta manera puede considerarse como un adyuvante particular que en la presente memoria puede designarse como un adyuvante "tolerogénico" o un "portador tolerogénico" o un "vehículo tolerogénico" o un "portador de tolerancia" o un "portador de inducción de inmunotolerancia" ("carrier of tolerization") o un "vehículo para tolerancia", estos términos son sinónimos.

Preferentemente, todos esos términos equivalentes se refieren a una bacteria viva no patógena que se utiliza en combinación con un antígeno de VIH como se define anteriormente para lograr una protección inmunitaria específica (preferentemente, inmunotolerancia) al antígeno, de esta manera evitando y/o tratando una enfermedad por VIH en humanos.

Más preferentemente, un "vehículo tolerogénico" es una bacteria viva no patógena que se administra en mezcla con un antígeno VIH como se define anteriormente, para lograr uno o más, preferentemente 2 o más, todavía más preferentemente 3 o más, de los siguientes efectos inmunoprotectores:

- 1) Un "vehículo tolerogénico" no induce una producción significativa de anticuerpos específicos de antígeno VIH sistémicos:

En particular, no se observa producción significativa de anticuerpos anti-HIV IgM y/o IgG sistémicos. Por ejemplo, no hay respuesta humoral sistémica significativa es decir que ya no hay respuesta de anticuerpo sistémica detectable específica que pueda detectarse por procedimientos de laboratorio clínicos clásicos tales como ELISA, o si los anticuerpos sistémicos se detectan, no son protectores contra infección de virus VIH.

- 2) Un "vehículo tolerogénico" no induce proliferación específica de antígeno VIH significativa de células T CD4+:

En particular, no hay proliferación significativa de células CD4 específicas de antígeno VIH que se observa ante estímulo de antígeno VIH *in vitro* como se mide por ensayos estándar tal como el descrito en los ejemplos adjuntos.

- 3) Un "vehículo tolerogénico" no induce producción significativa de gamma-interferona por células T CD8+ ante estímulo de antígeno VIH *in vitro*:

En particular, el nivel de secreción de interferón gamma por células T CD8+ que se observa ante estímulo de antígeno VIH *in vitro* está por debajo del nivel umbral para un ensayo ELISpot.

- 4) Un "vehículo tolerogénico" induce una respuesta de células T CD8+ significativa que suprime la activación de

células T CD4+ que presentan antígeno VIH:

5 En particular, esta respuesta puede ser determinada por una prueba *in vitro* que mide el nivel de inhibición de replicación viral por células T CD8+ (indicando una respuesta de células T CD8+ "significativa") como se muestra en los ejemplos adjuntos. Estas células T CD8+ también se denominan células T CD8+ "reguladoras". Todavía en particular, esta respuesta no es citotóxica dado que, por ejemplo no induce producción significativa de gamma-interferón. Todavía en particular, esta respuesta está restringida a MHC-Ib/E. Todavía en particular, TCR $\alpha\beta$ parece estar involucrado en la replicación viral que suprime la respuesta de célula T CD8+. Todavía en particular, esta respuesta suprime la activación de células T CD4+ que presentan antígeno VIH en comparación con la misma población celular agotada de células T CD8+. Preferentemente, la respuesta suprime la activación temprana de células T CD4+ que presentan antígeno VIH, en donde la activación "temprana" se mide por el marcador Ki67+ (Scholzen and Gerdes. J. Cell Physiol. 182, 311-322 (marzo 2000)).

15 Por la expresión "no inducen" como se utiliza anteriormente en 1), 2) y 3), se entiende un resultado por debajo del nivel umbral para un ensayo de detección cuantitativa apropiado, en donde el "nivel umbral" es un valor determinado en el ensayo sobre la base del/de los control(es) negativos: bajo este valor, el resultado es un resultado negativo. Este valor puede variar de un ensayo a otro y de un procedimiento de detección a otro.

20 Ventajosamente, el vehículo tolerogénico divulgado en la presente memoria es seleccionado de entre vivas:

- bacterias no patógenas, en especial probióticas y bacterias comensales;
- bacterias patógenas atenuadas; y
- 25 - bacterias patógenas inactivadas (opcionalmente, también atenuadas previamente).

El vehículo tolerogénico puede ser recombinante o no.

30 "Bacterias no patógenas" para utilizarse como vehículos tolerogénicos en el contexto de la presente invención, en general no inducen ninguna patología en humanos. Esta es la razón por la cual se reconocen generalmente como seguras (GRAS). Por supuesto, estas bacterias deben ser administrables a humanos.

35 Las bacterias no patógenas preferidas que deben utilizarse como vehículos tolerogénicos son bacterias comensales. Estas bacterias son bien conocidas por un experto en la materia. Los ejemplos no limitativos incluyen *Bacillus sp.* (e.g., *B. coagulans*), *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, y similares.

40 Una "bacteria comensal" para su utilización como vehículo tolerogénico en el contexto de la presente invención ventajosamente es una bacteria o bifidobacteria de ácido láctico que se selecciona más particularmente en el listado anterior, incluyendo también sus combinaciones. Una bacteria comensal preferida es *Lactobacillus sp.*, y más preferentemente *Lactobacillus plantarum*. Los ejemplos de los que informa a continuación muestran por primera vez que *Lactobacillus plantarum* es un vehículo tolerogénico, que lleva a inmunotolerancia viral cuando se administra junto con un antígeno como se definió anteriormente.

50 Ventajosamente, una combinación de bacterias no patógenas, tales como dos o más bacterias comensales pueden emplearse como el vehículo tolerogénico.

El término "bacteria patógena" se refiere a bacterias que inducen patologías en humanos. Estas bacterias son bien conocidas por el experto en la materia e incluyen entre *inter alia* especies *Listeria* (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*), especies *Corynebacterium*, especies *Mycobacterium*, especies *Rhococcus*, especies *Eubacteria*, especies *Bortadella* y especies *Nocardia*. Preferentemente, una bacteria patogénica se selecciona entre las especies *Mycobacterium*, y más preferentemente es *Mycobacterium bovis*.

60 Las "bacterias patógenas atenuadas" son bacterias patógenas que son menos virulentas en comparación con su equivalente natural debido a una o varias mutaciones de uno o más tratamientos de atenuación (por ejemplo, tratamiento químico y/o pasos sucesivos en medios específicos). Estas bacterias patógenas atenuadas son bien conocidas por un experto en la materia. Los ejemplos no limitativos de bacterias patógenas atenuadas incluyen *Salmonella typhimurium* y *Mycobacteria* atenuadas preferentemente por *Mycobacteria* atenuada. Como un ejemplo de *Mycobacteria* atenuada, se puede citar a "Bacille de Calmette Guerin", también conocido como "BCG", y en forma más especial entre otros, las seis cepas de BCG ampliamente empleadas – la cepa de evolución temprana BCG japonesa, las dos cepas tardías en evolución en grupo DU2 III (BCG Danish y Glaxo), y las tres cepas que evolucionan de manera tardía en el grupo DU2 IV (BCG Connaught, Pasteur, y Tice). Como otro ejemplo de

Mycobacteria atenuadas, también se puede citar BCG recombinante tal como la cepa rBCG30 descrita en HOFT *et al.* (2008), la BCG recombinante descrita en WANG *et al.* (2008), y también la BCG recombinante descrita en las solicitudes de patente internacional WO 2005/111205 y WO 02/102409, y descritas en las patentes US nº 7.122.195 y US nº 6.261.568.

5 Ventajosamente, en lugar de o además de ser atenuadas, las bacterias patógenas pueden inactivarse para ser utilizadas como vehículos tolerogénicos en el contexto de la presente invención, pero las bacterias patógenas atenuadas también pueden emplearse después de haber sido inactivadas.

10 "Bacterias patógenas inactivadas" son bien conocidas por un experto en la materia. procedimientos para preparación de estas bacterias patogénicas inactivadas forman parte del conocimiento general común en la especialidad. Como un ejemplo de estos procedimientos, se puede citar lisis mediada por fago, inactivación química tal como tratamiento con formalina (ver patente US nº 7.393.541), inactivación térmica, inactivación física tal como liofilización (por ejemplo, Extended Freeze Drying) o radiación U.V o gamma (ver el documento WO 2008/128065) o exposición a microondas y sus combinaciones.

15 Un vehículo tolerogénico utilizado como una bacteria no patógena en la composición farmacéutica de la invención es un derivado atenuado de bacterias patogénicas como BCG. Los Ejemplos de los que se informa a continuación muestran por primera vez que BCG es un vehículo tolerogénico, que lleva a inmunotolerancia viral cuando se administra junto con un antígeno como se definió anteriormente.

Cuando es recombinante, el vehículo tolerogénico de acuerdo con la presente invención no expresa ninguna proteína, péptido o epítipo de VIH.

25 Preferentemente, por lo menos una cantidad significativa de la bacteria viva empleada como un vehículo tolerogénico está en la fase media-log. Más preferentemente, por lo menos aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o incluso aproximadamente 100% del número total de células bacterianas está en la fase media-log.

30 Una cantidad eficaz para un vehículo tolerogénico puede fácilmente determinarse por un experto en la materia y ejemplos de esta cantidad eficaz se describen a continuación.

Como un ejemplo, la cantidad de la bacteria en la composición farmacéutica de la presente invención es de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{14} CFU por ml de la mezcla.

35 **La composición farmacéutica**

Se hace asimismo referencia a dicha composición en la presente memoria como una "composición tolerogénica" o una "composición toleroinmunógena", estos términos son equivalentes.

40 El vehículo tolerogénico y el antígeno que contiene o se deriva de Gag y/o Pol de un virus VIH son dos componentes separados y distintos que están contenidos como una mezcla en la composición farmacéutica de la presente invención. Esto significa que el vehículo tolerogénico y el antígeno están presentes como componentes distintos en la composición.

45 Ventajosamente, la composición farmacéutica de la invención no comprende ningún oligonucleótido (e.g., CpG o dsRNA) como adyuvante.

50 Ya que el vehículo tolerogénico es una bacteria, una bacteria y/o especie del mismo género puede emplearse por separado bajo una forma recombinante como una fuente de antígeno. Por ejemplo, la bacteria recombinante contendrá un ácido nucleico que codifica el antígeno colocado bajo el control de secuencias regulatorias apropiadas (incluyendo promotores - inducibles o constitutivas-), ya sea en un vector de ácido nucleico contenido en la célula o como una secuencia de ácido nucleico integrada en el cromosoma bacteriano. De esta manera, la bacteria recombinante será capaz de expresar o producir el antígeno. De esta manera, de acuerdo con una forma de realización particular, la composición farmacéutica de la presente invención incorpora un vehículo tolerogénico que es una bacteria y un antígeno que es uno o más proteínas o péptidos o epítipos virales que contienen o derivados de VIH Gag y/o Pol, y que se ha producido en forma separada por una bacteria recombinante que pertenece al mismo género y/o especie que el vehículo tolerogénico.

60 En una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, cuando el antígeno es un antígeno en partículas y más específicamente una partículas de virus, la proporción en la mezcla de las partículas de virus (expresada en partículas por ml de la mezcla) a la bacteria (expresada en CFU por ml de la mezcla) es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:1000, preferentemente de aproximadamente 1:25 a aproximadamente 1:750, todavía preferentemente de aproximadamente 1:50 a aproximadamente 1:500, todavía más preferentemente de aproximadamente 1:75 a aproximadamente 1:250, y todavía adicionalmente preferentemente aproximadamente 1:100.

Administrar la composición farmacéutica de la invención

5 Puede ser posible administrar el vehículo tolerogénico y un antígeno ya sea en forma simultánea o separada o secuencial.

De esta manera un objetivo de la presente invención es proporcionar un kit farmacéutico para prevenir y/o tratar una enfermedad VIH en un humano que lo requiere, que comprende:

- 10 - en un primer recipiente, un antígeno como se definió anteriormente; y
- en un segundo recipiente, una bacteria viva no patógena como se definió anteriormente,
- 15 en el que dicho antígeno y dicha bacteria están en portadores farmacéuticos aceptables para administración por la vía de las mucosas o intradérmica o intraepitelial.

Más particularmente, un objetivo de la invención es proporcionar un kit como se ha descrito anteriormente, en el que el antígeno y la bacteria viva no patógena son como son definidas en las reivindicaciones.

20 También un objetivo de la presente invención es proporcionar productos que contienen:

- una bacteria viva no patógena como un vehículo tolerogénico como se definió anteriormente; y
- 25 - un antígeno de partículas o un antígeno que tiene uno o más epítomos de proteínas VIH Gag y/o Pol como se define anteriormente,

como una composición farmacéutica combinada para uso simultáneo, separado o secuencial, para prevenir y/o tratar una enfermedad de VIH en un humano que lo requiere.

30 La prevención y/o tratamiento es (son) logrados mediante administración por la vía de las mucosas o intradérmica o intraepitelial de la composición farmacéutica combinada al ser humano. Para hacerlo, puede ser posible administrar el vehículo tolerogénico y el antígeno ya sea en forma simultánea, separada o secuencial.

35 Más particularmente, un objetivo de la invención es proporcionar unos productos como se han descrito anteriormente, en los que el antígeno y la bacteria viva no patógena son como se definen en las reivindicaciones.

40 Como un ejemplo de la presente divulgación, la bacteria viva no patógena puede administrarse en forma oral (por ejemplo, como un fármaco oral o suplemento de alimento), mientras que el antígeno se administra por la vía de las mucosas, intradérmica o intraepitelialmente.

Por supuesto, vehículos farmacéuticos apropiados pueden emplearse a fin de asegurar un suministro conveniente de cada uno al sitio esperado (por ejemplo, una superficie mucosa). El tiempo y la dosis para administrar cada uno del vehículo tolerogénico y el antígeno se adaptarán fácilmente por el experto en la materia.

45 Preferentemente, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención es una composición farmacéutica mucosa o intradérmica o intraepitelial. La composición farmacéutica según la presente invención es en la presente memoria una composición farmacéutica oral.

50 Una "composición farmacéutica mucosa, intradérmica o intraepitelial" es una composición farmacéutica para administración por la vía de las mucosas, intradérmica o intraepitelial, que significa que se formula para dicha administración.

55 En particular, la composición farmacéutica además puede comprender uno o más vehículos (o soportes) farmacéuticos apropiados para suministro por la vía de las mucosas o intradérmico o intraepitelial del antígeno y de la bacteria.

60 Preferentemente, un "suministro por la vía de las mucosas" se selecciona en la presente memoria de entre suministros nasal, oral, sublingual, traqueal, faríngeo, bronquial, esofágico, gástrico, duodenal, intestinal, rectal, prepucial y vaginal. Un "suministro por la vía de las mucosas" es un suministro a una superficie mucosa, tal como nasal, oral, sublingual, traqueal, bronquial, faríngeo, esofágico, gástrico y de mucosas del duodeno, intestinos grueso y delgado, incluyendo recto, así como mucosas de prepucio y vagina. En el presente contexto, la superficie mucosa también incluye la superficie externa del ojo, es decir la mucosa de y que circunda al ojo. Todavía preferentemente, la superficie mucosa se refiere a mucosa vaginal y digestiva, y más preferentemente a mucosa digestiva. Todavía preferentemente, el suministro por la vía de las mucosas es un suministro oral.

65 De esta manera, la composición farmacéutica también puede comprender uno o más vehículos farmacéuticos

dependiendo de la ruta de administración. El experto en materia farmacéutica está familiarizado con, o puede evaluar fácilmente vehículos para suministro de fármaco a una superficie mucosa o para suministro intradérmico o intraepitelial. Referencias útiles en este aspecto son Chien (Novel Drug delivery system, capítulos 3 a 6 y 9, Marcel Dekker, 1992), Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th Ed. (diversos editores, 1989-1998, Marcel Dekker); y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (ANSEL et al., 1994, WILLIAMS & WILKINS).

Los procedimientos y las rutas ejemplificativos para suministro de fármacos útiles en la invención se describen brevemente a continuación.

La administración a la mucosa bronquial, bronquiolar, traqueal, nasal, oral, prepucial o faríngea puede obtenerse al formular la composición farmacéutica como un espray inhalable y semejantes (por ejemplo, espray nasal, espray en aerosol o espray de bomba y semejantes), solución, gel, etc. Dispositivos nebulizadores adecuados para suministro de composiciones farmacéuticas a la mucosa nasal, tráquea y bronquiolos son bien conocidos en la técnica y por lo tanto no se describirán en la presente memoria en detalle. La composición farmacéutica puede entonces comprender un vehículo seleccionado del grupo que comprende soluciones, emulsiones, microemulsiones, emulsiones de aceite-en-agua, lípidos anhidros y emulsiones de aceite-en-agua, otros tipos de emulsiones.

La administración a la mucosa vaginal puede obtenerse al formular la composición farmacéutica como solución, enema, espuma, supositorio, comprimido vaginal o gel tópico. Vehículos preferidos para suministro vaginal incluyen vehículos hidrófilos e hidrófobos tales como aquellos comúnmente empleados para formular preparaciones en emulsión o gel (por ejemplo, gel de emulsión aceite/agua).

La administración a la mucosa del tracto digestivo puede obtenerse al formular la composición farmacéutica como cápsula, microcápsula. Vehículos preferidos para suministro digestivo corresponde a cápsulas y microcápsulas (por ejemplo, cápsulas y microcápsulas de pectina y/o alginato) en general suministradas *per os* tal como se emplea comúnmente al formular preparaciones para suministro digestivo (por ejemplo, las microcápsulas descritas en la solicitud de patente internacional WO 2007/140613). Alternativamente, el suministro digestivo puede obtenerse al consumir o administrar líquidos y/o alimentos apropiados, tales como bebidas, yogur y similares.

La administración intradérmica o intraepitelial es bien conocida por el experto en la materia. La administración intradérmica (por ejemplo, inyección) por ejemplo puede realizarse con dispositivos de aguja tales como aquellos descritos en la patente US nº 6.933.319 y en la solicitud de patente internacional WO 2004/101025, o con dispositivos libres de agujas apropiados.

La composición farmacéutica además puede comprender por lo menos un agente de absorción. "Agentes de absorción" son bien conocidos para un experto en la materia. Como ejemplos, se pueden citar tensioactivos tales como derivados de polioxietileno o ésteres parciales de ácido graso de anhídridos de sorbitol (por ejemplo, Tween® 80, Polioxil 40 Estearato, Polioxietilén 50 Estearato, polioxietilén-9-lauril éter y Octoxinol), sales biliares tales como glicocolato de sodio, micelios mixtos, enaminas, donadores de óxido nítrico (por ejemplo, S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina, NOR1, NOR4 que preferentemente se coadministran con un depurador de NO tal como carboxi-PITO o doclofenac sódico), salicilato de sodio, glicerol ésteres de ácido acetoacético (por ejemplo, gliceril-1, 3-diacetoacetato o 1,2-isopropilidenglicerín-3-acetoacetato), derivados de ciclodextrina o beta-ciclodextrina (por ejemplo, 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina y heptakis(2,6-di-O-metil-beta-ciclodextrina)), ácido graso de cadena media tal como mono- y diglicéridos (por ejemplo, caprato de sodio-extractos de aceite de coco, Capmul), o triglicéridos (por ejemplo, amilodextrina, Estaram 299, Miglyol 810), polímeros tales como carboximetilcelulosa, carbopol, policarbófilo, tragacanto y alginato de sodio y otros agentes de absorción adaptados para suministro por la vía de las mucosas, intradérmico o intraepitelial. Para una referencia con relación a principios generales respecto a agentes de absorción, que se han empleado con éxito en suministro por la vía de las mucosas o intradérmico o intraepitelial de fármacos, ver Chien, Novel Drug Delivery Systems, Ch. 4 (Marcel Dekker, 1992).

La composición farmacéutica además puede comprender uno o más aditivos (por ejemplo, diluyentes, excipientes, estabilizantes, conservantes y similares). Ver en general Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th Ed. (varios editores, 1989-1998, Marcel Dekker); y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (ANSEL et al., 1994, WILLIAMS & WILKINS).

Como se describe a continuación, las dosis apropiadas de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención que debe administrarse a un ser humano, pueden determinarse dependiendo de una o más características del sujeto tales como sexo, edad, peso, salud, etc.

Como un ejemplo, cuando el antígeno es de partículas y más específicamente, cuando es una partícula de virus, una dosis de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{14} partículas de virus por día puede administrarse al humano. Como otro ejemplo, una dosis de una bacteria viva no patógena de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{16} CFU por día puede administrarse al humano.

Aplicaciones de la composición farmacéutica de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica como se describió anteriormente, para utilizar como un medicamento, preferentemente como una vacuna.

5 La presente invención se refiere además a la composición farmacéutica de la invención para su utilización en un procedimiento para prevenir y/o tratar una enfermedad por VIH en un ser humano necesitado del mismo.

10 Dicho procedimiento para prevenir y/o tratar una enfermedad por VIH en un ser humano necesitado del mismo, es descrito en la presente memoria como comprendiendo por lo menos la etapa de administrar por la vía de las mucosas, intradérmicamente o intraepitelialmente una cantidad eficaz de una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente a dicho ser humano.

15 De acuerdo con la presente invención, para propósitos preventivos, un "humano necesitado del mismo" puede ser cualquier humano, preferentemente que tiene por lo menos aproximadamente 2 años de edad. Para propósitos terapéuticos, un "humano necesitado del mismo" es un humano que se va a tratar debido a que sufre de una enfermedad VIH.

20 Una "enfermedad VIH" se refiere a cualquier trastorno inmunitario relacionado a VIH, incluyendo SIDA, así como etapas tempranas de progreso de la enfermedad, incluyendo seroconversión (establecimiento de infección crónica).

La presente invención se refiere además a la composición farmacéutica de la invención para la utilización en un procedimiento para proteger a un ser humano contra el VIH.

25 Dicho procedimiento para proteger a un humano contra VIH, es descrito en la presente memoria como que comprende por lo menos la etapa de administración por la vía de las mucosas o intradérmica o intraepitelial de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica como se definió anteriormente a dicho ser humano. En particular, este procedimiento permite la protección de un humano de una infección VIH, si está expuesto en las mucosas a VIH y/o de replicación VIH y se expone en forma intravenosa a VIH.

30 La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica de la invención para su utilización en un procedimiento para proteger a un ser humano de una seroconversión de VIH.

35 Dicho procedimiento para proteger a un humano de seroconversión VIH, es descrito en la presente memoria como que comprende por lo menos la etapa de administrar por la vía de las mucosas o intradérmica o intraepitelial una cantidad eficaz de una composición farmacéutica como se definió anteriormente al humano. De esta manera, el humano no será seropositivo y no exhibirá un nivel significativo de anticuerpos de VIH.

40 El término "vacunación" se refiere a la o las acciones (en especial, administrar la composición farmacéutica de la presente invención) que se toman para evitar y/o tratar una enfermedad de VIH (HIV) en un humano. Preferentemente, la composición farmacéutica de la invención es útil para inducir y preferentemente mantener inmunotolerancia a un antígeno que contiene o se deriva de Gag y/o Pol de un virus VIH en un humano es decir, en otras palabras, para vacunar (o "inducir inmunotolerancia") al humano. De esta manera, vacunar a un humano utilizando el producto farmacéutico de la presente invención se considera como una "vacunación tolerogénica" [o una "inducción de inmunotolerancia" ("tolerization", "tolerisation")].

50 Si, después de la administración por la vía de las mucosas o intradérmica o intraepitelial de la composición farmacéutica de la invención (es decir, después de vacunación tolerogénica), se ha inducido exitosamente inmunotolerancia en un humano, el humano se considera que está "vacunado" (o "tolerizado" o "tolerante"). La respuesta, es decir, la replicación viral como se evalúa por carga de RNA viral en plasma de un humano "vacunado" a un ataque infeccioso viral *in vivo*, se reduce en al menos aproximadamente 50%, más preferentemente al menos aproximadamente 70%, aún más preferentemente en al menos aproximadamente 75% o 80% o 85% o 90% o 95% o 98% o 99%, o incluso más (99.5%, 99.8%, 99.9%, 100%), respecto a la carga de RNA viral en plasma de un humano de control al cual se administra ya sea el antígeno solo o el antígeno asociado con el adyuvante estándar (como se definió anteriormente) o sin composición farmacéutica o placebo.

60 De acuerdo con la presente invención, una vacunación tolerogénica puede comprender una o varias administraciones consecutivas de la composición farmacéutica. Preferentemente, la vacunación tolerogénica puede comprender al menos dos o más administraciones consecutivas (es decir, vacunaciones), y más preferentemente más de dos administraciones consecutivas de la composición.

Ventajosamente, el intervalo entre vacunaciones tolerogénicas consecutivas comprende entre 1 minuto y 3 meses, preferentemente entre 15 minutos y 2 meses.

65 Todavía ventajosamente, las vacunaciones tolerogénicas de la invención también pueden incluir vacunaciones tolerogénicas de repetición uno o varios años después de la primera vacunación por la vía de las mucosas o

intradérmica o intraepitelial tolerogénica (por ejemplo 1 a 10 años).

Las nuevas vacunaciones tolerogénicas después de la primera vacunación tolerogénica por la vía de las mucosas o intradérmica o intraepitelial pueden seleccionarse de vacunaciones tolerogénicas por la vía de las mucosas, intradérmicas o intraepiteliales. De manera notable, si las nuevas vacunaciones tolerogénicas son inyecciones intraepiteliales o intradérmicas, entonces una respuesta específica sistémica humoral y/o citotóxica (que produce gamma interferón) puede ser detectable pero no presenta una función en la prevención o el tratamiento de la enfermedad.

De acuerdo con la presente invención, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica se administra a un humano que lo requiere. La expresión "cantidad eficaz" significa una cantidad suficiente para lograr el efecto biológico deseado, que en la presente memoria es un efecto curativo o protector (en otras palabras, un efecto inmunoprotector) a través de inducción de una inmunotolerancia, preferentemente una inmunotolerancia "Ts". Se entiende que la dosis efectiva dependerá de la edad, sexo, salud y peso del sujeto que se va a tratar, el tipo de tratamiento concurrente, si existe, la frecuencia de tratamiento, y la naturaleza del efecto esperado. Los intervalos de dosis efectivas que se proporciona a continuación no se pretende que limiten la invención y representan intervalos de dosis preferidos. Sin embargo, la dosis preferida puede adaptarse al sujeto, como se entiende y determina por un experto en la materia, sin indebida experimentación. Ver, e.g., Ebadi, *Pharmacology*, Little, Brown and Co., Boston, Mass. (1985).

Por ejemplo, con respecto a VIH, una dosis típica para un adulto humano será de aproximadamente 10^6 - 10^{12} VIH partículas de virus (es decir, VLP, partículas de virus recombinantes o no recombinantes) por dosis, con 10^8 - 10^{10} preferido. Por supuesto, cualquier dosis que sea empleada, deberá ser una cantidad segura y efectiva como se determina por procedimientos conocidos, como también se describe en la presente memoria.

Además, el experto en la materia también puede determinar a partir de su conocimiento general la cantidad eficaz de vehículo tolerogénico que se va a administrar, a un humano, a fin de lograr el efecto biológico deseado.

Como un ejemplo, dicha cantidad eficaz para un derivado atenuado de bacterias patógenas (por ejemplo, BCG) comprende en el intervalo de 10^4 a 10^{12} , preferentemente 10^5 a 10^{10} CFU (unidades formadoras de colonias), y más preferentemente 10^6 a 10^8 CFU por dosis. Como otro ejemplo, la cantidad eficaz para un derivado atenuado de bacterias patógenas o bacterias patógenas inactivadas (e.g., BCG) comprende en el intervalo de 0.001 mg a 1 g, preferentemente 0.01 a 100 mg, y más preferentemente 0.1 a 10 mg por dosis.

Como otro ejemplo, dicha cantidad eficaz para bacterias no patógenas (por ejemplo, *Lactobacillus sp.*) está comprendida en el intervalo de aproximadamente 10^6 - 10^{14} CFU, y más preferentemente aproximadamente 10^{10} - 10^{12} CFU por dosis.

Como se describió anteriormente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención son adecuadas para evitar una enfermedad por VIH futura en un humano, o para tratar a un humano que sin embargo sufre una enfermedad por VIH.

Para propósitos terapéuticos, el antígeno de VIH como se definió anteriormente, puede ser autólogo, es decir puede ser derivado del virus VIH que infecta al humano que se va a tratar. En este caso, por ejemplo el virus VIH puede ser aislado del humano, entonces puede ser cultivado e inactivado (preferentemente al menos inactivado dos veces), para ser finalmente asociado con un vehículo tolerogénico para obtener una composición farmacéutica como se describió anteriormente.

Todavía por ejemplo, la composición farmacéutica que comprende un antígeno autólogo o no autólogo que contiene o es derivado de VIH Gag y/o Pol puede administrarse al humano durante un tratamiento antiviral convencional que primero hubiera llevado a una carga viral no detectable. El tratamiento antiviral convencional puede entonces detenerse después de una o más vacunas tolerogénicas utilizando la composición farmacéutica, siempre que se logre una supresión de replicación viral *ex vivo* apropiada de células CD4 infectadas en forma aguda no autólogas por células CD8 específicas de virus autólogas, siempre que se proporcione una supresión apropiada de activación de células T CD4 por células T CD8.

En particular, para propósitos terapéuticos, la composición farmacéutica puede administrarse una vez solo durante la vida del humano que se debe tratar. Alternativamente, puede administrarse dos o más veces durante la vida del humano que se va a tratar, el mismo día o en días diferentes separados durante un periodo en el intervalo por ejemplo de aproximadamente 1 día a aproximadamente 1 año o más. Más particularmente, puede administrarse todos los días o periódicamente, durante periodos en el intervalo por ejemplo de aproximadamente 1 día a aproximadamente 1 año o más. De ser necesario, la composición farmacéutica puede administrarse durante toda la vida del humano que se debe tratar.

La presente divulgación además proporciona un procedimiento *in vitro* para determinar si un humano está protegido contra un virus VIH, que comprende:

- a) aislar células T CD8 de sangre periférica de una muestra de sangre del humano vacunado;
- b) cultivar bajo condiciones apropiadas:
- (i) las células T CD8 aisladas con células de CD4+ alógenas o autólogas que fueron infectadas en forma aguda *in vitro* por una cepa viral equivalente al virus VIH; y
- (ii) las células T CD4+ autólogas o alógenas infectadas en forma aguda *in vitro*;
- c) recuperar los sobrenadantes de cultivo;
- d) medir la carga viral en los sobrenadantes; y
- e) determinar si el humano está protegido contra el virus VIH, o no.

Por "cepa viral equivalente a un virus VIH que se debe someter a prueba", se entiende que la cepa viral se origina de un virus natural y tiene características esenciales similares a aquellas del virus VIH que se debe someter a prueba (por ejemplo, se puede citar la cepa viral HTLVIII B que se origina de VIH-1 individual: HTLVIIIB puede considerarse como una "cepa viral equivalente a" VIH-1). Preferentemente, la cepa viral se originará de un virus natural que es el virus VIH que se debe someter a prueba. La cepa viral de esta manera representa un modelo apropiado para estudios que involucran un virus VIH, en especial un virus VIH natural. La cepa viral por supuesto está bien adaptada para estos estudios, en especial en términos de seguridad.

Todas las etapas anteriores pueden realizarse utilizando técnicas estándares que son bien conocidas por el experto en la materia. En particular, las condiciones de cultivo apropiadas para la etapa b) son parte del conocimiento general en el campo de la invención (tal como los procedimientos convencionales descritos en los ejemplos a continuación).

La carga viral puede medirse en la etapa d) por procedimientos convencionales tales como aquellos descritos en los ejemplos a continuación.

La carga viral en el sobrenadante recuperado del cultivo en las células T CD4+ autólogas o alógenas infectadas en forma aguda *in vitro* de acuerdo con la subetapa b) (ii), se utilizará como referencia para la determinación en la etapa e). Se calculará ventajosamente el "por ciento de supresión (%)" o "proporción de supresión" o "efecto antiviral" por ejemplo por la comparación del promedio geométrico de la concentración viral en los sobrenadantes de pocillos duplicados (o triplicados o cuadruplicados o más) que contienen solo células T CD4+ autólogas o alógenas infectadas de forma aguda *in vitro* con el promedio geométrico de la concentración viral en los sobrenadantes de pocillos duplicados (o triplicados o cuadruplicados o más) que contienen células T CD8, y células T CD4+ autólogas o alógenas infectadas de forma aguda *in vitro*.

Después, la determinación en la etapa e) preferentemente se realiza como sigue:

- Si la proporción de supresión es superior a aproximadamente 100, se puede concluir que el humano está protegido. Típicamente, este será el caso si a un humano no infectado con VIH se le ha administrado un tratamiento antiviral preventivo eficiente o si un humano infectado con VIH ha sido administrado con un tratamiento terapéutico eficiente, el tratamiento terapéutico preventivo eficiente comprende preferentemente una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, y de esta manera no será necesario administrar adicionalmente cualquier tratamiento preventivo o terapéutico al humano, siempre que permanezca protegido.
- Si la proporción de supresión es menor que aproximadamente 100, se puede concluir que el humano no está protegido contra el virus. Entonces, al humano, se trate de un humano no infectado con VIH o humano infectado con VIH, se le administrará ventajosamente un tratamiento preventivo o terapéutico que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, respectivamente y el procedimiento *in vitro* anterior se realizará una vez o más a intervalos de tiempo apropiados para asegurarse que el humano resulte protegido.

También, la presente divulgación proporciona un kit para determinar *in vitro* si un humano está protegido contra un virus de VIH, que comprende células T CD4+ alógenas o autólogas que pueden ser infectadas por una cepa viral, la cepa viral es como se definió anteriormente, equivalente al virus VIH que se debe someter a prueba. El kit también puede incluir una cepa viral adecuada en concentración apropiada para infectar las células T CD4+ alógenas o autólogas anteriormente mencionadas y/o reactivos y/o controles y/o medios apropiados (tales como medios para suspensión celular, cultivo celular, almacenamiento celular, etc.). El kit de la presente invención puede ser específico para el tipo particular de virus VIH, o puede estar adaptado a diversos tipos de virus, los tipos de virus son próximos (en particular, filogenéticamente cercanos).

Es divulgado en la presente memoria que la presente invención puede adaptarse fácilmente para utilizarse en la prevención y/o el tratamiento de cualesquiera enfermedades infecciosas crónicas. Los ejemplos no limitativos de estas enfermedades son: hepatitis B y C, virus de papiloma humano (HPV), EBV y otros virus de herpes, tuberculosis, lepra, leishmaniosis, etc.

Globalmente, cada vez en la que uno o varios antígenos patógenos asociados con las infecciones o enfermedades anteriormente mencionadas están involucrados en la activación específica de células T CD4+, que presentan epítomos derivados de las proteínas o péptidos anteriormente mencionados, la supresión/prevenición específica de activación de células T CD4+ puede desarrollarse por células T CD8+ no-citotóxicas generadas por las composiciones farmacéuticas mucosas o intraepiteliales o intradérmicas que asocian el o los antígenos anteriormente mencionados y un vehículo tolerogénico como se describe en la presente memoria.

En la presente memoria se muestra que las infecciones virales y enfermedades asociadas pueden prevenirse y/o tratarse en mamíferos/humanos utilizando las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Sobre la base de esta enseñanza, es posible proporcionar otras composiciones farmacéuticas que comprenden (i) vehículos tolerogénicos como se describen en la presente memoria; y (ii) cualesquiera antígenos de origen viral, bacteriano, fúngico, protozoo o parasitario. Estas composiciones farmacéuticas se formulan para suministro apropiado (preferentemente por la vía de las mucosas o intradérmico o intraepitelial) de los vehículos tolerogénicos y los antígenos. Son útiles para evitar y/o tratar infecciones crónicas en mamíferos provocadas por el virus, bacteria, hongos, protozoos o parásitos de los que se derivan los antígenos. Un ejemplo es una composición farmacéutica bacteriana que comprende (i) un vehículo tolerogénico como se describe en la presente memoria; y (ii) un antígeno derivado de *Mycobacterium tuberculosis*. Esta composición farmacéutica bacteriana se formula para suministro apropiado (preferentemente por la vía de las mucosas o intradérmico o intraepitelial) del antígeno y del vehículo tolerogénico. De interés particular para prevenir y/o tratar tuberculosis en humanos es esta composición farmacéutica bacteriana en la que el antígeno micobacteriano procede de bacilos de Koch.

La protección inmunitaria que se logra por la composición farmacéutica de la invención

Tolerancia es la capacidad fisiológica del sistema inmunitario para reconocer antígenos, tomada a través del sistema mucoso y para desarrollar anergia generalmente asociada con otras modificaciones inmunitarias a un encuentro subsecuente con los mismos antígenos. La tolerancia se ha mostrado frecuentemente que produce IgA mucosal permitiendo contención de anticuerpo de antígenos mucosales sin estimular al compartimiento inmunosistémico. TGF-beta, una citocina reguladora también en ocasiones ha estado involucrada en el desarrollo de tolerancia. La supresión activa de células T reguladoras CD25+ también frecuentemente se ha sugerido como un mecanismo potencial de tolerancia mucoso (Faria and Weiner, 2005; Mestecky et al., 2007). Sin embargo, ninguna de estas modificaciones inmunitarias se observó en la inmunotolerancia inducida por la composición farmacéutica descrita en la presente invención, que principalmente se caracteriza por la actividad de células T CD8+ que suprimen la activación de antígeno epitopo-virus -que presentan las células T CD4+, un tipo de reacción inmunitaria hasta la fecha no reconocida y de forma más específica, un tipo completamente nuevo de inmunotolerancia.

Las expresiones "tolerancia", "tolerancia inmunitaria", "inmunotolerancia", "inmunotolerancia a un virus", "nuevo tipo de tolerancia específica de virus", "inmunotolerancia a antígenos virales", "inmunotolerancia a inmunógenos virales", y "inmunotolerancia a Ts" son sinónimos. Esto se ha mostrado por los inventores que corresponde en macacos a una respuesta de células T CD8+ restringida por MHC-Ib/E, no citotóxica fuerte, inducida en forma activa que suprime la activación temprana de células T CD4+ que presentan antígeno VIH Gag y/o Pol asociadas con ausencia de proliferación de células CD4+T, junto con una falta de secreción de gamma interferón por células T CD8+ ante estímulo de antígeno VIS inactivado y una falta de producción de anticuerpos IgM e IgG anti-SIV sistémicos. También, los inventores pueden mostrar que TCR $\gamma\delta$ y V β 8 no estuvieron involucrados en supresión de células T CD8+ de replicación viral, sugiriendo que TCR $\alpha\beta$ habrá de jugar un papel central en el reconocimiento de la presentación de MHC-Ib/E-péptido en células T CD4+ infectadas.

Una "respuesta inmunitaria usual a un antígeno derivado de un virus" puede observarse *inter alia* ante vacunación con una composición de vacuna preventiva convencional que comprende un antígeno que contiene o se deriva de Gag y/o Pol de un virus VIH y un adyuvante estándar o convencional (es decir, cualquier forma de adyuvante físico, químico o biológico dirigido a estimular y/o facilitar y/o incrementar la respuesta inmunitaria asociada con el antígeno, tales como los descritos en el Capítulo con título "Adjuvants" en "Vaccines" por S. Plotkin et al). Esta "respuesta inmunitaria usual a un antígeno derivado de un virus" involucra respuestas inmunitarias, humorales, celulares o tanto humorales como celulares, y se caracteriza convencionalmente por:

- (i) la proliferación de células CD4 específicas de virus ante estímulo específico *in vitro*; y/o
- (ii) la inducción de una respuesta humoral sistémica específica mediante la producción de anticuerpos sistémicos contra proteínas y/o péptidos antigénicos virales; y/o
- (iii) la inducción de una respuesta celular específica asociada con la producción de gamma interferón por células T CD8, y/o

(iv) la ausencia de respuesta de células T CD8+ no citotóxicas que suprime la activación de células T CD4+ que presentan antígeno VIH Gag y/o Pol.

5 En contraste, una composición farmacéutica que comprende un antígeno que contiene o se deriva de Gag y/o Pol de un virus VIH y un vehículo tolerogénico, como se dispone por la presente invención, genera una "inmunotolerancia a un virus" y más particularmente una "inmunotolerancia a "Ts"" que es caracterizada en los Ejemplos a continuación con respecto a VIS en macacos, por:

- 10 (i) la ausencia de proliferación de células CD4 específicas de virus ante estímulo específico *in vitro*; y
- (ii) la ausencia de cualquier respuesta humoral sistémica significativa, es decir ya sea respuesta de anticuerpo sistémico detectable específico no puede detectarse por procedimientos de laboratorio clínico clásicos tales como ELISA, o si se detectan anticuerpos sistémicos, no protegen contra la infección de virus VIS; y
- 15 (iii) en la ausencia de cualquier respuesta de células T CD8+ citotóxicas asociadas con la producción de gamma interferón (por ejemplo, detectable por ELIspot) ante estímulo *in vitro* adecuado, o si una respuesta de células T CD8 citotóxicas se detecta, no protege contra infección de virus VIS; y
- 20 (iv) como una característica esencial, la respuesta de células T CD8+ no restringida CD25 MHC-Ib/E, no citotóxica fuerte inducida en forma activa que suprime la temprana activación de células T CD4+ que presentan antígeno VIS.

25 Como se mencionó anteriormente, la composición farmacéutica de la presente invención comprende un vehículo tolerogénico (una bacteria no patógena seleccionada de entre bacterias de ácido láctico no patógenas y BCG) y un antígeno que contiene o que está derivado de Gag y/o Pol de un virus VIH (partículas de virus de VIH inactivadas). De hecho, un vehículo tolerogénico combinado con el antígeno viral induce un estado de inmunotolerancia específica de virus en un humano, en lugar de producir una inmunorespuesta usual como se define anteriormente. De esta manera, el antígeno administrado por ruta mucosa o intradérmica o intraepitelial, solo o asociado con un adyuvante estándar en general, es capaz de producir una respuesta inmunitaria usual, excepto cuando se asocia con un vehículo tolerogénico como en la composición farmacéutica de la presente invención. Bajo las presentes específicas circunstancias, la asociación de vehículo tolerogénico/antígeno en la composición farmacéutica de la presente invención, induce una inmunotolerancia como se define anteriormente. Esto significa que la inmunotolerancia solo puede lograrse ante administración (por la ruta mucosa o intradérmica o intraepitelial) una mezcla apropiada de un vehículo tolerogénico y un antígeno que contiene o se deriva de Gag y/o Pol de un virus VIH. Si uno se administra a un humano en la ausencia del otro, el humano no estará "vacunado" o "tolerizado".

40 Como se muestra en los siguientes ejemplos (utilizando VIS en el modelo de macaco), la inmunotolerancia (también denominada inmunotolerancia de "Ts") inducida o lograda al administrar la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, se caracteriza por una respuesta de células T CD8+ (en particular, no citotóxica y/o restringida MHC-Ib/E) que suprime la activación (en especial la activación temprana) de antígeno VIS Gag y/o Pol que presenta células T CD4+; y ventajosamente por uno o más de: 1) en ausencia de proliferación de células T CD4+; 2) una falta de secreción de gamma interferón significativa por células T CD8+, ante estímulo de antígeno VIS; y 3) una falta de producción significativa de anticuerpos IgM e IgG sistémico anti-SIV.

45 Con la expresión "falta de secreción significativa de gamma interferón por células T CD8+ ante estímulo de antígeno VIH o VIS", se entiende en la presente memoria que el nivel de secreción de gamma interferón por células T CD8+ que se observa ante estímulo de antígeno VIH o VIS, es cero o débil. Una secreción de gamma interferón "débil" por células T CD8+ ante estímulo de antígeno VIH o VIS típicamente es menor a aproximadamente 80 SFC por 50 2×10^5 PBMC.

55 Por la expresión "falta de producción significativa sistémica de anticuerpos IgM e IgG anti-HIV o anti-SIV", se entiende en la presente memoria que el nivel de producción de anticuerpos IgM e IgG anti-HIV o anti-SIV sistémicos que se observa es cero o débil. Una producción "débil" de anticuerpos anti-HIV o anti-SIV sistémicos típicamente es una valoración de anti-HIV o anti-SIV de aproximadamente 300 o menos.

De esta manera, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención induce y preferentemente mantiene una protección inmunitaria específica de antígeno contra VIH en un humano, en la que la protección inmunitaria preferentemente se caracteriza por:

- 60 - la reducción y preferentemente la supresión de una carga viral VIH en el humano en comparación con controles experimentales apropiados; y/o
- 65 - células T CD8+ que suprimen la activación de antígeno VIH Gag y/o Pol que presentan células T CD4+ en el humano en comparación con controles experimentales apropiados.

Ventajosamente, dicha protección inmunitaria se determina en el humano al detectar *in vitro* la presencia o la actividad de las células T reguladoras de CD8+, del humano. Esta detección puede realizarse por técnicas *in vitro* estándares, tales como aquellas descritas en los ejemplos a continuación.

5 Ejemplos

Parte A - Materiales y métodos generales

10 A-I Animales. Macacos rhesus chinos creados en colonia (*Macaca mulatta*) se alojaron de acuerdo con los reglamentos de los National Institutes of Health 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Todos los animales estarán en buenas condiciones de salud, 2-4 años de edad, pesaron 4-6 kg y fueron seronegativos para VIS, SRV, virus linfotrópico de células T de simio 1, virus de hepatitis B y virus B. Se sometieron a pruebas de rayos X en la piel (PPD) al ingresar todos los animales para excluir potenciales portadores de tuberculosis.

15 A-II tipado MHC clase I. Alelos MHC clase I clásicos de macacos rhesus fueron genotipados en muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) utilizando ensayos PCR de cebadores específicos de secuencia (SSP) para secuencias representativas *Mamu-A* y *Mamu-B* como se describió previamente (Muhl et al., 2002; Loffredo et al., 2007).

20 A-III Preparaciones virales antigénicas.

III-1. La producción VIS se realizó en células CEM174 inoculadas con SIVmac239 (regalo de P. A. Marx). Los sobrenadantes de cultivo se recolectaron al seleccionar la producción viral.

25 III-2. SIVmac239 inactivado por AT-2: SIVmac239 se inactiva por 250 µM de aldritol (AT-) (Sigma) durante 2 horas y se lavó tres veces por ultracentrifugación. El virus inactivado AT2 se empleó en una dosis final de 10⁹ de partículas virales por cada administración (es decir vacunación).

30 III-3. SIVmac239 inactivado con calor: SIVmac239 inactiva a 56 grados C durante 30 minutos. El virus termoinactivado se empleó en una dosis final de 10⁹ de partículas virales para cada administración.

35 III-4. SIVmac239 inactivado por calor-AT-2: SIVmac239 se inactivó por 250 µM de aldritol (AT-2) (Sigma) durante 2 horas y se lavó tres veces por ultracentrifugación. Después, el virus se sometió a una temperatura de 56 grados C durante 30 minutos. El virus inactivado se emplea en una dosis final de 10⁹ partículas virales por cada administración.

III-5. Las preparaciones de virus inactivadas se inocularon a células CEM174 para verificar el 100% de inhibición de infectividad viral.

40 A-IV ensayo para respuestas de anticuerpo a VIS. Anticuerpos IgG, IgM, y IgA Anti-SIV de plasma se titularon por ensayo anticuerpo de inmunofluorescencia (IFA) (Mederle et al., 2003). Brevemente, diluciones dobles en serie de plasma de prueba se incubaron con portaobjetos agregados a células CEM174 infectadas con VIS a 37° C durante 30 minutos. Después de lavar con Hanks, IgG anti-macaco cabra conjugado con FITC (Sigma), IgM (ADI, San Antonio, Texas), o IgA (ADI) se agregaron durante 30 minutos adicionales (a 37 grados C). Títulos de anticuerpos se determinaron como recíprocos de la dilución más alta para alcanzar una tinción de inmunofluorescencia positiva. La sensibilidad de ensayo IFA fue un título de 20 para IgG y un título de 5 para IgM y IgA. Cuando una muestra de plasma fue negativa para IFA (por debajo de la sensibilidad de ensayo), un valor de 1 se asignó para facilitar análisis de datos.

50 Secreciones mucosas se recolectaron al lavar el recto con PBS utilizando un catéter para instilación gástrica como se describió previamente (Tsai et al., 1993). Brevemente, inhibidor tripsina (10 µg/ml) y EDTA (5 x 10⁻⁴ M) (Sigma) se agregaron a las muestras que después se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 x g a 4° C. Los sobrenadantes se recolectaron y suplementaron con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (10⁻³ M) y azida de sodio (0.01%) (Sigma). Las muestras se almacenaron a -80° C hasta su utilización. Títulos IgA anti-SIV en recto se detectaron por el ensayo IFA anterior.

60 A-V Citometría de flujo. Análisis de citometría de flujo se llevó a cabo con FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, California) utilizando anticuerpos monoclonales etiquetados por fluorescencia contra los siguientes: CD3-PE-Cy7 (clon SP34-2), CD4-PE (clon MT477), CD8-PerCP (clon RPA-T8), y APC-antirratón conejo secundario (BD Biosciences). Ki-67-PE (BD Biosciences) y anticuerpo monoclonal anti-P27 conjugado con FITC (Fitzgerald, Concord, MA) o anticuerpo monoclonal anti-P27 conjugado con biotina (Fitzgerald) acoplado con APC-SAv (BD Biosciences) se emplearon para tinción intracelular después de permeabilización.

65 Anticuerpos monoclonales conjugados con PE contra TCRγδ (clon B1), Vβ8, y antígenos CD (CD7, CD16, CD28, CD62L, CD95, CD122, CD137, CD150, CD183, CD184, CD195, CD196, CD197, CD226, CD272 y CD305) se adquirieron en BD Biosciences; anticuerpos monoclonales conjugados con PE contra antígenos CD (CD11a, CD25,

CD27, CD39, CD101, CD129, CD215, CD277 y CD357) se adquirieron en BioLegend (San Diego, CA, USA); y anticuerpos monoclonales conjugados con PE contra antígenos CD (CD127, CD247 y CD279) se adquirieron en Bioscience (San Diego, CA, USA).

5 A-VI Proliferación celular. PBMC se obtuvieron como se describió previamente (Lu et al. 2003). La proliferación de células T CD4+ o CD8+ específicas de VIS se evaluó por ensayo de etiquetado carboxifluoresceína diacetato, succinimidil éster (CFSE) (Molecular Probes, Eugene, Oregon) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. PBMC se tiñen con 3 μ M de CFSE durante 15 minutos a 37° C. Después de lavar, las células etiquetadas con CFSE se estimularon durante 5 días con 10 μ g/ml de proteína núcleo VIS P27 recombinante (ImmunoDiagnostics, Wobun, MA), 2 μ g/ml de péptidos 15-mero gag VIS (GLS, Shanghai, China), 10⁹/ml de VIS inactivado con AT-2 o medio solo. Después de etiquetar con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4 o anti-CD8, PBMC se fijó en paraformaldehído al 1% para citometría de flujo.

15 A-VII Activación celular. PBMC frescas, agotadas (o no) con CD8 o CD25 por perlas magnéticas se infectaron en una sola ronda con SIVmac239 tratado con AT-2 durante 2 horas a una concentración viral de 10¹⁰/ml. Células infectadas se estimularon durante la noche con anticuerpos de enterotoxina B de estafilococos (2.5 μ g/ml) y anti-CD3 (2.5 μ g/ml)/anti-CD28 (2.5 μ g/ml). Tinción intracelular de VIS P27 y Ki-67 se realizó 48 horas después de estímulo a fin de determinar el porcentaje de activación (Ki-67+) con células CD4+ (P27+) infectadas.

20 A-VIII Ensayo ELISPOT. Los ensayos IFN- γ IL-10 ELISPOT de macacos rhesus se llevaron a cabo en PBMC sin cultivar en la presencia o ausencia de P27 o VIS inactivado con AT-2 utilizando un kit comercial (Cell Sciences, Canton, MA). Un kit TGF- β 1 ELISPOT se adquirió de R&D Systems (Minneapolis, MN). Los datos se leyeron con un lector ELISPOT automatizado (AID, GmbH, Straßberg, Alemania). El número de células que forman puntos específicos de VIS (SFC = Specific Spot Forming Cells) se calcula al sustraer los SFC no específicos en la presencia de medio solo.

30 A-IX Ensayo antiviral. Células T CD4+ autólogas de cada animal purificadas mediante etiquetado positivo magnético (MicroBeads, Miltenyi Biotec) se infectaron de manera precisa con SIVmac239 (10⁻³ MOI) en la presencia o ausencia de células T CD8+ purificadas magnéticamente en una proporción CD4/CD8 de 1:2 y después se estimularon con SEB (Sigma) durante 16 horas. Después de lavar, las células se cultivaron en cuadruplicado en un volumen final de 200 μ l por pozo de medio RPMI 1640 (Invitrogen, Shanghai, China) que contiene 100 IU de rIL2 humano en placas de 96-pocillos durante 5 días a 37° C en la presencia de CO₂ al 5%. Los cultivos celulares se reemplazaron una vez con la mitad de medio fresco el día 3. Los sobrenadantes de cultivo recolectados al día 5 se emplearon para medición de carga viral por RT-PCR en tiempo real (ver a continuación). El porcentaje de supresión (%) se calcula al comparar la media geométrica de concentración viral en los sobrenadantes de cultivo de pocillos duplicados que contienen solo células infectadas con CD4+ con la media geométrica de la concentración viral en los sobrenadantes de pocillos en cuadruplicado que contienen las células CD8+ y CD4+ mixtas. Células T CD4+ también se cocultivaron con células T CD8+ alogenas a fin de determinar la correlación entre supresión viral y restricción de HLA.

40 A-X Medidas de carga viral. VIS ARN en plasma o VIS ADN asociada celular se cuantifica por RT-PCR en tiempo real o PCR utilizando cebadores (de sentido directo, SEQ ID No. 1: 5'-GAGGAAAAGAAATTTGGAGCAGAA-3'; de sentido contrario, SEQ ID No. 2: 5'-GCTTGATGGTCTCCACACAA-3') y sonda (SEQ ID No. 3: 5-FAM-AAAGTTGCACCCCTATGACATTAATCAGATGTTA-TAMRA-3') específicamente optimizados para SIVmac239 y para SIVmac251.

50 Ensayo de células T supresor específico de A-XI VIS. PBMC frescas, agotadas (o no) con cualquiera de CD8 o CD25 mediante anticuerpos anti-CD8 o anti-CD25 conjugados con perlas magnéticas de acuerdo con el protocolo que se proporciona por el fabricante (Miltenyi Biotec) se infectaron con SIVmac239 durante 2 horas a 0.5 de multiplicidad de infección (MOI = Multiplicity Of Infection). Células infectadas se trataron durante la noche con anticuerpos de enterotoxina B de estafilococos (SEB) (2.5 μ g/ml) (Sigma) y anti-CD3 (2.5 μ g/ml)/anti-CD28 (2.5 μ g/ml) (BD Biosciences). Tinción intracelular simultánea de VIS P27 y Ki-67 se realizó 48 horas después del estímulo *in vitro* a fin de determinar el por ciento (%) de activación de células T (Ki-67+) dentro de poblaciones celulares infectadas (P27+).

55 A-XII Pruebas de provocación virales.

60 XI 1-1. La producción de VIS se realizó en PBMC de macacos inoculados con SIVmac239 (regalo de P.A. Marx). Los sobrenadantes de cultivo se recolectaron al seleccionar la producción viral.

65 XII-2. Prueba de provocación intrarrectal (IRC): Después de vacunación, los animales se inocularon (repetidamente) en forma intrarrectal con 5000 MID 100 i.e. 5 x 10⁵ TCID₅₀ de SIVmac239 patógenos. Esta dosis de infección en general resulta en una infección sistémica de 100% de macacos rhesus chinos con una carga viral en plasma pico (10⁶-10⁷ copias/ml) entre los días 10 y 14. Todos los animales sometidos a prueba de provocación con VIS se evaluaron en forma clínica y biológica cada 2 semanas durante 1 mes y cada mes posteriormente.

XII-3. Prueba de provocación intravenosa (IVC): Después de vacunación, los animales fueron inoculados (repetidamente) de manera intravenosa con 5 MID 100 i.e. 500 TCID₅₀ (titulados en línea celular CEM174) de SIVmac239 patógenos (regalo de Dr. P.A. Marx de Aaron Diamond AIDS Research Center, New York, USA). Esta dosis infecciosa en general resultó en una infección sistémica de 100% de macacos rhesus chinos con una carga viral en plasma pico (10⁶-10⁷ copias/ml) entre el día 10 y el día 14. Todos los animales sometidos a prueba de provocación con VIS se evaluaron en forma clínica y biológicamente cada 2 semanas durante un mes y cada mes posteriormente.

A-XIII Análisis estadístico. Datos no apareados entre diferentes grupos de animales o datos apareados antes y después de inmunización se compararon por la prueba Mann-Whitney o la prueba Wilcoxon, respectivamente.

Parte B - Materiales y métodos específicos

15 B-I- Uso de BCG como un vehículo tolerogénico

B-I-I Preparación de BCG

I-1. BCG vivo: BCG vivos preparados en Copenhagen en el Statens Serum Institut (cepa SSI 1331) se adquirieron en Laboratoire Sanofi-Pasteur Merck, Sharp y Dome (SPMSD) y se emplearon a una concentración final de 5x10⁶ cfu para administración intestinal o intravaginal o a una concentración final de 5x10⁵ cfu por cada administración de refuerzo intradérmica.

I-2. GCG inactivados por secado por congelamiento prolongado (EFD): La cepa SSI 133 BCG viva se exterminó por secado por congelamiento extendido (EFD) de 5 días a un vacío inferior a 20 µm Hg y se utiliza a una dosis final correspondiente a 5x10⁶ cfu por cada administración intestinal o intravaginal o 5x10⁵ cfu por cada administración intradérmica.

I-3. BCG Termoinactivados: La cepa SSI 133 BCG viva se sometió a autoclave durante 15 minutos a 115° C en amortiguador borato y se utiliza a una dosis final correspondiente a 5x10⁶ cfu por cada administración intestinal o intravaginal o 5x10⁵ por cada administración intradérmica.

B-I-II Composiciones farmacéuticas

La composición se preparó recientemente con el uso de RPMI 1640 (Invitrogen, Shanghai, China) que contiene uno de los antígenos VIS y el vehículo tolerogénico.

B-I-III Inmunización de animales

En el momento de la inmunización, los animales se anestesiaron con hidrocloruro de tiletamina y zolazepán (0.7 mg/kg) se inyectó en forma intramuscular.

III-1. Inmunización intravaginal (IVI): Animales hembra se inmunizaron bajo anestesia por inyección intravaginal durante 4 horas con un mililitro de composición farmacéutica o de un vehículo tolerogénico descrito previamente como un control. Una inmunización de refuerzo con la composición farmacéutica o con el vehículo tolerogénico, se suministró con la misma dosis en el mismo sitio a 8 semanas. Todos los animales se evaluaron clínica y biológicamente cada dos semanas después de la primera inmunización.

III-2. Inmunización oral (intragástrica) (IGI): A animales macho o hembra bajo anestesia se les administró en forma intragástrica con 15 ml de bicarbonato de sodio 0.1 M 15 minutos antes de ingestión de la composición farmacéutica o de un vehículo tolerogénico descrito anteriormente como un control. Unos 15 ml adicionales de la solución de bicarbonato de sodio se suministran inmediatamente después de administración. La misma vacunación tolerogénica que la inicial se repitió dos veces a un intervalo de un mes a cada animal. Todos los animales se evaluaron en forma clínica y biológica cada dos semanas después de la primera inmunización.

III-3. Inmunización de refuerzo intradérmica (IDI): A animales hembra inmunizados intravaginalmente (ver sección IVI anterior) se les suministró 90 días después de la primera inmunización bajo anestesia, un refuerzo intradérmico con 0.1 ml de la composición farmacéutica que contiene 10⁹ copias de AT-2-inactivado con VIS y 5x10⁵ cfu de BCG vivos. Todos los animales se evaluaron en forma clínica y biológica cada dos semanas después de la primera inmunización.

B-I-IV Ensayo antiviral. El umbral correspondiente a inmunidad estéril después de la prueba intrarrectal es al menos 20.

65

B-II- Uso de *Lactobacillus plantarum* como un vehículo tolerogénico

B-II-I Preparación bacteriana (preparación de vehículo tolerogénico). *Lactobacillus plantarum* (LP) (ATCC8014) se cultivó a 37° C en medio MRS con una velocidad de rotación de 200 rpm. Para obtener LP en la fase logarítmica (midlog) de cultivo bacteriano, se cultivaron bacterias hasta alcanzar una densidad óptica de 1.0 a 600 nm con una concentración LP final de alrededor de 10¹⁰ cfu/ml (obtenido en aproximadamente 3.5 horas).

B-II-II Inmunización animal por suministro oral (intragástrico). Los animales ayunaron durante la noche (sin desayuno). En el momento de administración oral, los animales se anestesiaron con hidrocloruro de tiletamina y zolazepán (0.7 mg/kg) se inyectó en forma intramuscular.

Inmunización No. 1: A ocho animales se les administra de forma intragástrica 30 ml de una preparación bacteriana viral que contiene 4 x 10⁷ copias/ml de iSIV y 3 x 10⁹ cfu/ml de LP vivo en solución de maltodextrina (20%). Después de esta primera inmunización, los monos recibieron intragástricamente 25 ml de la misma preparación viral-bacteriana (es decir, composición farmacéutica) cada 30 minutos durante 3 horas. Este protocolo de suministro oral se realizó 5 veces durante 5 días laborales consecutivos. Como controles, se administraron 4 animales LP vivos solos y otros 3 recibieron solamente el doble de VIS inactivado en paralelo.

Inmunización No. 2: A doce animales (iSIV/LP#9-20) se les administró intragástricamente 30 ml de una preparación de 4 x 10⁷ copias/ml de iSIV (SIVmac239 inactivados con calor/AT-2) y 3 x 10⁹ cfu/ml de LP vivos en solución de maltodextrina (20%). Después, los animales recibieron 25 ml de la misma preparación cada 30 minutos durante 3 horas (6 veces) en 5 días consecutivos. A seis animales (LP#5-10) se les administró intragástricamente 30 ml de 3 x 10⁹ cfu/ml de LP vivo en solución de maltodextrina (20%). Después, los animales recibieron 25 ml de la misma preparación cada 30 minutos durante 3 horas (6 veces) en 5 días consecutivos. Finalmente, a otros 6 animales (iSIV#5-10) se les administró intragástricamente 30 ml de una preparación de 4 x 10⁷ copias/ml de iSIV solo. Después, los animales recibieron 25 ml de la misma preparación cada 30 minutos durante 3 horas (6 veces) en 5 días consecutivos.

B-II-III Agotamiento de células T CD8⁺ *in vivo*. Macacos primero se anestesiaron y después se les proporciona una inyección intravenosa de un anticuerpo monoclonal anti-CD8 quimérico (cMT-807, Centocor Research & Development, Inc., Malvern, Pennsylvania, USA) a 5 mg/kg los días 0, 4 y 7) como se describió previamente (Schmitz et al., 1999). Muestras de sangre periférica (5 ml) se tomaron de cada animal el día 0 y en diversos puntos en el tiempo después de la inyección del anticuerpo.

B-II-IV Ensayo antiviral. El umbral correspondiente a la prueba de inmunidad estéril después de prueba intrarrectal es al menos 100.

B-II-V Ensayo de supresión de VIS de células T CD8+. Células T CD4+ autólogas de cada animal purificadas por etiquetado positivo magnético (Micro Perlas, Miltenyi Biotec) se infectaron en forma aguda con SIVmac239 (10³ multiplicidad de infección) en la presencia o la ausencia de células T CD8+ magnéticamente purificadas en una proporción CD4/CD8 de 1:3 y después se estimularon con SEB y anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 durante 16 horas. Después de lavar, las células se cultivaron en cuadruplicado en placas de 96 pocillos. Los cultivos se mantuvieron en un volumen final de 200 µl por pocillo de medio RPMI 1640 que contiene 100 IU de rIL2 humano (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) durante 5 días. Los sobrenadantes de cultivo recolectados el día 5, se emplearon para la medición de carga viral por RT-PCR en tiempo real (ver a continuación). Las veces de supresión se calculan como sigue: las medias geométricas de la concentración viral en los sobrenadantes de cultivo de la células objetivo CD4+ infectadas solamente/las medias geométricas de la concentración viral en los sobrenadantes de las células T CD8+ y CD4+).

En algunos experimentos, células CD8+ y CD4+ se cultivaron sin contacto célula-a-célula al utilizar un aparato Multiwell Insert System (BD Biosciences) (CD8 en el pocillo de inserción y CD4 en el pocillo de fondo); células T CD4+ se cocultivaron con células T CD8+ alógenas para determinar la correlación entre supresión viral y restricción MHC; y células T CD8+ y CD4+ también se cocultivaron en la presencia de anticuerpos anti-MHC-ABC (BioLegend) o anti-MHC-E (Cell Science) para definir los modos de restricción MHC. Para definir los subconjuntos de células T CD8+ asociados con la actividad antiviral, células T CD8+ se purificaron de PBMCs inmediatamente después de su agotamiento con PE-conjugado anti-TCRγδ, anti-Vβ8, u otros anticuerpos de antígeno anti-CD utilizando microperlas anti-PE a través de una columna LD (Miltenyi Biotec).

B-II-VI. Ensayo de citotoxicidad de células T CD8+ específico de VIS. Tanto células T CD8+ purificadas (células efectoras) como células T CD4+ purificadas pulsadas con 10¹⁰ SIVmac239 tratadas con AT-2 (células diana) se etiquetaron con 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC₆) 40 nM (Marchetti et al., 1996) (Molecular Probes) durante 10 minutos a 37°C. Las células diana se etiquetaron con anti-CD4 conjugado con PerCP-Cy5 (BD Bioscience) durante 20 minutos en hielo. Después de lavar 3 veces, las células efectoras se mezclaron con las células diana en una placa de 96 pocillos con fondo en U a diferentes proporciones E/T (3:1, 1:1, 0.3:1) en triplicado. Células K562 (diana) con células anti-CD32 conjugadas con APC (BD Bioscience) y CD56⁺ purificadas (NK) (efectoras) de 4 donadores sanos se incluyeron como un control de ensayo. Después de 4 horas de incubación a 37°C en la presencia de SEB y

células anti-CD3/anti-CD28, se recolectaron y analizaron por citometría de flujo. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como sigue: $100 \times (\% \text{ de células objetivo apoptósicas total} - \% \text{ de células diana apoptósicas espontáneas}) / (100 - \% \text{ de células objetivo apoptósicas espontáneas})$.

5 B-II-VII Pruebas de provocación virales.

Primer estudio: Cuatro meses después de la administración oral de la vacuna o los controles en el primer lote de experimento (inmunización No. 1), los 8 animales inmunizados y sus 7 controles se inocularon intrarrectalmente con 2500 MID100 (100.000 TCID₅₀) de SIVmac239 patogénico. Dos meses después, 4 monos vacunados y ya protegidos se volvieron a someter por ruta intrarrectal (100.000 TCID₅₀) mientras que los 4 otros monos protegidos se sometieron a tratamiento intravenoso con 5 MID100 (200 TCID₅₀) de SIVmac239. Como controles, 2 monos recibieron una prueba de provocación intrarrectal y otros 2 una intravenosa. Estas dosis infecciosas en general resultaron en una infección sistémica de 100% macacos rhesus chinos con una carga viral en plasma pico ($10^7 - 10^9$ vp/ml) entre el día 10 y el día 14.

Segundo estudio (inmunización No. 2): El día 420 posterior a inmunización en el segundo juego de estudio, 16 animales (8 monos inmunizados con iSIV y LP) y 8 controles (4 iSIV y 4 LP) se sometieron a prueba de provocación intrarrectalmente con 100,000 TCID₅₀ de SIVmac239.

20 **Parte C - Resultados**

C-I BCG es un vehículo tolerogénico

C-I-I Protección contra la prueba de provocación SIVmac239 intravenosa después de administración intravaginal:

25 A seis animales (Composiciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6) se les administra intravaginalmente un mililitro de una composición tolerogénica que comprende virus inactivado AT2 como un antígeno y BCG vivo. Una administración de refuerzo se suministró con la misma composición tolerogénica en el mismo sitio a las 8 semanas.

30 Simultáneamente, a otros 5 animales (controles_1, 2, 3, 4 y 5) se les suministró intravaginalmente un mililitro de una composición que comprende solo BCG vivo. Una administración de refuerzo también se proporcionó con la misma composición en el mismo sitio a 8 semanas.

35 Cuatro meses después de la administración inicial, todos los 11 animales (Composiciones_1-6 y controles_1-5) se sometieron a prueba de provocación por inoculación viral intravenosa.

Las cargas virales se determinaron regularmente en el plasma de los animales tratados.

40 La figura 1 muestra las cargas de virus (copias de VIS ARN en plasma/ml) como una función de tiempo (días) en animales que han recibido la composición (Composiciones_1-6) y animales de control (controles_1-5) después de una sola prueba de provocación viral intravenosa.

45 Los resultados muestran que después de prueba de provocación viral intravenosa, los 5 animales de control (Controles_1-5) mostraron una infección primaria típica con una carga viral de plasma pico (10^6 - 10^7 copias/ml) entre los días 10-14 posteriores a la prueba de provocación como se esperaba. La carga viral de plasma de este grupo de animales de control permaneció todavía alta ($>10^5$ vp/ml) durante los 60 días posteriores a la prueba de provocación viral y posteriormente.

50 En contraste, 4/6 animales que han recibido intravaginalmente la composición tolerogénica elaborada de un SIVmac239 inactivado con AT-2 más BCG, mostraron muy bajo pico de carga viral en plasma (< 1000 vp/ml; entre los días 10-14), que devino indetectable (<10 vp/ml) rápidamente (un mes después de la prueba viral). Los 2 animales con un pico de alta carga viral en plasma ($> 10^6$ copias/ml) tuvieron un nivel de carga viral de valor determinado menor (<1.000 copias/ml) que el grupo de control ($> 10^5$ copias/ml) al día 60.

55 C-I-II- Protección contra prueba de provocación SIVmac239 intrarrectal después de administración intravaginal de la composición:

60 A siete animales (Composiciones_7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13) se les administra intravaginalmente un mililitro de una composición tolerogénica que comprende virus inactivado AT2 como un antígeno y BCG vivo como un vehículo tolerogénico. Una administración de refuerzo se proporcionó con la misma composición en el mismo sitio a 8 semanas.

65 Simultáneamente, a otros cinco animales (controles_6, 7, 8, 9 y 10) se les suministra intravaginalmente un mililitro de una composición que comprende solo BCG vivos. Una administración de refuerzo también se proporciona con la misma composición en el mismo sitio a 8 semanas.

Cuatro meses después de la administración inicial, los 12 animales (Composiciones_7-13 y controles_6-10) se sometieron a prueba de provocación con SIVmac239 a través de una inoculación viral intrarrectal.

Las cargas virales se determinaron regularmente en el plasma de los animales tratados y de control.

5 La figura 2 muestra las cargas de virus (copias de VIS ARN en plasma/ml) como una función de tiempo (días) en animales que recibieron la composición (Composiciones_7-13) y en animales de control (controles_6-10) siguiendo pruebas de provocación virales intrarrectales.

10 Los resultados muestran que, siguiendo las pruebas virales intrarrectales, los 5 animales que recibieron la administración intravaginal de BCG vivos solos (Controles_6-10) mostraron una infección primaria típica con una carga viral en plasma pico (10^6 - 10^7 vp/ml) entre los días 10-14 posteriores a la prueba de provocación como se esperaba. La carga viral de valor determinado de plasma de este grupo de animales de control permanece todavía alta ($>10^5$ copias/ml) a lo largo de los 60 días posteriores a la prueba de provocación viral.

15 En contraste, 4/7 animales que reciben SIVmac239 inactivados AT-2 intravaginalmente más BCG vivos mostraron un nivel de carga viral sorprendentemente indetectable (<10 copias/ml) durante un periodo de 60 días posterior a la prueba de provocación. Los otros 3 animales mostraron una infección primaria típica con una carga viral en plasma pico entre los días 10-14 posterior a la prueba de provocación. Sin embargo, su carga viral de valor determinado (10^3 - 10^5 copias/ml) fue significativamente menor que el nivel de los animales de control ($>10^5$).

C-I-III- Protección contra pruebas de provocación SIVmac239 intrarrectales intravenosas repetidas después de administración intravaginal de la composición farmacéutica:

25 Dos y ocho meses después, los 3 animales con una carga viral indetectable después de prueba de provocación intravenosa (Composiciones_1, _2 y _3) se sometieron a una segunda y tercera pruebas de provocaciones intravenosas con la misma dosis de inóculo viral.

30 Después de la segunda y tercera pruebas de provocación virales intravenosas de este grupo de monos, una carga viral en plasma pico bajo similar, se observó el día 10. Sin embargo, durante 30 días después de prueba de provocación viral, las cargas virales de nuevo fueron indetectables (figura 3).

35 Dieciséis y veintitrés meses después de la administración inicial de la composición, los 3 animales que ya habían tenido un total de 3 pruebas de provocación intravenosas (Composiciones_1, _2, y _3) se sometieron a prueba de provocación adicional por una inoculación intrarrectal.

40 Como se esperó, estos 3 animales (que inicialmente recibieron SIVmac239 inactivado con AT-2 más BCG intravaginalmente) no mostraron de nuevo carga viral en plasma pico detectable (<10 copias/ml) después de 2 pruebas de provocación virales intrarrectales sucesivas (figura 3).

Estos resultados han establecido que la eficacia para inhibir replicación viral es estable ya que esta inhibición todavía se observa más de 20 meses después de la administración inicial de la composición.

45 C-I-IV- Protección contra la prueba de provocación SIVmac239 intravenosa o intrarrectal después de administración intravaginal de la composición farmacéutica más un refuerzo intradérmico:

50 Como se esperó, después de la prueba de provocación intravenosa (controles 17 y 18, figura 4) o viral intrarrectal (controles 19 y 20, figura 5), los 4 animales que recibieron administración intravaginal de BCG solo, mostraron una infección primaria típica con una carga viral de plasma pico (10^6 - 10^7 vp/ml) entre los días 10-14 posteriores a la prueba como se esperó. La carga viral de valor determinado de plasma de este grupo de animales de control permaneció todavía alta ($>10^5$ copias/ml) durante los 60 días posteriores a prueba de provocación viral.

55 En contraste, los 3/4 (75%) animales (Composiciones 14, 15 y 17) que reciben intravaginalmente la composición realizada en SIVmac239 inactivado con AT-2 y BCG vivos más un refuerzo intradérmico con la misma composición mostró carga viral en plasma indetectable (<10 copias/ml) a lo largo de un periodo de 60 días posterior a la prueba intravenosa (ver figura 4). El animal restante (composición 16) mostró una infección primaria con una carga viral en plasma pico ($>10^5$ copias/ml) entre los días 10-14 posteriores a la prueba de provocación (ver figura 4). Sin embargo, su carga viral de valor determinado alcanzó un nivel relativamente bajo (10^4 copias/ml) el día 60.

60 Además, los 4/4 (100%) animales (composiciones 18-21) que recibieron intravaginalmente la composición realizada en SIVmac239 inactivado con AT-2 más BCG vivos más un refuerzo intradérmico de la misma composición, mostraron carga viral en plasma indetectable (<10 copias/ml) a lo largo de un periodo de 60 días posterior a la prueba de provocación postintrarrectal (ver figura 5).

C-I-V- Protección contra la prueba de provocación SIVmac239 intrarrectal después de administración oral de la composición farmacéutica:

5 Cuatro animales (Composiciones_22, _23, _24 y _25) son administrados intragástricamente con un mililitro de una composición que comprende virus inactivado con AT2 y BCG vivo.

Simultáneamente, a otros cuatro animales (controles 21-24) se les suministró intragástricamente un mililitro de BCG vivo solo.

10 La misma administración proporcionada inicialmente a cada animal se repitió tres veces en los días 15, 30 y 60 después de la primera etapa de administración.

15 Los resultados muestran que después de la prueba de provocación viral intrarrectal (realizada el día 90), los 4 animales que recibieron BCG vivos solos (controles 21-24) mostraron una infección primaria típica con una carga viral en plasma pico (10^6 - 10^7 copias/ml) entre los días 10-14 posteriores a la prueba de provocación mientras que los 4 animales (Composiciones_22-25) que recibieron la composición de VIS inactivado con AT-2 más BCG vivo mostró de manera sorprendente una carga viral en plasma indetectable (<10 copias/ml; entre los días 10-14) (figura 6).

20 C-I-VI- Correlación inmunitaria y protección contra prueba de provocación de SIVmac239 después de la administración de la composición realizada a partir de virus inactivado con AT2 más BCG vivos:

25 No se detectaron anticuerpos sistémicos dirigidos contra VIS en la sangre de los animales tratados. Sin embargo, alguna respuesta humoral sistémica específica se ha detectado cuando se ha empleado una administración de composición de refuerzo intradérmica. Consecuentemente, la protección observada contra infección VIS para los animales tratados, no resulta de una respuesta humoral sistémica.

30 Además, no fueron detectables linfocitos T citotóxicos que producen gamma interferón específico de VIS convencionales por ELISpot (datos no representados). Para el propósito de evaluar si existe una respuesta celular no convencional específica de VIS, se tomaron muestras de sangre de cada animal tratado o de control, y células CD4+ y CD8+ se purificaron de cada muestra de acuerdo con procedimientos convencionales. Las células CD4+ previamente obtenidas se cultivaron y después infectaron con SIVmac239 de acuerdo con los procedimientos convencionales. Las células CD4+ infectadas con VIS después se cultivaron en la presencia o en la ausencia de las células CD8+ autólogas previamente obtenidas por 5 días. La concentración de VIS en sobrenadante se ensayó mediante PCR real cuantitativo.

35 La figura 7 muestra las veces de supresión de replicación viral en CD4+ infectados con VIS que se obtienen la presencia o en la ausencia de células CD8+ autólogas que se obtienen en el curso de los experimentos presentados en la figura 2. Los CD8 probados se obtuvieron de animales que recibieron, por ruta intravaginal, la composición de virus inactivado con AT2 más BCG (Composiciones_7-13) o de animales de control (controles 6-10).

40 Los resultados muestran que las células T CD8 de animales protegidos contra infección de virus (composición_7, composición_8, composición_10 y composición_11) proporcionan un nivel de supresión viral en células CD4 infectadas con VIS superior a 20 veces, mientras que las células T CD8 de animales no protegidos contra infección de virus (composición_9, composición_12 y composición_13) proporcionan un nivel de supresión viral inferior o igual a 10 veces (figura 7). Aún más, una supresión viral mayor a 20 veces también se ha observado en los 4 animales protegidos contra pruebas de provocación virales intravenosas presentadas en la figura 1 (datos no representados).

45 La figura 8 muestra los niveles de supresión viral en CD4+ infectadas con VIS que se obtiene en la presencia o en la ausencia de células CD8+ autólogas que se obtienen en el curso de los experimentos presentados en la figura 6. Las CD8 probadas se obtuvieron de 4 animales que recibieron la composición (composiciones_22-25) por administración oral de virus inactivados con AT2 más BCG o de 4 animales de control (controles 21-24).

50 La figura 9 muestra los niveles de activación de célula T (KI-67+) en la población de células CD4 infectada con VIS (P27+) que se obtiene en la presencia o en la ausencia de células CD8+ autólogas que se obtienen en el curso de los experimentos presentados en la figura 6. Las CD8 probadas se obtuvieron de los 4 animales que recibieron la composición (composiciones_22-25) por administración oral de virus inactivado con AT2 más BCG o de los 4 animales de control (controles 21-24). Una supresión específica de VIS de activación de células T CD4+ por células T CD8+ autólogas se observa en los 4 animales que recibieron la composición.

55 Los resultados confirman que la prevención de infección VIS sistémica o mucosa que se obtiene por administración intravaginal u oral de inactivación AT2 más BCG induce un estado de inmunotolerancia caracterizado por respuesta a células T CD8+ no citotóxicas asociadas con una anergia de células CD4 infectadas con VIS. A partir de estos resultados, BCG puede de esta manera identificarse como un adyuvante tolerogénico.

60 Tomados en conjunto, estos hallazgos han demostrado que un estado estable de inmunotolerancia de antígenos VIS es por primera vez logrado por administración intravaginal u oral (o intragástrica) de una composición realizada a

partir de virus VIS inactivados más BCG vivos. Al mismo tiempo, se mostró por primera vez que una administración intravaginal u oral de una composición farmacéutica que comprende virus VIS inactivados de AT2 más BCG vivos de acuerdo con la invención es efectiva (>50%) para evitar infección viral crónica después de prueba intrarrectal o intravenosa.

5

C-II-Uso de *Lactobacillus plantarum* como un vehículo tolerogénico

C-II-I-Inducción de inmunotolerancia específica de VIS por coadministración oral de VIS doble inactivado y *Lactobacillus plantarum* (iSIV/LP)

10

Por una parte, anticuerpos específicos de VIS (IgG, IgM, y IgA) no se detectaron en animales tratados con iSIV/LP oral (figura 10a). Por otra parte, no se observó proliferación de células T CD4+ de sangre periférica específicas de VIS P27 significativa en animales tratados con iSIV/LP mientras que animales tratados con iSIV muestran una significativa proliferación de células T CD4+ de sangre periférica específica de P27.

15

C-II-II- Antiactivación y actividades antivirales de células CD8+ no citotóxicas.

Proliferación de células T CD8+ de sangre periférica específica de VIS P27 se observa tanto en animales tratados con iSIV como tratados con iSIV/LP (figura 10b). Sin embargo, no se detectaron células T que secreten interferón-gamma (ante estímulo *in vitro*) en animales tratados con iSIV/LP y el agotamiento de cualquiera de las células CD8+ o CD25+ no altera la incapacidad de respuesta de células T efectoras específicas de P27 (figura 10c). Aún más, una fuerte supresión de activación (Ki-67+) de células T CD4+ infectadas (P27+) por células T CD8+ no citotóxicas también se observó en PBMC infectadas *in vitro* agudamente que se toman de animales tratados con iSIV/LP y el agotamiento de células CD25+ no altera la supresión potente operada por células T CD25-CD8+ en la activación de células T CD4+ infectadas (figura 10d).

20

Debe apreciarse que no se detecta lisis celular por un ensayo de citotoxicidad altamente sensible (Marchetti et al., 1996) después de coincubación de CD8+ T células y células T CD4+ pulsadas con SIVmac239 no replicantes en la presencia o la ausencia de SEB y anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 (figura 10e).

30

Finalmente, las células T CD8+ de sangre periférica tomadas de animales tratados desde ≥ 2 meses por iSIV/LP mostraron una fuerte actividad inhibitoria contra replicación viral en células T CD4+ autólogas infectadas *in vitro* agudamente (figura 11a). Además, esta fuerte actividad antiviral de células T CD8+ también se observó igualmente en células T CD4+ heterólogas infectadas *in vitro* en forma aguda (figura 11b), sugiriendo que no está involucrado un mecanismo restringido HLA1 clásico en la actividad supresora/inhedorias de células T CD8+.

35

Las células T CD8+ de sangre periférica purificada tomadas de macacos inmunizados con LP/iSIV > 2 meses antes tuvieron fuerte actividad antiviral en células T CD4+ infectadas con SIVmac239 agudamente de manera autóloga estimuladas durante la noche con SEB y un anticuerpo anti-CD3/anti-CD28 y después cocultivadas durante 5 días. Una vez que la activación de células T CD4+ específica de VIS se establece (48 horas posteriores a estímulo), agregar células T CD8+ no puede más inhibir la replicación viral (figura 11c). Esta observación argumenta contra la lisis potencial de células T CD4+ objetivo (infectadas de manera productiva) por células T CD8+, en cultivo prolongado, como se sugiere por un estudio previo en diabetes tipo 1 autoinmunitaria humana (Jiang et al., 2010). Esta actividad antiviral mediada por células T CD8+ requiere contacto célula-a-célula (figura 11d) y también fue clásico MHC1a sin restricción como se muestra por la inhibición fuerte de replicación viral operada por células T CD8+ en células T CD4+ infectadas en forma aguda de otros animales inmunizados o de animales de control (figura 11e). Finalmente, la actividad antiviral mediada por CD8 se bloqueó por un anticuerpo anti-MHC-Ib/E pero no por el anticuerpo anti-MHC-Ia/ABC, indicando una actividad de células T CD8+ restringida por MHC-Ib/E no clásica (figura 11f).

50

Se establece que la expresión TCR células T CD8+ es necesaria para reconocer complejos MHC-Ib/E-péptido transportadas por células T CD4+ objetivo (Sarantopoulos et al., 2004; Van Kaer, 2010). Utilizando un agotamiento *in vitro* por las microperlas magnéticas conjugadas con anticuerpos TCR $\gamma\delta$ y V β 8 se mostró que no están involucrados en supresión de células T CD8+ de replicación viral (figura 11g). TCR $\alpha\beta$ de esta manera parece jugar un papel central en el reconocimiento de penetración de MHC-Ib/E-péptido en células T CD4+ infectadas. Aún más, al agotar células T CD8+ con la reacción cruzada de anticuerpos antihumanos disponible con antígenos de membrana CD (por "Diferenciación de Enjambre") de primates no humanos (CD7, CD11a, CD16, CD25 (IL-2RA), CD27, CD28, CD39, CD62L, CD95, CD101, CD122 (IL-2RB), CD127 (IL-7R), CD 129 (IL-9R), CD137, CD150, CD183 (CXCR3), CD184 (CXCR4), CD195 (CCR5), CD196 (CCR6), CD197 (CCR7), CD215 (IL-15Ra), CD218 (IL-18Ra), CD223 (LAG3), CD226, CD247, CD272, CD277, CD279 (PD-1), CD305 (LAIR1) y CD357), no pudieron identificarse antígenos CD asociado con células T CD8+ restringidas por MHC-Ib/E (Tabla 1). La tabla 1 a continuación muestra la actividad antiviral (veces de supresión, promedio geométrico \pm SE) de células T CD8+ que se toman de 8 animales inmunizados iSIV/LP antes y después de agotamiento de subconjuntos definidos por CD antígeno* en el primer estudio de inmunización (inmunización No. 1).

60

65

Tabla 1

Valor de antígenos de CD	Células T CD8+ sin agotar	Células T CD8+ agotadas	P
CD7	1387 ± 301	964 ± 326	0.313
CD11a		941 ± 377	0.568
CD16	529 ± 152	533 ± 99	0.772
CD25		691 ± 258	0.490
CD27	704 ± 242	761 ± 122	0.867
CD28		1021 ± 177	0.407
CD39	970 ± 361	1256 ± 354	0.710
CD62L		1013 ± 302	0.832
CD95	813 ± 238	775 ± 239	0.954
CD101		980 ± 197	0.613
CD122	997 ± 411	784 ± 265	0.412
CD127		715 ± 339	0.545
CD129	872 ± 325	855 ± 252	0.813
CD137		868 ± 306	0.852
CD150	889 ± 223	924 ± 231	0.959
CD183		633 ± 198	0.354
CD184	1452 ± 253	1265 ± 447	0.841
CD195		1083 ± 295	0.374
CD196	789 ± 245	652 ± 280	0.882
CD197		878 ± 247	0.789
CD215	1221 ± 213	1214 ± 445	0.621
CD218		739 ± 371	0.477
CD223	623 ± 293	1208 ± 248	0.197
CD226		1234 ± 192	0.237
CD247	914 ± 288	940 ± 279	0.991
CD272		1056 ± 231	0.846
CD277	1247 ± 216	957 ± 282	0.523
CD279		1197 ± 151	0.616
CD305	798 ± 245	1157 ± 241	0.233
CD357		820 ± 127	0.807

- 5 * En cada lote experimental, actividad antiviral (supresión de plegamiento, media geométrica ± SE) de células T CD8+ tomada de 8 animales inmunizados con iSIV/LP agotados (o no) con 2 anticuerpos de antígeno anti-CD se realiza.

C-II-III Protección de animales de pruebas de provocación intrarrectales por inmunotolerancia oral.

- 10 Tres meses después de administración de iSIV/LP o preparaciones de control, los 8 animales inmunizados con iSIV/LP y los 7 animales de control fueron sometidos a prueba de provocación intrarrectalmente con una sola dosis alta (100.000 TCID₅₀) de SIVmac239. Ocho de los 8 animales tratados con iSIV/LP fueron protegidos por prueba de provocación intrarrectal de SIVmac239 patógenos mientras que los 4 animales tratados con iSIV y los 4 tratados con LP infectaron por la misma prueba de provocación intrarrectal (figura 12a y b, parte izquierda de las figuras).

- 15 C-II-IV Protección de animales de prueba de provocación intravenosa por inmunotolerancia oral
- 20 Dos meses después de esta primera prueba de provocación, 4 de los 8 monos recibieron una segunda prueba de provocación por la ruta intravenosa (200 TCID₅₀). Todos ellos mostraron un ligero pico de replicación (≤ 200 copias de VIS ADN/millón de copias de PBMC y 200 copias de VIS ARN/ml de plasma) el día 10 posterior a la prueba; sin embargo el día 30, PBMC VIS ADN ha disminuido a ≤ 10 copias/millón de células y VIS ARN plasma fue indetectable (≤ 10 copias/ml), indicando la carencia de replicación activa *in vivo* del virus (figura 12a y b, parte derecha de las figuras). En contraste, 2 animales sin tratamiento previo que recibieron la misma prueba de provocación intravenosa de SIVmac239 (200 TCID₅₀) se infectaron exitosamente. Los 4 monos restantes fueron
- 25 sometidos a prueba de provocación de nuevo intrarrectalmente (100.000 TCID₅₀) y todos ellos permanecieron totalmente protegidos (figura 12a y b, parte derecha de las figuras).

C-II-V Confirmación *in vivo* del papel de células T CD8+

- 30 Cinco meses después de esta segunda prueba de provocación, para confirmar *in vivo* el papel de células T CD8+, 3 inyecciones intravenosas de un anticuerpo anti-CD8 monoclonal quimérico ratón-humano (cMT-807, Centocor) se suministraron durante un periodo de una semana (días 300, 304 y 307 postinmunización) a los 8 monos ya

sometidos a prueba para agotar temporalmente sus células T CD8+ de sangre periférica y órganos linfoides (figura 13a y b). No se detecta surgimiento de ARN o ADN viral en los 4 macacos sometidos de nuevo a prueba de provocación por ruta intrarrectal, demostrando de nuevo su completa protección estéril; en contraste, una fuerte replicación viral acompañada por el agotamiento de células T CD8+ de órganos linfoides de los 4 animales sometidos a prueba de provocación intravenosamente como se muestra por sus cargas virales en plasma que alcanzan pico a 10^6 ARN copias/ml y sus PBMC y cargas provirales de nodos linfáticos que alcanzaron 10^4 ADN copias/ 10^6 células al día 15 (el punto más bajo del agotamiento de las células T CD8+); los días 60-90, cuando los 4 monos han recuperado las concentraciones de células T CD8+ de línea de referencia, VIS ARN y PBMC en plasma y nodos linfáticos de VIS ADN recuperaron también niveles de línea de referencia (figura 13c, d & e). Esto confirmó el papel único de células T CD8+ inducidas por iSIV/LP en el control de replicación viral *in vivo* en animales sometidos a prueba de provocación VIS intravenosamente en el que virus competente de replicación permaneció latente supuestamente en células T CD4+ de memoria nativa.

Ocho meses después de la segunda prueba de provocación, los 4 monos sometidos a prueba de provocación de nuevo intrarrectalmente así como los 4 sometidos a prueba de provocación de nuevo intravenosamente recibieron una tercera prueba de provocación, esta vez mediante la ruta intrarrectal con SIVB670 (100.000 TCID₅₀), una cepa VIS infecciosa distinta. Los 8 animales permanecieron totalmente protegidos durante los siguientes 12 meses como se muestra por sus niveles de SIVB670 DNA y RNA indetectables mientras que 2 animales sin tratamiento previo se infectaron exitosamente por la misma prueba de provocación SIVB670, demostrando que las células T CD8+ restringidas por MHC-Ib/E generaron LP/iSIVmac239 fueron de protección cruzada evitando la activación de células T CD4+ infectadas por otras cepas VIS (figuras 14a y b).

Para determinar la duración de eficacia para evitar enfermedades VIS en los animales tratados con iSIV/LP, una segunda inmunización con iSIV/LP se realizó en 8 nuevos macacos de origen chino y la actividad antiviral *in vitro* de sus células T CD8+ se verificó con el tiempo sin prueba de provocación VIS. Esta actividad antiviral *in vitro* se detectó a partir de 60 días posteriores a inmunización en comparación con los animales de control ya sea tratados con LP (n = 4) o iSIV (n = 4) solo.

Niveles de actividad *ex-vivo* anti-SIV se mantuvieron hasta el día 420 en 7 de los 8 monos mientras que la actividad antiviral de un mono disminuyó progresivamente desde el día 360 para alcanzar niveles de línea de referencia de los monos de control el día 420 (figura 15a). El día 420 posterior a inmunización, los 16 animales fueron sometidos a prueba de provocación intrarrectalmente con 100.000 TCID₅₀ de SIVmac239. Siete de los 8 animales inmunizados con iSIV/LP adquirieron una inmunidad estéril sin ningún surgimiento de VIS ARN y ADN en plasma y PBMC (figura 15b & c), así como linfocitos de mucosa rectal (en donde se miden del día 1 posterior a la prueba de provocación) y nodos linfáticos pélvicos (figura 16a a 16e) mientras que un mono inmunizado fue totalmente infectado. De manera importante, la evolución de la actividad antiviral *ex-vivo* de los 8 monos vacunados permitió pronosticar a partir del día 360 postinmunización (es decir, 60 días antes de su prueba de provocación) los 7 monos protegidos y el no protegido (figura 15a a c).

C-II-VI Conclusiones

Es divulgado en la presente memoria, en el modelo de macaco, que la administración de SIVmac239 (iSIV) inactivados y comensales *Lactobacillus plantarum* (LP) (como adyuvante tolerogénico) generó células T CD8+ restringidas en MHC-Ib/E que inducen la supresión de activación de células T CD4+ que presentan antígeno VIS y de esta manera la supresión de replicación VIS y la protección de macacos de pruebas de provocación con VIS.

Una mezcla realizada de iSIV y LP inactivados se administra en forma intragástrica a un total de 16 animales y 15 controles. Cuatro de 14 meses después, todos los animales se sometieron a prueba de provocación en forma intrarrectal con SIVmac239 patogénicos.

Una completa protección contra infección VIS se observa en 15 de 16 animales administrados con iSIV/LP; en contraste, la infección se estableció en todos los animales de control y un mono vacunado. El mono no protegido puede pronosticarse por un ensayo antiviral *ex vivo* 60 días antes de la prueba de provocación intrarrectal. Ocho animales protegidos permanecieron protegidos después de una segunda prueba de provocación con SIVmac239 suministrado intravenosamente en 4 monos e intrarrectalmente en los otros cuatro 4.

Los 8 animales a los que se suministra iSIV/LP tienen ausencia completa de proliferación de células T CD4+ de sangre periférica específica VIS y no desarrollaron ningunos anticuerpos específicos de VIS sistémicos (IgG, IgM, o IgA).

Además, sus células T CD8+ de sangre periférica específicas de VIS tuvieron varias particularidades:

- 1) proliferaron bien pero sin secreción de interferón- γ sobre el estímulo *in vitro*;
- 2) suprimieron fuertemente la activación de células T CD4+ autólogas agudamente infectadas;

- 3) ambas funciones permanecieron sin cambio después de agotamiento de células CD25+;
- 4) también inhibieron replicación de VIS en células T CD4 + alógenas agudamente infectadas; y
- 5) su acción supresora/inhibitoria fue restringida por MHC-Ib/E.

Estos resultados demuestran que coadministración intragástrica de iSIV y LP permite a los macacos desarrollar células T reguladoras CD8+ restringidas MHC-Ib/E no citotóxicos específicos de virus que generan una inmunotolerancia específica de VIS-y que muy sorprendentemente tal inmunotolerancia específica de virus está asociada con protección de vacuna de los animales contra el establecimiento de la infección por VIS.

Anteriormente se muestra que la composición farmacéutica según la presente invención previene las infecciones de VIH y VIS en seres humanos/mamíferos. Esta acción preventiva se obtiene en los macacos induciendo una inmunotolerancia "Ts" en los sujetos vacunados tolerogénicamente (es decir, los mamíferos después de haberles administrado la composición farmacéutica). Dicha inmunotolerancia "Ts" se demuestra en la presente memoria que involucra células T reguladoras CD8 supresoras restringidas por MHC-Ib/E no citotóxicas específicas de virus, la presencia y la actividad de la que se muestra para:

- inhibir la replicación de VIS en las células T CD4+ agudamente infectadas de macacos a los que se les ha administrado la composición farmacéutica de la presente invención (*in vitro*); y/o
- evitar la replicación VIS en macacos tolerogénicamente vacunados sometidos a prueba con VIS infecciosa (*in vivo*).

Referencias

- Morgan C, et al. Plos Medicine 2008, 5: 1200-1204
- Marcondes MC, et al. Viral Immunol 2006,19:679-689
- Stahl-Hennig C, et al. J Med Primatol 2007,36: 195-205
- Chen S, et al. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao 2008,30: 156-160
- Hu et al., JAMA 275:210-216, 1996
- Korber et al. , Science 280: 1868-1871 , 1998
- Papathanasopoulos MA, et al. Virus Genes 2003,26: 151-163
- RAVIV et al. J. Virol., vol.79(19), p: 12394-12400, 2005
- Chien, Novel Drug Delivery Systems, Ch. 4 (Marcel Dekker, 1992)
- Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6th Ed. (various editors, 1989-1998, Marcel Dekker)
- Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (ANSEL et al., 994, WILLIAMS & WILKINS)
- Ebadi, Pharmacology, Little, Brown and Co., Boston, Mass. (1985)
- WONG et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol.104(8), p:2591 -2595, 2007
- Fuller. J. Appl. Bacteriol. 66:365-378 (1989)
- I. Mederle, R. Le Grand, B. Vaslin et al., Vaccine 21 (27-30), 4153 (2003)
- W. Lu, X. Wu, Y. Lu et al., Nature medicine 9 (1), 27 (2003)
- A. S. Fauci, Nature 384 (6609), 529 (1996)
- Faria and Weiner, Immunol Rev 206, 232 (2005)
- Mestecky et al., J Immunol 179 (9), 5633 (2007)
- HOFT et al. (J Infect Dis., vol.198(10), p: 1491 -1501 , 2008)

- WANG *et al* (*Med Microbiol Immunol.* , 2008 May 20)
- 5 Rerks-Ngarm *et al.* *N. Engl. J. Med. Vaccination with AL VAC and AIDSVAX to prevent VIH-1 infection in Thailand*, 2009 Oct. 20 (epub)
- McElrath *et al.* *The Lancet*, Volume 372, Issue 9653, Pages 1894 - 1905, 29 November 2008
- Tsai *et al.*, *Laboratory animal science* 43 (5), 41 1 (1993)
- 10 Wei Li Lee *et al.* *Small*, (p 1003-101 1) Published Online: Mar 31 2010 12: 16PM DOI: 10.1002/sml.200901985
- Delie F. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;34:221-233
- 15 Mathiowitz *et al.* *Nature.* 1997;386:410-414
- Goldberg *et al.* *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2:289-295
- Fasano *et al.* *J Clin Invest.* 1997;99: 1 158-1164
- 20 Sandri *et al.* *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;65:68-77
- Chickering *et al.* *J Control Release.* 1997;48:35^6
- 25 Ponchel *et al.* *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;34: 191-219
- Plotkin *et al.* *Vaccines*, Saunders Elsevier Fifth edition, 2008, pages 215 & 216
- Korin and Zack, *Journal of virology* 73 (8), 6526 (1999)
- 30 Vatakis *et al.*, *Journal of virology* 83 (12), 6222 (2009a)
- Vatakis *et al.*, *Journal of virology* 83 (7), 3374 (2009b)
- 35 Andrieu and Lu, *Immunol Today* 16 (1) , 5 (1995)
- Sacha *et al.*, *J Immunol* 178 (5), 2746 (2007)
- Schmitz *et al.*, *The American journal of pathology* 154 (6), 1923 (1999)
- 40 Liew *et al.*, 2010. *Journal of Biotechnology* 150:224-231
- Plummer and Manchester, 2010. *Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design.* John Wiley & Sons, Inc. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology. DOI: 10.1002/wnan.1 19
- 45 Ke-Qin Xin *et al.* *Blood* 102 (1), 223-228 (1 July 2003)
- Jae-Sung Yu *et al.* *Clinical and Vaccine Immunology* 13(11), 1204-121 1 (Nov. 2006)
- 50 Scholzen and Gerdes. *J. Cell Physiol.* 182,31 1 -322 (March 2000)
- Muhl, *et al.* MHC class I alleles influence set-point viral load and survival time in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Immunol* 169, 3438-3446 (2002) Loffredo *et al.* Mamu-B*08-positive macaques control simian immunodeficiency virus replication. *Journal of virology* 81, 8827-8832 (2007)
- 55 Sarantopoulos *et al.* Qa-1 restriction of CD8+ suppressor T cells. *The Journal of clinical investigation* 114, 1218-1221 (2004)
- 60 Jiang *ei al.* HLA-E-restricted regulatory CD8(+) T cells are involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes. *The Journal of clinical investigation* 120, 3641 -3650 (2010)
- Van Kaer, L. Comeback kids: CD8(+) suppressor T cells are back in the game. *The Journal of clinical investigation* 120, 3432-3434 (2010)
- 65 Marchetti, P., *et al.* Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *The Journal of experimental medicine* 184, 1 155-1 160 (1996)

Karpenko *et al.* Comparative analysis using a mouse model of the immunogenicity of artificial VLP and attenuated Salmonella strain carrying a DNA-vaccine encoding VIH-1 polyepitope CTL-immunogen. *Vaccine* **22** (13-14):1692-1699 (2004)

5 Chege *et al.* A prime-boost immunisation regim using recombinant BCG and Pr55(gag) virus-like particle vaccines based on VIH type 1 subtype C successfully elicits Gag-specific responses in baboons. *Vaccine*. **30**;27(35):4857-4866 (2009)

10 Reynolds *et al.* Macaques vaccinated with live-attenuated SIV control replication of heterologous virus. *J. Exp Med.* **27**;205(11):2537-2550 (2008)

Listado de secuencias

15 <110> Biovaxim limited
 Universite Paris Descartes
 Institut De Recherche Pour Le Développement (IRD)

<120> Composiciones farmacéuticas para prevenir y/o tratar una enfermedad por VIH en seres humanos

20 <130> 360677D29660

<150> PCT CN2011/072481

<151> 2011-04-06

25 <150> US 61/534.088

<151> 2011-09-13

<150> PCT CN2012/070761

<151> 2012-01-30

30 <150> US 61/609.051

<151> 2012-03-09

<160> 3

35 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

40 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador de PCR de sentido directo

45 <400> 1

gaggaaaaga aatttgagc agaa 24

<210> 2

<211> 21

50 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

55 <223> cebador de PCR de sentido inverso

<400> 2

gcttgatggt ctccacaca a 21

60 <210> 3

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

65 <220>

<223> sonda

<220>

<221> misc_binding

<222> (1) .. (1)

5 <223> La sonda puede ser marcada en 5' con FAM

<220>

<221> misc_binding

<222> (35) .. (35)

10 <223> La sonda puede ser marcada en 3' con TAMRA

<400> 3

aaagttgcac cccctatgac attaatcaga tgta 35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica oral que comprende una mezcla de partículas de virus de VIH inactivadas y una bacteria no patógena seleccionada de entre el grupo que consiste en bacterias de ácido láctico no patógenas y BCG.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que dicho VIH es el VIH-1 o el VIH-2.
- 10 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha bacteria es una bacteria *Lactobacillus*.
- 15 4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, en la que dicha bacteria *Lactobacillus* se selecciona de entre el grupo que consiste en *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius*, y *Lactococcus lactis*, preferentemente *Lactobacillus plantarum*.
- 20 5. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que:
 - la cantidad de partículas de virus de VIH inactivadas en la composición farmacéutica es desde aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} por ml de dicha mezcla; y/o
 - la cantidad de dicha bacteria no patógena en la composición farmacéutica es desde aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{14} CFU por ml de dicha mezcla.
- 25 6. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la razón en dicha mezcla de dichas partículas para dicha bacteria es desde aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:1.000, preferentemente aproximadamente 1:100.
- 30 7. Composición farmacéutica como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su utilización como un medicamento, preferentemente como una vacuna.
- 35 8. Composición farmacéutica como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su utilización en un procedimiento para prevenir y/o tratar una enfermedad por VIH en un ser humano necesitado del mismo.
9. Composición farmacéutica para su utilización según la reivindicación 8, en la que dicha enfermedad por VIH es el SIDA o una seroconversión.
- 40 10. Composición farmacéutica como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su utilización en un procedimiento para proteger a un ser humano contra el VIH.
- 45 11. Composición farmacéutica como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su utilización en un procedimiento para proteger a un ser humano de una seroconversión de VIH.
12. Composición farmacéutica para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en la que dicha composición es administrada una o varias veces de manera consecutiva.
- 50 13. Composición farmacéutica para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en la que:
 - se administra una dosis de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{14} partículas de virus de VIH inactivadas por día a dicho ser humano; y/o
 - se administra una dosis de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{16} CFU de dicha bacteria no patógena por día a dicho ser humano.
- 55 14. Partículas de virus de VIH inactivadas como se han definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y bacteria no patógena como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su utilización como una composición farmacéutica combinada para la utilización simultánea, separada o secuencial en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad por VIH en un ser humano necesitado de la misma.
- 60 15. Kit farmacéutico para prevenir y/o tratar una enfermedad por VIH en un ser humano necesitado del mismo, que comprende:
 - en un primer recipiente, unas partículas de virus de VIH inactivadas; y
 - en un segundo recipiente, una bacteria de ácido láctico no patógena y/o BCG,
- 65 estando dichas partículas de virus de VIH inactivadas y dicha bacteria en unos portadores farmacéuticamente aceptables para la administración oral.

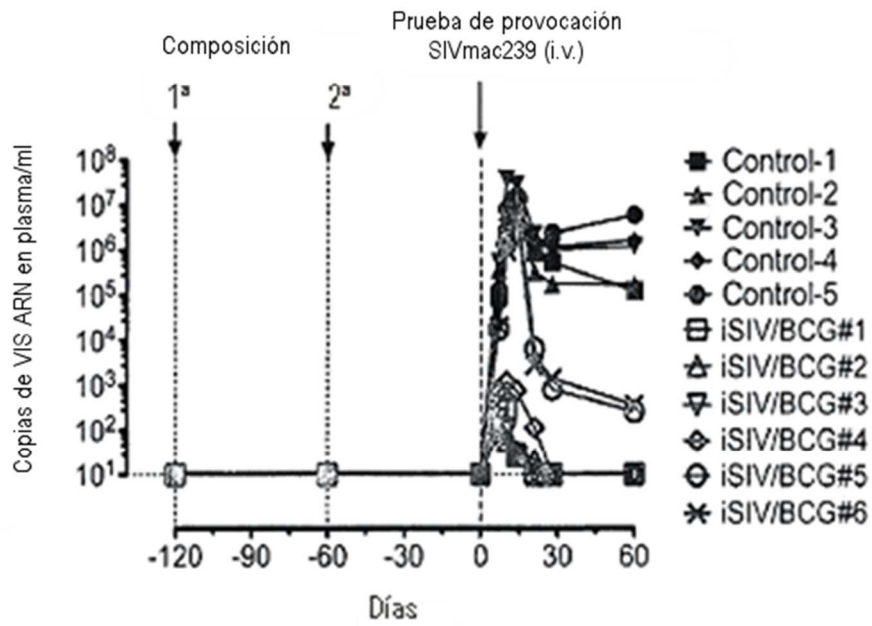


Figura 1

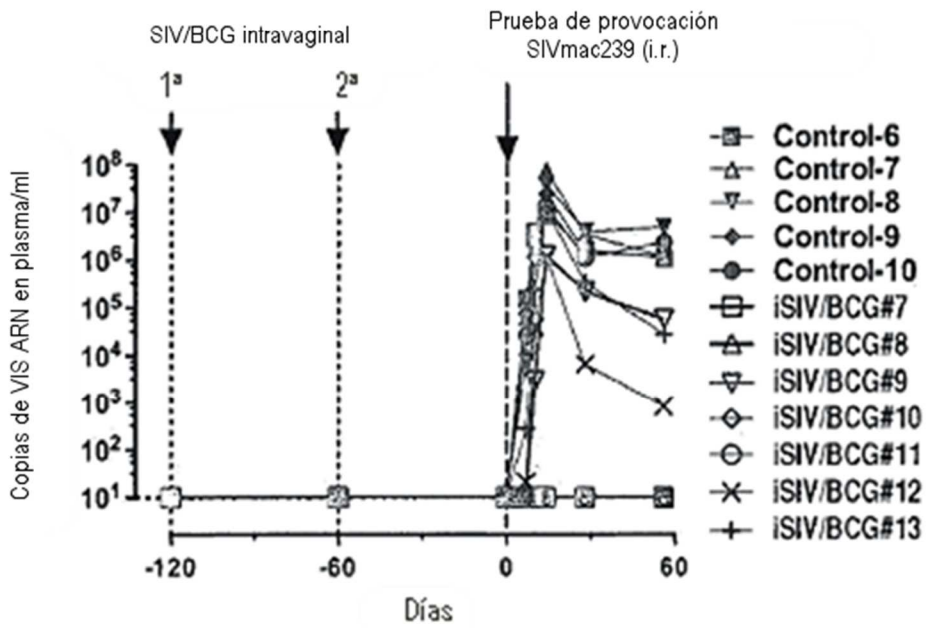


Figura 2

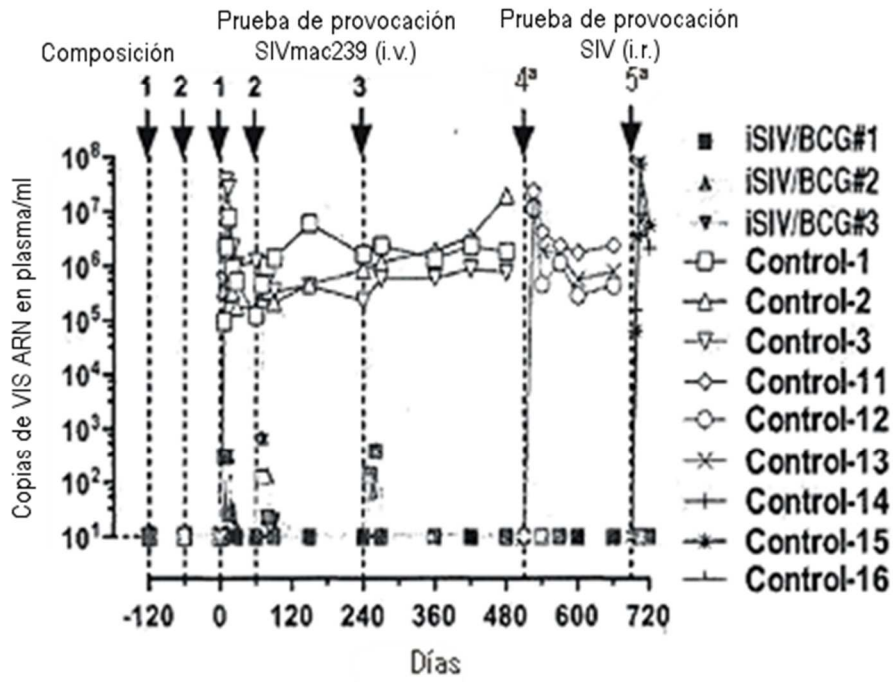


Figura 3

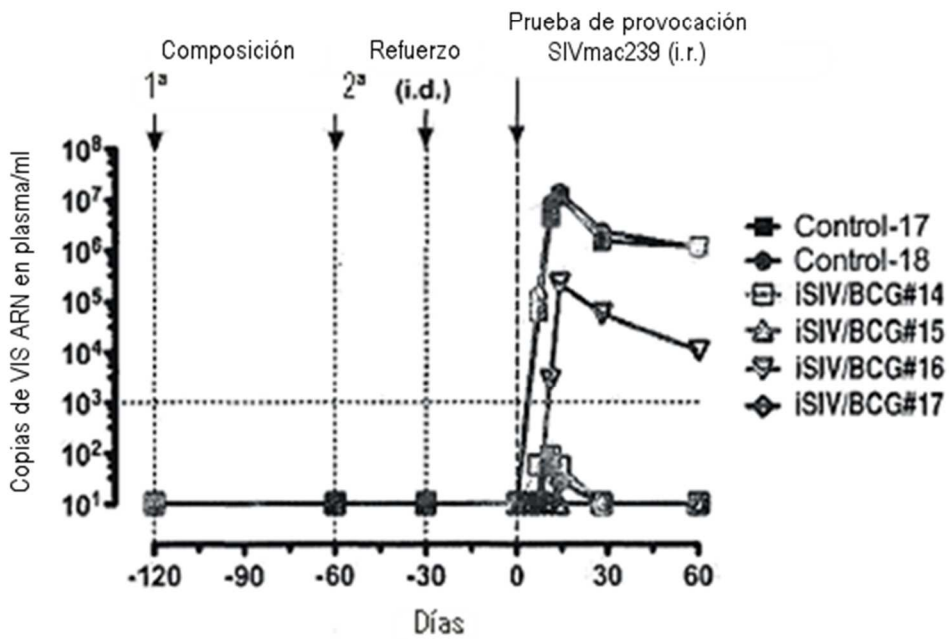


Figura 4

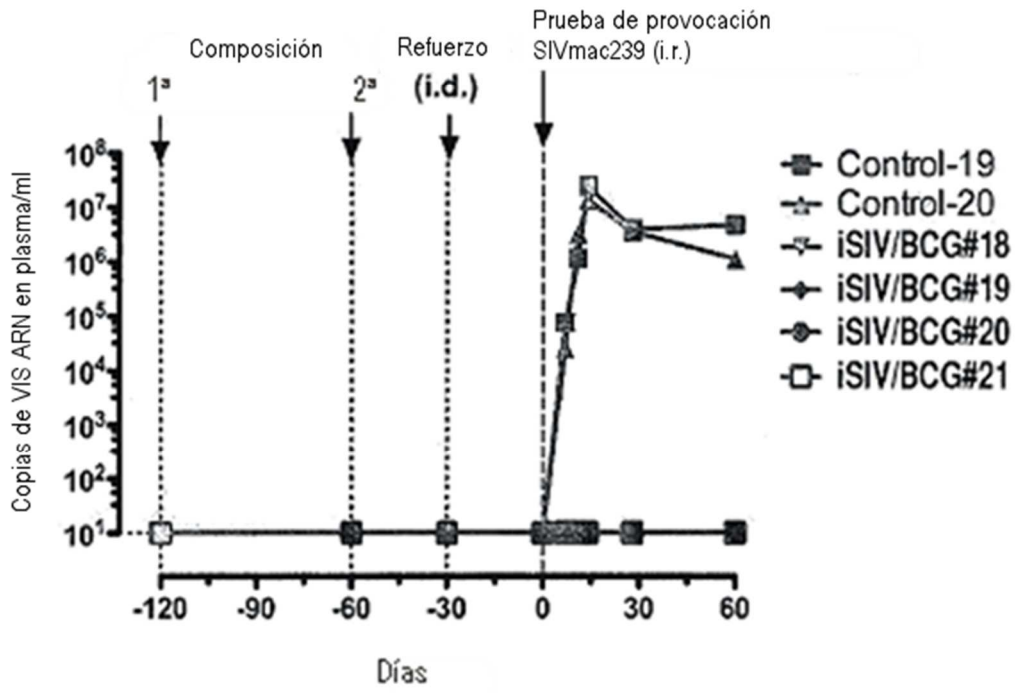


Figura 5

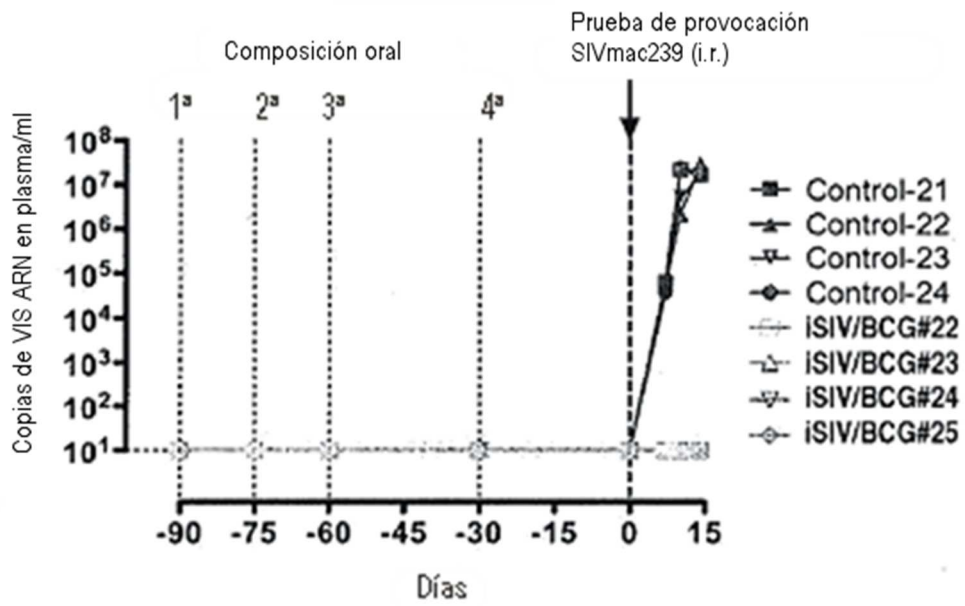


Figura 6

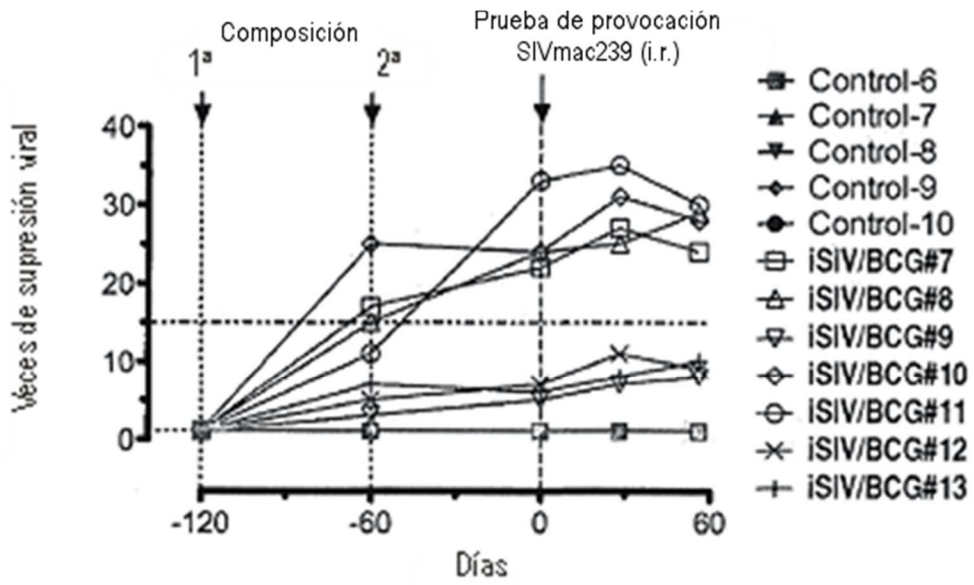


Figura 7

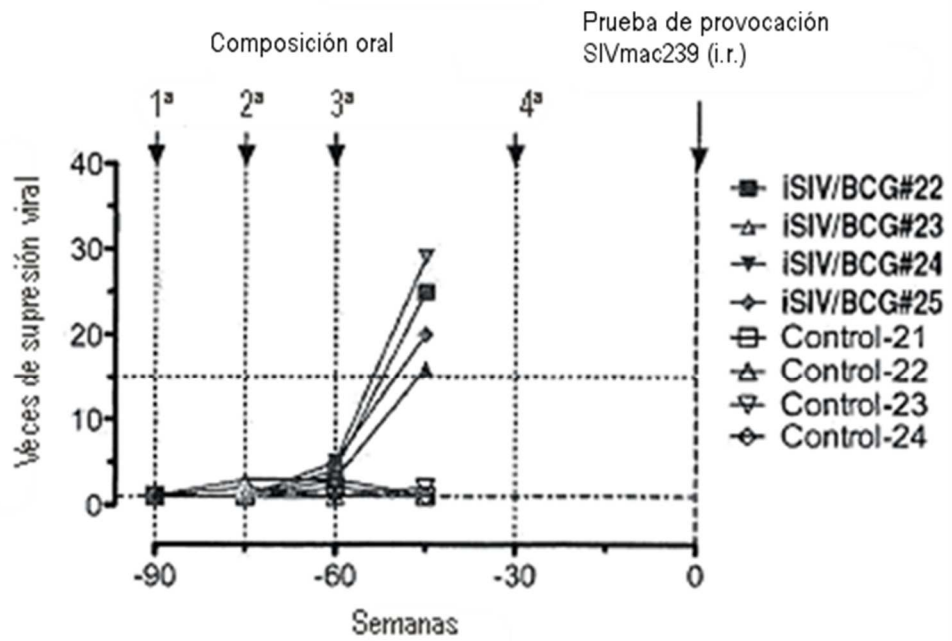


Figura 8

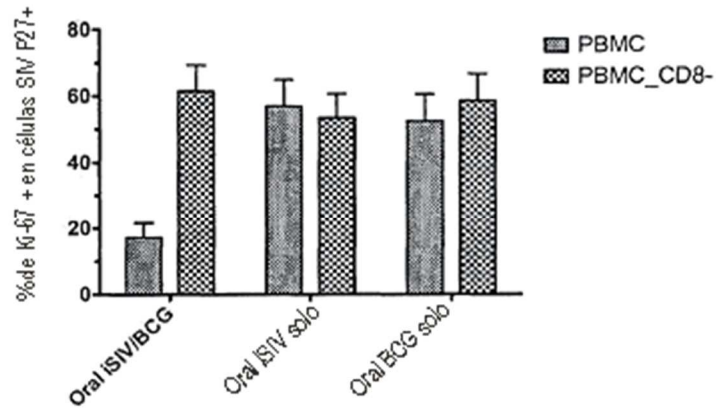


Figura 9

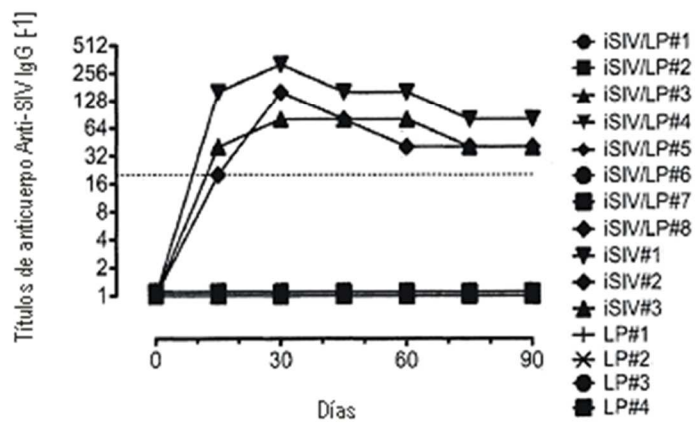


Figura 10a

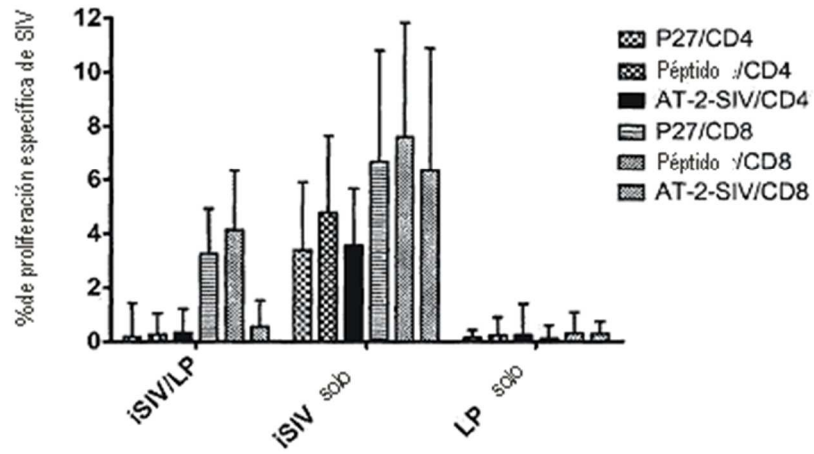


Figura 10b

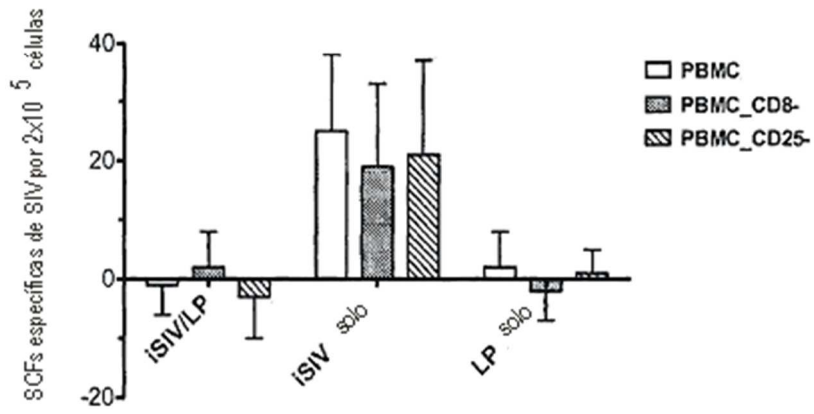


Figura 10c

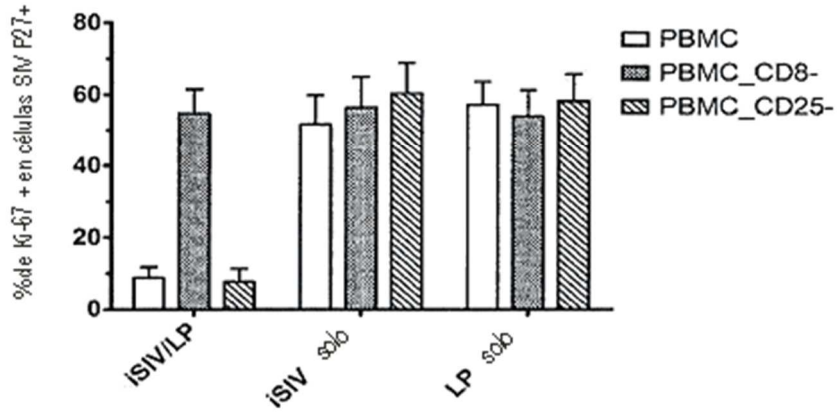


Figura 10d

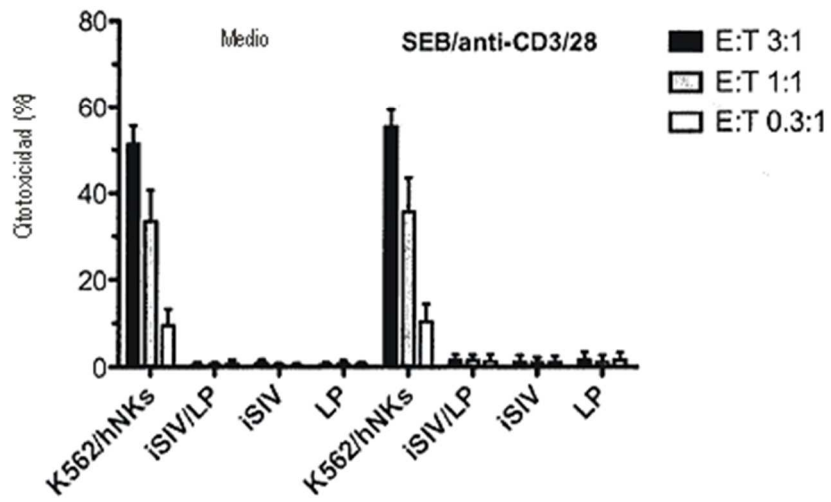


Figura 10e

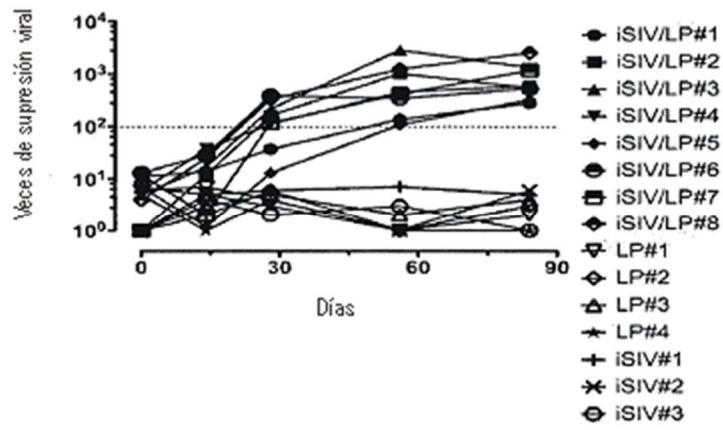


Figura 11a

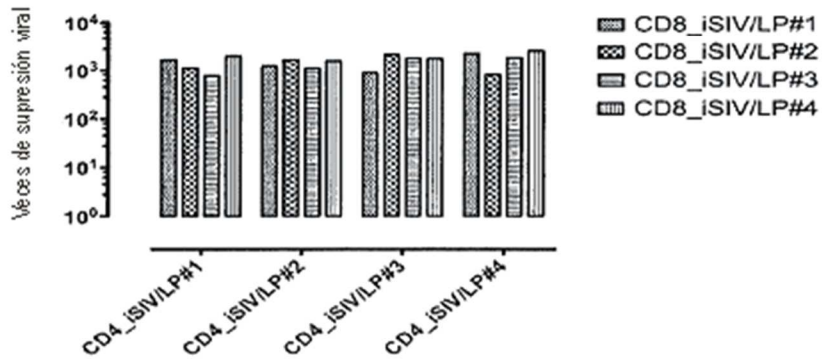


Figura 11b

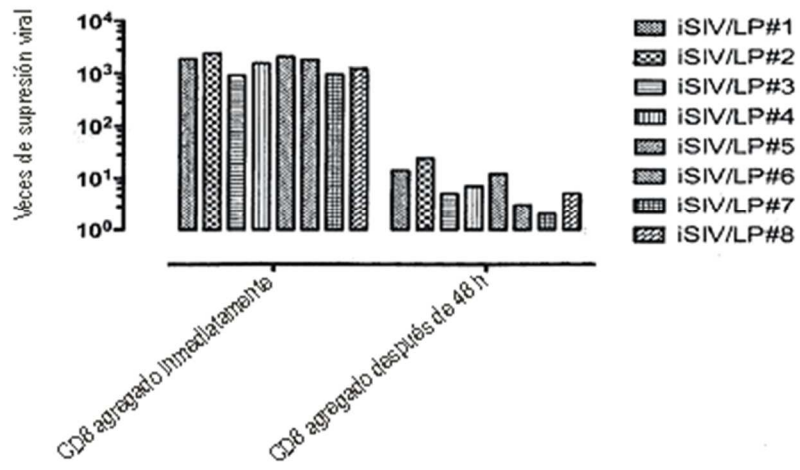


Figura 11c

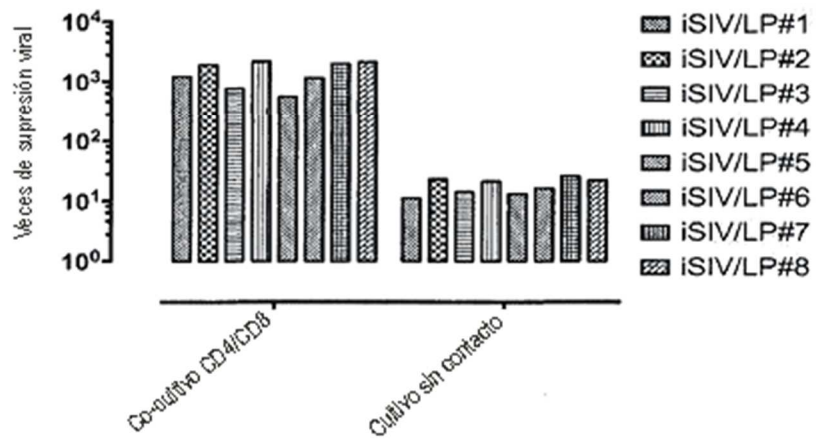


Figura 11d

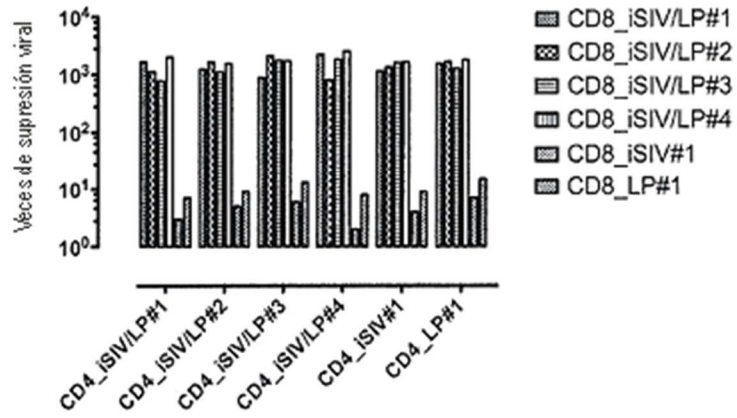


Figura 11e

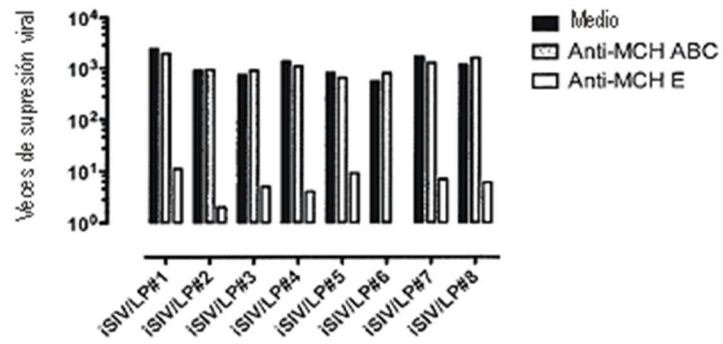


Figura 11f

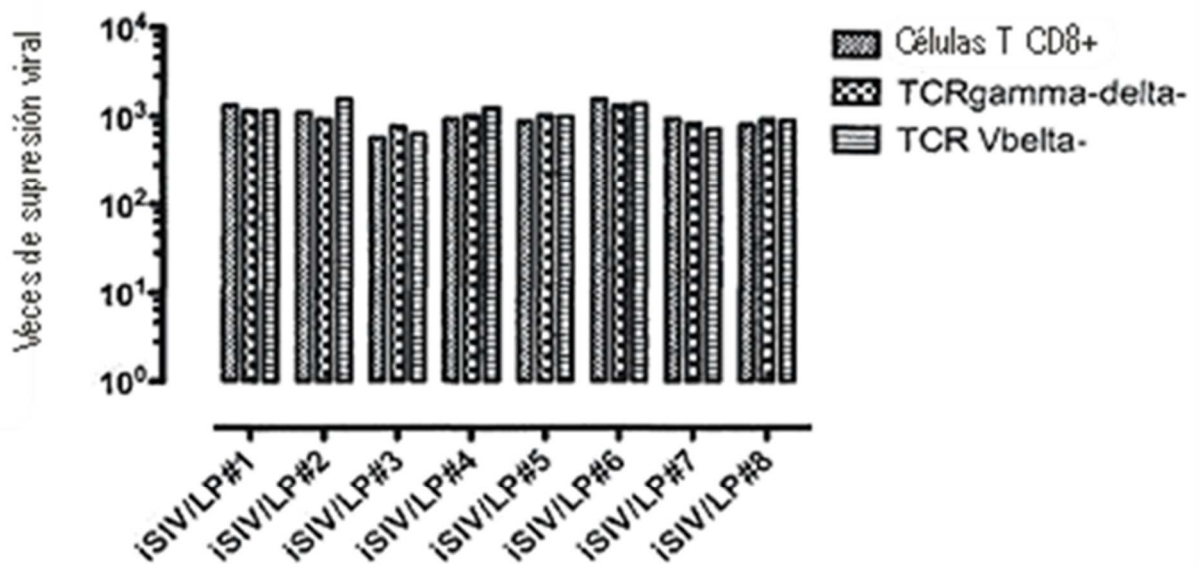


Figura 11g

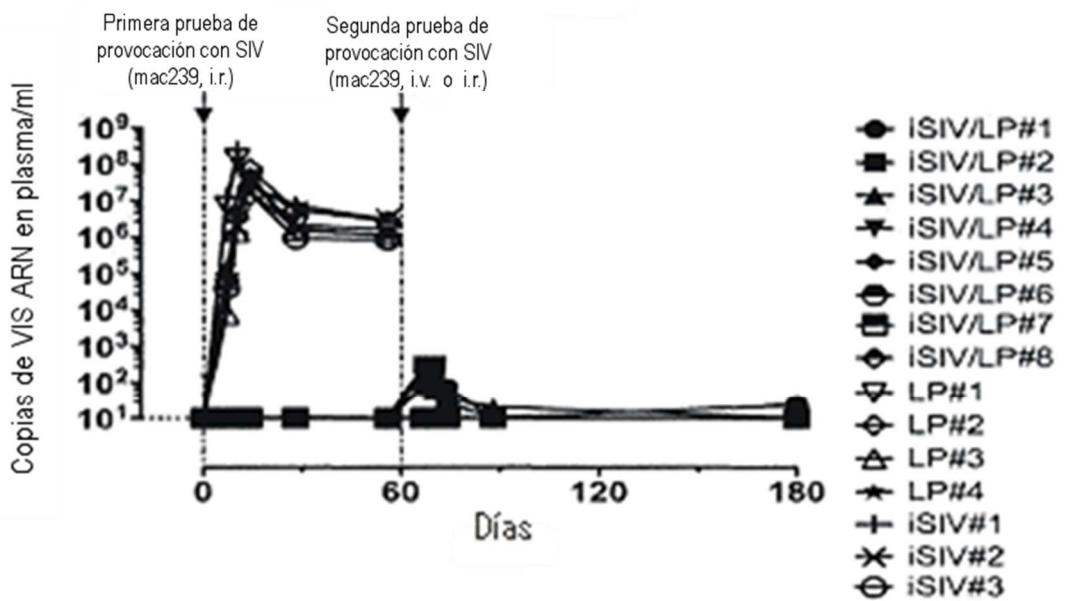


Figura 12a

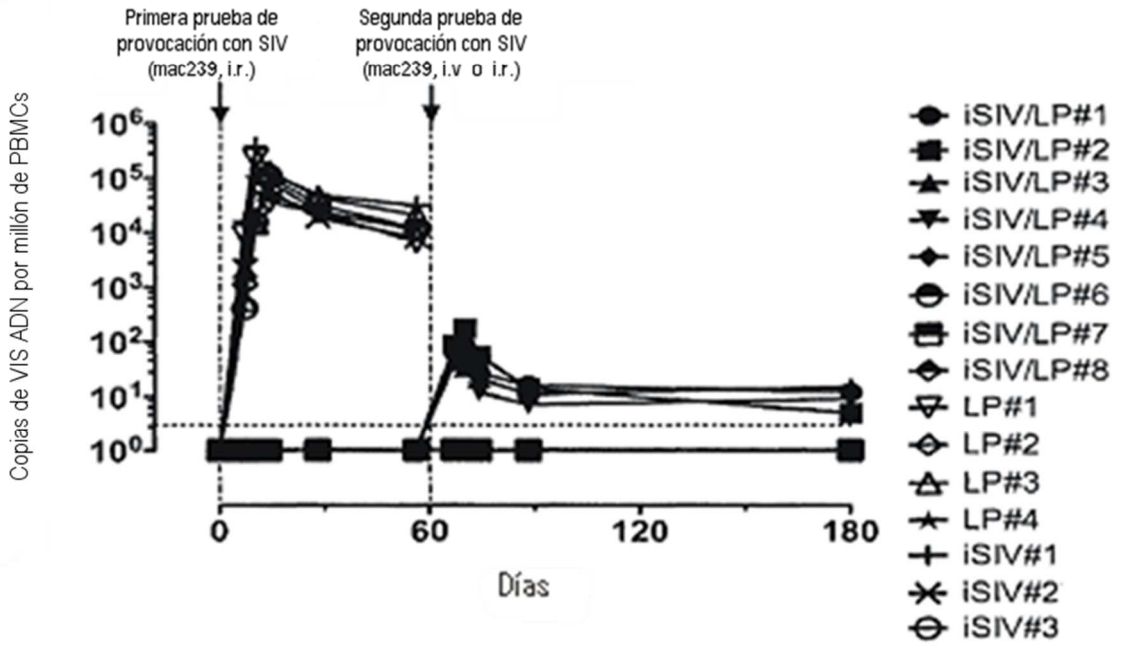


Figura 12b

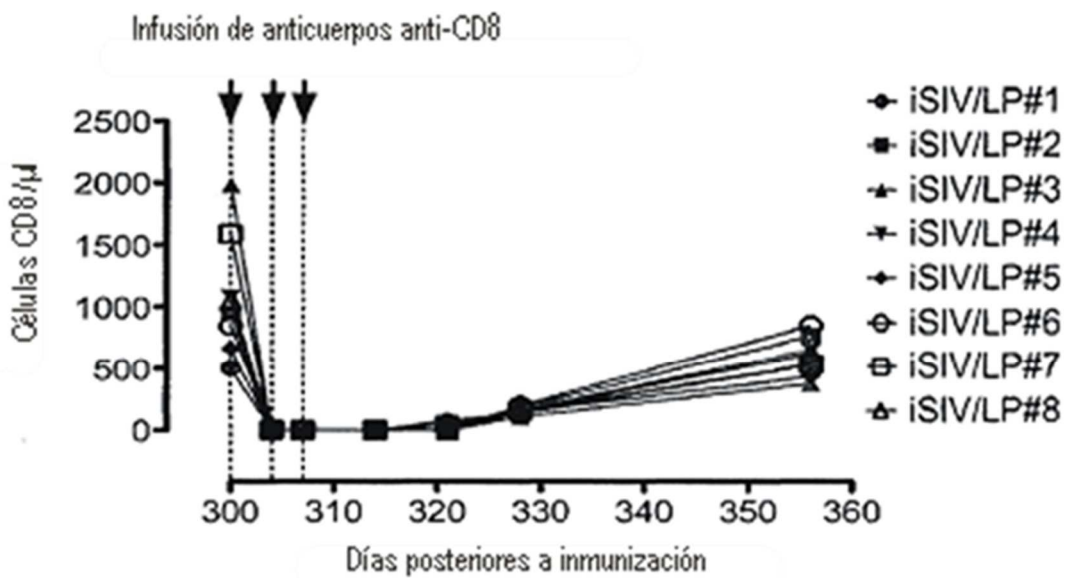


Figura 13a

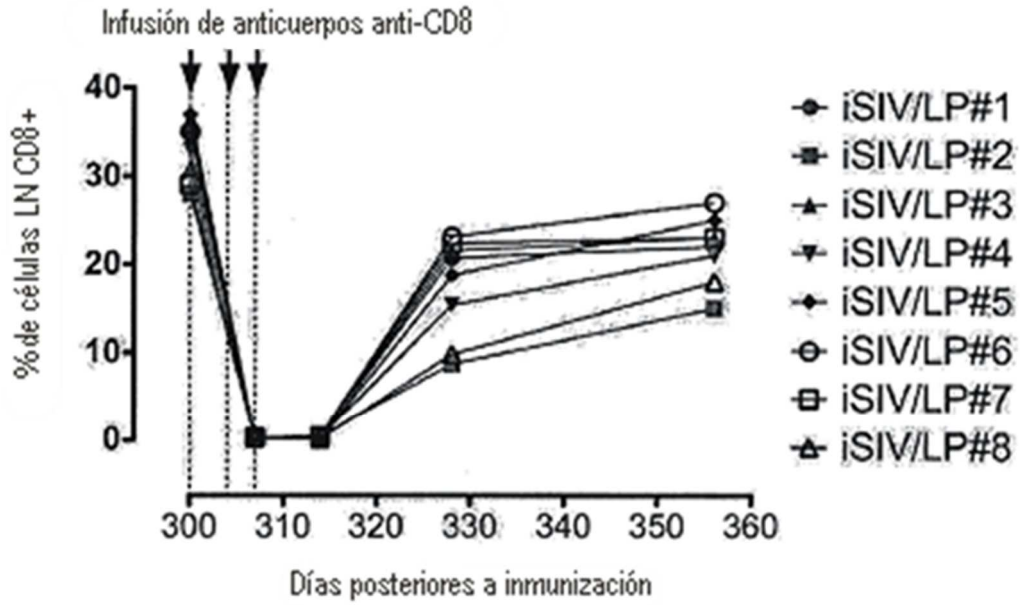


Figura 13b

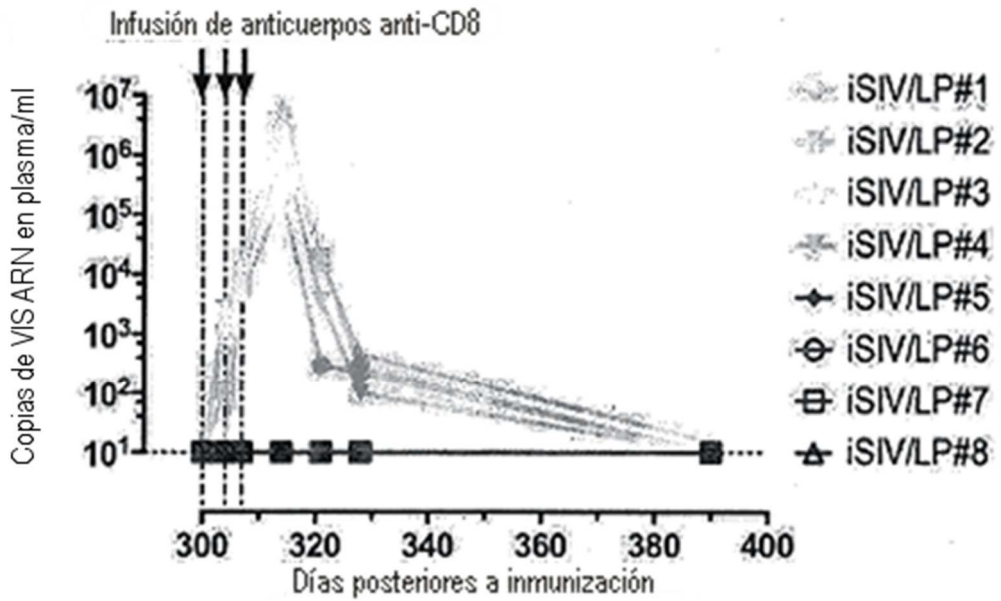


Figura 13c

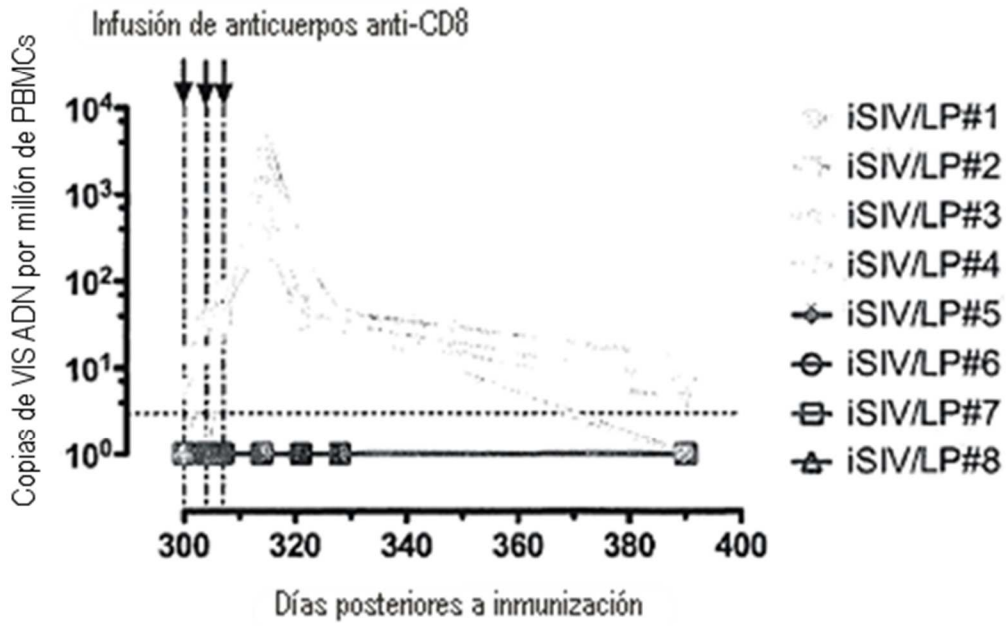


Figura 13d

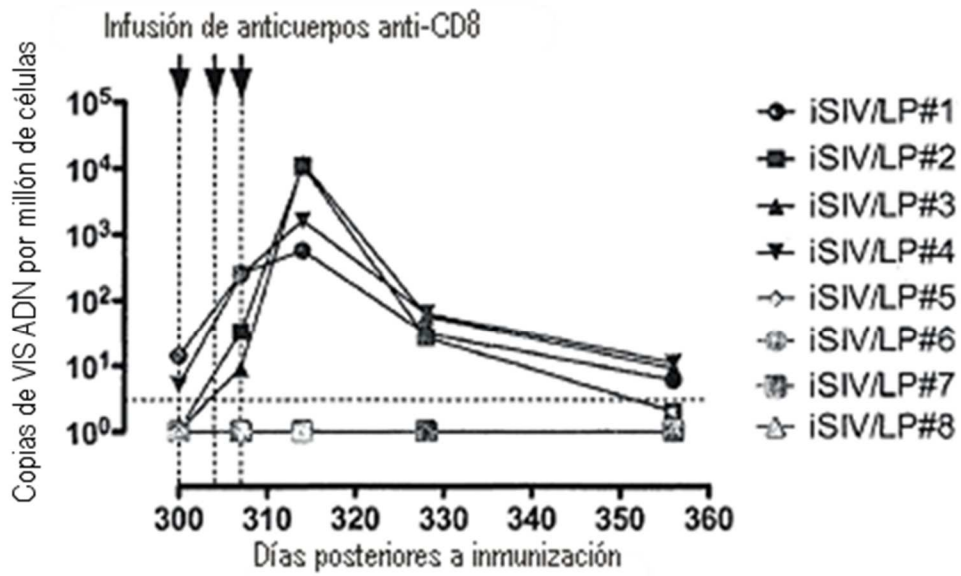


Figura 13e

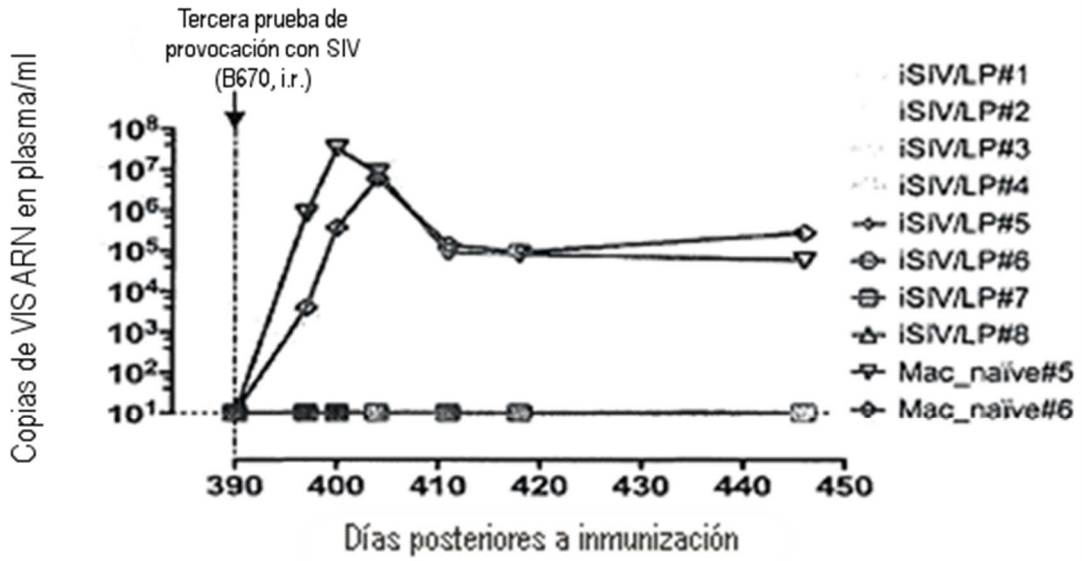


Figura 14a

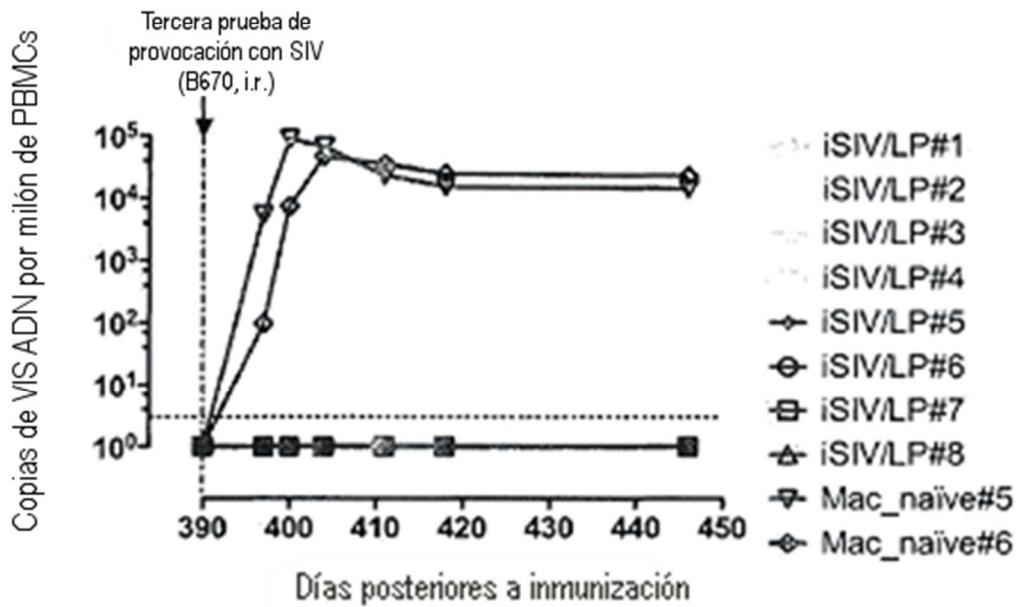


Figura 14b

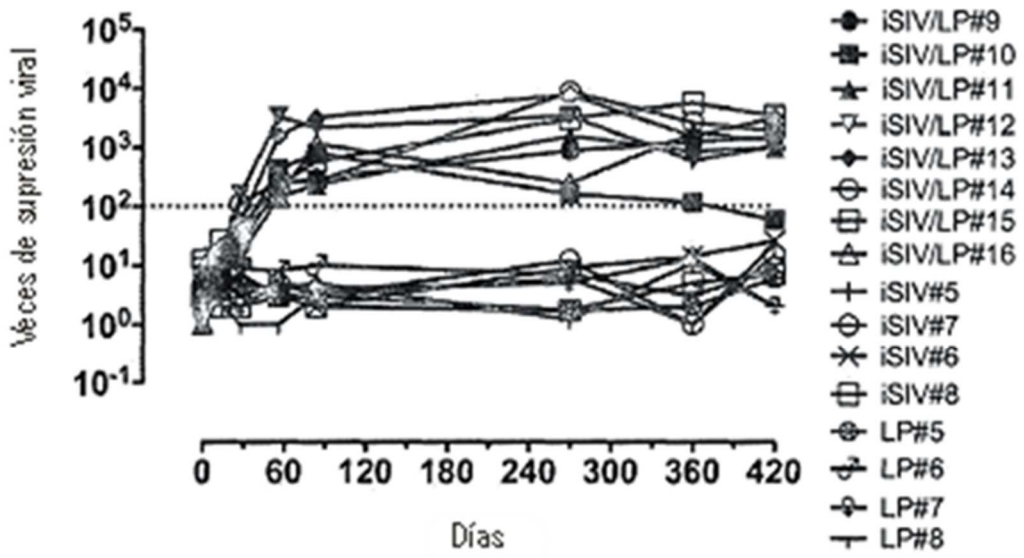


Figura 15a

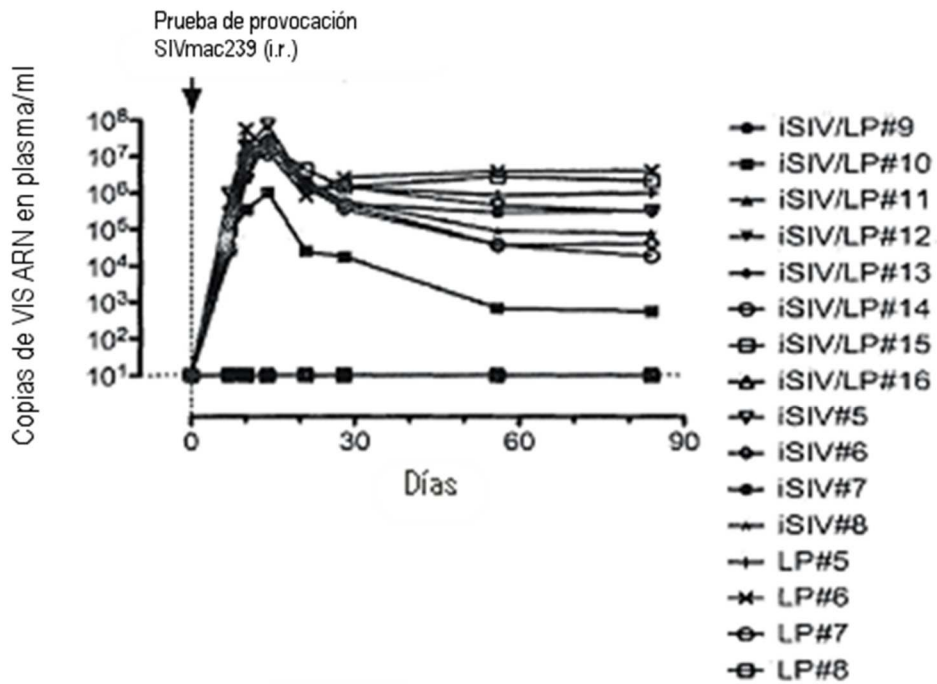


Figura 15b

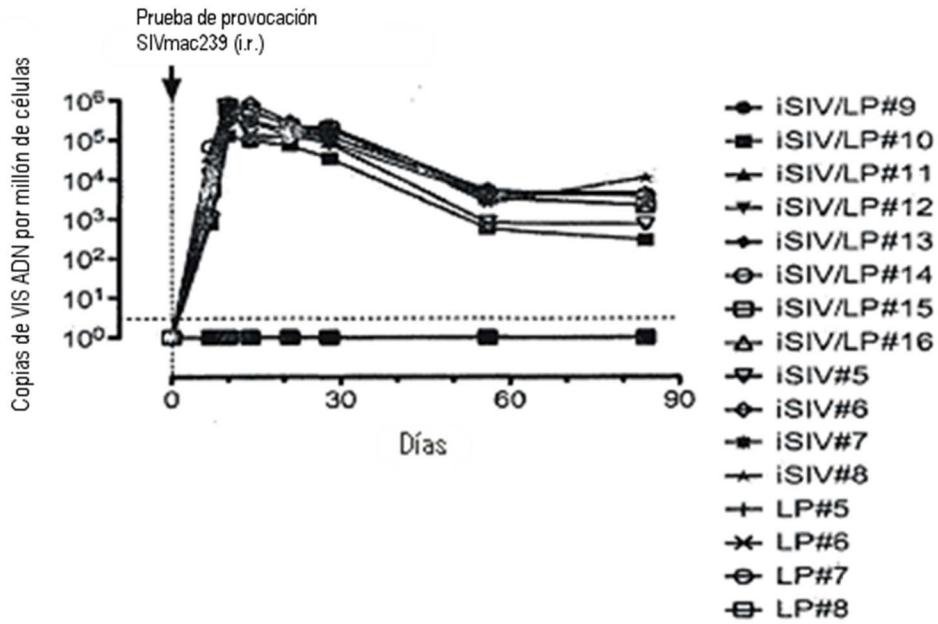


Figura 15c

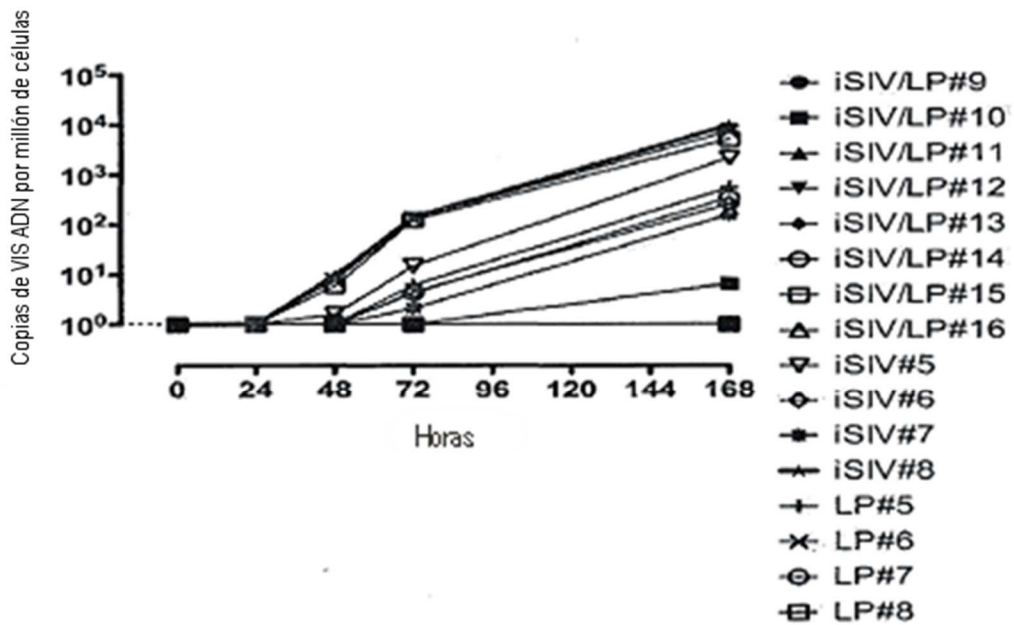


Figura 16a

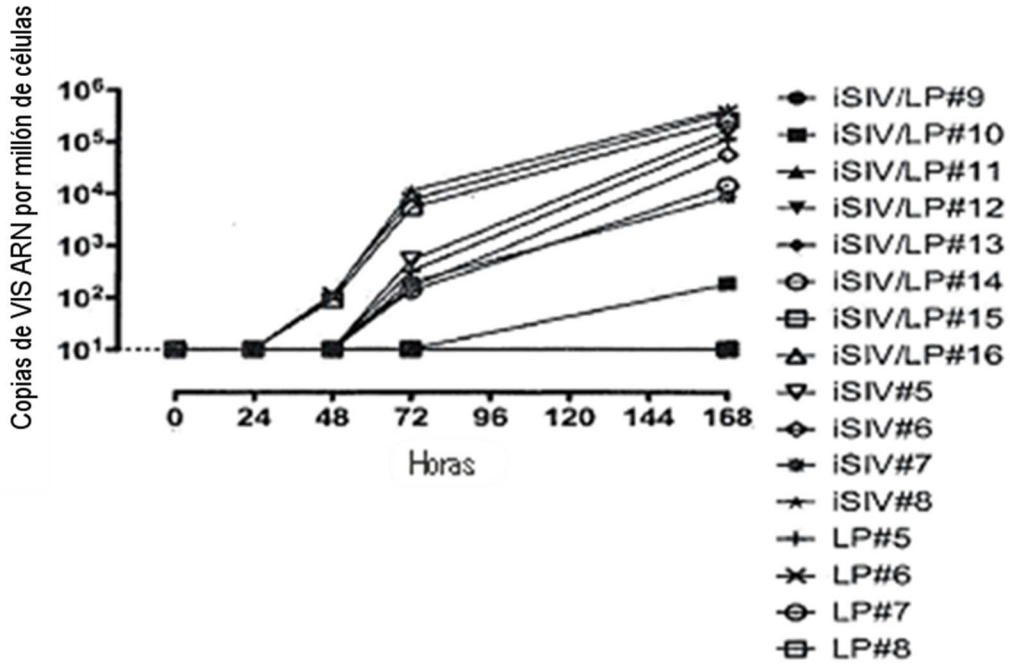


Figura 16b

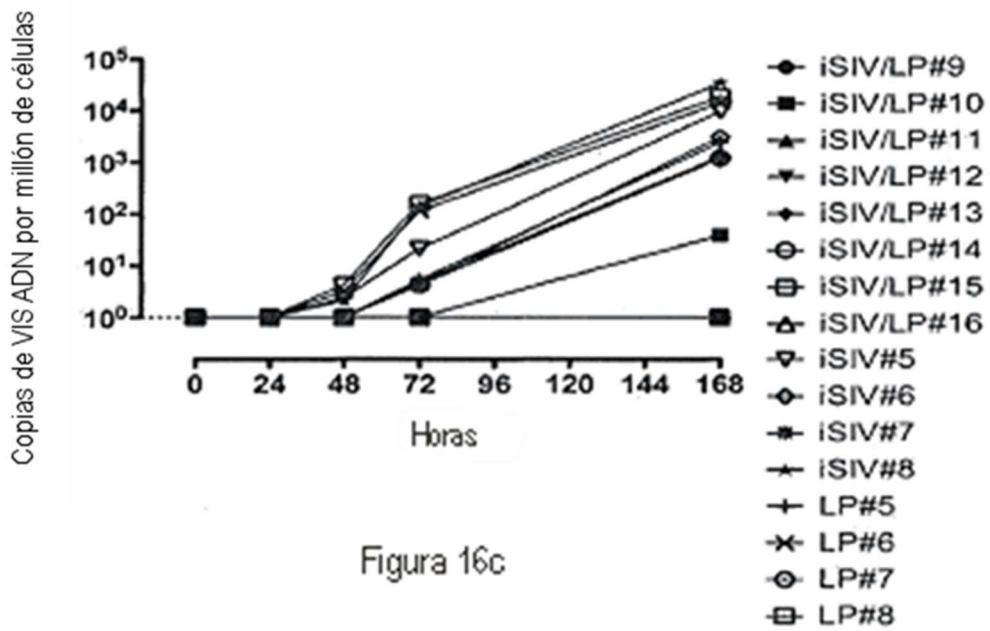


Figura 16c

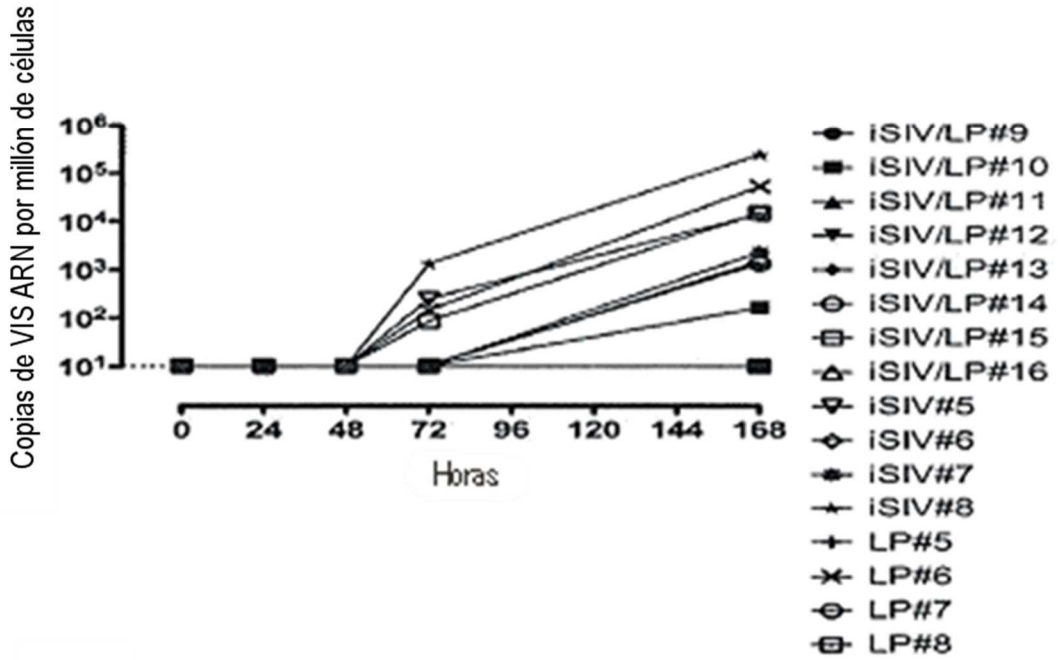


Figura 16d

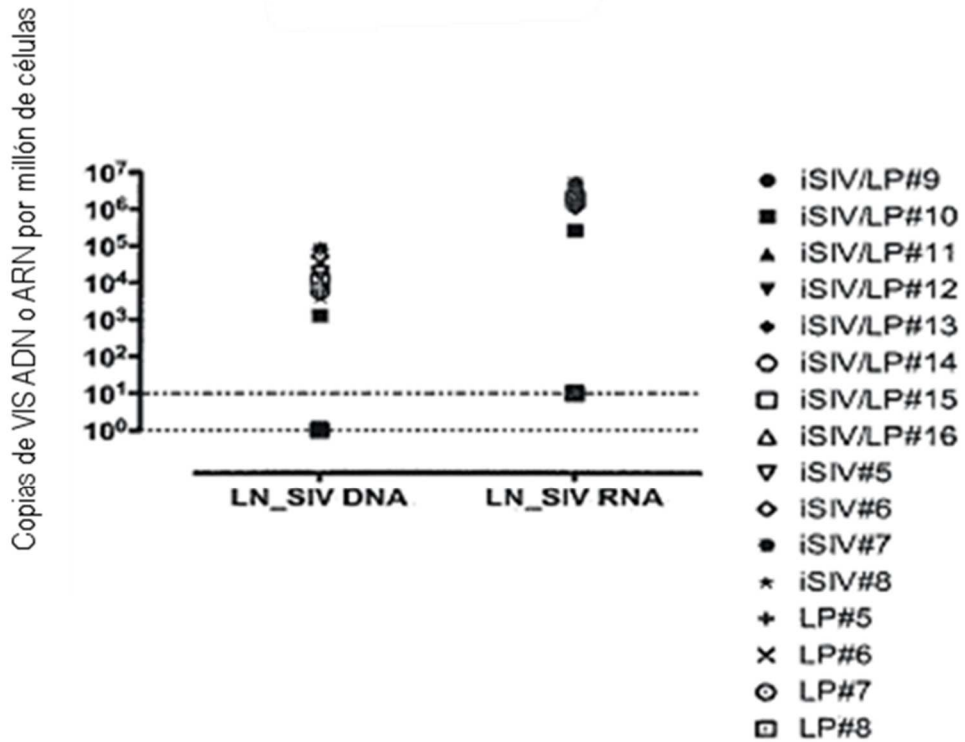


Figura 16e