

Vacunas preventivas contra el virus de la inmunodeficiencia humana

FELIPE GARCÍA

Unidad de Investigación en Inmunopatogenia del VIH. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS). Hospital Clínic. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

fgarcia@clinic.ub.es

Felipe García ha recibido una beca de investigación de IDIBAPS.

El número de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en todo el mundo se aproximaba a los 40 millones de personas al final de 2004, basado en las estimaciones de Joint United Nation programme on HIV/AIDS¹. Aunque la morbilidad y la mortalidad asociada al VIH han disminuido sustancialmente con la introducción de terapias antirretrovirales de alta eficacia en los Estados Unidos y Europa, no ocurre igual en los países en desarrollo. Se ha estimado que se infectan unas 14.000 personas al día (5 millones al año) por el VIH, el 95% en los países en vías de desarrollo¹. Con la disponibilidad limitada del tratamiento antirretroviral en la mayoría del mundo, el énfasis para combatir la epidemia del VIH se basa en las medidas preventivas. Por desgracia, estas medidas preventivas han tenido un resultado muy limitado. Además, el tratamiento antirretroviral, que ha tenido éxito en disminuir la morbilidad y la mortalidad asociada con la infección por el VIH², tiene importantes limitaciones en forma de toxicidades, interacciones medicamentosas y riesgos de desarrollar resistencias. El desarrollo de una vacuna frente al VIH que pudiera conducir a una caída en la tasa de nuevas infecciones por el VIH o retrasar la progresión a sida es capital.

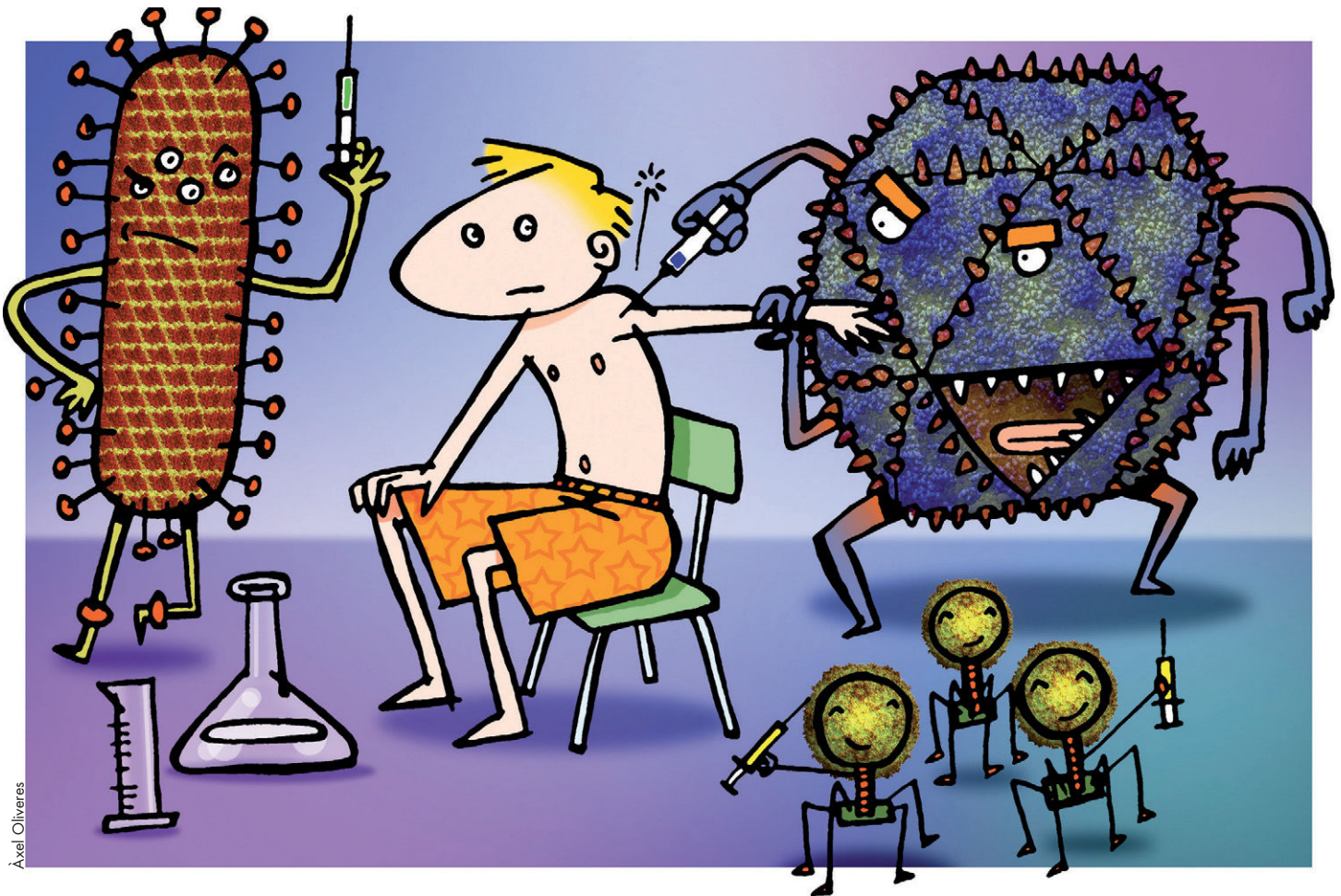
Puntos clave

- El desarrollo de una vacuna frente al VIH que pudiera conducir a una caída en la tasa de nuevas infecciones por el VIH o retrasar la progresión a sida es capital.
- La vacuna ideal necesitaría inducir tanto anticuerpos como respuestas mediadas por células, tanto en las mucosas como sistémicamente.
- Se están intentando desarrollar vacunas con subunidades del VIH que imitan la estructura tridimensional y las regiones conservadas del VIH.
- En el estudio con AIDSVAX B/E no se observó que la vacuna protegiera de la infección por el VIH.
- La Iniciativa Global para la obtención de una vacuna contra el sida tiene como objetivo fomentar y coordinar la investigación sobre vacunas contra el sida.

Obstáculos en el desarrollo de una vacuna frente al VIH

Actualmente, el arsenal terapéutico contra la infección por el VIH es muy completo y hay perspectivas de que siga creciendo de forma importante en los próximos años. En contraste con esta situación, la investigación de una vacuna frente a la infección por el VIH ha tenido un éxito limitado. Las razones que explican las dificultades asociadas con la investigación de una vacuna contra el VIH son múltiples. La diversidad genética, la rápida tasa de replicación y la alta frecuencia de mutaciones inherentes al VIH son barreras importantes para el desarrollo con éxito de una vacuna frente a esta enfermedad. Los aislados del VIH tipo 1 se ha clasificado en 3 grupos: M (*main*), O (*outlier*) y N (*new*). Cada uno está dividido en subtipos. Por ejemplo, el grupo M se divide en subtipos A a J. Los subtipos son variantes genotípicas y fenotípicas del virus, y la homología entre subtipos se estima en el 60%. Diferentes subtipos son característicos de diferentes regiones geográficas. Por ejemplo, el subtipo B es predominante en Europa y América de Norte. Además de las diferencias genéticas inherentes a los subtipos, el VIH exhibe tasas de replicación extrema y altas tasas de mutación, debido a fallos en la "lectura" por parte de la transcriptasa inversa. Una combinación de estos factores no puede sólo conducir a variantes genéticas del VIH entre diferentes individuos, sino también a una población de virus genéticamente diferentes en el mismo individuo. Así, una vacuna efectiva que produzca una respuesta inmune frente a un subtipo o cepa viral puede no necesariamente proporcionar protección contra otras³.

Otros obstáculos importantes en la investigación de la vacuna frente al VIH (sobre todo, para la inducción de producción de anticuerpos neutralizantes) se deben a: a) la envuelta está altamente glucosilada, lo que la hace no inmunogénica; b) tiene una conformación variable, y el sitio más sensible —el sitio de unión al receptor de la quimiocina— no se expone, a no ser que se haya unido a CD4; c) el sitio de unión del CD4 está situado profundamente y los anticuerpos tienen difícil acceso a él, y d) además, los carbohidratos que son partes cruciales de la superficie de la gp120 están protegidos por asas hipervariables, lo que implica que varíen sin coste alguno para el virus, lo que permite un escape a los anticuerpos neutralizantes⁴⁻⁶. A todo esto se une la falta de un modelo animal adecuado, el conocimiento limitado de la respuesta inmunitaria que ofrece



protección frente a la infección por el VIH, que las vías de infección son varias (hematogena, vía sexual, transmisión materno-fetal, por leche materna, etc.)⁷. Por tanto, la vacuna ideal necesitaría inducir tanto anticuerpos como respuestas mediadas por células, tanto en las mucosas como sistémicamente⁶. La complejidad de todo lo anterior es determinante en la lenta progresión del desarrollo de una vacuna para el VIH.

Estrategias de vacunación tradicionales. Ensayos clínicos en fase III

Tradicionalmente, se han utilizado vacunas de virus vivos atenuados para la prevención de infecciones (p. ej., sarampión, parotiditis o rubéola). Estas vacunas son altamente inmunogénicas porque imitan la infección natural tanto en la respuesta celular como humoral^{8,9}. Esto resulta en inducción de inmunidad de por vida después de una o dos dosis. En contraste las vacunas que utilizan organismos muertos o subunidades no imitan la infección, y la administración de estas vacunas induce sólo una respuesta humoral. Se requieren recuerdos periódicos para mantener anticuerpos en las concentraciones adecuadas. Se utilizan, además, adyuvantes como las sales de aluminio para incrementar estas respuestas que a veces son muy pobres. Algunas de estas estrategias de vacunas tradicionales no se pueden realizar para prevenir la infección por el VIH debido a problemas de seguridad⁹⁻¹³ o porque su eficacia ha sido nula cuando se han utilizado^{14,15}. Por ejemplo, las vacunas vivas atenuadas están prohibidas en humanos, ya que el virus de la inmunodeficiencia del simio

(SIV) altamente atenuado que protegía a macacos adultos de infección por el VIH producía sida en macacos neonatos, además de que unos cuantos de los macacos adultos desarrollaron sida posteriormente^{12,13}. Más aún, el grado de atenuación se correlacionó de forma inversa con la inmugenidad¹¹. Las vacunas de virus muertos han dado resultados nulos en ensayos clínicos^{14,15}. Se han intentado otras aproximaciones, como vacunar con subunidades del VIH como Env, Tat o p24; sin embargo, los resultados de los ensayos clínicos en fase I/II han sido muy desalentadores^{16,17}. Actualmente, se están intentando desarrollar vacunas con subunidades del VIH que imitan la estructura tridimensional y las regiones conservadas del VIH¹⁸.

Ensayos clínicos que evalúan la inmunogenicidad, la seguridad y la eficacia de candidatos de vacunas del VIH son limitados. Mientras que 27 vacunas del VIH preventivas están siendo evaluadas respecto a la inmunogenicidad y la seguridad en estudios en fase I o fase I-II, sólo 3 vacunas han entrado en ensayos en fase III⁶. Estos ensayos en fase III han intentado examinar la eficacia de la vacuna preventiva del VIH en poblaciones de alto riesgo, y sólo una está actualmente en progreso⁶. Los resultados de 2 ensayos en fase III se han comunicado recientemente¹⁹⁻²². La vacuna de gp120 recombinante AIDSVAX B/B (VaxGen, Inc.) se evaluó en poblaciones de Norteamérica y Europa, mientras que AIDSVAX B/E se evaluó en Tailandia. La población de estudio en el ensayo con AIDSVAX B/B consistió en 5.417 varones VIH negativos no usuarios de drogas vía parenteral (94%) y mujeres (6%) con alto riesgo de adquirir la infección²². Los resultados de este estudio no mostraron diferencias significativas en la tasa de

infecciones por el VIH entre los grupos que recibieron vacuna o el que recibió placebo (el 5,7 y el 5,8%, respectivamente). En el estudio con AIDSVAX B/E, la población de estudio comprendió 2.546 individuos VIH negativos que eran drogadictos por vía intravenosa¹⁹. No se observó que la vacuna protegiera de la infección por el VIH (tasas de infección por el VIH: el 8,4 frente al 8,3% en grupos de vacunados y placebo, respectivamente)¹⁹. Estos resultados eran esperables, ya que la gp120 recombinante había mostrado malos resultados en estudios previos. Actualmente, se está llevando a cabo otro ensayo fase III para la prevención de la infección por el VIH con una estrategia denominada *prime-boost*, los componentes de esta combinación son el vector viral *canarypox* (ALVAC) y la AIDSVAX B/E, con lo que se espera estimular tanto las respuestas humorales como las celulares. Se espera que este estudio reclute a 16.000 individuos. Sin embargo, actualmente hay pocas esperanzas de que los resultados sean positivos. Todo lo anterior lleva a que se plantee la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para una vacuna preventiva para el sida como pudieran ser las vacunas de virus recombinantes.

Vacunas de virus recombinantes

Las vacunas de virus recombinantes utilizan virus o bacterias atenuados como portadores de genes del VIH modificados al huésped. Esta información genética del VIH se incorpora al genoma del vector y se producen las proteínas del VIH. El huésped produce entonces respuestas inmunológicas contra estas proteínas del VIH. Debido a la falta de éxito de las vacunas capaces de inducir anticuerpos neutralizantes, ha crecido el interés en generar vacunas capaces de inducir respuestas mediadas por células. Este tipo de vacunas son las que se están estudiando más intensamente en la actualidad en muchos centros en estudios en fase I/II^{6,9,23}. Ejemplos de vectores potenciales incluye *canarypox*²⁴, adenovirus^{25,26}, vaccinia Ankara modificado (MVA) y vaccinia atenuado (NYVAC)^{27,28}. También se están probando vacunas con ADN desnudo como vector, aunque su inmunogenicidad es escasa, la propuesta es que se den con un esquema de *prime-boosting* junto con virus recombinantes.

Entre los vectores utilizados como portadores de antígenos VIH, MVA ha mostrado que es capaz de inducir respuestas citotóxicas HIV-específicas²⁹⁻³¹. Se ha demostrado que MVA es segura en humanos^{32,33} y se está utilizando actualmente en numerosos ensayos clínicos de vacunas para VIH^{6,23,33-35}. Dentro de la familia de los poxvirus atenuados, se ha utilizado también NYVAC portando múltiples antígenos VIS/HIV en monos^{36,37}. NYVAC es una cepa de virus vaccinia altamente atenuada generada por la delección de 18 *open reading frames* del genoma viral, que afecta a genes no esenciales para el crecimiento del virus en algunas líneas celulares, pero que son importantes para la virulencia en modelos animales³⁸. MVA se ha generado tras pasar por fibroblastos de embrión de pollo más de 500 veces, perdiendo cerca del 15% de información genética y la habilidad para crecer en humanos³⁹. Tanto NYVAC y MVA se han estudiado en profundidad⁴⁰⁻⁴³ y se ha demostrado que comparten genes deleccionados comunes, aunque la mayoría de los genes deleccionados son diferentes entre las 2 cepas virales. Respecto a los péptidos correspondientes a epítopos CTL administrados con adyuvante

o en vectores recombinantes se ha demostrado que son inmunogénicos, pero su utilización está limitada debido a la variabilidad HLA y a la alta tasa de mutación del virus. Una estrategia que tenga como diana tantas proteínas virales como sea posible y que no esté restringida a unas cuantas moléculas HLA tiene más probabilidades de tener éxito. Hasta la fecha, pocos candidatos de la vacuna han utilizado proteínas que contienen múltiples determinantes del VIH y poco es sabido sobre la amplitud y la magnitud de las respuestas contra estas vacunas. Dentro de la estructura de EUROVACC, que es un esfuerzo europeo para desarrollar vacunas y favorecer la realización de ensayos clínicos, se han realizado prototipos de vacuna que llevan una fusión de los genes de VIH-1 *gag*, *pol* y *nef* (desarrollado por el Dr. Mariano Esteban en Centro Nacional de Biotecnología en el entorno de EUROVACC). Se ha demostrado en modelos animales que MVA y NYVAC expresando esos genes indujeron respuesta de células T productoras de interferón-gamma y citotóxicas^{27,28,44}.

Respuestas inmunitarias protectoras

La identificación de qué respuestas inmunitarias serían protectoras sería un paso muy importante en el desarrollo de una vacuna preventiva para el VIH. Numerosos investigadores están intentando definir estas respuestas inmunológicas examinando distintas poblaciones de individuos con múltiples exposiciones de alto riesgo al VIH y que han permanecido sin infectar⁴⁵ o que están infectados, pero que progresan muy lentamente^{46,47}.

Respecto a la monitorización inmunológica de estas respuestas inmunitarias protectoras, el requisito fundamental de una vacuna para prevenir la infección es que induzca títulos altos de anticuerpos neutralizantes y anticuerpos con amplia actividad neutralizante. Respecto a la inmunidad celular, la situación es más compleja. Las observaciones que van a favor de un papel protector de la inmunidad mediada por células son predominantemente indirectas⁴⁸⁻⁵¹. Recientes avances que delinean la complejidad funcional tanto de células CD4+ como CD8+ han hecho replantear las estrategias actualmente utilizadas para monitorizar las respuestas inmunes inducidas por las vacunas. Aunque la medición de las células secretoras de interferón-gamma después de la estimulación específica de antígeno utilizando el ensayo de ELISPOT puede ofrecer información sobre la inmunogenicidad de una vacuna, puede ser insuficiente para definir una respuesta inmunitaria protectora, por lo que determinar la diversidad funcional de la respuesta inmunitaria inducida por la vacuna puede ser necesario. Además, la detección de células secretoras de interferón-gamma puede ofrecer sólo una información limitada sobre la durabilidad de la respuesta inmunitaria inducida por la vacuna. La secreción de interferón-gamma es típica de la fase temprana (efectora) de la generación de la respuesta inmunitaria, pero disminuirá con el aclaramiento del antígeno. Por el contrario, la secreción de interleucina (IL) 2 es típica de la respuesta de células T de la memoria de larga duración (predominantemente CD4+) y así puede ser un buen marcador de las células memoria a largo plazo⁵². No se puede excluir la posibilidad de que ciertas vacunas sean pobres inductoras de respuestas interferón-gamma, mientras que pudieran estimular las respuestas IL-2 dominantes. De

esta forma, la monitorización de las respuestas específicas de vacunas debería ser extendido para detectar células secretoras de IL-2.

Existen estudios que apoyan que 3 categorías de células CD8 memoria pueden definirse según la expresión de CD45RA y CCR7⁵³⁻⁵⁶: a) T_{EM}, o células memoria efectoras, que predominan en infecciones en las que persisten relativamente altos valores de antígeno; son CD45RA-CCR7-, migran a través de tejidos no linfoides y tienen un alto potencial citotóxico, pero pobre capacidad proliferativa; son las células memoria que monitorizan los tejidos para detectar la presencia de patógenos; b) T_{CM}, o células memoria central, que predominan en infecciones en las que el antígeno se aclara de forma completa, son CD45RA-CCR7+, migran a través de tejidos linfoides y tienen un pobre potencial citotóxico inmediato, pero alta capacidad proliferativa; son las células que reconocen antígenos en órganos linfoides y experimentan rápida expansión con el objetivo de generar un gran número de células efectoras, y c) T_{RAEM}, o células memoria terminales, que predominan en infecciones en las que persiste valores bajos de antígeno, son CD45RA+CCR7-, migran a través de tejidos no linfoides y tienen un muy rápido potencial citotóxico, pero pobre capacidad proliferativa, excepto en presencia de ayuda de células CD4+. Hay datos relativamente limitados sobre los fenotipos de las células CD8 que emergen en la población de células memoria tras las vacunaciones. En modelos animales, cuando se vacunan con el SIV vivo atenuado, las células memoria inducidas son tanto T_{EM} como T_{CM}²³. Sin embargo, las inmunizaciones con ADN-MVA indujeron respuestas sobre todo del tipo T_{CM}²³. Por tanto, la determinación de la maduración/diferenciación de las células CD8 específicas de VIH-1 tiene importancia no sólo para determinar qué tipo de respuesta inducen las vacunas, sino para entender cómo cambia la dinámica de las respuestas inmunitarias (o los patrones de contracción en memoria) según el tipo de vacuna. Por último, no sólo es necesario conocer el tipo y la función de las respuestas CD8 específicas de VIH-1 inducidas, sino que también es importante el análisis del número de células que son estimuladas mediante la determinación con tetrámeros, ya que se ha visto que diferentes tipos de vacunas son capaces de inducir una magnitud diferente de respuesta²³.

De esta forma, aunque los ensayos de ELISPOT pueden ser adecuados para un *screening* inicial de la inmunogenicidad de un número importante de muestras de los ensayos clínicos, otros ensayos (como la detección de la producción intracelular de citocinas [ICC] de linfocitos CD4/CD8 específicos de VIH-1, identificadas mediante tetrámeros y la determinación de la maduración/diferenciación de las células CD8 específicas de VIH-1) pueden ser necesarios para caracterizar de forma completa las respuestas de células T memoria inducidas por las vacunas.

Conclusión

Según la Global HIV/AIDS Vaccine Enterprise⁷, la identificación de qué tipo de vacuna inductora de respuestas celulares T sea más prometedora es una prioridad urgente (fig. 1). Para

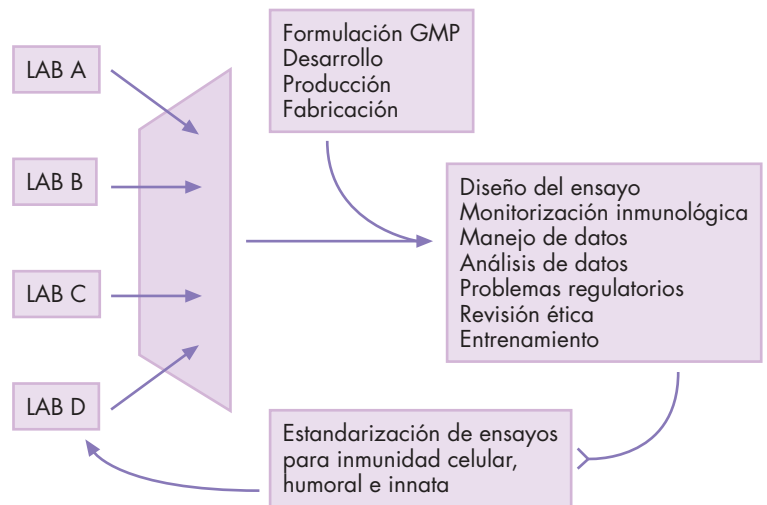


Figura 1. Selección de inmunógenos candidatos individuales y en combinación. GMP: guanosinmonofosfato.

esto, es necesario realizar ensayos en fase I/II en humanos con aquellas vacunas que hayan demostrado que sean capaces de inducir inmunogenicidad y seguridad en modelos animales. Sin embargo, estos ensayos en numerosas ocasiones se han realizado dentro de grupos de investigación preclínica, separados de las redes de investigación clínica, con el resultado de que las vacunas candidatas no pueden ser óptimamente comparadas preclínicamente o clínicamente entre sí. Esta forma de trabajar puede resultar en un retraso en la identificación de los candidatos más prometedores. Hoy sabemos que el desarrollo de una vacuna frente al VIH es una empresa científica llena de incertidumbres y dificultades, debido a los mecanismos de adaptación y escape del VIH a la respuesta inmune y a la complejidad que reviste el desarrollo, aplicación y evaluación de los prototipos generados. Sabemos también que es necesario un esfuerzo sin precedentes a escala mundial que aborde este desafío. Para paliar estas dificultades ha surgido la Iniciativa Global para la obtención de una vacuna contra el sida⁷ que tiene como objetivo fomentar y coordinar la investigación sobre vacunas contra el sida. El aunar esfuerzos en torno a esta iniciativa y preparar a los grupos de investigación de España para participar en esta tarea es una prioridad, y parece constituirse como la única salida para controlar esta devastadora epidemia.

Bibliografía



● Importante ●● Muy importante

■ Epidemiología
■ Ensayo clínico controlado

1. Joint United Nation Program on HIV/AIDS. Global summary of AIDS epidemic, December 2004. Disponible en: www.unaids.org/wad2004/report.html. 2004.
2. Palella FJJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. N Engl J Med. 1998;338:853-60.

3. ● Altfield M, Allen TM, Yu XG, Johnston MN, Agrawal D, Korber BT, et al. HIV-1 superinfection despite broad CD8+ T-cell responses containing replication of the primary virus. *Nature*. 2002;420:434-39.
4. Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, Koff WC, Kwong PD, Moore JP, et al. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol*. 2004;5:233-36.
5. ●● Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*. 2003;422:307-12.
6. Kaufmann SH, McMichael AJ. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat Med*. 2005;11:S33-44.
7. ●● Coordinating Committee of the Global HIV/AIDS Vaccine Enterprise. The Global HIV/AIDS Vaccine Enterprise: scientific strategic plan. *Plos Med*. 2005;2:e25.
8. McMichael AJ, Hanke T. HIV vaccines 1983-2003. *Nat Med*. 2003;9:874-80.
9. Mwau M, McMichael AJ. A review of vaccines for HIV prevention. *J Gene Med*. 2003;5:3-10.
10. Putkonen P, Walther L, Zhang YJ, Li SL, Nilsson C, Albert J, et al. Long-term protection against SIV-induced disease in macaques vaccinated with a live attenuated HIV-2 vaccine. *Nat Med*. 1995;1:914-8.
11. Johnson RP, Lifson JD, Czajak SC, Cole KS, Manson KH, Glickman R, et al. Highly attenuated vaccine strains of simian immunodeficiency virus protect against vaginal challenge: inverse relationship of degree of protection with level of attenuation. *J Virol*. 1999;73: 4952-61.
12. Wyand MS, Manson KH, Lackner AA, Desrosiers RC. Resistance of neonatal monkeys to live attenuated vaccine strains of simian immunodeficiency virus. *Nat Med*. 1997;3:32-6.
13. ● Baba TW, Liska V, Khimani AH, Ray NB, Dailey PJ, Penninck D, et al. Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nat Med*. 1999;5: 194-203.
14. Moss RB, Diveley J, Jensen F, Carlo DJ. In vitro immune function after vaccination with an inactivated, gp120-depleted HIV-1 antigen with immunostimulatory oligodeoxynucleotides. *Vaccine*. 2000;18:1081-7.
15. Limsuwan A, Churdboonchart V, Moss RB, Sirawaraporn W, Suththert R, Smutharaks B, et al. Safety and immunogenicity of REMUNE in HIV-infected Thai subjects. *Vaccine*. 1998;16:142-9.
16. Connor RI, Korber BT, Graham BS, Hahn BH, Ho DD, Walker BD, et al. Immunological and virological analyses of persons infected by human immunodeficiency virus type 1 while participating in trials of recombinant gp120 subunit vaccines. *J Virol*. 1998;72:1552-76.
17. Mascola JR, Snyder SW, Weislow OS, Belay SM, Belshe RB, Schwartz DH, et al. Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group. *J Infect Dis*. 1996;173:340-8.
18. Letvin NL. Strategies for an HIV vaccine. *J Clin Invest*. 2002;110:15-20.
19. Karnasuta C, Paris RM, Cox JH, Nitayaphan S, Pitisuttithum P, Thongcharoen P, et al. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxic responses in participants enrolled in a phase I/II ALVAC-HIV/AIDS/VAX B/E prime-boost HIV-1 vaccine trial in Thailand. *Vaccine*. 2005;23:2522-9.
20. Graham BS, Mascola JR. Lessons from failure -preparing for future HIV-1 vaccine efficacy trials. *J Infect Dis*. 2005;191:647-9.
21. Gilbert PB, Peterson ML, Pollmann D, Hudgens MG, Francis DP, Gurwith M, et al. Correlation between immunologic responses to a recombinant glycoprotein 120 vaccine and incidence of HIV-1 infection in a phase 3 HIV-1 preventive vaccine trial. *J Infect Dis*. 2005;191:666-77.
22. ●● Flynn NM, Forthal DN, Harro CD, Judson FN, Mayer KH, Para MF. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2005;191:654-65.
23. Robinson HL, Amara RR. T cell vaccines for microbial infections. *Nat Med*. 2005;11:S25-32.
24. Paris R, Bejrachandra S, Karnasuta C, Chandanayingyong D, Kunachiwa W, Lee-trakool N, et al. HLA class I serotypes and cytotoxic T-lymphocyte responses among human immunodeficiency virus-1-uninfected Thai volunteers immunized with ALVAC-HIV in combination with monomeric gp120 or oligomeric gp160 protein boosting. *Tissue Antigens*. 2004;64:251-6.
25. Mascola JR, Sambor A, Beaudry K, Santra S, Welcher B, Louder MK, et al. Neutralizing antibodies elicited by immunization of monkeys with DNA plasmids and recombinant adenoviral vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J Virol*. 2005;79:771-9.
26. Santra S, Seaman MS, Xu L, Barouch DH, Lord CI, Lifton MA, et al. Replication-defective adenovirus serotype 5 vectors elicit durable cellular and humoral immune responses in nonhuman primates. *J Virol*. 2005;79:6516-22.
27. Didierlaurent A, Ramirez JC, Gherardi M, Zimmerli SC, Graf M, Orbea HA, et al. Attenuated poxviruses expressing a synthetic HIV protein stimulate HLA-A2-restricted cytotoxic T-cell responses. *Vaccine*. 2004;22:3395-403.
28. ● Gómez CE, Abaitua F, Rodríguez D, Esteban M. Efficient CD8+ T cell response to the HIV-env V3 loop epitope from multiple virus isolates by a DNA prime/vaccinia virus boost (rWR and rMVA strains) immunization regime and enhancement by the cytokine IFN-gamma. *Virus Res*. 2004;105:11-22.
29. ●● Amara RR, Villingier F, Altman JD, Lydy SL, O'Neil SP, Staprans SI, et al. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science*. 2001;292:69-74.
30. Amara RR, Smith JM, Staprans SI, Montefiori DC, Villingier F, Altman JD, et al. Critical role for Env as well as Gag-Pol in control of a simian-human immunodeficiency virus 89.6P challenge by a DNA prime/recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine. *J Virol*. 2002;76:6138-46.
31. Ourmanov I, Brown CR, Moss B, Carroll M, Wyatt L, Pletneva L, et al. Comparative efficacy of recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing simian immunodeficiency virus (SIV) Gag-Pol and/or Env in macaques challenged with pathogenic SIV. *J Virol*. 2000;74:2740-51.
32. Stickl H, Hochstein-Mintzel V, Mayr A, Huber HC, Schafer H, Holzner A. MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA) (author's transl). *Dtsch Med Wochenschr*. 1974;99: 2386-92.
33. Guimaraes-Walker A, Mackie N, McMichael A, Weber J, McCormack S, Ceberé I, et al. Priming with a candidate HIV-1 clade A DNA vaccine followed by a booster with HIV-1 clade A MVA vaccine in volunteers at low risk of HIV infection. *AIDS Vaccine*. 2004. Lausanne, August 30-September 1; 2004.
34. Hanke T, McMichael AJ. Design and construction of an experimental HIV-1 vaccine for a year-2000 clinical trial in Kenya. *Nat Med*. 2000;6:951-55.
35. ● Mwau M, Ceberé I, Sutton J, Chikoti P, Winstone N, Wee EG, et al. A human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIV-specific T-cell responses by DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccines in humans. *J Gen Virol*. 2004;85:911-9.
36. ●● Hel Z, Venzon D, Poudyal M, Tsai WP, Giuliani L, Woodward R, et al. Viremia control following antiretroviral treatment and therapeutic immunization during primary SIV251 infection of macaques. *Nat Med*. 2000;6:1140-6.
37. Hel Z, Nacsa J, Trynieszewska E, Tsai WP, Parks RW, Montefiori DC, et al. Containment of simian immunodeficiency virus infection in vaccinated macaques: correlation with the magnitude of virus-specific pre- and postchallenge CD4+ and CD8+ T cell responses. *J Immunol*. 2002;169:4778-87.
38. Tartaglia J, Perkus ME, Taylor J, Norton EK, Audonnet JC, Cox WI, et al. NY-VAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology*. 1992;188:217-32.
39. Sutter G, Staib C. Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2003;3:263-71.
40. Hanke T, McMichael AJ, Dennis MJ, Sharpe SA, Powell LA, McLoughlin L, et al. Biodistribution and persistence of an MVA-vectored candidate HIV vaccine in SIV-infected rhesus macaques and SCID mice. *Vaccine*. 2005;23:1507-14.
41. Ramirez JC, Finke D, Esteban M, Kraehenbuhl JP, Cha-Orbea H. Tissue distribution of the Ankara strain of vaccinia virus (MVA) after mucosal or systemic administration. *Arch Virol*. 2003;148:827-39.
42. ● Guerra S, López-Fernández LA, Conde R, Pascual-Montano A, Harshman K, Esteban M. Microarray analysis reveals characteristic changes of host cell gene expression in response to attenuated modified vaccinia virus Ankara infection of human HeLa cells. *J Virol*. 2004;78:5820-34.
43. ● Cryklaff M, Risco C, Fernández JJ, Jiménez MV, Esteban M, Baumeister W, et al. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:2772-7.
44. Amara RR, Sharma S, Patel M, Smith JM, Chennareddi L, Herndon JG, et al. Studies on the cross-clade and cross-species conservation of HIV-1 Gag-specific CD8 and CD4 T cell responses elicited by a clade B DNA/MVA vaccine in macaques. *Virology*. 2005;334:124-33.
45. ● Lopaleo L, Barassi C, Pastori C, Longhi R, Burastero SE, Tambussi G, et al. CCR5-reactive antibodies in seronegative partners of HIV-seropositive individuals down-modulate surface CCR5 in vivo and neutralize the infectivity of R5 strains of HIV-1 In vitro. *J Immunol*. 2000;164:3426-33.
46. Soriano A, Martínez C, García F, Plana M, Palou E, Lejeune M, et al. Plasma stromal cell-derived factor (SDF)-1 levels, SDF1-3'A genotype, and expression of CXCR4 on T lymphocytes: their impact on resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection and its progression. *J Infect Dis*. 2002;186:922-31.
47. García F, Plana M, Soriano A, Vidal C, Arnedo M, Gil C, et al. Predictors of progression in chronically infected naive patients with plasma viremia below 5,000 c/ml and CD4+ T lymphocytes above 500 x 106/l. *AIDS*. 2001;15:131-3.
48. ●● Rowland-Jones SL, Dong T, Fowke KR, Kimani J, Krausa P, Newell H, et al. Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *J Clin Invest*. 1998;102:1758-65.
49. Kaul R, Plummer FA, Kimani J, Dong T, Kiama P, Rostron T, et al. HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *J Immunol*. 2000;164:1611.
50. ●● Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science*. 1999;283:857-60.
51. ●● Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE. Dramatic rise in plasma viremia after CD8+ T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected Macaques. *J Exp Med*. 1999;189:991-8.
52. Wu CY, Kirman JR, Rotte MJ, Davey DF, Perfetto SP, Rhee EG, et al. Distinct lineages of T(H)1 cells have differential capacities for memory cell generation in vivo. *Nat Immunol*. 2002;3:852-8.
53. ●● Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401:708-12.
54. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745-63.
55. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med*. 2002;8:379-85.
56. Ravkov EV, Myrick CM, Altman JD. Immediate early effector functions of virus-specific CD8+CCR7+ memory cells in humans defined by HLA and CC chemokine ligand 19 tetramers. *J Immunol*. 2003;170:2461-8.