

# Nueva estrategia para la inducción de respuestas de células CD4+ y CD8+ específicas para una proteína multiepitópica recombinante del VIH-1

✉ Enrique Iglesias<sup>1</sup>, Julio C Aguilar<sup>1</sup>, Yamilka Carrazana<sup>1</sup>, Daymir García<sup>1</sup>, Yadira Lobaina<sup>1</sup>, Verena L Muzio<sup>1</sup>, Gerardo E Guillén<sup>1</sup>, Rafael Thompson<sup>1</sup>, Orisley Franch<sup>1</sup>, Jorge Sánchez<sup>1</sup>, José García<sup>1</sup>, Alejandro Martín<sup>1</sup>, Aniel Sánchez<sup>1</sup>, Emma Brown<sup>1</sup>, Larisa Gorobaya<sup>1</sup>, Dioslaida Urquiza<sup>1</sup>, Otto Cruz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacan, Playa, AP 6 162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba

<sup>2</sup>Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA). San José, La Habana, Cuba  
E-mail: enrique.iglesias@cigb.edu.cu

## RESUMEN

Las proteínas recombinantes con elevada pureza son atractivas para el desarrollo de vacunas. Sin embargo, generalmente poseen una pobre inmunogenicidad, y cuando se administran en adyuvantes de aluminio —que son los universalmente aceptados— desarrollan un perfil de respuesta Th2 que no es adecuado para la inmunización contra agentes patógenos como el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1). Para combatir la infección con el VIH-1 se precisa una estrategia vacunal que induzca fuertes respuestas de tipo celular. El objetivo de esta investigación fue obtener una elevada respuesta inmune celular específica para un antígeno recombinante multiepitópico, que incluye secuencias de interés vacunal del VIH-1. Para lograr esto se utilizó la cualidad adyuvante de los antígenos de superficie (HBsAg y S) y de la nucleocápsida (HBcAg y C) del virus de la hepatitis B (VHB) en administraciones por las vías parenteral y/o mucosal. Después de inmunizar ratones con formulaciones de estos antígenos, se evidenció que la mezcla del antígeno recombinante multiepitópico del VIH-1 (CR3) con los antígenos de la superficie y la nucleocápsida del VHB genera una fuerte respuesta de tipo Th1 —detectada por el incremento de la frecuencia de células secretoras de IFN $\gamma$  y de la proliferación de células CD4+ y CD8+— luego de inoculaciones parenterales y nasales. Adicionalmente, se demostró que la coinmunización a través de las rutas nasal y parenteral permite generar respuestas inmunes más potentes que por la vía parenteral, y que respuestas preexistentes específicas contra los antígenos del VHB no impiden el desarrollo de una fuerte respuesta celular CD4+ y CD8+ específica para la proteína CR3.

## Introducción

Se necesitan nuevos adyuvantes y estrategias para la obtención de candidatos vacunales contra el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) que promuevan respuestas inmunes en compartimentos sistémicos y mucosales. El desarrollo de una vacuna profiláctica o terapéutica es un área de intenso trabajo para la comunidad científica internacional. Sin embargo, los resultados hasta estos momentos han sido decepcionantes. A su vez, los éxitos con las terapias antirretrovirales y su extensión a un número creciente de pacientes, podrían cambiar la pandemia a un nuevo escenario en el que predominen los aislamientos recombinantes, los genes mutantes que confieren resistencia a estas terapias y un aumento significativo del número de pacientes coinfectados con otros virus. Se conoce que la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus de la hepatitis C (VIH-VHC) puede llegar hasta más del 50% de los seropositivos al VIH en algunos territorios [1] y se sabe que del 70 al 90% de estos seropositivos tienen o tuvieron una infección activa con el VHB [2-4]. Estas coinfecciones disminuyen la eficacia y aumentan los eventos adversos en las terapias; además, aceleran la progresión de algunas enfermedades, como se ha mostrado con el VHC y el VHB [5, 6]. Hay algunas zonas donde la epidemia sigue en alarmante aumento como en África subsahariana —la de Sudáfrica es una de las peores en el mundo— y el Caribe [7]. Por todo esto, la obtención de una vacuna efectiva contra el

VIH-1 continúa siendo un objetivo priorizado para la comunidad científica internacional.

Luego de intensos estudios de la infección por el VIH-1, se han acumulado numerosas evidencias que enfatizan la importancia de la respuesta inmune celular para controlar la replicación viral [8]. Actualmente, se encuentran en estudio varias proteínas y polipéptidos multiepitópicos del VIH-1 y se utilizan diversas estrategias para generar respuestas celulares. Las estrategias líderes se basan en el uso de vectores vivos recombinantes, como el canarypox y el adenovirus [9, 10]; pero estos tienen varias desventajas. Entre las principales desventajas está la imposibilidad de usar tales vectores en esquemas de inmunización que lleven varias inoculaciones parenterales, ya que la inmunidad antivector puede llegar a ser entre 20 y 30 veces mayor que la respuesta contra la proteína recombinante [11]. Además, para algunos de esos vectores existe una respuesta preexistente muy fuerte en las poblaciones humanas donde hay elevada incidencia de infecciones por la variante salvaje [12]. Por estas razones, sus posibilidades de éxito son limitadas.

La ingeniería genética es una potente herramienta para obtener antígenos vacunales recombinantes puros. Sin embargo, se conoce que estos antígenos son poco inmunogénicos. Por esto, el objetivo fundamental en el desarrollo de adyuvantes es mejorar la inmunogenicidad de los antígenos (Ag) recombinantes, eliminando el riesgo y la toxicidad asociados con la administración del

1. Dieterich DT. Hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: clinical issues in coinfection. *Am J Med* 1999;107(6B):79S-84S.

2. Gilson RJ, Hawkins AE, Beecham MR, Ross E, Waite J, Briggs M, et al. Interactions between HIV and hepatitis B virus in homosexual men: effects on the natural history of infection. *Aids* 1997;11(5):597-606.

3. Rodríguez-Méndez ML, González-Quintela A, Aguilera A, Barrio E. Prevalence, patterns, and course of past hepatitis B virus infection in intravenous drug users with HIV-1 infection. *Am J Gastroenterol* 2000;95(5):1316-22.

4. Sinicco A, Raiteri R, Scianora M, Bertone C, Lingua A, Salassa B, et al. Coinfection and superinfection of hepatitis B virus in patients infected with human immunodeficiency virus: no evidence of faster progression to AIDS. *Scand J Infect Dis* 1997;29(2):111-5.

[5] Puoti M, Torti C, Ripamonti D, Castelli F, Zaltron S, Zanini B, et al. Severe hepatotoxicity during combination antiretroviral treatment: incidence, liver histology, and outcome. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;32(3):259-67.

✉ Autor de correspondencia

Ag en el microorganismo original. Sin embargo, la toxicidad intrínseca de los adyuvantes ha sido una limitación importante para el desarrollo de adyuvantes vacunales y de nuevas formulaciones.

Para obtener una proteína multiepitópica con interés vacunal se seleccionaron diversas regiones epitópicas del VIH-1 considerando: 1, aparición en la infección natural de respuestas celulares importantes; 2, relativamente poca variabilidad; 3, representación de varias proteínas virales y 4, representación de los haplotipos HLA más frecuentes. Así, se concibió la proteína recombinante CR3 que contiene varios epítomos para linfocitos T citotóxicos (CTL), linfocitos T auxiliares (Th) y células B de diferentes aislamientos pertenecientes al subtipo B del VIH-1 [13]. En un trabajo previo se demostró que los epítomos incluidos en CR3 se reconocen eficientemente por CTL generados durante la infección natural en pacientes [14]. Por otra parte, nuestro grupo de trabajo había evidenciado que, luego de inoculaciones mucosales y parenterales con la mezcla del HBcAg + HBsAg se obtenía una inmunodesviación Th1 en la respuesta anti-HBsAg, a la vez que un sinergismo en la respuesta inmune a ambos Ags [15]. Por esto, se pensó en el posible uso adyuvante de la anterior mezcla de Ag.

El objetivo propuesto entonces fue desarrollar una formulación novedosa para inoculaciones parenteral y/o mucosal que incremente la inmunogenicidad de un Ag multiepitópico del VIH-1 (CR3). Estos estudios se encaminan al desarrollo y producción de candidatos vacunales profilácticos y/o terapéuticos que permitan su uso en estrategias de administración vacunal a dosis repetidas con efecto en compartimentos mucosales y sistémicos.

## Resultados y discusión

### Demostración del efecto adyuvante Th1 de la mezcla HBsAg con HBcAg [16]

Con el objetivo de estudiar el efecto adyuvante de los Ag de superficie y la nucleocápsida del VHB sobre

la respuesta anti-CR3, se realizaron inoculaciones mucosales [vía intranasal (in)] y parenterales [vía subcutánea (sc)] con diferentes mezclas de CR3 con cada Ag del VHB por separado y con ambos a la vez. Además, se incluyeron grupos controles como, la proteína CR3 sola y otros. Las inoculaciones mucosales se hicieron diluyendo el inmunógeno en una solución tampón fosfato salino. Para la vía parenteral se usó como adyuvante el fosfato de aluminio (AlPO<sub>4</sub>) que se escogió tomando en cuenta el punto isoeléctrico de CR3 y su probada inocuidad en seres humanos. Estudios preliminares habían mostrado que la mezcla HBcAg + HBsAg + CR3 en solución salina, sin adyuvantes, es muy poco inmunogénica. Luego de inmunizar ratones Balb/c con la combinación de los tres antígenos, HBcAg + HBsAg + CR3 por las rutas sc e in, se generaron apreciables frecuencias de células específicas para CR3 secretoras de IFN $\gamma$ , superiores a otros grupos ensayados, excepto CR3 + HBsAg vía in, que se comportó de modo similar (Figura 1). Sin embargo, pudo demostrarse la importancia del HBcAg en la inducción de una respuesta Th1. A su vez, estudios más profundos con los animales inoculados con la formulación HBcAg + HBsAg + CR3 evidenciaron que se estimulaba la proliferación de células CD4+ y CD8+ específicas, no solo para CR3 sino para el HBsAg en el bazo de los animales inmunizados. Otro resultado interesante, demostrado *in vitro*, fue la existencia de un efecto de *bystander stimulation* entre los Ag CR3 y HBsAg, que potencia la respuesta a ambos Ag. Este fenómeno podría ser una de las causas del efecto adyuvante observado. Por último, se demostró que la respuesta humoral anti-HBsAg en los ratones inmunizados con CR3 + HBsAg + HBcAg por vía sc se mantiene al mismo nivel que la que se genera en el grupo de los animales inoculados con HBsAg + HBcAg, y aunque decae significativamente cuando se inoculan por vía in, aún mantiene títulos elevados. Estos resultados determinaron que se continuara trabajando con la mezcla de los tres Ags [16].

[6] Wit FW, Weverling GJ, Weel J, Jurriaans S, Lange JM. Incidence of and risk factors for severe hepatotoxicity associated with antiretroviral combination therapy. *J Infect Dis* 2002;186(1):23-31.

[7] UNAIDS. Report on the global AIDS epidemic. Geneva: UNAIDS-WHO; May 2006.

[8] Letvin NL, Walker BD. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med* 2003;9(7):861-6.

[9] Belshe RB, Stevens C, Gorse GJ, Buchbinder S, Weinhold K, Sheppard H, et al. Safety and immunogenicity of a canarypox-vectored human immunodeficiency virus Type 1 vaccine with or without gp120: a phase 2 study in higher-risk and lower-risk volunteers. *J Infect Dis* 2001;183(9):1343-52.

[10] Bruce CB, Akkrig A, Sharpe SA, Hanke T, Wilkinson GW, Cranage MP. Replication-deficient recombinant adenoviruses expressing the human immunodeficiency virus Env antigen can induce both humoral and CTL immune responses in mice. *J Gen Virol* 1999;80(10):2621-8.

[11] Harrington LE, Most RV R, Whittin JL, Ahmed R. Recombinant vaccinia virus-induced T-cell immunity: quantitation of the response to the virus vector and the foreign epitope. *J Virol* 2002;76(7):3329-37.

[12] Lemckert AA, Sumida SM, Holterman L, Vogels R, Truitt DM, Lynch DM, et al. Immunogenicity of heterologous prime-boost regimens involving recombinant adenovirus serotype 11 (Ad11) and Ad35 vaccine vectors in the presence of anti-ad5 immunity. *J Virol* 2005;79(15):9694-701.

[13] Iglesias E, Ruiz M, Carrazana Y, Cruz LJ, Aguilar A, Jiménez V, et al. Chimeric Proteins Containing HIV-1 T Cell Epitopes: Expression in *E. coli*, Purification and Induction of Antibodies in Mice. *Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics* 2001;5(1):109-20.

[14] Vázquez-Blomquist D, Iglesias E, González-Horta EE, Duarte CA. The HIV-1 chimeric protein CR3 expressed by poxviral vectors induces a diverse CD8+ T cell response in mice and is antigenic for PBMCs from HIV+ patients. *Vaccine* 2003;22(2):145-55.

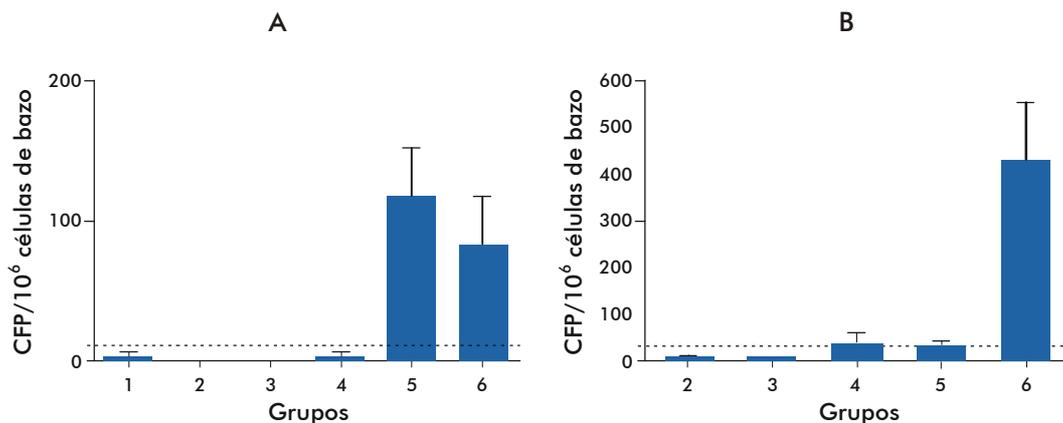


Figura 1. Cuantificación de la respuesta específica anti-CR3 con el ensayo ELISPOT. Ratones Balb/c (H-2d) se inmunizaron por la vía in (A) y sc (B) con: 1, Placebo; 2, S+C; 3, CR3; 4, CR3+C; 5, CR3+S; 6, CR3+S+C. Los esplenocitos se extrajeron 10 días después de la última dosis y se cuantificaron las frecuencias de las células secretoras de IFN $\gamma$  como respuesta a la estimulación con la proteína CR3. Como resultado, se muestra el número de células formadoras de puntos (CFP) por millón de esplenocitos en mezclas de tres bazos por grupo. La desviación estándar que se representa corresponde a tres pocillos. Los valores de corte se destacan con líneas discontinuas.

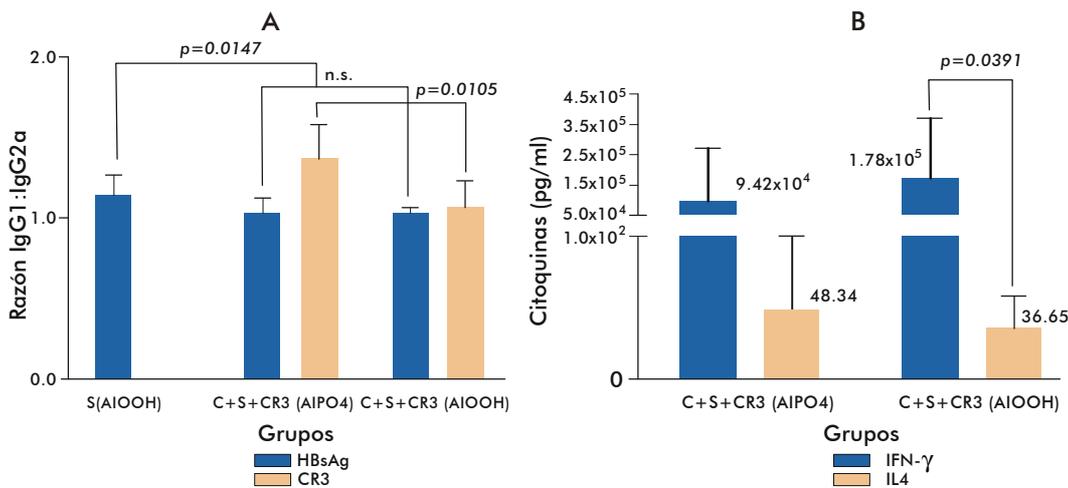


Figura 2. Evaluación de la razón IgG1:2a (A) y la secreción de citoquinas (IFN $\gamma$  e IL-4), luego de la estimulación con CR3 (B). Los sueros para el estudio de los anticuerpos y los esplenocitos para el estudio de la secreción de citoquinas se obtuvieron 10 días después de completado el esquema de inmunización.

### Comparación del efecto adyuvante del fosfato de aluminio con el hidróxido de aluminio

La selección del adyuvante adecuado es un elemento clave en una formulación vacunal. Los adyuvantes de aluminio se describieron por primera vez a inicios del pasado siglo. Aunque muchos adyuvantes experimentales se han descrito, los que están basados en el aluminio permanecen como los más ampliamente usados en las vacunas hasta la actualidad. A su vez, los datos a partir de ensayos con vacunas terapéuticas indican que son necesarias múltiples dosis para incrementar la respuesta inmune, así como el número de pacientes que responden de manera positiva. Por tanto, se necesitan adyuvantes que posean muy baja toxicidad. En tal sentido, los adyuvantes de aluminio son ideales, ya que han mostrado un perfil de seguridad elevado en millones de dosis administradas a seres humanos. El hidróxido de aluminio (AIOOH) y el fosfato de aluminio (AIPO4) son los adyuvantes de aluminio más usados en vacunas comerciales. El primero es el adyuvante de la vacuna Heberbiovac HB, producida en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y utilizada para la prevención de la infección por el VHB. Por esto, se decidió comparar, de manera experimental, la respuesta inmune inducida por ambos adyuvantes en la formulación previamente seleccionada [17].

Los experimentos con ratones inmunizados con la mezcla de los Ag HBcAg + HBsAg + CR3 evidenciaron que el AIOOH favoreció una mayor polarización Th1 de la respuesta anti-CR3 (razón IgG1/IgG2a) ( $p < 0.05$ ), y potenció la secreción de IFN $\gamma$  con respecto a la IL-4 ( $p < 0.05$ ) (Figura 2). La absorción de los Ag a ambos adyuvantes es muy eficiente, por lo que este factor no permitió explicar las diferencias halladas. Anteriormente, otros autores encontraron diferencias entre ambos adyuvantes [18]; pero aún las causas son desconocidas. A partir de estos resultados, se decidió continuar el estudio con el empleo de AIOOH para las inmunizaciones parenterales.

### Comparación entre diferentes formas de preparar la mezcla de los Ag

En los experimentos previos, los Ag se mezclaron y adyuvaron al mismo tiempo con el hidróxido de aluminio (mezcla simple); sin embargo, es importante la comparación entre diferentes formas de conformar la mezcla. Cuando se trabaja con varios Ag es posible que las interacciones entre ellos influyan en la adsorción del agregado resultante y, como consecuencia, la presentación al sistema inmune, lo cual podría generar diferencias cuantitativas y/o cualitativas en las respuestas inmunes de los animales.

Para estudiar y comparar *in vivo* el efecto que tiene la forma de preparar la mezcla de Ag sobre la frecuencia de células secretoras de IFN $\gamma$ , se realizaron varias mezclas en las que primero se incubaron dos Ag por separado, para más tarde añadir el tercero. Estas mezclas se compararon con la mezcla simple de los tres Ag a la vez. Después de las inmunizaciones no se observaron diferencias estadísticas en cuanto a la frecuencia de células secretoras de IFN $\gamma$  anti-CR3 entre las mezclas; aunque la mezcla simple alcanzó los mayores niveles de secreción (Figura 3). Tomando en

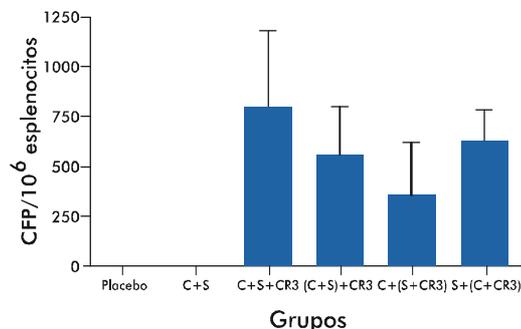


Figura 3. Cuantificación de la respuesta anti-CR3 usando ELISPOT IFN $\gamma$ . Se inmunizaron ratones Balb/c con diferentes formulaciones de los antígenos. Entre paréntesis aparecen los antígenos que se mezclaron primero, antes de la adición del tercero.

[15] Lobaina Y, Palenzuela D, Pichardo D, Muzio V, Guillén G, Aguilar JC. Immunological characterization of two hepatitis B core antigen variants and their immunoenhancing effect on co-delivered hepatitis B surface antigen. *Mol Immunol* 2005;42(3):289-94.

[16] Iglesias E, Thompson R, Carrazana Y, Lobaina Y, García D, Sánchez J, et al. Coinoculation with hepatitis B surface and core antigen promotes a Th1 immune response to a multipitopic protein of HIV-1. *Immunol Cell Biol* 2006;84(2):174-83.

[17] Iglesias E, Franch O, Carrazana Y, Lobaina Y, García D, Sánchez J, et al. Influence of aluminum-based adjuvant on the immune response to multiantigenic formulation. *Viral Immunol* 2006; 19(4):712-21.

[18] Wang S, Liu X, Caulfield MJ. Adjuvant synergy in the response to hepatitis B vaccines. *Vaccine* 2003;21(27-30):4297-306.

consideración que las variantes de mezclas no aportaron una mejora de la respuesta inmune y que son más laboriosas de preparar, se decidió continuar la experiencia con la mezcla simple de los Ag.

**Coinoculaciones por las rutas mucosal y parenteral**

Varios reportes de la literatura han demostrado que las coinmunizaciones por las rutas mucosal y parenteral generan mayores niveles cuantitativos y/o cualitativos de la respuesta inmune [19-22]. Tomando estos trabajos como referencia, se decidió comparar las respuestas inmunes generadas luego de la inmunización parenteral y de las coinoculaciones por las vías nasal y parenteral.

Los ratones de los grupos experimentales y controles se inmunizaron con iguales dosis totales para cada Ag, de las mezclas preparadas con los mismos procedimientos y similar adyuvación. Los resultados se correspondieron con los reportados por otros grupos. En tal sentido, se evidenció que los animales inmunizados por vía in y luego se desarrollaron mayor frecuencia de células secretoras de IFN $\gamma$  anti-CR3 en comparación con los inoculados por la vía sc solamente (Tabla 1). Además, se obtuvo una reducción en la razón de anticuerpos IgG1:2a anti-HBsAg. Estos estudios demostraron que la combinación de rutas de inoculación aporta mejoras en algunos parámetros inmunes medidos en compartimientos sistémicos con respecto a la inmunización parenteral.

**Influencia de la respuesta preexistente anti-HBsAg y anti-HBcAg sobre la respuesta anti-CR3**

El estudio de la influencia de la respuesta preexistente a los Ag del VHB es muy importante porque podría limitar el desarrollo de la respuesta anti-CR3 para esquemas terapéuticos en pacientes seropositivos al VIH-1 coinfectados con el VHB, en aquellos pacientes que eliminaron el VHB espontáneamente y en los vacunados contra la hepatitis B. Por esto, se decidió evaluar la influencia de la respuesta anti-HBcAg y la respuesta combinada anti-HBcAg y anti-HBsAg sobre la proliferación de células CD4+ y CD8+ anti-CR3. El examen de la respuesta anti-HBcAg simula la condición de un paciente enfermo crónico con VHB y la respuesta combinada a ambos Ag, la inmunidad natural a la infección, lo cual es el peor escenario que se puede analizar.

Luego de inmunizar ratones para generar las respuestas preexistentes a los Ag del VHB, se inmunizaron con la mezcla CR3 + HBsAg + HBcAg. Como muestra la figura 4, la respuesta proliferativa de las células CD4+ específicas para CR3 no se afectó significativamente en ninguno de los dos escenarios evaluados. La respuesta proliferativa de las células

Tabla 1. Comparación entre los grupos inmunizados por vía parenteral y por ambas rutas. Resultados de CFP por 10<sup>6</sup> de células de bazo en ELISPOT IFN $\gamma$  anti-CR3 luego de la reestimulación *in vitro* durante siete días.

Grupo	Ratón	CR3	Grupo	Ratón	CR3
CR3 + HBcAg + HBsAg vía sc	1	1 260	CR3 + HBcAg + HBsAg 1ra. y 2da. Dosis por vía in; 3ra. y 4ta. Dosis por vía sc	1	3 710
	2	1 160		2	>8 000
	3	800		3	>8 000
	4	1 220		4	2 540

CD8+ solo se afectó de manera significativa cuando hubo respuestas previas a ambos Ag del VHB ( $p < 0.05$ ); aunque no desapareció por completo y llegó a tener aún un nivel importante. En cualquier caso, este resultado demostró que la respuesta preexistente a los Ag del VHB no impidió el desarrollo de la respuesta celular anti-CR3.

**Conclusiones**

Estos resultados evidencian la potencialidad de la mezcla HBsAg + HBcAg como adyuvante Th1 para proteínas obtenidas por vía recombinante. En particular, se mostró que estos Ag del VHB posibilitan la inducción de una respuesta Th1 con células CD4+ y CD8+ específicas para la proteína multiepitópica CR3 del VIH-1. Esto no impide el desarrollo de las respuestas humoral y celular anti-HBsAg. En tal sentido, con la formulación evaluada existe la posibilidad de obtener protección contra la hepatitis B como un beneficio adicional. Para proteger esta estrategia novedosa se presentó una aplicación de patente en el año 2003 [23]. Actualmente se realizan diversos estudios para profundizar en el conocimiento de los mecanismos que explican estos resultados.

[19] Makitalo B, Lundholm P, Hinkula J, Nilsson C, Karlen K, Morner A, et al. Enhanced cellular immunity and systemic control of SHIV infection by combined parenteral and mucosal administration of a DNA prime MVA boost vaccine regimen. *J Gen Virol* 2004;85(Pt 8):2407-19.

[20] Vajdy M. Current efforts on generation of optimal immune responses against HIV through mucosal immunisations. *Drugs R D* 2006;7(5):267-88.

[21] Vajdy M, Singh M, Kazzaz J, Soenawan E, Ugozzoli M, Zhou F, et al. Mucosal and systemic anti-HIV responses in rhesus macaques following combinations of intranasal and parenteral immunizations. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004;20(11):1269-81.

[22] Vajdy M, Singh M, Ugozzoli M, Briones M, Soenawan E, Cuadra L, et al. Enhanced mucosal and systemic immune responses to *Helicobacter pylori* antigens through mucosal priming followed by systemic boosting immunizations. *Immunology* 2003;110(1):86-94.

[23] Aguilar JC, Iglesias E, Lobaina Y, Muzio V, Guillen G, et al., inventors; Pharmaceutical compositions for therapeutic use patent CU20030000240 20031020 2003 2005-04-28.

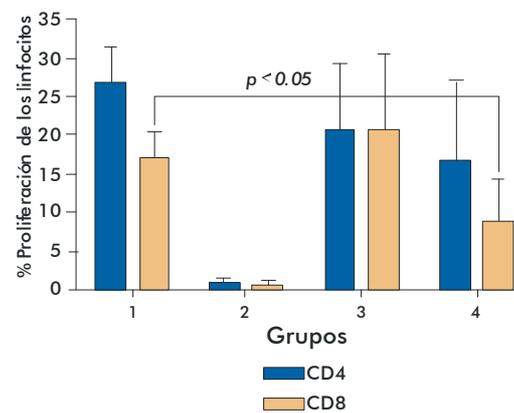


Figura 4. Estudio de proliferación de células CD4+ y CD8+ anti-CR3 tras utilizar la tinción con CFSE y el análisis por citometría de flujo. Grupos: 1, control positivo; 2, placebo; 3, con respuesta preexistente al HBcAg; 4, con respuesta preexistente al HBcAg y al HBsAg.