



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 313 791**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99944505 .9**
96 Fecha de presentación : **25.08.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1107785**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.06.2001**

54 Título: **Procedimiento de vacunación mediante ADN.**

30 Prioridad: **26.08.1998 GB 9818627**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **GLAXO GROUP LIMITED**
Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue
Greenford, Middlesex UB6 0NN, GB

72 Inventor/es: **Charo, Jehad y**
Kiessling, Rolf

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 313 791 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

Procedimiento de vacunación mediante ADN.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a mejoras en la vacunación mediante ADN y en particular, pero no exclusivamente, a procedimientos de vacunación de un mamífero contra estados patológicos, a composiciones de vacuna y al uso de ciertos compuestos en la fabricación de medicamentos.

10 **Antecedentes de la invención**

Las técnicas de vacunación tradicionales que implican la introducción en un sistema animal de un antígeno que puede inducir una respuesta inmune en el animal, y por lo tanto protegen al animal contra infección, se han conocido durante muchos años. La memoria descriptiva de la patente WO 94/07479 describe compuestos que pueden ser útiles como inmunopotenciadores para potenciar la respuesta inmune a las técnicas de vacunación tradicionales. Después de la observación a comienzos de los años 1990 ese ADN de plásmido se puede transfectar directamente a células animales *in vivo*, los esfuerzos de investigación significativos se han entendido que desarrollan técnicas de vacunación basadas en el uso de plásmidos de ADN para inducir respuestas inmunes, mediante la introducción directa de en animales de ADN que codifica péptidos antigénicos. Tales técnicas, que se denominan “inmunización por ADN” o “vacunación de ADN”, se han usado ahora para inducir respuestas inmunes protectoras de anticuerpo (humoral) y mediada por célula (celular) en una amplia diversidad de modelos preclínicos para las enfermedades virales, bacterianas y parásitas. La investigación también está en proceso con relación al uso de las técnicas de vacunación de ADN en el tratamiento y protección contra cáncer, alergias y enfermedades autoinmunes.

Las vacunas de ADN usualmente constan de un vector plásmido en el que se inserta un fuerte promotor viral, el gen de interés que codifica un péptido antigénico y una secuencia de poliadenilación/transcripción. El gen de interés puede codificar una proteína completa o simplemente una secuencia de péptido antigénica con relación al patógeno, tumor u otro agente que se pretende que esté protegido contra él. El plásmido se puede desarrollar en bacterias, tal como por ejemplo *E. coli* y después aislarse y prepararse en un medio apropiado, dependiendo de la vía propuesta de administración, antes de que se administre al huésped. Después de la administración se recoge el plásmido mediante las células del huésped donde se produce el péptido codificado. El vector plásmido se preparará preferiblemente sin un origen de replicación que es funcional en células eucarióticas, con el fin de prevenir la replicación del plásmido en el huésped de mamífero e integración con el ADN cromosómico del animal de referencia.

Existen numerosas ventajas de la vacunación de ADN con relación a las técnicas de vacunación tradicionales. En primer lugar, se predice que debido a que las proteínas que están codificadas por la secuencia de ADN se sintetizan en el huésped, la estructura o conformación de la proteína similar a la proteína nativa asociada al estado patológico. Es también probable que la vacunación de ADN ofrecerá protección contra diferentes cepas de un virus, mediante la generación de respuestas de linfocitos T citotóxicos que reconocen epítopes de proteínas conservadas. Además, debido a que los plásmidos se recogen mediante las células huésped donde la proteína antigénica se puede producir, junto con la respuesta inmune de larga duración se inducirá. La tecnología también ofrece la posibilidad de combinar diversos inmunógenos en una sola preparación para facilitar la inmunización simultánea en relación con un número de estados patológicos.

La información útil de los antecedentes en relación a la vacunación de ADN se proporciona en (1), cuya descripción se incluye en el presente documento en su totalidad por referencia.

A pesar de las numerosas ventajas asociadas a la vacunación de ADN con relación a las terapias tradicionales de vacunación, sin embargo no existe un deseo de desarrollar los compuestos adyuvantes que servirán para incrementar la respuesta inmune inducida por la proteína que está codificada por el ADN de plásmido que se administra a un animal.

Una razón para esto es que mientras las vacunas de ADN tienden a funcionar bien en modelos animales, existe evidencia de una potencia algo más débil en especies superiores tales como primates no humanos (2,3), que se piensa es predictivo de la probable potencia en seres humanos. Los adyuvantes también pueden ser útiles para corregir una desviación inapropiada de respuesta inmune a partir de una respuesta de Th1 a Th2 que puede estar asociada a la vacunación de ADN, especialmente cuando se administra directamente a la epidermis (4). Finalmente, se ha reconocido que el propio ADN, mediante los motivos CpG, puede mostrar algunas propiedades adyuvantes (5,6,7) que son preponderante en animales más pequeños administrados con las vacunas de ADN por vía intramuscular, pero reducidas en especies superiores o cuando se administran cantidades pequeñas de ADN, tal como la administración mediante “pistola génica”.

De acuerdo con lo anterior, un objeto de la presente invención proporciona compuestos adyuvantes que se pueden usar junto con los procedimientos de vacunación de ADN. También es un objeto proporcionar procedimientos de vacunación de ADN mejorados que implican tales adyuvantes, así como composiciones que incluyen los adyuvantes relacionados. Otros objetos de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la misma. Sin embargo, hasta la fecha la reunión de estos objetos han demostrado que es difícil, en gran medida

debido a diferencias mecánicas asociadas a la vacunación de ADN, cuando se compara con las técnicas de vacuna tradicionales.

La bibliografía reseña numerosos casos de respuestas inmunes humorales en modelos animales, que se producen por la vacunación de ADN. Se han mostrado respuestas de anticuerpos se han mostrado contra la hormona de crecimiento humano y α -1 anti-tripsina (8), contra la influenza NP (9), contra la proteína de envoltura de VIH (10), glicoproteína del virus herfís bovino (11) y antígeno de superficie de la hepatitis B (12), entre otros, después de la administración de ADN de plásmido que codifica los mismos. Las respuestas de células T citotóxicas se han demostrado en modelos animales de vacunación de ADN. La generación de células T citotóxicas se ha demostrado contra NP a partir de la influenza A (13), antígeno de superficie de la hepatitis B (HBs Ag) 65 y antígeno de núcleo (14), y HIV Env (15,16,17) como unos pocos ejemplos. Sin embargo, es interesante indicar, que la respuesta de células T auxiliares parece depender del modo de administración del ADN de plásmido. La administración intramuscular predispone la respuesta de las células T auxiliares predispone la respuesta inmune hacia una respuesta de tipo Th2 (4). Hay que indicar además que un número conocido de agentes inmunopotenciadores conocidos se han ensayado en combinación con las técnicas de vacunación de ADN con existo limitado, o como mucho, mixto. Por ejemplo, mientras la coexpresión de GM-CSF con glicoproteína del virus de la rabia (18) y antígeno carcinoembriónico (CEA (19)), y la coexpresión de B7-1 y B7-2 *M. tuberculosis* HSP 65 (20) o CEA (19), todos inducían titulaciones de anticuerpos mayores que la expresión del antígeno solo, no existe reseña de una respuesta inmune celular potenciada. De manera interesante también, la glicoproteína del virus de la rabia cuando se coadministra con el ADN que codifica el interferon- γ , realmente tenía un efecto inhibitor sobre la respuesta de anticuerpo (18).

Con este antecedente en mente, lo más sorprendente es es indicar que los presentes inventores reseñan compuestos adyuvantes que muestran la acción dual de no solamente la estimulación de la respuesta inmune humoral, pero de manera simultánea estimulando el mecanismos de la respuesta inmune celular. Los compuestos que se ha mostrado recientemente que demuestran este adyuvante notable en relación a la vacunación de ADN se describieron en la Publicación de Patente Internacional N° WO94/07479, en relación con su actividad inmunopotenciadora. Un compuesto particular identificado por los presentes inventores por tener actividad adyuvante de vacuna de ADN favorable es ácido 4-(2-formil-3-hidroxifenoximetil) benzoico, también conocido como tucaresol, que se describió originalmente en el documento EP 0054924. Ninguno de los compuestos ahora identificados por los presentes inventores por ser adecuados para actuar como adyuvantes de vacunas de ADN se han descrito o sugerido previamente por demostrar la actividad inmunogénica humoral y celular que así los adapta al papel como adyuvantes de vacuna de ADN.

Sumario de la invención

De acuerdo con una realización de la presente invención se proporciona un procedimiento de vacunación de un mamífero contra un estado patológico, que comprende la administración a dicho mamífero, dentro de un vector apropiado, de una secuencia de ADN que codifica un péptido antigénico asociado al estado patológico.

Adicionalmente la administración a dicho mamífero de un compuesto que potencia las respuestas inmunes tanto humorales como celulares iniciadas por el péptido antigénico, siendo el compuesto:

ácido 4-(2-formil-3-hidroxifenoximetil) benzoico; y las sales fisiológicamente aceptables del mismo, cuando sea apropiado.

Preferiblemente la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN.

Preferiblemente entre una y siete administraciones del compuesto tienen lugar entre aproximadamente 14 días antes de y aproximadamente 14 días después de la administración de la secuencia de ADN particularmente preferiblemente entre aproximadamente 7 días antes y aproximadamente 7 días después de la administración de la secuencia de ADN, preferiblemente entre aproximadamente 1 día antes y 1 día después de la administración de la secuencia de ADN. La administración más particularmente preferiblemente de los compuestos es sustancialmente simultánea a la administración de la secuencia de ADN, con administraciones adicionales opcionales del compuesto en los días siguientes a la administración de la secuencia de ADN.

Preferiblemente el compuesto se administra una dosis de entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg por administración.

Preferiblemente el mamífero es un ser humano.

Preferiblemente el compuesto es ácido 4-(2-formil-3-hidroxifenoximetil) benzoico. De acuerdo a otra realización de la invención se proporciona una composición de vacuna que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido antigénico asociado a un estado patológico y está dentro de un vector apropiado, y un compuesto que potenciará las respuestas inmunes tanto humorales como celulares en un mamífero que se inician por el péptido antigénico, siendo el compuesto:

ácido 4-(2-formil-3-hidroxifenoximetil) benzoico; y las sales fisiológicamente aceptables del mismo, cuando sea apropiado.

ES 2 313 791 T3

Preferiblemente el compuesto es ácido 4-(2-formil-3-hidroxifenoximetil) benzoico.

De acuerdo con una realización adicional de la presente invención se proporciona el uso de un compuesto en la fabricación de un medicamento, cuando la administración del compuesto a un mamífero potencia las respuestas tanto humorales como celulares iniciadas por un péptido asociado a un estado patológico con un estado patológico, estando el péptido expresado como resultado de la administración a dicho mamífero de una secuencia de ADN que codifica el péptido;

en el que dicho compuesto es

ácido 4-(2-formil-3-hidroxifenoximetil) benzoico; y las sales fisiológicamente aceptable del mismo, cuando sea apropiado.

Preferiblemente el compuesto es ácido 4-(2-formil-3- hidroxifenoximetil) benzoico y se administra preferiblemente a una dosis de entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg por administración.

De acuerdo con una realización adicional de la invención se proporciona una combinación de componentes para la administración separada, secuencial y concomitante en un procedimiento como se ha indicado anteriormente, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un péptido antigénico y el compuesto que potencia las respuestas inmunes tanto celulares como humorales iniciadas por el péptido antigénico.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

Proliferación de células de T de ganglios linfáticos en respuesta al péptido Ova *in vitro* (en presencia de 0,5% de suero de ratón). Los resultados muestran que la respuesta de células T para la ovoalbúmina en PBS (sin adyuvante) y PBS sola, el adyuvante de Freund Completo (CFA) solo con el péptido Ova, lipopolisacárido bacteriano (LPS) solo y combinado con el péptido Ova y *Bacillus Calmette Geurin* (HK-BCG) solo y combinado con el péptido Ova.

Figura 2

Proliferación de células de T de ganglios linfáticos en respuesta al pADN o ADN que codifica ovoalbúmina (PVAC1.Ova) en aislamiento y en combinación con los adyuvantes LPS, CFA, GM-CSF y monocitogénes de *Listeria inactivados por calor* (HKLM).

Figura 3

Efectos de tucaresol sobre la respuesta de anticuerpo específica a hsp65 micobacteriano después de la inmunización con pADN que expresa Mhsp65. Los ratones se inmunizaron con 20 μ g de pADN en dos ocasiones, con tres semanas de diferencia. Dos semanas después de se extrajo sangre y se detectó la proteína IgG (a), IgG2a (b) y IgG1 (c) anti-recombinante M.hsp65 ELISA. $p^* \geq 0,1$ Sin diferencia significativa en la respuesta de anticuerpo específica. $p^{**} \leq 0,05$ para comparación entre p3 o p3,T y p3M.65 y entre p3M.65 y p3M.65 G o p3M.65, T en (a), entre p3 o p3,T y p3M. 65 o p3M.65 G en (b), y entre p3 y o p3,T y p3M.65Gub (c). $p^{***} \leq 0,003$ para comparación entre p3 o p3, T y p3M.65 G o p3M.65,T en (a), para comparación entre p3 y o p3,T y p3M. 65, t y entre p3M.65 y p3M.65, t en (b), y entre p3 y o p3, T y p3M.65, T en (c). p y h son significativos cuando se compara con p3 y p3M.65 respectivamente.

Figura 4

Efecto del tucaresol sobre la respuesta de células T proliferativa. Los esplenocitos de los ratones inmunizados por pADN se cultivaron en la presencia de cualquier S6c-E4 solo o infectados con vaccinia que expresan EBNA-4 9S6C-VE4) o células tumorales de control S6C-gpt de manera individual o infectado o infección con vaccinia. La construcción de vaccinia de control de TK 9S6CgptV). El índice de estimulación se calculó como se ha descrito en la sección de procedimientos.

Figura 5

La respuesta de IFN γ en ratones inmunizados por pADN y el efecto de tucaresol sobre ello. Grupos de ratones se inmunizaron con p3, E4 o E4, T y se estimularon esplenocitos *in vitro* con S6C-E\$, S6C-gpt o nada durante 72 h. Las cubiertas de IFN γ se determinaron mediante ELISA específico.

Figura 6

La respuesta de células T citotóxicas está notablemente potenciada en los ratones tratados por. Los grupos de ratones transgénicos de HLA-A2/kb se inmunizaron dos veces con p3M.65, p3M. 65 γ o p3M.65, T. Los esplenocitos se cultivaron con péptidos de unión de HLA-A2 P\$ durante 5 - 6 días y después se usaron como efectores en el ensayo de liberación 51 Cr convencional. Usando Jk-A2kb como dianas pulsadas con P4, con un péptido irrelevante (Inf) o con ninguno de los procedimientos descritos en la sección de procedimientos.

Figura 7

La inhibición del desarrollo de tumores está potenciada de manera notable en los ratones tratados con tucaresol. Se inmunizaron grupos de ratones de ACA tres veces con p3, E4 o E4,T, y se expusieron posteriormente con células tumorales de 104 S6C. Se sacrificaron los ratones cuando el diámetro de tumor alcanzó 20 mm.

Figura 8

La producción de IFN γ se potencia en ratones tratados con tucaresol después de la inmunización por pistola de gen. Los ratones C57BU6 o ACA se inmunizaron mediante pistola génica pVAC1.PR (Fig 8a) o EBNA-4 (Fig 8b) respectivamente con tucaresol o bien solo o en combinación, o los plásmidos negativos respectivos. Se cultivaron los esplenocitos con un péptido de nucleoproteína, o células tumorales que expresan el antígeno de EBNA-4, o células tumorales negativas de antígeno. Las cubiertas de IFN γ se determinaron ensayo de ELISPOT específico (Fig 8b) o mediante ensayo de ELISA (Fig 8a).

Figura 9

El Tucaresol potencia la respuesta de CTL lítica inducida por la inmunización de ADN de pistola génica. Los ratones C57B1/6 se inmunizaron con ADN de plásmido que codifica la nucleoproteína del virus de la influenza con o sin tucaresol que se administra por vía subcutánea (Fig 9a) o por vía oral (Fig 9b). Los esplenocitos se reestimularon *in-vitro* con virus A/PR8/34. Las técnicas de liberación de europio convencionales se usaron para determinar la lisis específica de células diana emparejadas a MHC pulsadas con péptido NP restringido con H-2D^b.

Descripción detallada de la invención

En la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones anexas, salvo que el contexto lo requiera de otra manera, las palabras “comprende” e “incluye” o variaciones tales como “comprendiendo”, “comprende”, “incluyendo”, “incluye”, etc., se han de considerar inclusivamente, esto es, el uso de estas palabras implicarán la posible inclusión de números enteros o elementos no mencionados específicamente.

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención se refiere a procedimientos de vacunación, y en particular a mejoras de los procedimientos de vacunación que implican la introducción en un mamífero de ADN que codifica una proteína o péptido antigénico, de manera que la proteína o péptido se expresará en el cuerpo de mamíferos mediante lo cual se introduce una respuesta inmune dentro del mamífero, contra la proteína o péptido antigénico. Tales técnicas se conocen bien y se describen completamente en (1) como se ha mencionado anteriormente.

Es posible para los procedimientos de vacunación de acuerdo con la presente solicitud que se adapte a la protección de los mamíferos contra una diversidad de estados patológicos tales como, por ejemplo, infecciones virales, bacterianas o parásitas, cáncer, alergias y trastornos autoinmunes. Algunos ejemplos específicos de trastornos o estados patológicos que se pueden proteger contra o tratado mediante el uso de los procedimientos o composiciones de acuerdo con la presente invención, son como sigue:

Infecciones Virales

Virus de la Hepatitis A, B, C, D & E, HIV, virus herpes 1,2, 6 y 7,-citomegalovirus, varicela zoster, virus papiloma, virus Epstein Barr, virus de la influenza, virus para-influenza, adenovirus, virus coxsakie, virus picorna, rotavirus, virus respiratorios sincitiales, poxvirus, rinovirus, virus rubella, papovirus, virus mumps, virus de sarampión.

Infecciones bacterianas

Micobacterias que provoca TB y lepra, neumococos, bacilos gram negativos aerobios, micoplasma, infecciones por estafilococos, infecciones por estreptococos, salmonelas, clamidias.

Parásitos

Malaria, leishmaniasis, tripanosomiasis, toxoplasmosis, esquistosomiasis, filariasis,

Cáncer

Cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la cabeza y cuello, cáncer renal, melanoma maligno, cancer de laringe, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de próstata.

Alergias

Rinitis debido al ácaro del polvo del hogar, polen y otros alérgenos ambientales.

ES 2 313 791 T3

Enfermedades autoinmunes

Lupus Eritematoso sistémico

5 Se ha de reconocer que estos estados patológicos específicos se han aludido mediante cualquiera de los ejemplos solamente, y no pretende que limiten el alcance de la presente invención.

10 Las secuencias de ADN aludidas en esta solicitud, que se van a expresar dentro de un sistema de mamíferos, con el fin de inducir una respuesta antigénica, puede codificar una proteína entera, o solamente una secuencia de péptidos más corta que es capaz de iniciar una respuesta antigénica. A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones anexas, la frase "péptido antigénico" pretende abarcar todas las secuencias de péptidos o proteínas que son capaces de inducir una respuesta inmune dentro del animal de referencia. Sin embargo, lo más preferiblemente, la secuencia de ADN codificará una proteína completa que está asociada al estado patológico, ya que la expresión de las proteínas completas dentro del sistema animal son más probable que imiten la presentación del antígeno natural, y por lo tanto
15 evocar una respuesta inmune completa. Algunos ejemplos no limitantes de péptidos antigénicos conocidos en relación con los estados patológicos específicos incluyen los siguientes:

HBV - PreS1 PreS2 y proteínas env de superficie, núcleo y pol

20 HIV - gp120 gp40, gp160, p24, gag, pol, env, vif, vpr, vpu, tat, rev, nef

Papiloma - E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, L1, L2

25 HSV - gL, gH, gM, gB, gC, gK, gE, gD, ICP47, ICP36, ICP4

Influenza - hemaglutina, nucleoproteína

TB - superóxido dismutasa micobacteriana, 85A, 85B, MPT44, MPT59, MPT45, HSP10, HSP65, HSP70, HSP90, PPD 19 kDa Ag, PPD 38 kDa Ag.
30

Con el fin de obtener la expresión del péptido antigénico dentro de células de mamíferos, es necesario para la secuencia que codifica el péptido antigénico que se presente en un sistema de vector apropiado. Por ejemplo, el vector seleccionado puede comprender un plásmido bacteriano y un promotor viral fuerte y la secuencia de poliadenilación/de
35 terminación de la transcripción dispuesta en el orden correcto de los péptidos antigénicos. La construcción de vectores que incluyen estos componentes y opcionalmente otros componentes tales como potenciadores, sitios de enzima de restricción y genes de selección, tales como genes de resistencia de antibióticos, se conocen bien por los expertos en la técnica y se explican en detalle en Maniatis *et al* (21).

40 Como es importante para prevenir los plásmidos que se replican dentro del huésped mamífero e integración dentro del ADN cromosómico del animal, el plásmido se producirá preferiblemente sin un origen de replicación que es funcional en células eucarióticas.

45 Los procedimientos y composiciones de acuerdo con la presente invención se puede usar en relación a los procedimientos profilácticos o de tratamiento de todos los mamíferos que incluyen, por ejemplo, animales domésticos, animales de laboratorio, animales de granja, animales salvajes cautivos y lo más preferiblemente, seres humanos.

50 Los compuestos mencionados anteriormente que se han identificado mediante los presentes inventores por mostrar la actividad favorable de potenciación actividad inmunogénica tanto humoral como celular iniciada mediante la administración de vacunas de ADN son compuesto conocidos, reseñados previamente en el documento WO94/07479 por tener propiedades inmunopotenciadoras. En particular, el compuesto preferido ácido 4-(2-formol-3-hidroxifenoximetil) benzoico que también se conoce como tucaresol, se describió originalmente en el documento EP 0054924 y se ha
55 reseñado por tener actividad inmunopotenciadora por ser útil para el tratamiento de diversos trastornos que incluyen HIV, HBV, HCV, tumores y anemia de células falciformes. Se cree que la actividad reseñada de tucaresol se puede explicar por su capacidad para formar bases de Schiff y que por lo tanto se puede sustituir por donantes fisiológicos o grupos carbonilo y proporcionan una señal coestimuladora para las células CD4 Th. Se reseñó previamente que las respuesta de la células CD4 Th potenciada por tucaresol, que favorecen de manera selectiva un perfil de tipo Th 1 sobre Th 2 (22), mientras que los presentes inventores han demostrado que es capaz de potenciar los isotipos tanto Th 1 como Th 2 de anticuerpos en u modelo inmune.
60

65 Por referencia a la potenciación de tanto respuestas inmunes humorales como celulares iniciadas mediante el péptido antigénico, y provocados mediante los compuestos de la presente invención, pretende que transmita que tanto los niveles de anticuerpos y niveles de linfocitos T citotóxicos (CTL) respectivamente se inducirán como resultado de la administración de estos compuestos, comparados con los niveles asociados a la administración de la secuencia de ADN que codifica el péptido antigénico solo. Tales niveles se pueden cuantificar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, como se explicará en los ejemplos anexas.

ES 2 313 791 T3

Los vectores que comprenden las secuencias de ADN que codifican péptidos antigénicos se pueden administrar de una diversidad de maneras. Es posible que los vectores que se van a administrar en una forma desnuda (esto es un ADN desnudo no en asociación con las formulaciones de liposomas, con vectores virales o transfección que facilitan las proteínas) suspendido en un medio apropiado, por ejemplo, una solución salina tamponada tal como PBS y después se inyecta por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal o por vía intravenosa, aunque algunos datos anteriores sugieren que la inyección intramuscular o subcutánea es preferible (23), cuya descripción se incluye en el presente documento en su totalidad por referencia). De manera adicional es posible que los vectores que se van a encapsular mediante, por ejemplo, liposomas o dentro de partículas poliláctida co-glicolida (PLG) (25) para la administración mediante las vías oral, nasal o pulmonar. También es posible, de acuerdo con la reacción preferida de la invención, para la administración por vía intradérmica del vector, preferiblemente mediante el uso de técnicas de pistola génica (particularmente bombardeo de partículas). Tales técnicas pueden implicar la liofilización de una suspensión que comprende el vector y sobre perlas de oro que después se administran a alta presión en la epidermis, tal como, por ejemplo, como se describe en (26). La cantidad de ADN administrado variará de manera significativa, dependiendo de la especie y peso del mamífero que se está inmunizando, la naturaleza del estado patológico que se está tratando/protegiendo contra, el protocolo de vacunación adoptado (es decir, la administración individual contra dosis repetidas), la vía de administración y la potencia y dosis del compuesto adyuvante elegido. Basándose en estas variables, un facultativo médico o veterinario será fácilmente capaz de determinar el nivel de dosificación apropiado.

Es posible para el vector de ADN, que incluya la secuencia de ADN que codifica el péptido antigénico a administrar de una vez en base o administrar de manera repetida, por ejemplo, entre 1 y 7 veces, preferiblemente entre 1 y 4 veces, a intervalos entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 18 meses. Sin embargo, una vez más, este régimen de tratamiento dependerá de manera significativa del tamaño y especie de animal de referencia, la enfermedad que se está tratando/protegida, la cantidad de ADN administrado, la vía de administración, la potencia y dosis de compuesto adyuvante seleccionado entre y otros factores que serían evidentes para los expertos veterinarios y facultativos médicos.

El compuesto adyuvante especificado en e31 presente documento se puede administrar de manera similar mediante una diversidad de vías de administración diferentes, tal como por ejemplo, mediante las vías oral, nasal, pulmonar, intramuscular, subcutánea, intradérmica o tópica. Esta administración puede tener entre aproximadamente 14 días y después de aproximadamente 14 días de la administración de la secuencia de ADN, preferiblemente entre aproximadamente 7 días antes y aproximadamente 7 días después de la administración de la secuencia de ADN, más preferiblemente entre aproximadamente 24 horas antes y 24 horas después de la administración de la secuencia de ADN, y particularmente preferiblemente, sustancialmente de manera simultánea con la administración de la secuencia de ADN. Por "sustancialmente simultánea" significa que la administración del compuesto es preferiblemente al mismo tiempo que se administra la secuencia de ADN, o si no, al menos dentro de unas pocas horas en cualquier lado de la administración de la secuencia de ADN. En el protocolo de tratamiento más preferido, el compuesto se administrará sustancialmente de manera simultánea en aproximadamente una base diaria durante hasta aproximadamente 14 días después de la administración de la secuencia de ADN, preferiblemente diariamente durante los 3 días siguientes a la administración inicial. Es obvio, que este protocolo se puede variar según sea necesario, se acuerdo con el tipo de variables mencionadas anteriormente. Una vez más, dependiendo de de tales variables, la dosis de administración también variará, pro puede, por ejemplo, variar entre aproximadamente 0,1 mg por kg y aproximadamente 100 mg por kg, donde "por kg" se refiere al peso de cuerpos del mamífero de referencia. Esta administración del compuesto adyuvante se repetirá preferiblemente con cada administración posterior o de refuerzo de la secuencia de ADN. Más preferiblemente, la dosis de administración estará entre aproximadamente 0,1 mg por kg y aproximadamente 10 mg por kg, preferiblemente entre aproximadamente 1 mg por kg y aproximadamente 5 mg por kg.

Aunque es posible para los compuestos adyuvantes que se administren en el estado de material prima química, es preferible para al administración en la forma de una composición farmacéutica. Esto es, los compuestos preferiblemente se combinar preferiblemente con uno o más vehículos farmacéutica o veterinariamente aceptables, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. El (los) vehículo(s) debe(n) ser "aceptables" en el sentido de ser compatible(s) con otros ingredientes dentro de la formulación, y no ser peligroso para el receptor del mismo. La naturaleza de las formulaciones variará naturalmente de acuerdo con la vía de administración propuesta, y se puede preparar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Todos los procedimientos incluyen la etapa de poner en asociación un compuesto de la invención (el compuesto adyuvante) con un vehículo o vehículos apropiado(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de manera uniforme e íntima el compuesto con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesario conformando el producto se puede en la formulación deseada. Las formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración oral se pueden presentar como unidades tales como cápsulas, sellos o comprimidos cada una conteniendo una cantidad predeterminada del ingrediente activo; en forma de polvo o de gránulos; en forma de una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o en forma de una emulsión de aceite en agua o una emulsión agua en aceite. El ingrediente activo también puede estar presente en forma de un bolo, electuario o pasta.

Un comprimido se puede preparar mediante compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos se pueden preparar mediante compresión en una máquina adecuada del ingrediente activo en una forma suelta tal como polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, tensioactivo o agente de dispersión. Los comprimidos moldeados se pueden elaborar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

ES 2 313 791 T3

Los comprimidos se pueden opcionalmente recubrir o rayar y se pueden formular de manera que se proporcione liberación lenta o controlada del ingrediente activo.

Las formulaciones para inyección mediante, por ejemplo, las vías de administración intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que pueden hacer la formulación isotónica con la sangre del receptor propuesto, y las suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvo, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito previamente. Las formulaciones adecuadas para la administración pulmonar mediante la cavidad bucal o nasal se presentan de tal manera que las partículas que contienen el ingrediente activo, que de manera deseable tienen un diámetro de 0,5 a 7 micrómetros, se distribuyen en el árbol bronquial del receptor. Las posibilidades para tales formulaciones que están en la forma de polvos finamente desmenuzados que pueden de manera conveniente estar presente o bien en una cápsula perforada, de manera de, por ejemplo, gelatina para uso en un dispositivo de inhalación, o como alternativa, en forma de una formulación de un autopropulsor que comprende ingrediente activo, un propulsor líquido adecuado y opcionalmente, otros ingredientes tales como tensioactivo y/o un diluyente sólido. Las formulaciones de autopropulsores también se pueden emplear cuando el ingrediente activo se dispensa en la forma de gotitas de una solución o suspensión. Tales formulaciones autopropulsoras son análogas a las conocidas en la técnica y se pueden preparar mediante procedimientos establecidos. Se proporcionan de manera adecuada con o bien una válvula operable manualmente o que funciona automáticamente que tiene las características de pulverización deseadas, de manera ventajosa la válvula es de un tipo de medición que distribuye un volumen fijo, por ejemplo, 50 a 100 μL , tras cada operación de la misma.

En una posibilidad adicional, el ingrediente activo puede estar en la forma de de una solución de para uso en un atomizador nebulizador, mediante en que una corriente de aire acelerada o agitación ultrasónica se emplea para producir una neblina de gotitas finas para inhalación.

Las formulaciones adecuadas para la administración intranasal en general incluyen presentaciones similares a las descritas anteriormente para la administración pulmonar, aunque se prefiere que tales formulaciones tengan un diámetro de partícula en el intervalo de aproximadamente 10 y aproximadamente 200 micrómetros, que permiten la retención dentro de la cavidad nasal. Esto se puede lograr mediante, según sea apropiado, el uso de un polvo de un tamaño de partícula adecuado, o elección de una válvula apropiada. Otras formulaciones adecuadas incluyen polvos rústicos que tienen un diámetro de partícula en el intervalo de aproximadamente 20 y aproximadamente 500 micrómetros, para la administración mediante una inhalación rápida a través del tramo nasal desde un recipiente mantenido cerca de la nariz, y gotas nasales que comprenden aproximadamente 0,2 y 5% p/p del ingrediente activo en solución acuosa u oleosa. Los ejemplos de formulaciones apropiadas que comprenden los compuestos adyuvantes de acuerdo con la presente invención se proporcionan en el documento WO94/07479, cuya descripción se incluye en el presente documento por referencia en su totalidad.

En una realización preferida de la invención, es posible que el que el vector que comprende la secuencia de ADN que codifica el péptido a administrar en la misma formulación como el compuesto adyuvante. En una realización particularmente preferida el compuesto adyuvante se prepara en una forma adecuada para la administración por pistola génica, y se administra mediante la vía sustancialmente simultánea a la administración de la secuencia de ADN. Para preparación de las formulaciones adecuadas para uso de esta manera, puede ser necesario para el compuesto adyuvante que se liofilice y se adhiera sobre, por ejemplo, perlas de oro que son adecuadas para la administración por pistola de genes.

Incluso si no se formulan juntos, puede ser apropiado para el compuesto adyuvante que se administre en o aproximadamente en el mismo sitio de administración que la secuencia de ADN.

Otros detalles de las preparaciones farmacéuticas se pueden encontrar en (24), cuya descripción se incluye en el presente documento en su totalidad, a modo de referencia.

La presente invención se describirá ahora además, con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes:

Ejemplo 1

60 *Actividad en adyuvantes convencionales en la vacunación de ADN comparada con la administración de péptidos*

Células linfoides de ratones transgénicos TCR, que expresan un receptor específico para un antígeno de ovoalbúmina se transfirieron en ratones singénicos normales. Después estos ratones se inmunizaron de manera subcutánea con péptido de ovoalbúmina con o sin adyuvantes. Tres días más tarde, las células de los ganglios linfáticos regionales se retiraron y se midió su respuesta proliferativa al péptido de ovoalbúmina mediante la incorporación de timidina tritiada en ADN. Esto proporciona una medición del grado de cebado de células T específicos que se producen *in vivo* en la respuesta a la inmunización. La inmunización con péptido de ovoalbúmina solo (O) da como resultado un significativo pero bajo nivel de cebado de células T comparado con la inmunización simulada (●). Lipopolisacárido

bacteriano (LPS) (Δ), adyuvante de Freund completo (CFA) (\square) y *Bacillus Calmette Geurin* (HK-BCG) (∇), todos proporcionaron potenciación significativa de esta respuesta. En ausencia de un antígeno de inmunización la administración de lipopolisacárido bacteriano (LPS) (\blacktriangle), adyuvante de Freund completo (\blacksquare), y *Bacillus Calmette Geurin* (HK-BCG) (\blacktriangledown), tiene efectos mínimos sobre la proliferación posterior en respuesta al péptido de ova.

5

Células linfoides de ratones transgénicos TCR, que expresan un receptor específico para un antígeno de ovoalbúmina se transfirieron en ratones singénicos normales. Después estos ratones se inmunizaron de manera subcutánea (mediante una pistola de genes) con ADN de plásmido o con construcción de ADN de plásmido que codifica ovoalbúmina (pVAC1.Ova) con o sin adyuvantes proporcionados por vía subcutánea. Tres días después, las células de ganglios linfáticos regionales se retiraron y se midió la respuesta proliferativa a péptido de ovoalbúmina mediante la incorporación de timidina tritiada en ADN. Esto proporciona una medición del grado de cebado de células T específicas que se producen *in vivo* en respuesta a inmunización. Se inmunizó un grupo de control con péptido de ovoalbúmina en adyuvante de Freund completo que produjo cebado de células T sustancial (\blacklozenge). La inmunización de ADN con pVAC1.Ova (Δ) produjo un cebado de células T significativo comparado con el vector vacío (O). Sin embargo, por el contrario que la inmunización de péptido convencional, ninguno de los adyuvantes era capaz de potenciar esta respuesta a la inmunización de ADN. LPS (\blacktriangle), monocitogenes de *Listeria* inactivados por calor (HKLM) (\blacktriangledown), GM-CSF (\diamond), y adyuvante de Freund completo (∇), fracasan todos para potenciar la respuesta a la vacunación de ADN. [Se observó una alta respuesta anómala en el control de vector vacío usando HKLM como adyuvante].

20 Ejemplo 2

El Tucaresol potencia la producción de anticuerpos específicos de antígeno

Se analizó el efecto de tucaresol sobre la inmunización con un ADN de plásmido que codifica el antígeno de la proteína 65 (M.hsp65) de choque térmico micobacteriana, y se comparó el efecto de tucaresol a la de los plásmidos que expresan las citoquinas GM-CSF e IFN γ .

Se inmunizaron grupos de ratones por vía intramuscular (i.m.) con 20 μ g de un plásmido (p3). Se pudieron detectar cantidades significativas de anticuerpos M>hsp65 en suero de ratones inmunizados con p3M.65, pero no en los inmunizados con p3 (Fig. 3a). Los títulos de anticuerpos se incrementaban de manera notable cuando se administró por vía subcutánea 1 mg de tucaresol de manera simultánea con el plásmido M.hsp 9p3M.65, T). Por el contrario, no se detectó ningún incremento en la respuesta de anticuerpo específica en un grupo de ratones inmunizado con el plásmido de control y tucaresol (p3, T), excluyendo la posibilidad de que un incremento general en los anticuerpos de reacción cruzada no específicos debido al alto grado de la inmunopotenciación asociado a la administración de tucaresol responsable del efecto observado. (Fig. 3a).

Los inventores también compararon en el mismo experimento el efecto de tucaresol con el de la inyección de plásmidos que expresan las citoquinas GM-CSF y IFN γ . Se administró el plásmido p3M.65 solo o en combinación equimolar con o bien GM-CSF que expresa plásmido (p3M.65, G), un plásmido que expresa IFN γ (p3M.65, γ), o una mezcla de GMCSF y plásmidos que expresan IFN γ (p3M.65, G γ). Los títulos anti-M.hsp65 se incrementaron de manera notable cuando el plásmido GM-CSF se incluyó en la inmunización cuando se compara con p3M65. Por el contrario con el efecto potenciador del plásmido GM-CSF sobre la respuesta de anticuerpo específica de M.hsp65, fue una respuesta de anticuerpo no significativa cuando el plásmido que expresa IFN γ se incluyó en línea con los datos publicados anteriormente. La combinación de ambos plásmidos de citoquina parecían antagonizar el efecto potenciador del plásmido GM-CSF, reduciendo la respuesta hasta niveles esencialmente similares al observado cuando se inmuniza con p3M.65 solamente (datos no mostrados). De manera colectiva, estos resultados demuestran que el tucaresol tiene una potente capacidad para potenciar la respuesta de anticuerpos inducida por la inmunización genética con el antígeno M.hsp65, comparable con el efecto del plásmido GM-CSF.

Los inventores han analizado el isotipo de los anticuerpos anti-M.hsp65. Los anticuerpos inmunizados con p3M.65 producían cantidades significativas de anticuerpos IgG2a anti-M.hsp65. Este título se incremento de manera significativa ($P = 0,003$) en ratones que reciben tucaresol (Fig. 3b). Esta potenciación clara de una respuesta de anticuerpo asociada a Th1 era única como inmunización con p3M.65,G, p3M.65 γ o p3M.65 G γ podría no ejercer tal efecto. La inclusión del plásmido que expresa IFN γ en la inmunización no potenció la respuesta de anticuerpo IgG2a anti-M.hsp65.

Una respuesta de anticuerpo anti-M.hsp65 IgG1 asociada a Th2 no se podría detectar en una cantidad significativa de ratones que reciben p3M.65,G, p3M.65 γ o p3M.65 G γ . Esta respuesta se indujo en una cantidad significativa ($P = 0,003$) sin embargo, en los ratones que reciben p3M.65, T y hasta un grado menor ($P = 0,027$) en ratones inmunizados con pM.65G cuando se compara con ratones inmunizados con p3 (Fig. 3c).

Tomados conjuntamente, los datos de los investigadores prueban que un incremento significativo en la respuesta de anticuerpos específico como respuesta de la inmunización genética se puede lograr mediante la administración de tucaresol. Aunque esta administración potenció en gran medida la respuesta asociada a Th1, también indujo una respuesta de anticuerpo asociada a Th2. Esta es la primera vez que el tucaresol se reseña que potencia la producción de una respuesta de anticuerpo específica.

Ejemplo 3

El Tucaresol potencia la respuesta proliferativa de células T específica

5 Los inventores a continuación analizan el efecto de tucaresol sobre la respuesta de células T proliferativa inducida por la vacunación con pADN que expresa el número 4 del antígeno nuclear (EBNA-4) del Virus de Epstein Barr (EBV). Se inmunizaron grupos de ratones por vía i.m. con plásmido de control p3 o con el plásmido que expresa EBNA-4 (E4) o con E4 más el tratamiento con tucaresol (E4, T). Se detectó una respuesta mínima proliferativa en los cultivos de esplenocitos a partir de ratones inmunizados con E4 cuando se estimulan con la línea (S6C-E4) de carcinoma transfectado con EBNA-4 singénico. De manera interesante, una respuesta proliferativa mucho más fuerte a S6C-E4 se obtuvo con esplenocitos de ratones inmunizados por vía i.m. con el E4 y tratados por vía s.c. con tucaresol (Fig. 4). Los estimuladores infectados con EBNA-4 (S6C-VE4) también indujeron una respuesta proliferativa mayor que S6C-E4 en los esplenocitos a partir de ratones inmunizados tanto E4 y E4, T como se ha descrito previamente. La proliferación se calculó como índice de simulación (SI) usando la fórmula: SI = proliferación de esplenocitos hacia S6C-EBNA-4 transfectante (infectados con EBNA-4 vaccinia)/proliferación de esplenocitos hacia S6C-gpt (infectados con TK-vaccinia) transfectante control. De nuevo, esta respuesta se localizó como antígeno ya que no era detectable proliferación en los esplenocitos de los ratones inmunizados con control (p3) hacia células infectadas con S6C-E4 o EBNA-4 vaccinia por encima de las de infectados con S6C-gpt o control TK- vaccinia S6C-gptV respectivamente (Fig. 4).

Ejemplo 4

El Tucaresol potencia de manera significativa la producción de las citoquinas Th-1

25 La inmunización con pADN está asociada con una respuesta de Th-1 predominante como se caracteriza mediante la producción de citoquinas Th1 que incluyen IFN γ . Para determinar la capacidad de tucaresol para potenciar esta respuesta de Th-1, se inmunizaron los ratones por vía i.m. con p3, E4 o E4 con la administración simultánea de tucaresol por vía s.c. Se produjo poca, si no ninguna respuesta a partir de IFN γ por los esplenocitos a partir de los esplenocitos de ratones inmunizados con E4 solamente en respuesta a la estimulación específica con S6C-E4 cuando se compara con la producción del esplenocitos de control a partir de ratones inmunizados con p3 o la producción en respuesta a S6C-gpt. De manera interesante, los esplenocitos a partir de ratones inmunizados con e4 y tratados con tucaresol producidos en las cantidades más altas de IFN γ en respuesta a la estimulación específica *in vitro* con S6C-E4 pero no lo hicieron en respuesta a la estimulación control con S6C- gpt. Los inventores fueron capaces de detectar la producción de citoquina IL- 4 de Th2 en respuesta a estimulación específica en cultivos de esplenocitos de cualquier grupo (datos no mostrados). Los inventores por lo tanto concluyen que la administración de tucaresol conjuntamente con la vacunación de pADN es un camino altamente eficaz de promover una respuesta de citoquina dominada con Th1.

Ejemplo 5

Aumento de la respuesta de CTL específica por tucaresol

40 Para investigar el efecto de tucaresol sobre la respuesta de células T específica (CTL) inducida por vacunación con pADN, los inventores han inmunizado ratones transgénicos HLA A2 inmunizados dos veces con o bien p3 M.65, p3M.65 γ o p3M.65, T. Dos semanas después de la última inmunización los esplenocitos de los ratones inmunizados se estimularon una vez con el epítipo de péptido restringido de HLA-A2 derivado de la molécula de hsp65 micobacteriana, y los cultivos ensayados para la actividad de CTL específica contra la línea de células HLA-A2/kb Jurkat (Jk-A2/kbds) no pulsadas o pulsadas con el péptido afín o con un control del péptido de influenza restringido de HLA A2. Los esplenocitos de los ratones inmunizados con p3M.65 y tucaresol (p3M.65,T) desarrollaron alta actividad de CTL contra las células diana pulsadas con el epítipo M.hsp65 afín mientras su actividad lítica contra las células Jk-A2/kb no pulsadas o pulsadas con el péptido de influenza de control era mucho más bajo (Fig. 6). Por el contrario, los esplenocitos de los ratones inmunizados con el p3M.65 sin ninguno de los agentes coestimuladores eran casi totalmente inactivos. La inclusión del plásmido IFN γ conjuntamente con la vacuna de p3M.65 (p3M.65 γ) potenció la actividad de CTL de los esplenocitos cuando se compara con la actividad de los esplenocitos derivados de esplenocitos derivados de los ratones inmunizados con p3M. 65 solamente, pero esta citotoxicidad era solamente 30 - 50% del observado con los esplenocitos de os ratones tratados con tucaresol. Los inventores por lo tanto concluyeron que el tucaresol es un agente muy eficaz para potenciar el desarrollo de CTL específico cuando se proporciona conjuntamente con la vacunación con pADN.

Ejemplo 6

*Efecto de tucaresol sobre la inhibición de desarrollo de tumores *in vivo* después de la inmunización con un plásmido que expresa el antígeno nuclear 4 de virus de Epstein Barr (EBNA-4)*

65 El virus de Epstein Barr ha estado implicado en algunos cánceres. Los inventores analizaron el efecto de tucaresol sobre la inhibición del desarrollo de tumores *in vivo* como resultado de la vacunación con pADN vaccina con un plásmido que expresa EBNA-4 (Fig 7). Los ratones se inmunizaron mediante inyección intramuscular con 40 μ g de o bien plásmido simulado de control pCDNA3 (P3), plásmido que expresa EBNA-4 (E4) o plásmido que EBNA-4

ES 2 313 791 T3

seguido 1, 2, 3 y 4 días después de la administración de 200 μg de tucaresol por vía s.c. i.e. 800 μg de tucaresol (E4T). Este programa de inmunización se repitió 1 mes y 2 meses después de la inmunización inicial. Dos semanas después de la última inmunización los ratones se expusieron con células tumorales 104 S6C-E4 por vía subcutánea s.c. Se sacrificaron los ratones cuando el tumor alcanzó un diámetro de 20 mm. La Figura 7 muestra el tucaresol potencia de manera significativa la capacidad de EBNA-4 to de inhibir el desarrollo de tumor.

Ejemplo 7

Efecto de tucaresol sobre la respuesta de la citoquina CTL inducida por la inmunización de ADN mediante pistola génica en ratones

La producción de interferón gamma ($\text{IFN}\gamma$) mediante linfocitos T citotóxicos (CTL) es una medida clave de las respuestas inmunes mediadas por células importantes en la eliminación de la infección viral.

15 *Uso de antígeno de Influenza NP (Fig 8a)*

Se inmunizaron ratones C57BL/6 mediante pistola génica con plásmidos de ADN que codifican la nucleoproteína del virus de la influenza A/PR8/34 (pVAC1.PR) a dos niveles de dosis (10 y 100 ng) o vector vacío. Se recogieron los bazos 14 días después de la inmunización y se volvieron a estimular los esplenocitos *in vitro* con un péptido NP (10 μM), que se reconocieron solamente por las células T citotóxicas CD8, conjuntamente con IL-2 humana recombinante (50 ng/ml). Las células $\text{FN}\gamma$ positivas por 10^6 esplenocitos se detectaron mediante ensayo de ELISPOT que mide el número de células individuales que producen citoquina (media \pm D. E. M.; n = 3 ratones). Se administró tucaresol a ratones al tiempo de inmunización o bien por vía (s.c.) (2 x 1 mg) en el sitio de la vacunación intradérmica de ADN, o mediante sonda oral (15 mg/kg) al día durante 5 días comenzando el día de inmunización. El tucaresol por vía subcutánea produce un incremento pequeño pero significativo en la respuesta de citoquina CTL a la inmunización mientras que el tucaresol oral produce una respuesta doble de de la respuesta.

Uso de antígeno 4 nuclear del virus Epstein Barr (EBNA-4) (Fig 8b)

Se inmunizaron ratones mediante pistola de genes con plásmidos de ADN que codifican EBNA-4 (E4) o vector vacío (P3). 2 μg de ADN se administró por disparo, proporcionando dos disparos de no superposición por ratón. Se administró tucaresol a los ratones (E4T) en cantidades de 200 μg por vía subcutánea los días 1, 2, 3 y 4. Los ratones de volvieron a inmunizar después de dos meses con el mismo programa de inmunización y tratamiento. Dos semanas después de se estimularon los esplenocitos *in vitro* con células tumorales que expresan el antígeno EBNA-4 (S6C-E4) o con células tumorales negativas de antígeno (S6C-gpt) durante 72 h. Después se recogieron los sobrenadantes y se determinaron los títulos de $\text{IFN-}\gamma$ mediante ELISA específico. El tucaresol incrementó de manera notable la producción de $\text{IFN}\gamma$.

Ejemplo 8

Efecto de tucaresol sobre la respuesta de CTL lítica inducida mediante inmunización de ADN por pistola de genes

La lisis de células dirigidas por CD8 CTL es un mecanismo principal en la eliminación de infecciones virales por el sistema inmune. CTL lítico se puede medir usando células diana que llevan péptido viral y marcadas con europio.

45 *Administración por vía subcutánea de Tucaresol (fig 9a)*

Ratones C57BI/6 se inmunizaron con ADN de plásmido (10 ng) que codifica la nucleoproteína del virus de la influenza (NP) con y sin tucaresol administrado por vía subcutánea (sc). Se sacrificaron los ratones 14 días después de la inmunización y se volvieron a estimular *in vitro* (5 días) con los esplenocitos irradiados pulsados con (A/PR8/34). Las técnicas de liberación de europio convencionales se usaron para determinar la lisis específica de células diana emparejadas a MHC (células EL4) pulsadas con péptido NP restringido con H-2D^b. La lisis no específica era menor que el 15% para todos los controles. Se proporcionó tucaresol por vía subcutánea (1 mg) en el sitio de inmunización por pistola de genes por vía intradérmica.

55 *Administración oral de tucaresol (fig 9b)*

Ratones C57B1/6 se inmunizaron con ADN de plásmido (10 ng) que codifica la nucleoproteína del virus de influenza (NP) con y sin tucaresol administrado por vía oral. Se sacrificaron los ratones 14 días después de la inmunización y se volvieron a estimular *in-vitro* (5 días) con los esplenocitos irradiados pulsados con virus (A/PR8/34). Las técnicas de liberación de europio convencionales se usaron para determinar la lisis específica de las células EL4 pulsadas con péptido NP restringido de H-2D^b. La lisis no específica era menor que 15% para todos los controles. Se administró tucaresol (15 mg/kg) mediante sonda oral una vez al día durante 5 días comenzando el día de la inmunización.

65 *Descripción de los resultados experimentales*

Los inventores presentan en el presente documento un sencillo y muy eficaz planteamiento para potenciar la inmunización por pADN, basándose en la proporción de una señal coestimuladora para las células T mediante la formación

ES 2 313 791 T3

de la base de Schiff. Varias de las observaciones de los investigadores demuestran este procedimiento es capaz de eliminar el problema de limitación en la eficacia que de manera común se encuentra como resultado de la vacunación de ADN. Éstas incluyen una inducción observada de una respuesta inmune específica en la mayoría de los animales inmunizados, mientras que los planteamientos de uso de vectores que codifican citoquina eran considerablemente menos eficaces a este respecto (datos no mostrados). La potenciación también estaba asociada a un incremento cuantitativo a la respuesta cuando se compara con la administración de vacuna de pADN sola o en combinación con el pADN que expresa los genes de citoquina, y se observó que incrementaba tanto los títulos de anticuerpo específicos como potenciaba las respuestas de células T proliferativas y citotóxicas.

La inducción de una respuesta inmune adecuada requiere la parificación de componentes múltiples del sistema inmune, e inmunización por pADN cumple este requerimiento como se induce tanto en las respuestas humorales como celulares que incluyen las respuestas de CTL, todas las cuales se encontró que estaban potenciadas por tucaresol. Además, mientras otros modos de potenciación de la inmunización por pADN condujo a un anticuerpo de una respuesta inmune desviada por las células T, inyección conjunta de tucaresol dio como resultado una potenciación general de ambos tipos de inmunidad específica que incluye la potenciación de las respuestas de anticuerpos asociadas a Th1 y Th2. La combinación de la vacunación de pADN y tucaresol se puede por lo tanto considerar en las condiciones donde cualquier respuesta inmune basada en anticuerpo sería beneficiosa para el huésped.

Existió un incremento notable en la producción de anticuerpo específico como se midió también mediante la relación más alta de IgG: IgM cuando se compara con el otro procedimiento de inmunización (datos no mostrados). Esto significa una ventaja potencial de uso de este procedimiento durante la producción de anticuerpos monoclonales.

La notable capacidad de tucaresol de potenciar la respuesta de células T específica inducida por pADN a hsp65, NP de Influenza y EBNA-4, como se detecta mediante proliferación, producción de citoquinas y citotoxicidad, es de importancia particular. La inmunidad protectora para la infección micobacteriana depende de tanto las células CD4+ T con la capacidad para secretar las citoquinas que activan macrófagos, incluyendo IFN γ como de las células CD8 + citotóxicas que pueden eliminar macrófagos infectados. La inmunidad protectora para la infección de EBV depende de las respuestas de las células CD4+ y CD8 + T, e inmunoterapia basada en células T contra los trastornos linfoproliferativos basados en células T frente a los trastornos linfoproliferativos de trasplante después del trasplante ya han probado que son eficaces. Ya que la vacunación de pADN combinada con tucaresol favorece las respuestas mediadas tanto por CD4 como CD8, como se muestra en el presente documento, esta es una forma atractiva de de vacunación a aplicar en nuevas vacunas de células T contra las bacterias y virus intracelulares.

El Tucaresol es una molécula bien definida químicamente que ya se ha ensayado clínicamente. Esto debe simplificar el procedimiento aprobado de este fármaco en nuevos protocolos de vacunación basados en pADN. Además, como se mostró que es de manera esquemática activa no existe necesidad para la coadministración local de pADN y tucaresol, como se muestra en el presente documento mediante la inmunización de pADN intramuscular con la inyección subcutánea de tucaresol. La combinación de la administración "balística" intradérmica de la vacunación de pADN con la administración oral de tucaresol puede probar una forma muy atractiva inmunización particularmente en condiciones donde las inmunizaciones por vía parenteral se deben evitar debido al riesgo de infecciones de origen sanguíneo o asociados a estigmas culturales asociados a inyecciones.

En resumen, los inventores presentan en el presente documento datos que muestran por primera vez la utilidad de uso de una base de Schiff que forma un fármaco como un procedimiento sencillo y eficaz para aumentar la respuesta inmune específica inducida por la vacunación de pADN. Estos datos se pueden aplicar a entornos tanto clínicos como industriales.

Procedimientos experimentales

50 *Construcción y ensayo de plásmidos*

Se insertaron todos los genes en el vector pCDNA3 (Invitrogen BV, NV Leek, Holanda). *Mycobacterium bovis* hsp65 cDNA se escindió a partir del plásmido pRIB1300 (proporcionado amablemente por el Dr. R. v d Zee, Utrecht University, Utrecht, Holanda) usando Eco RI y Sal I y se subclonó en los sitios Eco RI y Xho I de pCDNA3 MCS. La identidad y orientación del gen en el plásmido resultante (p3M.65) se confirmaron con mapeado de restricción. La expresión y producción de la proteína hsp se detectó en el lisado de COS-7 transfectado con p3M.65 mediante lipofección usando Lipofectina (Life technologies, Paisley, Escocia). Se sometieron a electroforesis los lisados sobre 12% de gel SDS-PAGE, seguido de transferencia de Western sobre membrana PVDF (BioRad, CA) e inmunodetección mediante anticuerpo DC-16 monoclonal específico anti-Micobacteriano hsp65 (proporcionado amablemente por el Dr. Juraj Ivanyi, Londres, Reino Unido). Después se detectó esto con un anti - ratón de cabra Ig conjugado a la fosfatasa alcalina secundaria (Southern Biotech, AL) y la transferencia se desarrolló usando usando el sistema de sustrato azul western (Promega, Madison, Wisconsin).

65 *Procedimientos ELISA*

Se recogieron sueros de ratones inmunizados y se usaron en ELISA directo como se ha descrito anteriormente. hsp65 micobacteriano recombinante (proporcionado amablemente por el Dr. R. v d Zee) se usó a una concentración de 4 μ g/ml de tampón carbonato para cubrir los pocillos de la placa de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc, Dinamarca)

ES 2 313 791 T3

durante toda una noche a 4°C. Se añadieron suero por duplicado a una dilución de 1:100, se incubó durante toda una noche a 4°C. Se detectaron los anticuerpos de unión usando IgG (absorbido previamente contra IgM de ratón), suero anti-ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina específica de IgG1 y IgG2a (Southern Biotech).

5 *Ratones*

Se han descrito los ratones transgénicos HLA-A2*0201/Kb (proporcionados amablemente por el Dr. L. Sherman, Scripps Laboratories, San Diego, Ca) usados en este estudio. Estos ratones expresan una molécula I de clase II MHC quimérica cuyos dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son la molécula HLA- A*0201 mientras los dominios $\alpha 3$ trans-membrana y citoplásmico son de la molécula H2 Kb de ratón. Esta construcción permite que el sitio de unión de la molécula CD8 de ratón sobre la célula T interactúe con el dominio $\alpha 3$ de la molécula quimérica. La expresión de superficie del HLA-A*0201/Kb se confirmó usando anticuerpo monoclonal conjugado a FITC específico de HLA-A*0201 (One Lambda, Ca) y se determinó mediante citometría usando FACSCAN (Becton Dickinson & Co., Mountain View, Ca). Se han descrito ratones C575Bl/6. estos ratones tienen un epítipo definido de nucleoproteína del virus de influenza CTL epitope. Se compararon ratones ACA (H-2f) en Jackson (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Main). Se propagaron los ratones y se mantuvieron en nuestro ambiente SP en alojamiento animal MTC en el Instituto Karolinska.

Inmunización

La inmunización genética se llevó a cabo mediante inmunización intramuscular. Se prepararon los plásmidos a partir de cultivo de *E. coli* LB ampicilina usando el kit plasmid giga de Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Se determinaron las concentraciones y pureza usando un espectrofotómetro y electroforesis de gel analítica. Los ratones se inyectaron en el músculo anterior tibial de regeneración de cuerdo con el procedimiento de Davis *et al* usando 20 μ g pADN/100 μ l de músculo de o bien plásmido de control (P3), plásmido que expresa EBNA-4 más plásmido de control p3 (E4), plásmido que expresa p3M.65 más plásmido de control p3 (p3M.65), p3M. 65 más plásmidos de expresión de GM-CSF (p3M.65G), o p3M.65 más plásmido de expresión de IFN γ (9p3M.65 γ). Los plásmidos se mezclaron en cantidades molares iguales. Como alternativa, la inmunización se llevó a cabo mediante pistola génica de acuerdo con el procedimiento Fynan *et al* (27) usando 10 ng o 100 ng de plásmido de ADN que codifica la nucleoproteína del virus de la influenza A/PR8/34 (pVAC1.PR) o vector vacío, o 2 μ g de plásmido que codifica EBNA-4 (E4) o vector de control p3. Los ratones tratados con tucareol se inmunizaron con E4, p3M.65, o pVAC1.PR (E4,T p3M.65,t y pVAC1.NP PR(Tuc sc) respectivamente) y o bien se inyectaron al mismo tiempo con 1 mg de tucareol casa uno por vía subcutánea o recibieron inyecciones diarias de tucareol 200 μ g por ratón durante un período de 4 días también por vía subcutánea. Los ratones recibieron refuerzo dos semanas después del cebado con la misma dosis.

35 *Líneas celulares*

Jurkat A*0201/Kb(Jk-A2/kb), una línea celular negativa de OHLA- A*0201 de leucemia de células T humana transfectada de manera estable con el gen quimérico HLA-A80201/Kb (proporcionada amablemente por el Dr. W. M. Kast, Universidad de Loyola, Maywood III). La línea celular S6C se derivó de un adeno-carcinoma mamario espontáneo se ha originado en un ratón ACA. S6C-gpt y S6C-E4 son plásmidos de control y EBNA-4 transfectante respectivamente (proporcionada amablemente por el Dr. George Klein, MTC, Instituto Karolinska, Estocolmo). Todas las líneas celulares se mantuvieron pasando *in vivo* en ratones ACA singénicos e *in vitro* en RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS), 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina, 50 μ M de 2-mercaptoetanol, y 2 mM de L-glutamina.

45 *Ensayo de proliferación*

Se recogieron esplenocitos de ratones inmunizados. Se preparó una suspensión de células individuales y las células se volvieron a suspender en IMDM suplementado con 10% de FBS y L-glu y antibióticos. Los esplenocitos y cultivos de células tumorales (MSTC) mezclados se prepararon mezclando 3 X 10⁶ de células tumorales por ml. Los cultivos se incubaron durante 5 días a 37°C en 7,5% de CO₂. Un μ Ci de timidina marcada con tritio se añadió a cada pocillo de placas de 96 pocillos con el fondo en forma de U. Las células después se incubaron durante 18 horas en las mismas condiciones como se ha descrito anteriormente y se recogieron y se midió la cantidad de timidina marcada con tritio usando el lector Beta Plate (Wallac, Turku, Finland). Se realizó el ensayo por triplicado y se calculó el índice de estimulación (SI) usando la fórmula: SI = proliferación de esplenocitos hacia el transfectante S6C-EBNA-4 (o infectados con EBNA-4 Vaccinia)/proliferación de esplenocitos hacia transfectante de control S6C-gpt (o infectados con TK-Vaccinia).

Ensayos de citoquina

Los esplenocitos (de ratones inmunizados E4) y cultivos de células tumorales mezclados (MSTC) se prepararon mezclando 3 x 10⁶ esplenocitos más 3 x 10⁵ células tumorales por ml. Los sobrenadantes se recogieron después de 72 horas de cultivo y se ensayaron para determinar la presencia de interferón gamma (IFN γ) e IL-4 usando pares de anticuerpos emparejados comercialmente disponibles para las citoquinas de ratón ELISA (Immunokontakt, Bioggio, Suiza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Generación de la línea CTL específica y ensayos de citotoxicidad

Las líneas CTL específicas de péptido se prepararon en placas de 12 pocillos como sigue. Los esplenocitos de ratones inmunizados y no inmunizados de control se sembraron a 6×10^6 por pocillo y se cultivaron conjuntamente con 3×10^6 de esplenocitos singénicos pulsados con péptido ($5 \mu\text{g}$ por ml P4). Después de 6 - 8 días se midió la citotoxicidad mediada por células mediante liberación de ^{51}Cr como sigue. Un millón de células diana se incubaron a 37°C en la presencia de $200 \mu\text{Ci}$ de cromato ^{51}Cr de sodio (Amersham, Reino Unido) durante 1 hora, se lavaron tres veces y se volvieron a suspender en medio completo a 10^5 células/ml en la presencia o ausencia de $10 \mu\text{g}$ del péptido relevante (P4) o irrelevante (influenza NP 58-66). El ensayo se realizó mediante incubación de 5×10^3 de células diana a efector diferente a relaciones diana en pocillos triplicados a un volumen final de $200 \mu\text{l}$ en placas de 96 pocillos de fondo en V. las células se incubaron durante 4 horas a 37°C después de lo cual los sobrenadantes se recogieron y se usaron para determinar la lisis específica usando la siguiente ecuación: porcentaje de liberación específica = $100 \times (\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})$.

15

Referencias

1. **Donnelly J. et al.**, "DNA Vaccines" *Annu. Rev. Immunol.* 1997, 15: 617 - 48. 21 22.
- 20 2. **Donnelly, J. J., Friedman A., Martinez D., Montgomery, D. L., Shiver, J. W., Motzel, S. L., Ulmer, J. B., Liu, M. A.** 1995. Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine-enhanced protection against antigenic drift in influenza-virus. *Nature Med.* 1: 583 - 87.
- 25 3. **Lu, S., Arthos, J., Montefiori, D. C., Yasutomi, Y., Manson, K., Mustafa, F., Johnson, E., Santoro, J. C., Wissink, J., Mullins, J. I., Haynes, J. R., Letvin, N.L., Wyand, M., Robinson, H. L.** 1996. Simian immunodeficiency virus ADN vaccine trial in macaques. *J. Virol.* 70: 3978 - 91.
- 30 4. **Fuller, D. H. Haynes, J. R.**, 1994. A qualitative progression in HIV type 1 glycoprotein 120-specific cytotoxic celular and humoral immune responses in mice receiving a DNA-based glycoprotein 120 vaccine. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 10: 1433 - 41.
5. **Krieg, A. M., Yi, A-K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretsky, G.A. Klinman, D.M.**, 1995. C μ g motifs in bacterial ADN trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546 - 48.
- 35 6. **Messina, J. P., Gilkeson, G. S., Pisetsky, D. S.**, 1991. Stimulation of *in vitro* murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J. Immunol.* 147: 1759-64.
7. **Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., Kuramoto, E., Yano, O., Tokunaga, T.**, 1992. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce TNF and augment TNF-mediated natural killer activity. *J. Immunol.* 148: 4072 - 76.
- 40 8. **Tang, D. C., Devit, M., Johnston, S. A.**, 1992. Genetic inmunización is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152 - 54.
- 45 9. **Yankauckas, M. A., Morrow, J. E., Parker S. E., Abai, A., Rhodes, G. H., Dwarki, V. J., Gromkowski, S. H.** 1993. Long-term antinucleoprotein celular and humoral immunity is induced by intramuscular injection of plasmid ADN containing NP gene ADN *Cell Biol.* 12: 771 - 76.
10. **Wang, B., Boyer, J., Srikantan, V., Coney, L., Carrano, R., Phan, C., Merva, M., Dang, K., Agadjanyan, M., Gilbert L., Ugen, K. E., Williamson, W. V., Weiner, D. B.** 1993. ADN inoculation induces neutralising immune-responses against human-immunodeficiency-virus type-1 in mice and nonhumanprimates. *DNA Cell Biol.* 12: 799 - 805.
- 50 11. **Cox, G., Zamb, T. J., Babiuk, L. A.** 1993. Bovine herpesvirus-1-immune-responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J. Virol.* 67: 5664 - 67.
- 55 12. **Davis, H. L., Michel, M. L., Whalen, R. G.**, 1993. DNA-based inmunización induces continuous secretion of hepatitis-b surface-antigen and high-levels of circulating antibody. *Human Mol. Genet.* 2: 1847-51.
- 60 13. **Ulmer, J. B., Donnelly, J. J. Parker, S.E., Rhodes, G. H, Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromokowski, S. H., Deck, R. R., Dewitt, C. M., Friedman, A., Howe, L. A., Leander, K. R., Martinez, D., Perry, H. C., Shiver, J. W., Montgomery, D. L., Liu, M. A.**, 1993. Heterologous protection against influenza by injection of ADN encoding a viral protein. *Science* 259: 1745 - 49.
- 65 14. **Kuhober, A., Pudollek, H-P, Reifenberg, K., Chisari, F. V., Schlicht, H-J, Reimann, J., Schirmbeck, R.**, 1996. ADN inmunización induces antibody and cytotoxic T cell-responses to hepatitis B core antigen in H-2b mice. *J. Immunol.* 156: 3687 - 95.

ES 2 313 791 T3

15. **Okuda, K., Bukawa, H., Hamajima, K., Kawamoto, S., Sekigawa, K. I., Yamada, Y., Tanaka, S. I., Ishii, N., Aoki, I., Nakamura, M., Yamamoto, H., Cullen, B.R., Fukushima, J., 1995.** Induction of potent humoral and cell-mediated immune-responses following direct-injection of ADN encoding the HIV type- 1 env and rev gerte-products. *Aids Res. Human Retrovir.* 11: 933 - 43.

5

16. **Liu, M. A., Davies, M. E., Yasutomi, Y., Perry, H C., Letvin, N. L., Shiver, J. W., 1994.** Immune responses to HIV generated by ADN vaccines. In *Retroviruses of Human AIDS and Related Animal Diseases*, ed. M. Girard, B. Dodet, pp. 197 - 200. Lyon: Fond. Merce- Merieux.

10

17. **Shiver, J. W., Perry, H. C., Davies, M. E., Freed, D. C., Liu, M. A., 1995.** Cytotoxic T-lymphocyte and helper T cell responses following HIV polynucleotide vaccination. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 772: 198 - 208.

18. **Xiang, Z. Q., Ertl, H., 1995.** Manipulation of the immune-response to a plasmid-encoded viral-antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity* 2: 129 - 35.

15

19. **Conry, R. M., Widera, G., Lobuglio, A. F., Fuller, J.T., Moore, S. E., Barlow, D. L., Turner, J., Curiel, D. T., 1996.** Selected strategies to augment polynucleotide inmunización. *Gene Therapy* 3: 67 - 74.

20

20. **Tascon, R., Stavropoulos, E., Colston, M. J., Lowrie, D. B. 1996.** Polynucleotide vaccination induces a significant protective immune response against Mycobacteria. In *Vaccines 96*, ed. F. Brown, R.M. Chanock, M.S. Ginsbert, R.A. Lerner, p. 45 - 49. Cold Spring Harbor, NY: *Cold Spring Harbor Lab. Press.*

25

21. **Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E. F., "Molecular cloning: A Laboratory Manual"**, Cold Spring Harbour Laboratory, *Cold Spring Harbour Press*, Vols 1 - 3, 2ª Edición, 1989.

22. Rhodes *et al*, "Therapeutic Potentiation of the Immune System by Co-Stimulatory Schiff-Based-Forming Drug," *Nature*, 377, p 71 - 75, 1995.

30

23. **Brohm W et al**, "Routes of Plasmid Vacunación de ADN that Prime Murine Humoral and Celular Immune Reponses," *Vaccine*, Vol 16, No. 9/10, p 949 - 954, 1998.

24. Remington's Pharmaceutical Sciences, *Mack Publishing Company*, Easton, Pennsylvania (1985).

35

25. **Vordermeier, H.M., Coombs, A.G.A., Jenkins, P. McGee, J.P., O'Haga, D. T. Davis, S.S. and Singh, M.** Synthetic delivery systems for tuberculosis vaccines: immunological evaluation of the M. tuberculosis 38 kDa protein entrapped in biodegradable PLG microparticles. *Vaccine* 13: 1576 - 1582 1995.

40

26. **Haynes JR. McCabe DE. Swain WF. Wedera G. Fuller JT.** Particle-mediated nucleic acid inmunización. *Journal of Biotechnology.* 44: 37 - 42, 1996.

27. **Fynan, E.F., Webster, R.G., Fuller, D. H., Haynes J. T., Santoro, J. C., and Robinson, H. L., (1993)** DNA vaccines: protective inmunizaciones by parenteral, mucosal and gene-gun inoculatiions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11478.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una composición de vacuna que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido antigénico y que está dentro de un vector apropiado y, el compuesto ácido 4-(2-formil-3-hidroxifenoximetil) benzoico.

2. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 que está en una forma adecuada para la administración mediante la vía oral, nasal, pulmonar, intramuscular, subcutánea o intradérmica.

10 3. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 que está en una forma adecuada para la administración que usa una técnica de administración de pistola de genes.

15 4. Uso de ácido 4-(2-formil-3-hidroxifenoximetil) benzoico y secuencia de nucleótidos en la fabricación de un medicamento para potenciar las respuestas humorales y celulares de un mamífero a un péptido antigénico en el que dicho péptido antigénico se expresa a partir d la secuencia de nucleótidos cuando se administra a dicho mamífero.

5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4 que está en una forma adecuada para la administración por vía oral, nasal, pulmonar, intramuscular, subcutánea o intradérmica.

20 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5 en el que el medicamento está en una forma adecuada para la administración usando una técnica de administración de pistola de genes.

25 7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 en el que el compuesto se administra a una dosis entre aproximadamente 0,1 mg/kg y 100 mg/kg por administración.

30

35

40

45

50

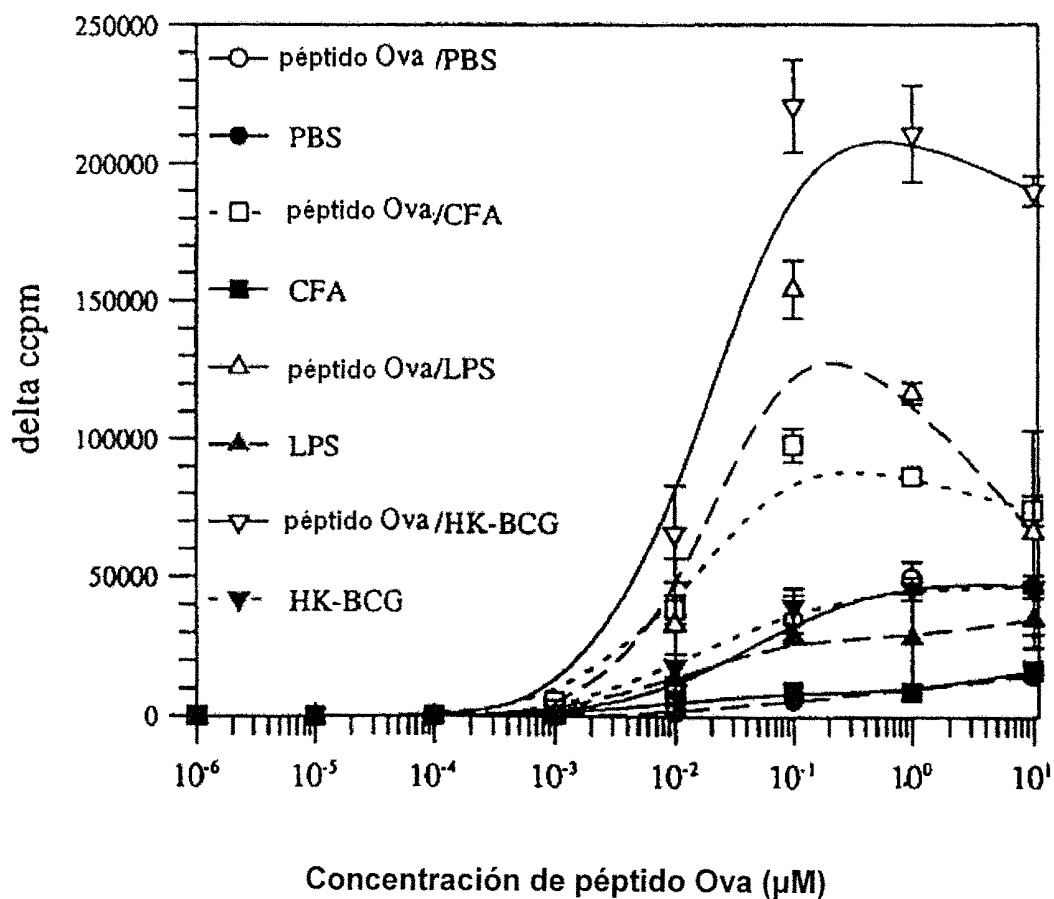
55

60

65

Proliferación *in vitro*: Efecto de adyuvantes

Proliferación de células t de ganglio linfático en respuesta a péptido Ova *in vitro* (en presencia de suero de ratón al 0,5%)

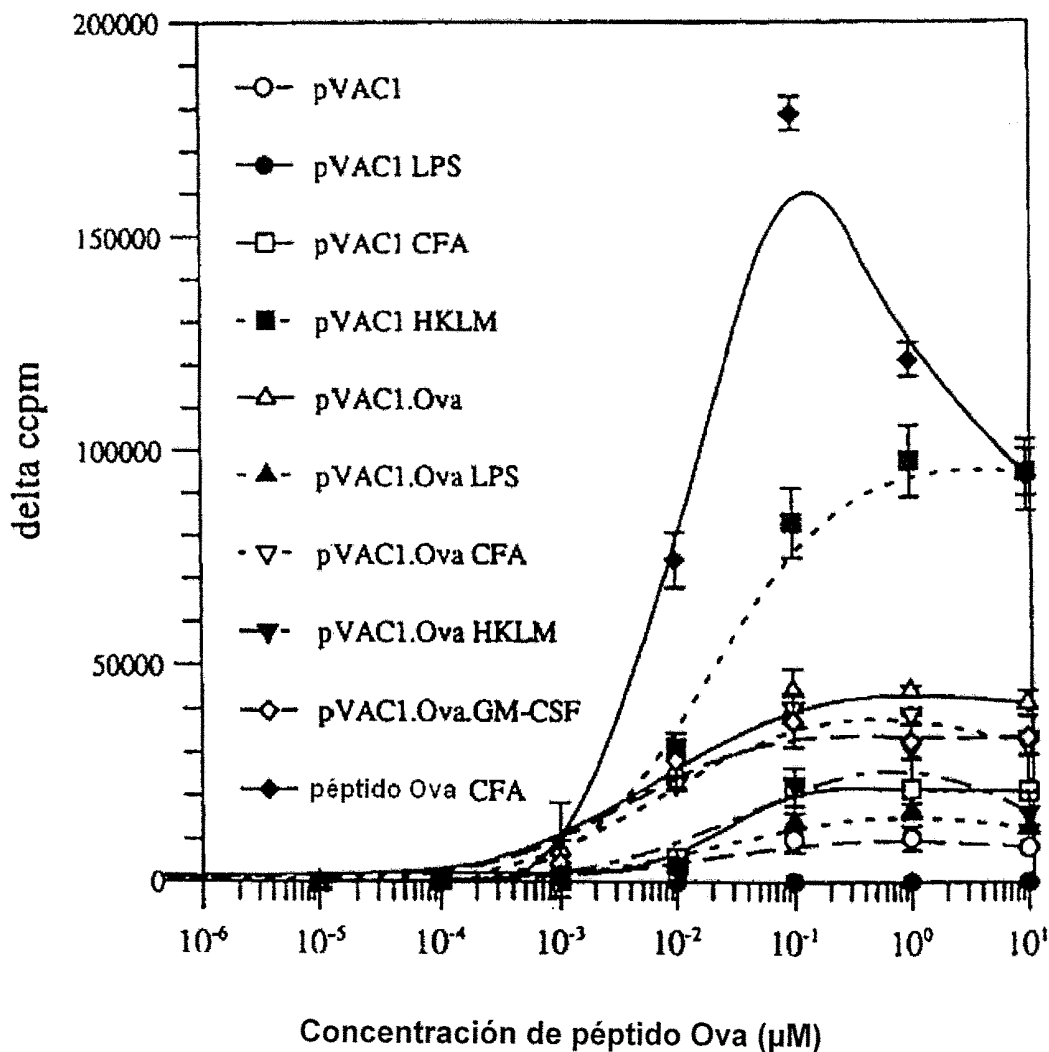


3 días después de la inmunización primaria

FIG. 1

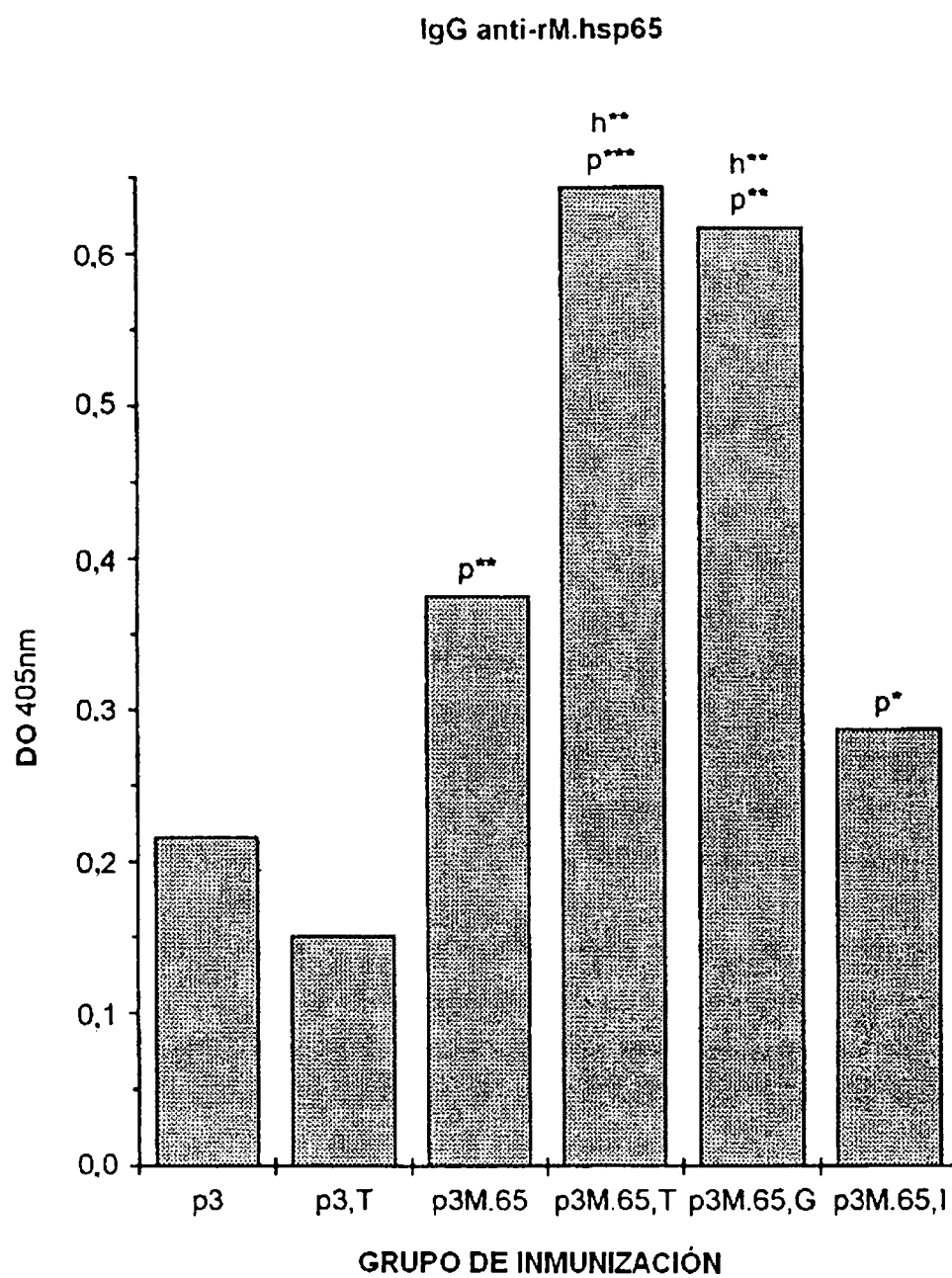
Proliferación *in vitro*: Efecto de adyuvantes

Proliferación de células t de ganglio linfático en respuesta a péptido
Ova *in vitro* (en presencia de suero de ratón al 1%)



3 días después de la inmunización primaria

FIG. 2



p*= $p > 0,1$ cf p3 (no significativo)
 p**= $p < 0,05$ cf p3
 p***= $p < 0,003$ cf p3
 h**= $p < 0,05$ cf p3M.65

FIG. 3a

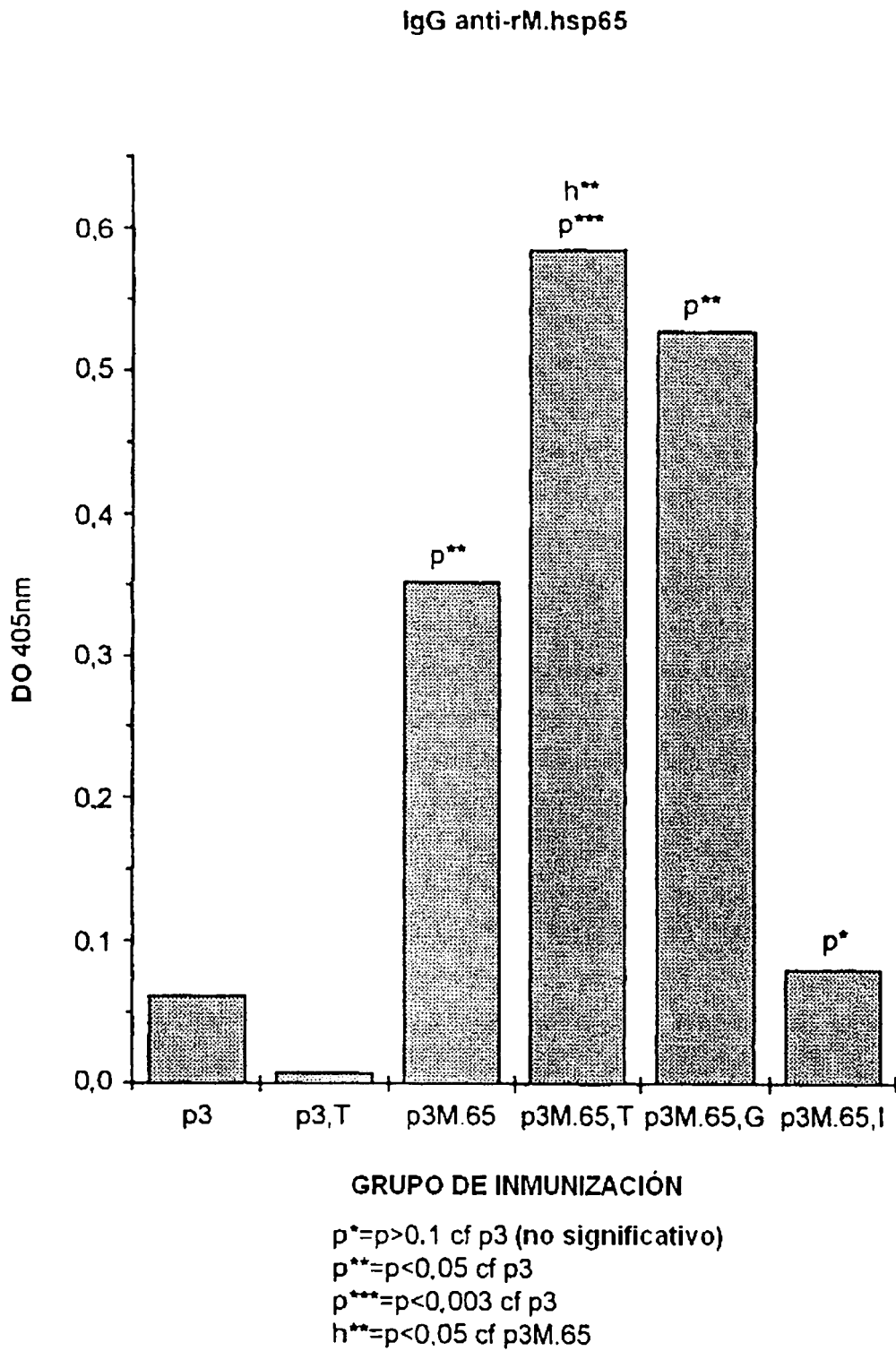


FIG. 3b

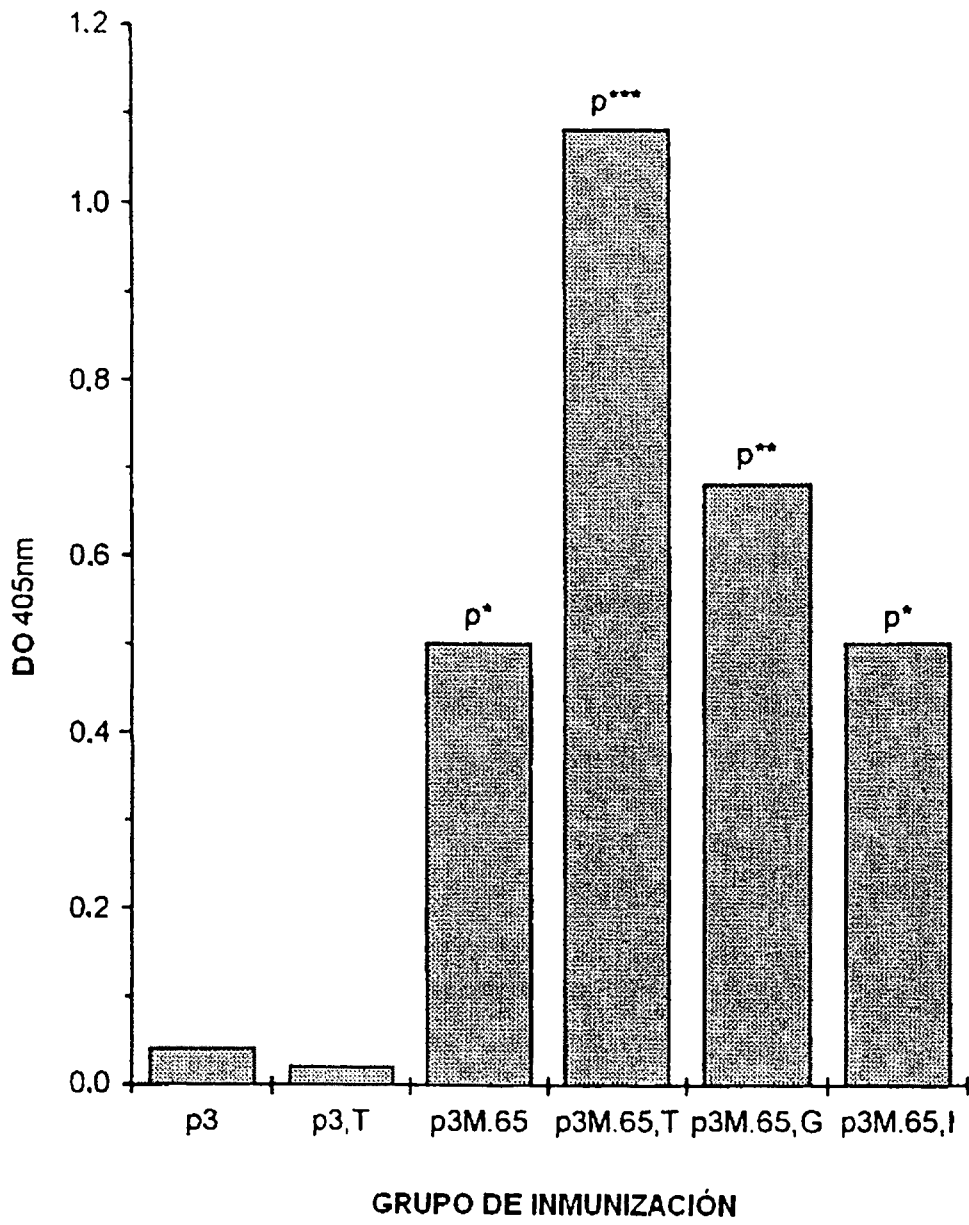


FIG. 3c

RESPUESTAS PROLIFERATIVAS DE CÉLULAS T A CONSTRUCCIONES DE EBNA-4. EFECTO DE TUCARESOL

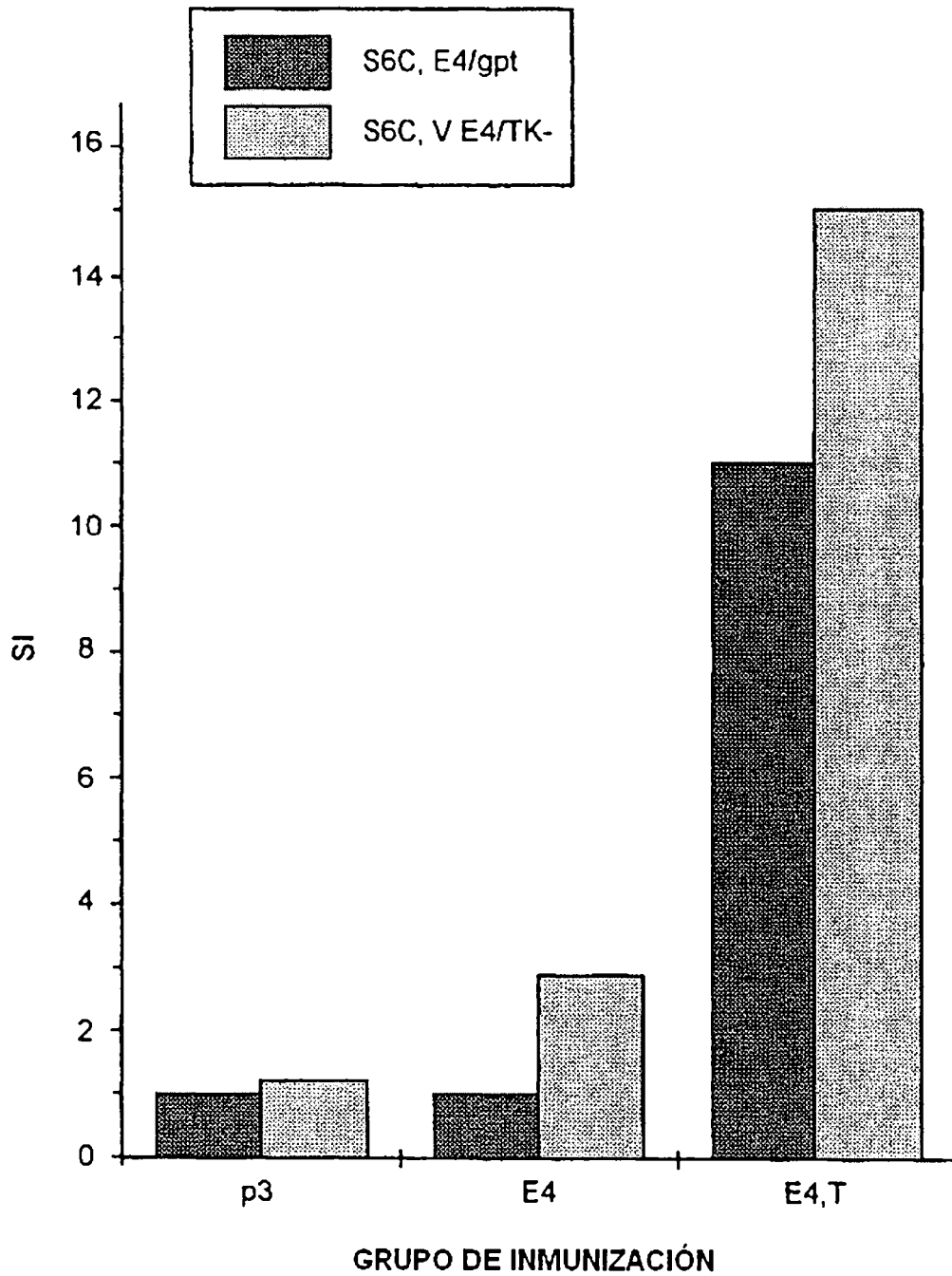


FIG. 4

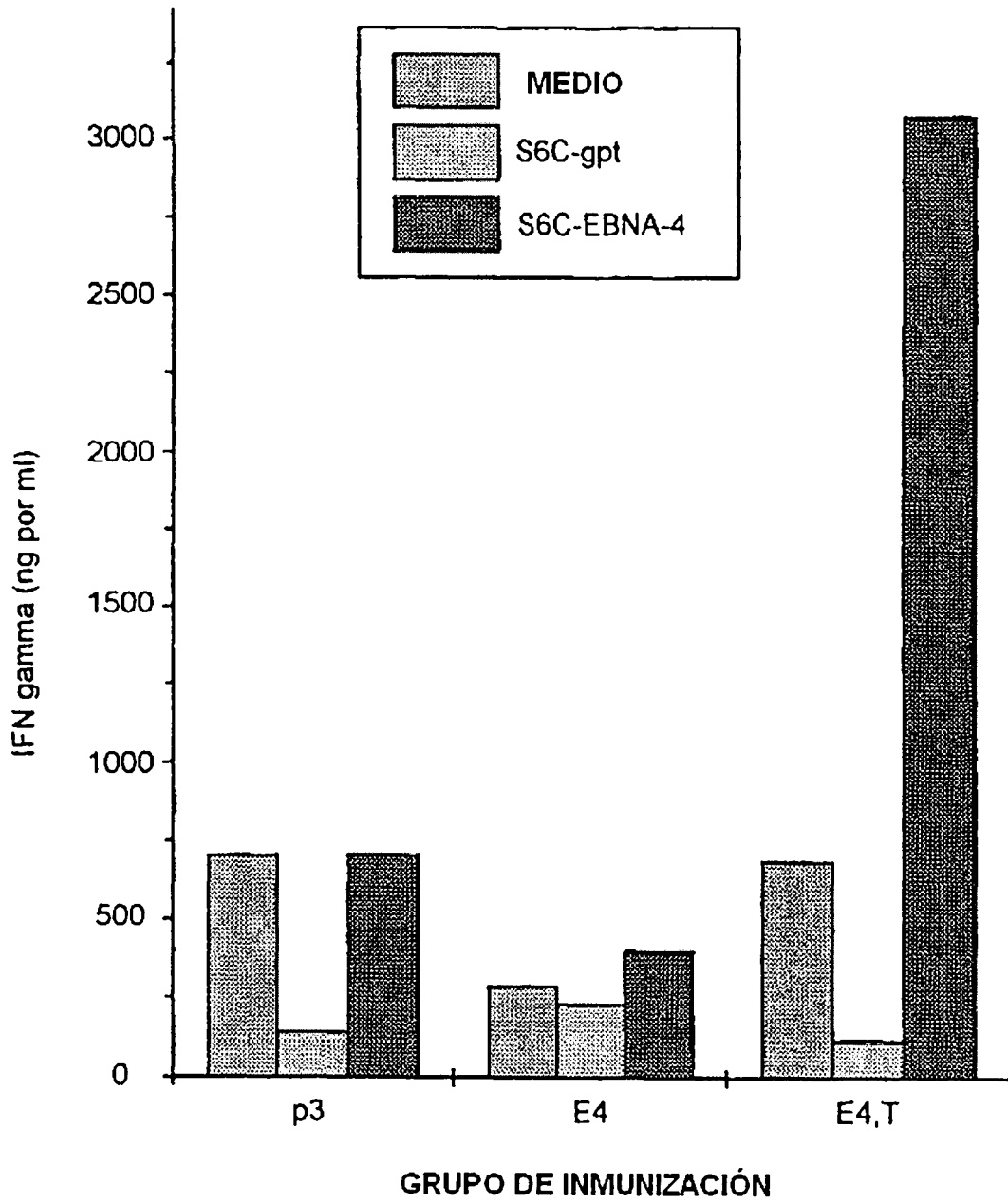


FIG. 5

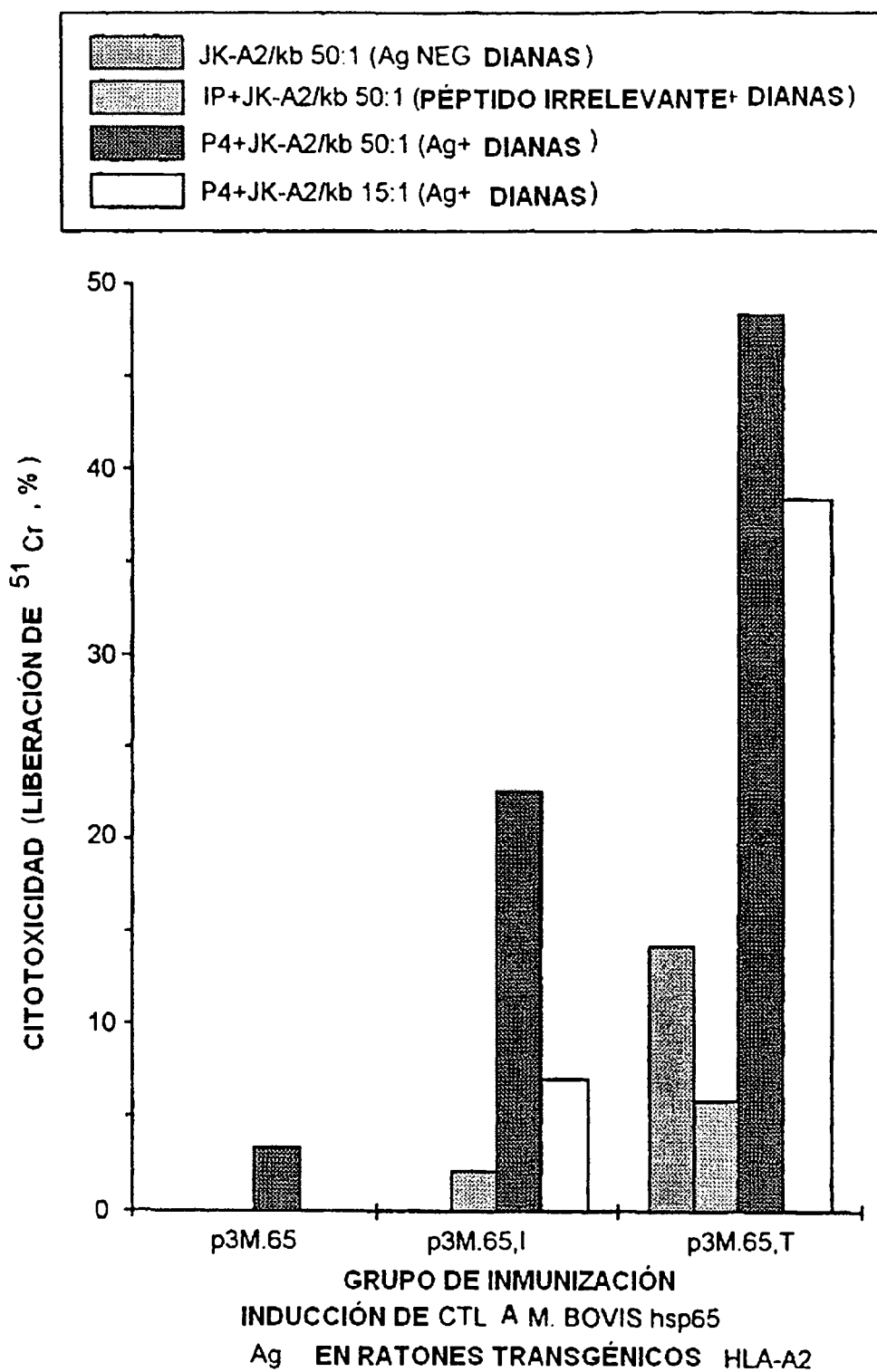
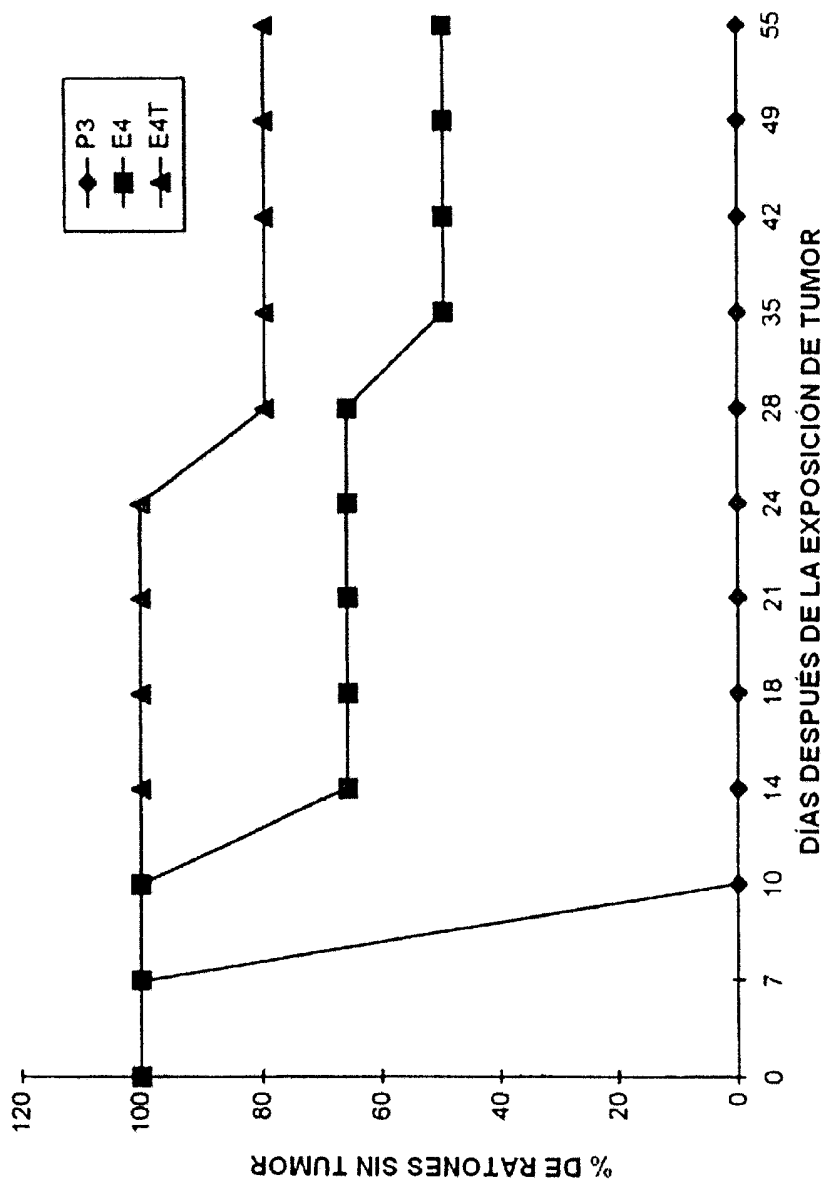
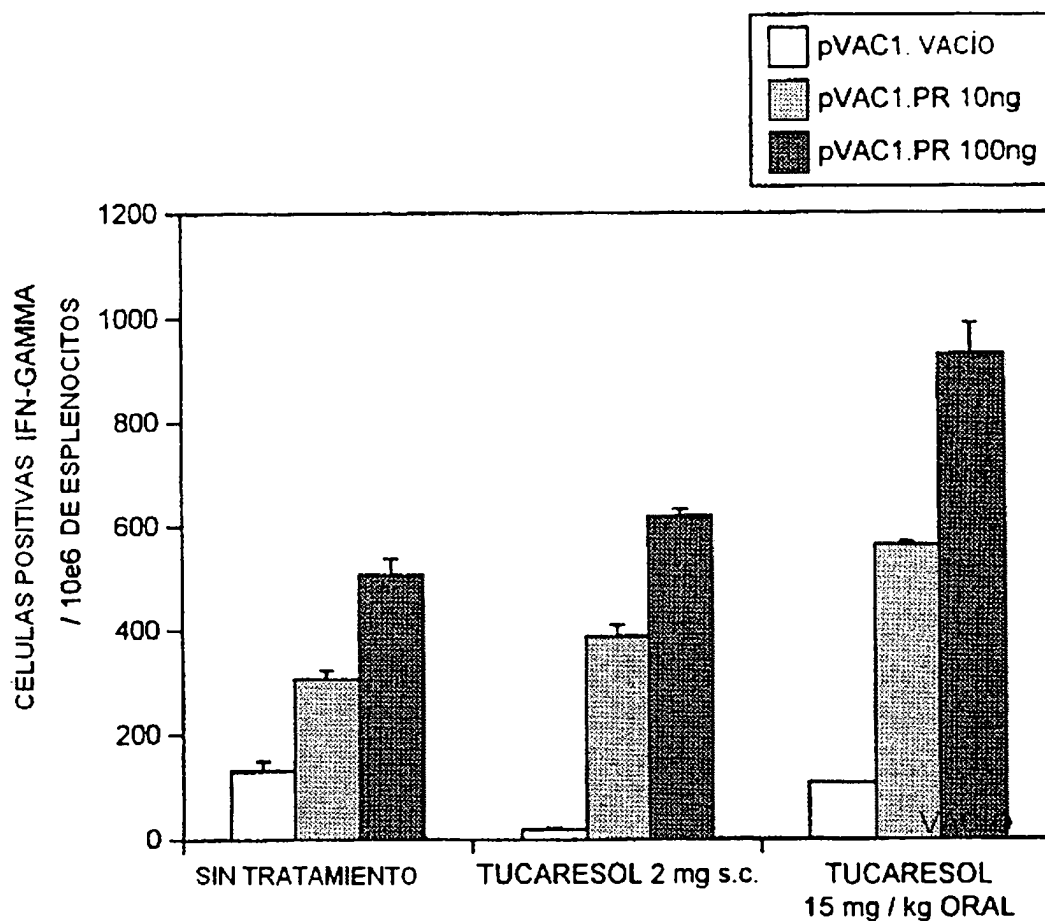


FIG. 6



EFEECTO DE TUCARESOL SOBRE LA INHIBICIÓN DE DESARROLLO DE TUMOR IN VIVO DESPUÉS DE LA INMUNIZACIÓN CON UN PLÁSMIDO QUE EXPRESA UN ANTIGENO 4 NUCLEAR DEL VIRUS EPSTEIN BARR (EBNA-4)

FIG. 7

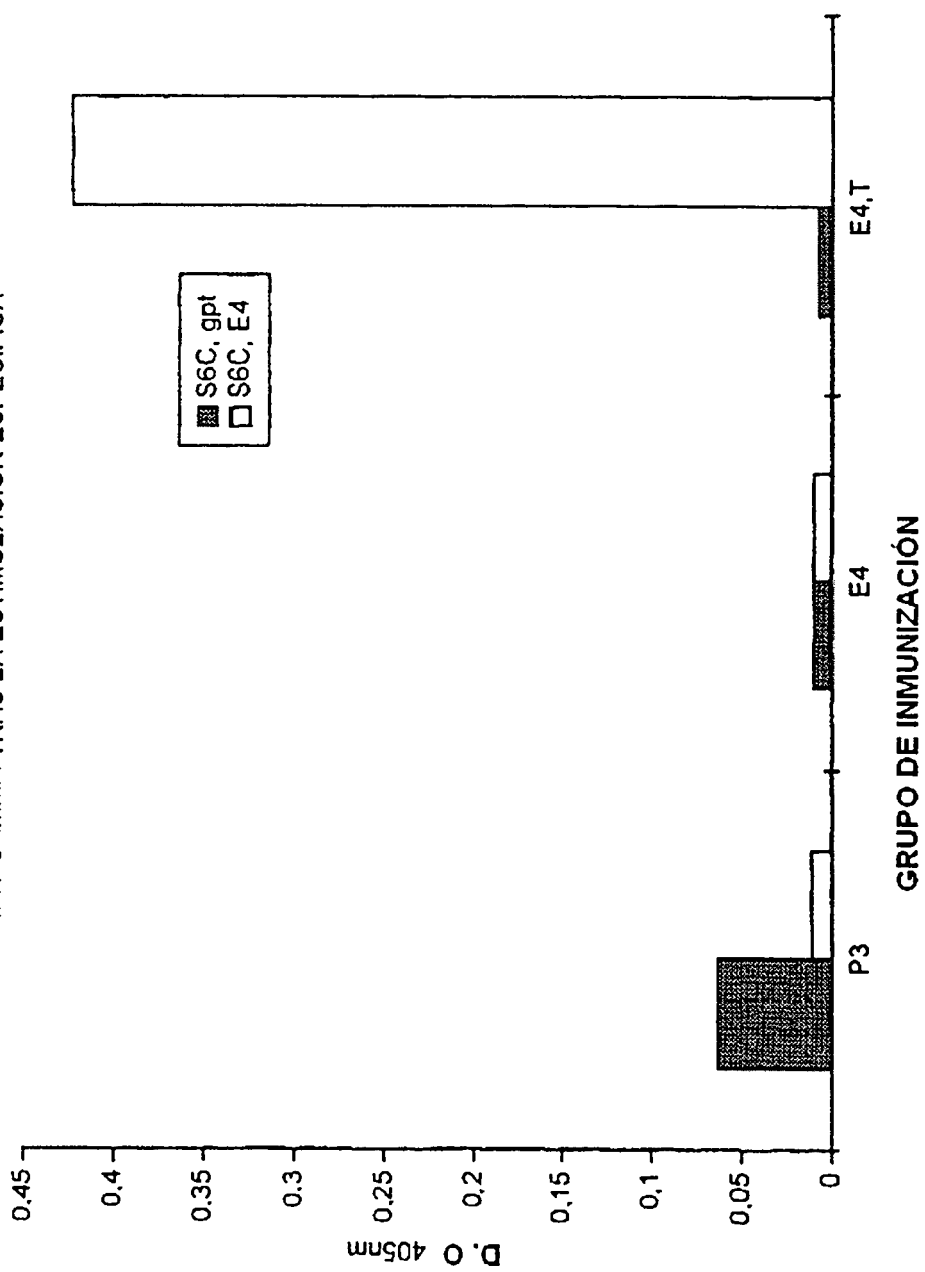


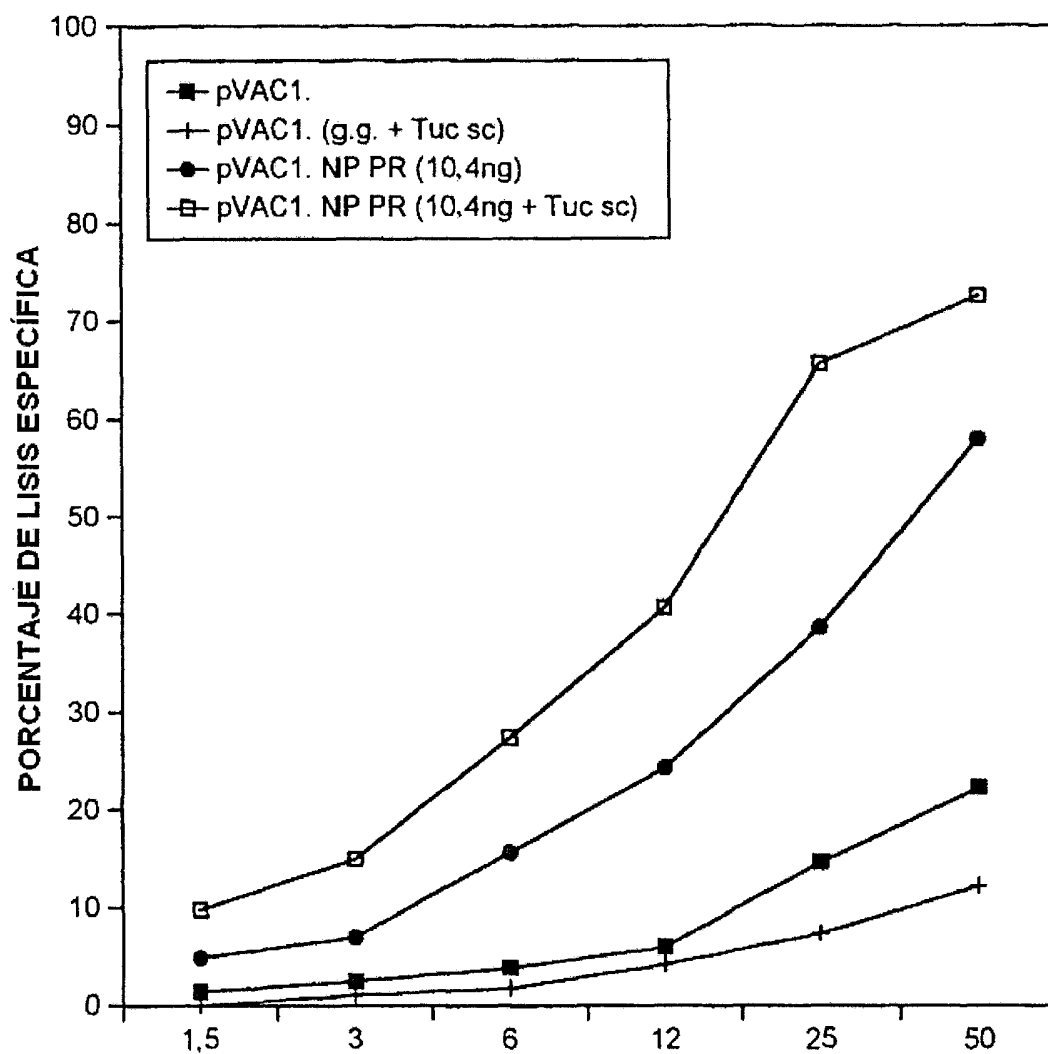
EFFECTO DE TUCARESOL SOBRE LA RESPUESTA DE CITOQUINA CTL INDUCIDA POR INMUNIZACIÓN POR ADN POR PISTOLA DE GENES EN RATONES

FIG. 8 a

FIG. 8b

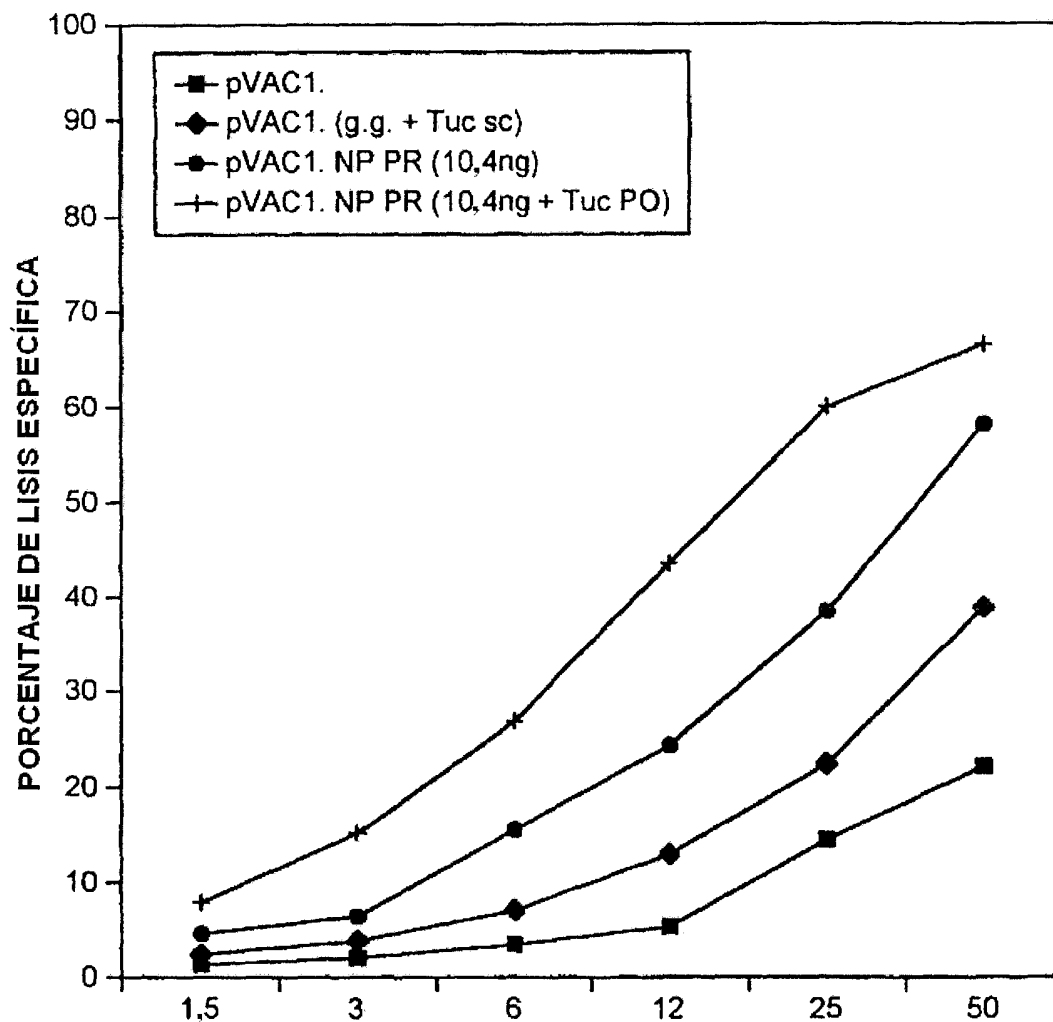
TUCARESOL POTENCIA LA PRODUCCIÓN DE IFN-GAMMA TRAS LA ESTIMULACIÓN ESPECÍFICA





RELACIÓN EFECTOR : DIANA
 EFECTO DE TUCARESOL ADMINISTRADO POR VÍA SUBCUTÁNEA
 SOBRE LA RESPUESTA DE CTL LÍTICA INDUCIDA POR LA
 INMUNIZACIÓN DE ADN POR PISTOLA DE GENES

Fig. 9 a



RELACIÓN EFECTOR : DIANA
 EFECTO DE TUCARESOL ADMINISTRADO POR VÍA ORAL SOBRE LA
 RESPUESTA DE CTL LÍTICA INDUCIDA POR LA INMUNIZACIÓN DE ADN
 POR PISTOLA DE GENES

Fig. 9 b