(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 351 489**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04722281 .5**
(96) Fecha de presentación : **22.03.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1608402**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **28.12.2005**

(54) Título: **Vacunas mejoradas.**

(30) Prioridad: **24.03.2003 EP 03450072**
11.04.2003 EP 03450084
11.07.2003 EP 03450171

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.02.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.02.2011

(73) Titular/es: **INTERCELL AG.**
Campus Vienna Biocenter 6
1030 Wien, AT

(72) Inventor/es: **Buschle, Michael;**
Fritz, Jorg;
Prinz, Karin;
Habel, Andre y
Lingnau, Karen

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a vacunas mejoradas, especialmente a vacunas virales y a procedimientos de preparación de las mismas.

La protección del huésped frente a patógenos invasores implica a efectores humorales y celulares y es el resultado de la acción coordinada de la inmunidad tanto no adaptativa (innata) como adaptativa (adquirida). La última se basa en el reconocimiento inmunológico específico mediado por receptores, es una adquisición reciente del sistema inmune y está presente sólo en vertebrados. La primera evolucionó antes del desarrollo de la inmunidad adaptativa, y consiste en una diversidad de células y moléculas distribuidas por todo el organismo con la tarea de mantener a patógenos potenciales bajo control.

Los linfocitos B y T son los mediadores de la inmunidad adaptativa específica de antígeno adquirida, incluyendo el desarrollo de memoria inmunológica, que es el objetivo principal de generar una vacuna con éxito. Las células presentadoras de antígeno (CPA) son células altamente especializadas que pueden procesar antígenos y presentar sus fragmentos procesados en la superficie celular junto con moléculas necesarias para la activación de linfocitos. Esto significa que las CPA son muy importantes para el inicio de reacciones inmunes específicas. Las CPA principales para la activación de linfocitos T son células dendríticas (CD), macrófagos y células B, mientras que las CPA principales para las células B son células dendríticas foliculares. En general, las CD son las CPA más potentes en términos del inicio de respuestas inmunes que estimulen linfocitos T y B de memoria y sin exposición previa quiescentes.

La tarea natural de las CPA en la periferia (por ejemplo, CD o células de Langerhans) es capturar y procesar antígenos, activándose de este modo, comienzan a expresar moléculas coestimulantes de linfocitos, a migrar a órganos linfoides, a secretar citocinas y a presentar antígenos a diferentes poblaciones de linfocitos, iniciando respuestas inmunes específicas de antígeno. No sólo activan linfocitos, en determinadas circunstancias, también inducen tolerancia de células T a antígenos.

El reconocimiento de antígenos por linfocitos T está restringido por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Un linfocito T dado reconocerá un antígeno solamente cuando el péptido esté unido a una molécula del CMH particular. En general, los linfocitos T se estimulan solamente en presencia de moléculas propias del CMH y el antígeno se reconoce solamente como péptidos unidos a moléculas propias del CMH. La restricción por CMH define la especificidad del linfocito T en términos del antígeno reconocido y en términos de la molécula de CMH que se une a su fragmento peptídico.

Los antígenos intracelulares y extracelulares representan desafíos completamente

diferentes para el sistema inmune, ambos en términos del reconocimiento y de la respuesta apropiada. La presentación de antígenos a células T está mediada por dos clases distintas de moléculas CMH de clase I (CMH-I) y CMH de clase II (CMH-II), que utilizan rutas de procesamiento de antígenos diferentes. Principalmente se podría distinguir entre dos rutas de procesamiento de antígenos principales que han evolucionado. Los péptidos derivados de antígenos intracelulares se presentan a células T $CD8^+$ por moléculas del CMH de clase I que se expresan en prácticamente todas las células, mientras que los péptidos derivados de antígenos extracelulares se presentan a células T $CD4^+$ por moléculas del CMH-II. Sin embargo, existen ciertas excepciones a esta dicotomía. Varios estudios han demostrado que los péptidos generados a partir de proteínas solubles o particulados endocitados se presentan en moléculas del CMH-I en macrófagos, así como en células dendríticas. Por lo tanto, las CPA, como células dendríticas que se asientan en la periferia, que ejercen una alta potencia para capturar y procesar antígenos extracelulares y que los presentan en moléculas del CMH-I a los linfocitos T, son dianas interesantes para estimularlas extracelularmente con antígenos *in vitro* e *in vivo*.

El singular e importante papel de las CPA, incluyendo su actividad estimulante sobre diferentes tipos de leucocitos, es reflejar su posición central como dianas para estrategias apropiadas en el desarrollo de vacunas de éxito. Teóricamente, una forma de hacerlo es aumentar o estimular su tarea natural, la captación de un antígeno o antígenos. Una vez estimuladas con los antígenos apropiados contra los que se dirige la vacuna, las CPA deberían comenzar a procesar el antígeno o antígenos captados, activándose de este modo, expresando moléculas coestimulantes de linfocitos, migrando a órganos linfoides, secretando citocinas y presentando antígenos a diferentes poblaciones de linfocitos, iniciando de este modo respuestas inmunes.

Las células T activadas generalmente secretan varias citocinas efectoras de una forma altamente regulada, por ejemplo, interleucina 2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-10 e interferón gamma (IFN-g). La detección funcional de respuestas de linfocitos T citotóxicos a antígenos específicos (por ejemplo, antígenos tumorales, en general antígenos administrados en una vacuna) se controla comúnmente mediante un ensayo ELISpot (ensayo inmune de manchas ligado a enzimas), una técnica que analiza la producción de citocinas a nivel celular individual. En la presente invención, se usa un ensayo ELISpot para la inmunidad celular (respuesta inmune de tipo 1) que promueve la citocina IFN-g para controlar el éxito de la activación de células T específicas de antígeno. Además, la citocina IL-4 se determina como un indicador para una respuesta de tipo 2, habitualmente implicada en promover respuestas humorales potentes. Además, la respuesta inmune humoral se determinó por ELISA (IgG1 como indicador

para una respuesta de tipo 2, IgG2b como indicador para una respuesta de tipo 1).

Se ha demostrado previamente que los policationes aumentan eficazmente la captación de los péptidos correspondientes al CMH clase I en células tumorales, un proceso de estimulación con péptido o proteína que se denominó “TRANScarga”. Además, se ha demostrado que los policationes son capaces de “TRANScargar” péptidos o proteínas en células presentadoras de antígenos *in vivo* así como *in vitro*. Además, la coinyección de una mezcla de poli-L-arginina o poli-L-lisina junto con un péptido apropiado como vacuna protege a los animales del desarrollo de tumores en modelos de ratón. Esta vacuna definida químicamente es capaz de inducir un alto número de células T específicas de péptido/antígeno. Se demostró que eso era al menos parcialmente atribuible a una captación aumentada de péptidos en CPA mediada por el policatión que indica que cuando las CPA se estimulan *in vivo* con antígenos pueden inducir una inmunidad mediada por células T contra el antígeno administrado.

Al contrario que la inmunidad adaptativa, que se caracteriza por una respuesta altamente específica pero relativamente lenta, la inmunidad innata se basa en mecanismos efectores que se desencadenan por diferencias en la estructura de los componentes microbianos respecto al huésped. Estos mecanismos pueden generar una respuesta inicial bastante rápida que, principalmente, conduce a la neutralización de los agentes nocivos. Las reacciones de la inmunidad innata son la única estrategia de defensa de los filos inferiores y se han conservado en vertebrados como defensa del huésped de primera línea antes de que se movilice el sistema inmune adaptativo.

En vertebrados superiores las células efectoras de la inmunidad innata son neutrófilos, macrófagos y linfocitos citolíticos naturales, y probablemente también células dendríticas, mientras que los componentes humorales en esta ruta son la cascada del complemento y una diversidad de proteínas de unión diferentes.

Un componente rápido y eficaz de la inmunidad innata es la producción de una gran diversidad de péptidos microbicidas con una longitud de habitualmente entre aproximadamente 12 y aproximadamente cien restos aminoacídicos. Se han aislado varios cientos de péptidos antimicrobianos diferentes a partir de una diversidad de organismos, que varían de esponjas e insectos a animales y seres humanos, lo que apunta a una amplia distribución de estas moléculas. También se producen péptidos antimicrobianos por bacterias como sustancias antagonistas contra organismos competidores.

Se han identificado dos subconjuntos principales de células $CD4^+$ (T auxiliares 1 (Th1) y T auxiliares 2 (Th2)) en ratones y seres humanos, basándose en su secreción de diferentes perfiles de citocinas y sus diferentes funciones efectoras. Las células Th1 están principalmente

implicadas en la generación de las denominadas respuestas inmunes de tipo 1, que se caracterizan típicamente por la inducción de respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado, inmunidad mediada por células, cambio de clase de inmunoglobulina a IgG2a/IgG2b y secreción de, entre otros, interferón gamma. Por el contrario, las células Th2 están implicadas en la generación de las denominadas respuestas de tipo 2, que se caracterizan por la inducción de inmunidad humoral por activación de células B, conduciendo a la producción de anticuerpos, que incluye el cambio de clase a IgG_1 e IgE. Las respuestas de tipo 2 también se caracterizan por la secreción de las siguientes citocinas: IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.

En la mayoría de situaciones, el tipo de respuesta inducida (tipo 1 o tipo 2) tiene un impacto significativo sobre la eficacia protectora de una vacuna. Los adyuvantes alternativos tienden a favorecer tipos específicos de respuestas. Sin embargo, la selección de adyuvante se complica por imprevisibilidades funcionales y también por limitaciones comerciales y de disponibilidad.

Las infecciones con virus de influenza pertenecen a las infecciones más frecuentes e importantes y tienen un índice de mortalidad significativo, especialmente para personas mayores o personas con deficiencias en el sistema inmune. Actualmente, existen varias vacunas de influenza en el mercado; sin embargo no todas las vacunaciones conducen a protección frente a infecciones por influenza. Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar las vacunas de influenza actuales para ampliar la eficacia de protección.

Además, puesto que la mayoría de las vacunas actuales están generando casi exclusivamente respuestas de tipo 2, también existe la necesidad de proporcionar vacunas mejoradas que muestren una respuesta inmune dirigida de tipo 1 o vacunas que también permitan —además de una respuesta de tipo 2— una reacción inmune de un tipo significativo. Además, las vacunas ya disponibles deberían proporcionarse en una forma mejorada que permita la inducción de una respuesta de tipo 1.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una vacuna mejorada frente a infecciones (víricas) que comprende un antígeno de influenza, un péptido de la secuencia de aminoácidos $KLKL_5KLK$ y ácidos desoxinucleicos inmunoestimulantes que contienen restos de desoxiinosina.

De acuerdo con los experimentos realizados en el transcurso de la presente invención, la combinación de estos dos tipos de agentes inmunizantes ha demostrado un efecto sinérgico con respecto a los antígenos. Esto se demostró específicamente con respecto a antígenos comunes de influenza (especialmente hemaglutinina y neuraminidasa) y antígenos del virus de la hepatitis. Este efecto sinérgico, especialmente para antígenos virales, no era deducible a partir de las propiedades conocidas de estas clases de sustancias. Aunque se sabe que cada

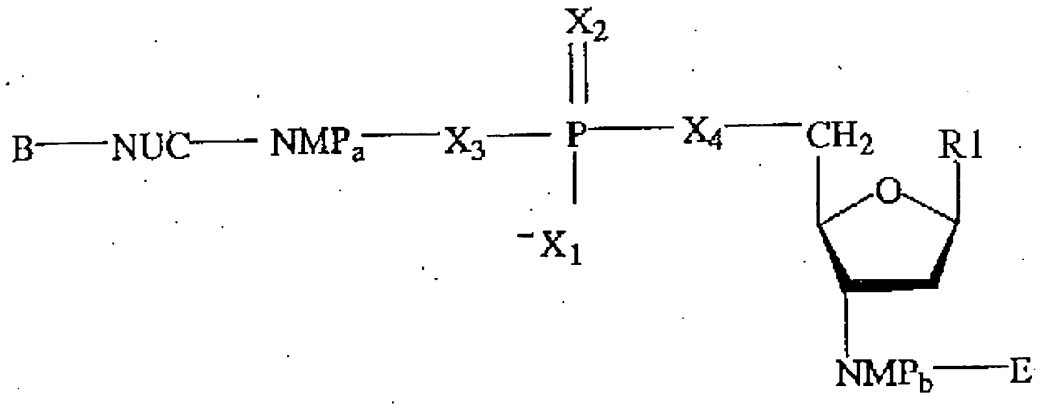
una de estas dos clases de sustancias tienen propiedades inmunoestimulantes excelentes (documentos WO 02/32451, WO 01/93905, WO 01/93903, WO 02/053185, WO 03/47602 y WO 02/095027), el efecto combinado para patógenos virales, especialmente para antígenos de virus de la hepatitis y de influenza, era significativamente mejor de lo que podría esperarse de la simple adición de estas eficacias individuales.

Con la presente invención, también es posible mejorar significativamente las vacunas virales, especialmente las vacunas de la hepatitis A, B o C o de influenza, que ya están disponibles o en el mercado, proporcionando simplemente además la combinación de los dos tipos de inmunizantes de acuerdo con la presente invención.

La presente invención proporciona por lo tanto una vacuna para prevenir infecciones con virus de influenza, que comprende

- un antígeno de influenza,
- un péptido con la secuencia de aminoácidos $KLKL_5KLK$ y
- una molécula de ácido oligodesoxinucleico inmunoestimulante que se selecciona de oligodesoxinucleótidos $d(IC)_{13,}$ tcc atg aci ttc ctg atg ct y tcc atg aci ttc ctg atg ct sustituido con tiofosfato.

Además, se describe una molécula de ácido oligodesoxinucleico inmunoestimulante que tiene la estructura de acuerdo con la fórmula (I)



en la que

R1 es hipoxantina,

cualquier X es O,

cualquier NMP es un monotiofosfato o monofosfato de 2'-desoxinucleósido seleccionado del grupo que consiste en monofosfato de desoxiadenosina, deoxiguanosina, desoxiinosina, desoxicitosina, desoxitimidina,

NUC es un 2'-desoxinucleósido seleccionado del grupo que consiste en desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxiinosina, desoxicitosina, desoxiinosina, desoxitimidina

a y b son números enteros de 0 a 100 con la condición de que a + b esté entre 4 y 150, y

B y E son grupos comunes para los extremos 5' o 3' de moléculas de ácido nucleico (en lo sucesivo también denominadas "I-ODN").

Por supuesto, la presente vacuna puede contener además otras sustancias, por ejemplo, diluyentes o vehículos, tampones o sustancias estabilizantes, etc. adecuados farmacéuticamente aceptables.

La vacuna de acuerdo con la presente invención puede contener además adyuvantes adicionales, especialmente un adyuvante de $Al(OH)_3$ (alumbre).

El alumbre, como se entiende en el presente documento, incluye todas las formas de adyuvantes basados en Al^{3+} usados en medicina humana y animal y en investigación. Especialmente, incluye todas las formas de hidróxido de aluminio, como se definen en Römpp, 10ª Ed. páginas 139/140, formas de gel del mismo, fosfato de aluminio, etc.

Esto se prefiere especialmente para vacunas que ya están en el mercado y contienen dichos adyuvantes de $Al(OH)_3$. En tal caso, la combinación de inmunizantes de acuerdo con la presente invención puede añadirse simplemente a dicha vacuna existente.

El presente antígeno es un antígeno de influenza. Si fueran específicamente necesarias respuestas de tipo 1 de Th1 pronunciadas (o exclusivas), se prefieren como antígenos epítopos de células T (véase la introducción anterior). En la sección de ejemplos, la presente invención se demuestra en principio y específicamente eficaz con antígenos virales de influenza.

Por supuesto, la preparación farmacéutica también puede comprender dos o más antígenos dependiendo de la respuesta inmune deseada. El antígeno o antígenos también pueden modificarse para aumentar adicionalmente la respuesta inmune.

Pueden usarse como antígenos proteínas o péptidos derivados de patógenos virales o bacterianos, de hongos o parásitos, así como antígenos tumorales (vacunas contra el cáncer) o antígenos con un supuesto papel en enfermedades autoinmunes (incluyendo antígenos derivatizados como antígenos glicosilados, lipidados, glicolipidados o hidroxilados). Además, los propios carbohidratos, lípidos o glicolípidos pueden usarse como antígenos. El procedimiento de derivatización puede incluir la purificación de una proteína o péptido específico del patógeno, la inactivación del patógeno, así como la estabilización o derivatización química o proteolítica de dicha proteína o péptido. Como alternativa, también el propio patógeno puede usarse como antígeno. Los antígenos son preferentemente péptidos o proteínas, carbohidratos, lípidos, glicolípidos o mezclas de los mismos.

De acuerdo con una realización preferida, se usan epítopos de células T como antígenos. Como alternativa, también puede preferirse una combinación de epítopos de células

T y epítopos de células B.

Por supuesto, también es posible usar de acuerdo con la presente invención mezclas de diferentes antígenos. Preferentemente, se usan proteínas o péptidos aislados de virus de influenza como tales como antígenos (incluyendo antígenos derivatizados o antígenos glicosilados o lipidados o polisacáridos o lípidos).

En el caso de antígenos peptídicos, el uso de mimótopos/agonistas/superagonistas/antagonistas peptídicos o péptidos cambiados en determinadas posiciones sin afectar a las propiedades inmunológicas, o de mimótopos/agonistas/superagonistas/antagonistas no peptídicos, se incluye en la presente invención. Los antígenos peptídicos también pueden contener extensiones en el extremo carboxi- o amino-terminal del antígeno peptídico, facilitando la interacción con el compuesto o compuestos policatiónicos o el compuesto o compuestos inmunoestimulantes.

Los antígenos también pueden derivatizarse para incluir moléculas que aumentan la presentación de antígenos y la dirección de antígenos a células presentadoras de antígenos.

El antígeno de influenza a usar de acuerdo con la presente invención generalmente no está limitado a una forma específica, parece que el efecto de acuerdo con la presente invención se aumenta aún más específicamente por patógeno para influenza, pero no específico para un tipo determinado de antígeno de este patógeno de influenza. Sin embargo se prefiere usar los antígenos de influenza convencionales también en las presentes vacunas, es decir, un antígeno de hemaglutinina y/o un antígeno de neuraminidasa.

Preferentemente, se usan proteínas o péptidos aislados de una fuente de virus de influenza (por ejemplo, un cultivo celular) o sus homólogos recombinantes como dichos antígenos, incluyendo antígenos derivatizados.

La vacuna descrita anteriormente puede contener además poliarginina.

Además, también pueden usarse compuestos neuroactivos tales como hormona del crecimiento (humana) (como se describe, por ejemplo, en el documento WO 01/24822) como inmunoestimulantes (inmunizantes).

La vacuna de acuerdo con la presente invención contiene preferentemente $KLKL_5KLK$ y Oligo $d(IC)_{13}$ (la combinación de $KLKL_5KLK$ y oligo-$d(IC)_{13}$ también se denomina IC31). Estas dos sustancias han demostrado resultados específicamente ventajosos en los experimentos de acuerdo con la presente invención.

La vacuna descrita anteriormente puede contener además un oligodesoxinucleótido que contiene un motivo CpG como ácidos nucleicos inmunomoduladores. Los ácidos nucleicos inmunomoduladores a usar de acuerdo con la presente invención pueden ser de origen sintético, procariota y eucariota. En el caso de un origen eucariota, el ADN debería proceder

de, basándose en el árbol filogenético, especies menos evolucionadas (por ejemplo, insectos, pero también otras). En una realización preferida de la invención, el oligodesoxinucleótido (ODN) inmunogénico es una molécula de ADN producida sintéticamente, o mezclas de dichas moléculas. También se incluyen derivados o modificaciones de ODN tales como análogos sustituidos con tiofosfato (restos de tiofosfato sustituyen a fosfato) como, por ejemplo, los descritos en las Patentes de Estados Unidos US 5.723.335 y US 5.663.153 y otros derivados y modificaciones que preferentemente estabilicen la composición o composiciones inmunoestimulantes pero no cambien sus propiedades inmunológicas. Un motivo de secuencia preferido es un motivo de ADN de seis bases que contiene un dinucleótido CpG (no metilado) flanqueado por dos purinas 5' y 2 pirimidinas 3' (5'-Pur-Pur-C-G-Pyr-Pyr-3'). Los motivos CpG contenidos en los ODN de acuerdo con la presente invención son más comunes en ADN microbiano que de vertebrado superior, y presentan diferencias en el patrón de metilación. Sorprendentemente, las secuencias que estimulan CPA de ratón no son muy eficaces para células humanas. Se desvelan ODN palindrómicos o no palindrómicos preferidos a usar de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, en las Solicitudes de Patente Austriaca A 1973/2000, A 805/2001, EP 0 468 520 A2, WO 96/02555, WO 98/16247, WO 98/18810, WO 98/37919, WO 98/40100, WO 98/52581, WO 98/52962, WO 99/51259 y WO 99/56755, incorporándose todas en el presente documento por referencia. Los ODN/ADN pueden producirse químicamente o de forma recombinante, o pueden obtenerse de fuentes naturales. Las fuentes naturales preferidas son insectos.

La vacuna descrita anteriormente puede contener preferentemente poliarginina y un oligodesoxinucleótido que contiene un motivo CpG en combinación. En el transcurso de la presente invención, ha resultado incluso que la combinación de CpG-ODN y poliarginina muestra efectos de mejora en composiciones de vacuna de influenza que son comparables a los efectos de la combinación de $KLKL_5KLK$ e I-ODN y, no sólo puede combinarse con péptido A y I-/U-ODN, sino incluso usarse en lugar de los mismos. Por supuesto, también pueden usarse mezclas de diferentes ácidos nucleicos inmunoestimulantes (I-ODN, CpG-ODN...) (así como otros inmunizantes) de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se refiere al uso de una combinación de $KLKL_5KLK$ y un I-ODN, ambos como se definen de acuerdo con la presente invención, para mejorar la eficacia protectora de una vacuna contra virus de influenza. Específicamente, la respuesta de tipo 1 específica de antígeno, especialmente la respuesta de anticuerpos IgG2 o respuesta de IFN-gamma de una vacuna contra virus de influenza puede mejorarse y al mismo tiempo la respuesta de tipo 2, especialmente la respuesta de anticuerpos IgG1 o respuesta de interleucina 4 (IL-4) de dicha vacuna puede conservarse o preferentemente aumentarse

también.

Se ha demostrado previamente (documento WO 02/13857) qué péptidos antimicrobianos derivados de catelicidina de origen natural o derivados de los mismos tienen una actividad estimulante de la respuesta inmune y, por lo tanto, constituyen adyuvantes inductores de tipo 1 altamente eficaces (agentes inmunizantes). Las fuentes principales de péptidos antimicrobianos son gránulos de neutrófilos y células epiteliales que revisten los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario. En general, se encuentran en esos sitios anatómicos más expuestos a la invasión microbiana, se secretan en los fluidos corporales internos o se almacenan en gránulos citoplasmáticos de fagocitos profesionales (neutrófilos).

En el documento WO 02/32451 se desvela un adyuvante inductor de tipo 1 (agente inmunizante) que es capaz de aumentar claramente la respuesta inmune contra un antígeno coadministrado específico y, por lo tanto, constituye un adyuvante altamente eficaz, el péptido A, que comprende una secuencia R_1-XZXZ$_N$XZX-R_2. Un péptido específicamente preferido es KLKLLLLLKLK. Aparte de péptidos antimicrobianos de origen natural, se han producido e investigado péptidos antimicrobianos sintéticos. El péptido antimicrobiano sintético KLKLLLLLKLK-NH_2 se demostró que tenía una actividad quimioterápica significativa en ratones infectados con *Staphylococcus aureus*; los neutrófilos humanos se activaron para producir el anión superóxido (O_2^-) por medio de la calreticulina de superficie celular. El número exacto y la posición de K y L se descubrió que era crítica para la actividad antimicrobiana del péptido sintético (Nakajima, Y. (1997); Cho, J.-H. (1999)).

La presente invención es especialmente beneficiosa si el medicamento combinado se administra, por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular, intradérmica o transdérmica. Sin embargo, otras formas de aplicación, tales como parenteral, intravenosa, intranasal, oral o tópica, también son adecuadas para la presente invención.

El antígeno de influenza puede mezclarse con el adyuvante (agente inmunizante) (composición) de acuerdo con la presente invención o formularse específicamente de otro modo, por ejemplo, como un liposoma, formulación retardada, etc.

Las vacunas de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un individuo en cantidades eficaces conocidas por los expertos en la materia de la vacunación frente a influenza. La optimización de la cantidad de antígeno y la cantidad de agente inmunizante puede comenzarse a partir de cantidades establecidas y usando procedimientos disponibles.

La invención se describirá en más detalle mediante los siguientes ejemplos y figuras, pero, por supuesto, la invención no se limita a los mismos.

La Fig. 1 muestra que péptidos catiónicos coinyectados con diferentes ODN inducen sinérgicamente respuestas humorales de tipo 1 potentes (IgG2b) contra una vacuna de

influenza disponible en el mercado;

la Fig. 2 muestra que KLK/o-d$(IC)_{13}$ mejora claramente la eficacia de una vacuna de influenza disponible en el mercado;

la Fig. 3 muestra que una sola inyección de KLK/o-d$(IC)_{13}$ induce sinérgicamente respuestas humorales de tipo 1 y 2 y celulares de tipo 1 potentes contra una vacuna de influenza disponible en el mercado;

la Fig. 4 muestra que una sola inyección de KLK/o-d$(IC)_{13}$ mejora claramente la eficacia de una vacuna de influenza disponible en el mercado;

la Fig. 5 muestra que la vacunación con péptidos derivados de ncORF del virus de la influenza A en combinación con KLK/o-d$(IC)_{13}$ induce células T productoras de IFN-γ potentes y protección frente a la exposición a virus;

la Fig. 6 muestra que KLK/O-d$(IC)_{13}$ induce respuestas inmunes celulares de tipo 1 específicas de péptido del VHC;

la Fig. 7 muestra que péptidos catiónicos coinyectados con diferentes ODN inducen una respuesta celular de tipo 1 específica de HBsAg (producción de IFN-γ), aunque la respuesta de tipo 2 inducida por HBsAg (producción de IL-4) no se ve afectada o disminuida;

la Fig. 8a muestra los resultados de una sola inyección de la combinación del péptido antimicrobiano catiónico KLK con el oligodesoxinucleótido sintético o-d(IC)13 (ODN1a) y pequeñas cantidades de una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1), que induce sinérgicamente respuestas inmunes celulares de tipo 1 específicas de vacuna potentes;

la Fig. 8b muestra los resultados de una sola inyección de la combinación del péptido antimicrobiano catiónico KLK con el oligodesoxinucleótido sintético o-d(IC)13 (ODN1a) y pequeñas cantidades de una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1), que induce sinérgicamente respuestas inmunes humorales mixtas de tipo 1/tipo 2 potentes;

la Fig. 9a muestra los resultados de una sola inyección de baja dosis de la combinación del péptido antimicrobiano catiónico KLK con el oligodesoxinucleótido sintético o-d(IC)13 (ODN1a), que induce sinérgicamente respuestas inmunes de tipo celular potentes contra una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1);

la Figura 9b muestra los resultados de una sola inyección de baja dosis de la combinación del péptido antimicrobiano catiónico KLK con el oligodesoxinucleótido sintético o-d(IC)13 (ODN1a) y pequeñas cantidades de una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1), que induce sinérgicamente respuestas inmunes humorales mixtas de tipo

1/tipo 2 potentes;

la Fig. 10 muestra los resultados de una sola inyección de una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1) combinada con el péptido antimicrobiano catiónico KLK y el oligodesoxinucleótido sintético o-d(IC)13 (ODN1a) en comparación con otros adyuvantes.

Ejemplos:

Ejemplo 1:

Péptidos catiónicos (pR o KLK) coinyectados con diferentes oligodesoxinucleótidos (ODN) (CpI, ntCpI, o-d(IC)$_{13}$) inducen sinérgicamente respuestas humorales de tipo 1 potentes (IgG2b) contra una vacuna de Influenza disponible en el mercado (Fluvirin)

Ratones	C57BL/6 (Harlan/Olac)
Vacuna de influenza	Fluvirin (Evans vaccine); antígenos superficiales de virus de influenza inactivado (hemaglutinina y neuraminidasa) purificados de las cepas: cepa tipo A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) (15 μg de hemaglutinina), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17) (15 μg de hemaglutinina), cepa tipo B/Sichuan/379/99 (15 μg de hemaglutinina) dosis: 1 μg de proteína total/ratón
$Al(OH)_3$	Alhydrogel; Biosys, Dinamarca dosis: mezcla 1:1 con antígeno
pR	Poli-L-arginina con un grado promedio de polimerización de 43 restos de arginina (determinado por MALLS); Sigma Aldrich Inc dosis: 100 μg/ratón
KLK	El KLKLLLLLKLK-COOH se sintetizó por MPS (Multiple Peptide System, Estados Unidos) dosis: 168 μg/ratón
oligo-d(IC)$_{13}$ (= ODN1a)	El ODN 5'ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' se sintetizó por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen dosis: 5 nmol/ratón
I-ODN 2	ODN sustituidos con tiofosfato, que contienen desoxiinosina: tcc atg aci ttc ctg atg ct, se sintetizarin por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen dosis: 5 nmol/ratón

I-ODN 2b	ODN que contienen desoxiinosina: tcc atg aci ttc ctg atg ct, se sintetizaron por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen dosis: 5 nmol/ratón
formulación	Tris 5 mM/sorbitol 270 mM, pH 7

grupo experimental (12 ratones/ grupo):

1.: sin exposición previa
2.: vacuna de la gripe
3.: vacuna de la gripe + pR
4.: vacuna de la gripe + KLK
5.: vacuna de la gripe + $Al(OH)_3$
6.: vacuna de la gripe + o-d$(IC)_{13}$
7.: vacuna de la gripe + I-ODN 2
8.: vacuna de la gripe + I-ODN 2b
9.: vacuna de la gripe + pR + I-ODN 2
10.: vacuna de la gripe+ KLK + o-d$(IC)_{13}$
11.: vacuna de la gripe + KLK + I-ODN 2
12.: vacuna de la gripe + KLK + ODN 2b

Los días 0, 28 y 56 se inyectó s.c. a ratones C57BL/6 en ambas almohadillas plantares traseras un volumen total de 100 µl/ratón (50 µl/almohadilla plantar) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. Se recogió suero los días 26, 54 y 82 y se analizó para anticuerpos IgG1 e IgG2b específicos de vacuna de influenza por ELISA. Los títulos corresponden a esa dilución de suero que da como resultado una $DO_{405\ nm}$ semimáxima.

La Figura 1 indica que la inyección combinada de péptidos catiónicos (pR o KLK) y diferentes ODN (I-ODN 2, I-ODN 2b u o-d$(IC)_{13}$) induce respuestas humorales de tipo 1 específicas de antígeno (vacuna de influenza) muy potentes (IgG2b) de una forma sinérgica. Tras la inyección de la vacuna de influenza en solitario o en combinación con $Al(OH)_3$, péptidos catiónicos (pR, KLK) solamente o diferentes ODN (excepto I-ODN 2) solamente, no es detectable ninguna respuesta de IgG2b específica. Las vacunaciones de refuerzo aumentan claramente la respuesta observada.

La coinyección de la vacuna de influenza con $Al(OH)_3$, KLK o combinaciones de pR/I-ODN 2, KLK/I-ODN 2, KLK/I-ODN 2b o KLK/o-d$(IC)_{13}$ induce la producción de IgG1 específica de vacuna de influenza (respuesta de tipo 2).

Ejemplo 2:

La combinación de KLK/o-d $(IC)_{13}$ aumenta claramente la eficacia de una vacuna de influenza disponible en el mercado (Fluvirin)

Ratones	BALB/c (Harlan/Olac)
Vacuna de influenza	Fluvirin (Evans vaccine); antígenos superficiales de virus de influenza inactivado (hemaglutinina y neuraminidasa) purificados de las cepas: cepa tipo A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) (15 µg de hemaglutinina), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17) (15 µg de hemaglutinina), cepa tipo B/Sichuan/379/99 (15 µg de hemaglutinina) dosis: 1 µg de proteína total/ratón (= baja dosis/bibliografía: 10 µg/ratón)
$Al(OH)_3$	Alhydrogel; Biosys, Dinamarca dosis: mezcla 1:1 con antígeno
KLK	El KLKLLLLLKLK-COOH se sintetizó por MPS (Multiple Peptide System, Estados Unidos) dosis: 168 µg/ratón
oligo-$d(IC)_{13}$ (= ODN1a)	El ODN 5'ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' se sintetizó por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen dosis: 5 nmol/ratón
formulación	Tris 5 mM/sorbitol 270 mM, pH 7

grupo experimental (12 ratones/ grupo):

1.: sin exposición previa

2.: vacuna de la gripe

3.: vacuna de la gripe + $Al(OH)_3$

4.: vacuna de la gripe + KLK + o-$d(IC)_{13}$

Los días 0, 28 y 56 se inyectó s.c. a ratones BALB/c en ambas almohadillas plantares traseras un volumen total de 100 µl/ratón (50 µl/almohadilla plantar) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. Se recogió suero los días 26, 54 y 82 y se analizó para anticuerpos neutralizantes anti-hemaglutinina usando un ensayo de inhibición de hemaglutinina convencional. En resumen, la presencia de hemaglutinina en la superficie del virus induce la hemaglutinación de los eritrocitos, que puede inhibirse por anticuerpos neutralizantes anti-hemaglutinina. Se determinaron los títulos de anticuerpos contra hemaglutinina de las diferentes cepas virales (A1 = cepa tipo A/NewCaledonia/20/99 (H1N1); A2 = A/Panama/2007/99 RESVIR-17; B = cepa tipo B/Sichuan/379/99). El título sérico

corresponde a la dilución a punto final que muestra inhibición.

Al contrario que la inyección de vacuna de influenza en solitario o en combinación con $Al(OH)_3$ la coinyección de vacuna de influenza más KLK y o-d$(IC)_{13}$ induce altos niveles de anticuerpos neutralizantes contra las tres hemaglutininas ensayadas (Fig. 2). Puesto que se ha demostrado que la eficacia de una vacuna de influenza se correlaciona con los títulos séricos de anticuerpos anti-hemaglutinina, los resultados obtenidos indican un alto potencial de KLK/o-d$(IC)_{13}$ para la inducción de protección frente a influenza.

Ejemplo 3:

Una sola inyección de la combinación del péptido antimicrobiano catiónico KLK y el oligodesoxinucleótido sintético o-d$(IC)_{13}$ induce sinérgicamente respuestas inmunes humorales de tipo 1/tipo 2 y celulares de tipo 1 potentes contra una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1)

Materiales

Ratones	BALB/c (Harlan-Winkelmann, Alemania)
Vacunas de influenza	***Agrippal S1*** (Chiron SpA, Italia; temporada 2002/2003); antígenos de virus de influenza inactivado purificados (hemaglutinina y neuraminidasa) de las cepas: cepa tipo A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) (A/New Caledonia/20/99 IVR-116), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17), cepa tipo B/Hong Kong/330/2001 (B/Shangdong/7/97). Contenido de antígeno total: 45 µg (15 µg para cada antígeno); Lote Nº 4307; fecha de caducidad 05/2003. Dosis: 1 µg de proteína total/ratón. ***Fluad*** (Chiron SpA, Italia; temporada 2002/2003); antígenos de virus de influenza inactivado purificados (hemaglutinina y neuraminidasa) de las cepas: cepa tipo A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) (A/New Caledonia/20/99 IVR-116), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17), (B/Shangdong/7/97). Contenido de antígeno total: 45 µg (15 µg para cada antígeno); Adición de MF59C.1 como adyuvante. Lote Nº 3403; fecha de caducidad 05/2003.
o-d$(IC)_{13}$ (= ODN1a)	Dosis: 1 µg de proteína total/ratón. El ODN 5'ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' se sintetizó por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen. Dosis: 0,4 nmol/ratón

KLK	El KLKLLLLLKLK-COOH se sintetizó por MPS (Multiple Peptide System, Estados Unidos)
	Dosis: 10 nmol/ratón
Formulación	Tris 10 mM/NaCl 135 mM; pH-7

Preparación Experimental (10 ratones / grupo)

1.: sin exposición previa

2.: Agrippal S1

3.: Fluad

4.: Agrippal S1 + KLK + o-d$(IC)_{13}$

El día 0 se inyectó a ratones BALB/c por vía intramuscular en ambos músculos femorales posteriores una cantidad total de 100 µl de vacuna/ratón (50 µl/músculo) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. El día 21, se recogió suero y se analizó para anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos de vacuna de influenza por ELISA. Los títulos corresponden a la dilución de suero que da como resultado una $DO_{405\ nm}$ semimáxima. Además, se combinaron los bazos de cada grupo experimental y se prepararon suspensiones de una sola célula. Se separó una alícuota de esplenocitos en células T $CD4^+$ por separación magnética (separación MACS de CD4, Miltenyi). Los esplenocitos no separados o las células T $CD4^+$ separadas en combinación con células presentadoras de antígenos irradiadas (CPA; obtenidas de ratones sin exposición previa) se estimularon en placas de ELIspot de 96 pocillos para enumerar la cantidad de células productoras de citocinas específicas de antígeno de Agrippal S1 para cada grupo experimental. Se analizó la producción de las citocinas siguientes:

IFN-γ (como un indicador para una respuesta celular de tipo 1),

IL-4 e IL-5 (como indicadores para una respuesta celular de tipo 2)

Resultados (Fig. 3a)

La inyección de pequeñas cantidades de las vacunas de influenza Agrippal S1 (sin adyuvante) y Fluad (con adyuvante MF59) en solitario no es capaz de inducir IFN-γ específico de vacuna (Agrippal S1) por células T $CD4^+$, mientras que tras la inyección de Agrippal S1 en combinación con KLK/o-d$(IC)_{13}$ se observa una producción de IFN-γ específico de vacuna (Agrippal S1) por células T $CD4^+$ potente. En comparación con ratones sin exposición previa, el Agrippal S1 en solitario sólo induce ligeramente la producción de IL-4 por células T $CD4^+$, y la adición de KLK/o-d$(IC)_{13}$ a la vacuna no muestra un aumento adicional. Sin embargo, el Fluad es un inductor potente de la producción de IL-4 por células T $CD4^+$ y la producción de IL-5 por esplenocitos no separados. La IL-5 sólo es detectable a niveles muy bajos tras la inyección de Agrippal S1 en solitario, pero no en combinación con KLK/o-d$(IC)_{13.}$ Tras la reestimulación de esplenocitos no separados se obtuvieron resultados similares.

Resultados (Fig. 3b)

La Fig. 3b muestra que la inyección de la vacuna de influenza con adyuvante Fluad en solitario induce una respuesta humoral de tipo 2 específica de vacuna (Agrippal S1) potente (IgG1), pero sólo una respuesta de tipo 1 débil (IgG2a). Sin embargo, la inyección combinada de la vacuna de influenza sin adyuvante con KLK/o-d$(IC)_{13}$ induce IgG2a específica de vacuna (Agrippal S1) muy potente (respuesta inmune humoral de tipo 1) y mayores niveles de IgG1 que el Agrippal S1 en solitario. Puesto que la protección frente a influenza se correlaciona con la presencia de anticuerpos IgG2a específicos de antígeno vacunal, los resultados obtenidos indican un alto potencial de KLK/o-d$(IC)_{13}$ como adyuvante potente para vacunas de influenza.

Ejemplo 4:

La combinación de KLK/o-d$(IC)_{13}$ mejora claramente la eficacia de una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1) tras una sola inyección

Materiales

Ratones	BALB/c (Harlan-Winkelmann, Alemania)
Vacunas de influenza	***Agrippal S1*** (Chiron SpA, Italia; temporada 2002/2003); antígenos de virus de influenza inactivado (hemaglutinina y neuraminidasa) purificados de las cepas: cepa tipo A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) (A/New Caledonia/20/99 IVR-116), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17), cepa tipo B/Hong Kong/330/2001 (B/Shangdong/7/97). Contenido de antígeno total: 45 µg (15 µg para cada antígeno); Lote Nº 4307; fecha de caducidad 05/2003. Dosis: 1 µg de proteína total/ratón. ***Fluad*** (Chiron SpA, Italia; temporada 2002/2003); antígenos de virus de influenza inactivado (hemaglutinina y neuraminidasa) purificados de las cepas: cepa tipo A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) (A/New Caledonia/20/99 IVR-116), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17), (B/Shangdong/7/97). Contenido de antígeno total: 45 µg (15 µg para cada antígeno); Adición de MF59C.1 como adyuvante. Lote Nº 3403; fecha de caducidad 05/2003.
o-d$(IC)_{13}$ (= ODN1a)	Dosis: 1 µg de proteína total/ratón. El ODN 5'ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' se sintetizó por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen. Dosis: 0,5 nmol/ratón

KLK	El KLKLLLLLKLK-COOH se sintetizó por MPS (Multiple Peptide System, Estados Unidos) Dosis: 10 nmol/ratón
Formulación	Tris 10 mM/Sorbitol 270 mM; pH-7

Preparación experimental (10 ratones/grupo)

1.: sin exposición previa

2.: Agrippal S1

3.: Fluad

4.: Agrippal S1 + KLK + o-d$(IC)_{13}$

El día 0 se inyectó a ratones BALB/c por vía intramuscular en ambos músculos femorales posteriores una cantidad total de 100 µl de vacuna/ratón (50 µl/músculo) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. El día 21, se recogió suero y se analizó para anticuerpos neutralizantes anti-hemaglutinina mediante el uso de un ensayo de inhibición de hemaglutinina (IH) convencional para sueros humanos. Se determinaron los títulos de anticuerpos contra hemaglutinina derivada de diferentes cepas virales de ambas vacunas de influenza Agrippal S1 y Fluad (véanse los Materiales).

Resultados (Fig. 4)

Al contrario que la inyección de Agrippal S1 en solitario, la coinyección de la vacuna de influenza con pequeñas cantidades de KLK/o-d$(IC)_{13}$ induce niveles claramente aumentados de anticuerpos neutralizantes contra las dos cepas de influenza A ensayadas (A/New Caledonia/20/99; A/Panama/2007/99). Sin embargo, la inmunización con Fluad induce los mismos niveles de anticuerpos neutralizantes que la coinyección de Agrippal S1 con pequeñas cantidades de KLK/o-d$(IC)_{13}$. Puesto que se ha demostrado que la eficacia de una vacuna de influenza se correlaciona con los títulos séricos de anticuerpos anti-hemaglutinina, los presentes resultados indican un alto potencial de KLK/o-d$(IC)_{13}$ como adyuvante para la inducción de protección frente a influenza.

Ejemplo 5:

Vacunación de ratones con péptidos derivados de la ncORF de virus de influenza A en combinación con KLK/o-d$(IC)_{13}$. La respuesta de células T específica se mide 7 días después de la vacunación y los animales se exponen posteriormente a una dosis letal de virus de influenza A adaptado a ratón (x31). La supervivencia se controla durante 15 días.

Materiales

Ratones	C57B1/6 (Harlam-Winkelmann, Alemania)
Péptidos	**p82** (GLCTLVAML) Péptido de control derivado de VEB; HLA-A*0201; AA inicio 280 **p1574** (IASNENMETM). Péptido de control derivado de la nucleoproteína de influenza, AA inicio 365 **p1569** (TMLYNKMEF). Péptido derivado de la ncORF de la gripe del segmento 1, fase 1, ORF 1, AA inicio 569 **p1600** (SSIAAQDAL). Péptido derivado de la ncORF de la gripe del segmento 3, fase 6, ORF 2, AA inicio 83 **P1664** (VTILNLALL). Péptido derivado de la ncORF de la gripe del segmento 4, fase 5, ORF 6, AA inicio 9. Dosis: 100 µg/péptido/ratón
o-d(IC)$_{13}$ (= ODN1a)	El ODN 5'ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' se sintetizó por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen Dosis: 5 nmol/ratón
KLK	El KLKLLLLLKLK-COOH se sintetizó por MPS (Multiple Peptide System, Estados Unidos) Dosis: 127 nmol/ratón
Formulación	Sorbitol 270 mM/Hepes 10 mM
Virus de influenza A	x31, virus de influenza A adaptado a ratón, virus rec. derivado de A/Pr/8/34 (seg. 1, 2, 3, 5, 7, 8) y A/Aichi/2/68 (seg. 4, 6)

Preparación experimental (15 ratones/grupo)

1. p1574 + KLK + o-d(IC)$_{13}$
2. p1569 + KLK + o-d(IC)$_{13}$
3. p1600 + KLK + o-d(IC)$_{13}$
4. p1664 + KLK + o-d(IC)$_{13}$
5. p1600 + p1569 +KLK + o-d(IC)$_{13}$

El día 0 se inyectó s.c. a ratones en ambas almohadillas plantares traseras una cantidad total de 100 µl de vacuna/ratón (50 µl/pata) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. El día 7, se estimularon los esplenocitos no separados de 5 ratones en placas de ELIspot de 96 pocillos para enumerar la cantidad de células productoras de IFN-γ específicas de péptido para cada grupo experimental.

Los 10 ratones restantes se expusieron a virus de influenza A x31 adaptado a ratón (5*10E5 ufp). La supervivencia se controló durante 15 días.

Resultados del ELIspot (Fig. 5a)

Los esplenocitos de los grupos 1 y 3 (péptidos p1574 y p1600) no muestran ninguna mancha específica después de la reestimulación con los péptidos respectivos. Los grupos 2 y 4

(p1569 y p1664) liberan específicamente IFN-γ después de la reestimulación. El grupo 5 se vacunó con dos péptidos individuales (no como una mezcla, p1600 y p1569). Tras la reestimulación con la mezcla de ambos péptidos o con p1569, se detectó la liberación de citocinas específicas. Por el contrario, tras la reestimulación con p1600 solamente, no eran detectables manchas de IFN-γ. Esto concuerda con el grupo 3 (p1600 solamente).

Resultados de la exposición (Fig. 5b)

La Fig. 5b muestra el índice de supervivencia de los ratones expuestos a una dosis letal de virus de la influenza A adaptado a ratón x31. El grupo 1 (p1574, epítopo protector descrito para H2-Db) protege el 30% de todos los ratones expuestos. El péptido p1569 no proporciona en absoluto protección (0%). Por el contrario, los péptidos p1600 y p1664 protegen al 50% y 62% de los animales expuestos, respectivamente. Cuando los animales se vacunaron con dos péptidos diferentes (grupo 5, péptidos p1600 y p1569) se protegió hasta al 70% de los animales.

Ejemplo de Referencia 6:

Se inducen respuestas celulares de tipo 1 específicas de VHC potentes por la inyección combinada de cinco péptidos derivados del VHC diferentes, el péptido antimicrobiano KLK y el oligodesoxinucleótido sintético o-d(IC)$_{13}$

Ratones	Ratones transgénicos HLA-A*0201 (HHD.1)
Péptidos	Los péptidos p83, p84, p87, p89, p1426 se usaron para la vacunación. p83: péptido derivado del VHC, (KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRL). p84: péptido derivado del VHC, (GYKVLVLNPSVAAT). p87: péptido derivado del VHC, (DLMGYIPAV). p89: péptido derivado del VHC, (CINGVCWTV) p1426: péptido derivado del VHC, (HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA), (p1274 usado para la reestimulación como péptido irrelevante (YMDGTMSQV; restringido por HLA-A*0201). Todos los péptidos se sintetizaron por síntesis de F-moc en fase sólida convencional, se purificaron por HPLC y se analizaron por espectroscopía de masas para determinar su pureza. Dosis: 20 μg por péptido/ratón
KLK	El KLKLLLLLKLK-COOH se sintetizó por MPS (Multiple Peptide System, Estados Unidos) Dosis: 10 nmol/ratón

oligo-d$(IC)_{13}$ (=ODN1a)ODN	El 5'ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' se sintetizó por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen Dosis: 0,4 nmol/ratón
Formulación	Tris 10 mM/NaCl 135 mM; pH-7

Preparación experimental (5 ratones/grupo)

1. Péptidos del VHC
2. Péptidos del VHC + KLK + o-d$(IC)_{13}$

Los días 0, 14 y 28 se inyectó s.c. a ratones HHD.1 en ambas almohadillas plantares traseras un volumen total de 100 µl/ratón (50 µl/almohadilla plantar) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. El día 35 (7 días después de la última vacunación) se aislaron células T $CD4^+$ así como $CD8^+$ por separación magnética (MACS, Miltenyi) a partir de suspensiones de una sola célula de esplenocitos. Las células T se incubaron con medio (control de fondo) o se reestimularon con esplenocitos irradiados a partir de ratones HHD.1 sin exposición previa como CPA en presencia de los diferentes péptidos usados para la vacunación o del péptido irrelevante p1274. Después de una incubación de una noche, la producción de IFN-γ se analizó usando un ensayo de ELIspot.

La Figura 6 muestra que tras la coinyeción de los cinco péptidos derivados del VHC con KLK/o-d$(IC)_{13}$ se indujeron altas cantidades de IFN-γ producido por células T $CD4^+$ contra p84, p87, p89, p1426. Además, era detectable una fuerte producción de IFN-γ por células T $CD8^+$ contra p87, p89.

Ejemplo de referencia 7:

Péptidos catiónicos (pR o KLK) coinyectados con diferentes oligodesoxinucleótidos (ODN) (Cpl, ntCpl, o-d$(IC)_{13}$) inducen sinérgicamente respuestas celulares de tipo 1 potentes (IFN-γ) contra antígeno superficial de la Hepatitis B

Ratones	C57BL/6 (Harlam-Winkelmann, Alemania); ratones de bajo nivel de respuesta para respuestas inmunes específicas de HbsAg
Antígeno	Antígeno superficial de la Hepatitis B (HBsAg) dosis: 5 µg/ratón
$Al(OH)_3$	Alhydrogel; Biosys, Dinamarca dosis: mezcla 1:1 con antígeno
pR	Poli-L-Arginina con un grado promedio de polimerización de 43 restos de arginina (determinado por MALLS); Sigma Aldrich Inc dosis: 100 µg/ratón

KLK	El KLKLLLLLKLK-COOH se sintetizó por MPS (Multiple Peptide System, Estados Unidos) dosis: 168 µg/ratón
I-ODN 2	(= Cpl 2) ODN sustituidos con tiofosfato que contienen desoxiinosinas: 5'tcc atg aci ttc ctg atg ct3' se sintetizaron por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen dosis: 5 nmol/ratón
I-ODN 2b	(= Cpl 2b) ODN contienen desoxiinosinas: 5'tcc atg aci ttc ctg atg ct3' se sintetizaron por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen dosis: 5 nmol/ratón
o-d$(IC)_{13}$ (= ODN1a)	El ODN 5'ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' se sintetizó por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen dosis: 5 nmol/ratón
Formulación	Tris 5 mM/Sorbitol 270 mM; pH7

Preparación experimental (5 ratones/grupo/punto temporal)

1. HBsAg
2. HBsAg + Alumbre
3. HBsAg + I-ODN 2
4. HBsAg + I-ODN 2b
5. HBsAg + o-d$(IC)_{13}$
6. HBsAg + pR
7. HBsAg + KLK
8. HBsAg + pR + I-ODN 2
9. HBsAg + pR + I-ODN 2b
10. HBsAg + pR + o-d$(IC)_{13}$
11. HBsAg + KLK + I-ODN 2
12. HBsAg + KLK + I-ODN 2b
13. HBsAg + KLK + o-d $(IC)_{13}$

El día 0 y el día 56 se inyectó a ratones por vía subcutánea en el flanco derecho un volumen total de 100 µl/ratón que contenía los compuestos mencionados anteriormente. El análisis de la respuesta inmune se realizó el día 7, el día 21 y el día 50 después de la primera y segunda inyección, respectivamente. Los esplenocitos de cinco ratones por grupo por punto temporal se reestimularon *ex vivo* con HBsAg 10 µg/ml y se realizaron ensayos ELIspot para analizar la producción de IFN-γ específico de HBsAg (respuesta inmune de tipo 1), así como de IL-4 (respuesta inmune de tipo 2).

Resultados (Fig. 7)

El HBsAg inyectado en solitario o en combinación con alumbre no induce, o induce niveles muy bajos de IFN-γ, mientras que tras la inyección de HBsAg combinado con pR/ODN o KLK/ODN se induce una producción de IFN-γ específico de HBsAg que puede aumentarse adicionalmente mediante una vacunación de refuerzo. Es observable una producción de IL-4 ligeramente aumentada en comparación con la inyección de HBsAg en solitario tras la coinyección de alumbre, pR y KLK después del refuerzo, así como tras la coinyección de combinaciones de KLK/ODN.

Ejemplo 8:

Una sola inyección de la combinación del péptido antimicrobiano catiónico KLK con el oligodesoxinucleótido sintético o-d$(IC)_{13}$ (ODN1a) y pequeñas cantidades de una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1) induce sinérgicamente respuestas inmunes celulares de tipo 1 específicas de vacuna potentes.

Materiales

Ratones	BALB/c (Harlam-Winkelmann, Alemania)
Vacuna de influenza	**Agrippal S1** (Chiron SpA, Italia; temporada de vacunación 2003/2004); lote 035105, fecha de caducidad 06/2004. Antígenos de virus de influenza inactivado (hemaglutinina y neuraminidasa) purificados de las cepas: cepa tipo A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) (A/New Caledonia/20/99 IVR-116), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17), cepa tipo B/Hong Kong/330/2001 (B/Shangdong/7/97). Contenido de antígeno total: 45 μg de hemaglutinina (15 μg para cada cepa viral)
Dosis:	9 μg de proteína total/ratón (usada directamente a partir de una jeringa precargada), 0,1 μg de proteína total/ratón
o-d$(IC)_{13}$ (= ODN1a)	ODN sustituido con fosfodiéster que contiene 13 motivos desoxi(-inosina, -citosina) (ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC); sintetizado por Transgenomics; Número de parte: I02A03001N
Dosis:	4 nmol/ratón, 1,4 nmol/ratón, 0,4 nmol/ratón
KLK	Poliaminoácido catiónico sintético que contiene lisina y leucina (KLKLLLLLKLK-COOH); sintetizado por Bachem AG lote: 05 62101; Dosis: 100 nmol/ratón, 35 nmol/ratón, 10 nmol/ratón
Formulación	por el Pharmaceutical Development Department en Intercell; Tris 10 mM/NaCl 135 mM pH 7,5

Preparación experimental (10 ratones/grupo)

1. sin exposición previa
2. 9 μg de Agrippal S1
3. 0,1 μg de Agrippal S1
4. 0,1 μg de Agrippal S1 + KLK 100 nmol + ODN1a 4 nmol
5. 0,1 μg de Agrippal S1 + KLK35 nmol + ODN1a 1,4 nmol
6. 0,1 μg de Agrippal S1 + KLK 10 nmol + ODN1a 0,4 nmol

El día 0, se inyectó a ratones BALB/c por vía intramuscular en ambos músculos femorales una cantidad total de 100 μl de vacuna/ratón (50 μl/músculo) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. El día 21, se recogió suero y se analizó para anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos de vacuna de influenza por ELISA. Los títulos corresponden a la dilución de suero que da como resultado una $DO405_{nm}$ semimáxima. Además, los bazos de cada grupo experimental se combinaron y se prepararon suspensiones de una sola célula. Se separó una alícuota de esplenocitos en células T $CD4^+$ y $CD8^+$ por separación magnética (separación MACS de CD4 y CD8, Miltenyi). Los esplenocitos no separados o células T $CD4^+$ y $CD8^+$ separadas en combinación con células presentadoras de antígenos irradiadas (CPA; obtenidas de ratones sin exposición previa) se estimularon en placas de ELIspot de 96 pocillos para enumerar la cantidad de células productoras de citocinas específicas de antígeno de Agrippal S1 para cada grupo experimental. Se analizó la producción de las citocinas siguientes:

IFN-γ (como un indicador para una respuesta celular de tipo 1),

IL-4 e IL-5 (como indicadores para una respuesta celular de tipo 2)

Resultados (Fig. 8a)

La vacunación de ratones con 9 μg y un 0,1 μg de Agrippal S1 en solitario no fue capaz de inducir **IFN**-γ específico de vacuna por esplenocitos $CD4^+$, mientras que tras la inyección de Agrippal S1 en combinación con diferentes concentraciones de KLK/o-d$(IC)_{13}$ se observó una producción de IFN-γ potente por esplenocitos $CD4^+$. Sin embargo, los esplenocitos $CD8^+$ no eran capaces de inducir **IFN**-γ. En comparación con los ratones sin exposición previa, el Agrippal S1 en solitario inducía sólo ligeramente la producción de **IL-4** por esplenocitos no separados y $CD4^+$, y la adición de KLK/o-d$(IC)_{13}$ a la vacuna no mostraba un aumento adicional. Sin embargo, la **IL-5** inducida por Agrippal S1 se suprimía totalmente tras la coinyección de KLK/o-d$(IC)_{13}$. Tras la reestimulación de esplenocitos no separados se obtuvieron resultados similares.

Resultados (Fig. 8b)

Como se ilustra en la Fig. 8b, la inyección combinada de pequeñas cantidades de la

vacuna de influenza sin adyuvante con diferentes concentraciones de KLK/o-d$(IC)_{13}$ inducía **IgG2a** específica de vacuna (Agrippal S1) muy potente (respuesta inmune humoral de tipo 1) y mayores niveles de **IgG1** que pequeñas cantidades de Agrippal S1 en solitario. Sin embargo, la alta dosis de Agrippal S1 mostraba los mayores títulos de anticuerpos IgG1 específicos de vacuna. Puesto que la protección frente a influenza se correlaciona con la presencia de anticuerpos IgG2 específicos de antígeno vacunal, los resultados obtenidos indican un alto potencial de KLK/o-d$(IC)_{13}$ como un adyuvante potente para vacunas de influenza.

Ejemplo 9:

Una sola inyección de baja dosis de la combinación del péptido antimicrobiano catiónico KLK con el oligodesoxinucleótido sintético o-d$(IC)_{13}$ (ODN1a) induce sinérgicamente respuestas inmunes celulares de tipo 1 específicas de vacuna potentes contra una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1)

Materiales

Ratones	BALB/c (Harlam-Winkelmann, Alemania)
Vacuna de influenza	**Agrippal S1** (Chiron SpA, Italia; temporada de vacunación 2003/2004); lote 035105, fecha de caducidad 06/2004. Antígenos de virus de influenza inactivado (hemaglutinina y neuraminidasa) purificados de las cepas: cepa tipo A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) (A/New Caledonia/20/99 IVR-116), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17), cepa tipo B/Hong Kong/330/2001 (B/Shangdong/7/97). Contenido de antígeno total: 45 µg de hemaglutinina (15 µg para cada cepa viral)
Dosis:	9 µg de proteína total/ratón (usada directamente a partir de una jeringa precargada), 0,1 µg de proteína total/ratón
o-d$(IC)_{13}$ (= ODN1a)	ODN sustituido con fosfodiéster que contiene 13 motivos desoxi(-inosina, -citosina) (ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC); sintetizado por Transgenomics; Número de parte: I02A03001N
Dosis:	0,4 nmol/ratón, 0,2 nmol/ratón, 0,04 nmol/ratón
KLK	Poliaminoácido catiónico sintético que contiene lisina y leucina (KLKLLLLLKLK-COOH); sintetizado por Bachem AG lote: 05 62101; Dosis: 10 nmol/ratón, 5 nmol/ratón, 1 nmol/ratón
Formulación	por el Pharmaceutical Development Department en Intercell; Tris 10 mM/NaCl 135 mM pH 7,5

Preparación experimental (5 ratones/grupo)

1. sin exposición previa

2. 9 μg de Agrippal S1
3. 1 μg de Agrippal S1
4. 1 μg de Agrippal S1 + KLK 10 nmol + ODN1a 0,4 nmol
5. 1 μg de Agrippal S1 + KLK 5 nmol + ODN1a 0,2 nmol
6. 1 μg de Agrippal S1 + KLK 1 nmol + ODN1a 0,04 nmol

El día 0 se inyectó a ratones BALB/c por vía intramuscular en ambos músculos femorales una cantidad total de 100 μl de vacuna/ratón (50 μl/músculo) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. El día 21, se recogió suero y se analizó para anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos de vacuna de influenza por ELISA. Los títulos corresponden a la dilución de suero que da como resultado una $DO405_{nm}$ semimáxima. Además, los bazos de cada grupo experimental se combinaron y se prepararon suspensiones de una sola célula. Se estimularon esplenocitos en placas de ELIspot de 96 pocillos para enumerar la cantidad de células productoras de citocinas específicas de antígeno de Agrippal S1 para cada grupo experimental. Se analizó la producción de las citocinas siguientes:

IFN-γ (como un indicador para una respuesta celular de tipo 1),

IL-4 y IL-5 (como indicadores para una respuesta celular de tipo 2)

Resultado (Fig. 9a)

De nuevo, la vacunación de ratones con 9 μg y un 1 μg de Agrippal S1 en solitario (véase la Figura 8a) no era capaz de inducir **IFN**-γ específico de vacuna por esplenocitos murinos, mientras que tras la inyección de Agrippal S1 en combinación con diferentes concentraciones reducidas de KLK/o-d$(IC)_{13}$ se observó una producción de IFN-γ potente. En comparación con ratones sin exposición previa, el Agrippal S1 en solitario inducía sólo ligeramente la producción de **IL-4** por esplenocitos murinos y la adición de KLK/o-d$(IC)_{13}$ a la vacuna no tenía efecto. La **IL-5** inducida por Agrippal S1 se suprimió tras la coinyección de KLK/o-d$(IC)_{13}$ de una forma dependiente de la concentración. Aun a una dosificación muy baja, la combinación de KLK/o-d$(IC)_{13}$ induce una respuesta inmune celular de tipo 1 potente.

Resultados (Fig. 9b)

La inyección combinada de pequeñas cantidades de la vacuna de influenza sin adyuvante con diferentes concentraciones de KLK/o-d$(IC)_{13}$ inducía **IgG2a** específica de vacuna (Agrippal S1) muy potente (respuesta inmune humoral de tipo 1) y niveles de **IgG1** aproximadamente comparables a pequeñas cantidades de Agrippal S1 en solitario. Sin embargo, la alta dosis de Agrippal S1 en solitario mostraba títulos ligeramente aumentados de anticuerpos IgG1 específicos de vacuna y niveles comparables de anticuerpos IgG2a en comparación con la coinyección de Agrippal S1 y la menor concentración de KLK/o-d$(IC)_{13}$. Puesto que la protección frente a influenza se correlaciona con la presencia de anticuerpos

IgG2a específicos de antígeno vacunal, los resultados obtenidos indican un alto potencial de KLK/o-d$(IC)_{13}$, incluso a una dosis muy baja, como adyuvante potente para vacunas de influenza.

Ejemplo 10

Una sola inyección de una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1) combinada con el péptido antimicrobiano catiónico KLK y el oligodesoxinucleótido sintético o-d$(IC)_{13}$ (ODN1a) en comparación con otros adyuvantes

Materiales

Ratones	BALB/c (Harlam-Winkelmann, Alemania)
Vacuna de influenza	**Agrippal S1** (Chiron SpA, Italia; temporada de vacunación 2003/2004); lote 035105, fecha de caducidad 06/2004 y **Fluad** (Chiron SpA, Italia; temporada de vacunación 2003/2004); lote 4003, fecha de caducidad 05/2004. Adición de MF59C.1 como adyuvante. Ambas vacunas contienen antígenos de virus de influenza inactivado (hemaglutinina y neuraminidasa) purificados de las cepas: cepa tipo A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) (A/New Caledonia/20/99 IVR-116), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17), cepa tipo B/Hong Kong/330/2001 (B/Shangdong/7/97). Contenido de antígeno total: 45 µg de hemaglutinina (15 µg para cada cepa viral)
Dosis:	9 µg de proteína total/ratón (usada directamente a partir de una jeringa precargada), 1 µg de proteína total/ratón
o-d$(IC)_{13}$ (= ODN1a)	ODN sustituido con fosfodiéster que contiene 13 motivos desoxi(-inosina, -citosina) (ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC); sintetizado por Transgenomics; Número de parte: I02A03001N Dosis: 0,4 nmol/ratón
KLK	Poliaminoácido catiónico sintético que contiene lisina y leucina (KLKLLLLLKLK-COOH); sintetizado por Bachem AG lote: 05 62101; Dosis: 100 nmol/ratón, 10 nmol/ratón
CpG1668	ODN sustituido con tiofosfato que contiene motivos CpG (5'-tcc atg acg ttc ctg atg ct-3'); sintetizado por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen; lote 020614. Dosis: 5 nmol/ratón
Alumbre	$Al(OH)_3$ [15 g/l]; suministrado por Chiron Behring, Alemania Dosis: mezcla 1:1 con antígeno

pR	Poli-L-Arginina con un grado promedio de polimerización de 43 restos de arginina (determinado por MALLS); suministrado por Sigma; lote 50K7280. Dosis: 100 μg/ratón
IFA	Adyuvante Incompleto de Freud; suministrado por Difco Lab.; lote 2158430. Dosis: mezcla 1:1 con antígeno
CFA	Adyuvante Completo de Freud; suministrado por Difco Lab.; lote 3126639. Dosis: mezcla 1:1 con antígeno
Formulación	por el Pharmaceutical Development Department en Intercell; Tris 10 mM/NaCl 135 mM pH 7,5

Preparación experimental (5 ratones/grupo)

1. sin exposición previa
2. 9 μg de Fluad
3. 9 μg de Agrippal S1
4. 1 μg de Agrippal S1
5. 1 μg de Agrippal S1 + KLK 10 nmol + ODN1a 0,4 nmol
6. 1 μg de Agrippal S1 + CpG1668 5 nmol
7. 1 μg de Agrippal S1 + 100 μg de pR43
8. 1 μg de Agrippal S1 + KLK 100 nmol
9. 1 μg de Agrippal S1 + Alumbre
10. 1 μg de Agrippal S1 + CFA
11. 1 μg de Agrippal S1 + IFA

El día 0 se inyectó a ratones BALB/c por vía intramuscular en ambos músculos femorales una cantidad total de 100 μl de vacuna/ratón (50 μl/músculo) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. El día 21, los bazos de cada grupo experimental se combinaron y se prepararon suspensiones de una sola célula. Se estimularon los esplenocitos en placas de ELIspot de 96 pocillos para enumerar la cantidad de células productoras de citocinas específicas de antígeno de Agrippal S1 para cada grupo experimental. Se analizó la producción de las citocinas siguientes:

IFN-γ (como un indicador para una respuesta celular de tipo 1),

IL-4 y IL-5 (como indicadores para una respuesta celular de tipo 2)

Resultados (Fig. 10)

La inyección combinada de pequeñas cantidades de la vacuna de influenza sin adyuvante con pequeñas dosis de KLK/o-d$(IC)_{13}$ inducían mayores niveles de **IFN**-γ específico de vacuna (Agrippal S1) por esplenocitos murinos en comparación con la inmunización con Agrippal S1 y Fluad en solitario. Sólo se consiguieron cantidades comparables de IFN-γ tras la

vacunación con CFA, todos los demás grupos experimentales mostraron aproximadamente ninguna producción (pR43, Alumbre, IFA) o una producción ligeramente aumentada (CpG1668, KLK) de IFN-γ por esplenocitos murinos en comparación con Agrippal S1 en solitario. En comparación con ratones sin exposición previa, sólo el Fluad inducía notablemente la producción de **IL-4** por esplenocitos murinos, mientras que todos los demás grupos experimentales mostraban casi los mismos bajos niveles de IL-4. La **IL-5** específica de antígeno vacunal era detectable a niveles muy elevados tras la vacunación de ratones con Fluad y a niveles moderados tras la inyección de Agrippal S1 en solitario o en combinación con KLK. La coinyección de Agrippal S1 con pR, Alumbre o IFA aumentaba sólo ligeramente los niveles de IL-5, mientras que todos los demás grupos mostraron una reducción en la producción de IL-5.

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna para prevenir infecciones con virus de influenza que comprende
   - un antígeno de influenza,
   - un péptido con la secuencia de aminoácidos $KLKL_5KLK$, y
   - una molécula de ácido oligodesoxinucleico inmunoestimulante que se selecciona de oligodesoxinucleótidos $d(IC)_{13}$, tcc atg aci ttc ctg atg ct y tcc atg aci ttc ctg atg ct sustituido con tiofosfato.

2. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** contiene además un adyuvante de $Al(OH)_3$.

3. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada porque** dicho antígeno es un antígeno de hemaglutinina o neuraminidasa.

4. Uso de una combinación de un antígeno de influenza, un péptido con la secuencia de aminoácidos $KLKL_5KLK$ y una molécula de ácido oligodesoxinucleico inmunoestimulante que se selecciona de oligodesoxinucleótidos $d(IC)_{13}$, tcc atg aci ttc ctg atg ct y tcc atg aci ttc ctg atg ct sustituido con tiofosfato, para la fabricación de una vacuna contra virus de influenza con una eficacia protectora mejorada frente a una infección con virus de influenza.

5. Uso de una combinación de un antígeno de influenza, un péptido con la secuencia de aminoácidos $KLKL_5KLK$ y una molécula de ácido oligodesoxinucleico inmunoestimulante que se selecciona de oligodesoxinucleótidos $d(IC)_{13}$, tcc atg aci ttc ctg atg ct y tcc atg aci ttc ctg atg ct sustituido con tiofosfato, para la fabricación de una vacuna contra virus de influenza con una respuesta de tipo 1 específica de antígeno mejorada, especialmente una respuesta de anticuerpos IgG2 o una respuesta de IFN-gamma, contra infecciones con virus de influenza, y que al mismo tiempo conserve o preferentemente también aumente la respuesta de tipo 2, especialmente la respuesta de anticuerpos IgG1 o la respuesta de interleucina 4 (IL-4), de dicha vacuna.

6. Uso de la reivindicación 4 ó 5, **caracterizado porque** la vacuna comprende un antígeno de hemaglutinina o un antígeno de neuraminidasa.

Fig. 1

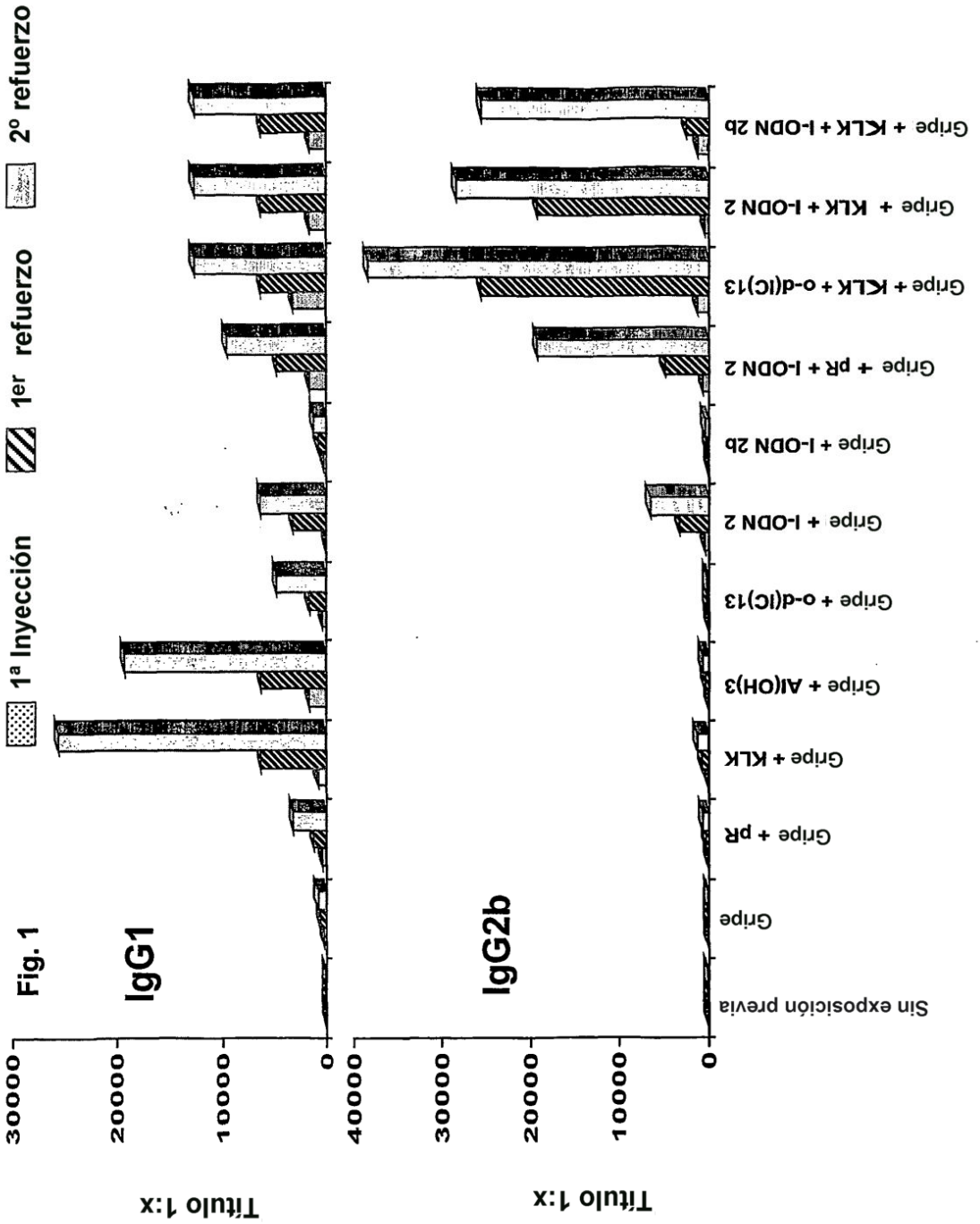

1ª Inyección
1er refuerzo
2º refuerzo
IgG1
IgG2b
Título 1:x
30000
20000
10000
0
40000
30000
20000
10000
0
Sin exposición previa
Gripe
Gripe + pR
Gripe + KLK
Gripe + Al(OH)3
Gripe + o-d(IC)13
Gripe + I-ODN 2
Gripe + I-ODN 2b
Gripe + pR + I-ODN 2
Gripe + KLK + o-d(IC)13
Gripe + KLK + I-ODN 2
Gripe + KLK + I-ODN 2b

Fig. 2

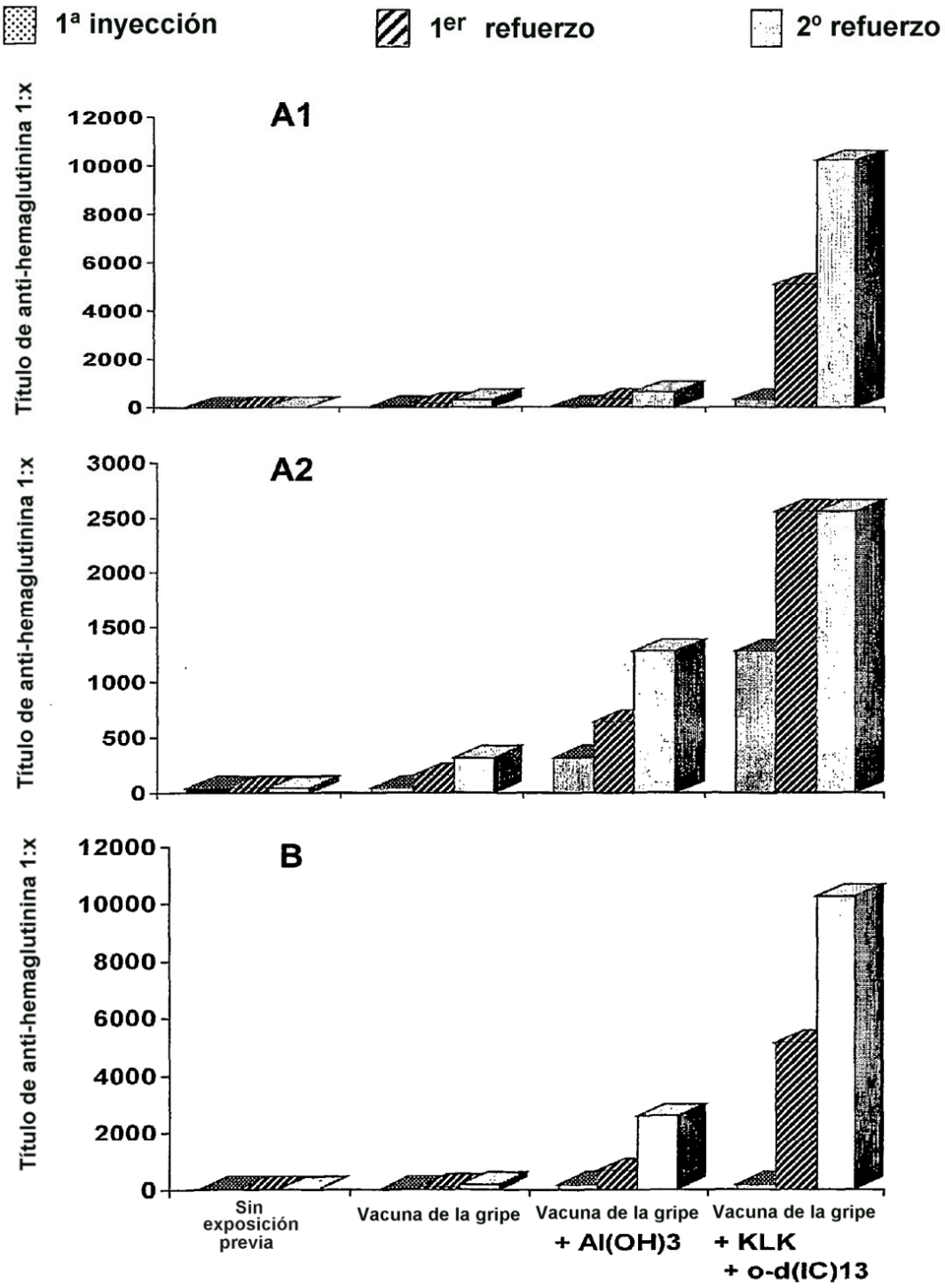
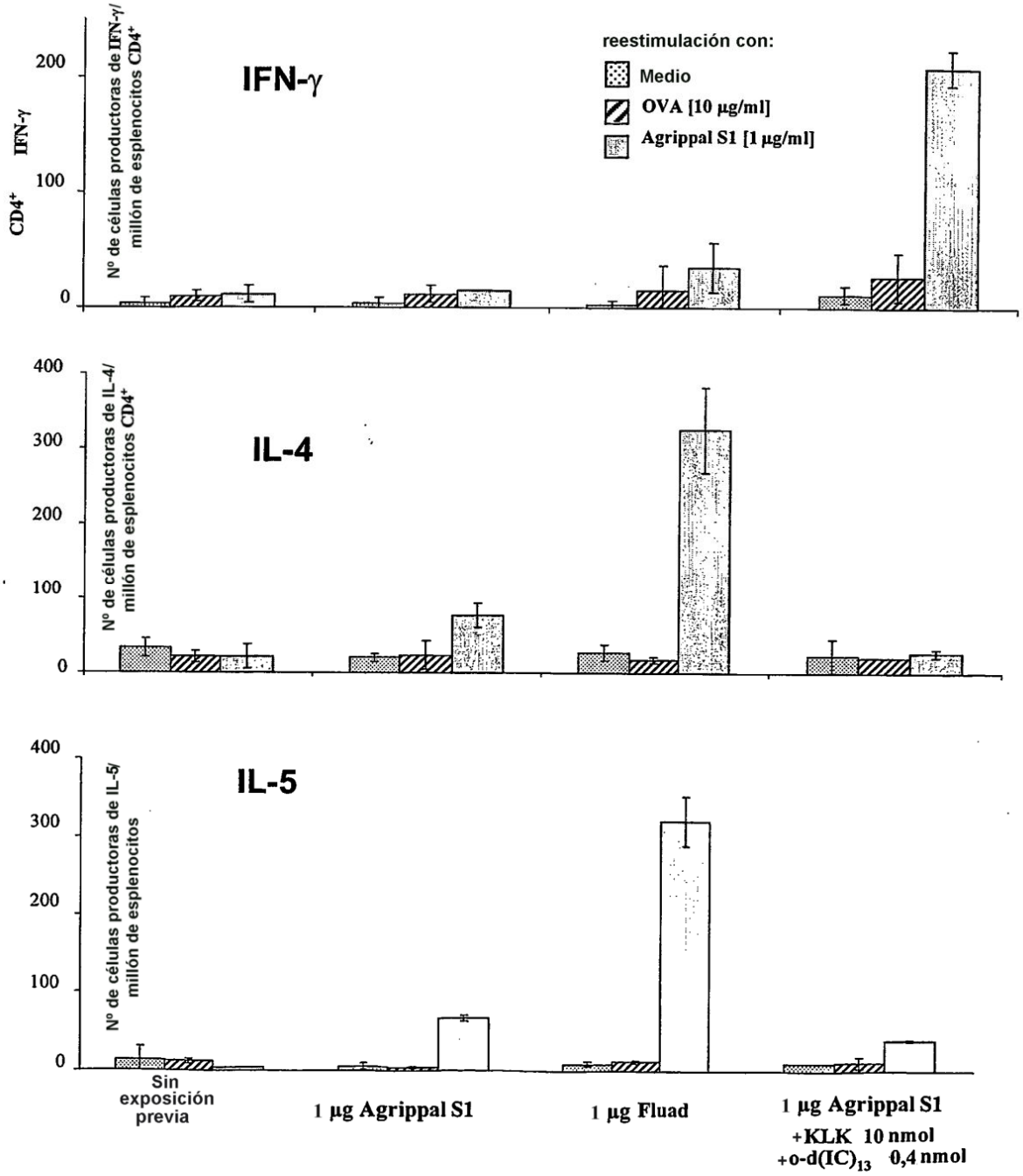
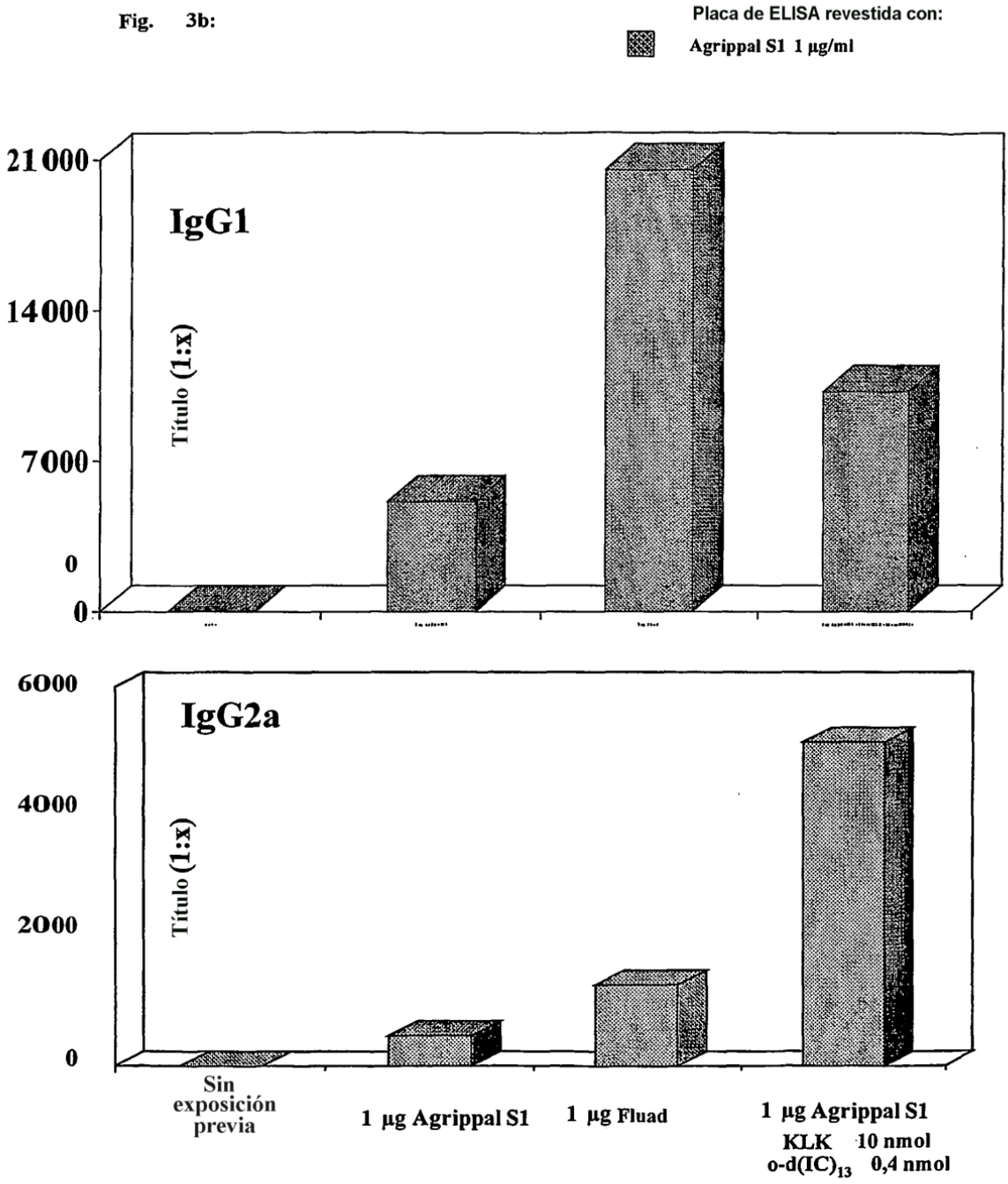

1ª inyección
1er refuerzo
2º refuerzo
A1
A2
B
Título de anti-hemaglutinina 1:x
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
3000
2500
2000
1500
1000
500
Sin exposición previa
Vacuna de la gripe
Vacuna de la gripe + Al(OH)3
Vacuna de la gripe + KLK + o-d(IC)13

Fig. 3a:



ratones **BALB/c** inmunizados con

Fig. 3b:



ratones BALB/c inmunizados con

Fig. 4:

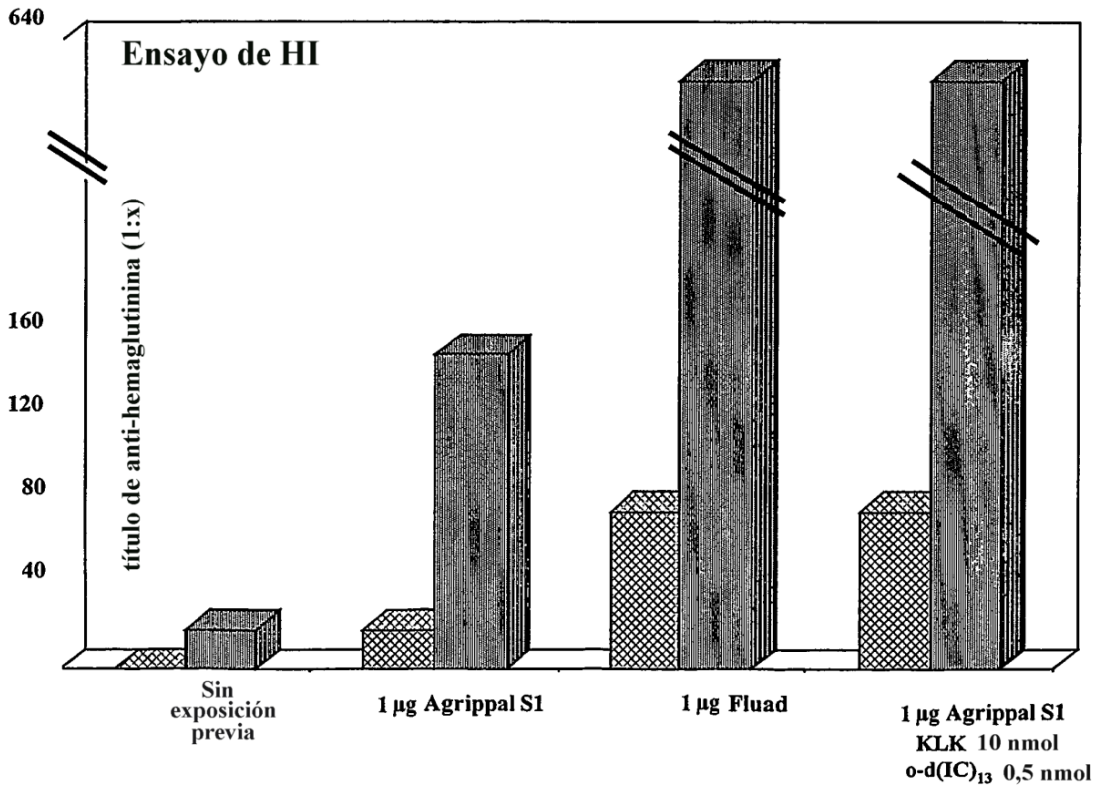

sueros de ratón ensayados contra hemaglutinina derivada de la cepa:
A/New Caledonia/20/99 (H1/N1)
A/Panama/2007/99 (H3/N2)
Ensayo de HI
título de anti-hemaglutinina (1:x)
640
160
120
80
40
Sin exposición previa
1 µg Agrippal S1
1 µg Fluad
1 µg Agrippal S1 KLK 10 nmol o-d(IC)13 0,5 nmol
ratones BALB/c inmunizados con

Fig. 5a:

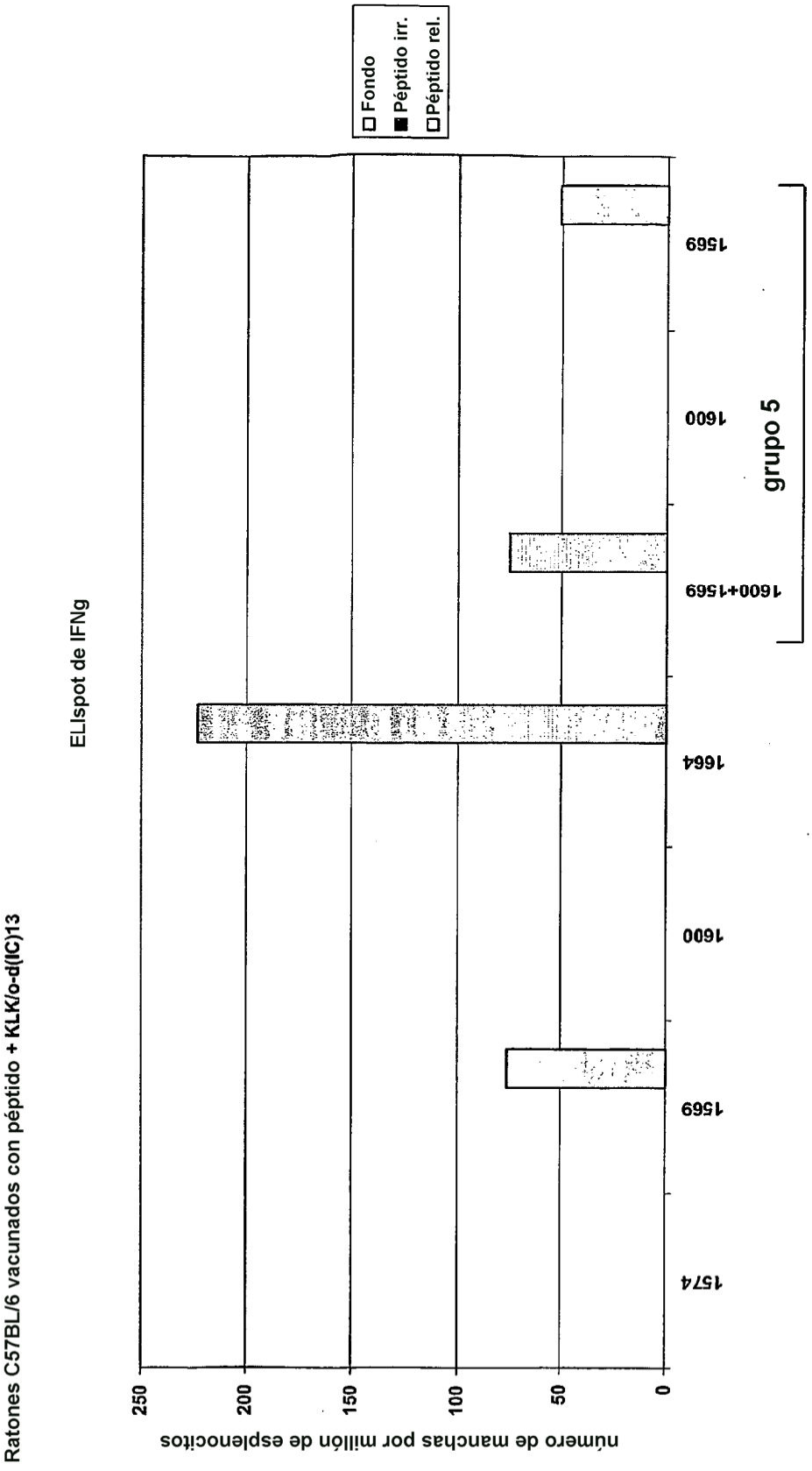

Ratones C57BL/6 vacunados con péptido + KLK/o-d(IC)13
ELIspot de IFNg
número de manchas por millón de esplenocitos
250
200
150
100
50
0
Fondo
Péptido irr.
Péptido rel.
1574
1569
1600
1664
1600+1569
1600
1569
grupo 5

Fig. 5b:

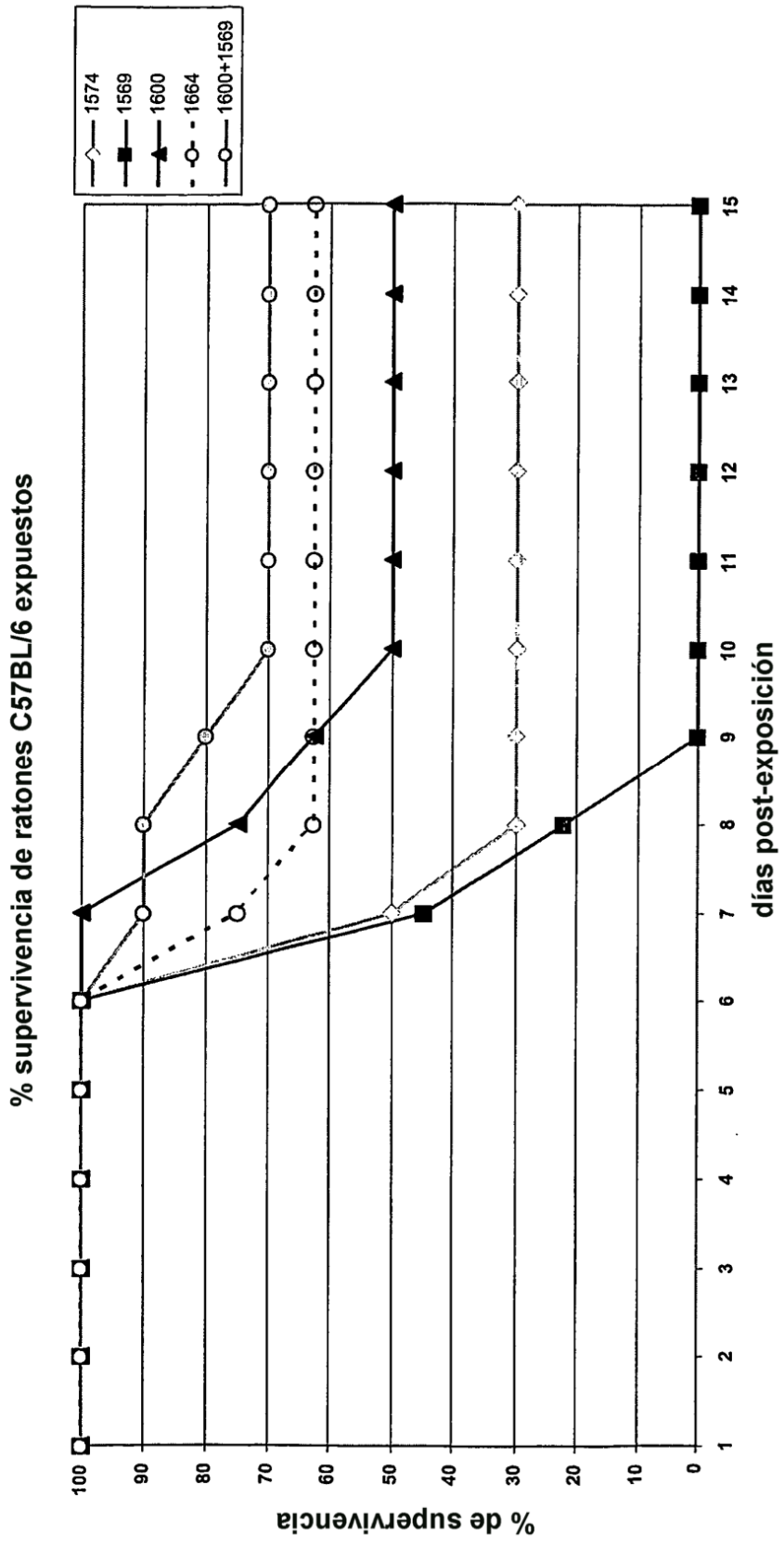

% supervivencia de ratones C57BL/6 expuestos
1574
1569
1600
1664
1600+1569
% de supervivencia
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
días post-exposición
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

Fig. 6:

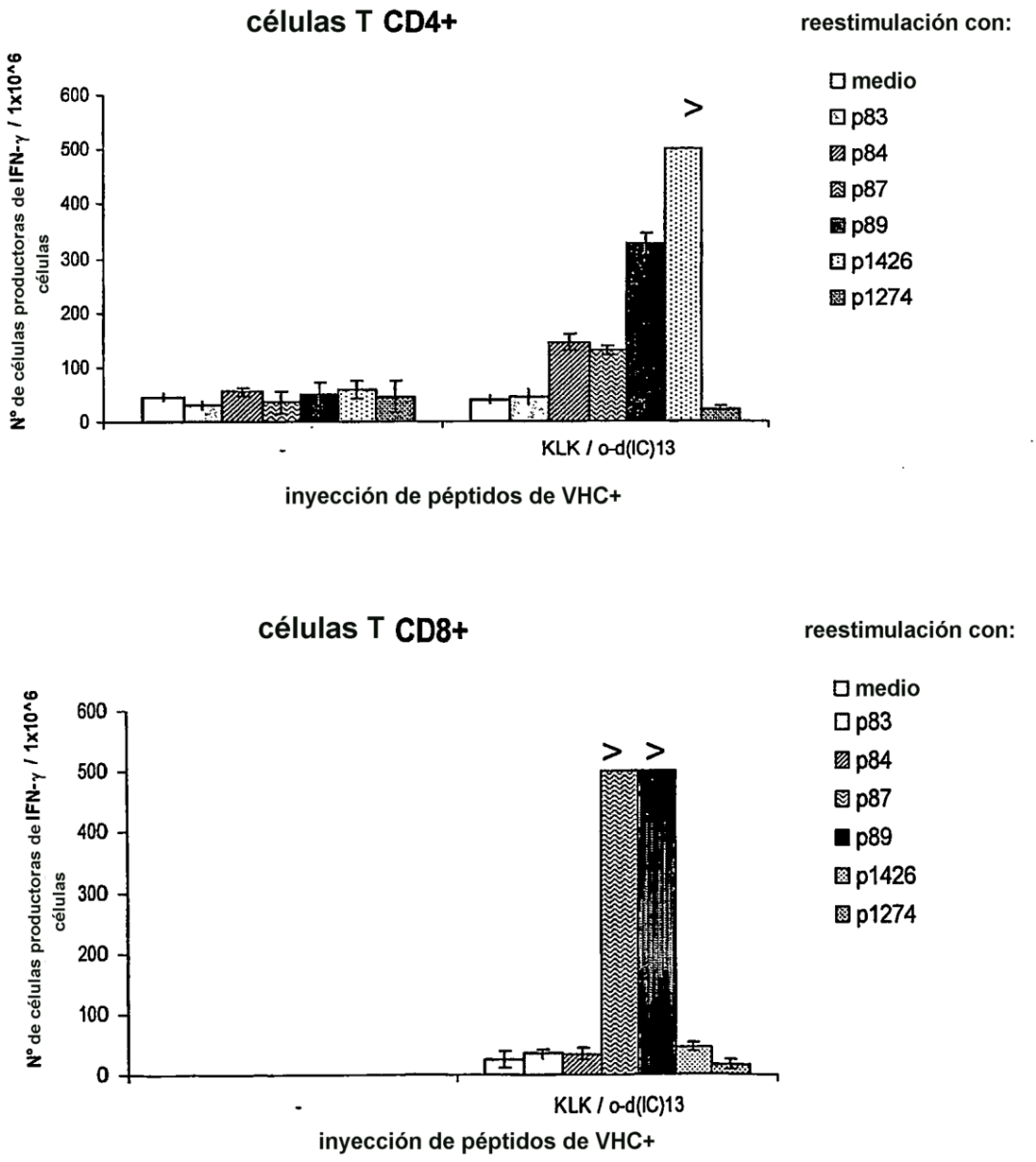

células T CD4+
reestimulación con:
medio
p83
p84
p87
p89
p1426
p1274
Nº de células productoras de IFN-γ / 1x10^6 células
600
500
400
300
200
100
0
-
KLK / o-d(IC)13
inyección de péptidos de VHC+
células T CD8+
reestimulación con:
medio
p83
p84
p87
p89
p1426
p1274
Nº de células productoras de IFN-γ / 1x10^6 células
600
500
400
300
200
100
0
-
KLK / o-d(IC)13
inyección de péptidos de VHC+

Fig. 7

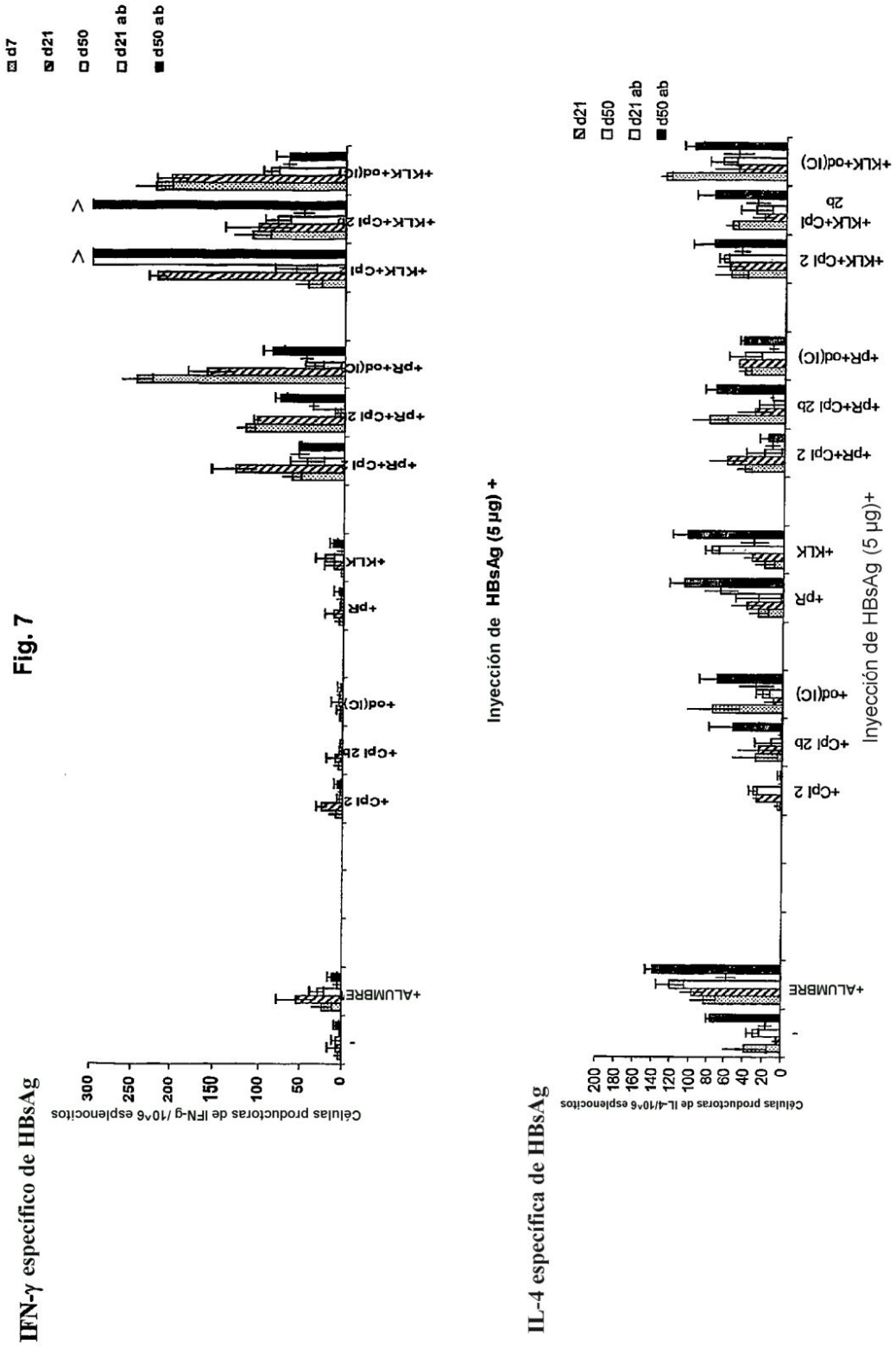
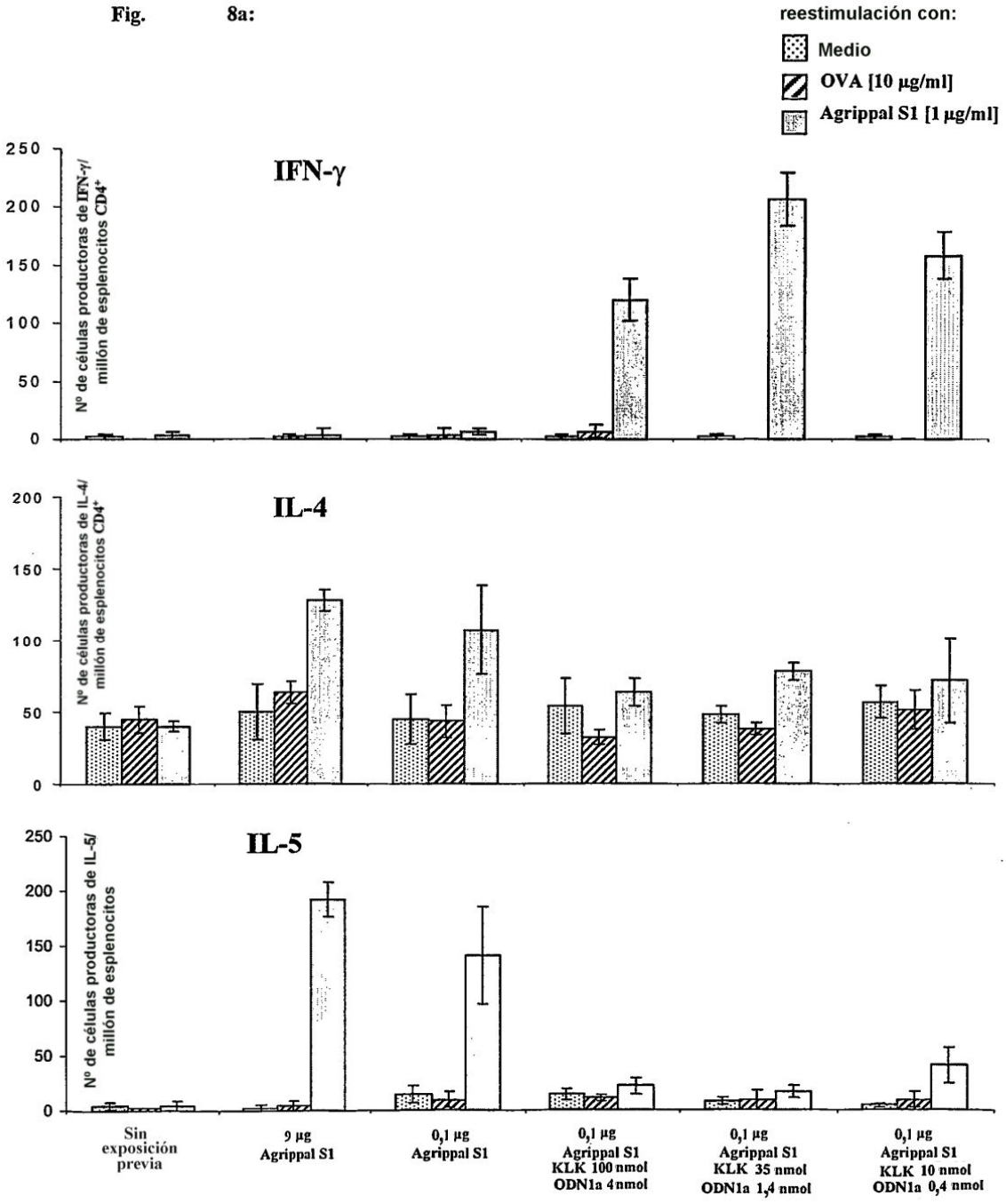
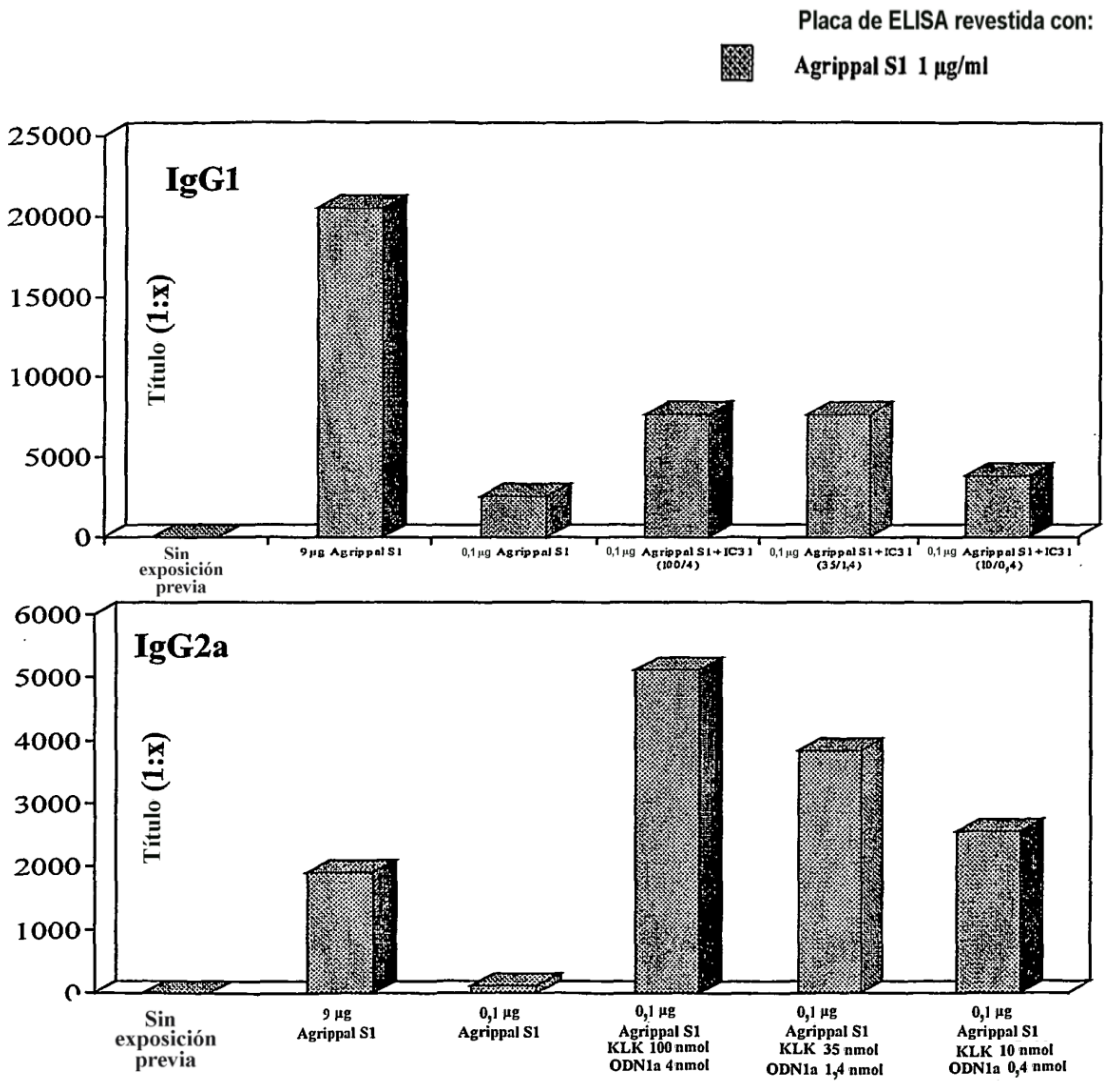

IFN-γ específico de HBsAg
d7
d21
d50
d21 ab
d50 ab
Células productoras de IFN-g /10^6 esplenocitos
300
250
200
150
100
50
0
-
+ALUMBRE
+KLK
+pR
+pR+Cpl 2
+pR+Cpl 2b
+pR+od(IC)
+KLK+Cpl 2
+KLK+Cpl 2b
+KLK+od(IC)
+Cpl 2
+Cpl 2b
+od(IC)
Inyección de HBsAg (5 µg) +
IL-4 específica de HBsAg
d21
d50
d21 ab
d50 ab
Células productoras de IL-4/10^6 esplenocitos
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-
+ALUMBRE
+KLK
+pR
+pR+Cpl 2
+pR+Cpl 2b
+pR+od(IC)
+KLK+Cpl 2
+KLK+Cpl 2b
+KLK+od(IC)
+Cpl 2
+Cpl 2b
+od(IC)
Inyección de HBsAg (5 µg)+

Fig. 8a:



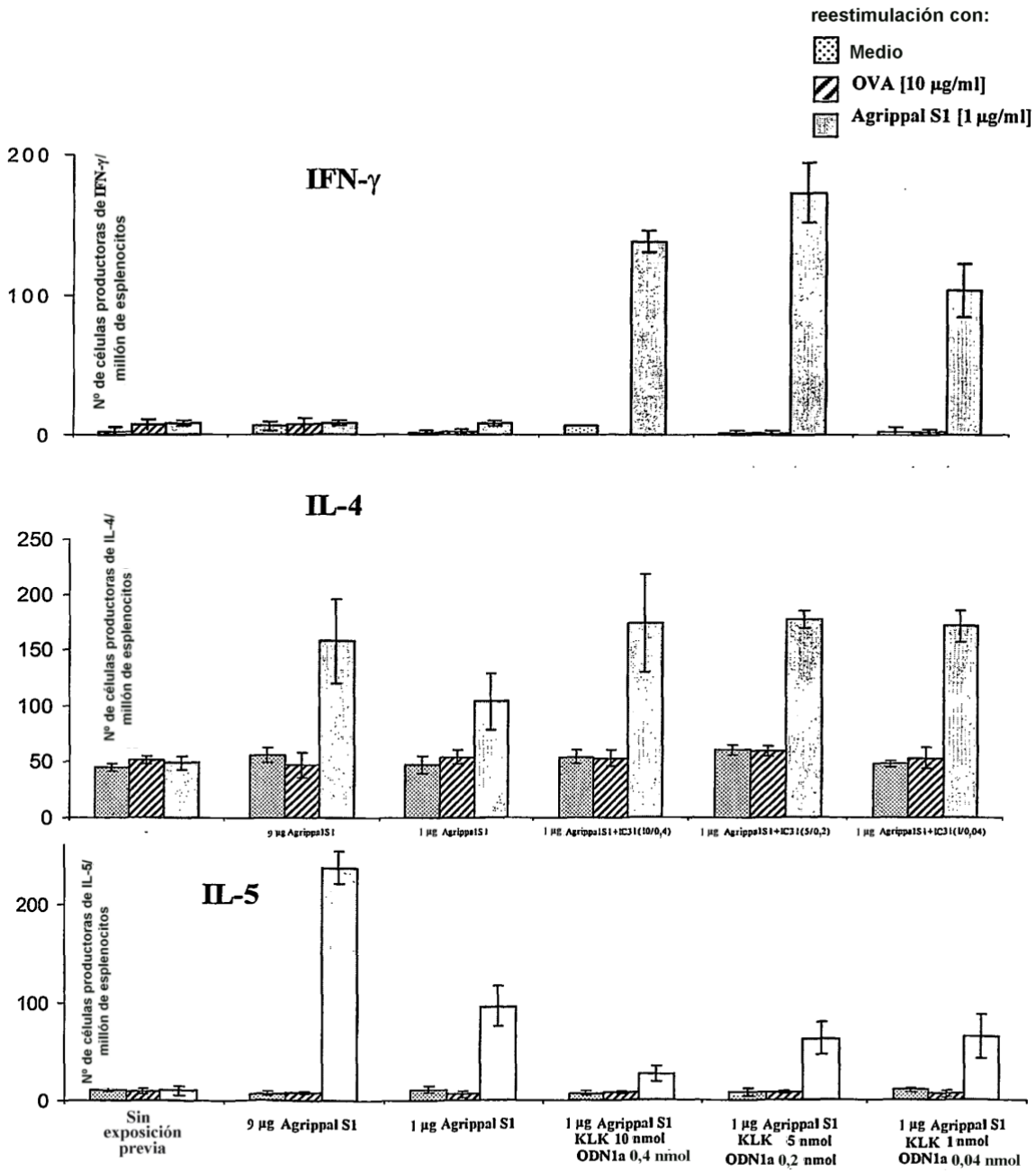
ratones **BALB/c** inmunizados con

Fig. 8b:



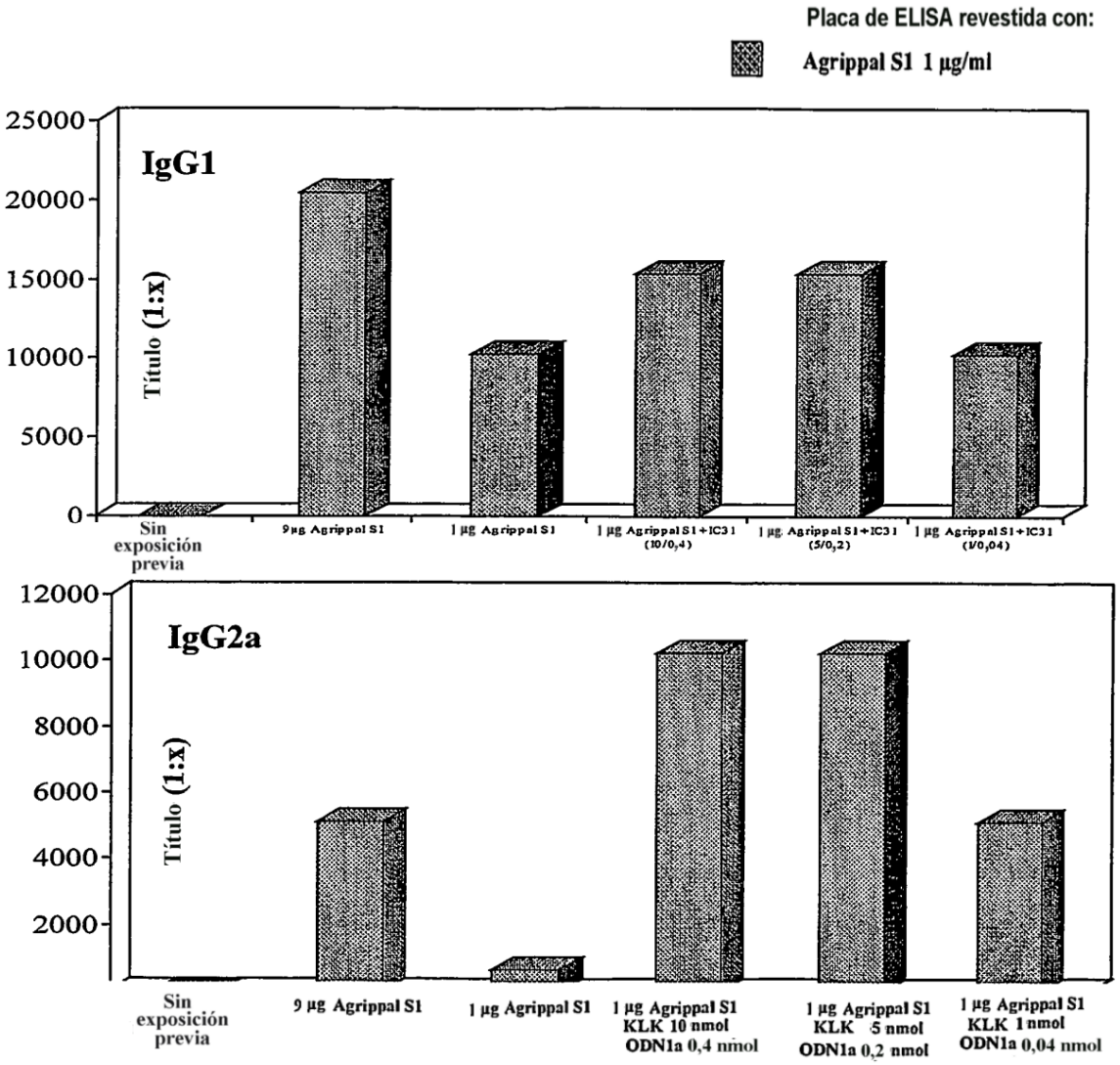
ratones BALB/c inmunizados (i.m.) con

Fig. 9a:



ratones **BALB/c** inmunizados con

Fig. 9b:



ratones **BALB/c** inmunizados con

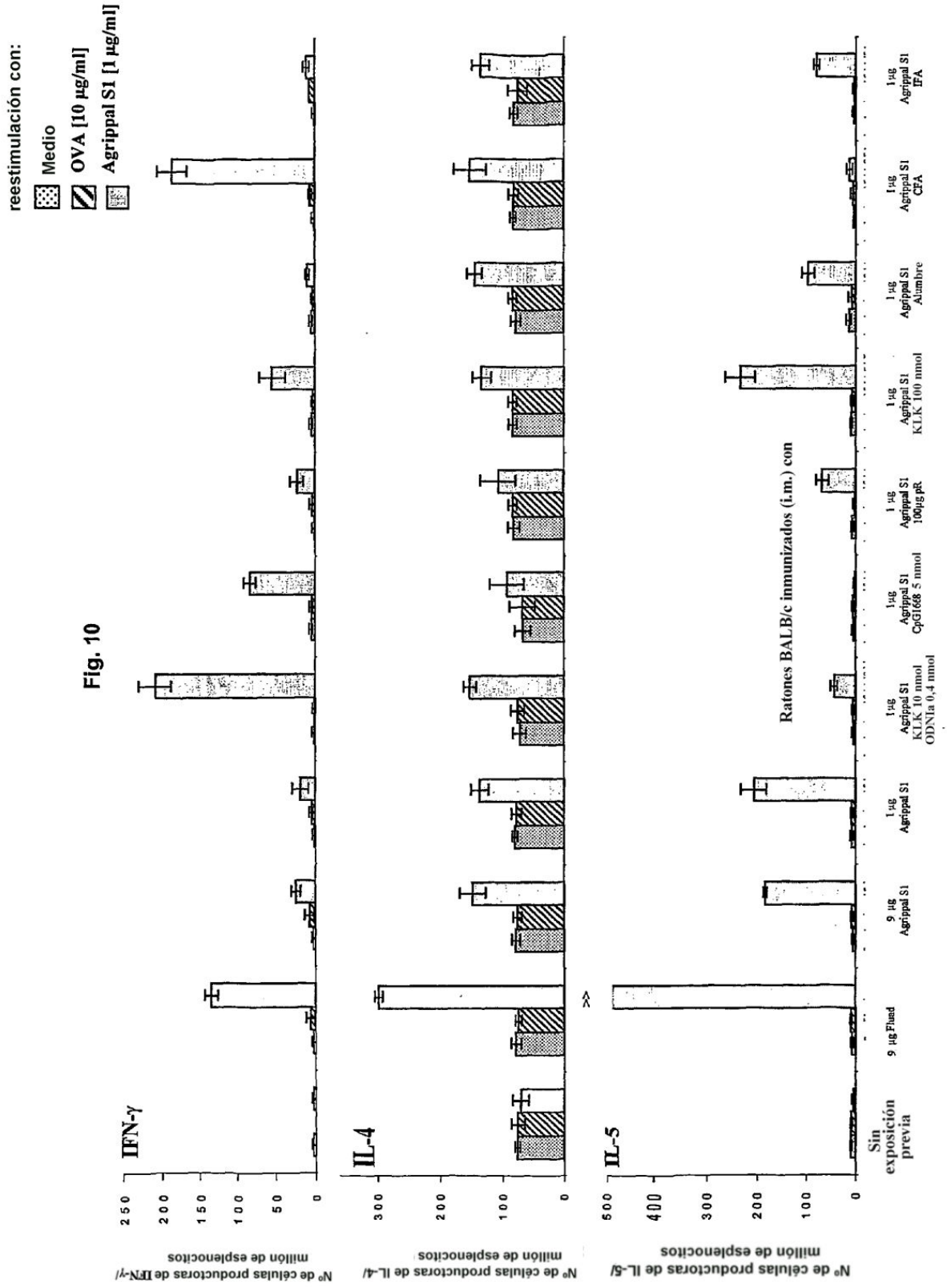

reestimulación con:
Medio
OVA [10 µg/ml]
Agrippal S1 [1 µg/ml]
IFN-γ
IL-4
IL-5
Nº de células productoras de IFN-γ/ millón de esplenocitos
Nº de células productoras de IL-4/ millón de esplenocitos
Nº de células productoras de IL-5/ millón de esplenocitos
Ratones BALB/c inmunizados (i.m.) con
Sin exposición previa
9 µg Fluad
9 µg Agrippal S1
1 µg Agrippal S1
1 µg Agrippal S1 KLK 10 nmol ODNIa 0,4 nmol
1 µg Agrippal S1 CpGI668 5 nmol
1 µg Agrippal S1 100µg pR
1 µg Agrippal S1 KLK 100 nmol
1 µg Agrippal S1 Alumbre
1 µg Agrippal S1 CFA
1 µg Agrippal S1 IFA

Fig. 10