



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 943**

51 Int. Cl.:
A61K 39/21 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06820300 .9**
96 Fecha de presentación : **17.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1948231**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

54 Título: **Composición que comprende un vector sintético coloidal bioresorbible y un vector vial.**

30 Prioridad: **14.11.2005 FR 05 53445**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2011

73 Titular/es: **Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS)
3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR**

72 Inventor/es: **Ataman-Onal, Yasemin;
Delair, Thierry y
Verrier, Bernard**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 355 943 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

La presente invención se refiere al campo de la vacunación profiláctica y terapéutica. En particular, la presente invención tiene por objeto una composición vacunal que comprende un vector viral que permite expresar antígenos proteicos y un vector sintético que expresa antígenos proteicos.

Históricamente, los antígenos utilizados en las vacunas son bien microorganismos vivos cuyo poder patógeno se ha atenuado, o bien microorganismos muertos. Sin embargo, estas vacunas provocan a menudo efectos secundarios no deseables durante la administración y en raros casos complicaciones muy graves. De este modo, desde hace muchos años, para garantizar la seguridad vacunal, se privilegia el uso de fracciones purificadas de los microorganismos en las vacunas. Tal inmunógeno, administrado solo, puede no inducir respuesta inmunosuficiente. Según la técnica anterior, se han desarrollado numerosas estrategias vacunales para aumentar u orientar la respuesta inmunitaria inducida por los inmunógenos purificados presentes en una vacuna.

La estrategia más directa consiste en asociar la sustancia proteica (inmunógeno) a un adyuvante. Aunque numerosos tipos de adyuvantes estén en desarrollo, los hidróxidos de aluminio (alumbre) eran hasta hace poco el único adyuvante autorizado para una administración al hombre. Ahora bien, el alumbre es un adyuvante débil para la inducción de las respuestas humorales, no es apropiado para todos los antígenos y no permite obtener respuestas celulares. Entre los adyuvantes en desarrollo, los sistemas más eficaces para inducir una fuerte inmunidad son los vectores sintéticos a base de micropartículas y en particular las micropartículas de poli(láctido co glicolido) (PLGA) y poli(ácido láctico) (PLA). Debido a su dimensión, estas partículas permiten identificar células presentadoras de antígeno como los macrófagos o las células dendríticas y mejoran la toma a cargo del inmunógeno por el sistema inmunitario. La sustancia proteica se puede bien encapsular en micropartículas, bien adsorber en la superficie. Los dos enfoques permiten inducir a la vez respuestas inmunocelulares y humorales, incluso si originariamente se utilizaban sobre todo para obtener una respuesta de anticuerpo. Sin embargo, la encapsulación presenta dos inconvenientes importantes. El primero es que es preciso una degradación parcial o total de la micropartícula para que la sustancia proteica se vuelva disponible para el sistema inmunitario, de este modo se retrasa la puesta en práctica de la inmunidad. El segundo es que la sustancia proteica se puede desnaturalizar o degradar durante la encapsulación y de este modo perder sus propiedades inmunogénicas. Por estas razones, este procedimiento no se puede usar con cualquier tipo de sustancia proteica, mientras que el procedimiento por adsorción no presenta estos inconvenientes. En ambos casos, el obstáculo principal para su uso es su falta de

eficacia para generar respuestas celulares específicas. Si con respecto al alumbre las respuestas celulares inducidas son mucho mejores, están muy por debajo de lo que se puede obtener con un vector viral.

5 Los vectores virales recombinantes permiten que se exprese in vivo (en el animal o en el hombre) la sustancia proteica de interés. Se trata de una estrategia eficaz que permite una fuerte movilización del sistema inmunitario. Pero la inducción de una respuesta inmune duradera en el tiempo necesita el uso de vectores vivos atenuados que pueden replicarse en el organismo vacunado. Ahora bien, por razones reglamentarias ligadas a la seguridad de uso de las vacunas, las nuevas generaciones de vacunas usan vectores virales no replicativos en el hombre, que conllevan una disminución de las respuestas inmunes específicas en el tiempo. De este modo, en el caso de vacunas profilácticas, es a menudo todavía necesario reestimar la inmunidad específica para guardar una respuesta de memoria eficaz. En el ámbito de la inmunoterapia, la reestimulación de la inmunidad específica sigue siendo útil para mantener la intensidad de las respuestas inmunes que permiten controlar el organismo patógeno. De este modo, la administración repetida de vectores virales parece necesaria pero va acompañada de un problema importante que es el de la inmunidad antivector. En efecto, el vector viral es él mismo un inmunógeno y puesto que se administra varias veces, aparece y a continuación aumenta la inmunidad específica del vector. Esta respuesta inmune que apunta a eliminar el vector viral impide también la expresión del gen que vehicula conllevando de este modo una disminución de la eficacia de las respuestas inmunes contra la sustancia proteica de interés. Además, la inmunidad antivector impide el uso del vector en cuestión para vacunar contra otra enfermedad. Schagen y col. Describen algunos enfoques que permiten paliar esta inmunidad antivector tales como modificaciones al nivel del vector o también adaptaciones al nivel de los pacientes vacunados (2004, *Critical Review in Oncology/Hematology* 50 :51-70). Sin embargo, la aplicación de estos enfoques virales es difícil y no se puede realizar para todas las enfermedades o todos los pacientes. Por lo tanto no se optimiza la estrategia que usa vectores virales.

Otra vía de mejora de la respuesta inmunoinducida por vacunación es la estrategia iniciador y refuerzo. Consiste en aumentar las respuestas inmunes específicas administrando secuencialmente dos vacunas diferentes que vehiculan una misma sustancia proteica en lugar de administrar la misma vacuna varias veces. Por ejemplo, es posible usar un vector viral diferente a cada inyección (Negri DR, y col. 2004, *Journal of General Virology*, 85: 1191-1201). Sin embargo, esta estrategia tiene pocas posibilidades de éxito ya que el número de vectores virales cuyo empleo está autorizado en el hombre es muy limitado. Además, la administración repetida de estos vectores virales se encuentra de nuevo con el problema de la inmunidad

antivector. Con el fin de solucionar este problema, Otten y col. describen el uso de un ADN iniciador seguido de un refuerzo de micropartículas de PLGA en cuya superficie son adsorbidos antígenos proteicos (2003, Journal of Virology, 77 : 6087-6092) Sharpe y col. propusieron un ADN iniciador encapsulando el ADN en micropartículas basándose en PLGA y un refuerzo por un vector viral MVA (2003, Virology, 313: 13-21). O'hagan y col. Describen el uso de un iniciador por ADN adsorbido sobre micropartículas de PLGA, seguido de un refuerzo por un vector de vacuna (2001, Journal of Virology, 75: 9037-9043). La solicitud de patente WO 98/56919A describe un ADN iniciador, seguido de un refuerzo por un poxvirus. El inconveniente del uso de un ADN iniciador es su baja eficacia especialmente en los primates y también cuando se trata de gen poco inmunógeno como por ejemplo el gen *tat* del VIH-1. La solicitud de patente WO 98/569119A describe también el uso de un iniciador por VLP ("virus-like particles"), seguido de un refuerzo por un poxvirus. Las VLP son partículas virales defectuosas que no incorporan el genoma viral y que no pueden replicarse. Están a menudo formadas por autoensamblado de las proteínas estructurales de un virus o de un retrotransposón (elemento endógeno similar a un retrovirus) tales como el precursor Pr55 gag del VIH-1 o las proteínas L1 o L2 del HPV-16 (papilomavirus humano). En función de las proteínas virales expresadas, la estructura de la VLP se puede acercar más o menos a la de virión nativo, de manera que las VLP se pueden comparar con un virus. El inconveniente de estas VLP es que proceden de la biotecnología y que su fabricación según las normas reglamentarias es muy difícil.

Los solicitantes han puesto ahora de manifiesto inesperadamente que la asociación particular de un vector sintético coloidal bioresorbible que comprende antígenos proteicos y de un vector viral que comprende las secuencias nucleotídicas que codifican los antígenos proteicos correspondientes, permite aumentar la eficacia de la vacunación ligada al uso de un antígeno proteico, a la vez que reduce la inmunidad antivector.

De este modo un primer objeto de la invención consiste en una composición farmacéutica que comprende o consiste en:

- un vector sintético coloidal constituido por micropartículas bioresorbibles no tóxicas que comprende un antígeno proteico o varios antígenos proteicos, y
- un vector viral que comprende al menos una secuencia nucleotídica que codifica uno o más antígenos proteicos comprendidos en el vector sintético
- eventualmente en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro objeto de la invención consiste en el uso de dicha composición para la preparación de un medicamento, preferiblemente una vacuna. Se puede usar también para el diagnóstico *in vitro* de estados patológicos relativos a las sustancias proteicas de la composición de la invención.

La presente invención propone por lo tanto una nueva composición que comprende un vector sintético coloidal constituido por micropartículas bioresorbibles que presenta al menos un antígeno proteico.

5 Se entiende por compuesto bioresorbible un compuesto que no es tóxico, es decir, cuya administración en el organismo no provoca modificación fisiológica o metabólica letal, invalidante o molesta en la vida diaria, y que se puede eliminar por las vías naturales del organismo después de su administración.

10 Los términos coloides y coloidal(es) definen cualquier dispersión de una sustancia (fase dispersada) en el seno de una fase continua acuosa de la cual al menos una de las tres dimensiones es inferior o igual a 10 μm y preferiblemente inferior o igual a 1 μm

Una fase continua acuosa es una fase cuya composición es mayoritariamente agua, como por ejemplo, un tampón o una mezcla agua/disolvente orgánico miscible en agua. Evidentemente, una fase continua acuosa apropiada para los fines de la invención es una fase no tóxica.

15 La fase dispersada puede ser un líquido insoluble en la fase continua como por ejemplo, un aceite o una mezcla de aceites, o bien materias grasas orgánicas, o también ser un sólido de naturaleza polimérica o mineral. La fase dispersada es siempre bioresorbible.

20 Ejemplos de fase dispersada comprenden aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de cacahuete, aceite de colza o sus mezclas; triglicéridos: polímeros sintéticos tales como polímeros de hidroxiácido como por ejemplo, ácido láctico, ácido glicólico, el adyuvante hidroxibutírico, o los compuestos procedentes de la caprolactona; polipéptidos como los compuestos procedentes de la polimerización de la caprolactama; polímeros naturales tales como, a título de ejemplo, los polisacáridos como el ácido hialurónico, quitosano, dextrano.

25 Ejemplos de tales coloides bioresorbibles se ofrecen en Benita S. Levy M.Y. 1993, Journal of Pharmaceutical Sciences, 82(11) : 1069-1079 (emulsiones líquido/líquido), Trotta., y col, 2003, International Journal of Pharmaceutics, 257 : 153-160 (emulsiones lípido sólido/líquido) y Jiang W y col., 2005, Biodegradable poly(lactic-co-glycolic) acid microparticles for injectable delivery of vaccine antigens Advanced Drug Delivery Reviews, 57 : 391-410.

30 La forma del vector sintético coloidal es dada por la fase dispersada que puede ser esférica o no, homogénea o constituida por un apilamiento de láminas.

35 Preferiblemente, el vector sintético de la invención es de naturaleza esférica. Más preferiblemente, el vector está compuesto por microesferas. Los términos microesfera y micropartícula se emplean indistintamente a continuación en la descripción. Por micropartícula o microesfera se entienden partículas de dimensión a lo sumo micrónica para permitirles entrar en las células presentadoras de antígenos. Por dimensión a lo sumo micrónica, se entiende

una dimensión inferior o igual a 999 μm . Preferiblemente, las micropartículas tienen un diámetro de partícula inferior o igual a 3 μm . Ventajosamente preferido, las partículas de la invención son de dimensión submicrónica, con preferiblemente, un diámetro comprendido entre 150 y 900 nm, más preferiblemente entre 250 y 700 nm. La dimensión de las partículas se determina fácilmente mediante técnicas conocidas por el experto en la técnica, tales como, por ejemplo, utilizando la microscopia de barrido electrónico, la difusión casi-elástica de la luz, la microscopia electrónica de transmisión.

Según una realización de la invención, los vectores sintéticos coloidales son vectores a base de polímero.

A título de ejemplo de vectores sintéticos a base de polímero, se pueden mencionar vectores que comprenden micropartículas a base de polímeros tales como poli(ácidos α -hidroxilados), poli(ácidos hidroxibutíricos), policaprolactonas, poliortoésteres y polianhídridas. Preferiblemente, el vector sintético comprende al menos un polímero bioresorbible elegido entre un poli(ácido α -hidroxilado) tal como el poli(ácido D-láctico) poli(ácido L-láctico) (denominado PLA), poli(ácido glicólico) (denominado PLG), o bien una mezcla de poli(ácidos α -hidroxilados) tales como una mezcla de poli(ácidos D- y L-láctico), una mezcla de poli(ácido L-láctico) y de poli(ácido glicólico), una mezcla de poli(ácido D-láctico) y de poli(ácido glicólico), o una mezcla de poli(ácidos D- y L-lácticos) y de poli(ácido glicólico). Cuando el polímero es una mezcla de poli(ácidos α -hidroxilados), la proporción de cada constituyente se puede determinar fácilmente por el experto en la técnica. De este modo, por ejemplo, se puede utilizar una mezcla racémica de poli(ácido D- y L-lácticos) o una mezcla PLA(PLG a diversos porcentajes conocidos por el experto en la técnica. Preferiblemente, el vector sintético coloidal según la invención se prepara a partir de al menos un polímero elegido entre los poli(ácidos α -hidroxilados). Más preferiblemente, las partículas de la invención están desprovistas de agente estabilizante y de agente tensioactivo de manera que no son tóxicas. Por micropartícula tóxica se entiende una micropartícula que comprende al menos un compuesto susceptible de provocar trastornos biológicos, tales como perturbaciones del metabolismo, en el organismo que ha recibido la micropartícula. Tales partículas no tóxicas se pueden preparar según el protocolo descrito en la solicitud de patente WO2005/027871.

Según otra realización, el vector sintético coloidal se prepara a partir de al menos un polímero natural tal como los mencionados anteriormente.

La composición de la invención es útil para estimular tanto una respuesta de mediación celular como una respuesta humoral. Es útil tanto en el campo profiláctico y terapéutico como en el campo diagnóstico.

De este modo, las sustancias proteicas apropiadas a los fines de la invención aportadas por el vector sintético pueden ser todas sustancias proteicas contra las cuales se busca activar una respuesta inmunitaria.

5 Por respuesta inmunitaria, se entiende una respuesta de mediación celular, una respuesta humoral o ambas.

Por respuesta de mediación celular, se entiende una respuesta mediada por los linfocitos T y/o otros leucocitos. Esta respuesta se traduce por la inducción de una actividad lítica por los linfocitos T citotóxicas y/o por la producción de citoquinas por los linfocitos T CD8+ o por las células T auxiliares (auxiliares).

10 Por respuesta humoral, se entiende una respuesta mediada por moléculas anticuerpos secretadas por los linfocitos B.

Por sustancia proteica, se entiende cualquier sustancia proteica que tiene una función de antígeno después de la adición a los vectores apropiados para los fines de la invención tales como péptidos, proteínas, fragmentos de proteína, poliproteínas, glicoproteínas y glicoproteínas, entendiéndose que los fragmentos de proteína han conservado la estructura de interés.

Los antígenos son moléculas susceptibles de ser reconocidos por un anticuerpo del cual han inducido la síntesis por una respuesta inmunitaria y que contiene al menos un epítipo.

20 Ejemplos de fragmentos de proteína comprenden por ejemplo péptidos, polipéptidos y epítipes.

Los epítipes son péptidos que comprenden entre 3 y 15 y generalmente entre 5 y 15 aminoácidos, que consisten en el fragmento peptídico mínimo contra el cual se activa una respuesta inmunitaria.

25 El vector sintético presenta las sustancias proteicas en múltiples copias. Por al menos una sustancia proteica, se entiende al menos varias sustancias proteicas de igual tipo. Por tipo de sustancia proteica, se entiende un conjunto de sustancias proteicas que activan la misma respuesta inmunitaria por producción de los mismos anticuerpos (es decir, que tiene la misma inmunidad).

El vector sintético puede por lo tanto comprender:

30 - bien sustancias proteicas de igual tipo y por lo tanto que constituyen antígenos asociados a la misma enfermedad. De este modo, por ejemplo, el vector sintético puede comprender como sustancia proteica la proteína p24 en forma de proteína nativa y/o de proteína mutada y/o de fragmento de proteína, entendiéndose que la proteína mutada y el fragmento han conservado su inmunidad;

- bien sustancias proteicas de tipos diferentes y que constituyen antígenos asociados a la misma enfermedad. De este modo, por ejemplo, el vector sintético puede comprender varias proteínas del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tales como la proteína Gag, la proteína Gag mutada que no tienen la misma inmunidad, la proteína Tat, la proteína Rev, la proteína Nef, la proteína Env;
- bien sustancias proteicas de tipos diferentes y que constituyen antígenos asociados enfermedades diferentes. De este modo, por ejemplo, el vector sintético puede comprender al menos un tipo de proteína del VIH, tales como las proteínas p24, Tat, Rev, y al menos un tipo de proteína del virus de la hepatitis C (VHC) tales como las proteínas NS2, NS3, NS4.

Según una realización de la invención, el vector sintético comprende sustancias proteicas de tipos diferentes y que constituyen antígenos asociados a la misma enfermedad.

Las sustancias proteicas pueden tener diversos orígenes tales como el origen viral, bacteriano o ser de patología de origen no infeccioso (como el cáncer o una enfermedad metabólica).

Según una realización particular de la invención, la sustancia proteica es un antígeno de origen viral.

Cuando la sustancia proteica es de origen viral, los virus usados son todos virus para los cuales se conocen sustancias capaces de una respuesta inmunitaria.

A título de ejemplo, se pueden mencionar, sin ninguna limitación, los herpes virus, los virus de las hepatitis tales como el virus de la hepatitis B (VHB) o el virus de la hepatitis C (VHC), los papilomavirus (HPV), los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tales como VIH-1 y VIH-2, diferentes cepas de los virus de la gripe humana y de la gripe aviar.

Las secuencias nucleicas de los virus apropiados a los fines de la invención, así como las proteínas codificadas por dichas secuencias son ampliamente conocidas por el experto en la técnica y están disponibles por ejemplo en bases de datos tales como GenBank.

De este modo, por ejemplo, el virus VIH tiene genes que codifican proteínas estructurales del virus. El gen *gag* codifica la proteína que forma el núcleo del virion, que incluye el antígeno p24. El gen *pol* codifica las enzimas responsables de la transcripción inversa (transcriptasa inversa), del clivado (proteasa) y de la integración (integrasa). El gen *env* codifica las glicoproteínas de envoltura. Contiene seis otros genes (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu* (VIH-1) o *vpx* (VIH-2)) que codifican proteínas implicadas en la regulación de la expresión de los genes del virus (proteínas de regulación). El genoma del VIH comprende igualmente LTR5' y 3' (Long Terminal Repeat) que comprenden elementos de regulación implicados en la expresión de los genes del virus.

Según una realización de la invención, la sustancia proteica utilizada en el procedimiento de la invención es una proteína del virus VIH. A título de ejemplo de antígeno del virus VIH, se pueden mencionar las proteínas de regulación o la proteína *gag* o la glicoproteína *Env*, siendo las proteínas de regulación preferidas la proteínas Tat, Rev o Nef.

5 Tratándose del VHC, el extremo 5' de su genoma corresponde a una región no traducida adyacente a los genes que codifican las proteínas estructurales, la proteína núcleo de la nucleocápsida, las dos glicoproteínas de envoltura E1 y E2, y una pequeña proteína denominada p7. La región no traducida 5' y el gen núcleo se conservan relativamente bien en los diferentes genotipos. Las proteínas de envoltura E1 y E2 son codificadas por regiones más variables de un aislado a otro. La proteína p7 es una proteína extremadamente hidrófoba que constituiría un canal iónico. El extremo 3' del genoma del VHC contiene los genes que codifican las proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4, NS5) y una región 3' no codificante que posee un dominio bien conservado (Major ME, Feinstone SM, Hepatology, junio 1997, 25 (6) : 1527-1538).

15 La proteína no estructural NS3 del VHC es una proteína de 630 aminoácidos que comprende dos dominios estructurales distintos: un dominio N-terminal, de 81 aminoácidos, dotado de una actividad proteásica de serina activa que interviene en la maduración de la proteína viral (dominio denominado NS3 proteasa), y un dominio C-terminal, de 549 aminoácidos, que comprende una actividad helicasa asociada a una actividad NTPásica que desempeña una función en la replicación del genoma viral (dominio denominado NS3 helicasa). Esta proteína NS3 se conserva relativamente bien entre los diferentes geotipos del virus, de manera que esta proteína constituye un antígeno "candidato vacuna" elegido.

Según otra realización de la invención, la sustancia proteica es un antígeno asociado a los tumores.

25 En efecto, algunos tumores expresan antígenos que son potencialmente reconocidos por los linfocitos T CD8+ incluso si no son el origen de una respuesta inmune intensa. Se trata de antígenos asociados a los tumores (AAT) o marcadores tumorales (Houghton AN, 1994, J Exp Med 180:1). Mejorando la presentación de los AAT al sistema inmunitario, es posible hacer que sean más inmunogénicos, de este modo los AAT pueden servir de base para el desarrollo de vacunas anticancerosas en forma de proteína recombinante o de péptido de síntesis.

30 Con el fin de ensayar las nuevas estrategias de inmunoterapia que apuntan a aumentar el reconocimiento de los AAT, Wang y col. Han desarrollado un modelo que expresa un modelo experimental en el ratón (1995, Journal of Immunology, 154:4685-4692). La línea tumoral CT26.WT, fondo genético BALB/c, ha sido transducida por el gen *lacZ* de *Escherichia coli* que codifica la enzima beta-galactosidasa con el fin de crear la línea CT26.CL25. Las dos líneas

son letales en el ratón y su cinética de crecimiento son similares. Administrada en el ratón, la línea CT26.CL25 está en el origen de formación de tumores que se pueden ralentizar incluso inhibir en presencia de una respuesta inmune contra la beta-galactosidasa que constituye un ATT modelo.

5 Las sustancias proteicas apropiadas a los fines de la invención se pueden obtener por las técnicas de la ingeniería genética que comprende las etapas de:

- cultivo de un microorganismo o de células eucarióticas transformado(as) con la ayuda de una secuencia nucleotídica que codifica la sustancia proteica de interés, y
 - recuperación de dicha sustancia proteica producida por dicho microorganismo de
- 10 dichas células eucarióticas.

Estas técnicas son bien conocidas por el experto en la técnica. Para más detalle a este respecto, se podrá referirse a la siguiente obra: Recombinant DNA Technology I, Editors Ales Prokop, Raskesh K Bajpai; Annals of the New-York Academy of Sciences, Volumen 646, 1991.

15 Las sustancias proteicas de interés, cuando son de pequeñas dimensiones, se pueden preparar también por las síntesis peptídicas clásicas bien conocidas por el experto en la técnica.

La sustancia proteicas se asocia a los vectores coloidales según las técnicas conocidas por el experto en la técnica, tales como la inclusión en o el enlace con la superficie. A título de ejemplo de inclusión de la sustancia proteica en el vector sintético coloidal, se puede

20 mencionar la encapsulación (Tamber H, y col, 2005, Adv Drug Deliv Rev, 57(3): 357-76). A título de enlace de la sustancia coloidal con el vector sintético coloidal, se pueden mencionar la adsorción, como se describe en la solicitud de patente WO2005/027871, o el injertado covalente que implica la formación de un enlace químico entre un grupo reactivo del vector coloidal y otro de la sustancia proteico de manera descrita por ejemplo en "Protein immobilization-Fundamentals and Applications R.F. Taylor Ed, Marcel Dekker Inc, Nueva York,

25 1991.

Según una realización particular, las sustancias proteicas se añaden a los vectores sintéticos por enlace y preferiblemente también por adsorción, como por ejemplo, mezclando las micropartículas con las sustancias proteicas e incubando con agitación, por ejemplo, a

30 temperatura ambiente o a 37°C.

La composición según la invención comprende igualmente un vector viral.

El vector viral comprende al menos una secuencia nucleotídica que codifica una sustancia proteica que corresponde a al menos una sustancia proteica del vector sintético.

35 Por sustancia proteica del vector viral que corresponde a una sustancia proteica del vector sintético, se entiende que la sustancia proteica del vector viral constituye un antígeno

asociado a la misma enfermedad que la sustancia proteica del vector sintético, sea ésta del mismo tipo o de tipo diferente como se ha indicado anteriormente. Cuando las sustancias proteicas son de tipo diferente, es preciso que tengan al menos un epítotope en común, como por ejemplo las proteínas Gag y p24.

5 De este modo el genoma del vector viral es modificado para insertar una o más secuencias nucleotídicas que codifican una o más sustancias proteicas que constituyen antígenos de la misma enfermedad o enfermedades diferentes. Entre estas sustancias proteicas, al menos una corresponde a una sustancia proteica del vector sintético, constituyendo estas sustancias proteicas antígenos asociados a la misma enfermedad.

10 Según una realización preferida, el vector viral comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína del VIH

Además de la o las secuencias nucleotídicas que codifican al menos una sustancia proteica que constituye un antígeno asociado a la misma enfermedad que la sustancia proteica del vector sintético, el vector viral comprende igualmente los medios necesarios para la expresión de dicha sustancia proteica.

15 Se entiende por medio necesario para la expresión de una sustancia proteica, cualquier medio que permite obtener la sustancia proteica, tal como especialmente un promotor, un terminado de transcripción, un origen de replicación y preferiblemente un marcador de selección.

20 Los medios necesarios para la expresión de una sustancia proteica están ligados de manera operativa a la secuencia de ácido nucleico que codifica dicha sustancia. Por "ligados de manera operativa", se entiende una yuxtaposición de dichos elementos necesarios para la expresión y del gen que codifica la sustancia proteica, los cuales constituyen una relación tal que esto les permite funcionar da manera esperada. Por ejemplo, pueden existir bases suplementarias entre el promotor y el gen de interés mientras se preserva su relación funcional.

25 Los medios necesarios para la expresión de la sustancia proteica pueden ser medios homólogos, es decir, incluidos en el genoma del vector utilizado, o bien ser heterólogos. En este último caso, dichos medios se clonan con la proteína de interés a expresar.

30 Ejemplos de promotores heterólogos comprenden (i) los promotores virales tales como el promotor SV40 (Virus simio 40), el promotor del gen de la timidina-quinasa del virus simplex del Herpes (TK-HSV-1), el LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), el promotor intermedio precoz del ciromegolovirus humano (CMV) y el promotor mayor tardío adenoviral (MLP), así como (ii), cualquier promotor celular que controla la transcripción de los genes que codifican proteínas en eucariotas superiores, tales como el promotor del gen de fosfoglicerato-quinasa (PGK) constitutivo (Adra y col., 1987, Gene, 60 : 65-74), el promotor de los genes específicos

de hígado alfa-antitripsina y FIX y el promotor SM22 específico de las células del músculo liso (Moessler y col., 1996, Development, 122 : 2415-2425).

5 Dichas secuencias contenidas en el vector viral se pueden ligar directamente entre sí bajo el control de un solo promotor y/o de un solo elemento regulador de la expresión, o bien pueden separarse estando cada una bajo la dependencia de promotores y/o reguladores de la expresión independientes, idénticos o diferentes.

A título de vector viral apropiados para los fines de la invención, se pueden mencionar por ejemplo los vectores virales de tipo adenovirus, poxvirus, baculovirus, herpesvirus, togavirus, retrovirus.

10 Los adenovirus se han detectado en numerosas especies animales. No se integran y son poco patógenos. Son capaces de infectar una variedad de tipos celulares, las células en división y las células en reposo. Poseen un tropismo natural para los epitelios bronquiales. Además, se han utilizado como vacunas entéricas durante numerosos años con un excelente perfil de seguridad. Finalmente, se puede cultivar fácilmente y purificarlas en gran cantidad.
15 Estas características han hecho que los adenovirus son particularmente apropiados para un uso como vectores de expresión y especialmente como vectores de terapia génica para fines terapéuticos y vacunales.

Según una realización preferida, el vector de la invención es un adenovirus.

20 Ejemplos de adenovirus a usar en la presente invención se pueden derivar de cualquier fuente de origen humano o animal, en particular de origen canino (por ejemplo CAV-1 o CAV-2; referencia GenBank CAV1GENOM y CAV77082, respectivamente), de origen aviar (referenciado GenBank AAVEDSDNA) de origen bovino (tal como BAV3, Seshidhar Reddy y col., 1998, J. Virol., 72 : 1394-1402), de origen ovino, felino, porcino, de origen simio o bien de uno de sus híbridos. Se puede usar cualquier serotipo. Sin embargo, se prefieren los
25 adenovirus de origen humano y en particular el adenovirus 5 (Ad5).

De manera general, los virus mencionados están disponibles en las colecciones ATCC y son objeto de numerosas publicaciones que describen su secuencia, su organización y su biología, lo cual permite que el experto en la técnica las aplique fácilmente. Por ejemplo, la secuencia del adenovirus tipo se describe en la base de datos GenBank (M73260) y M29978) y se incorpora aquí por referencia.
30

El genoma de los adenovirus está constituido por una molécula de ADN lineal de doble hebra de aproximadamente 36 kb que lleva aproximadamente más de 30 genes necesarios para terminar el ciclo viral. Hay 4 genes precoces repartidos en el genoma del adenovirus (E1 a E4). Las regiones E1, E2 y E4 son esenciales para la replicación viral. La región E3 es
35 considerada como una región no esencial basándose en la observación de que los virus

mutantes que aparecen naturalmente o los virus híbridos que han perdido esta región E3 siguen replicándose como los virus de tipo salvaje en las células cultivadas (Kelly y Lewis, 1973, J. Virol., 12 : 643-652). Los genes tardíos (L1 a L5) codifican mayoritariamente las proteínas estructurales que constituyen la cápsida viral. Se superponen al menos en parte a los primeros motivos de transcripción y se transcriben a partir de un único promotor (MLP por “Major Late Promoter”). Además, el genoma adenoviral lleva en los dos extremos regiones de acción en cis esenciales para la replicación de ADN, respectivamente los motivos de repetición inversos 5' y 3' (ITR por “Inverted Terminal Repeats”) y una secuencia de empaquetado.

Los adenovirus actualmente usados en los protocolos de terapia génica están desprovistos de la mayoría de la región E1, lo que hace que los virus sean deficientes al nivel de su replicación para evitar su diseminación en el entorno y en el organismo huésped. Además, la mayoría de los adenovirus están igualmente desprovistos de la región E3 con el fin de aumentar su capacidad de clonación. La factibilidad de la transferencia de gen utilizando estos vectores se ha demostrado en una variedad de tejidos *in vivo* (véase por ejemplo Yei y col., 1994, Hum. Gene ther., 5 : 731-744; Dai y col., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92 : 1401-1405: US6.099.831; y US6.013.638).

Otro vector de expresión particularmente apropiado para los fines de la invención un poxvirus, el cual constituye otra realización de la invención

Los poxvirus constituyen un grupo de virus complejo envueltos, que se distinguen principalmente por su morfología inhabitual, su gran genoma de ADN y su sitio citoplásmico de replicación. El genoma de varios elementos de los *poxviridae*, que comprenden la cepa viral de la vacuna de Copenhagen (VV) (Goebel y col., 1990, Virol. 179 : 247-226 y 517-563) y la cepa del virus de la vacuna modificada de Ankara (MVA) (Antoine y col., 1998, Virol., 244 : 365-396), se ha cartografiado y secuenciado. La cepa VV posee un genoma de ADN de doble hebra de aproximadamente 192 kb que codifica aproximadamente 200 proteínas de las cuales aproximadamente 100 están implicadas en el ensamblado del virus. La cepa MVA es una cepa del virus de la vacuna muy atenuada, generada por más de 500 pasadas en serie de la cepa de Ankara del virus de la vacuna (CVA) sobre fibroblastos de embriones de pollo (Mayr y col., 1975, Infection, 3 : 6-16). El virus MVA se ha registrado en la Colección Nacional de Cultivos de microorganismos (CNCM) con el número 1-721. La determinación de la secuencia completa del genoma del MVA y la comparación con el del VV permite la identificación precisa de las alteraciones que aparecieron en el genoma viral y la definición de siete delecciones (I a VII) y numerosas mutaciones que conducen a marcos de lectura abiertos fragmentados (Antoine y col., 1998, Virology, 244 : 365-396).

Otros ejemplos de poxvirus apropiados para los fines de la invención comprenden el pox del canario, el pox de ave de corral, el pox de vaca, el entomox, el pox de mono, el pox de cerdo y el pox de pingüino.

5 El poxvirus se encuentra en dos formas morfológicamente distintas, denominadas virus maduro intracelular (IMV) y virus extracelular envuelto (EEV).

Preferiblemente, el poxvirus usado para los fines de la invención es un Virus Vaccinia Ankara Modificado.

10 Los procedimientos de supresión y de inserción de secuencias de ADN en vectores de expresión son ampliamente conocidos por el experto en la técnica y consisten en etapas de digestión enzimática y ligadura. Preferiblemente, la secuencia nucleotídica insertada en el vector viral codifica una proteína del virus del VIH.

15 Las composiciones a base de vectores según la invención son particularmente eficaces para la inhibición, la prevención y el tratamiento de una enfermedad cuya sustancia proteica de la composición constituye un antígeno, tal como una infección por un virus. Son particularmente útiles para la preparación de un medicamento, y en particular de una vacuna, bien terapéutica o profiláctica.

En un enfoque de tratamiento profiláctico o terapéutico, en particular vacunación, una dosis eficaz de la composición según la invención se administra a un paciente.

20 Las composiciones farmacéuticas de la invención son apropiadas para la administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, tópica, local, intratraqueal, intranasal, transdérmica, rectal, vaginal, intraocular, intraauricular, pudiendo dicho principio activo ser administrado en forma unitaria de administración.

25 Las formas unitarias de administración pueden ser por ejemplo comprimidos, cápsulas duras, gránulos, polvos, soluciones o suspensiones orales inyectables, parches transdérmicos ("patch"), formas de administración sublingual, bucal, intratraqueal, intraocular, intranasal, intraauricular, por inhalación, formas de administración tópica, tales como rectal o vaginal, transdérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa o implantes. Para la administración tópica, se pueden considerar, cremas, geles, pomadas, lociones o colirios.

30 Estas formas galénicas se preparan según los procedimientos usuales de los ámbitos considerados.

Dichas formas unitarias se dosifican para permitir una administración diaria de 0,001 a 10 mg de principio activo por kg de peso corporal, según la forma galénica.

Puede haber casos particulares en los cuales dosificaciones más elevadas o más bajas son apropiadas, tales dosificaciones no salen del marco de la invención. Según la práctica

habitual, la dosificación apropiada para cada paciente es determinada por el médico según el modo de administración, el peso y la respuesta del paciente.

La cantidad y la naturaleza del excipiente se pueden determinar fácilmente por el experto en la técnica. Se eligen la forma galénica y el modo de administración deseados

5 La composición según la invención puede estar contenida en un kit farmacéutico. La administración de la composición según la invención puede ser simultánea, separada o escalonada en el tiempo.

Por administración simultánea, se entiende una administración al mismo tiempo y en el mismo lugar de la composición.

10 Por administración escalonada, se entiende la administración del vector viral o del vector sintético en tiempos diferidos. El plazo entre cada administración se puede entender entre algunos minutos a varios años, preferiblemente de varias semanas a varios meses y de manera preferida puede ser de 3 o 4 semanas.

15 Por administración separada, se entiende la administración del vector viral y del vector sintético en lugares corporales diferentes. El vector viral y el vector sintético pueden estar en el mismo excipiente o preferiblemente en excipientes diferentes apropiados.

Preferiblemente, la composición según la invención se administra de manera escalonada. Más preferiblemente, el vector sintético se administra antes del vector viral.

20 De este modo, según un modo de realización de la invención, la composición de la invención comprende:

- i) un constituyente iniciador que consisten en el vector sintético coloidal bioresorbible que comprende al menos una sustancia proteica y
 - ii) un constituyente de refuerzo que consiste en el vector viral que comprende al menos una secuencia nucleotídica que codifica una sustancia proteica que
- 25 corresponde a al menos una sustancia proteica del vector sintético.

Además de una aplicación terapéutica y profiláctica, la invención tiene también una aplicación diagnóstica. De este modo, la invención se refiere igualmente al uso de la composición de la invención para el diagnóstico *in vitro* del estado patológico, del cual la o las sustancias proteicas del vector sintético y del vector sintético constituyen los antígenos, y en particular de una infección viral o un cáncer.

30 La presente invención se entenderá mejor con la ayuda de los siguientes ejemplos dados únicamente a título ilustrativo y no limitativo, así como con la ayuda de las figuras 1 a 20 anexas, en las cuales

35 La figura 1 representa las respuestas CTL durante el experimento de inmunización N1 con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones según la invención

comprenden un vector sintético a base de micropartículas de poli(ácido D, L-láctico) asociados a la proteína p24 (denominado en lo sucesivo PLA/p24) y de un vector viral MVA que comprende la secuencia gag (denominado en lo sucesivo virus MVA gag).

5 La figura 2 representa las respuestas ELISPOT IFN- γ específicas del péptido Gag AMQ durante los 3 experimentos de inmunización con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones según la invención que comprenden el vector sintético PLA/p24 y el vector viral MVA gag.

10 La figura 3 representa las respuestas ELISPOT IFN- γ específicas de la proteína p24 durante los 3 experimentos de inmunización con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones según la invención que comprenden el vector sintético PLA/p24 y el vector viral MVA gag.

15 La figura 4 representa las respuestas ELISPOT IL-4 específicas de la proteína p24 durante los 3 experimentos de inmunización con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones según la invención que comprenden el vector sintético PLA/p24 y el vector viral MVA gag.

La figura 5 representa la secreción de la citoquina GM-CSF específica de la proteína p24 durante los 3 experimentos de inmunización con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones según la invención que comprenden el vector sintético PLA/p24 y el vector viral MVA gag.

20 La figura 6 representa la secreción de la citoquina IL-5 específica de la proteína p24 durante los 3 experimentos de inmunización con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones según la invención que comprenden el vector sintético PLA/p24 y el vector viral MVA gag.

25 La figura 7 representa la secreción de la citoquina IL-2 específica de la proteína p24 durante los 3 experimentos de inmunización con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones según la invención que comprenden el vector sintético PLA/p24 y el vector viral MVA gag.

30 La figura 8 representa la cinética de aparición de las respuestas humorales específicas de la proteína p24 durante los 3 experimentos de inmunización con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones según la invención que comprenden el vector sintético PLA/p24 y el vector viral MVA gag.

La figura 9 representa las respuestas CTL durante el experimento nº 2 con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones según la invención que comprenden el vector sintético PLA/p24 y el vector viral MVA gag.

La figura 10 representa las respuestas ELISPOT IFN- γ específicas del péptido Gag AMQ después de la inmunización con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones según la invención que comprenden el vector sintético PLA/p24 y el vector viral Adenovirus gag.

5 La figura 11 representa la secreción específica de la proteína p24 de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-10 después de la inmunización con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones según la invención que comprenden el vector sintético PLA/p24 y el vector viral Adenovirus gag.

10 La figura 12 representa la cinética de las respuestas humorales específicas de la proteína p24 (12A) o del adenovirus (12B) después de la inmunización con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones según la invención que comprenden el vector sintético PLA/p24 y el vector viral Adenovirus gag.

15 La figura 13 compara las respuestas ELISPOT IFN- γ específicas del péptido Gag AMQ después de la inmunización con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones que comprenden PLA/p24 y MVA gag o que comprenden Alum/p24 y MVA gag.

La figura 14 compara las respuestas ELISPOT IL-4 específicas de la proteína p24 después de inmunización con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones que comprenden PLA/p24 y MVA gag o que comprenden Alum/p24 y MVA gag.

20 La figura 15 compara las cinéticas de aparición de las respuestas humorales específicas de la proteína p24 después de inmunización con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones que comprenden PLA/p24 y MVA gag o que comprenden Alum/p24 y MVA gag.

25 La figura 16 compara las cinéticas de aparición de las respuestas humorales específicas del virus MVA después de inmunización con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones que comprenden PLA/p24 y MVA gag o que comprenden Alum/p24 y MVA gag.

30 La figura 17 representa las respuestas ELISPOT IFN- γ específicas del péptido beta-gal TPH después de la inmunización de ratón con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones que comprenden el vector sintético PLA-beta-gal y el vector viral MVA beta-gal.

La figura 18 compara las cinéticas de aparición de las respuestas humorales específicas de la beta-gal después de la inmunización de ratón con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones que comprenden el vector sintético PLA-beta-gal y el vector viral MVA beta-gal.

La figura 19 representa las respuestas ELISPOT IFN- γ específicas del péptido p24 AMQ después de la inmunización de ratón con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones que comprenden el vector sintético CPL-p24 y el vector viral MVA beta-gag.

5 La figura 20 compara las cinéticas de aparición de las respuestas humorales específicas del péptido p24 AMQ después de la inmunización de ratón con diferentes composiciones vacunales, de las cuales las composiciones que comprenden el vector sintético CPL-p24 y el vector viral MVA beta-gag.

Ejemplo 1: Inmunización de ratón con una composición vacunal según la invención

10 La composición vacunal usada comprende un vector sintético a base de micropartículas de poli(ácido D,L-láctico) asociadas a la proteína p24 (en lo sucesivo denominada PLA/p24) y de un vector viral MVA que comprende la secuencia gag de SEQ ID N^o1 (denominado en lo sucesivo virus MVA gag).

1.- Modelo animal

15 Los experimentos de inmunización se han realizado en ratones BALB/c (H-2K^d) hembras de 6 a 8 semanas en el momento de la primera inmunización

2.- Inmunógenos administrados

En esta serie de experimentos se han utilizado los siguiente inmunógenos solos o en combinación:

- 20
- las micropartículas PLA/p24 preparadas según el protocolo de desplazamiento de disolvente y de adsorción de la solicitud de patente W02005/027871.
 - el virus MVA gag (Modified Vaccinia Ankara, virus de la vacuna modificada de la cepa Ankara) que es recombinante para el gen gag del virus VIH-1, que codifica la proteína p24. El virus recombinante se ha construido en Transgene a partir de la cepa salvaje (MVATGN33) tal como se describe en Antoine G. y col., 1998, "The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses", Virology, 244 : 365-396. Este virus recombinante se ha producido y purificado a continuación como sigue: el MVA se replica en las células embrionarias de pollo. Después de 48 a 72 horas, las células se recogen, y se lisan por congelación/descongelación y por sonicación. El lisado se purifica/concentra mediante dos almohadillas de sacarosa seguido eventualmente de 2 gradientes de sacarosa.
- 25
- 30

Para mayores precisiones, se puede referirse al libro "Current Protocols in Molecular Biology" Vol 2, capítulo 16.16 Editores Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, John Wiley & Sons, inc, Nueva York. 3 Volúmenes.

35

- el virus MVA salvaje MVATGN33. Se trata de un testigo negativo que sirve para medir si el vector viral induce una respuesta inmune no específica durante las inmunizaciones.
- el ADN gag. El gen gag (de SEQ ID N°1) se ha clonado en el plásmido de expresión eucariótica pCMV (contiene el promotor intermedio/precoz del citomegalovirus humano y de las señales de empalme y de poliadenilación procedentes del gen beta-globina del conejo (J K, y col., 1994, Proc Natl Acad Sci., 91(20): 9564-9568). Las preparaciones de ADN sin endotoxinas y en gran cantidad se han preparado con el kit de gigaprep endotoxine-free de Macherey-Nagel. El ADN sirve de control positivo, ya que es sabido que en el ratón la administración por vía intramuscular de ADN no permite inducir una buena respuesta citotóxica (CTL).

3.- Inmunizaciones

Experimento 1

35 ratones recibieron 2 dosis de los inmunógenos descritos en el punto 2 anterior a las 0 y 3 semanas. Las composiciones vacunales recibidas por cada grupo de ratones se indican en la siguiente Tabla 1. todas las inyecciones se han realizado por vía subcutánea salvo para el ADN que se ha administrado por vía intramuscular.

Tabla 1

Dosis: 1 ^{era} inyección semana 0	Dosis: 2 ^a inyección semana 3	Número de ratón
MVA gag 10 ⁷ pfu	MVA gag 10 ⁷ pfu	5
MVA gag 10 ⁷ pfu	PLA/p24 40 µg	5
PLA/p24 40 µg	MVA gag 10 ⁷ pfu	5
PLA/p24 40 µg	PLA/p24 40 µg	5
MVA gag 10 ⁷ pfu	MVA gag 10 ⁷ pfu	5
ADN gag 10 µg(IM)	PLA/p24 40 µg	5
PLA/p24 40 µg	ADN gag 10 µg(IM)	5

Pfu = plaque forming units, es la unidad de medición de la dosis MVA usada. La valoración se expresa en pfu según la técnica de dosificación del stock viral usada, como se indica en Current Protocols in Molecular Biology, *supra*.

Los animales se sacrificaron 6 semanas después de la primera inyección y se extrajo la sangre y el bazo para los análisis inmunológicos.

Experimento 2

En este experimento, se aumentó el número de inyecciones.

30 ratones recibieron 2 o 3 dosis de los inmunógenos descritos en el punto 2 anterior a las 0, 3 y 6 semanas. Las composiciones vacunales recibidas por cada grupo de ratones se indican en la siguiente tabla 2. Todas las inyecciones se realizaron por vía subcutánea.

Tabla 2

Dosis: 1 ^{era} inyección semana 0	Dosis: 2 ^a inyección semana 3	Dosis: 3 ^a inyección semana 6	Número de ratón
MVA gag 10 ⁷ pfu	MVA gag 10 ⁷ pfu		5
MVA gag 10 ⁷ pfu	MVA gag 10 ⁷ pfu	MVA gag 10 ⁷ pfu	5
MVA gag 10 ⁷ pfu	PLA/p24 40 µg		5
MVA gag 10 ⁷ pfu	PLA/p24 40 µg	PLA/p24 40 µg	5
PLA/p24 40 µg	MVA gag 10 ⁷ pfu		5
MVA salvaje 10 ⁷ pfu	MVA salvaje 10 ⁷ pfu	MVA salvaje 10 ⁷ pfu	5

5 Los animales se sacrificaron 3 semanas después de la última inyección y se extrajo la sangre y el bazo para los análisis inmunológicos.

Experimento 3

10 30 ratones recibieron 2 o 3 dosis de los inmunógenos descritos en el punto 2 anterior a las 0, 3 y 6 semanas. Las composiciones vacunales recibidas por cada grupo de ratones se indican en la siguiente tabla 3. Todas las inyecciones se realizaron por vía subcutánea.

Tabla 3

Dosis: 1 ^{era} inyección semana 0	Dosis: 2 ^a inyección semana 3	Dosis: 3 ^a inyección semana 6	Número de ratón
MVA gag 10 ⁷ pfu	PLA/p24 40 µg		5
MVA gag 10 ⁷ pfu	PLA/p24 40 µg	PLA/p24 40 µg	5
PLA/p24 40 µg	MVA gag 10 ⁷ pfu		5
PLA/p24 40 µg	MVA gag 10 ⁷ pfu	PLA/p24 40 µg	5
PLA/p24 40 µg	PLA/p24 40 µg		5
PLA/p24 40 µg	PLA/p24 40 µg	PLA/p24 40 µg	5

Los animales se sacrificaron 3 semanas después de la última inyección y se extrajo la sangre y el bazo para los análisis inmunológicos.

4.- Análisis inmunológicos

15 Se buscó la respuesta humoral y la respuesta celular como sigue:

- Respuesta humoral: se efectuó una extracción sanguínea a los ratones antes de su sacrificio. La presencia de los anticuerpos anti-p24 se determinó por ELISA. La proteína p24 (producida con *Escherichia coli* y purificada por cromatografía de afinidad metal-quelato según Cheynet V y col., 1993, Protein Expr Purif, 4(5) : 367-

72) se utilizó en captura y se revelaron los anticuerpos específicos presentes en el suero mediante un anticuerpo policlonal anti-ratón como valoración de anticuerpo de detección que es un anticuerpo de cabra anti-IgG AffiniPure conjugado con la peroxidasa de Raifort (H+L, Jackson ImmunoResearch, cat nº 115-035-062). La valoración es la inversa de la dilución para la cual se obtiene una absorbancia de 0,1 unidad DO con el protocolo ELISA utilizado.

- Respuesta celular: después del sacrificio de los ratones, se extrajeron los bazos de manera estéril para preparar una suspensión celular. Los siguientes análisis se practicaron sobre las suspensiones celulares obtenidas, habiéndose analizado cada ratón de manera individual o conjuntamente cuando la cantidad de células obtenidas no era suficiente para un análisis individual.

(i) *Ensayo CTL*: La suspensión celular se cultivó en presencia de un péptido de la proteína p24 de 9-mero (AMQMLKETI – SEQ ID N°2) que corresponde a un epítotope CTL $H-2K^d$ restringido inmunodominante, y de IL-2. Cinco días más tarde, la población efectora se reestimuló mediante células naives irradiadas, cargadas con el péptido. La población citotóxica efectora se recogió al cabo del séptimo día y la actividad CTL se midió utilizando como dianas las células P815 (ATCC TIB-64) marcadas con ^{51}Cr .

(ii) *ELISPOT*: El ELISPOT permite determinar el número de células que secretan una citoquina dada en respuesta a un estímulo específico. Nos interesamos por las citoquinas IFN- γ de tipo Th1 e IL-4 de tipo Th2. Las suspensiones celulares obtenidas a partir de los bazos se reestimularon *in vitro* por el péptido AMQMLKETI durante 20 horas para analizar las respuestas de tipo CDB. Las suspensiones celulares obtenidas a partir de los bazos se reestimularon *in vitro* por la proteína p24 (sin endotoxinas) durante 42 horas para analizar las respuestas de tipo CD4.

Las placas de ELISPOT de 96 pocillos con membranas de PVDF (Multiscreen IP, Millipore) se recubrieron con un anticuerpo anti-IFN- γ o anti-IL-4. durante la reestimulación, las suspensiones de esplenocitos se incubaron en estas placas para capturar las citoquinas secretadas por cada célula. Se revelaron los spots correspondientes a cada célula que secreta la citoquina de interés mediante un anticuerpo de detección biotinilado específico de la citoquina de interés.

(iii) *Secreción de las citoquinas*: Los esplenocitos se estimularon durante 3 días en un medio de cultivo completo (medio de cultivo alpha minimal essential medium (α MEM) que contiene suero de feto de ternero al 10%, 10 mM HEPES, 5×10^{-5}

5

M B-mercaptoetanol, 4 mM L-glutamina, 80 U/ml penicilina, 80 mg/ml estreptomina, aminoácidos no esenciales lx (cat nº 11140-35) piruvato sódico 1 x (cat nº 11360-039) (constituyentes de Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia)) en presencia o no del antígeno de interés p24, y a continuación las citoquinas secretadas en el sobrenadante de cultivo se dosificaron por el kit mouse FlowCytomix Th1/Th2 10plex de Bender Medsystems /Cat nº BMS720FF).

5. Resultados

5.1. La respuesta CTL

10

La siguiente tabla 4 recapitula los resultados obtenidos durante los 3 experimentos sucesivos:

Código	Composición vacunal	Ratones analizados de manera conjunta (Exp 1 n=5)	Frecuencia de los ratones con respuesta CTL número de ratón positivo/número de ratones analizados individualmente
A	MVA gag + MVA gag	Grupo negativo	0,5
A'	MVA gag + MVA gag + MVA gag		1/5
B	MVA gag + PLA/p24	Grupo negativo	1/10
B'	MVA gag + PLA/p24 + PLA/p24		3/10
C	PLA/p24 + MVA gag	Grupo positivo	2/10
C'	PLA/p24 + MVA gag + PLA/p24		1/5
F	ADN gag + PLA/p24	Grupo positivo	No efectuado
G	PLA/p24 + ADN gag	Grupo positivo	No efectuado
D	PLA/p24 + PLA/p24	Grupo negativo	0/5
D'	PLA/p24 + PLA/p24+ PLA/p24		0/5
E	MVA + MVA salvaje	Grupo negativo	No efectuado
E'	MVA + MVA + MVA salvaje		0/5

15

La figura 1 representa las respuestas CTL obtenidas durante el experimento de inmunización nº 1. Cada grupo está constituido por 5 ratones, los bazo se agruparon antes de la dosificación CTL. Siendo 0, la estimulación no específica (sin péptido) en todos los grupos, no se representa. Igualmente, al ser 0, las respuestas CTL obtenidas con las composiciones A, D y E, no se representan. La abscisa corresponde a la relación células efectoras (CTL) respecto de las células dianas (a lisar). El eje de ordenadas corresponde al porcentaje de lisis media.

Las respuestas CTL inducidas son de baja intensidad con todos los inmunógenos utilizados (MVA, PLA o combinaciones), con la excepción del grupo G del experimento 1 que ha recibido ADN en último lugar (Figura 1). La inducción de CTL en los grupos ADN es normal: el ADN se optimiza con este objetivo, es un testigo positivo en el ratón pero que no funciona tan bien en los primates.

Incluso si las respuestas siguen siendo débiles, los grupos que contienen a la vez MVA y PLA dan mejores respuestas CTL que los grupos que han recibido MVA solo o PLA solo.

Cuando se han realizado 2 inyecciones, en los grupos que han recibido 2 veces MVA o 2 veces PLA, no hay CTL detectado durante el sacrificio retenido (A y D), mientras que en los grupos que han recibido a la vez PLA y MVA (B y C), hay una baja frecuencia de CTL. El orden de inyección desempeña también una función: PLA + MVA (C) da mejores resultados que MVA + PLA (B).

Cuando se han realizado 3 inyecciones, la frecuencia de inducción de las respuestas sigue siendo todavía débil. Las respuestas CTL no mejoran respecto de dos inyecciones. La estrategia vacuna que usa MVA necesita 3 inyecciones para dar los mismos resultados que las combinaciones de PLA y MVA.

5.2.- La respuesta ELISPOT IFN- γ contra el péptido Gag AMQ

La figura 2 representa las respuestas ELISPOT IFN- γ específicas del péptido Gag AMQ. Todos los animales inmunizados durante los 3 experimentos sucesivos se han incluido en el análisis. Para cada composición vacunal, el número de animales que ha recibido esta composición se indica entre paréntesis. El eje de las ordenadas representa el número medio de células que secretan IFN- γ de manera específica en respuesta a una estimulación de 18 horas por el péptido Gag AMQ sobre un millón de células estimuladas. Esta respuesta se ha determinado individualmente para cada ratón. El número representado en este gráfico corresponde a la media calculada a partir de todos los ratones de un grupo (n=5, 10 o 15 según los grupos).

El interferón gamma o de tipo II se denomina también interferón inmunitario ya que es secretado por los linfocitos T de tipo CD4+, por los linfocitos T de tipo CD8+ y las células NK. Protege las células contra las infecciones virales. Estimula la actividad fagocitaria de los macrófagos, permitiéndoles matar las células tumorales. Estimula la maduración de los linfocitos T y B y aumenta la producción de anticuerpos. Aumenta la expresión de las moléculas HLA de clase I y II por los macrófagos. Se trata de una citoquina de tipo tTh1.

Es posible clasificar las composiciones vacunales en varias categorías en función de las respuestas ELISPOT IFN- γ obtenidas. Las mejores respuestas son inducidas por las composiciones PLA + MVA(C) y MVA + MVA(A). En estos casos, la tercera inyección, o no

aporta ninguna mejora (composición MVA + MVA)(A'), o puede hacer que se reduzca la respuesta observada (composición PLA + MVA) (C). Las composiciones MVA + PLA (B y B') y ADN + PLA (F) permiten generar respuestas de intensidad intermedias, mientras que la estrategia que usa únicamente PDA (D y D') no induce más que respuestas débiles.

5 De este modo, hemos podido mostrar que la composición vacunal PLA + MVA (C) era al menos tan buena, o mejor que la combinación MVA + MVA (A) para inducir una secreción de IFN- γ específica del péptido AMQ.

5.3. La respuesta ELISPOT IFN- γ contra la proteína p24

10 La figura 3 representa las respuestas ELISPOT IFN- γ específicas de la proteína p24. Todos los animales inmunizados durante los 3 experimentos sucesivos se han incluido en el análisis. Para cada composición vacunal, el número de animales que ha recibido esta composición se indica entre paréntesis. El eje de las ordenadas representa el número medio de células que secretan IFN- γ de manera específica en respuesta a una estimulación de 42 horas por la proteína p24 sobre un millón de células estimuladas. Esta respuesta se ha determinado individualmente para cada ratón. El número representado en este gráfico corresponde a la media calculada a partir de todos los ratones de un grupo (n=5, 10 o 15 según los grupos).

15 De nuevo, es posible clasificar las composiciones vacunales en varias categorías en función de las respuestas ELISPOT IFN- γ obtenidas. Las mejores respuestas son inducidas por las composiciones PLA + MVA (C y C') y ADN + PLA (F). La tercera inyección hacer reducir también la respuesta observada en el caso de la composición PLA – MVA(C'). Las composiciones MVA + PLA (B y B') y MVA + MVA (A y A') permiten generar respuestas de intensidad intermedias, mientras que la estrategia que usa únicamente PLA (D y D') no induce más que respuestas débiles.

20 De este modo, se ha podido mostrar que la composición vacunal PLA + MVA era la mejor elección para inducir una secreción de IFN- γ específica de la proteína p24.

5.4 La respuesta ELISPOT IL-4 contra la proteína p24

30 La figura 4 representa las respuestas ELISPOT IL-4 específicas de la proteína p24. Todos los animales inmunizados durante los 3 experimentos sucesivos se han incluido en el análisis. Para cada composición vacunal, el número de animales que han recibido esta composición se indica entre paréntesis. El eje de las ordenadas representa el número medio de células que secretan IL-4 de manera específica en respuesta a una estimulación de 42 horas por la proteína p24 sobre un millón de células estimuladas. Esta respuesta se ha determinado individualmente para cada ratón. El número representado en este gráfico corresponde a la media calculada a partir de todos los ratones de un grupo (n=5, 10 o 15 según los grupos).

De nuevo, es posible clasificar las composiciones vacunales en varias categorías en función de las respuestas ELISPOT IL-4 obtenidas. Las mejores respuestas son inducidas por la composición PLA + MVA (C y C'). La tercera inyección parece de nuevo no necesaria ya que no mejora en gran medida la respuesta inducida por la composición PLA + MVA(C'). Las composiciones MVA + PLA (B y B') y ADN + PLA(F) y PLA + PLA (D y D') permiten generar respuestas de intensidad intermedias, mientras que la estrategia que usa únicamente MVA no induce más que respuestas débiles (A y A').

De este modo, se ha podido mostrar que la composición vacunal PLA + MVA era la mejor elección para inducir una secreción de IL-4 específica de la proteína p24.

5.5. Secreciones de las citoquinas

El estudio de la secreción de las citoquinas permite trazar una tabla del estado de activación inmunitaria del animal que ha recibido la composición vacunal. Se pueden repartir las citoquinas en cuatro grupos en función de sus propiedades:

- 1) los mediadores de la inmunidad natural (IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-8...)
- 2) Los activadores de la activación, crecimiento y diferenciación linfocitaria (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF-B)
- 3) Los activadores no específicos de la inflamación (IFN- γ , IL-5, IL-8)
- 4) Los activadores y diferenciadores de leucocitos inmaduros (IL-3, GM-CSF)

Gracias al uso de un kit múltiplex, se ha podido dosificar la secreción de 10 citoquinas diferentes en los sobrenadantes de cultivo de los esplenocitos obtenidos de los animales sacrificados. Estas citoquinas son: IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-4, IL-17, IL-1 α , IL-2, IL-5, IL-6, IL-10.

Ninguna de las composiciones vacunales ensayadas induce una secreción significativa de las citoquinas IL-1 α e IL-17.

Para todas las otras citoquinas ensayadas, se ha podido poner de manifiesto diferencias entre los grupos.

La figura 5 representa la secreción de la citoquina GM-CSF específica de la proteína p24. Todos los animales inmunizados durante los 3 experimentos sucesivos se han incluido en el análisis, cuando la cantidad de células disponibles lo permiten. Para cada composición vacunal, el número de animales que recibieron esta composición se indica entre paréntesis. Las células obtenidas a partir de los ratones de un mismo grupo se han agrupado antes de su cultivo para el ensayo de secreción. El eje de ordenadas representa la concentración de GM-CSF (en pg/ml) secretada en el medio de cultivo en respuesta a una estimulación de 3 días por la proteína p24.

La citoquina GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) es un potente inmunoestimulador que permite activar las funciones inmunitarias tales como la adhesión, la fagocitosis, etc de los macrófagos, de los neutrófilos y de los eosinófilos. Como se puede ver en la figura 5, se ha podido mostrar una importante secreción de GM-CSF en los grupos que contienen PLA en asociación o no con el MVA (salvo cuando el número de inyección aumenta a 3 para los PLA) mientras que los grupos inmunizados exclusivamente con MVA no lo secretan o lo secretan poco)

La figura 6 representa la secreción de la citoquina IL-5 específica de la proteína p24. Todos los animales inmunizados durante los 3 experimentos sucesivos se han incluido en el análisis, cuando la cantidad de células disponibles lo permitía. Para cada composición vacunal, el número de animales que ha recibido esta composición se indica entre paréntesis. Las células obtenidas a partir de un mismo grupo se han agrupado antes de ser cultivadas para el ensayo de secreción. El eje de las ordenadas representa la concentración de IL-5 (en pg/ml) secretada en el medio de cultivo en respuesta a una estimulación de 3 días por la proteína p24.

Para todas las citoquinas de tipo Th2 como IL-4, IL-5, IL-6 e IL10, los perfiles de secreción son muy similares al presentado en la figura 6 que corresponde a la secreción del IL-5. No se ha observado ninguna secreción en los grupos que han recibido MVA salvaje (es normal, es un testigo negativo). Se obtienen bajas concentraciones para los grupos MVA gag, 2 o 3 inyecciones, y los grupos que asocian el ADN y el PLA. Se obtienen concentraciones medias para los grupos de ratones inmunizados por las composiciones PLA y MVA. Las concentraciones más fuertes se obtienen en los grupos que han recibido únicamente PLA. La secreción de citoquinas se orienta por lo tanto más o menos hacia las citoquinas de tipo Th2 en función de la composición vacunal:

- se observa una respuesta mayoritariamente de tipo Th2 para los grupos inmunizados únicamente con los PLA (la secreción de IFN- γ del IL-2, citoquinas de tipo Th1 es baja (figura 7),
- se observa una respuesta no polarizada, a la vez Th1 y Th2 para los grupos inmunizados con las combinaciones PLA y MVA.
- para los grupos MVA, la secreción de citoquinas de tipo Th2 es baja.

Obsérvese también que las 4 citoquinas Th2 dosificadas no son secretadas a la misma concentración. IL-4 e IL-10 son las secretadas a tasas elevadas. La siguiente tabla recapitula las concentraciones medias de las diferentes citoquinas observadas en los grupos que han recibido las composiciones PLA y MVA.

Tabla 5

Citoquina	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
Concentración media (pg/ml)	2600	1460	260	2660

La interleuquina 4, IL-4 es secretada por los linfocitos T de tipo CD4+. Aumenta el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos B previamente activados, favorece la producción de IgE que desempeña una función importante en las reacciones de hipersensibilidad inmediata. Activa también los macrófagos.

5 La interleuquina 5, IL-5, estimula el crecimiento, la diferenciación y la actividad de los eosinófilos que desempeñan una función importante en la lucha contra las infecciones parasitarias. El aumento del número de los eosinófilos no es solamente un signo de ataque parasitario sino también un medio de defensa. La IL-5 induce la proliferación de los linfocitos B y su secreción de inmunoglobulinas. Activa los linfocitos T citotóxicos. Se puede considerar su
10 uso en el tratamiento de algunas enfermedades.

La interleuquina 6, IL-6 estimula el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos B y aumenta la generación de las plaquetas. Provoca, por activación hepatocitos, la secreción de las proteínas de la inflamación como el fibrinógeno y la proteína C reactiva. Tiene una función proinflamatoria. Tiene un efecto citotóxico respecto de algunos tumores.

15 La figura 7 representa la secreción de la citoquina IL-2 específica de la proteína p24. Todos los animales inmunizados durante los 3 experimentos sucesivos se han incluido en el análisis, cuando la cantidad de células disponibles lo permitía. Para cada composición vacunal, el número de animales que ha recibido esta composición se indica entre paréntesis. Las células
20 obtenidas a partir de los ratones de un mismo grupo se han agrupado antes de su cultivo para el ensayo de secreción. El eje de las ordenadas representa la concentración de IL-2 (en pg/ml) secretada en el medio de cultivo en respuesta a una estimulación de 3 días por la proteína p24.

La IL-2 es un factor de crecimiento para los linfocitos. Activa su transformación en linfocitos T citotóxicos de tipo CD8+ que secretan el interferón α , el cual estimula los macrófagos para liberar el TNF α y el TGF α (transforming growth factor α). La IL-2-2 estimula el
25 crecimiento y la actividad citolítica de las células NK (natural killer). Estimula la maduración de los linfocitos B y la síntesis de anticuerpos. Es una citoquina de tipo Th1.

Es posible clasificar las composiciones vacunales en varias categorías en función de la secreción de IL-2, específica de la proteína p24. La mejor respuesta es inducida por la combinación MVA + PLA(B), y a continuación PLA + MVA (C), PLA solo (D) y MVA solo (A).

30 5.6. La respuesta humoral específica de la proteína p24

La figura 8 representa una cinética de aparición de las respuestas humorales específicas de la proteína p24. Todos los animales inmunizados durante los 3 experimentos se

han incluido en el análisis. Para cada composición vacunal, el número de animales que ha recibido esta composición se indica entre paréntesis. El eje de las ordenadas representa la valoración en IgG anti-p24 por ELISA de captura p24; la escala de este eje es logarítmica. La valoración en anticuerpos se ha determinado individualmente para cada ratón. El número representado en este gráfico corresponde a la media geométrica calculada a partir de todos los ratones de un grupo (n=5, 10 o 15 según los grupos). S3= semana 3, S6 = semana 6, S9 = semana 9.

En lo que se refiere a las respuestas humorales anti-p24, por primera vez en esta serie de experimentos, aumentar el número de inyecciones permite mejorar de manera significativa la respuesta inmune medida. En efecto, sea cual sea el grupo estudiado, pasar de 2 a 3 inyecciones de inmunógeno aumenta aproximadamente en un log la respuesta anti.p24 (salvo para el grupo PLA solo donde el aumento es menor aunque significativo).

Para los grupos que han recibido 3 inyecciones, todas las combinaciones que contienen MVA y PLA o el PLA solo inducen una valoración elevada (10^6), superior en un log a la valoración inducida por MVA solo.

De manera similar, para los grupos que han recibido 2 inyecciones, todas las composiciones que contienen MVA y PLA o el PLA solo inducen una valoración elevada, superior en un log a la valoración inducida por MVA solo.

Cambiar una inyección de PLA en MVA en un esquema de vacunación no perjudica la valoración en anticuerpos obtenidos sino que permite ampliar las respuestas celulares respecto de las que son generadas únicamente por un vector PLA.

Conclusión:

En función del tipo de respuesta analizada, la mejor composición no es siempre la misma, obteniendo algunas composiciones específicamente muy buenas respuestas.

Sin embargo, para obtener una respuesta inmune amplia e intensa, la mejor composición es la composición PLA + MVA.

Ejemplo: Inmunización de ratón con la composición vacunal de micropartículas PLA/p24 y el Adenovirus Gag

1. Modelo animal

Los experimentos de inmunización se han realizado en ratones BALB/c, (H-2K^d) hembras de 6 a 8 semanas en el momento de la primera inmunización.

2. Inmunógenos administrados

En esta serie de experimentos se han utilizado solos o en combinación los siguientes inmunógenos:

- las micropartículas PLA/24 preparados según el protocolo de desplazamiento de disolvente de la solicitud de patente WO2005/02787.
- El Adenovirus tipo 5 Gag que es recombinante para el gen gag del virus VIH-1, que codifica la proteína p24 (Généthon)
- El Adenovirus tipo 5 eGFP que es recombinante para el gen que codifica la enhanced Green Fluorescent Protein (Généthon). Se trata de un testigo negativo que sirve para medir si el vector viral induce una respuesta inmune no específica durante las inmunizaciones.
- El ADN gag. El gen gag (SEQ ID N°1) se ha clonado en el plásmido de expresión eucariótica pCMV (plásmido no comercial). Las preparaciones de ADN sin endotoxinas y en gran cantidad se han realizado con el kit de gigaprep endotoxine-free de Marcherey-Nagel. El ADN sirve de control positivo, ya que es sabido que en el ratón la administración por vía intramuscular de ADN no permite inducir una buena respuesta citotóxica (CTL).

3. Inmunizaciones

30 ratones recibieron 2 dosis de los inmunógenos descritos en el punto 2 anterior a las 0 y 3 semanas. Las composiciones vacunales recibidas por cada grupo de ratones se indican en la siguiente tabla 6. Todas las inyecciones se realizaron por vía intramuscular para el adenovirus y el ADN y por vía subcutánea para los PLA.

Tabla 6

Dosis 1 ^{era} inyección semana 0	Dosis 2 ^a inyección semana 3	Números de ratones	Composición
Ad5 gag 10 ⁸ ip	Ad5 gag 10 ⁸ ip	5	H
Ad5 gag 10 ⁸ ip	PLA/p24 40 µg	5	I
PLA/p24 40 µg	Ad5 gag 10 ⁸ ip	5	J
Ad5 gag 10 ⁷ ip	Ad5 gag 10 ⁷ ip	5	H'
Ad5 gag 10 ⁷ ip	PLA/p24 40 µg	5	I'
PLA/p24 40 µg	Ad5 gag 10 ⁷ ip	5	J'

Los animales se sacrificaron 3 semanas después de la última inyección y se extrajo la sangre y el bazo para los análisis inmunológicos.

4. Análisis inmunológicos

Realizados según los mismos protocolos que en el ejemplo 1. Además, se han medido las respuestas humorales dirigidas contra el adenovirus5 utilizando una técnica ELISA. El protocolo es idéntico al utilizado para ELISA anti-p24, salvo que se ha utilizado un lisado de adenovirus en captura.

5. Resultados

5.2. Respuestas CTL

La figura 9 representa las respuestas CTL obtenidas durante el experimento de inmunización nº2. cada grupo está constituido por 5 ratones, analizados individualmente. Al ser la estimulación no específica (sin péptido) en todos los grupos 0. no se ha representado. La abscisa corresponde a la relación de células efectoras (CTL) respecto de las células dianas (a lisar). El eje de las ordenadas corresponde al porcentaje de lisis media, se trata de la media aritmética calculada a partir de todos los ratones de un grupo (n=5).

En todos los grupos 5 ratones de 5 han desarrollado una respuesta CTL, salvo un ratón del grupo Ad5gag 10^7 + PLA.

Se observa lo mismo para las 2 dosis de virus ensayadas: las combinaciones Ad + Ad (H y H') y PLA + Ad (J y J') inducen mejores respuestas CTL que la combinación Ad + PLA (I y I').

5.3. la respuesta ELISPOT IFN- γ contra el péptido Gag AMQ

La figura 10 representa las respuestas ELISPOT IFN- γ específicas del péptido Gag AMQ. El eje de las ordenadas representa el número medio de células que secretan IFN- γ de manera específica en respuesta a una estimulación de 18 horas por el péptido Gag AMQ sobre un millón de células estimuladas. Esta respuesta se ha determinado individualmente para cada ratón (enumerado del 1 al 5 para cada ratón, así H1 corresponde al ratón 1 que ha recibido la composición H Ad5 gag 10^8 ip y Ad5 gag 10^8 ip. El número representado en este gráfico corresponde a una media de triplicados.

Se puede observar según la figura 10 que:

- a 10^8 : la respuesta PLA + AD > Ad + Ad > ad + PLA
- a 10^7 la respuesta Ad + Ad > o = PLA + Ad > Ad + PLA. La diferencia entre las composiciones Ad + Ad y PLA + Ad es poco flagrante. globalmente la respuesta ELISPOT IFN- γ está en consonancia con el ensayo CTL: Las composiciones PLA + Ad y Ad + Ad son más eficaces que Ad + PLA.

5.4. Secreción de citoquinas

Como en el ejemplo 1, se ha ensayado la secreción de 10 citoquina en el sobrenadante. Entre éstas, la IL-5, IL-6, IL17 y la IFN- γ no eran secretadas o lo eran a concentraciones infinitesimales. Cuando en GM-CSF- TNF- α e IL-1 α , su secreción no era específica de la proteína p24 por la técnica de dosificación usada. Es muy probable que sea la inmunización por el adenovirus la que provoca la secreción de estas citoquinas. Si existe una secreción específica de la proteína p24, se sumerge en la provocada por el adenovirus.

Para 3 otras citoquinas, a saber IL-2(Th1), así como la IL-4 y la IL-10 (Th2), se ha podido medir la secreción específica de la proteína p24. Los resultados se presentan en la figura 11.

5 La figura 11 representa la secreción de las citoquinas IL-2, IL-4 e IL-10 específica de la proteína p24. Cada composición vacunal se ha administrado a 5 ratones. Las células obtenidas a partir de los ratones de un mismo grupo se han agrupado antes de su cultivo para el ensayo de secreción. El eje de las ordenadas representa la concentración de cada citoquina (en pg/ml) secretada en el medio de cultivo en respuesta a una estimulación de 3 días por la proteína p24.

Los resultados en la figura 11 muestran que:

- 10
- la composición Ad5 + Ad5 gag (H y H') no dan ninguna secreción de IL-2, IL-4 o IL-10.
 - solo la composición PLA + Ad5 gag (J y J') dan una secreción de IL-2 e IL-4.
 - las composiciones PLA + Ad5 gag (J y J') y Ad5 gag + PLA (I e I') permiten una secreción de IL-10.

15 La composición Ad + Ad (H y H') induce una respuesta citoquina en lugar de polarizada Th1 (medida por ELISPOT IFN- γ).

La composición PLA + Ad5 (J y J') induce una respuesta citoquina no polarizada, ya que se detectan a la vez citoquinas Th1 como IFN- γ (por ELISPOT) y la IL-2, y citoquinasTh2 como IL-4 e IL-10.

20 5.5. Respuestas humorales

La figura 12 representa la cinética de aparición de las respuestas humorales. La figura 12(a) representa la respuesta de anticuerpos dirigida contra la proteína p24 y la figura 12(b) representa la respuesta de anticuerpos dirigida contra el adenovirus. Cada composición vacunal se ha administrado a 5 ratones. El eje de las ordenadas representa la valoración en IgG medida por ELISA; la escala de este eje es algorítmica. La valoración en anticuerpos se ha determinado individualmente para cada ratón. El número presentado en este gráfico corresponde a la media geométrica calculada a partir de todos los ratones de un grupo (n=5). S3 = semana 3, S6 = semana 6.

30 La respuesta anti-adenovirus (o respuesta anti-vector) es aproximadamente 1 log menos en los grupos que han recibido las composiciones Ad+PLA (I e I') y PLA+Ad (J y J') que para Ad+Ad (H y H').

Las composiciones según la invención permiten por lo tanto disminuir la inmunidad anti-adenovirus.

Ejemplo 3: Comparaciones de las composiciones vacunales PLA/p24+MVA gag y Alum/p24 + MVA gag en el ratón

1. Modelo animal

Los experimentos de inmunización se han realizado en ratones BALB/c (H-d^d) hembras de 6 a 8 semanas en el momento de la primera inmunización.

2. Inmunógenos administrados

5 En esta serie de experimentos se han usado solos o en combinación los siguientes inmunógenos:

- Las micropartículas PLA/24 preparadas según el protocolo de desplazamiento de disolvente de la solicitud de patente WO2005/02787.
- Alum/p24: el alumbre (Imject Alum, Pierce, N° de catálogo 77161) se mezcla volumen con volumen (1:1) con la proteína p24 diluida en PBS. Se administra una
10 dosis de 40 µg de p24 por inyección y por animal.
- El virus MVA gag (Modified Vaccinia Virus Ankara, virus de la vacuna atenuada, cepa Ankara) que es recombinante para el gen gag del virus VIH-1, que codifica la proteína p24. El virus recombinante se ha construido en Transgene, como se indica
15 en el ejemplo 1.
- El ADN gag. El gen gag (SEQ ID N°1) se ha clonado en el plásmido de expresión eucariótica pCMV. Las preparaciones de ADN sin endotoxinas y en gran cantidad se han realizado con el kit de gigaprep endotoxine-free de Marcherey-Nagel. El ADN sirve de control positivo, ya que es sabido que en el ratón la administrtración por vía
20 intramuscular de ADN no permite inducir una buena respuesta citotóxica (CTL).

3. Inmunizaciones

30 ratones recibieron 2 dosis de los inmunógenos descritos en el punto 2 anterior a las 0 y 3 semanas. Las composiciones vacunales recibidas por cada grupo de ratones se indican en la siguiente tabla 7. Todas las inyecciones se realizaron por vía subcutánea salvo para el
25 ADN que se ha administrado por vía intramuscular.

Tabla 7

Dosis 1 ^{era} inyección semana 0	Dosis 2 ^a inyección semana 3	Números de ratones	Composición
MVA gag 10 ⁷ pfu	PLA/p24 40 µg	5	B
PLA/p24 40 µg	MVA gag 10 ⁷ pfu	5	C
MVA gag 10 ⁷ pfu	Alum/p24 40 µg	5	K
Alum/p24 40 µg	MVA gag 10 ⁷ pfu	5	L
PLA/p24 40 µg	ADN gag 5 µg (IM)	5	G

Alum/p24 40 µg	ADN gag 5 µg (IM)	5	M
----------------	-------------------	---	---

Pfu = plaque forming units, es la unidad de medición de la dosis de MVA usada. La valoración viral se expresa en pfu según la técnica de dosificación del stock viral usado.

Los animales se sacrificaron 6 semanas después de la primera inyección y se extrajo la sangre y el bazo para los análisis inmunológicos.

5 4. Análisis inmunológicos

Realizados según los mismos protocolos que en el ejemplo 1. Además, se han medido las respuestas humorales dirigidas contra el MVA utilizando una técnica ELISA. El protocolo es idéntico al utilizado para ELISA anti-p24, salvo que se ha utilizado un lisado de MVA en captura.

10 5. Resultados

5.1..La respuesta ELISPOT IFN- γ contra el péptido Gag AMQ

15 La figura 13 representa las respuestas ELISPOT IFN- γ específicas del péptido Gag AMQ. El eje de las ordenadas representa el número medio de células que secretan IFN- γ de manera específica en respuesta a una estimulación de 18 horas por el péptido Gag AMQ sobre un millón de células estimuladas. Esta respuesta se ha determinado individualmente para cada ratón. El número representado en este gráfico corresponde a una media calculada a partir de todos los ratones de un grupo (n=5)

20 Las respuestas ELIPSOT IFN- γ obtenidas durante este experimento son más bajas que de costumbre. Esta bajada se observa a la vez para los grupos ensayados y los grupos de control, y se liga al desarrollo del experimento. De hecho, como se pretende comparar las diferentes combinaciones entre sí, este experimento sigue siendo interpretable y muestra claramente que la composición PLA/p24 + MVA gag (C) induce una mejor secreción de IFN- γ medida por ELISPOT que los otros grupos ensayados, a saber MVA gag + PLA/p24 (B) MVA gag + Alum/p24 (K), alum/p24+MVA gag (L).

25 *5.2 La respuesta ELISPOT IL-4 contra la proteína p24*

30 La figura 14 representa las respuestas ELISPOT IL-4 específicas de la proteína p24. El eje de las ordenadas representa el número medio de células que secretan IFN- γ de manera específica en respuesta a una estimulación de 42 horas por la proteína p24 sobre un millón de células estimuladas. Esta respuesta se ha determinado individualmente para cada ratón. El número representado en este gráfico corresponde a la media calculada a partir de todos los ratones de un grupo (n=5).

Para la inducción de una respuesta ELISPOT de tipo IL-4, el mejor inmunógeno está constituido por la asociación MVA gag y PLA/p24 (B y C). Sea cual sea el orden de administración de esta composición, las respuestas IL-4 obtenidas son superiores a las

inducidas por las composiciones MVA gag + Alum/p24 (sea cual sea el orden) (K y L), PLA/p24 + ADN gag (G) y Alum/p24 + ADB gag (M). En referencia a hora al orden de administración de los productos, es siempre la composición PLA/p24 + MVA gag (C) la que da mejores resultados que la combinación inversa, MVA gag + PLA/p24 (B).

5.3. Respuestas humorales específicas de la proteína p24

La figura 15 representa la cinética de aparición de las respuestas humorales específicas de la proteína p24. El eje de las ordenadas representa la valoración en IgG anti-p24 medida por ELISA de captura p24; la escala de este eje es algorítmica. La valoración en anticuerpos se ha determinado individualmente para cada ratón. El número presentado en este gráfico corresponde a la media geométrica calculada a partir de todos los ratones de un grupo (n=5). S2 = semana 2, S4 = semana 4, S6 = semana 6.

Para la inducción de una respuesta de anticuerpos específica de la proteína p24, el mejor inmunógeno está constituido de nuevo por la asociación MVA gag y PLA/p24 (B y C). Sea cual sea el orden de administración de esta composición, las valoraciones de IgG anti-P4 obtenidas son del 0,6 a 1,2 log más elevadas en la semana 6 que las inducidas por las combinaciones MVA gag + Alum/p24 (sea cual sea el orden) (K y L), PLA/p24 + ADN gag (G) y Alum/p24 + ADB gag (M). En referencia ahora al orden de administración de los productos, es siempre la composición PLA/p24 + MVA gag (C) que da mejores resultados que la combinación inversa, MVA gag + PLA/p24 (B), pero solamente de 0,4 log.

5.4. La respuesta humoral específica del virus MVA

La figura 16 representa la cinética de aparición de las respuestas humorales específicas del virus MVA. El eje de las ordenadas representa la valoración en IgG anti-MVA medida por ELISA de captura MVA. La valoración en anticuerpos se ha determinado individualmente para cada ratón. El número presentado en este gráfico corresponde a la media geométrica calculada a partir de todos los ratones de un grupo (n=5). S2 = semana 2, S4 = semana 4, S6 = semana 6.

En los grupos PLA/p24 + MVAgag (C) y Alum/p24 (L), el MVA se ha administrado en la semana 3. Como se puede ver en la figura 16, la respuesta anti-MVA no ha tenido tiempo de establecerse en el momento del análisis, en la semana 6. Sin embargo, en los grupos que han recibido la inyección de MvVA en primer lugar, el posible medir la respuesta anti-vector. Sorprendentemente, a partir de las 4 semanas, la respuesta anti-MVA es mucho más baja en el grupo MVAgag + PLA/p24 (B) que en el grupo MVAgag + Alum/p24 (K). Además, con la combinación MVAgag + PLA/p24 la valoración anti-MVA no aumenta con el tiempo, lo cual no es el caso con la combinación MVAgag + Alum/p24.

En asociación con el MVA, los PLA permiten limitar la respuesta de anticuerpos anti-MVA mientras que este no es el caso de la asociación MVA + Alum. Se trata de una propiedad muy interesante y muy útil para aplicaciones de inmunización y de vacunación.

Conclusión:

5 Las composiciones según la invención PLA/p24 y MVA permiten inducir mejores respuestas celulares y humorales que las composiciones Alum/p24 y MVA_{gag}. Además, permiten limitar la respuesta anti-vector.

Ejemplo 4: Administración de las composiciones vacunales PLA/p24 y MVA_{gag} por vía intranasal

10 **1. Modelo animal**

Los experimentos de inmunización se han realizado en ratones BALB/c (H-2^d) hembras de 6 a 8 semanas en el momento de la primera inmunización.

2. Inmunógenos administrados

15 En esta serie de experimentos se han utilizado solos o en combinación los siguientes inmunógenos:

- las micropartículas PLA/p24 preparadas según el protocolo de desplazamiento de disolvente y de adsorción de la solicitud de patente W02005/027871.
- el virus MVA gag (Modified Vaccinia Ankara, virus de la vacuna modificada de la cepa Ankara) que es recombinante para el gen gag del virus VIH-1, que codifica la proteína p24. El virus recombinante se ha construido en Transgene, como se ha indicado anteriormente.

20

3. Inmunizaciones

10 ratones recibieron 3 dosis de los inmunógenos descritos en el punto 2 anterior a los 0 10 y 20 días. Las composiciones vacunales recibidas por cada grupo de ratones se indican en la siguiente Tabla 8. Todas las inyecciones se han realizado por vía intranasal.

25

Tabla 8

Dosis 1 ^{era} inyección día 0	Dosis 2 ^a inyección día 10	Dosis 3 ^a inyección día 20	Número de ratones
PLA/p24 20 µg	PLA/p24 20 µg	MVA gag 10 ⁷ pfu	5
MVA gag 10 ⁷ pfu	MVA gag 10 ⁷ pfu	PLA/p24 20 µg	5

Pfu = plaque forming units, es la unidad de medición de la dosis de MVA usada. La valoración viral se expresa en pfu según la técnica de dosificación del stock viral usado.

30 Los animales se sacrificaron 32 días después de la primera inyección. Se extrajeron las secreciones vaginales, las heces, el bazo y el aparato genital (vagina) para los análisis inmunológicos.

4. Análisis inmunológicos

Realizados según los mismos protocolos que en el ejemplo 1.

5. Resultados

Recapitulación de los datos experimentales.

5 Tabla 9

	PLA/24		MVAgag	
	PLA/24		MVAgag	
	MVAgag		PLA/24	
	Número de ratones que han desarrollado una respuesta CIL		2/5	2/5
10	% medio de lisis de los ratones CTL+		50%	45%
	El ELISPOT mide el número de células que secretan la citoquina por 10 ^E 6 células analizadas			
	ELISPOT IFN- γ , AMQ, sangre		155	79
	ELISPOT IFN- γ , p24, sangre		146	94
15	ELISPOT IL-4, AMQ, sangre		50	10
	ELISPOT IL-4, p24, sangre		126	32
	ELISPOT IFN- γ , AMQ, vaginal		1550	754
	ELISPOT IL-4, AMQ, vaginal		0	0
	ELISPOT IL-4, p24 vaginal		0	0
20	Valoración en IgG anti—p24 del suero (determinado por ELISA)		68000	200 000
	Valoración en IgA anti—p24 de las secreciones vaginales determinado por ELISA)		18	8
	Valoración en IgG anti—p24 de las secreciones vaginales determinado por ELISA)		124	616
25	IgA anti-p24 en las heces (Absorbancia a 450 nm, determinada por ELISA)		J20 0,20 J32 0,02	J20 0,18 J32 0,03
	IgGA anti-p24 en las heces (Absorbancia a 450 nm, determinada por ELISA)		J20 0,17 J32 0,69	J20 0,17 J32 0,60
30				

La administración de las combinaciones PLA/p24 y MVAgag por vía intranasal permite inducir a la vez una respuesta sistémica medida en la muestras de sangre y de bazo, y una respuesta inmune periférica al nivel de las mucosas, en particular al nivel del tracto urogenital. Cada vez, se activan los dos brazos del sistema inmunitarios: se ha podido poner de manifiesto al nivel de estos dos sitios respuestas inmunes celulares y humorales dirigidas contra la

proteína p24. La capacidad para inducir una amplia respuesta periférica al nivel del tracto urogenital constituye un punto a favor considerable para las combinaciones PLA/p24 y MVA_{gag} en las aplicaciones vacunales con objetivo profiláctico o terapéutico.

Ejemplo 5 Inmunización de ratones con la combinación vacunal de micropartículas PLA/beta-gal y virus MVA beta-gal

1.- Modelo animal

Los experimentos de inmunización se han realizado en ratones BALB/c (H-2^d) hembras de 6 a 8 semanas en el momento de la primera inmunización

2. Inmunógenos administrados

En esta serie de experimentos se han utilizado solos o en combinación los siguientes inmunógenos:

- las micropartículas PLA/beta-gal preparadas según el protocolo de desplazamiento de disolvente y de adsorción de la solicitud de patente W02005/027871.
- el virus MVA beta-gag (Modified Vaccinia Ankara, virus de la vacuna modificada de la cepa Ankara) que es recombinante para el gen lacZ de *E. coli* que codifica la enzima beta-galactosidasa (beta-gal). El virus recombinante se ha construido en Transgene, y producido y purificado como se ha indicado anteriormente.

3. Inmunizaciones

35 ratones recibieron 2 dosis de los inmunógenos descritos en el punto 2 anterior a las 0 y 3 semanas. Las combinaciones vacunales recibidas por cada grupo de ratones se indican en la siguiente Tabla 10. Todas las inyecciones se han realizado por vía subcutánea.

Tabla 10

Código	Dosis 1 ^a inyección semana 0	Dosis 2 ^a inyección semana 3	Número de ratones
M	PLA/beta-gal 40 µg	PLA/p24 40 µg	5
N	MVA beta-gal 10 ⁷ pfu	MVA beta-gal 10 ⁷ pfu	5
O	PLA/beta-gal 40 µg	MVA beta-gal 10 ⁷ pfu	5
P		PLA/beta-gal 40 µg	5
Q	PLA/beta-gal 40 µg + MVA beta-gal 10 ⁷ pfu		5
R		PLA/beta-gal 40 µg + MVA beta-gal 10 ⁷ pfu	5
S	PLA/beta-gal 40 µg + MVA beta-gal 10 ⁷ pfu	PLA/beta-gal 40 µg + MVA beta-gal 10 ⁷ pfu	5

Pfu = plaque forming units, es la unidad de medición de la dosis de MVA usada. La valoración viral se expresa en pfu según la técnica de dosificación del stock viral usado.

Los animales se sacrificaron 6 semanas después de la primera inyección y se extrajeron la sangre y el bazo para los análisis inmunológicos.

5 4. Análisis inmunológicos

Se ha buscado la respuesta humoral y la respuesta celular como sigue:

- Respuesta celular: después del sacrificio de los ratones, se han extrajeron los bajos de manera estéril para preparar una suspensión celular. El ELISPOT permite determinar e número de células que secretan una citoquina dada en respuesta a un estímulo específico. Se ha prestado interés a la citoquina IFN- γ de tipo Th1. Las suspensiones celulares obtenidas a partir de los bazos se han reestimulado *in vitro* por el péptido TPH (TPHPARIGL – SEQ ID N°3) durante 20 horas para analizar las respuestas de tipo CD8. Las placas de ELISPOT de 96 pocillos con membranas de PVDF (Multiscreen IP, Millipore) se han recubierto por un anticuerpo anti-IFN- γ . Durante la reestimulación, las suspensiones de los esplenocitos se han incubado en estas placas para capturar las citoquinas secretadas por cada célula. Los spots que corresponden a cada célula que secreta la citoquina de interés han sido revelados por un anticuerpo de detección biotinilado específico de la citoquina de interés.
- Respuesta humoral: se ha efectuado una toma de muestra de sangre en los ratones antes de su sacrificio. La presencia de los anticuerpos anti-beta-gal se ha determinado por ELISA. La proteína beta-gal se ha utilizado en captura y los anticuerpos específicos presentes en el suero han sido capturados por un anticuerpo policlonal antiratón como valoración de anticuerpo de detección que es un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón AffiniPure conjugado a la peroxidasa de Raifort (H+L, Jackson Inmunoresearch, Cat nº 115-035-062). La valoración es la inversa de la dilución para la cual se obtiene una absorbancia de 0,1 unidad DO con el protocolo ELISA usado.

5. Resultados

5.1. La respuesta ELISPOT IFN- γ contra el péptido beta-gal TPH

Los resultados se presentan en la figura 17 que da las respuestas ELISPOT IFN- γ específicas del péptido beta-gal TPH. El eje de las ordenadas representa el número medio de células que secretan IFN- γ de manera específica en respuesta a una estimulación de 18 horas por el péptido beta-gal TPH sobre un millón de células estimuladas. Esta respuesta se ha determinado individualmente para cada ratón. El número representado en este gráfico corresponde a una media calculada a partir de todos los ratones de un grupo (n=5)

Estos resultados ponen de manifiesto que es posible clasificar las combinaciones vacunales en varias categorías en función de las respuestas ELIPSOT IFN- γ obtenidas. Las mejores respuestas son inducidas por las combinaciones PLA + MVA en inyección separada (O) o en dos inyecciones simultáneas (S). Se han obtenido respuestas intermedias con una sola inyección de PLA – MVA al mismo tiempo (grupos Q y R). Las respuestas más bajas se observan con los grupos que no contienen más que un solo inmunógeno PLA únicamente (M) o MVA únicamente (N).

De este modo, en el modelo beta-galactisidasa también, se ha podido demostrar que la combinación vacunal PLA + MVA era mejor que la combinación MVA + MVA para inducir una secreción de IFN- γ específica del péptido TPH. Además, el orden de inyección parece también tener una importancia ya que entre todas las combinaciones PLA + MVA ensayadas, es el grupo O, PLA y a continuación MVA el que ha permitido obtener el mejor resultado. Se ha de observar que es también la misma combinación que se había revelado como la más eficaz en el modelo p24 (ejemplo 1)

5.2 La respuesta humoral específica de la proteína beta-gal

Los resultados se presentan en la figura 18 que compara la cinética de aparición de las respuestas humorales específicas de la proteína beta-gal. El eje de las ordenadas representa la valoración en IgG anti-beta-gal medida por ELISA de captura beta-gal; la escala de este eje es logarítmica. La valoración en anticuerpo se ha determinado individualmente para cada ratón. El número representado en este gráfico corresponde a una media calculada a partir de todos los ratones de un grupo (n=5). S3 = semana 3, S6 = semana 6.

Estos resultados muestran que las mejores respuestas humorales se obtienen para el grupo PLA + MVA (N). Las valoraciones inducidas en los ratones que han recibido PLA y MVA en cada inyección (S) son comparables. En los grupos O, P, Q y R, las valoraciones son más bajas en aproximadamente un log. Entre todas las combinaciones ensayadas, el pero inductor de anticuerpos anti-beta-gal, es MVA+MVA. En el modelo beta-galactosidasa, como en el modelo p24, todas las combinaciones que contienen MVA y PLA inducen una valoración elevada, superior en un log a la valoración inducida por MVA solo.

Como en el ejemplo 1 (p24), cambiar una inyección de PLA por una MVA en un esquema de vacunación no perjudica mucho las valoraciones en anticuerpos obtenidas pero permite ampliar las respuestas celulares respecto de las que son generadas únicamente por un vector PLA.

Incluso si la inmunización PLA + MVA (S) no permite inducir la mejor respuesta inmune según cada tipo de respuesta analizada, globalmente es el grupo para el cual se observan las mayores respuestas y las más intensas.

Ejemplo 6: Inmunización de ratones con la combinación vacunal de micropartículas CPL/p24 y virus MVA gag

1.- Modelo animal

Los experimentos de inmunización se han realizado en ratones BALB/c (H-2^d) hembras de 6 a 8 semanas en el momento de la primera inmunización.

2.- Inmunógenos administrados

En esta serie de experimentos se han utilizado solos o en combinación los siguientes inmunógenos:

- las micropartículas CPL utilizadas en este trabajo se forman por coprecipitación de dos polisacáridos; el quitosano (Mahtani chitosan PVT Batch 124) y el sulfato de dextrano (Sigma: 31404). Los dos polímeros se disuelven previamente en agua a pH 4 que contiene 50 mM de NaCl. Las soluciones se dejan con agitación magnética durante 12 horas antes de preparar las partículas. A continuación, se mezclan 20 ml de la solución de quitosano al 0,1% (masa molar de 105000 g/mol y de un grado de acetilación 9) con 9,35 ml de solución de sulfato de dextrano al 0,1%. La solución con falta se vierte rápidamente en la solución con exceso con agitación magnética a 1000 rpm. La mezcla se deja 30 segundos en el agitador a 500 rpm, y a continuación se centrifuga durante 30 minutos a 7800 g. El sobrenadante se elimina por vuelco, se recupera el residuo en agua y a continuación se vuelve a centrifugar durante 30 minutos a 8000 g. Los residuos así obtenidos se recuperan en agua y se conservan a temperatura ambiente (granulómetro Coulter), y de carga (Zelasizer Malvem)
- Para la adsorción de la proteína p24 sobre CPL, la p24 a 1g/l en tampón fosfato 10 mM pH 5,7 se mezcla volumen por volumen con partículas CPL al 1% de tasa de sólido, es decir, al 0,5 final. Las muestras se agitan en una rueda a temperatura ambiente durante 20 horas. Después de la incubación, los tubos se recuperan y centrifugan 10 minutos a 1800 g a 20°C. Los sobrenadantes se recuperan y centrifugan 15 minutos a 3000 g a 20°C para eliminar las partículas que pueden quedar en suspensión, y a continuación se determina la concentración en proteína usando una dosificación BCA (kit BCA protein Assay: 23225). Los residuos se recuperan en 400 µl de tampón fosfato 10 mM. Las partículas obtenidas se caracterizan por una medición de la dimensión y de la carga.
- El virus MVA gag (Modified Vaccinia Virus Ankara, virus de la vacuna modificada, cepa Ankara), que es recombinante para el gen gag del virus VIH-1, que codifica la

proteína p24. El virus recombinante se ha construido en Transgene, y se ha producido y purificado como se ha descrito anteriormente.

3. Inmunizaciones

35 ratones recibieron 2 dosis de los inmunógenos descritos en el punto 2 anterior a las 0 y 3 semanas. Las combinaciones vacunales recibidas por cada grupo de ratones se indican en la siguiente Tabla 11. Todas las inyecciones se han realizado por vía subcutánea.

Tabla 11

Código	Dosis 1ª inyección semana 0	Dosis 2ª inyección semana 3	Número de ratones
T	CPL/p24 10 µg	CPL/p24 10 µg	5
U	MVA gag 10 ⁷ pfu	MVA gag 10 ⁷ pfu	5
V	CPL/p24 10 µg	MVA gag 10 ⁷ pfu	5
W	MVA gag 10 ⁷ pfu	CPL/p24 10 µg	5
X	CPL/p24 10 µg + MVA gag 10 ⁷ pfu		5
Y		CPL/p24 10 µg + MVA gag 10 ⁷ pfu	5
Z	CPL/p24 10 µg + MVA gag 10 ⁷ pfu	CPL/p24 10 µg + MVA gag 10 ⁷ pfu	5

Pfu = plaque forming units, es la unidad de medición de la dosis de MVA usada. La valoración viral se expresa en pfu según la técnica de dosificación del stock viral usado.

Los animales se sacrificaron 6 semanas después de la primera inyección y se extrajeron la sangre y el bazo para los análisis inmunológicos.

4.- Análisis inmunológicos

Realizados según los mismos protocolos que en el ejemplo 1.

5. Resultados

5.1. La respuesta ELISPOT IFN- γ contra el péptido gag AMQ

Los resultados se presentan en la figura 19 que da las respuestas ELISPOT IFN- γ específicas del péptido p24 AMQ. El eje de las ordenadas representa el número medio de células que secretan IFN- γ de manera específica en respuesta a una estimulación de 18 horas por el péptido p24 AMQ sobre un millón de células estimuladas. Esta respuesta se ha determinado individualmente para cada ratón. El número presentado en este gráfico corresponde a la media calculada a partir de todos los ratones de un grupo (n=5).

Estos resultados muestran que es posible clasificar las combinaciones vacunales en varias categorías en función de las respuestas ELISPOT IFN- γ obtenidas. La mejor respuesta es inducida por la combinación MVA + MVA (U). La segunda categoría contiene las

combinaciones CPL + MVA, en inyección separada (V) o en dos inyecciones simultáneas (Z). Una sola inyección simultánea de CPL y MVA (X e Y no es suficientemente eficaz para inducir una respuesta ELISPOT IFN- γ elevada. Finalmente, la combinación CPL + CPL (T) es la menos eficaz.

5 Como para la asociación PLA + MVA, la asociación CPL + MVA es eficaz para inducir una secreción de IFN- γ específica del péptido AMQ. La inyección simultánea de los dos inmunógenos no permite sin embargo, mejorar las prestaciones respecto de la administración separada de 3 semanas (Z vs V).

5.2 La respuesta humoral específica de la proteína p24

10 Los resultados se presentan en la figura 20 que compara la cinética de aparición de las respuestas humorales específicas de la proteína p24. El eje de las ordenadas representa la valoración en IgG anti-p24 medida por ELISA de captura p24; la escala de este eje es logarítmica. La valoración en anticuerpos se ha determinado individualmente para cada ratón. El número presentado en este gráfico corresponde a la media calculada a partir de todos los ratones de un grupo (n=5). S3 = semana 3, S6 = semana 6.

15 Los resultados muestran que, para los grupos que han recibido 2 inyecciones, todas las combinaciones que contienen CPL y MVA (V, W, Z) o CPL solo (T) inducen una valoración elevada (10^E6), superior en 2-3 log a la valoración inducida por MVA solo. Sin embargo, CPL + MVA (V) es más eficaz que el orden de inyección inverso (W). En los grupos que no han recibido más que una sola inyección de CPL y MVA (X e Y), las valoraciones en anticuerpos son más bajas, pero, sin embargo, superiores a lo que se obtiene con MVA solo.

20 Como para la asociación PLA + MVA, cambiar una inyección de CPL + MVA en un esquema de vacunación no perjudica las valoraciones en anticuerpos obtenidas sino que permite aumentar considerablemente las respuestas celulares respecto de las que se generan únicamente por un vector CPL

Conclusiones:

25 El conjunto de estos ejemplos ha permitido mostrar que la combinación de un vector sintético coloidal bioresorbible, tal como PLA, CPL, y de un vector viral, tal como MVA y adenovirus, permite inducir respuestas inmunes eficaces y amplias. Preferiblemente, para la mejor eficacia, la combinación se debería administrar en el orden, vector sintético y a continuación vector viral

Listado de secuencias

<110> bioMérieux

Centre National de la Recherche Scientifique

<120> Composición que comprende un vector sintético coloidal biorresorbible y un vector

<130> Primeboost

5 <150> 3

<170> Patentin Versión 3.3

<210> 1

<211> 432

<212> PRT

10 <213> Virus de Inmunodeficiencia Humana

```

Met Ala Ala Arg Ala Ser Ile Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp
1           5           10           15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Arg Tyr Lys Leu Lys
20           25           30

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro
35           40           45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu
50           55           60

Gln Pro Ala Ile Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Lys Ser Leu Tyr Asn
65           70           75           80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Val Lys Asp
85           90           95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Arg Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
100          105          110

Gln Lys Ala Gln Pro Ala Ala Ala Asp Lys Gly Asn Ser Ser Gln Ala
115          120          125

Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His
130          135          140

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu
145          150          155          160

Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
165          170          175

Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly
180          185          190

Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu
195          200          205
    
```

Ala Ala Glu Trp Asp Arg Leu His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala
 210 215 220

Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
 225 230 235 240

Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile
 245 250 255

Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
 260 265 270

Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly
 275 280 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
 290 295 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
 305 310 315 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
 325 330 335

Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
 340 345 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Ile Leu Ala Glu Ala Met Ser
 355 360 365

Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
 370 375 380

Asn Gln Arg Lys Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
 385 390 395 400

Ile Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
 405 410 415

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
 420 425 430

<210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Virus de Inmunodeficiencia Humana
 <400> 2

Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile
 1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus de Inmunodeficiencia Humana

Thr Pro His Pro Ala Arg Ile Gly Leu
 1 5

REIVINDICACIONES

- 1.- Composición farmacéutica que comprende:
- un vector sintético coloidal constituido por micropartículas bioresorbibles no tóxicas que comprende un antígeno proteico o varios antígenos proteicos, y
- 5 - un vector viral que comprende al menos una secuencia nucleotídica que codifica uno o más antígenos proteicos comprendidos en el vector sintético.
- 2.- Composición según la reivindicación 1, **caracterizado porque** las micropartículas se preparan a partir al menos un polímero elegido entre los poli(ácidos α -hidroxilados),
- 3.- Composición según la reivindicación 1, **caracterizado porque** las micropartículas se preparan a partir al menos un polímero natural.
- 10 4.- Composición según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** las micropartículas comprenden antígenos proteicos de tipos diferentes y constituyendo cada una un antígeno asociado a la misma enfermedad.
- 15 5.- Composición según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** comprende, como vector viral, un adenovirus o un poxvirus.
- 6.- Composición según la reivindicación 5, **caracterizado porque** el poxvirus es el virus de la vacuna modificada de Ankara.
- 7.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** los
- 20 antígenos proteicos son de origen viral.
- 8.- Composición según la reivindicación 7, **caracterizado porque** los antígenos proteicos de origen viral son proteínas del virus VIH.
- 9.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque el antígeno proteico es un antígeno asociado a los tumores.
- 25 10.- Uso de la composición tal como se define en las reivindicaciones 1 a 9 para la preparación de una vacuna profiláctica o terapéutica.
- 11.- Uso de la composición según la reivindicación 10 en el cual la vacuna es para la administración en el tratamiento o la prevención de las infecciones virales.
- 12.- Uso de la composición según la reivindicación 10 en el cual la vacuna es para la
- 30 administración en el tratamiento o la prevención de un cáncer.
- 13.- Kit farmacéutico que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 14.- Kit farmacéutico según la reivindicación 13, para la administración simultánea, separada o escalonada del vector sintético y del vector viral.

15.- Kit farmacéutico según la reivindicación 14, para la administración escalonada, siendo el vector sintético administrado antes que el vector viral.

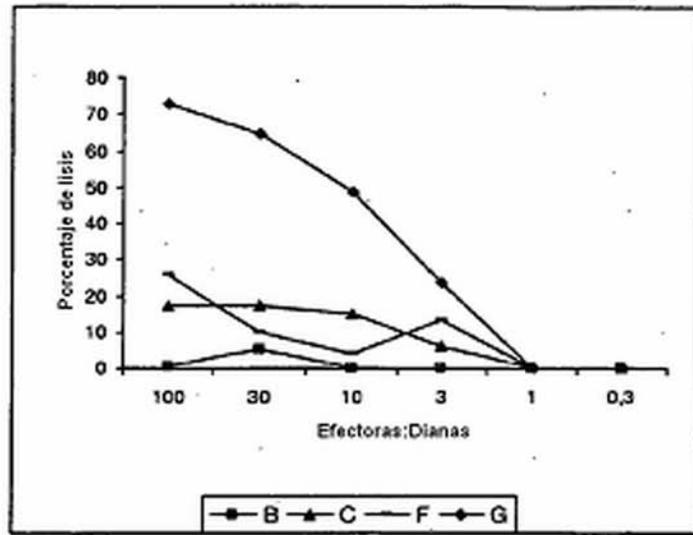


Figura 1

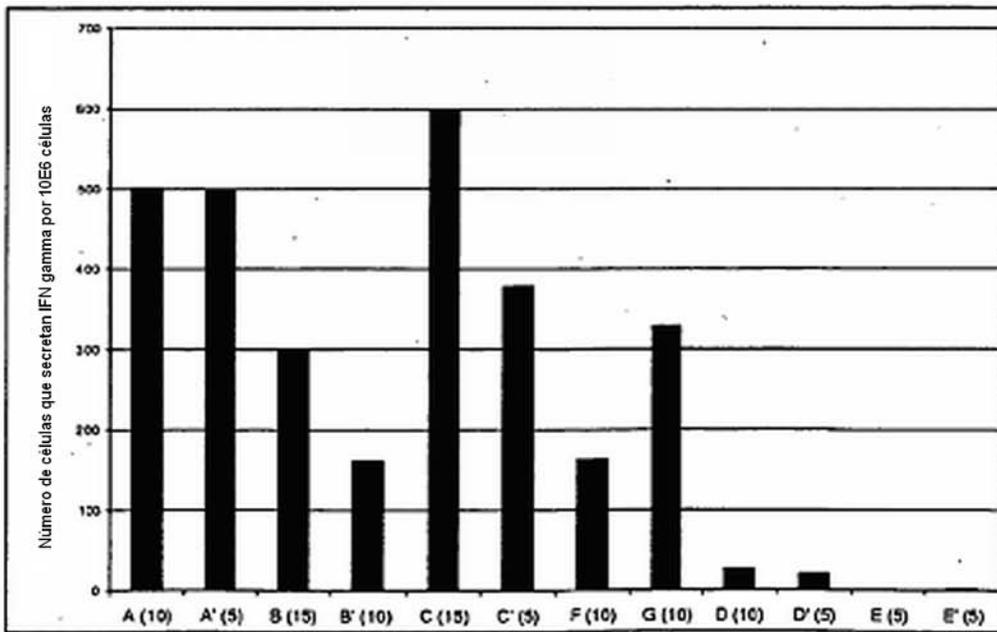


Figura 2

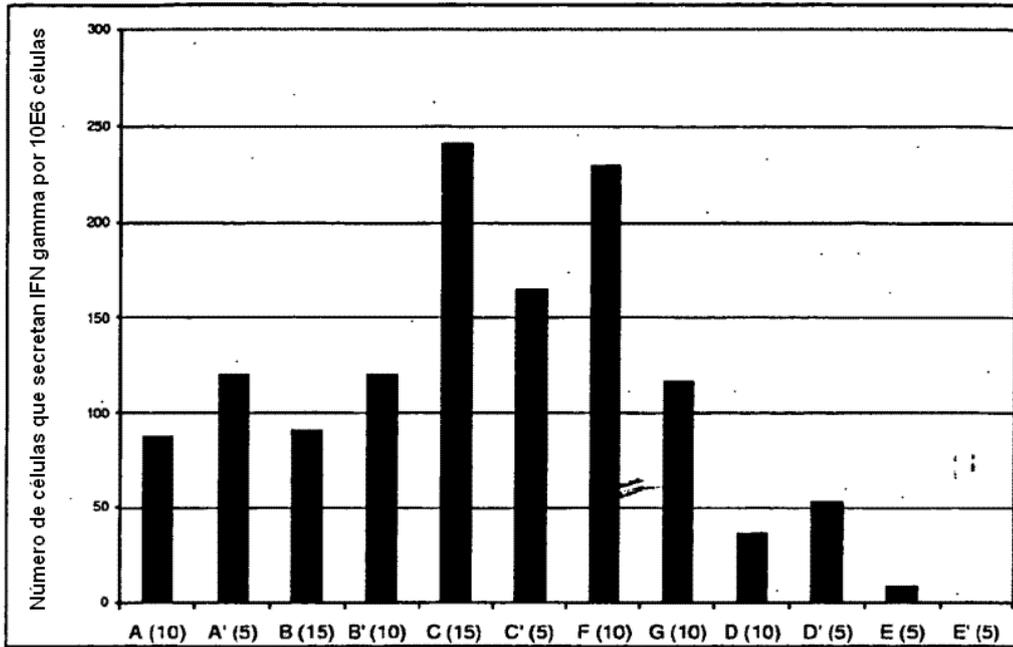


Figura 3

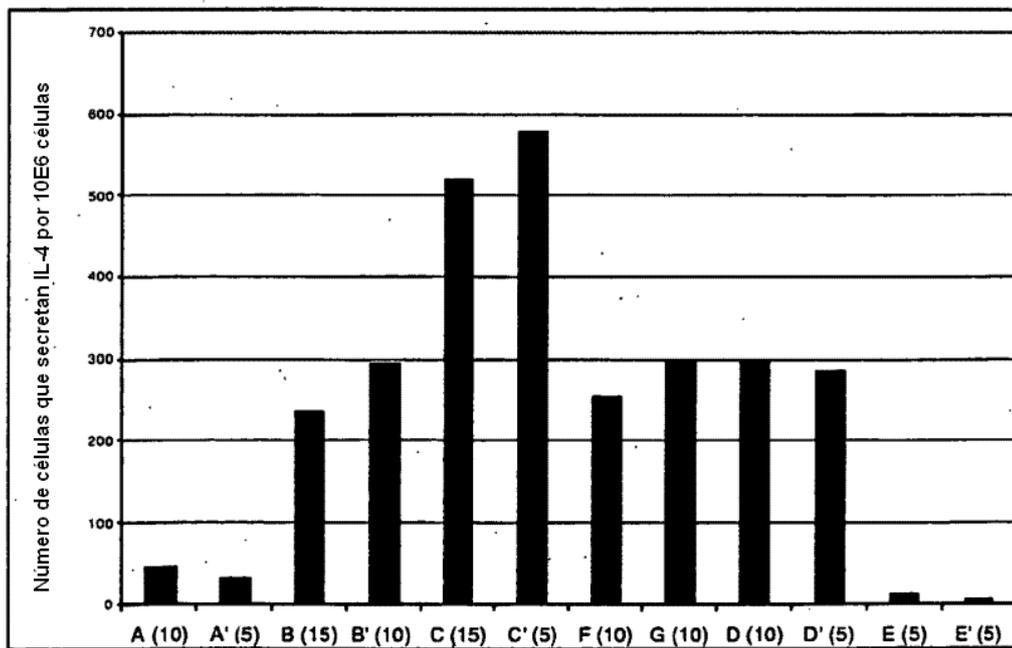


Figura 4

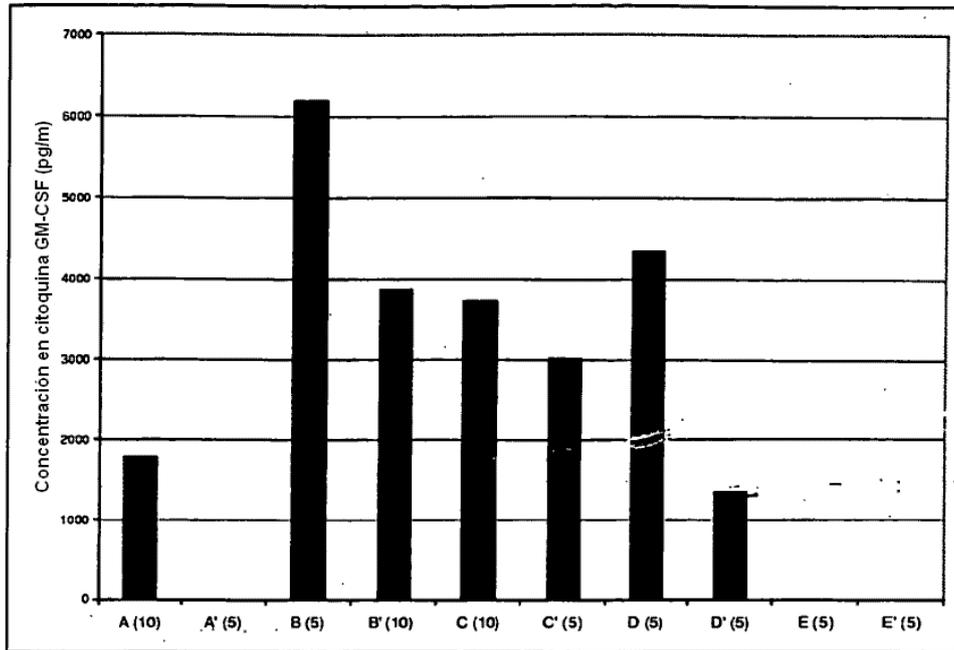


Figura 5

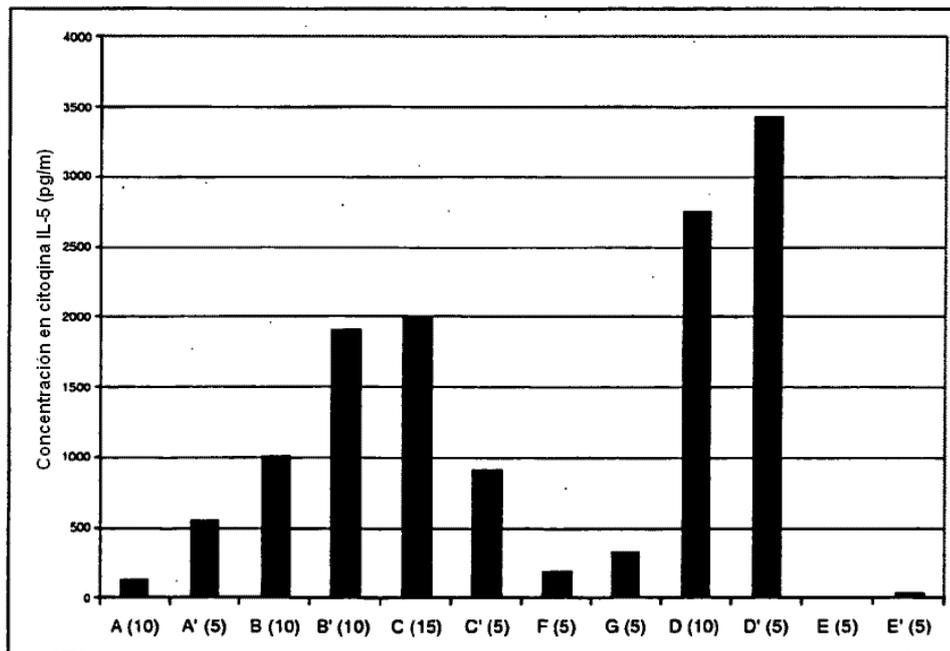


Figura 6

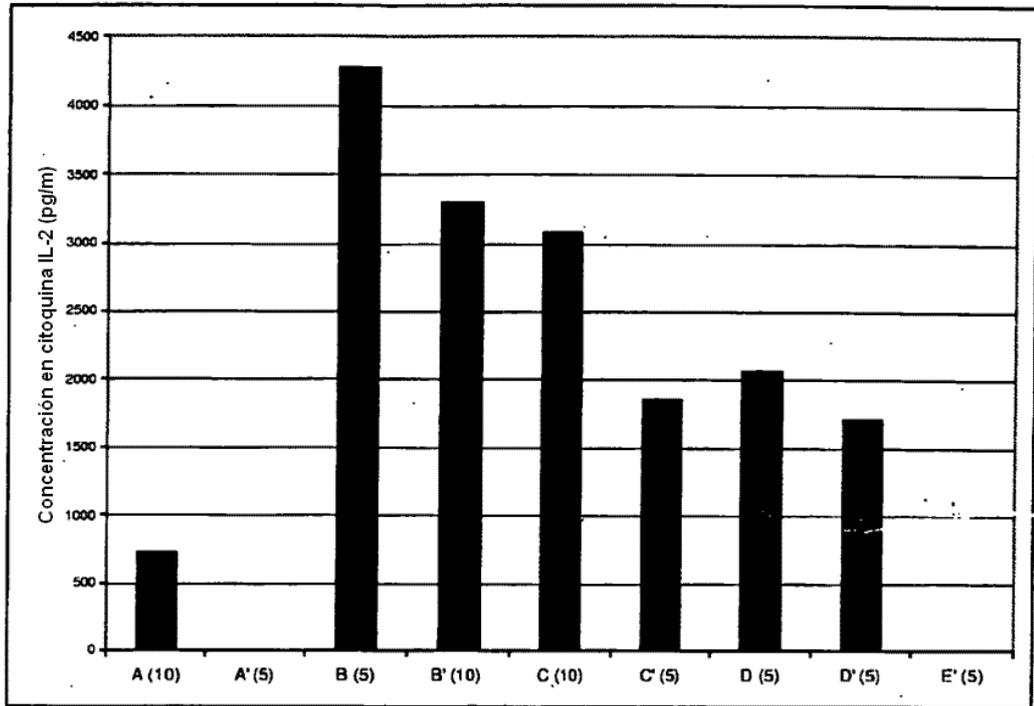


Figura 7

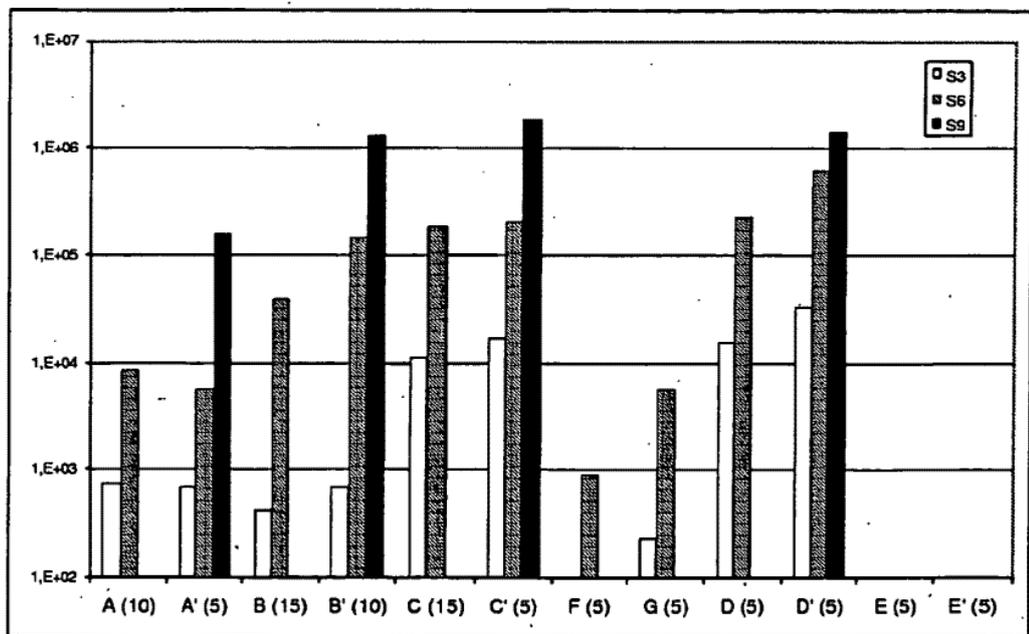


Figura 8

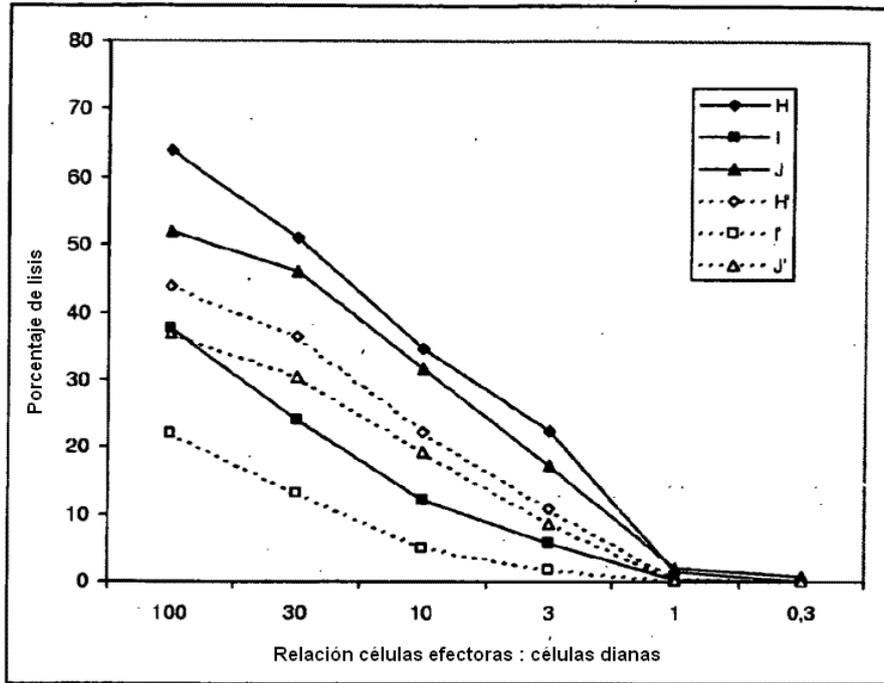


Figura 9

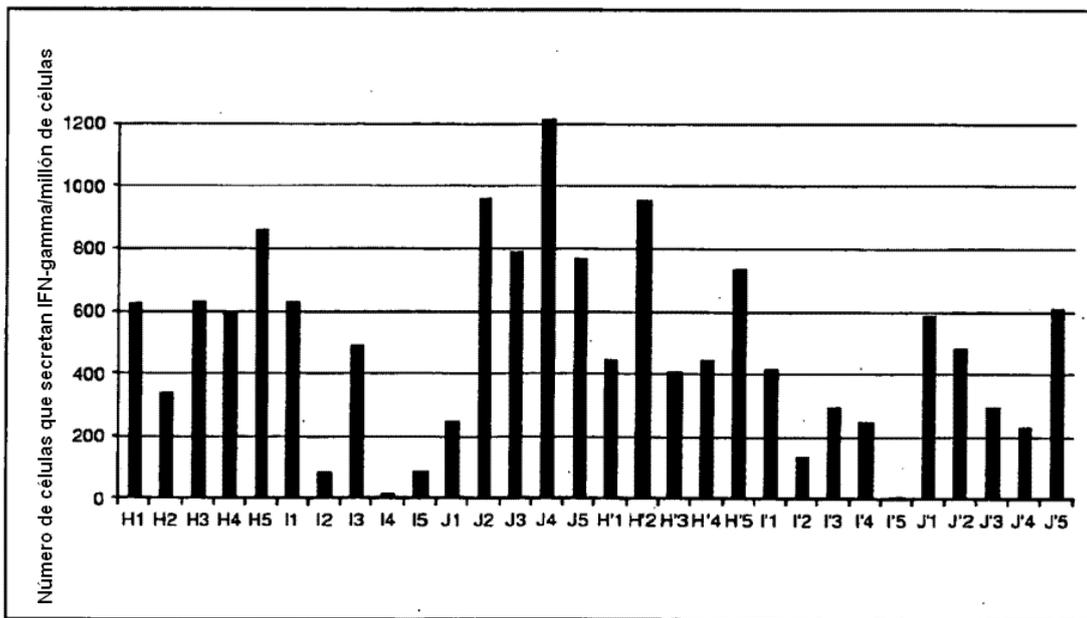


Figura 10

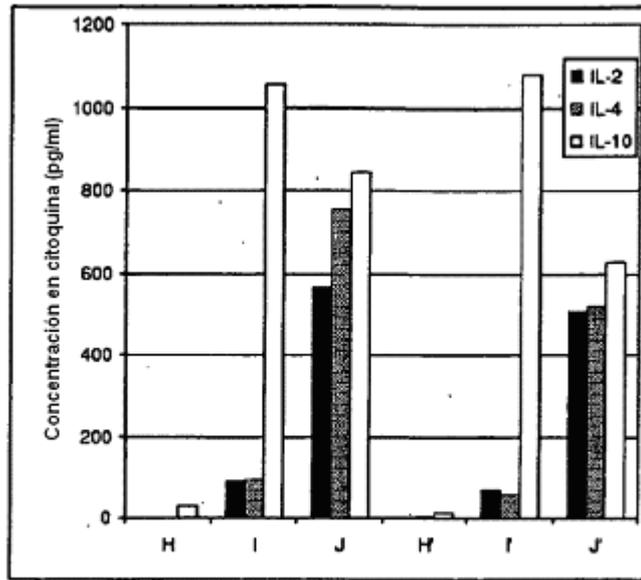


Figura 11

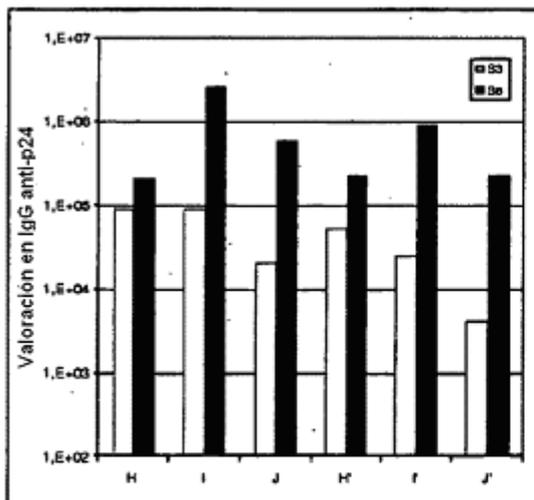


Figura 12 A

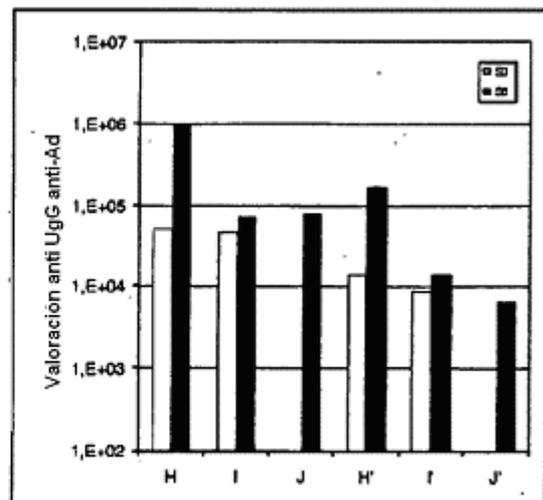


Figura 12 B

Figura 12

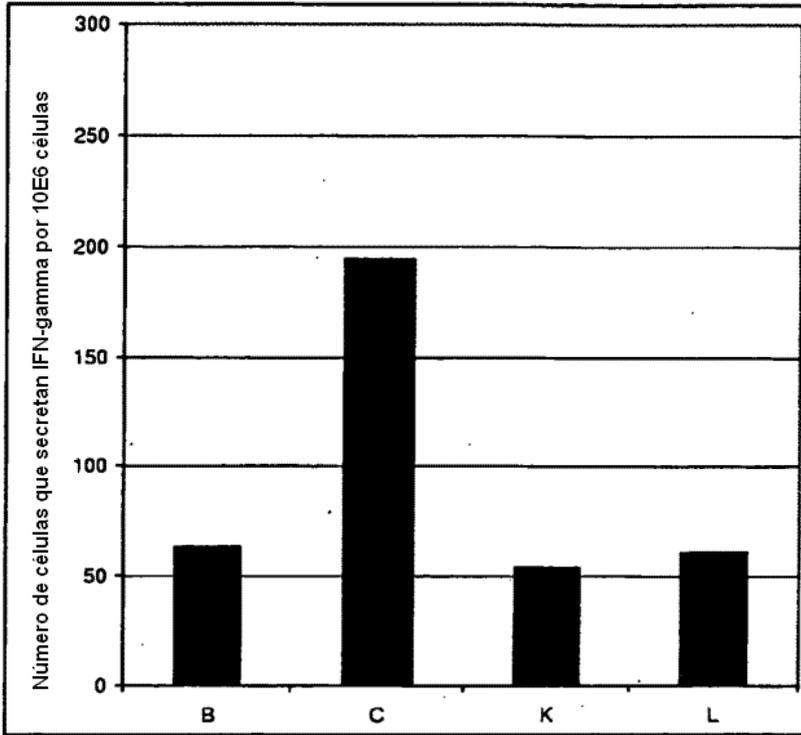


Figura 13

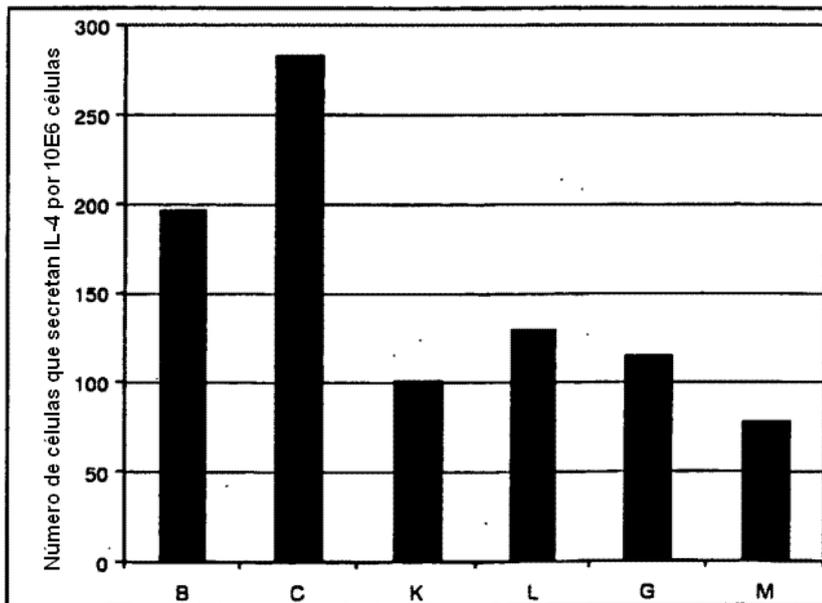


Figura 14

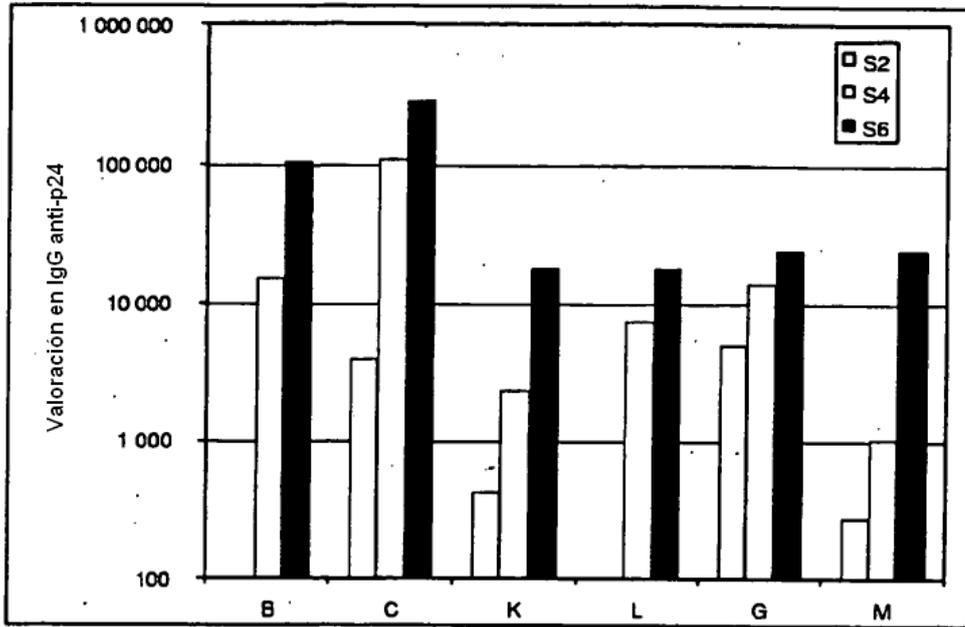


Figura 15

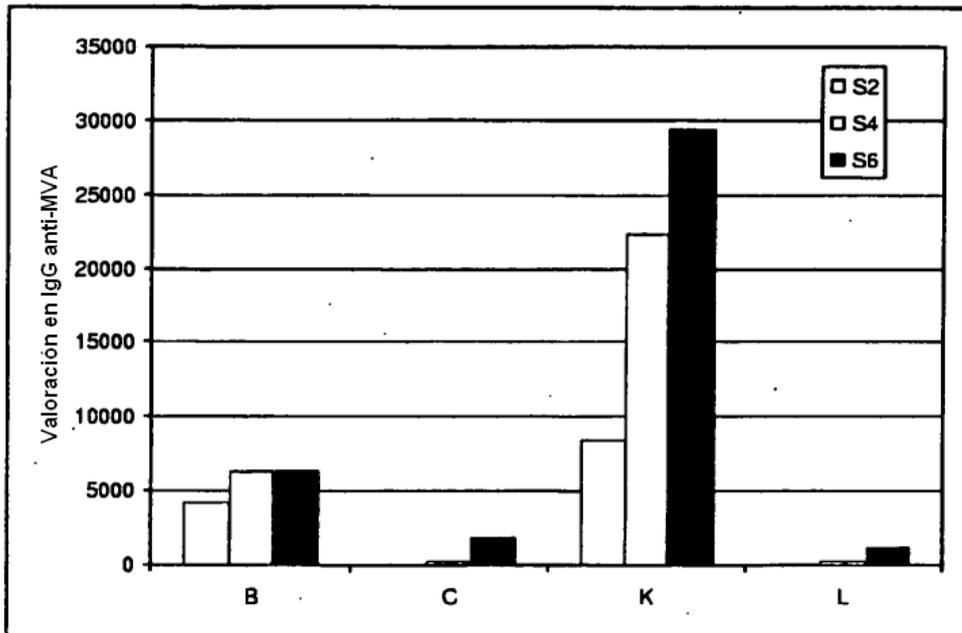


Figura 16

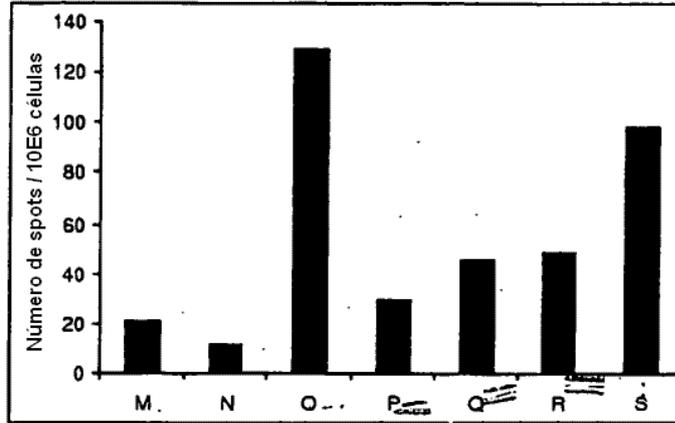


Figura 17

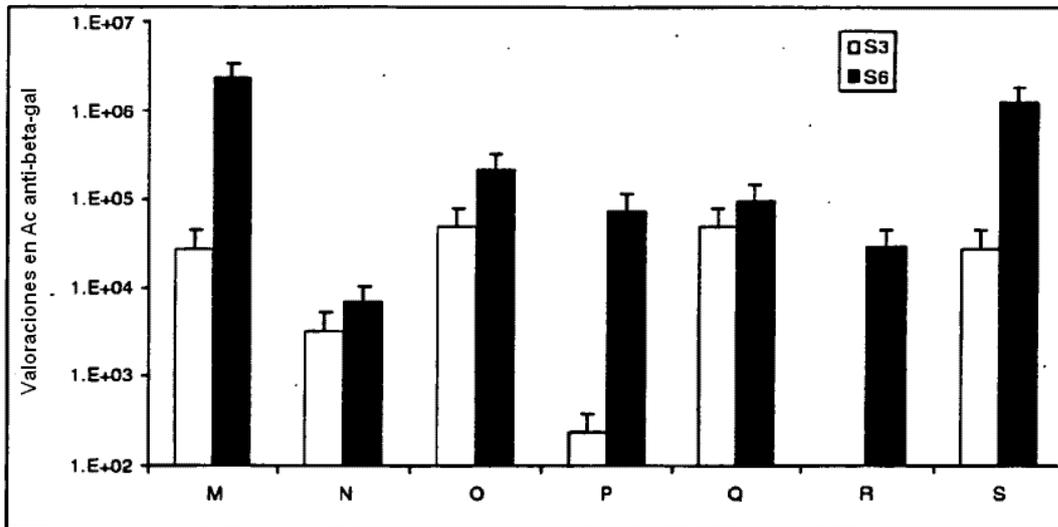


Figura 18

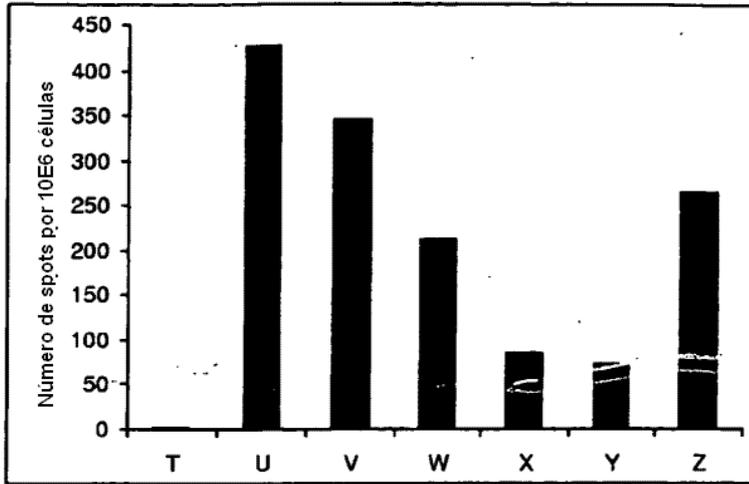


Figura 19

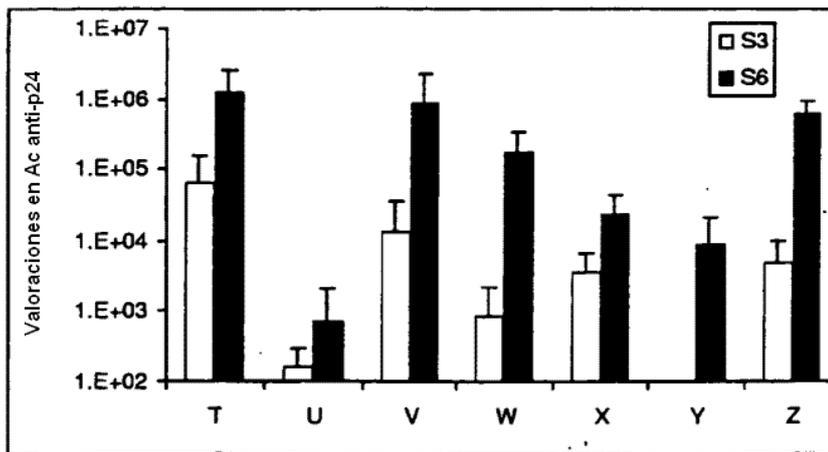


Figura 20