



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 294 864**

⑯ Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61M 5/30 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **99956885 .0**

⑯ Fecha de presentación : **03.11.1999**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1227840**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **07.08.2002**

⑯ Título: **Vacunas genéticas potenciadas con adyuvante.**

⑰ Titular/es: **Powderject Vaccines, Inc.**
585 Science Drive
Madison, Wisconsin 53711, US

⑯ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

⑰ Inventor/es: **Haynes, Joel, R.;**
Widera, Georg;
Fuller, James, T.;
Shipley, Timothy;
Fuller, Deborah y
Wu, Mary

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

⑰ Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 294 864 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

Vacunas genéticas potenciadas con adyuvante.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere al campo general de biología molecular e inmunología, y se refiere en general a reactivos útiles en técnicas de inmunización con ácidos nucleicos. Más particularmente la invención se refiere a partículas recubiertas y a su uso en la fabricación de medicamentos para inducir una respuesta inmune potenciada contra un 10 antígeno seleccionado.

Antecedentes de la invención

Las técnicas para la inyección de ADN y ARNm en tejido de mamíferos para fines de inmunización contra un producto de expresión ya se han descrito anteriormente. Véase por ejemplo la memoria descriptiva de patente europea EP 15 0 500 799 y la patente de Estados Unidos Nº 5.589.466. Las técnicas, denominadas “inmunización con ácido nucleico” en este documento, han demostrado provocar respuestas inmunes tanto humorales como mediadas por células. Por ejemplo, los sueros de ratones inmunitizados con una construcción de ADN que codifica la glicoproteína de la envuelta gp160, demostraron reaccionar con g160 recombinante en inmunoensayos y los linfocitos de los ratones inyectados 20 demostraron proliferar en respuesta a gp120 recombinante. Wang *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4156-4160. Análogamente, los ratones inmunitizados con un gen de la hormona del crecimiento humana (hGH) demostraron una respuesta inmune basada en anticuerpos. Tang *et al.* (1992) *Nature* 356: 152-154. La inyección intramuscular de ADN que codifica nucleoproteína del virus de la gripe impulsada por un promotor de mamífero ha demostrado provocar una respuesta de linfocitos T citolíticos CD8+ (CTL) que puede proteger a los ratones contra una exposición 25 posterior letal al virus. Ulmer *et al.* (1993) *Science* 259: 1745-1749. Los estudios inmunohistoquímicos de los sitios de inyección mostraron que el ADN era captado por los mieloblastos y la producción citoplasmática de la proteína viral pudo demostrarse durante al menos 6 meses.

Estas llamadas “vacunas genéticas” han demostrado por lo tanto provocar una respuesta inmune en animales tratados, similar a la que se observa después de la administración de vacunas atenuadas vivas, la forma de vacuna más eficaz usada en la actualidad. La teórica eficacia de las vacunas basadas en ácidos nucleicos parte de la capacidad de las composiciones de vacuna para provocar la producción *de novo* de antígenos de proteína plegados correctamente, lo que puede dar como resultado la producción de respuestas de anticuerpo que reconocen a los epítopos tridimensionales complejos. Además, la producción *in vivo* de estos antígenos en células de presentación de antígeno profesionales, 30 da como resultado la presentación de fragmentos peptídicos procesados por moléculas MHC de clase I, dando como resultado la activación y la participación de linfocitos T citolíticos (CTL) específicos de antígeno.

Hasta la fecha, la técnica de inmunización con ácido nucleico más eficaz implica el suministro de una composición de vacuna de ADN mediante el suministro intracelular mediado por partículas en la epidermis. Véase por ejemplo, la 40 Patente Europea Nº 0 500 799. Esta técnica evita las dificultades del suministro extracelular (por ejemplo, mediante suministro con aguja y jeringa a la piel o al músculo) ya que se cree que la mayor parte de dicho ADN suministrado de forma extracelular se degrada rápidamente, lo que hace necesario inocular una cantidad excesiva de ADN para conseguir un nivel suficiente de expresión del antígeno. El suministro de ADN mediado por partículas a la epidermis, por otro lado, consigue el depósito directo e intracelular de ADN de plásmidos en las células epidérmicas, incluyendo 45 las células de Langerhans epidérmicas. Debido al suministro directo intracelular, el ADN está protegido de las nucleasas extracelulares y es necesario suministrar solamente pequeñas cantidades de ADN. De hecho, la inmunización mediada por partículas con cantidades cercanas al nanogramo de un ADN de plásmido dado puede dar como resultado la producción de respuestas humorales y de CTL muy fuertes, a menudo después de una única inmunización.

50 La malaria está muy extendida y es una enfermedad humana significativa, particularmente en países tropicales. La enfermedad está causada por el mosquito portador de los parásitos *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*. La investigación sobre la vacuna de la malaria aún no ha dado como resultado el desarrollo de un producto de vacuna seguro, práctico, profiláctico y eficaz. Aunque se han producido muchos ejemplos de respuesta inmune significativa en modelos animales y en voluntarios humanos usando diversas vacunas experimentales, la protección real provocada por dicha vacunación en ensayos clínicos humanos ha sido lamentablemente baja. La cada vez mayor comprensión científica del ciclo vital del parásito de la malaria y la identificación de importantes antígenos para diversas etapas de la vida del parásito han permitido el desarrollo de diversas estrategias de vacuna diseñadas para provocar la formación de anticuerpos protectores así como de células efectoras celulares tales como CTL.

60 El ciclo de la enfermedad de la malaria comienza con una picadura del mosquito que inyecta los esporozoitos infecciosos de la malaria en el torrente sanguíneo. Por lo tanto sería razonable que los anticuerpos específicos para el esporozoito fueran un medio eficaz para prevenir o limitar significativamente la infección de los hepatocitos en esta etapa. Sin embargo, después de la infección de los hepatocitos, el parásito se desarrolla de forma intracelular en el hepatocito y puede escapar a los anticuerpos circulantes. En esta etapa, la presentación de antígenos específicos del esporozoito en la superficie del hepatocito infectado antes del merozoito y del merozoito o de la liberación del de la etapa sanguínea, proporciona una diana atractiva para las CTL específicas de la malaria. Dichas células efectoras podrían eliminar los hepatocitos infectados o provocar la destrucción de los parásitos intracelulares, antes de la primera liberación de merozoitos de la etapa sanguínea maduros.

Sumario de la invención

Es un objeto principal de la presente invención proporcionar nuevas partículas recubiertas para su uso en procedimientos de vacunación con ácido nucleico (genética). Estas partículas recubiertas están recubiertas con moléculas de ácido nucleico que contienen secuencias que codifican un antígeno de interés y un adyuvante, en las que el adyuvante está presente en una forma diferente al ADN y pretenden el suministro directo intracelular de la composición, es decir la secuencia que codifica el antígeno y el adyuvante no de ADN. Por consiguiente, las presentes partículas recubiertas representan un alejamiento significativo de las composiciones de vacuna de ADN anteriores que pueden combinar secuencias que codifican el antígeno con secuencias que codifican el adyuvante. Además, el suministro determinado del adyuvante no de ADN en una célula diana es contrario a la intuición, puesto que se sabe que los adyuvantes funcionan en base extracelular, por ejemplo formando un depósito extracelular y es cuando estos restos están presentes en el entorno extracelular que las células inmunocompetentes pueden encontrarse e interactuar con el adyuvante para producir un efecto adyuvante deseado. El componente adyuvante de estas nuevas partículas recubiertas puede proporcionarse en varias formas diferentes tales como, aunque sin limitación, en forma de una proteína, un lípido, una hormona no proteica o un análogo de la misma, una vitamina o un análogo de la misma, un derivado de proteína purificado a partir de un cultivo bacteriano (por ejemplo, *Bacillus calmette guerin*), un material esquelético de la pared celular de micobacterias, una saponina o un derivado de la misma, o similares.

Por consiguiente, la invención proporciona partículas recubiertas adecuadas para su uso en inmunización con ácido nucleico mediada por partículas, partículas que comprenden partículas vehículo núcleo recubiertas con:

- una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un antígeno; y
- un adyuvante que es eficaz para potenciar al menos un componente de una respuesta inmune provocada contra el antígeno, en el que el adyuvante está presente en dicha composición en una forma diferente a ADN.

En realizaciones particulares, la molécula de ácido nucleico se proporciona en el contexto de una construcción de vector, preferiblemente un plásmido. La partícula vehículo núcleo es preferiblemente, por ejemplo una partícula vehículo balística de oro o de tungsteno. El antígeno seleccionado puede obtenerse o extraerse de cualquier agente contra el que se desee provocar una respuesta inmune y puede ser por lo tanto un agente de enfermedad infecciosa o parasitaria, un antígeno específico de tumor o un "auto" antígeno, un alérgeno o similares. En realizaciones particulares, el antígeno es un antígeno viral, tal como un antígeno de un virus de la hepatitis B (HBV), un virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o un virus de la gripe. En otras realizaciones, el antígeno es de un parásito, tal como un parásito de la malaria. El adyuvante seleccionado puede ser cualquier composición adyuvante adecuada. En realizaciones particulares, el adyuvante es al menos parcialmente soluble en etanol. Los adyuvantes preferidos incluyen monofosforil lípido A (MPL), y saponinas tales como Quil-A. Otros adyuvantes preferidos son los llamados adyuvantes de cambio inmune como se describen en este documento. Todas estas composiciones pueden usarse en la fabricación de un medicamento para su uso en técnicas de inmunización con ácido nucleico.

La invención también proporciona un dispositivo de aceleración de partículas, adecuado para la inmunización con ácido nucleico mediada por partículas, y que se carga con las partículas recubiertas y una casete de suministro adecuada para su uso en el dispositivo de suministro mediado por partículas, casete que se carga con las partículas recubiertas.

La invención también proporciona usos de las partículas recubiertas descritas anteriormente para provocar una respuesta inmune contra un antígeno seleccionado en un individuo vacunado. Dichos usos suponen suministrar la composición directamente a las células que presentan un sitio diana en el individuo en una cantidad suficiente para producir la respuesta inmune deseada. Las partículas vehículo núcleo recubiertas (por ejemplo, partículas balísticas de oro o de tungsteno) pueden administrarse usando una técnica de suministro transdérmico, tal como una técnica de suministro mediado por partículas. Un tejido diana preferido es por lo tanto el tejido epidérmico.

Por consiguiente, la invención también proporciona:

- uso de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un antígeno y un adyuvante que es eficaz para potenciar al menos un componente de una respuesta inmune provocada contra el antígeno, en el que el adyuvante está presente en dicha composición en una forma distinta a ADN, para la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune contra un antígeno seleccionado en un individuo, mediante un método que comprende suministrar el medicamento directamente a las células presentes en un sitio diana en el individuo;

- uso de un adyuvante que es eficaz para potenciar al menos un componente de una respuesta inmune provocada contra un antígeno, en el que el adyuvante está en una forma distinta al ADN, para la fabricación de un medicamento para potenciar una respuesta inmune en un individuo en el que el medicamento se suministra directamente a las células presentes en un sitio diana en el individuo y se coadministra junto con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un antígeno; y

- uso de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un antígeno, para la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune en un individuo, en el que el medicamento se coadministra

junto con un adyuvante que es eficaz para potenciar al menos un componente de una respuesta inmune provocada contra el antígeno, en el que el adyuvante está presente en una forma distinta de ADN y el adyuvante se administra directamente a las células presentes en un sitio diana en el individuo.

5 También se describen en este documento composiciones para su uso en procedimientos de vacunación con ácido nucleico (genética), composiciones que se forman a partir de la combinación de una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia que codifica un antígeno de interés y un adyuvante de cambio inmune que es eficaz para potenciar el componente Th1 de una respuesta inmune provocada contra el antígeno en un individuo vacunado. En este caso de nuevo, el adyuvante de cambio inmune está presente en la composición en una forma distinta a ADN, 10 y la composición está destinada al suministro directo intracelular. El antígeno puede ser de un agente de enfermedad infecciosa o parasitaria y/o el adyuvante de cambio inmune puede ser monofosforil lípido A. La composición puede recubrir una partícula vehículo núcleo para proporcionar una preparación farmacéutica.

15 En este documento también se describe un método para provocar una respuesta inmune contra un antígeno seleccionado en un individuo (por ejemplo, vacunación contra un agente de enfermedad infecciosa) que incluye las etapas de suministrar a las células del individuo una construcción genética que causa la expresión en las células del individuo de un antígeno a niveles suficientes para producir una respuesta inmune específica del antígeno; y coadministrar al individuo en las proximidades del punto de suministro de la construcción genética, una cantidad eficaz de un adyuvante de cambio inmune suficiente para causar un cambio en el equilibrio de las repuestas inmunes de tipo Th1 y Th2 20 provocadas en el individuo vacunado a partir de la respuesta que se obtendría sin el adyuvante de cambio inmune. Esto facilita el uso de vacunas genéticas a través del uso de adyuvantes de cambio inmune que alteran o redirigen la respuesta inmunológica de un individuo a una vacuna genética.

25 Es una ventaja de la presente invención que pueda potenciarse la eficacia de las composiciones de vacuna genética. Es otra ventaja que los métodos y las composiciones descritas en este documento puedan usarse para modificar o alterar específicamente la naturaleza de una respuesta inmune generada usando una composición de vacuna genética.

30 Este y otros objetos, realizaciones y ventajas de la invención serán evidentes para los especialistas en la técnica en vista de la descripción en este documento.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un histograma que representa los resultados del Experimento 1.

35 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

40 Antes de describir la presente invención con detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a formulaciones de vacuna o parámetros de proceso particulares ya que, por supuesto, estos podrían variar. También debe entenderse que la terminología usada en este documento es solamente para fines de descripción de realizaciones particulares de la invención y no pretende ser limitante.

45 Debe observarse que, como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “uno” y “el” incluyen los referentes plurales a menos que el contenido indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “una partícula” incluye dos o más partículas, la referencia a “un antígeno” o “un adyuvante” incluye una mezcla o una combinación de dos o más de dichos agentes, la referencia a “un excipiente” incluye mezclas o combinaciones de dos o más excipientes y similares.

A. Definiciones

50 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un especialista en la técnica a la que se refiere la invención. Aunque en la práctica pueden usarse varios métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento, en este documento se describen los materiales y métodos preferidos.

55 Para describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos, que pretenden definirse como se indica a continuación.

60 Como se usa en este documento, la expresión “suministro transdérmico” incluye el suministro intradérmico (por ejemplo, en la dermis o epidermis) y transdérmico (por ejemplo, “percutáneo”) es decir, el suministro mediante el paso de un agente en o a través de al menos una capa superior de la piel. Véase por ejemplo, el documento *Transdermal Drug Delivery: Developmental issues and Research Initiatives*, Hadgraft and Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989); *Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications*, Robinson and Lee (eds.), Marcel Dekker Inc., (1987); y *Transdermal Delivery of Drugs*, Vols. 1-3, Kydonieus and Berner (eds.), CRC Press, (1987).

65 Un “antígeno” se refiere a un resto o agente inmunogénico, generalmente una macromolécula, que puede provocar una respuesta inmune en un individuo. El término puede usarse para referirse a una macromolécula individual o a una población homogénea o heterogénea de macromoléculas antigenéticas. Como se usa en este documento, el término “antígeno” incluye alérgenos. Por lo tanto, el término “antígeno” abarca ampliamente restos que incluyen proteínas,

polipéptidos, fragmentos de proteína antigenicos, oligosacáridos, polisacáridos, productos o composiciones químicas orgánicas o inorgánicas y similares. Además, el antígeno puede extraerse u obtenerse de cualquier virus, bacteria, parásito, protozoóo u hongo y puede ser un organismo completo. El término también incluye antígenos tumorales o los llamados "auto" antígenos, que están implicados en la enfermedad autoinmune. Análogamente, un oligonucleótido o polinucleótido que expresa un antígeno, tal como en aplicaciones de inmunización con ácido nucleico, también

5 se incluye en la definición. También se incluyen los antígenos sintéticos, por ejemplo, polipeptídos, epítopos flanqueantes, y otros antígenos obtenidos de forma recombinante o sintética (Bergmann *et al.* (1993) *Eur. J. Immunol.* 23: 2777-2781; Bergmann *et al.* (1996) *J. Immunol.* 157: 3242-3249; Suhrbier, A. (1997) *Immunol. And Cell Biol.* 75: 402-408; Gardner *et al.* (1998) 12th World AIDS Conference, Ginebra, Suiza, 28 de junio-3 de Julio de 1998).

10

Las expresiones "molécula de ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan de forma intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótido de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen un gen, un fragmento de un gen, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN transferente, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores.

15 Un "gen", como se usa en el contexto de la presente invención, es una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico (cromosoma, plásmido, etc.) con el que se asocia una función genética. Un gen es una unidad hereditaria, por ejemplo de un organismo, que comprende una secuencia de polinucleótidos (por ejemplo, una secuencia de ADN para mamíferos) que ocupa una ubicación física específica (un "locus del gen" o "locus genético") dentro del genoma de un organismo. Un gen puede codificar un producto expresado, tal como un polipéptido o un polinucleótido (por ejemplo, ARNt). Como alternativa, un gen puede definir una ubicación genómica para un suceso/función particular, tal como la unión de proteínas y/o ácidos nucleicos (por ejemplo, sitios de unión al fago), en el que el gen no codifica un producto expresado. Típicamente, un gen incluye secuencias codificantes, tales como secuencias que codifican polipéptidos y secuencias no codificantes, tales como secuencias promotoras, secuencias de poliadenilación, secuencias reguladoras de la transcripción (por ejemplo, secuencias potenciadoras). Muchos genes eucariotas tienen "exones" (secuencias codificantes) interrumpidos por "intrones" (secuencias no codificantes). En algunos casos, un gen puede compartir secuencias con otro(s) gen(es) (por ejemplo, genes solapantes).

30

30 Una "secuencia codificante" o una secuencia que "codifica" un polipéptido seleccionado, es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) a un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de las secuencias reguladoras apropiadas (o "elementos de control"). La expresión abarca a un gen. Los límites de la secuencia codificante se determinan mediante un codón de inicio en el extremo 5' (amino) y el codón de terminación de la traducción en el extremo 3' (carboxilo). Una secuencia codificante puede incluir, aunque sin limitación, ADNc de ARNm eucariota, procariota o viral, secuencias de ADN genómicas de ADN procariota o viral o incluso secuencias de ADN sintéticas. Una secuencia de terminación de la transcripción puede situarse en posición 3' con respecto a la secuencia codificante. La transcripción y la traducción de secuencias codificantes están reguladas típicamente mediante "elementos de control" incluyendo, aunque sin limitación, promotores de la transcripción, elementos potenciadores de la transcripción, señales de terminación de la transcripción, secuencias de poliadenilación (situadas en posición 3' con respecto al codón de terminación de la traducción), secuencias para la optimización del inicio de la traducción (situadas en posición 5' con respecto a la secuencia codificante) y secuencias de terminación de la traducción.

45 Un "vector" es cualquier resto que es capaz de transferir moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, polinucleótidos o secuencias génicas) a células diana (por ejemplo, vectores virales, vectores no virales, vehículos particulados y liposomas). Típicamente, "construcción de vector", "vector de expresión" y "vector de transferencia de genes", significan cualquier construcción de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen de interés y que puede transferir secuencias génicas a células diana. Por lo tanto, la expresión incluye vehículos de clonación y de expresión, así como vectores virales.

50 "Unido de forma operativa" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes descritos están configurados de modo que realicen su función habitual. Por lo tanto, un promotor dado que se une de forma operativa a una región codificante (por ejemplo, una secuencia que codifica un antígeno de interés) es capaz de provocar la expresión de la secuencia codificante cuando las proteínas reguladoras y las enzimas apropiadas están presentes. En algunos casos, algunos elementos de control no necesitan ser contiguos a la secuencia codificante, mientras funcionen dirigiendo la expresión de la misma. Por ejemplo, pueden estar presentes secuencias ya transcritas aunque no traducidas intermedias entre la secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora puede seguir considerándose "unida de forma operativa" a la secuencia codificante.

60

55 "Recombinante" como se usa en este documento para describir una molécula de ácido nucleico, significa un polinucleótido de ADNc genómico, de origen semisintético o sintético que, gracias a su origen o a la manipulación: (1) no se asocia con toda o una parte de polinucleótido con el que se asocia de forma natural; y/o (2) está unido a un polinucleótido diferente al que está unido en la naturaleza. El término "recombinante" como se usa respecto a una proteína o polipéptido, significa un polipéptido producido mediante la expresión de un polinucleótido recombinante.

65 Las técnicas para determinar la "identidad de secuencia" de un ácido nucleico y de un aminoácido se conocen en la técnica. Típicamente, dichas técnicas incluyen determinar la secuencia de nucleótidos del ARNm para un gen

y/o determinar la secuencia de aminoácidos codificada en su interior y comparar estas secuencias con una segunda secuencia de nucleótidos o aminoácidos. En general, “identidad” se refiere a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, respectivamente. Pueden compararse dos o más secuencias (polinucleótido o aminoácido) determinando su “identidad porcentual”. La identidad porcentual de dos secuencias, ya sean secuencias de ácido nucleico o de aminoácido, es la cantidad de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas dividido por la longitud de la secuencia más corta y multiplicado por 100. Un alineamiento aproximado para las secuencias de ácidos nucleicos se proporciona mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489. Este algoritmo puede aplicarse a secuencias de aminoácidos usando la matriz de valoración desarrollada por Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M.O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. USA, y normalizada por Gribskov (1986) *Nucl. Acids Res.* 14(6): 6745-6763. Una implementación ejemplar de este algoritmo para determinar la identidad porcentual de una secuencia se proporciona por el grupo Genetics Computer Group (Madison, WI) en la aplicación de utilidad “BestFit”. Los parámetros por defecto para este método se describen en el Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Versión 8 (1995) (disponible del Genetics Computer Group, Madison, WI). Un método preferido para establecer la identidad porcentual en el contexto de la presente invención es usar el paquete de programas MPSRCH registrado por la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). Para este tipo de paquetes informáticos puede emplearse el algoritmo de Smith-Waterman usando parámetros por defecto para la tabla de valoración (por ejemplo, penalización de apertura de hueco de 12, penalización de extensión de hueco de uno, y un hueco de seis). A partir de los datos generados, el valor de “Coincidencia” refleja la “identidad de secuencia”. Otros programas adecuados para calcular la identidad o similitud porcentuales entre secuencias se conocen generalmente en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineamiento es BLAST, usado con los parámetros por defecto. Por ejemplo, pueden usarse BLASTN y BLASTP usando los siguiente parámetros por defecto: código genético = convencional; filtro = ninguno; cadena = ambas; límite = 60; valor esperado = 10; matriz = BLOSUM62; descripciones = 50 secuencias; clasificada mediante = VALOR MÁS ALTO; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR. Los detalles acera de estos programas pueden encontrarse en la siguiente dirección de Internet: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

Como alternativa, la homología puede determinarse mediante hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguida de digestión con nucleasa(s) específica(s) de cadena sencilla y la determinación del tamaño de los fragmentos dirigidos. Dos secuencias de ADN, o de polipéptidos son “sustancialmente homólogas” entre sí cuando las secuencias muestran al menos aproximadamente el 80-85%, preferiblemente al menos el 90% y más preferiblemente al menos el 95-98% de identidad de secuencia en una longitud definida de las moléculas, según lo determinado usando los métodos anteriores. Como se usa en este documento, sustancialmente homólogas también se refiere a secuencias que muestran identidad completa con la secuencia de ADN o de polipéptido especificadas. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas pueden identificarse en un experimento de hibridación de Southern en, por ejemplo, condiciones rigurosas, como se define para este sistema en particular. Por ejemplo, las condiciones de hibridación rigurosas pueden incluir formamida al 50%, 5 volúmenes de solución de Denhardt, 5 volúmenes de SSC, SDS al 0,1% y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y las condiciones de lavado pueden incluir 2 volúmenes de SSC, SDS al 0,1% a 37°C seguido de un volumen de SSC y SDS al 0,1% a 68°C. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas está dentro del alcance de la técnica. Véase por ejemplo el documento Sambrook *et al.*, *supra*; *DNA Cloning, supra*; *Nucleic Acid Hybridization, supra*.

La expresión “composición de vacuna” se refiere a cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno (particularmente, como se usa en este documento, la expresión se refiere a una composición que contiene una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que codifica un antígeno), composición que puede usarse para prevenir o tratar una enfermedad o afección en un sujeto. Las composiciones de vacuna también pueden contener uno o más adyuvantes. Típicamente, una composición de vacuna se usa para la profilaxis de una enfermedad causada por un patógeno, sin embargo, las composiciones de vacuna de la presente invención también pueden usarse en un contexto terapéutico.

Una “respuesta inmunológica” o “respuesta inmune” contra un agente, un antígeno o una composición de interés seleccionada es el desarrollo en un individuo de una respuesta inmune humoral y/o celular a moléculas (por ejemplo, un antígeno) presentes en el agente o composición de interés. Para los fines de esta invención, una “respuesta inmune humoral” se refiere a una respuesta inmune mediada por moléculas de anticuerpo, mientras que una “respuesta inmune celular” es una respuesta mediada por linfocitos T y otros glóbulos blancos sanguíneos.

Se entiende que las respuestas inmunes de mamífero implican una cascada inmune después de una de dos amplias categorías de respuesta, caracterizada por la clase de célula T ayudante que puede iniciar la cascada. Por lo tanto, una respuesta inmune a un antígeno específico puede caracterizarse como una respuesta de tipo ayudante T 1 (Th1) o de tipo ayudante T 2 (Th2), dependiendo del tipo de citocinas que se liberan de los linfocitos T específicos del antígeno, después de la presentación del antígeno. Las respuestas inmunes de Th1 se caracterizan generalmente por la liberación de citocinas inflamatorias, tales como IL-2, interferón-gamma (IFN- γ), y factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) a partir de las células T ayudantes estimuladas con el antígeno. Las respuestas Th1 también se asocian con una fuerte inmunidad celular (por ejemplo CTL) y la producción de subclases de anticuerpos anti-IgG que poseen actividad opsonizadora y de fijación al complemento, tales como IgG2a en el modelo de ratón usado habitualmente. Por otro lado, las respuestas inmunes de Th2 se caracterizan por la liberación de citocinas no inflamatorias, tales como IL-4 e IL-10, después de la estimulación de células T ayudantes específicas del antígeno. Las respuestas Th2 no favorecen

generalmente la máxima actividad de CTL, sino que se asocian con fuertes respuestas de anticuerpos, representando subclases de IgG tales como IgG1 en el ratón, clases de anticuerpos que carecen de actividad opsonizadora y de fijación al complemento. En general, los niveles de anticuerpo asociados con las respuestas Th2 se consideran más fuertes que los asociados con las respuestas Th1.

5 El término “adyuvante” significa cualquier material o composición capaz de alterar, promover, dirigir, redirigir, potenciar o iniciar de forma específica o no específica una respuesta inmune específica de antígeno. Por lo tanto, la coadministración de un adyuvante y un antígeno (por ejemplo, en forma de composición de vacuna) puede dar como resultado una dosis menor o una menor cantidad de dosis de antígeno necesarias para conseguir una respuesta inmune deseada en el sujeto al que se le administra el antígeno. En algunas realizaciones de la invención, la coadministración de un adyuvante con un ácido nucleico que codifica un antígeno puede redirigir la respuesta inmune contra el antígeno, por ejemplo, donde la respuesta inmune se redirige de una respuesta inmune de tipo Th2 a una de tipo Th1, o viceversa. La eficacia de un adyuvante puede determinarse administrando el adyuvante con una composición de vacuna y controles de composición de vacuna a animales y comparando los títulos de anticuerpo y/o la inmunidad mediada por células 10 contra los dos usando ensayos convencionales tales como radioinmunoensayos, ELISA, ensayos CTL y similares, bien conocidos en la técnica. Típicamente, en una composición de vacuna, el adyuvante es un resto diferente del antígeno, aunque una única molécula puede tener propiedades adyuvantes y antigénicas (por ejemplo, la toxina del cólera). Para los fines de la presente invención, se usa un adyuvante para potenciar la respuesta inmune a un antígeno específico, por ejemplo cuando un adyuvante se coadministra con la composición de vacuna, la respuesta inmune resultante es 15 mayor que la respuesta inmune provocada por una cantidad equivalente de la composición de vacuna administrada sin el adyuvante, o el adyuvante se usa para redirigir la naturaleza de la respuesta inmune. Además, para los fines de la presente invención, una “cantidad eficaz” de un adyuvante será la cantidad que potencia una respuesta inmunológica a un antígeno coadministrado en una composición de vacuna de modo que se necesiten dosis menores o menos dosis para generar una respuesta inmune eficaz, o una “cantidad eficaz” de un adyuvante será la cantidad suficiente para 20 producir un cambio o redirección de la respuesta inmune en relación con la respuesta inmune al antígeno en solitario. Una “composición adyuvante” se refiere a cualquier composición farmacéutica que contiene un adyuvante.

Un “adyuvante de cambio inmune” es un adyuvante que es eficaz para alterar o dirigir (redirigir) la naturaleza de una respuesta inmune contra un antígeno seleccionado, que recibe el antígeno y el adyuvante de cambio inmune. La 30 alteración o redirección está en relación con la naturaleza de la respuesta inmune que se dirige contra el antígeno en ausencia del adyuvante de cambio inmune. Por lo tanto, dichos adyuvantes se usan en este documento para cambiar la naturaleza de una respuesta inmune provocada contra un antígeno seleccionado (un antígeno codificado por una secuencia de ácido nucleico presente en una composición de vacuna genética) para favorecer una respuesta de tipo Th1 en lugar de una respuesta de tipo Th2 o para favorecer una respuesta de tipo Th2 en lugar de una respuesta de tipo 35 Th1. Pueden usarse varios adyuvantes conocidos en este documento como adyuvantes de cambio inmune incluyendo, aunque sin limitación el adyuvante monofosforil lípido A (MPL). La capacidad de un adyuvante para servir como adyuvante de cambio inmune puede determinarse ensayando la naturaleza de las respuestas inmunes generadas por la administración de la composición de vacuna en solitario y la administración de la composición de vacuna con el adyuvante. Estos ensayos pueden implicar una caracterización o identificación de los tipos de citocinas que se liberan 40 a partir de linfocitos T específicos de antígeno después de la presentación del antígeno en un individuo y/o de la caracterización o identificación de las subclases de IgG predominantes que provoca la combinación antígeno/adyuvante en relación con el antígeno en solitario. Toda esta caracterización o identificaciones están dentro del alcance del especialista en la técnica de acuerdo con la presente memoria descriptiva.

45 Como se usa en este documento, el término “coadministrado” tal como cuando un adyuvante se “coadministra” con un ácido nucleico que codifica un antígeno (por ejemplo, una composición de vacuna) abarca la administración simultánea o concurrente de la adyuvante y el antígeno, por ejemplo, cuando los dos están presentes en la misma composición o se administran en composiciones diferentes casi al mismo tiempo pero en sitios diferentes, así como el suministro de adyuvante y antígeno en composiciones diferentes en momentos diferentes. Por ejemplo, la composición 50 adyuvante puede suministrarse antes de o posteriormente al suministro del antígeno en el mismo sitio o en un sitio diferente. La temporización entre los suministros de adyuvante y de antígeno puede variar entre una separación de aproximadamente varios minutos y una separación de varias horas o incluso una separación de varios días.

55 Como se usa en este documento, el término “tratamiento” incluye cualquiera de los siguientes: la prevención de infección o reinfección; la reducción o eliminación de los síntomas; y la reducción o la completa eliminación de un patógeno. El tratamiento puede realizarse de forma profiláctica (antes de la infección).

60 Los términos “individuo” y “sujeto” se usan de forma intercambiable en este documento para referirse a cualquier miembro del subfilo cordados, incluyendo, aunque sin limitación, seres humanos y otros primates (incluyendo primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de mono), animales de granja tales como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; animales domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y cobayas; aves (incluyendo aves domésticas, salvajes y de caza, tales como gallinas, pavos y otras gallináceas, patos, gansos); peces y similares. Los términos no delimitan una edad en particular. Por lo tanto, pretende abarcarse individuos adultos y recién nacidos. Los métodos descritos en este documento se refieren al uso 65 en cualquiera de las especies de vertebrado anteriores, puesto que los sistemas inmunes de todos estos vertebrados funcionan de forma similar.

B. Métodos generales

Una premisa básica de la presente invención es el descubrimiento de que puede incorporarse un adyuvante no ADN en una composición de vacuna basada en ácido nucleico (por ejemplo, una composición de vacuna genética o de ADN) y puede usarse para alterar, potenciar, dirigir o redirigir la naturaleza de la respuesta inmune a un antígeno en un individuo tratado. Las composiciones, que contienen una combinación de una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia que codifica un antígeno de interés y un adyuvante que está en una forma distinta a ADN, se administran directamente a las células presentes en el tejido diana de un individuo a tratar. La composición recubre a unas partículas vehículo núcleo, lo que facilita enormemente el suministro directo intracelular de las nuevas composiciones. El componente adyuvante de la composición es eficaz para potenciar al menos un aspecto de una respuesta inmune provocada contra el antígeno acompañante. En algunos aspectos de la invención, el adyuvante se selecciona para cambiar o redirigir la naturaleza de la respuesta inmune específica del antígeno en relación con la respuesta inmune específica del antígeno que se genera en ausencia del adyuvante coadministrado. En otros aspectos de la invención, el adyuvante se selecciona para potenciar el componente de ayudante T 1 (Th1) de la respuesta inmune específica del antígeno.

En un aspecto particular de la invención, se ha descubierto que la adición de un adyuvante de cambio de la respuesta inmune apropiado a una vacuna de ADN tiene el efecto de estimular y cambiar la respuesta inmune específica de antígeno provocada por la vacuna para favorecer una respuesta Th1 en lugar de una respuesta Th2. Un adyuvante particular que se ha descubierto que tiene este efecto es el monofosforil lípido A (MPL), aunque se han identificado otros adyuvantes que tienen efectos similares. Dicho cambio de respuesta inmune en una vacuna de ADN aumenta la eficacia de vacunas de ADN para diversas enfermedades infecciosas, tales como la malaria.

Antígenos

Las moléculas de ácido nucleico para el componente de vacuna genética de la presente composición no necesitan técnicas de preparación muy elaboradas. La etapa de preparación más crítica es, evidentemente, la selección de una secuencia apropiada que codifica un antígeno de interés. El antígeno se selecciona de tal modo que la respuesta inmune, cuando se provoca, proporcionará algún nivel de efecto terapéutico al individuo vacunado, por ejemplo algún nivel de protección eficaz contra un agente de la enfermedad. En aquellas realizaciones en las que se pretende que la respuesta inmune a partir de una vacuna de ADN pueda modificarse para potenciar el carácter Th1 de respuesta inmune, el antígeno codificado por el ADN en la vacuna se seleccionará teniendo en cuenta este efecto.

Por lo tanto, en general, el antígeno se seleccionará teniendo en cuenta un método de suministro, el tejido diana y el adyuvante acompañante particulares. Por ejemplo, la inmunización mediada por partículas de ratones con vectores que codifican el antígeno de la nucleoproteína del virus de la gripe (NP), antígeno carcinoembrionario humano (CEA), o antígeno CS de *P. falciparum* dan como resultado predeciblemente la inducción de respuesta a anticuerpos indicativas de una respuesta Th2. Por otro lado, la inmunización de ratones con vectores que codifican proteínas de VIH da como resultado inicialmente respuestas de tipo Th1 que pueden convertirse en respuestas Th2 con inmunizaciones adicionales. Además, la inmunización con vectores que codifican los antígenos de la superficie y del núcleo del virus de la hepatitis B (HBV) dan como resultado una respuesta que puede clasificarse como Th0 debido a la representación por igual de las principales subclases de IgG en la respuesta inmune específica del antígeno. Por lo tanto, para algunas enfermedades infecciosas o parasitarias, es posible que el resultado inmunológico después de la vacunación con ADN sea apropiado para proporcionar una protección óptima, mientras que para otras, es necesaria la modulación o la redirección del resultado inmunológico para conseguir un nivel eficaz de protección que sea superior al observado sin el uso del adyuvante. Por ejemplo, también es posible que para algunas enfermedades infecciosas o parasitarias, las respuestas inmunes, aún siendo de potencia significativa, puedan no ser apropiadas para proporcionar un efecto terapéutico óptimo, por ejemplo protección. En otras palabras, la respuesta inmune puede ser cuantitativamente suficiente, pero cualitativamente insuficiente. Éste puede ser el caso de la malaria, en la que los datos de vacunas anteriores indican que las respuestas Th1 pueden ser importantes, pero donde, cuando se usa un vector de plásmido que codifica CS, se provocan respuestas Th2 mediante vacunación con ADN de la epidermis. Por lo tanto el efecto del tipo de adyuvante previsto en este documento puede no potenciar el nivel cuantitativo de respuesta inmune, sino en su lugar redirigir simplemente la respuesta inmune para potenciar el componente Th1 de esa respuesta.

Por consiguiente, para el componente de ácido nucleico de las presentes composiciones, un sistema promotor adecuado será una secuencia unida de forma operativa que codifica un antígeno de interés. El antígeno de interés estará asociado preferiblemente con un patógeno, tal como un patógeno viral, bacteriano o parasitario o el antígeno puede ser un antígeno específico de tumor, o un auto-antígeno o un alérgeno. El antígeno puede ser una proteína de longitud completa. Como alternativa, el antígeno puede estar constituido esencialmente por un epítopo de células B o un epítopo de células T de un antígeno.

Los antígenos específicos de tumor incluyen, aunque sin limitación, cualquiera de los diversos MAGE (antígeno E asociado a melanoma), incluyendo MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3 (péptido HLA-A1), MAGE 4, etc. cualquiera de las diversas tirosinatas (péptido HLA-A2); ras mutante; p53 mutante; y antígeno de melanoma p97. Otros antígenos específicos de tumor incluyen el péptido Ras y el péptido p53; asociados con cánceres avanzados, los antígenos HPV 16/18 y E6/E7 asociados con cánceres cervicales, el antígeno MUC1-KLH asociado con carcinoma de mama, CEA (antígeno carcinoembrionario) asociado con cáncer colorrectal, antígenos gp100 o MART1 asociados con melanoma y el antígeno PSA asociado con cáncer de próstata. La secuencia del gen p53 se conoce (véase por ejemplo el docu-

mento Harris *et al.* (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 4650-4656) y está depositada en el GenBank con el número de acceso M14694.

Los antígenos virales adecuados incluyen, aunque sin limitación, antígenos obtenidos o extraídos de la familia del virus de la hepatitis, incluyendo virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la hepatitis delta (HDV), virus de la hepatitis E (HEV) y virus de la hepatitis G (HGV). Como ejemplo, se conoce la secuencia del genoma viral del HBV, y también métodos para obtener secuencias que codifican antígenos a partir de ésta. Véase por ejemplo Ganem *et al.* (1987) *Annu. Rev. Biochem.* 56: 651-693; Hollinger, F.B. (1990) *Hepatitis B virus*, vol. II, pág. 2171-2235, en Fields *et al.* (eds.), *Virology* 2^a ed. Raven Press, Nueva York, NY; y Valenzuela *et al.*, (1980) *The nucleotide Sequence of the Hepatitis B viral Genome and the Identification of the Major Viral Genes*, pág. 57-70; en Fields *et al.* (eds.), *Animal Virus Genetics*, Academic Press, Nueva York, NY). El genoma de HBV codifica varias proteínas virales, incluyendo los polipéptidos antigenicos de superficie grande, mediano y principal, el polipéptido del gen X, y el polipéptido del núcleo. Véase por ejemplo, Yokosuka *et al.* (1986) *N. Engl. J. Med.* 315: 1187-1192; Imazeki *et al.* (1987) *Hepatology* 7: 753-757; Kaneko *et al.* (1988); *J. Virol.* 62: 3979-3984; y Ou *et al.* (1990) *J. Virol.* 64: 4578-4581. De igual modo, se conoce la secuencia genómica viral de HCV, al igual que métodos para obtener la secuencia. Véase por ejemplo, las Publicaciones Internacionales N° WO 89/04669; WO 90/11089; y WO 90/14436. El genoma de HCV codifica varias proteínas virales, incluyendo E1 y E2. Véase por ejemplo, el documento Houghton *et al.* (1991) *Hepatology* 143: 381-388. Las secuencias que codifican estas proteínas de HBV y HCV, así como los fragmentos antigenicos de las mismas, se usarán en los presentes métodos. Análogamente, se conoce la secuencia codificante del antígeno δ de HDV (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.378.814).

De igual modo, en la presente invención pueden usarse secuencias que codifican una amplia variedad de antígenos proteicos de la familia del herpesvirus incluyendo antígeno extraídos u obtenidos de virus herpes simplex (HSV) tipos 1 y 2, tales como las glicoproteínas de HSV-1 y HSV-2 gB, gD y gH; antígenos del virus varicela zoster (VZV), virus Epstein-Barr (EBV) y citomegalovirus (CMV) incluyendo gB y gH de CMV; y antígenos de otros herpesvirus humanos tales como HHV6 y HHV7. (Véase por ejemplo Chee *et al.* (1990) *Cytomegaloviruses* (J.K. McDougall, ed., Springer-Verlag, pág. 125-169; McGeoch *et al.* (1988) *J. Gen. Virol.* 69: 1531-1574; Patente de Estados Unidos N° 5.171.568; Baer *et al.* (1984) *Nature* 310: 207-211; y Davison *et al.* (1986) *J. Gen. Virol.* 67: 1759-1816).

Los antígenos de VIH, tales como las secuencias gp120 de múltiples aislados de VIH-1 y VIH-2 incluyendo miembros de los diversos subtipos genéticos de VIH, se conocen y se presentan (véase por ejemplo, Myers *et al.*, Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico (1992); y Modrow *et al.* (1987) *J. Virol.* 61: 570-578) y los antígenos obtenidos de cualquiera de estos aislados podrán usarse en los presentes métodos. Además, la invención también es aplicable a otros restos inmunogénicos obtenidos de cualquiera de los diversos aislados de VIH, incluyendo cualquiera de las diversas proteínas de la envuelta tales como gp160 y gp41, antígenos gag tales como p24gag y p55gag, así como proteínas obtenidas de las regiones *pol*, *env*, *tat*, *vif*, *rev*, *nef*, *vpr*, *vpu* y LTR del VIH.

Las secuencias que codifican antígenos extraídos u obtenidos de otros virus también podrán usarse en los métodos reivindicados, tales como, pero sin limitación, secuencias de miembros de las familias Picornaviridae (por ejemplo poliovirus, etc); Caliciviridae; Togaviridae (por ejemplo, virus de la rubéola, virus del dengue, etc); Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae; Birnaviridae; Rhabodoviridae (por ejemplo, virus de la rabia, etc.); Filoviridae; Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, etc.); Bunyaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (por ejemplo, HTLV-I; HTLV-II; VIH-1 (también conocido como HTLV-III, LAV, ARV; hTLR, etc.)), incluyendo aunque sin limitación antígenos de los aislados VIH_{IIIb}, VIH_{SF2}, VIH_{LAV}, VIH_{LA1}, VIH_{MN}); VIH-1_{CM235}, VIH-1_{USA}; VIH-2 entre otros. Véase por ejemplo, el documento *Virology*, 3^a Edición (W. K. Joklik ed. 1988); *Fundamental Virology*, 2^a Edición (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds. 1991), para una descripción de estos y de otros virus.

Las secuencias que codifican antígenos bacterianos y parasitarios adecuados se obtienen o se extraen de agentes causantes conocidos responsables de enfermedades tales como Difteria, Tos ferina, Tétanos, Tuberculosis, Neumonía Bacteriana o Fúngica, Cólera, Fiebres Tifoideas, Peste, Shigelosis o Salmonelosis, Enfermedad del Legionario, Enfermedad de Lyme, Lepra, Malaria, Anquilostomosis, Oncocerciasis, Esquistosomiasis, Tripamasomiasis, Lessmaniasis, Giardiasis, Amebiasis, Filariasis, Boreliasis y Triquinosis. Otros antígenos pueden obtenerse o extraerse de virus no convencionales o agentes similares a virus, tales como los agentes causantes de Kuru, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), escrapie, encefalopatía transmisible del visón y enfermedades de desgaste crónico o partículas infecciosas proteicas, tales como priones, que se asocian con la enfermedad de las vacas locas.

Las secuencias que codifican alérgenos adecuados que pueden usarse en la presente invención incluyen, aunque sin limitación, alérgenos de polen, polvillo procedente de animales, gramíneas, mohos, polvo, antibióticos, venenos de picadura de insecto y diversos alérgenos ambientales, farmacológicos y alimentarios. Los alérgenos de árboles comunes incluyen polen de álamo, árbol de la tulipas, fresno, abedul, arce, roble, nogal y pecana; los alérgenos de plantas comunes incluyen los de centeno, ambrosía, musa inglesa, acedera, y verdolaga; los alérgenos vegetales de contacto incluye los de zumaque venenoso, hiedra venosa y ortigas; los alérgenos comunes de gramíneas incluyen alérgenos de Timothy, Jonson, Bermuda, festuca y grama azul; también pueden obtenerse alérgenos comunes de mohos u hongos tales como Alternaria, Fusarium, Hormodendrum, Aspergillus, Micropolyspora, Mucor y actinomicetos termófilos; la penicilina y tetraciclina son alérgenos de antibióticos comunes; los alérgenos epidérmicos pueden obtenerse de polvos

domésticos y orgánicos (típicamente de origen fúngico), de insectos tales como ácaros domésticos (dermatphagoides pterosinensis), o de fuentes animales tales como plumas y polvillo procedente de perros y gatos; los alérgenos alimentarios comunes incluyen leche y queso (lácteos), huevos, trigos, nueces (por ejemplo, cacahuetes), alimentos marinos (por ejemplo, marisco), alérgenos de guisantes, judías y gluten; los alérgenos farmacológicos comunes incluyen alérgenos de anestesia local y de salicilatos; y los alérgenos de antibióticos incluyen alérgenos de penicilina y sulfonamida, y los alérgenos de insectos comunes incluyen veneno de abeja, de avispa y de hormigas, y alérgenos de cucaracha. Los alérgenos particularmente bien caracterizados incluyen, aunque sin limitación, los epítopos principales y crípticos del alérgeno Der p 1 (Hoynes *et al.* (1994) *Immunology* 83: 190-195), la fosfolipasa A2 del veneno de abeja (PLA) (Akdis *et al.* (1996) *J. Clin. Invest.* 98: 1676-1683), el alérgeno del polen de abedul Bet v 1 (Bauer *et al.*, (1997) *Clin. Exp. Immunol.* 107: 536-541), y el alérgeno de gramíneas recombinante multiepitípico rKBG8.3 (Cao *et al.* (1997) *Immunology* 90: 46-51). Estos y otros alérgenos adecuados están disponibles en el mercado y/o pueden prepararse fácilmente de acuerdo con técnicas conocidas.

La secuencia codificante del antígeno de interés puede obtenerse y/o prepararse usando métodos conocidos. Por ejemplo, pueden obtenerse preparaciones de antígeno sustancialmente puro usando herramientas de biología molecular convencionales. Esto es, las secuencias de polinucleótidos que codifican los antígenos descritos anteriormente pueden obtenerse usando métodos recombinantes, tales como la exploración de bibliotecas de ADNc y genómicas de células que expresan el gen, o extrayendo el gen de un vector que se sabe que incluye el mismo. Además, la secuencia deseada puede aislarse directamente de células y tejidos que la contienen, usando técnicas convencionales, tales como extracción con fenol y PCR de ADNc o de ADN genómico. Véase por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra* para una descripción de técnicas usadas para obtener un ADN aislado. Las secuencias de polinucleótidos también pueden producir de forma sintética, en lugar de clonarse.

Otro método conveniente para aislar moléculas de ácido nucleico específicas es mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mullis *et al.* (1987) *Methods Enzymol.* 155: 335-350. Esta técnica usa ADN polimerasa, normalmente una ADN polimerasa termoestable, para replicar una región de ADN deseada. La región de ADN a replicar se identifica mediante oligonucleótidos de secuencia especificada complementaria a los extremos opuestos y a las cadenas opuestas del ADN deseado para iniciar la reacción de replicación. El producto de la primera ronda de replicación es, en sí mismo, una plantilla para las posteriores replicaciones, por lo tanto los ciclos sucesivos de replicación dan como resultado la amplificación geométrica del fragmento de ADN delimitado por el par de cebadores usados.

Una vez que se ha obtenido la secuencia codificante de interés particular, ésta puede unirse de forma operativa a elementos de control adecuados para proporcionar una molécula de ácido nucleico expresable usando técnicas de clonación o de biología molecular convencionales. Véase por ejemplo, los documentos Edge (1981) *Nature* 292: 756; Nambair *et al.* (1984) *Science* 223: 1299; y Jay *et al.* (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 6311. La molécula de ácido nucleico puede usarse *per se* o puede insertarse en un vector adecuado tal como una construcción de vector de expresión viral o de plásmidos.

Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención comprenden típicamente una secuencia promotora homóloga o heteróloga y otras secuencias de control adecuadas. Estas otras secuencias de control pueden comprender una secuencia de terminación y/o de inicio de la traducción (por ejemplo GCCACCATGG o GCCCCCATGG) y/o un codón de terminación de la traducción (por ejemplo TAA, TAG o TGA) y/o una señal de poliadenilación y/o un sitio de pausa en el ARN. Además, pueden estar presentes secuencias potenciadoras nativas o heterólogas para la secuencia promotora. Una vez construidas, las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse usando protocolos de suministro de genes convencionales. Los métodos para el suministro de genes se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466. Los genes pueden suministrarse directamente a un sujeto o, como alternativa, suministrarse *ex vivo*, a células obtenidas del sujeto y las células pueden reimplantarse en el sujeto.

50 Adyuvantes

El segundo componente de las nuevas composiciones de la presente invención es el componente adyuvante que puede comprender cualquier adyuvante o combinación de adyuvantes adecuados. Por ejemplo, los adyuvantes adecuados incluyen, sin limitación, adyuvantes formados a partir de sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; formulaciones de emulsión de aceite en agua y de agua en aceite, tales como adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); geles minerales; copolímeros de bloque; Avridine™; SEAM62; adyuvantes formados a partir de componentes de la pared celular bacteriana tales como adyuvantes que incluyen lipopolisacáridos (por ejemplo, lípido A o monofosforil lípido A (MPL), Imoto *et al.* (1985) *Tet. Lett.* 26: 1545-1548), dímicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS); proteína de choque térmico o derivados de la misma; adyuvantes obtenidos de toxinas bacterianas que ribosilan ADP, incluyendo la toxina de difteria (DT), la toxina de tos ferina (PT), la toxina del cólera (CT), las toxinas lábiles al calor de *E. coli* (LT1 y LT2); la endotoxina A de *Pseudomonas*, la exotoxina S de *Pseudomonas*, la exoenzima de *B. cereus*, la toxina de *B. sphaericus*, las toxinas C2 y C3 de *C. botulinum*, la exoenzima de *C. limosum*, así como las toxinas de *C. perfringens*, *C. spiriforma* y *C. difficile*, EDIN de *Staphylococcus aureus* y mutantes de toxinas bacterianas que ribosilan ADP tales como CRM₁₉₇, un mutante no tóxico de la toxina de difteria (véase por ejemplo, Bixler *et al.* (1989) *Adv. Exp. Med. Biol.* 251: 175; y Constantino *et al.* (1992) *Vaccine*); adyuvantes de saponinas tales como Quil A (Patente de Estados Unidos N° 5.057.540) o partículas generadas a partir de saponinas tales como ISCOM (complejos

inmunoestimuladores); quimiocinas y citocinas tales como interleucinas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo interferón gamma), factor estimulador de colonia de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), defensinas 1 ó 2, RANTES, MIP1- α y MIP-2, etc.; péptidos de muramilo tales como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE) etc.; adyuvantes obtenidos de la familia de moléculas de CpG, dinucleótidos y oligonucleótidos de GpC que comprenden motivos CpG (véase por ejemplo los documentos Krieg *et al.*, *Nature* (1995) 374: 546, Medzhitov *et al.*, (1997) *Curr. Opin. Immunol.* 9: 4-9; y Davis *et al.* *J. Immunol.* (1998) 160: 870-876) tales como TCCATGACGTTCTGATGCT y exoenzima GACTCTGAGCGTTCTC de *C. limosum* ATC; y adyuvantes sintéticos tales como PCPP (poli[di(carboxilatofenoxi)fosfaceno]) (Payne *et al.*, *Vaccines* (1998) 16: 92-98). Dichos adyuvantes están disponibles en el mercado de diversos distribuidores tales como Accurate Chemicals; Ribi Immunochemicals, Halmiton, MT; GIBCO; Sigma, St. Louis, MO.

Los adyuvantes preferidos para su uso en la presente composición son los que son al menos parcialmente solubles en etanol. Una clase de adyuvantes particularmente preferidos para su uso en este documento son los clasificados como "saponinas" esto es, adyuvantes que se originan a partir de plantas productoras de saponina de los géneros *Quillaja*, *Saponaria* o *Gypsophila*. Las saponinas son productos vegetales glicosídicos naturales, constituidos por una estructura en anillo (la aglicona) a la que se unen una o más cadenas de azúcares. La aglicona puede ser asteroidea, triterpenoidea o esteroidealcaloidea y la cantidad de azúcares unidos a los enlaces glicosídicos pueden variar enormemente. Las saponinas más comunes usadas como adyuvantes farmacéuticos son los glicósidos de triterpeno extraídos del árbol sudamericano *Quillaja saponaria* y que se denominan Quill A (véase por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.688.772; 5.057.540; y 4.432.969; y Publicación Internacional N° WO 88/09336, publicada el 1 de diciembre de 1988), cuyo componente activo se denomina QS-21. Otro adyuvante preferido es un análogo de muramilo dipéptido denominado "GMTP-N-DPG" (N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-L-alanil-dipalmitoilpropilamida). Véase Fast *et al.* (1997) *Vaccine* 15: 1748-1752.

Se prefieren varios adyuvantes para su uso como adyuvante de cambio inmune en la presente invención. El atributo crítico de dicho adyuvante es que tiende a redirigir la respuesta inmune provocada en una dirección deseada particular en relación con el uso del ADN que codifica el antígeno en sí mismo. Esto es particularmente deseable si el adyuvante tiene el atributo de dirigir o cambiar la respuesta inmune hacia Th1 en oposición a respuestas Th2. Puesto que todas las respuestas inmunes a un antígeno son complejas, y muchas si no todas las respuestas inmunes implican elementos de respuesta Th1 y Th2, no es práctico buscar una redirección total de la respuesta. En su lugar, lo que se pretende es un cambio relativo del tipo de respuesta inmune, por ejemplo usando un adyuvante para potenciar una respuesta de tipo Th1. Por ejemplo, si se ha descubierto que un antígeno particular produce predominantemente una respuesta Th2, y un resultado deseado es una respuesta Th1, un cambio en la dirección de Th1 mostrará una mayor eficacia clínica para la vacuna. Un adyuvante de cambio inmune como se describe en este documento, puede o no provocar un aumento en la respuesta inmune cuantitativa total en el individuo, que es el resultado que se busca habitualmente con la incorporación de adyuvantes a la vacunas. En su lugar, el adyuvante de cambio inmune pretende cambiar o redirigir la naturaleza o calidad de la respuesta inmune en lugar de su magnitud o cantidad.

Un ejemplo de un adyuvante de cambio inmune que favorece la respuesta Th1 es monofosforil lípido A o MPL disponible de Ribi Immunochemical Research Inc. Un ejemplo de un adyuvante de cambio inmune que favorece la respuesta Th2 es 1,25-dihidroxi vitamina D₃. Otros adyuvantes de cambio inmune posibles incluyen PPD, un derivado de proteína purificada de *Bacillus calmette guerin* (BCG), dimicolato de trehalosa y material del esqueleto de la pared celular de micobacterias.

El adyuvante puede estar presente en la presente composición individualmente o en una combinación de dos o más adyuvantes. A este respecto, los adyuvantes combinados pueden tener un efecto de adición o sinérgico para promover o cambiar una respuesta inmune. Un efecto sinérgico es uno en el que el resultado que se consigue combinando dos o más adyuvantes es mayor que el que se esperaría simplemente sumando el resultado conseguido por cada adyuvante cuando se administran de forma individual.

Desafortunadamente, se sabe que la mayor parte de los adyuvantes mencionados anteriormente son altamente tóxicos, y se consideran generalmente demasiados tóxicos para uso en el ser humano. Por esta razón el único adyuvante aprobado actualmente para su uso en el ser humano es alumbre, una composición de sal de aluminio. Sin embargo, varios de los adyuvantes anteriores se usan habitualmente en animales y son por lo tanto adecuados para numerosos sujetos pretendidos y varios se están sometiendo a estudios preclínicos y clínicos para su uso en el ser humano. Sin embargo, se ha descubierto que los adyuvantes que se consideran generalmente demasiado tóxicos para su uso en el ser humano pueden administrarse con una técnica de inyección de polvo (tal como la técnica de suministro mediada por partículas preferida que se usa en este documento) sin problemas de toxicidad concomitante. Sin vincularse a ninguna teoría en particular, parece que el suministro de pequeñas cantidades de adyuvantes a la piel permite la interacción con las células de Langerhans en la capa epidérmica y con células dendríticas en la capa cutánea de la piel. Estas células son importantes en el inicio y el mantenimiento de una respuesta inmune. Por lo tanto, puede obtenerse un efecto adyuvante potenciado dirigiendo el suministro en o cerca de estas células. Además, el suministro transdérmico de adyuvantes puede evitar los problemas de toxicidad debido a que (1) las capas superiores de la piel están poco vascularizadas, y por lo tanto la cantidad de adyuvante que entra en el sistema circulatorio es reducida, lo que reduce el efecto tóxico; (2) las células de la piel se están desprendiendo constantemente, por lo tanto el adyuvante residual se elimina en lugar de absorberse, y (3) puede administrarse sustancialmente menos adyuvante para producir un efecto

adyuvante adecuado (en comparación con el adyuvante que se suministra usando técnicas convencionales tales como inyección intramuscular).

El(los) adyuvante(s) estarán presentes en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado, esto es, para 5 potenciar la respuesta de la mucosa contra el antígeno coadministrado de interés y/o para dirigir una respuesta inmune de la mucosa contra el antígeno de interés. Generalmente, de aproximadamente 0,1 μg a 1000 μg de adyuvante, más preferiblemente de aproximadamente 1 μg a 500 μg de adyuvante y más preferiblemente de aproximadamente 10 5 μg a 300 μg de adyuvante, serán eficaces para potenciar una respuesta inmune para una antígeno dado. Por lo tanto, por ejemplo, para Quil A, se usarán dosis en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 50 μg , preferiblemente de 10 aproximadamente 1 a 25 μg , y más preferiblemente de aproximadamente 5 a 20 μg , con los presentes métodos. Para MPL, se usará una dosis en el intervalo de aproximadamente 1 a 250 μg , preferiblemente de aproximadamente 20 a 150 μg y más preferiblemente de aproximadamente 40 a 75 μg , con los presentes métodos.

Las dosis para otros adyuvantes pueden determinarse fácilmente por un especialista en la técnica usando métodos 15 rutinarios. La cantidad a administrar dependerá de diversos factores incluyendo el antígeno coadministrado, así como la capacidad del adyuvante para actuar como estimulador de una respuesta inmune o para actuar como adyuvante de cambio inmune.

Preparación de las composiciones

20 Las moléculas de ácido nucleico y/o adyuvantes recubren a las partículas vehículo núcleo que son adecuadas para el suministro intracelular, por ejemplo, de oro o de tungsteno. Los métodos mediados por partículas para suministrar dichas preparaciones de vacuna se conocen en la técnica. Más particularmente, una vez preparadas y purificadas adecuadamente, las moléculas de ácido nucleico que codifican antígenos y/o adyuvantes pueden recubrir a las partículas 25 vehículo núcleo (por ejemplo, vehículos núcleo balísticos) usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Las partículas vehículo se seleccionan entre materiales que tienen una densidad adecuada en el intervalo de tamaños de partícula típicamente usados para el suministro intracelular mediante un dispositivo de pistola génica. El tamaño de partícula vehículo óptimo dependerá, por supuesto, del diámetro de las células diana.

30 El suministro usando técnicas mediadas por partículas se emplea por diversas razones. Una razón muy importante es que esta técnica de suministro génico en mamíferos ha demostrado tener el mismo nivel de eficacia en todos los sistemas de mamífero ensayados hasta ahora. El significado de este hecho es que los datos de modelos animales pueden transferirse y aplicarse más directamente al tratamiento de seres humanos de forma más directa que con otras 35 técnicas, tales como el suministro intramuscular de genes que ha demostrado tener una eficacia drásticamente diferente en roedores. Los dispositivos de suministro mediado por partículas, generalmente aceleran el material genético en el animal a través del uso de una fuerza propulsora ajustable, una descarga eléctrica o una descarga de gas comprimido, haciendo posible de este modo seleccionar fácilmente los tejidos diana a los que se suministrarán las composiciones de vacuna de ácido nucleico.

40 De acuerdo con las técnicas de suministro mediado por partículas establecidas, el material genético a suministrar puede prepararse en solución acuosa y después precipitarse sobre pequeñas partículas vehículo núcleo inertes. Puede usarse cualquier partícula vehículo adecuada, por ejemplo, partículas formadas a partir de polímeros o metales, (por ejemplo, tungsteno, oro, platino e iridio); sin embargo, se prefieren partículas vehículo de tungsteno y de oro. Las partículas de tungsteno están fácilmente disponibles en un tamaño medio de 0,05 a 2,0 μm de diámetro. Aunque dichas partículas tienen una densidad óptima para su uso en métodos de suministro mediado por partículas, y permiten 45 un recubrimiento muy eficaz con ADN, el tungsteno puede ser potencialmente tóxico para algunos tipos celulares. Las partículas de oro o el oro microcristalino (por ejemplo, polvo de oro A1570, disponible de Engelhard Corp., East Newark, NJ) se usarán también con los presentes métodos. Las partículas de oro proporcionan una uniformidad de tamaño (disponibles de Alpha Chemicals en tamaños de partícula de 1-3 μm , o disponibles de Degussa, South Plainfield, NJ en un intervalo de tamaños de partícula que incluye 0,95 μm) y toxicidad reducida. El oro microcristalino 50 proporciona una diversa distribución de tamaño de partícula. Típicamente en el intervalo de 0,5-5 μm . Sin embargo, el área de superficie irregular del oro microcristalino posibilita un recubrimiento altamente eficaz con ácidos nucleicos, antígenos y adyuvantes. En esta invención pueden usarse partículas de oro que tienen un tamaño nominal de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 10 μm .

55 Se conocen y se han descrito varios métodos para recubrir con o precipitar ADN o ARN sobre partículas de oro o tungsteno. Dichos métodos combinan generalmente una cantidad predeterminada de oro y tungsteno con ADN de plásmido, CaCl_2 y espermidina. La solución resultante se agita en vórtice de forma continua durante el procedimiento de recubrimiento para asegurar la uniformidad de la mezcla de reacción. Después de la precipitación del ácido nucleico, las partículas recubiertas pueden transferirse a membranas adecuadas y pueden dejarse secar antes de su uso, recubrir 60 superficies de un módulo, cartucho o casete de muestra o introducirse en una cajeta de suministro para su uso en dispositivos de suministro mediado por partículas (por ejemplo, instrumentos de pistolas génicas).

65 Los adyuvantes peptídicos pueden unirse en el mismo lote o en un lote diferente de partículas vehículo núcleo mezclando simplemente los dos componentes en una proporción determinada de forma empírica, mediante precipitación con sulfato de amonio u otros métodos de precipitación en disolvente conocidos por los especialistas en la técnica, o mediante acoplamiento químico del péptido con la partícula vehículo. El acoplamiento de restos de L-cisteína a oro se ha descrito anteriormente (Brown *et al.* (1980) *Chemical Society Reviews* 9: 271-311). Otros métodos incluyen,

por ejemplo, disolver el péptido en etanol absoluto, agua, o en una mezcla de alcohol/agua, añadiendo la solución a una cantidad de partículas vehículo y secando la mezcla en un chorro de aire o gas de nitrógeno mientras se agita en vórtice. Como alternativa, los péptidos pueden secarse sobre partículas vehículo mediante centrifugado al vacío. Una vez secas, las partículas recubiertas pueden resuspenderse en un disolvente adecuado (por ejemplo, acetato de etilo o acetona) y triturarse (por ejemplo, mediante sonicación) para proporcionar una suspensión sustancialmente uniforme.

En una realización, la invención supone el uso de un adyuvante MPL en una composición de vacuna genética, siendo el MPL una molécula lipídica compleja. Aunque algunos compuestos pueden mezclarse simplemente en la preparación acuosa de ácido nucleico (por ejemplo ADN) antes de recubrir con ellas las partículas vehículo, y aunque esto puede funcionar en el caso de MPL, el MPL u otros compuestos solubles en etanol simplemente pueden añadirse a la solución de etanol que se usa típicamente para suspender las partículas de oro recubiertas de ADN. Aunque el etanol se evapora finalmente de las partículas de oro recubiertas con ADN, permanece la suficiente cantidad de adyuvante (por ejemplo MPL que no es volátil) después de la evaporación. Pueden usarse las mismas técnicas generales con otras clases de materiales biológicos en el proceso de suministro génico mediado por partículas, tales como adyuvantes formados a partir de hormonas no proteicas, vitaminas, o análogos de las mismas.

Las técnicas de suministro mediado por partículas permiten dirigir a las composiciones de vacuna a cualquier tipo o categoría de tejido diana en el cuerpo. Sin embargo, es más conveniente suministrar partículas vehículo que tienen ADN a la epidermis. De forma adecuada, la epidermis ha demostrado ser una ubicación especialmente deseable para el suministro de vacunas de ADN. Se ha demostrado también que puede provocarse una respuesta inmune cuantitativamente superior a una vacuna genética en la epidermis en comparación con otros tejidos diana posibles. La potente respuesta inmune provocada con suministro de genes a la epidermis puede deberse a células inmunes, tales como células de Langerhans u otras células que presentan antígenos, que regularmente penetran en la capa epidérmica de la piel en busca de dianas antigenicas.

Por consiguiente, después de su formación, las partículas vehículo recubiertas con preparaciones de antígeno y/o adyuvante se suministran en el sitio diana de la piel usando una técnica de suministro mediado por partículas. En la técnica se conocen diversos dispositivos de aceleración de partículas adecuados para el suministro mediado por partículas y todos son adecuados para su uso en la práctica de la invención. Los diseños de dispositivos actuales emplean una descarga explosiva, eléctrica o gaseosa para propulsar las partículas vehículo recubiertas hacia las células diana. Las propias partículas vehículo recubiertas pueden estar unidas de forma reversible a una lámina vehículo móvil, o unirse de forma reversible a una superficie junto a la que pasa un chorro de gas, desprendiendo las partículas de la superficie y acelerándolas en dirección a la diana. Un ejemplo de un dispositivo de descarga gaseosa se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.204.253. Un dispositivo de tipo explosivo se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 4.945.050. Un ejemplo de un aparato de aceleración de partículas tipo descarga de helio es el instrumento PowderJect® XR (PowderJect Vaccines, Inc., Madison), instrumento que se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.120.657. Un aparato de descarga eléctrica adecuado para su uso en esta invención se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.149.655.

Las dosificaciones únicas de las partículas vehículo recubiertas pueden proporcionarse en un recipiente adecuado, por ejemplo, proporcionarse en un cartucho que comprende un tramo de tubería que contiene una dosis de las partículas que recubren la superficie interna del mismo. Los métodos para preparar dichos recipientes se describen en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.733.600 y 5.780.100.

Las partículas recubiertas se administran al individuo de forma compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que será eficaz para los fines de la invención. La cantidad de la composición a suministrar (por ejemplo, de aproximadamente 0,01 μ g a 10 mg, más preferiblemente de 1 a 50 μ g de la secuencia del antígeno, depende del individuo a ensayar y del(los) antígeno(s) o alérgeno(s) particulares que se administran. La cantidad exacta necesaria variará dependiendo de la edad y del estado general del individuo a tratar, y una cantidad eficaz apropiada puede determinarse fácilmente por un especialista en la técnica después de la lectura de la presente memoria descriptiva.

Programas de Administración y Dosificación

Las composiciones de vacuna (que contienen la secuencia que codifica el antígeno y/o el adyuvante) se administran al sujeto de forma compatible con la formulación de dosificación y en cantidades eficaces para producir una respuesta inmune de la mucosa deseada. La cantidad del antígeno a suministrar por administración está generalmente, en el caso de moléculas de ácido nucleico que codifican el antígeno, en el intervalo de entre aproximadamente 0,001 μ g y 10 mg, y preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 5000 μ g de molécula de ácido nucleico por dosis (generalmente en el intervalo de entre 0,5 μ g/kg y 100 μ g/kg de molécula de ácido nucleico por dosis). La cantidad exacta dependerá, por supuesto, del sujeto y de la afección a tratar o prevenir. Más particularmente, la cantidad exacta necesaria variará dependiendo de la edad y del estado general del individuo y del(los) antígeno(s) y adyuvante(s) particulares seleccionados así como de otros factores. Una cantidad eficaz apropiada puede determinarse fácilmente por un especialista en la técnica después de la lectura de la presente memoria descriptiva y/o puede determinarse a través de ensayos rutinarios.

El tratamiento de la dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis. Para composiciones de vacuna, un programa de múltiples dosis es uno en el que un ciclo primario de vacunación puede estar constituido por 1-10 dosis diferentes, seguido de otras dosis administradas a intervalos de tiempo posteriores,

seleccionados para mantener y/o reforzar la respuesta inmune, por ejemplo, a los 1-4 meses una segunda dosis, y si fuera necesario, dosis posteriores después de varios meses. El régimen de dosificación también se determinará, al menos en parte, por la necesidad del sujeto y dependerá del juicio del médico. Además, si se desea la prevención de la enfermedad, las composiciones se administran generalmente antes de la infección primaria con el patógeno de interés.

5 Si se desea el tratamiento, por ejemplo, reducción de síntomas o de recurrencia, las composiciones se administran generalmente de forma posterior a la infección primaria.

C. Ejemplos

10 A continuación se presentan ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solamente para fines ilustrativos y no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la presente invención.

15 Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a las cantidades usadas (por ejemplo, temperaturas, cantidades, etc.), pero debe tenerse en cuenta por supuesto algún error y desviación experimentales.

Ejemplo 1

Redirección de una Respuesta Inmune a CEA usando una Técnica de Suministro Mediado por Partículas

20 Para demostrar la influencia del adyuvante MPL sobre la respuesta inmune para una vacuna de ADN desnudo, se realizó el siguiente estudio. El adyuvante y la molécula de ácido nucleico que contenía la secuencia que codifica el antígeno de interés se coadministraron mediante suministro mediado por partículas usando una pistola génica. El antígeno particular usado para este ejemplo era el antígeno carcinoembrionario humano ("CEA"), un antígeno 25 tumoral humano usado ampliamente en experimentos que investigan tratamientos terapéuticos del cáncer. Los trabajos anteriores habían demostrado que cuando un gen que codifica CEA se suministraba mediante suministro mediado por partículas a ratones, era dominante una respuesta inmune de tipo Th2, según lo indicado por la predominancia de IgG1 en los títulos de anticuerpos del suero del animal. Sin adyuvante, se detectan anticuerpos específicos de CEA de tipo 30 Th2 (IgG1) a niveles más de veinte veces superiores que los niveles de anticuerpos específicos de CEA de tipo Th1 (IgG2a) en ratones Balb/c. Los trabajos realizados en este documento se usaron para demostrar que la respuesta inmune de tipo Th2 podía redirigirse hacia una respuesta de tipo Th1 a través del uso de un adyuvante de cambio inmune.

35 Para este protocolo, se usó una construcción de plásmido que contenía una región codificante del antígeno CEA bajo el control del promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) con el intrón A de CMV entre el promotor y la región codificante. Para formar la composición, se añadieron 64 μ g del plásmido, que se denominó WRG7083, en 120 μ l de agua a 32 miligramos de partículas de oro de 0,9 micrómetros en un tubo Eppendorf, es decir, 2 μ g de ADN/mg de oro. A continuación, se añadieron 13,5 μ l de solución de acetato de amonio y 135 μ l de isopropanol y el tubo se agitó en vórtice brevemente. La mezcla se incubó durante 15 minutos a -20°C para precipitar el ADN sobre 40 el oro. Las partículas recubiertas con ADN se sedimentaron mediante un centrifugado de 10 segundos y los sobrenadantes se eliminaron. Los sedimentos de oro/ADN se lavaron cuatro veces agitando en vórtice en 1 ml de etanol, microcentrifugando durante 10 segundos y eliminando los sobrenadantes. Después del lavado final, las partículas vehículo de oro recubiertas con ADN se resuspendieron en 1,14 ml de etanol, de modo que cada 250 μ l de la suspensión de etanol contenían 7 mg de partículas vehículo de oro con 2 μ g de ADN por mg de oro.

45 Por separado, se preparó una solución de 1 mg/ml de MPL en etanol y se usó como solución madre de MPL. Despues se prepararon cada una de las siguientes soluciones:

50 (0 MPL) - suspensión de 250 μ l de partículas vehículo, 750 μ l adicionales de etanol y 0 μ l de solución madre de MPL.

(0,05 mg/ml de MPL) - 250 μ l de suspensión de partículas vehículo, 750 μ l adicionales de etanol y 50 μ l de solución madre de MPL.

55 (0,2 mg/ml de MPL) - 250 μ l de suspensión de partículas vehículo, 750 μ l adicionales de etanol y 200 μ l de solución madre de MPL.

(0,5 mg/ml de MPL) - 250 μ l de suspensión de partículas vehículo, 750 μ l adicionales de etanol y 500 μ l de solución madre de MPL.

60 (1 mg/ml de MPL) - 250 μ l de suspensión de partículas vehículo con el etanol eliminado centrifugado y sustituido con solución madre de MPL.

65 Cada preparación se sometió a sonicación durante diez segundos en un sonicador para generar una suspensión uniforme de partículas vehículo de oro en el etanol.

La transferencia mediada por partículas descrita en este documento se realizó usando un dispositivo de suministro de genes impulsado por gas comprimido. Este instrumento se obtuvo de Agracetus, Inc., y se denominó dispositivo

ACCELL® y actualmente puede obtenerse sustancialmente el mismo instrumento de PowderJect Vaccines, Inc., y se denomina dispositivo PowderJect™ XR. El diseño general de este instrumento, que se describe en la solicitud de patente PCT/US95/00780 y en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.865.796 y 5.584.807 se construye de modo que las partículas vehículo recubiertas con ADN se colocan sobre o recubren ellas mismas el interior de un vehículo de partículas cilíndrico. Para este vehículo, se usaron secciones cilíndricas de tubo de Tefzel™. Usando una jeringa equipada con un adaptador fabricado para este fin, la suspensiones anteriores se introdujeron cada una en un tubo de Tefzel™ de 30 pulgadas (76,2 cm) de longitud, llenando con 1 ml (7 mg de partículas de oro recubiertas con ADN) de cada suspensión una longitud de 7 pulgadas (17,78 cm) del tubo, proporcionando una distribución nominal de 1 mg de partículas vehículo de oro recubiertas con ADN, con o sin MPL, por pulgada (2,54 cm) de tubo. El tubo se transfirió a un elemento fijo que mantenía al tubo en configuración horizontal lineal. Después de permitir durante un momento que las partículas vehículo se asentaran visiblemente, se extrajo del tubo el exceso de etanol a partir de un extremo y el tubo se hizo girar durante treinta segundos para distribuir de forma más uniforme a las partículas vehículo alrededor del interior del tubo cilíndrico. El etanol residual se eliminó después haciendo pasar nitrógeno a través del tubo durante 3 minutos. El tubo se cortó en secciones, cada una de las cuales tenía media pulgada (1,27 cm) de longitud. Cada sección del tubo se usó como una carga o dosis para el dispositivo de aceleración, que liberaba un chorro de gas de helio comprimido a través del interior de las secciones del tubo para liberar las partículas vehículo del tubo y transportarlas hacia el sujeto experimental.

Los animales del modelo eran ratones Balb/c de seis a ocho semanas de edad (Harlan/Sprague/Dawley, Indianapolis Indiana), que se habían anestesiado y a los que se había afeitado el pelo del abdomen. En cada uno de los dos sitios adyacentes del abdomen de cada animal, se suministró una única dosis de partículas vehículo recubiertas con ADN en la epidermis mediante una carga de helio que tenía una presión de 400 psi (2,76 MPa). Por tanto, cada sitio recibía 1 μ g de ADN sobre 0,5 mg de partículas vehículo de oro, con cantidades variables de MPL, y cada animal tenía dos sitios.

En un experimento paralelo, la solución madre de MPL se aplicaba directamente sobre la piel de los sitios de tratamiento del animal, frotando antes del suministro de los genes. Esto se realizó frotando sobre el abdomen un aplicador de algodón sumergido en la solución madre de MPL, después de lo cual se dejaba evaporar el etanol durante 10 segundos antes del suministro de las partículas vehículo recubiertas con ADN a una dosis correspondiente.

Cuatro semanas después del tratamiento se obtuvieron muestras de suero de los animales inmunizados y se cuantificaron los anticuerpos específicos de CEA (IgG e IgG_{2a}) usando un kit de ELISA de Southern Biotech. Comparando con los isotipos de inmunoglobulina convencionales de concentración conocida, se realizó la cuantificación de los tipos de inmunoglobulinas específicas para CEA.

Los resultados del estudio se representan en la Figura 1. Como puede observarse, los tres ratones sometidos a cada uno de los niveles de dosificación del adyuvante de vacuna genética y el adyuvante se representan mediante una única barra en el gráfico. En el borde izquierdo del gráfico, las tres barras representan los animales que no recibieron MPL en sus dosificaciones y las respuestas inmunes de estos animales, como puede observarse, eran predominantemente similares a Th2, con una media de 27,5 veces más anticuerpos de tipo IgG1 en comparación con anticuerpos Ig2a. El mayor cambio de la naturaleza de la respuesta inmunológica en los animales tratados era de una tasa de 0,2 mg/ml de MPL, donde la proporción de IgG1 con respecto a IgG2a se había reducido a 4,5. Cuando se frotaba MPL sobre los animales, como se indica en las barras de la derecha de la Figura 1, los resultados eran comparables con el método de suministro de pistola genética de 0,2 mg/ml, siendo la proporción de IgG1 con respecto a IgG2a de aproximadamente 4,0. El resto de dosificaciones de MPL mostraron variación en el nivel de redirección de la respuesta inmune, pero todas mostraron claramente una respuesta de IgG_{2a} más robusta que la que podía obtenerse con la vacuna genética en solitario sin el adyuvante. Estos resultados demuestran que el uso de adyuvante MPL altera efectivamente la naturaleza de la respuesta inmunológica a la vacuna genética cambiando la respuesta a favor de la producción de un anticuerpo de tipo Th1.

Los estudios de los Ejemplos 2-5, que se describen a continuación en este documento, se realizaron para evaluar el efecto del adyuvante proporcionado mediante la administración intracelular de diversas secuencias que codifican antígeno con un adyuvante Quil A. En cada estudio, se combinaron moléculas de ADN que contenían secuencias que codifican antígenos virales con el adyuvante Quil A y se recubrieron con ellas partículas de oro para proporcionar composiciones ejemplares de acuerdo con la presente invención. Las partículas recubiertas se administraron a sujetos animales y se comparó la capacidad de las composiciones para producir respuestas de Th, CTL y anticuerpo específicas del antígeno, con la administración intradérmica o subcutánea extracelular del adyuvante Quil A inmediatamente antes del suministro del ADN. En cada uno de los estudios, se usaron las siguientes técnicas generales.

Recubrimiento de las Partículas Vehículo Núcleo: se pesaron los pesos apropiados de partículas de oro directamente en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Después se añadieron 400-500 μ l de espermidina 0,05 M y se disolvieron masas de oro en la solución de oro/espermidina usando un sonificador de baño de agua durante 3-5 segundos. Se añadió la solución madre de ADN que contenía la molécula de plásmido de ADN pertinente a la solución de oro/espermidina para dar como resultado un índice de carga de las perlas de 2,0 μ g de ADN/mg de Au, y los tubos se taparon y se invirtieron para el mezclado y después se agitaron en vórtice brevemente. Después de reducir la velocidad del agitador y agitar en vórtice suavemente, se añadió gota a gota un volumen de CaCl₂ al 10% a una cantidad igual del volumen de espermidina añadida al oro seco. Una vez que se había añadido todo el volumen de CaCl₂, la solución resultante se agitó en vórtice a una velocidad mayor durante aproximadamente 5 segundos. Después se permitió a la solución

ES 2 294 864 T3

5 precipitar a temperatura ambiente durante al menos 10 minutos. Al mismo tiempo, se formó una solución madre de polivinilpirrolidona (PVP)/etanol a una concentración de 0,03 mg de PVP/ml de EtOH. Después de los diez minutos de precipitación, los tubos se centrifugaron brevemente (10-15 segundos) para sedimentar todo el oro. El sobrenadante se aspiró y los tubos se colocaron en una gradilla Eppendorf para liberar el sedimento de oro. Se añadieron 800 μ l de EtOH los tubos se invirtieron varias veces para lavar el oro recubierto con ADN. Esta etapa se repitió dos veces, 10 después de lo cual los tubos se centrifugaron de nuevo y el sobrenadante se aspiró. Después se añadieron las partículas de oro recubiertas con ADN lavadas a la solución madre de PVP y se añadieron 50 μ g de Quil A a la solución de partículas de oro recubiertas con ADN-PVP con sonicación durante 3 segundos. Las partículas resultantes que estaban recubiertas con la composición de vacuna de ADN + Quil A se introdujeron en tubos de Tefzel™ como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

15 *Ensayos ELISPOT en Ratones:* los materiales y reactivos eran los siguientes. Los anticuerpos de recubrimiento incluían anticuerpo anti IFN- γ de rata anti-ratón, AB IL-4 de rata anti-ratón, o Ab IL-5 de rata anti-ratón (Pharmin-
20 gen); los anticuerpos de detección incluían IFN- γ de rata anti-ratón biotinilado, e IL-4 de rata anti-ratón biotinilado o IL-5 de rata anti-ratón biotinilado (Pharmingen); tampón carbonado filtrado estéril a pH 9,6 (Pierce), palcas de ELISPOT de 96 pocillos (Millipore), solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS, Gibco), conjugado de estreptavidina y fosfatasa alcalina (Mabtech); el kit de sustrato de fosfatasa alcalina (BioRad), y el medio de cultivo celular FCS RPMI-10% (sigma). La estimulación celular se realizó de la siguiente manera. Para la liberación de citocinas de las células T ayudantes, se cultivaron esplenocitos de los animales vacunados a 6×10^6 células/ml en RPMI-
25 FCS al 10% suplementado con piruvato sódico y aminoácidos no esenciales. Se transfirió un ml de células a cada pocillo de una placa de 24 pocillos y para cada sujeto un pocillo = solamente los medios (para control de fondo) un pocillo = el antígeno de elección o el péptido de Clase II de elección. Después se incubaron las placas en una incubadora de cultivo tisular durante 3 días. Para liberación de IFN- γ de precursores de CTL, se cultivaron esplenocitos de los animales vacunados a 6×10^6 células/ml en RPMI-FCS al 10% suplementado con piruvato sódico y aminoá-
30 cidos no esenciales. Se trasfirió un ml de células a cada pocillo de una placa de 24 pocillos y después se incubó la placa durante 2 días, después de lo cual se añadió el péptido CTL a los pocillos de péptido. Para cada sujeto un pocillo = solamente los medios. Un pocillo = el péptido CTL de elección a 10^{-5} M y un pocillo = el péptido CTL irrelevante. Después se incubaron las placas durante 24 horas adicionales, después de la adicción del péptido y antes de colocar las células en la placa de ELISPOT.

35 El recubrimiento y el bloqueo de las placas de ELISPOT se realizaron de la siguiente manera. Las placas de ELISPOT se recubrieron un día antes de colocar las células en las placas, usando 50 μ l por pocillo de 15 μ g/ml de anticuerpo de recubrimiento en tampón carbonato estéril, pH 9,6. Las placas recubiertas se incubaron durante una noche a 4°C, después de lo cual se lavaron 6 veces con 100 μ l de PBS para eliminar el Ab de recubrimiento sin unir, y 40 después se sometieron a transferencia cuidadosamente. Cada pocillo se bloqueó usando 200 μ l de RPMI-FCS al 10% durante 1-2 horas en una incubadora de cultivo tisular a temperatura ambiente. Se eliminó todo el medio de bloqueo inmediatamente antes de colocar las células en placas. Las células se colocaron en las placas de la siguiente manera. Después de 3 días, se recogieron las células y el sobrenadante de cada pocillo y se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml. Las células se centrifugaron en una centrifuga para recoger el sobrenadante que se almacenó después a -80°C hasta que se usó en los análisis de ELISA. Las células sedimentadas se resuspendieron en 2-5 ml de medios y después se llevaron a una concentración final de 1×10^7 /ml. Las células se añadieron a los pocillos de ELISPOT a 1×10^6 /pocillo.

45 Las placas de ELISPOT se desarrollaron de la siguiente manera. Las células se retiraron y las placas se lavaron dos veces con PBS usando un frasco lavador. Las células se lavaron con agua DI (dejando el agua en los pocillos durante varios minutos para lisar las células restantes) y las placas se lavaron dos veces más. Se diluyó anticuerpo de detección a 1 μ g/ml en PBS estéril y después se añadió a 50.000 μ l/pocillo y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cinco veces con PBS y 50 μ l de conjugado de estreptavidina y fosfatasa alcalina (diluido a 1:1000 en PBS) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas. Después se lavaron las placas cinco veces con PBS y se añadieron 50 μ l de sustrato cromogénico de fosfatasa alcalina y se dejó a las placas incubar 50 a temperatura ambiente hasta que aparecieron puntos negros (aproximadamente 2 horas). La reacción de aparición de color se interrumpió lavando tres veces con 200 μ l de agua corriente, las placas se dejaron secar al aire y se contaron los puntos en un microscopio de disección (40 aumentos).

55 *Ensayos de CTL Pulsado con Péptidos de Ratón:* Los materiales y reactivos eran los siguientes. Medio RPMI-10 (500 ml de RPMI 1640 con L-glutamina y Hepes, 55 ml de suero fetal bovino inactivado con calor (FBS), 0,5 ml de gentamicina, 5,5 ml de solución de anticuerpos antimicóticos); medio de sensibilización (“SM”) sin IL-2 (500 ml de RPMI-10, 5,0 ml de piruvato sódico 100 mM, 5,0 ml de aminoácidos no esenciales 100 x) y SM con IL-2 (SM con una concentración final de 20 U/ml de IL-2 recombinante de rata); péptido epítopo de CTL (péptido disuelto en DMSO de calidad cultivo tisular hasta la concentración de solución madre de 10^{-2} M); tampón de lisis ACK (BioWhittaker); 60 IL-2 de rata recombinante (Collaborative); mitomicina CC (de Aldrich disuelta en PBS estéril para obtener una solución madre de 500 μ g/ml; tubos cónicos de 50 ml (Falcon), filtros coladores de malla de nylon (Falcon); 51 Cromo y placas Lumaplates (Packard).

65 Para estimuladores pulsados por péptidos, se proporcionan bazos singénicos sin tratamiento previo (aproximadamente $1,2 \times 10^7$ estimuladores/ratón) recogiendo los bazos y triturándolos mediante presión entre 2 portaobjetos esmerilados y esterilizados mediante autoclave para romper el saco y liberar las células a una pequeña placa de petri. Las masas de células se rompen pipeteando las células arriba y abajo con una pipeta de transferencia de 3 ml, y la suspensión celular resultante se pasa a través de un filtro colador de células de nylon de 70 μ m a un tubo cónico de 50 ml

ES 2 294 864 T3

usando 5-10 ml de medio RPMI-10 para lavar las células. Los esplenocitos recuperados se centrifugan a 1500 rpm durante 5 minutos para sedimentar y el sobrenadante se descarta. Las RBC se lisaron resuspendiendo los esplenocitos en 5 ml de tampón de lisis ACK durante 1-2 minutos, después de los cuales las células se lavaron dos veces con 20 ml de RPMI suplementado, y una vez con RPMI-10. Después se resuspendieron las células a aproximadamente 1×10^7 células/ml. Los estimuladores se trataron con mitomicina C (por cada 10 ml de células, se añadieron 500 ml de 0,5 mg/ml de mitomicina C), y las células se incubaron con la mitomicina C durante 25-45 minutos a 37°C, CO₂ al 5%. Después del tratamiento, las células se lavaron dos veces con RPMI sin suplementar y una vez con RPMI-10. Las células lavadas se resuspendieron a 2×10^6 células/ml en SM con 20 U/ml de IL-2 de rata y se añadió el epítopo de CTL de la solución madre. Las células estimuladoras se dispersaron a una proporción de 3/1 respondedor/estimulador en placas de 24 pocillos y se incubaron durante una noche a 37°C, CO₂ al 5%.

La estimulación *in vitro* de las células respondedoras se realizó de la siguiente manera. Se extrajeron bazos de ratones vacunados y de control, y los esplenocitos sensibles se aislaron triturando los bazos como se ha descrito anteriormente. Las RBC se lisaron con 5 ml de tampón de lisis ACK durante 2-3 minutos y las células se lavaron dos veces con 20 ml de RPMI sin suplementar y una vez con RPMI-10. Después se resuspendieron los esplenocitos a 6×10^6 células/ml en SM sin IL-2. Para cada ratón, se dispuso 1 ml de esplenocitos en cada uno de los pocillos de una placa de 24 pocillos que contenía 1 ml de células estimuladoras pulsadas con péptido a 2×10^6 células/ml descritas anteriormente en SM con IL-2 (la concentración final de IL-2 era de 10 U/ml) y las placas se incubaron a 37°C, CO₂ al 5% durante 5-7 días.

Ensayo de Liberación de ⁵¹Cromo a partir de CTL: Para la lisis específica de péptidos, se realizaron las siguientes técnicas. Se colocaron células diana singénicas en fase de crecimiento logarítmico en placas de 96 pocillos a aproximadamente 30.000 células diana/pocillo. Se sedimentaron cantidades apropiadas de células diana en tubos cónicos y se resuspendieron en 20 µl de FBS inactivado con calor. Se añadieron 100-200 µl de ⁵¹Cr (cromato sódico) a cada sedimento, se mezclaron bien y después se incubaron durante 1 hora a 37°C. Las células se lavaron después cuatro veces con 6-10 ml de RPMI-10 por sedimento y después se resuspendieron a 3×10^5 células/ml en RPMI-10. Para las dianas pulsadas con péptido, se añadió una cantidad apropiada del péptido de epítopo de CTL hasta alcanzar una concentración final de péptido óptima (aproximadamente 10^{-5} M). Se dejó pulsar a las células diana con los péptidos durante 30 minutos (a 37°C) antes de colocarlas en placas con las células efectoras.

Después de 5-7 días de estimulación *in vitro*, se recogieron esplenocitos efectores de las placas de 24 pocillos y las células de cada ratón se reunieron en tubos cónicos de 15 ml y después se resuspendieron a $1,5 \times 10^7$ células/ml. Para colocarlas en las placas, se colocaron esplenocitos de cada ratón a proporciones de 50, 17, 5,6 y 1,9 células efectoras/células diana. Después de las diluciones, se añadieron 100 µl de las células diana marcadas con ⁵¹Cr a cada pocillo. Después se centrifugaron brevemente las placas y se incubaron durante 4-6 horas a 37°C. La lisis se midió frente a células diana pulsadas con péptido y de control sin pulsar para cada ratón.

Para la lisis no específica, se siguió el mismo protocolo excepto que también se colocaron en placas 100 µl de células diana sin pulsar. Después de una incubación de 4-6 horas, las placas se centrifugaron para sedimentar las células y se lisaron. Después se transfirieron 25 µl del sobrenadante a placas Lumaplates y se dejaron secar durante 2 horas o durante una noche. Después se cerraron herméticamente las placas y se contaron usando un programa convencional para ⁵¹Cr-sólido. Para calcular el % de lisis (cpm del ensayo - cpm espontáneas) se dividió por (cpm máximas - cpm espontáneas) y se multiplicó por 100. Para obtener el % de lisis específica, se restó el % de lisis de células diana sin pulsar del % de lisis de las células diana pulsadas con péptido.

ELISA: La respuesta de anticuerpos de las diversas composiciones de vacuna se determinó mediante un procedimiento de ELISA convencional. Más particularmente, se recubrieron placas de unión al medio (Costar) con 100 µl/pocillo con 1 µg/ml de solución madre del antígeno (en PBS) y se incubaron durante una noche a 4°C. Se aspiró la solución del antígeno y las placas se bloquearon con leche en polvo al 5%/PBS durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado (TBS 10 mM/Brij-35 al 0,1%) y se añadieron 100 µl de suero de muestra y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente (tampón de dilución: leche en polvo al 2%/PBS/Tween 20 al 0,05%). Las placas se lavaron 3 veces y se incubaron con anticuerpos de cabra marcados con biotina específicos para inmunoglobulina IgG de ratón o subclases de IgG específicas durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados adicionales, las placas de ELISA se incubaron con conjugados de estreptavidina-peroxidasa de rábano rusticano durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se lavaron y se desarrollaron con un sustrato TMB (kit de Bio-Rad, Richmond, CA) y se dejaron desarrollar durante 30 minutos. Las reacciones se interrumpieron con H₂SO₄ 1 N y las placas se leyeron a A₄₅₀. Se determinó la absorbancia media mediante pocillos que recibieron todos los reactivos excepto los sueros de ensayo.

60 Ejemplo 2

Coadministración Intracelular de Quil A con ADN en Perlas de Oro para Potenciar una Respuesta Inmune Específica de la NP del virus de la Gripe

Para determinar si la coadministración de una composición que contiene un vector de vacuna de ADN que codifica el antígeno de NP de la gripe y el adyuvante Quil A directamente en las células puede potenciar una respuesta inmune específica del antígeno, se realizó el siguiente estudio. Los grupos experimentales de ratones Balb/c se establecieron de la siguiente manera: (Grupo 1) 3 ratones de control que recibían perlas de oro recubiertas con ADN intrascendente

ES 2 294 864 T3

mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR; (Grupo 2) 3 ratones que recibían perlas de oro recubiertas solamente con el vector de ADN de NP mediante el dispositivo PowderJect™ XR; (Grupo 3) 4 ratones que recibían perlas de oro recubiertas solamente con el vector de ADN de NP mediante el dispositivo PowderJect™ XR y se les inoculaba trehalosa o solución salina antes de la administración del ADN; (Grupo 4) 3 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de NP y el adyuvante Quil A; (Grupo 5) 3 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de NP coadministrado inmediatamente después de una inyección intradérmica de Quil A; y (Grupo 6) 3 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de NP administrado inmediatamente antes de una inyección subcutánea de una solución que contenía Quil A.

El vector de ADN de NP contenía una secuencia que codificaba el antígeno de NP de la gripe (de la cepa PR8) y se describe en el documento Pertmer *et al.* (1995) *Vaccine* 13: 1427-1430. Todas las perlas de oro se recubrieron como se ha descrito anteriormente a un índice de carga de la perla de 0,5 µg de Au/célula diana y un índice de carga de ADN de 2,0 µg/mg de Au. La administración con el dispositivo PowderJect™ XR era en dos sitios diana a una presión de funcionamiento de 400 psi (2,76 Mpa) y era un experimento exclusivamente de sensibilización. Después de un mes, los ratones se sacrificaron y se recogieron muestras de sangre y del bazo para su análisis como se ha descrito anteriormente. Para el ensayo ELISPOT, el péptido usado para estimular a los precursores de CTL era TYQRTRALV (a 10⁻⁸ M) y se usó el virus de la gripe PR8 lisado a 5 µg/ml para la estimulación de Th. Para el análisis de cromo, el péptido usado para estimular la respuesta era TYQRTRALV (a 10⁻⁸ M); y el péptido usado para pulsar las células diana era TYQRTRALV (a 10⁻⁵ M). Para el ELISA, el antígeno de captura era antígeno de NP de PR8 (Sprafas) a 1 mg/ml.

Los resultados del estudio se representan a continuación en la Tabla 1. Como puede observarse, la administración intracelular de Quil A junto con el vector de ADN (Grupo 4) potencia la respuesta de células T ayudantes de específicas de antígeno, las respuestas de CTL y de anticuerpo y es superior a la coadministración intracelular intradérmica (Grupo 5) o subcutánea (Grupo 6) del Quil A inmediatamente antes del suministro de ADN para la inducción de la respuesta de CTL y de anticuerpo.

TABLA 1

30 35 40 45	Grupo Nº	SFC medias para CTLp /10 ⁶ células	% medio de lisis (40:1 E/T)	Respuesta Th1 (IFN-γ)	Respuesta Th2 (IL-4)	IgG (Titulación)
	1	0	0	0	0	< 100
	2	18	12,6	15	3	14.642
	3	nd	17,5	nd	nd	5.171
	4	52	43,0	53	14	40.637
	5	6	5,7	55	28	5.283
	6	4	19,7	nd	nd	25.600

50 Ejemplo 3

Coadministración Intracelular de Quil A con ADN en Perlas de Oro para Potenciar una Respuesta Inmune Específica de NP del Virus de la Gripe

Para ayudar a la confirmación de los resultados observados anteriormente con el Ejemplo 2, se realizó el siguiente estudio. Los Grupos experimentales de ratones Balb/c se establecieron de la siguiente manera: (Grupo 1) 4 ratones de control que recibían perlas de oro recubiertas con ADN intrascendente mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR; (Grupo 2) 4 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con ADN intrascendente y Quil A coadministrado mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR; (Grupo 3) 4 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de NP solamente mediante el dispositivo PowderJect™ XR; y (Grupo 4) 4 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de NP y el adyuvante Quil A.

En este caso de nuevo, el vector de ADN de NP contenía una secuencia que codificaba el antígeno de la NP de la gripe (de la cepa PR8) y se describe en el documento Pertmer *et al.* (1995) *Vaccine* 13: 1427-1430. Todas las perlas de oro se cargaron como se ha descrito anteriormente a un índice de carga de perla de 0,5 mg de Au/célula diana y un índice de carga de ADN de 2,0 µg/mg de Au. La administración con el dispositivo PowderJect™ XR era en

ES 2 294 864 T3

dos sitios diana a una presión de funcionamiento de 400 psi (2,76 MPa), y era un experimento exclusivamente de sensibilización. La vacunación se administró solamente una vez, y después de 1 mes se sacrificaron los ratones y se recogieron muestras de sangre y del bazo para su análisis como se ha descrito anteriormente. Para el ensayo ELISPOT, el péptido usado para estimular los precursores de CTL era TYQRTRALV (a 10^{-8} M) y se usó el virus de la gripe PR8 lisado a 5 μ g/ml para la estimulación de Th. Para los análisis de cromo, el péptido usado para estimular las células sensibles era TYQRTRALV (a 10^{-8} M); y el péptido usado para pulsar las células diana era TYQRTRALV (a 10^{-5} M). Para el ELISA, el antígeno de captura era antígeno de la NP de PR8 (Sprafas) a 1 mg/ml.

Los resultados del estudio se representan a continuación en la Tabla 2. Como puede observarse, la administración intracelular de Quil A junto con el vector de ADN (Grupo 4) posibilita una respuesta de células T ayudantes, una respuesta de CTL y una respuesta de anticuerpo específicas del antígeno potenciadas.

TABLA 2

15

20

25

Grupo Nº	SFC medias para CTLp/ 10^6 células	% medio de lisis (50:1 E/T)	IgG (Titulación)
1	6,5	0,3	< 100
2	0,5	0	< 100
3	14,5	17,0	16.846
4	25,0	28,8	62.706

30 Ejemplo 4

Coadministración Intracelular de Quil A con ADN en Perlas de Oro para Potenciar una Respuesta Inmune de CTL Específica de gp 120 de VIH

35 Para determinar si la coadministración de una composición que contenía un vector de vacuna de ADN que codifica el antígeno gp 120 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el adyuvante Quil A directamente en las células puede potenciar una respuesta inmune específica del antígeno, se realizó el siguiente estudio. Los Grupos experimentales de ratones Balb/c se establecieron de la siguiente manera: (Grupo 1) 4 ratones de control que recibían perlas de oro recubiertas con ADN intrascendente mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR; (Grupo 2) 4 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con vector de ADN intrascendente y Quil A y suministradas mediante el dispositivo PowderJect™ XR; (Grupo 3) 3 ratones que recibían perlas de oro recubiertas solamente con el vector de ADN de gp 120 de VIH suministradas mediante el dispositivo PowderJect™ XR, sensibilizados una vez y reforzados tres veces; (Grupo 4) 3 ratones que recibían perlas de oro recubiertas solamente con el vector de ADN de gp 120 de VIH, suministradas mediante el dispositivo PowderJect™ XR, sensibilizados una vez y reforzados una vez, (Grupo 5) 3 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de gp 120 de VIH y el adyuvante Quil A y coadministradas mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR, sensibilizados una vez y reforzados 3 veces; y (Grupo 6) 3 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de gp 120 de VIH y el adyuvante Quil A y administradas mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR, sensibilizados una vez y reforzados una vez.

50

El vector de ADN de gp 120 de VIH contenía una secuencia que codificaba el antígeno de gp 120 de VIH (de la cepa LAI) y se describe en el documento Heydenburg *et al.* (1995) *AIDS Res. And Hum. Retroviruses* 10: 1433-1441. Todas las perlas de oro se cargaron como se ha descrito anteriormente a un índice de carga de la perla de 0,5 μ g de Au/célula diana y un índice de carga de ADN de 2,0 μ g/mg de Au. La administración con el dispositivo PowderJect™ XR era en dos sitios diana a una presión de funcionamiento de 400 psi (2,76 MPa). Se realizaron cantidades variables de vacunaciones (teniendo algunas un refuerzo, teniendo otras tres refuerzos), con la vacunación administrada cada cuatro semanas. El sacrificio de todos los ratones se realizó en la semana 14 del estudio, y se recogieron muestras del bazo para el análisis como se ha descrito anteriormente. Para el ensayo ELISPOT, el péptido usado para estimular a los precursores de CTL era RGPGRAFVTI (a 10^{-7} M). Para el análisis de cromo, el péptido usado para estimular a las células respondedoras a CTL y pulsar las células diana era RGPGRAFVTI (a 10^{-7} M).

65 Los resultados del estudio se representan a continuación en la Tabla 3. Como puede observarse, los resultados confirman los datos observados anteriormente con el antígeno de la gripe en el que la coadministración intracelular de Quil A y del vector de ADN potenció la respuesta de CTL específica de gp 120 de VIH después de una sensibilización y un refuerzo en ratones vacunados, sin diferencias significativas cuando los ratones se reforzaban 3 veces.

TABLA 3

Grupo Nº	% medio de lisis (50:1 E/T)
1	3,2
2	3,5
3	36,7
4	14,7
5	32,7
6	35,4

Ejemplo 5

Coadministración Intracelular de Quil A con ADN en Perlas de Oro para Potenciar una Respuesta Inmune de CTL específica de HBsAg

Para determinar si la coadministración de una composición que contiene un vector de vacuna de ADN que codifica el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y el adyuvante Quil A, directamente a las células puede potenciar una respuesta inmune específica del antígeno, se realizó el siguiente estudio. Los Grupos experimentales de ratones Balb/c se establecieron de la siguiente manera: (Grupo 1) 4 ratones de control que recibían perlas de oro recubiertas con ADN intrascendente mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR; (Grupo 2) 4 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de HBsAg y se administraban mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR; y (Grupo 3) 4 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de HBsAg y el adyuvante Quil A y se administraban mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR. El experimento se repitió usando exactamente los mismos grupos experimentales.

El vector de ADN de HBsAg contenía una secuencia que codificaba el antígeno de superficie de HBV se denomina pWRG7128. El plásmido pWRG7128 contiene, además de los elementos de control adecuados, una secuencia que codifica el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) que está bajo el control trascripcional de un promotor de citomegalovirus (CMV), y que ha demostrado producir partículas de HBsAg después de la transfección en la mayoría de los tipos celulares. El plásmido pWRG7128 se construyó de la siguiente manera. Se preparó un vector de clonación pWRG7077 (Schmaljohn *et al.* (1997) *J. Virol.* 71: 9563-9569) para aceptar una secuencia codificante de HBsAg digiriendo el vector hasta su finalización con *Bah*H1, seguido de una digestión parcial con *Hind*3. Después de hacer romos a los salientes 5' mediante el tratamiento con el fragmento de Klenow y desoxirribonucleótidos, se aisló el fragmento del vector de 4,3 kB. El fragmento de inserción de HBsAg de 1,35 kB (que contenía la secuencia pre-S2 sin traducir, la secuencia codificante de HBsAg de 226 aminoácidos de la cepa *adw* y el elemento potenciador HBV) se escindió del plásmido pAM6 (ATCC, Rockford, MD) digiriendo con *Bam*H1. Después de hacer romos los extremos mediante el tratamiento con el fragmento de Klenow y desoxirribonucleótidos, el fragmento se aisló y se ligó en el fragmento del vector de 4,3 kB descrito anteriormente. Los recombinantes resultantes se seleccionaron para la orientación apropiada del inserto y se identificó un aislado correcto que se designó como plásmido intermedio (pWRG7074). Para eliminar el inicio del codón de la proteína X (presente en el extremo 3' del inserto pAM6 de 1,35 kB), se aisló un fragmento del vector de 4,86 kB a partir del plásmido pWRG7074 digiriendo con *Bgl*2, haciendo romos los extremos con el fragmento de Klenow y desoxirribonucleótidos y después digiriendo con *Bst*X1. A continuación, se aisló un fragmento del inserto de 754 pb de la construcción pWRG7074 mediante digestión con *Nco*1, tratándolo con nucleasa de fríjol mungo y digiriéndolo con *Bst*X1. El vector y los fragmentos de inserción resultantes se ligaron después conjuntamente para formar el plásmido clínico pWRG7128. Todas las perlas de oro se cargaron como se ha descrito anteriormente a un índice de carga de las perlas de 0,5 μ g de Au/célula diana y un índice de carga de ADN de 2,0 μ g/mg de Au. La administración con el dispositivo PowderJect™ XR era a dos sitios diana a una presión de funcionamiento de 400 psi (2,76 MPa). La vacunación se administró solamente una vez, y después de un mes, se sacrificaron todos los ratones y se recogieron muestras del bazo para el análisis de la liberación de cromo (lisis específica) como se ha descrito anteriormente. Para el ensayo ELISPOT, el péptido usado para estimular a los precursores de CTL era IPQSLDSWWTLSL (a 10^{-6} M). Para el análisis de cromo, se usó una línea celular P815, que expresaba el antígeno de superficie de HBV, en lugar del péptido para estimulación de las células respondedoras (a 40.000/pocillo) y de las células efectoras (a 30.000/pocillo).

Los resultados del estudio se representan a continuación en la Tabla 4. Como puede observarse, los resultados confirman los datos que se han observado anteriormente con el antígeno de la gripe y el antígeno del VIH y que la coadministración intracelular de Quil A y del vector de ADN potenció las respuestas de CTL específicas de HBsAg.

ES 2 294 864 T3

TABLA 5

% de lisis específica a la proporción de efector/diana	Animales del Grupo 2, primer experimento	Animales del Grupo 3, primer experimento	Animales del Grupo 2, segundo experimento	Animales del Grupo 3, segundo experimento
17:1	26,9	44,2	53,4	78,6
5,6:1	16,5	36,3	34,7	70,9
1,9:1	7,4	18,0	22,3	41,9

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Partículas recubiertas adecuadas para su uso en inmunización con ácido nucleico mediado por partículas, partículas que comprenden partículas vehículo núcleo recubiertas con:

- una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un antígeno; y
- un adyuvante que es eficaz para potenciar al menos un componente de una respuesta inmune provocada contra el antígeno, en el que el adyuvante está presente en una forma distinta a ADN.

2. Partículas recubiertas de acuerdo con la reivindicación 1, en las que la molécula de ácido nucleico está presente en una construcción de vector.

3. Partículas recubiertas de acuerdo con la reivindicación 2, en las que el antígeno es un antígeno de un patógeno viral, bacteriano, parásito o fúngico.

4. Partículas recubiertas de acuerdo con la reivindicación 3, en las que el virus se selecciona entre virus de la hepatitis B (HBV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y un virus de la gripe.

5. Partículas recubiertas de acuerdo con la reivindicación 3, en las que el antígeno es un antígeno de circumsporozoito (CS) de un parásito de la malaria.

6. Partículas recubiertas de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en las que el antígeno es un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado con una enfermedad autoinmune.

7. Partículas recubiertas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en las que el adyuvante está presente en forma de una proteína, un lípido, una hormona no proteína o una vitamina.

8. Partículas recubiertas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en las que el adyuvante comprende un derivado de proteína purificada de *Bacillus calmette guerin* (BCG), un material del esqueleto de la pared celular micobacteriana, monofosforil lípido A o una saponina.

9. Partículas recubiertas de acuerdo con la reivindicación 8, en las que el adyuvante es Quil A.

10. Partículas recubiertas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en las que el adyuvante es al menos parcialmente soluble en etanol.

11. Partículas recubiertas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en las que el adyuvante es un adyuvante de cambio inmune.

12. Partículas recubiertas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en las que dichas partículas vehículo núcleo son partículas de tungsteno o de oro.

13. Partículas recubiertas de acuerdo con la reivindicación 12, en las que las partículas de oro tienen un tamaño nominal de aproximadamente 0,1 a 10 μm .

14. Un dispositivo de aceleración de partículas adecuado para una inmunización con ácido nucleico mediada por partículas, en el que dicho dispositivo se carga con partículas recubiertas como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

15. Una casete de suministro adecuada para su uso en un dispositivo de suministro mediado por partículas, casete que se carga con partículas recubiertas como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

16. Uso de partículas recubiertas como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en la fabricación de un medicamento para su uso en inmunización con ácido nucleico.

17. Uso de una molécula de ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un adyuvante como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 7 a 11, para la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune contra un antígeno seleccionado en un individuo, mediante un método que comprende suministrar el medicamento directamente en las células presentes en un sitio diana en el individuo.

18. Uso de un adyuvante como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 7 a 11 para la fabricación de un medicamento para potenciar una respuesta inmune en un individuo, en el que el medicamento se suministra directamente a las células presentes en un sitio diana del individuo y se coadministra con una molécula de ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

ES 2 294 864 T3

19. Uso de una molécula de ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune en un individuo, en el que el medicamento se coadministra con un adyuvante como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 7 a 11, y el adyuvante se suministra directamente en las células presentes en un sitio diana en el individuo.

5 20. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que la molécula de ácido nucleico y/o el adyuvante recubre(n) a las partículas vehículo núcleo.

10 21. Uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dichas partículas vehículo núcleo son partículas de tungsteno o de oro.

22. Uso de acuerdo con la reivindicación 21, en el que las partículas de oro tienen un tamaño nominal de aproximadamente 0,1 a 10 μm .

15 23. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22 en el que la molécula de ácido nucleico y/o el adyuvante se suministran usando una técnica de suministro mediado por partículas.

24. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, en el que el sitio diana es tejido epidérmico.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ANTICUERPOS ANTI-CEA DESPUÉS DE LA SENSIBILIZACIÓN
INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON MPL

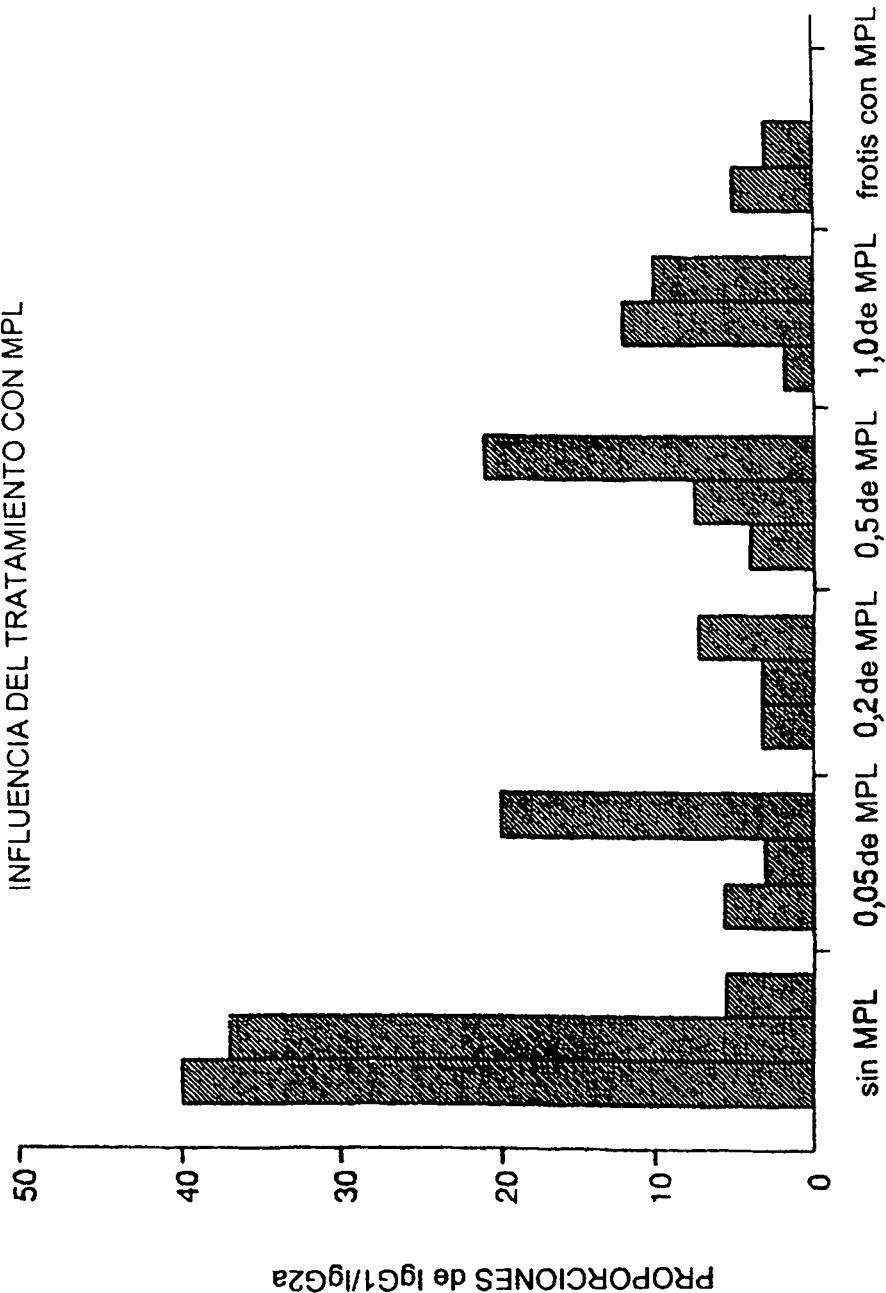


FIGURA 1