



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 625**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/155 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

A61K 39/35 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00930698 .6**

96 Fecha de presentación : **12.05.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1178825**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.02.2002**

54

Título: **Formulaciones de combinaciones de adyuvantes.**

30

Prioridad: **13.05.1999 US 133963 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.11.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.11.2011

73

Titular/es: **WYETH HOLDINGS CORPORATION**
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940, US

72

Inventor/es: **Hagen, Michael**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 625 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

Formulaciones de combinaciones de adyuvantes

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de monofosforil lípido A 3-O-desacilado o de monofosforil lípido A en combinación con factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos como formulación adyuvante en una composición antigénica para aumentar la respuesta inmune hacia un antígeno seleccionado en un huésped vertebrado.

Antecedentes de la invención

10 El sistema inmune usa una variedad de mecanismos para atacar a los patógenos. Sin embargo, no todos estos mecanismos se activan necesariamente tras la inmunización. La inmunidad protectora inducida por la inmunización depende de la capacidad de la vacuna para generar la respuesta inmune apropiada para resistir o eliminar el patógeno. En función del patógeno, esto puede requerir una respuesta inmune mediada por células y/o humoral.

15 El actual paradigma para el papel de los linfocitos T cooperadores en la respuesta inmune es que es posible separar los linfocitos T en subconjuntos en base a las citocinas que producen y que el perfil de las distintas citocinas observado en estas células determina su función. Este modelo de linfocitos T incluye dos subconjuntos principales: los linfocitos TH-1, que producen interleucina-2 (IL-2) e interferón gamma, que aumentan tanto la respuesta inmune celular como la humoral (anticuerpo); y los linfocitos TH-2, que producen interleucina-4, interleucina-5 e interleucina-10 (IL-4, IL-5 e IL-10, respectivamente), que aumentan las respuestas inmunes humorales (entrada bibliográfica n.º 1).

20 A menudo, es deseable aumentar la potencia inmunógena de un antígeno con el fin de obtener una respuesta inmune más potente en el organismo que esté siendo inmunizado y reforzar la resistencia del huésped al agente portador del antígeno. En algunos casos, es deseable cambiar la respuesta inmune de una respuesta predominantemente humoral (TH-2) a una respuesta celular (TH-1) y humoral (TH-2) más equilibrada.

25 Una respuesta celular implica la generación de una respuesta de los CTL (linfocitos T citotóxicos) CD8+. Tal respuesta es deseable para el desarrollo de vacunas contra patógenos intracelulares. La protección contra una variedad de patógenos requiere potentes respuestas en las mucosas, altos títulos en suero, la inducción de CTL y altas respuestas celulares. Estas respuestas no han sido proporcionadas por la mayoría de las preparaciones antigénicas, incluyendo las vacunas subunitarias convencionales. Entre tales patógenos se encuentra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

30 Así pues, existe la necesidad de desarrollar formulaciones de composiciones antigénicas que sean capaces de generar respuestas inmunes tanto humorales como celulares en un huésped vertebrado.

Resumen de la invención

35 Por consiguiente, un objeto de la presente invención consiste en utilizar formulaciones de combinaciones de adyuvantes en composiciones antigénicas que contienen monofosforil lípido A 3-O-desacilado (MPL™) o monofosforil lípido A combinado con factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Un adyuvante es una sustancia que aumenta la respuesta inmune cuando se administra junto con un inmunógeno o un antígeno. La formulación adyuvante de la presente invención se administra junto con un antígeno seleccionado en una composición antigénica. Las composiciones antigénicas de la presente invención aumentan la respuesta inmune hacia ese antígeno seleccionado en un huésped vertebrado. El antígeno seleccionado puede ser un polipéptido, péptido o fragmento derivado (1) de un virus, una bacteria, un hongo o un parásito patógeno, o (2) de una célula cancerosa o célula tumoral, o (3) de un alérgeno para interferir en la producción de IgE con el fin de moderar las respuestas alérgicas hacia el alérgeno o (4) de una proteína peptídica amiloide para prevenir o tratar una enfermedad caracterizada por la deposición amiloide en un huésped vertebrado. En una realización de la invención, el antígeno seleccionado procede del VIH. El antígeno del VIH seleccionado puede ser una proteína, un polipéptido, un péptido o un fragmento derivado de dicha proteína del VIH. En una realización particular de la invención, el antígeno del VIH es un péptido específico. En otras realizaciones de la invención, el antígeno seleccionado procede de *Neisseria gonorrhoeae* o virus respiratorio sincitial.

50 El MPL™ se puede presentar en forma de solución acuosa o de emulsión de aceite en agua estabilizada (emulsión estable o EE). En una realización preferida de la invención, la emulsión de aceite en agua contiene escualeno, glicerol y fosfatidilcolina. En la formulación de la EE, se mezcla el MPL™ con la citocina o la linfocina para formar la composición antigénica antes de su administración. No es necesario introducir el GM-CSF en la emulsión. En una realización preferida de la invención, el MPL™ se encuentra en forma de EE. La composición antigénica puede comprender además un diluyente o un vehículo.

También se revelan procedimientos para aumentar la capacidad de una composición antigénica que contiene un antígeno seleccionado (1) procedente de un virus, una bacteria, un hongo o un parásito patógeno para producir la respuesta inmune de un huésped vertebrado o (2) procedente de un antígeno canceroso o antígeno asociado a un tumor de una célula cancerosa o célula tumoral para producir un efecto terapéutico o profiláctico anticancerígeno en un huésped vertebrado, o (3) procedente de un alérgeno para interferir en la producción de IgE para moderar las respuestas alérgicas hacia el alérgeno o (4) procedente de una proteína peptídica amiloide para prevenir o tratar una enfermedad caracterizada por una deposición amiloide en un huésped vertebrado, mediante la inclusión de una cantidad adyuvante eficaz de una combinación de una citocina o linfocina, en concreto de MPL™ con GM-CSF o IL-12, o un agonista o antagonista de dicha citocina o linfocina.

También se revelan procedimientos para aumentar la capacidad de una composición antigénica que contiene un antígeno seleccionado procedente de un virus, una bacteria, un hongo o un parásito patógeno para producir linfocitos T citotóxicos en un huésped vertebrado mediante la inclusión de una cantidad adyuvante eficaz de una combinación de una citocina o linfocina, en concreto, MPL™ con GM-CSF o IL-12, o un agonista o antagonista de dicha citocina o linfocina.

15 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 representa los títulos finales recíprocos determinados de grupos de cinco ratones hembra Balb/c inmunizados con 25 µg de T1SP10MN(A)(-Cys), un péptido multiepitopo de 39 aminoácidos, formulado con CFA o IFA (triángulos), o con 50 µg de emulsión estable (EE) al 2% de MPL™ (cuadrados). Los ratones fueron inmunizados el día 0 y recibieron una vacuna de recuerdo el día 28. Se determinaron los títulos de IgG, IgG1 e IgG2a específicos del péptido de los sueros recogidos el día 42 mediante ELISA.

La Figura 2 representa el efecto de la EE sola, el MPL™ solo o la EE de MPL™ sobre las propiedades adyuvantes de GM-CSF en los títulos de IgG anti-T1SP10MN(A)(-Cys). Se inmunizaron grupos de cinco ratones Balb/c hembra con 25 µg de T1SP10MN(A)(-Cys) el día 0 y recibieron una vacuna de recuerdo el día 28 con las formulaciones adyuvantes indicadas. Se emulsionaron CFA e IFA con péptido acuoso a una proporción de 1:1. El GM-CSF se usó a 10 µg/dosis. Se administró MPL™ a los ratones a una concentración final de 50 µg en forma de una formulación acuosa o a 25 µg como parte de una emulsión estable con EE al 1%. Los títulos se determinaron dos semanas después de la segunda inmunización. Los datos representan títulos individuales determinados de cinco ratones.

La figura 3 representa los resultados de un análisis de neutralización viral. Se diluyeron (1/1600) los sueros mezclados obtenidos el día 42 de los ratones inmunizados los días 0 y 28 con las formulaciones indicadas y se añadieron a diluciones de VIH_{MN} adaptado a linfocitos T antes de su adición a células AA5 *in vitro*. Tras un cultivo de siete días, se analizó los sobrenadantes de los cultivos celulares por transcriptasa inversa viral como indicador de replicación viral.

La Figura 4 representa la proliferación de células de bazo de ratones inmunizados con T1SP10MN(A)(-Cys) y diversas formulaciones adyuvantes. Se estimularon las células de bazo *in vitro* durante cuatro días con 3,3 µg/ml de T1SP10MN(A)(-Cys). Los resultados se muestran como el cambio en la incorporación de timidina marcada como resultado de una estimulación *in vitro* con T1SP10MN(A)(-Cys) frente a la incorporación en ausencia de estimulación (cpm delta).

La Figura 5 representa la actividad CTL de células de bazo aisladas de ratones siete días después de la segunda inmunización. Las células de bazo se cosecharon de grupos de tres ratones Balb/c inmunizados los días 0 y 21 con 50 µg de T1SP10MN(A)(-Cys) formulado con 50 µg de MPL™ en EE al 1% con o sin 10 µg de GM-CSF. Las células se cultivaron con péptido epitopo CTL de VIH_{MN} durante siete días. Durante los últimos cinco días, se añadió IL-2 a los cultivos. Se añadieron células de bazo efectoras a células P815 marcadas con cromo pulsadas con VIH_{MN}, otra cepa designada VIH_{MN} o sin péptido en las proporciones indicadas. El porcentaje de la actividad CTL se calculó como:

$$\frac{\text{cpm liberada específicamente} - \text{cpm liberada espontáneamente}}{\text{cpm máxima total} - \text{cpm liberada espontáneamente}} \times 100$$

45

“E:D” significa proporción entre células efectoras y diana.

Descripción detallada de la invención

Los adyuvantes, las citocinas y las linfocinas son compuestos inmunomoduladores que tienen la capacidad de aumentar y dirigir el desarrollo y el perfil de las respuestas inmunes contra diversos antígenos que por sí mismos son poco inmunógenos. Una selección apropiada de los adyuvantes, las citocinas y las linfocinas puede producir buenas respuestas inmunes humorales y celulares que no se desarrollarían en ausencia de adyuvante, citocina o linfocina. En concreto, los adyuvantes, las citocinas y las linfocinas tienen efectos relevantes en el aumento de la respuesta inmune contra antígenos subunitarios y peptídicos en vacunas. Su actividad estimulante también es beneficiosa para el desarrollo de respuestas inmunes con especificidad antigénica dirigidas contra antígenos proteicos. Para una variedad de antígenos que requieren potentes respuestas en mucosas, altos títulos en suero, la inducción de CTL y altas respuestas celulares, las combinaciones de adyuvante y citocina/linfocina proporcionaron estímulos que no son proporcionados por la mayoría de las preparaciones antigénicas.

Numerosos estudios han evaluado diferentes formulaciones de adyuvantes en modelos animales, pero el alumbre (hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio) es actualmente el único adyuvante autorizado para un uso extendido en seres humanos. Hay un grupo de adyuvantes, emulsiones estables, constituido por diversas combinaciones de agua en aceite o de aceite en agua, que ha sido centro de atención en cuanto a su capacidad inmunopotenciadora. Estas formulaciones consisten en general en diversas combinaciones de aceites metabolizables o inertes que actúan para estabilizar y depositar el antígeno en la zona de la inyección. Uno de tales adyuvantes es adyuvante incompleto de Freund (IFA), que incluye aceite mineral, agua y un agente emulsionante. El adyuvante completo de Freund (CFA) es IFA más micobacterias matadas mediante calor. Un problema particular asociado al uso de estos tipos de adyuvantes ha sido la irritación en la zona de inyección, a menudo como resultado de infiltraciones de células mononucleares que provocan lesiones granulomatosas. Por lo tanto, se están investigando otros compuestos y formulaciones como posibles adyuvantes.

Uno de tales compuestos es el monofosforil lípido A 3-O-desacilado (MPL™), que se encuentra disponible en Ribit ImmunoChem Research Inc. (Hamilton, MT). El MPL™ se describe en la patente estadounidense n.º 4.912.094 (2).

Recientemente, Ribit ImmunoChem Research Inc. ha formulado una formulación de aceite en agua metabolizable que cuando se combina con MPL™ da como resultado la formación una emulsión estabilizada denominada EE de MPL™. La emulsión estabilizada se genera mediante la microfluidificación del MPL™ con aceite de escualeno, glicerol y fosfatidilcolina. La formulación actual es una emulsión microfluidizada de calidad GMP. En los experimentos que figuran más abajo, se describen emulsiones que contienen aceite al 1 ó 2%.

No se apreció ninguna patología tisular vinculada a la zona de la inyección cuando se administró la EE de MPL™ subcutánea o intramuscularmente a ratones Balb/c. También se generó una emulsión estabilizada que contenía los mismos componentes, pero sin MPL™ a efectos comparativos. Específicamente, la inmunización subcutánea o intramuscular con un péptido del VIH de 40 aminoácidos, el T1SP10MN(A)(+Cys), o con un péptido de 39 aminoácidos con la cisteína eliminada, el T1SP10MN(A)(-Cys) (que carece del residuo de cisteína en el aminoácido número 17 del péptido de 40 aminoácidos (+Cys)), formulado con la combinación de los adyuvantes EE de MPL™ y GM-CSF no produjo ninguna anomalía tisular o de infiltración celular apreciable dos semanas después de la inmunización.

La presente invención también engloba el uso de monofosforil lípido A, una forma precursora del MPL™, que también se describe en la patente estadounidense n.º 4.912.094 (2). La presente invención engloba además derivados y análogos del MPL™ y del monofosforil lípido A.

La incorporación de citocinas y linfocinas en las formulaciones de vacuna ha resultado ser prometedora para la expansión y el aumento del potencial de las vacunas (3). Se ha demostrado que la citocina interleucina-12 (IL-12) produce y aumenta la inmunidad mediada por células mediante un cambio de la expansión del subconjunto de linfocitos T cooperadores hacia el perfil de citocinas Th1 (i.e., la subclase de IgG2 del modelo murino) (4-6). En ratones, se ha observado que la IL-12 murina recombinante aumenta un perfil de respuestas inmunes dominadas por Th1 (3).

La IL-12 es producida por una variedad de células presentadoras de antígeno, principalmente, por macrófagos y monocitos. Se trata de un elemento fundamental en la inducción de linfocitos TH1 a partir de linfocitos T preinmunes. Se ha demostrado que la producción de IL-12 o la capacidad para responder a la misma es fundamental en el desarrollo de respuestas de tipo TH1 protectoras, por ejemplo, durante infecciones parasitarias, más concretamente, la leishmaniosis (7). Los efectos de la IL-12 están mediados en gran parte por el interferón gamma producido por las células NK y los linfocitos T cooperadores. El interferón gamma es fundamental para la inducción de anticuerpos IgG2a contra antígenos proteicos dependientes de T (8) y respuestas de IgG3 hacia los antígenos independientes de T (9). La IL-12, inicialmente denominada factor estimulante de células asesinas naturales, es una citocina heterodimérica (10). La expresión y el aislamiento de la proteína IL-12 en células huésped recombinantes se describe en la solicitud de patente internacional publicada WO 90/05147 (11).

Otra citocina con un potencial prometedor como adyuvante es el GM-CSF. El GM-CSF es un tipo particular de factor estimulante de colonias (CSF). Los CSF son una familia de linfocinas que hacen que las células progenitoras encontradas en la médula ósea se diferencien en tipos específicos de hepatocitos maduros. Según lo descrito en la patente estadounidense n.º 5.078.996 (12), el GM-CSF activa macrófagos o monocitos precursores para que medien una actividad tumoricida inespecífica. Se ha descrito la secuencia de nucleótidos que codifica el gen del GM-CSF humano (12). Se ha transformado un plásmido que contiene ADNc de GM-CSF en *E. coli* y se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el número de acceso 39900. Según lo descrito en la patente estadounidense n.º 5.229.496 (13), el gen del GM-CSF también ha sido insertado en un plásmido de expresión de levaduras y depositado en la ATCC con el número de acceso 53157. Además, según lo descrito en la patente estadounidense n.º 5.073.627 (14), hay una secuencia de ADN que codifica el GM-CSF con sitios de glicosilación eliminados depositada en la ATCC con el número de acceso 67231.

Se ha demostrado que el GM-CSF sobrerregula las moléculas proteicas en las células presentadoras de antígeno conocidas por aumentar las respuestas inmunes (15) y que afecta a la secreción de Ig en los linfocitos B murinos purificados por separación celular (16).

Se ha observado que hay otras citocinas o linfocinas que tienen una actividad inmunomoduladora, que incluyen, pero no se limitan a, interleucinas 1-alfa, 1-beta, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, los interferones alfa, beta y gamma, el factor estimulante de colonias de granulocitos y los factores de necrosis tumoral alfa y beta.

Un problema relacionado con la administración sistemática de cualquier citocina o linfocina es el de las consecuencias biológicas asociadas con la actividad de las citocinas o linfocinas. Además, se deberían aumentar los efectos de las citocinas o las linfocinas relacionados con el desarrollo de las respuestas inmunes con especificidad antigénica si se mantienen las concentraciones locales de la citocina o la linfocina.

En estudios previos, se han evaluado por separado el GM-CSF y la IL-12, observándose el aumento de diversos parámetros de la respuesta inmune.

La invención descrita en la presente memoria demuestra que, a través de la combinación de un antígeno, adyuvante GM-CSF y un segundo adyuvante, el MPL™ (preferiblemente, en una emulsión metabolizable estable), se aumentan las respuestas inmunes específicas del antígeno.

Los antígenos seleccionados para su inclusión en las composiciones antigénicas de la presente invención comprenden péptidos o polipéptidos derivados de proteínas, así como fragmentos de cualquiera de los siguientes: sacáridos, poli- u oligonucleótidos u otros componentes macromoleculares. Como se usa en la presente memoria, un "péptido" comprende una serie de al menos seis aminoácidos y contiene al menos un determinante antigénico, mientras que un "polipéptido" es una molécula mayor que un péptido, pero que no constituye una proteína de longitud completa. Como se usa en la presente memoria, un "fragmento" comprende una parte, pero menos de la totalidad de un sacárido, proteína, poli- u oligonucleótido, u otros componentes macromoleculares. En el caso del VIH, las composiciones antigénicas de la presente invención comprenden además proteínas de VIH de longitud completa.

La invención está ejemplificada en un sistema modelo que usa antígenos peptídicos derivados del VIH. Estos péptidos se describen o derivan de las patentes estadounidenses n.º 5.013.548 (17) y 5.019.387 (18), y se resumen a continuación. Estos péptidos comprenden secuencias de aminoácidos que corresponden a una región de la proteína de la envoltura del VIH contra los que se producen respuestas de anticuerpos neutralizantes y de linfocitos T.

El VIH es un retrovirus humano que es el agente causante del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). El VIH infecta a los linfocitos T del sistema inmune atacando su glucoproteína de la envoltura externa de la molécula CD4 (T4) de la superficie de los linfocitos T, usando así la molécula CD4 (T4) como receptor para entrar e infectar linfocitos T. Se ha intentado inducir, con poco éxito, una respuesta inmune protectora específica de la infección por VIH mediante la inmunización. Actualmente, se está empleando una serie de enfoques en un intento por determinar una estrategia de vacunación eficaz y protectora. Estos incluyen el uso de vectores bacterianos atenuados y recombinantes que expresan epítopos antigénicos del VIH (19), adenovirus recombinantes (20) o vectores del virus vacuna (21), vacunas de ADN (22) y péptidos sintéticos que contienen diversos epítopos de linfocitos T y B del VIH (23).

Se ha observado que la glucoproteína de la envoltura externa del VIH gp120 es capaz de producir anticuerpos neutralizantes en el hombre. Se ha observado que la proteína recombinante PB1, que codifica aproximadamente un tercio de toda la molécula de gp120, incluye la parte de la proteína de la envoltura que genera la formación de los anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, estudios en chimpancés demostraron que ni la gp120 ni la PB1 intactas es capaz de generar la producción de altos títulos de anticuerpos neutralizantes.

Se sintetizaron péptidos cortos mediante procedimientos convencionales que corresponden a determinantes antigénicos de gp120 y se generó una respuesta de los anticuerpos contra gp120 que neutralizó el virus y produjo respuestas de linfocitos T cooperadores y CTL contra el virus.

5 Uno de tales péptidos es el péptido de VIH-1_{MN} que contiene múltiples epítomos C4/V3 denominado T1SP10MN(A)(+Cys) y una variante con la cisteína eliminada, el T1SP10MN(A)(-Cys). Estos péptidos incluyen los epítomos Th, T_{CTL} y B, pero no hacen que los anticuerpos interfieran en la unión a CD4. Con anterioridad, se ha demostrado que estos péptidos del VIH que contienen C4/V3 son candidatos prometedores para la inducción de respuestas inmunes cuando se administran con CFA o adyuvantes de tipo CFA (24-29). Estos péptidos contienen epítomos de los que previamente se ha observado que producen respuestas de linfocitos Th CD4+ tanto en ratones como en seres humanos, y contienen tanto un determinante neutralizante principal como un sitio que es reconocido por los CTL CD8+ tanto en ratones Balb/c como en seres humanos que son HLA B7+. El péptido de 39 aminoácidos ha demostrado recientemente tanto inmunogenicidad como seguridad en los pacientes infectados con el VIH (28).

T1SP10MN (A) (+Cys) tiene la siguiente secuencia de 40 aminoácidos:

15 **Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met
Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile
His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEQ ID
NO:1) (26) .**

T1SP10MN (A) (-Cys) se ha sintetizado sin la cisteína de la posición 17 y tiene la siguiente secuencia de 39 aminoácidos:

20 **Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met
Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His
Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEQ ID
NO:2) .**

25 Este residuo de cisteína está ubicado fuera de los epítomos funcionales reconocidos por los linfocitos Th, CTL o B. En la patente estadounidense n.º 5.861.243 (30), la patente estadounidense n.º 5.932.218 (31), la patente estadounidense n.º 5.939.074 (32), la patente estadounidense n.º 5.993.819 (33), la patente estadounidense n.º 6.037.135 (34) y la solicitud de patente europea publicada n.º 671.947 (35), se describen otros péptidos del VIH de diversas regiones del genoma viral.

30 El antígeno del VIH puede ser una proteína, un polipéptido, un péptido o un fragmento derivado de dicha proteína. La proteína puede ser una glucoproteína tal como gp41, gp120 o gp160. Alternativamente, la proteína puede ser una proteína codificada por genes tales como *gag*, *pol*, *vif*, *rev*, *vpr*, *tat*, *nef* o *env*. Los péptidos derivados de tales proteínas contendrán al menos un determinante antigénico (epítomo), de al menos seis aminoácidos de longitud.

35 La respuesta inmune hacia un péptido del VIH se puede aumentar mediante la unión covalente (conjugación) del péptido con una molécula transportadora farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de moléculas transportadoras adecuadas incluyen el toxoide tetánico, el toxoide diftérico, la hemocianina de lapa californiana y otros péptidos correspondientes a epítomos de linfocitos T de la glucoproteína gp120 del VIH.

40 Actualmente, se cree que una estrategia satisfactoria de vacunación contra el VIH necesitará producir una inmunidad contra el VIH en las mucosas, así como una buena respuesta de los CTL. En un reciente estudio murino en el que se usó péptido multiepítomo T1SP10MM(A) y un adyuvante mucoso, toxina colérica, se observó que la inmunización intranasal produjo anticuerpos IgG1 neutralizantes en suero (36). Un estudio posterior en el que también se usaron péptidos del bucle V3 del VIH demostró la producción de anticuerpo IgA sintetizado por vía mucosa y potentes respuestas de mediación celular, incluyendo a los CTL específicos de los péptidos (37). Se desconoce el papel funcional de los títulos elevados de anticuerpos sistémicos y neutralizantes en la prevención del VIH o en la estabilización de los individuos infectados por el VIH, aunque se cree que los títulos elevados de anticuerpo específico del virus son importantes en la prevención de la propagación viral.

45 En una realización preferida de la invención, se formula una emulsión estable de aceite en agua que contiene MPL™, que luego se mezcla con GM-CSF. Los datos presentados a continuación demuestran que estas combinaciones dan como resultado altos títulos de anticuerpos neutralizantes del VIH en suero. La combinación de EE de MPL™ y GM-CSF produce altos títulos de anticuerpos IgG e IgA específicos del antígeno en la cavidad vaginal de ratones hembra inmunizados. La inmunización de los ratones con cualquiera de los péptidos T1SP10MN (A) formulados con EE de MPL™ y GM-CSF produjo una potente respuesta inmune celular determinada por una

mayor proliferación y secreción celular específica del antígeno en el cultivo de citocinas, así como la inducción de respuestas de CTL específicos de los péptidos.

Generalmente, la formulación de antígeno/adyuvante de MPL™ o de EE de MPL™ combinado con GM-CSF o IL-12 y la proteína o el péptido de elección produce altos títulos de anticuerpos específicos del antígeno y neutralizantes del virus, un cambio significativo en la proporción de las subclases de IgG hacia una mayor proporción de anticuerpos IgG fijadores de complementos (a favor de IgG2a en ratones), una producción elevada de citocinas y una proliferación celular de células mononucleares como respuesta a la estimulación antigénica *in vitro*. No se observaron estas propiedades con las formulaciones de antígeno y EE en ausencia de MPL™, bien con o sin GM-CSF. Las formulaciones de la presente invención también producen buenas respuestas celulares determinadas por la inducción de CTL.

Un beneficio de la EE de MPL™ es que la formulación no provoca acumulación granulomatosa ni inflamación en el lugar de la inyección. Por lo común, tales reacciones en la zona de la inyección son provocadas por formulaciones adyuvantes de agua en aceite o de aceite en agua.

No se ha publicado la capacidad de generar una mayor respuesta inmune a través de los efectos estimulantes del MPL™ en combinación con GM-CSF o IL-12 en ausencia de inflamación granulomatosa local con otras formulaciones adyuvantes propuestas actualmente para el tratamiento del VIH.

Se ha realizado una serie de estudios para comparar el MPL™ (bien con o sin EE) más el GM-CSF o la IL-12 con el MPL™, la EE, el GM-CSF, la IL-12 o el CFA/IFA individualmente o junto con un péptido del VIH. A continuación, se presentará un resumen de los resultados seguido por una descripción más detallada.

En un primer experimento, ratones Balb/c inmunizados subcutáneamente con el péptido del VIH C4/V3 T1SP10MN(A)(-Cys) formulado con EE de MPL™ y GM-CSF, produjeron títulos de IgG en suero en un exceso de 10^7 tras sólo dos inyecciones. La respuesta de los anticuerpos fue neutralizante del VIH y demostró aumentos significativos de los títulos de los anticuerpos IgG1, IgG2a e IgG2b específicos del péptido. Las células de bazo estimuladas en cultivo con péptido liberaron niveles elevados de IL-4, IL-5 e interferón gamma. En conjunto, estos descubrimientos indican la inducción de una respuesta de tipo Th1/Th2 equilibrada. Se generaron anticuerpos IgG e IgA que fueron específicos de T1SP10MN(A)(-Cys) en los líquidos de la cavidad vaginal de ratones inmunizados con EE de MPL™ y con GM-CSF. Estos descubrimientos indican que la combinación de EE de MPL™ y GM-CSF con un antígeno de péptido del VIH da como resultado la generación de un perfil favorable de respuestas inmunes.

En este primer experimento, los ratones Balb/c inmunizados con el péptido del VIH T1SP10MN(A)(-Cys) y una formulación adyuvante que contenía EE o GM-CSF generaron títulos de anticuerpos IgG específicos del péptido (Tabla 1). Una emulsión estable (EE) de aceite en agua constituida por escualeno, glicerol y un agente emulsionante (fosfatidilcolina) demostró una capacidad para aumentar los títulos de IgG específicos del péptido al mezclarla con T1SP10MN(A)(-Cys). Los títulos de IgG producidos mediante la inmunización con 25:g de T1SP10MN(A)(-Cys) formulado con EE produjeron títulos de respuesta secundaria que fueron aproximadamente una quinta parte de los producidos en los ratones inmunizados con péptido y CFA que habían recibido una vacuna de recuerdo de péptido en IFA. Los receptores de las vacunas formuladas con CFA/IFA desarrollaron automáticamente títulos de IgG específicos de T1SP10MN(A)(-Cys) como respuesta a una inmunización primaria. A efectos comparativos, se inmunizaron ratones con 25:g de péptido T1SP10MN(A)(-Cys) solo.

Se compararon las formulaciones acuosas y de EE del MPL™ con las respuestas generadas mediante la inmunización de ratones con los adyuvantes de Freund o las citocinas IL-12 y GM-CSF. Los receptores de T1SP10MN(A)(-Cys) mezclado con IL-12, en general, no produjeron títulos de anticuerpos específicos del péptido en varios estudios repetidos. Por el contrario, los receptores de GM-CSF o EE de MPL™ más T1SP10MN(A)(-Cys) sí desarrollaron títulos de anticuerpos IgG bajos, pero fácilmente detectables. La adición de IL-12 o GM-CSF a las formulaciones que contenían EE de MPL™ más péptido T1SP10MN(A)(-Cys) generaron títulos significativamente más altos de IgG como respuesta a la inmunización. De hecho, la inmunización de los ratones con EE de MPL™ y GM-CSF en combinación dio como resultado títulos de una respuesta secundaria que fueron sistemáticamente mayores que los determinados en ratones inmunizados con cualquier otra formulación analizada. Los títulos de IgG específicos del péptido fueron mayores que los de los ratones inmunizados incluso con 125 µg de T1SP10MN(A)(-Cys) formulado con adyuvantes de Freund.

Una característica deseable de una respuesta inmune específica del VIH es la del equilibrio entre componentes los celulares y humorales. Se ha establecido una correlación entre determinadas subclases de isotipos de inmunoglobulina con el sesgo de los tipos de subconjuntos de linfocitos T cooperadores bien hacia la predominancia de Th1 o de Th2. Las citocinas secretadas por cada uno de estos subconjuntos de linfocitos T cooperadores han demostrado actividad en la dirección del intercambio de las subclases de IgG. Se determinaron los títulos finales de las subclases de IgG de sueros mezclados recogidos dos semanas después de la segunda inmunización (Tabla 2). La inmunización de los ratones con T1SP10MN(A)(-Cys) solo, o formulado bien con GM-CSF o con IL-12, generó

títulos bajos o nulos de las subclases de IgG en varios estudios repetidos. No fue posible detectar anticuerpos IgG3 mediante ELISA. Los grupos de ratones inmunizados con T1SP10MN(A)(-Cys) emulsionado con CFA que luego recibieron una vacuna de recuerdo de IFA desarrollaron predominantemente una respuesta de anticuerpos IgG1 específicos de T1SP10MN(A)(-Cys). Las formulaciones de péptido con EE, EE de MPL™, EE de MPL™ más IL-12 o EE de MPL™ más GM-CSF también desarrollaron altos títulos de anticuerpos IgG1. Los receptores de vacunas formuladas con EE demostraron en repetidas ocasiones títulos relevantes de IgG1, pero títulos no relevantes de IgG2a o de IgG2b. La inclusión de MPL™ en la formulación de EE dio como resultado mayores títulos de anticuerpos IgG2a e IgG2b específicos de T1SP10MN(A)(-Cys). La inclusión bien de IL-12 o de GM-CSF con EE de MPL™ y T1SP10MN(A)(-Cys) provocó un cambio en la proporción de los títulos de los anticuerpos IgG1:IgG2a. Sin citocina, las vacunas formuladas con EE de MPL™ generaron títulos similares de IgG1 y de IgG2a. Tanto la IL-12 como el GM-CSF aumentaron las concentraciones relativas en suero de IgG2a específico del péptido. Además, la combinación de EE de MPL™ y GM-CSF también provocó un aumento significativo de los títulos de anticuerpos IgG2b específicos de T1SP10MN(A)(-Cys) (47 veces más en comparación con la EE de MPL™ y 74 veces más en comparación con la EE). Los títulos desarrollados en ratones inmunizados con EE de MPL™ y GM-CSF junto con péptido T1SP10MN(A)(-Cys) fueron sistemáticamente los más altos de cualquiera de los grupos de receptores de vacunas.

Para determinar si los altos títulos medidos en los sueros mezclados procedentes de los ratones inmunizados con T1SP10MN(A)(-Cys), EE de MPL™ y GM-CSF eran representativos de cada ratón del grupo, se compararon los títulos de cada ratón del grupo con los de los ratones inmunizados con péptido formulado con adyuvante de Freund (Figura 1). Se determinó que la media de los títulos individuales en suero de IgG, IgG1 e IgG2a era similar a la de los títulos medidos en las mezclas de suero (datos no mostrados). La coformulación de T1SP10MN(A)(-Cys) con EE de MPL™ y GM-CSF generó títulos de IgG, IgG1 e IgG2a que fueron significativamente mayores que los producidos en ratones inmunizados con CFA/IFA. Todos los ratones inmunizados con péptido formulado con EE de MPL™ y GM-CSF desarrollaron títulos más elevados de anticuerpo IgG que los medidos en ratones inmunizados con la formulación de CFA/IFA. Estos resultados indicaron que la combinación de EE de MPL™ con GM-CSF generó un perfil favorable de respuestas de anticuerpos determinado por títulos altos de anticuerpo específico del péptido y una distribución favorable de las subclases de IgG. Esta formulación produjo automáticamente los títulos específicos de T1SP10MN(A)(-Cys) más altos de cualquier formulación de vacuna usada.

Se compararon los títulos de IgG anti-T1SP10MN(A)(-Cys) de los ratones inmunizados con GM-CSF formulado con MPL™ acuoso, EE o EE de MPL™ para determinar los efectos del GM-CSF como complemento adyuvante (Figura 2). Los resultados sugieren que la combinación de EE de MPL™ con GM-CSF y péptido es única en esta realización particular en la inducción de altos títulos de anticuerpos. MPL™ más GM-CSF generó títulos comparables a los generados con CFA/IFA. Así pues, las propiedades adyuvantes de MPL™ y GM-CSF parecen ser sinérgicas cuando se formulan juntos, ya esté MPL™ bien en forma acuosa o esté presente en forma de emulsión estable.

Después, se midieron los títulos de los anticuerpos específicos de T1SP10MN(A)(-Cys) en líquido de lavado vaginal mezclado obtenido de ratones cuatro semanas después de la segunda inmunización (Tabla 3). Los ratones inmunizados con EE de MPL™ más GM-CSF desarrollaron títulos altos de anticuerpo tanto IgA como IgG. No se detectaron rutinariamente títulos de anticuerpos en los líquidos de lavado vaginal obtenidos de ratones inmunizados con otras formulaciones. Como la proporción entre IgG e IgA del lavado vaginal favorece a IgG, y como no se midió siga no se puede concluir que el anticuerpo IgA detectado en el líquido de lavado vaginal sea sintetizado localmente por los tejidos mucosos. De hecho, es probable que los títulos de IgA e IgG detectados sean el resultado de la inmunoglobulina transudada secretada por células plasmáticas ubicadas en una posición distal a la mucosa vaginal.

Estos resultados demostraron que los ratones inmunizados con un péptido del VIH T1SP10MN(A)(-Cys), formulado con EE de MPL™ en combinación bien con IL-12 o con GM-CSF tuvieron títulos altos de anticuerpo específico del péptido en suero.

Para evaluar si esos títulos de anticuerpos eran funcionalmente eficaces, se analizó la capacidad de los sueros para inhibir la infección de las células *in vitro* mediante una cepa de VIH adaptada a las condiciones de laboratorio. El análisis midió la actividad transcriptasa inversa del virus derramado en los sobrenadantes de cultivos de células infectadas con la cepa apropiada del VIH. El suero de ratones inmunizados con EE de MPL™ y GM-CSF o con EE de MPL™ e IL-12 redujo significativamente la infectividad viral (Figura 3). Las unidades de transcriptasa inversa viral máximas variaron de 9.481 a 10.411. Los sueros de ratones inmunizados con esa formulación inhibieron la replicación viral. Incluso en diluciones virales de sólo 1/20, los sueros de ratones inmunizados con EE de MPL™ y GM-CSF junto con T1SP10MN(A)(-Cys) inhibieron la replicación viral en aproximadamente un cincuenta por ciento. Se determinó que el título de neutralización en suero de esta formulación fue mayor de 1.600 en comparación con 71 del suero obtenido de ratones inmunizados con la formulación de EE de MPL™, IL-12 y péptido del VIH.

Los títulos anti-T1SP10MN(A)(-Cys) en suero de esos grupos de ratones fueron similares (aunque algo superiores) a los generados mediante la inmunización de los ratones con CFA e IFA. Los sueros de ratones inmunizados con

T1SP10MN(A)(-Cys) emulsionado con CFA/IFA no desmotaron la neutralización del VIH en este análisis. Los sueros de ratones inmunizados con péptido y la combinación de EE de MPL™ más GM-CSF como adyuvante demostraron una mayor actividad neutralizante que cualquier otro suero. A diluciones equivalentes, los sueros de ratones inmunizados con EE de MPL™ más GM-CSF y el péptido del VIH neutralizaron concentraciones más elevadas de virus que los sueros de receptores de otras formulaciones de vacuna.

Entonces se midió la proliferación en cultivo de células de bazo específicas del péptido del VIH. Como medida de la respuesta celular a T1SP10MN(A)(-Cys), se cultivaron células de bazo *in vitro* con péptido y proteínas control. El análisis midió la ³H-timidina incorporada en el ADN de las células en división (Tabla 4). A diferencia de las células de bazo procedentes de ratones inmunizados sin adyuvante, las células de bazo de ratones inmunizados con T1SP10MN(A)(-Cys) formulado con EE proliferaron energícamente como respuesta al péptido. Las células de bazo de los receptores de la vacuna no respondieron en cultivo a un antígeno irrelevante (lisozima) o a una falta de estimulación antigénica. Todos los grupos respondieron de manera similar a la estimulación con mitógeno ConA. En la mayoría de los grupos, no hubo indicio de una respuesta proliferativa dependiente de la dosis específica del antígeno. A las tres dosis de péptido, el mayor grado de proliferación se determinó en los grupos de ratones inmunizados con GM-CSF coformulado con EE de MPL™. Las respuestas de proliferación más bajas se midieron en las células de bazo de los grupos de ratones inmunizados con vacunas formuladas con CFA/IFA o IL-12 más péptido del VIH. Las células de bazo de ratones inmunizados con péptido y bien con EE o con GM-CSF incorporaron niveles similares de timidina en cultivo. Estos resultados muestran que la coformulación del péptido del VIH con EE de MPL™ junto con GM-CSF proporcionó células de bazo murinas con el mayor potencial de proliferación como respuesta a la presentación del antígeno *in vitro*.

Se examinó el potencial de las células de bazo cultivadas para secretar las citocinas IL-4 (Tabla 5) e interferón gamma (Tabla 6) en sobrenadantes de cultivos. Se midieron estas citocinas en los sobrenadantes de los cultivos cosechados tras tres y seis días de estimulación *in vitro* con antígeno o mitógeno. La medición de la IL-4, citocina asociada a linfocitos T cooperadores de tipo 2, demostró que aunque todos los grupos generaron niveles detectables como respuesta a la estimulación con el mitógeno ConA el día 3, sólo los ratones inmunizados con EE de MPL™ o EE de MPL™ más GM-CSF produjeron IL-4 como respuesta a la estimulación con el péptido. Sólo los ratones inmunizados con EE de MPL™ más GM-CSF y T1SP10MN(A)(-Cys) secretaron en cultivo niveles detectables de IL-4 a todas las dosis de péptido usadas para estimular las células de bazo. El sexto día del cultivo, las células de bazo de ratones inmunizados con péptido junto con EE de MPL™ más GM-CSF habían secretado niveles más elevados de IL-4 que los detectados en los ratones inmunizados con péptido junto con EE de MPL™, EE de MPL™ más IL-12 o EE. Los niveles de IL-4 fueron incluso mayores que los producidos mediante la estimulación de esas células en cultivo con ConA. Las células de bazo cultivadas de ratones inmunizados con EE de MPL™ más GM-CSF también secretaron en cultivo niveles detectables de IL-5 (otra citocina de linfocitos T cooperadores de tipo 2 (no mostrada)) como respuesta a seis días de estimulación con T1SP10MN(A)(-Cys). Las células de bazo de otros grupos produjeron IL-5 detectable en estos cultivos.

Como respuesta a tres días de estimulación en cultivo con ConA, las células de bazo de todos los grupos de ratones secretaron niveles detectables de interferón gamma en cultivo (Tabla 6). Sólo las células de ratones inmunizados con EE de MPL™ o EE de MPL™ más GM-CSF produjeron niveles detectables de interferón gamma como respuesta a tres días de estimulación con el péptido del VIH. Al finalizar los seis días de estimulación en cultivo, se observaron concentraciones más elevadas de interferón gamma como respuesta tanto a ConA como al péptido. Fueron de interés los niveles de interferón gamma medidos en los sobrenadantes de los cultivos de bazos de ratones inmunizados con EE de MPL™ o EE de MPL™ más GM-CSF. Las células de bazo de esos dos grupos de receptores secretaron concentraciones sensiblemente superiores de interferón gamma en los sobrenadantes de los cultivos que las de las células de bazo de ratones inmunizados con péptido junto con EE de MPL™ más IL-12 o EE.

Los resultados del primer experimento demostraron que la inclusión de MPL™ en una emulsión estable de aceite en agua y la posterior combinación de la emulsión con el péptido del VIH T1SP10MN(A)(-Cys) y GM-CSF generan anticuerpos neutralizantes. Además, la coformulación de GM-CSF con EE de MPL™ y un antígeno vacunal generó niveles mayores de IL-4, IL-5 e interferón gamma secretados en sobrenadantes de cultivos y aumentó la respuesta proliferativa de las células de bazo estimuladas en cultivo con el antígeno inmunizante. Esa formulación también generó los títulos más altos de IgG, IgG2a e IgG2b de cualquiera de las formulaciones vacunales observadas. Sólo los grupos de ratones inmunizados con la combinación de EE de MPL™ y GM-CSF junto con el péptido tuvieron títulos de IgG e IgA detectables en líquido de lavado vaginal en una serie de estudios repetidos de manera sistemática. La combinación de EE de MPL™, IL-12 y péptido también dio como resultado niveles más altos de títulos de IgG1 e IgG2a, una mayor neutralización viral, una mayor proliferación de las células de bazo y la secreción de IL-4 e interferón gamma.

La inmunización de los ratones con cualquier adyuvante individual formulado con el péptido del VIH no produjo una respuesta inmune con la propiedad de generar un anticuerpo neutralizante.

Con frecuencia, se observó que la inmunización de los ratones con T1SP10MN(A)(-Cys) junto con EE de MPL™ o MPL™ en forma de formulación acuosa generó buenos títulos de anticuerpos. En cualquiera caso, esas formulaciones no generaron sistemáticamente una respuesta inmune con títulos de anticuerpos vaginales, títulos de anticuerpos neutralizantes (ni potentes respuestas de CTL según lo descrito más adelante en el Experimento 8).
 5 Ocasionalmente, el MPL™ o la EE de MPL™ combinados con péptido generaron títulos medibles de IgA e IgG en el líquido de lavado vaginal. En algunos estudios, la adición bien de IL-12 o de GM-CSF al MPL™ en la formulación vacunal dio como resultado títulos que fueron similares a los producidos en ratones inmunizados con CFA/IFA o cualquiera de las formulaciones de EE de MPL™ con o sin citocina. Esta observación sugiere que no se necesita la forma de EE del MPL™ para obtener antisuero de título elevado específico del péptido del VIH. La adición de GM-
 10 CSF al vehículo de EE confirió un aumento de los títulos específicos del péptido en comparación con los ratones inmunizados sólo con la EE o con la EE e IL-12. Sin embargo, en general, la inducción de buenos títulos de anticuerpos IgG2a e IgG2b dependió de la formulación del péptido con la EE de MPL™ y el GM-CSF. Es interesante destacar que esta formulación produjo títulos de IgG que fueron similares a los producidos mediante la inmunización con otras formulaciones como CFA/IFA y péptido. La combinación de EE de MPL™ con GM-CSF y péptido fue la
 15 única formulación que demostró la generación de altos títulos tanto de anticuerpo neutralizante como de CTL (véase el Experimento 8). La inclusión de IL-12 a la EE de MPL™ y el péptido también produjo un perfil favorable de respuestas inmunes. Los resultados indicaron que la EE de MPL™ coformulada con las citocinas GM-CSF o IL-12 confirió una diferencia cualitativa en la respuesta de los anticuerpos en comparación con la inmunización con CFA e IFA. Se cree que la diferencia es atribuible a niveles elevados de IgG2a e IgG2b.

20 En un segundo experimento, se siguieron los protocolos del primer experimento con péptido del VIH en ratones Balb/c con modificaciones de poca importancia. El MPL™ también se administró en forma acuosa con o sin una citocina.

La inmunización de los ratones Balb/c con el péptido del VIH T1SP10MN(A)(-Cys) sin adyuvante no produjo títulos relevantes de anticuerpo. Por el contrario, la formulación de antígeno peptídico con diversas combinaciones de adyuvante/citocina resultó en la generación de altos títulos de anticuerpos tras dos inmunizaciones.
 25

La inmunización con péptido e IL-12, o sólo con EE, dio como resultado títulos indistinguibles de los generados sin adyuvante (Tabla 7). Los receptores de péptido coformulado con GM-CSF tuvieron un aumento moderado del título. En comparación con los receptores de la vacuna que contenía CFA/IFA, la EE de MPL™ microfluidizada demostró un desarrollo similar de títulos específicos del péptido. En comparación con los receptores de la vacuna de CFA/IFA, la EE de MPL™ generó niveles más altos de IgG2a específico del péptido. Los calendarios de inmunización usados pueden afectar a los títulos de anticuerpos observados. Sin embargo, la inmunización de los ratones con péptido
 30 formulado con MPL™ (acuoso) generó títulos elevados de anticuerpo específico del péptido. La adición de GM-CSF o de IL-12 a esta formulación produjo un aumento de los títulos de más de 10⁶. Así pues, la combinación de un péptido del VIH con MPL™ y las citocinas IL-12 o GM-CSF generó un alto título de anticuerpo específico del
 35 péptido.

Sólo los grupos de ratones inmunizados con el péptido y bien con MPL™ e IL-12 o con EE de MPL™ y GM-CSF desarrollaron títulos relativamente altos de anticuerpo detectados en los líquidos obtenidos del lavado vaginal (Tabla 8). De hecho, sólo ese grupo de ratones inmunizados con MPL™ e IL-12 con péptido produjeron IgA específico del péptido.
 40

Se determinó la capacidad proliferativa de las células de bazo en cultivo mediante la incorporación de timidina como respuesta a la estimulación *in vitro* con péptido. La presentación de los datos de la Tabla 9 se debe a la normalización de la proliferación, estandarizando hasta la proliferación máxima determinada mediante la estimulación con ConA. Las células de bazo de ratones inmunizados con EE de MPL™ bien junto con GM-CSF o con IL-12, así como las de los ratones inmunizados sólo con GM-CSF demostraron niveles bajos de proliferación asociada al péptido. Por el contrario, las células de bazo de ratones inmunizados con péptido combinado con MPL™ y GM-CSF demostraron una proliferación relevante.
 45

También se midió la producción de citocinas por parte de células de bazo cultivadas *in vitro*. Para la IL-4, sólo los ratones inmunizados con EE de MPL™ combinada con GM-CSF y T1SP10MN(A)(-Cys) secretaron buenos niveles de IL-4 como respuesta a la estimulación con péptido (Tabla 10). Para el interferón gamma, los ratones inmunizados con EE de MPL™ y bien con GM-CSF o con IL-12, o MPL™ acuoso con GM-CSF o IL-12, produjeron niveles fácilmente detectables de esta citocina en los sobrenadantes de los cultivos (Tabla 11).
 50

Así pues, la combinación de citocinas GM-CSF o IL-12 con MPL™ o EE de MPL™ generó altos títulos de anticuerpos específicos del antígeno peptídico. Los títulos fueron similares a los generados mediante la inmunización de los ratones con péptido y CFA/IFA. Los datos muestran que estas combinaciones también produjeron las respuestas proliferativas más altas de las células de bazo desarrolladas en cultivo y que establecieron poblaciones
 55

de células de bazo que secretaron los niveles más altos de interferón gamma como respuesta a la estimulación con péptido.

Los resultados de este segundo experimento indican que la coformulación de T1SP10MN(A)(-Cys) con MPL™ y las citocinas GM-CSF o IL-12 producen un perfil de respuestas inmunes que es similar, o mejor, que el producido en ratones inmunizados con péptido y CFA, y una vacuna de recuerdo de péptido e IFA.

La evaluación histológica (no mostrada) del lugar de la inyección dos semanas después de la segunda inmunización mostró que los ratones inmunizados con EE de MPL™ microfluidizada no desarrollaron ni mantuvieron una infiltración de células mononucleares en la dermis. Los tejidos teñidos con hematoxilina/eosina se asemejaron a los preparados a partir de receptores sin adyuvante. Por el contrario, los ratones Balb/c inmunizados con CFA e IFA como adyuvantes (una emulsión de agua en aceite) tuvieron una gran acumulación de células mononucleares en esta zona. Los receptores de EE de MPL™ junto con GM-CSF y péptido mostraron un aumento perceptible, aunque mínimo, en las células mononucleares en comparación con los receptores de EE de MPL™ sin GM-CSF. Los tejidos de los ratones inmunizados con GM-CSF y péptido solo no fueron examinados.

En un tercer experimento, se siguieron los protocolos del segundo experimento usando ratones Swiss-Webster en lugar de ratones Balb/c. Los ratones Swiss-Webster se usaron para determinar los efectos adyuvantes con el antígeno del péptido del VIH, en el que el epítipo de linfocito T cooperador restringido al MHC no influiría en la respuesta inmune. Los ratones Swiss-Webster son una cepa no consanguínea de ratones, y no se realizaron estudios celulares como tales. En este experimento, sólo se midieron los títulos finales recíprocos de IgG anti-péptido del VIH y los títulos finales recíprocos de IgG e IgA de los lavados vaginales. Como se observa en las Tablas 12 y 13, el perfil de respuestas fue comparable al obtenido en los ratones Balb/c medidos en el primer y segundo experimento.

En un cuarto experimento, se siguieron los protocolos del segundo experimento con variaciones de poca importancia, usando ratones Balb/c. Como se muestra en la Tabla 14, las formulaciones adyuvantes de MPL™ bien junto con GM-CSF o con IL-12 produjeron una respuesta MGT de IgG sensiblemente superior que el MPL™ solo. Como se muestra en la Tabla 15, la formulación adyuvante de EE de MPL™ junto con GM-CSF provocó una respuesta significativa de la subclase IgG2b. Las formulaciones adyuvantes de MPL™ bien junto con GM-CSF o con IL-12 produjeron una respuesta de la subclase IgG2a sensiblemente superior a la del MPL™ solo, mientras que las formulaciones de EE de MPL™ bien junto con GM-CSF o con IL-12 produjeron una respuesta de la subclase IgG2a superior a la del MPL™ solo. Como se muestra en la Tabla 16, las formulaciones adyuvantes de MPL™ bien junto con GM-CSF o con IL-12 produjeron títulos de IgG sensiblemente mayores en los líquidos de lavado vaginal que los del MPL™ solo. Finalmente, como se muestra en la Figura 4, las formulaciones adyuvantes de MPL™ bien junto con GM-CSF o con IL-12, así como las formulaciones de EE de MPL™ bien junto con GM-CSF o con IL-12, demostraron una proliferación mayor de las células de bazo que el MPL™ solo o la EE de MPL™ sola, respectivamente.

En un quinto experimento, se siguieron los protocolos del segundo experimento con variaciones de poca importancia usando ratones Balb/c; no se incluyó la IL-12 en las formulaciones adyuvantes. Como se muestra en la Tabla 17, las formulaciones adyuvantes que contenían tanto MPL™ como GM-CSF generaron respuestas de IgG2a e IgG2b sensiblemente superiores que las del MPL™ solo. Además, las formulaciones adyuvantes que contenían tanto MPL™ como GM-CSF generaron respuestas sensiblemente superiores para todas las subclases de IgG que las del MPL™ solo.

En un sexto experimento, se siguieron los protocolos del segundo experimento con variaciones de poca importancia usando ratones Balb/c; no se incluyó la IL-12 en las formulaciones adyuvantes. El péptido del VIH fue de una longitud de 40 aminoácidos, debido a la presencia de una cisteína en la posición de aminoácido 17. Como se muestra en la Tabla 18, las formulaciones adyuvantes que contenían tanto EE de MPL™ como GM-CSF generaron respuestas significativamente superiores para todas las subclases de IgG que las del MPL™ solo, y respuestas sensiblemente superiores para todas las subclases que las de la EE de MPL™ sola.

En un séptimo experimento, se siguieron los protocolos del sexto experimento con variaciones de poca importancia usando ratones Balb/c; no se incluyó la IL-12 en las formulaciones adyuvantes. Como se muestra en la Tabla 19, las formulaciones adyuvantes que contenían tanto EE de MPL™ como GM-CSF generaron respuestas sensiblemente superiores para todas las subclases de IgG que las de la EE de MPL™, y las formulaciones adyuvantes que contenían tanto MPL™ como GM-CSF generaron respuestas sensiblemente superiores para todas las subclases que las del MPL™ solo.

En un octavo experimento, como medida de la inmunidad funcional mediada por células, se analizó la capacidad de las células de bazo de ratones inmunizados con EE de MPL™, o con EE de MPL™ más GM-CSF formulados junto con el péptido multiepítipo T1SP10MN(A)(+Cys) para generar respuestas de CTL específicas de VIH_{MN}.

5 Como se muestra en la Figura 5, las células de bazo de ratones inmunizados con EE de MPL™, o con EE de MPL™ más GM-CSF demostraron una baja actividad hacia las células diana que estaban bien sin marcar o marcadas por pulsos con el epítipo CTL IIIB. Las células de bazo de ratones inmunizados con T1SP10MN(A)(+Cys) formulado conjuntamente con EE de MPL™ y GM-CSF generaron una buena actividad CTL específica de VIH_{MN} tras una sola inmunización. La lisis de las células diana medida por CTL específicos de VIH_{MN} resultó ser notablemente mayor cuando se midió siete días después de la inmunización secundaria (Figura 5). En experimentos separados, los ratones inmunizados sin adyuvante no generaron ninguna respuesta de los CTL. Los ratones inmunizados con MPL™ acuoso y péptido generaron bajas respuestas de CTL específicos del péptido (<30%).

10 Una dificultad que surge al analizar la posible eficacia de las composiciones inmunógenas contra el VIH es que los primates no humanos infectados con el VIH no desarrollan los síntomas de tipo SIDA. Así pues, el posible modelo animal no imita la sintomatología humana provocada por el VIH. Afortunadamente, los primates no humanos infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia del Simio (VIS), que está estrechamente relacionado con el VIH, sí desarrollan los síntomas de tipo SIDA.

15 Esto permite analizar los antígenos del VIS en primates no humanos. El antígeno del VIS puede ser una proteína, un polipéptido, un péptido o un fragmento derivado de dicha proteína. La proteína puede ser una glucoproteína tal como gp41, gp120 o gp160. Alternativamente, la proteína puede ser una proteína codificada por genes tales como *gag*, *pol*, *vif*, *rev*, *vpr*, *tat*, *nef* o *env*. Los péptidos derivados de tales proteínas contendrán al menos un determinante antigénico (epítipo) de al menos seis aminoácidos de longitud.

20 De manera análoga al VIH, los péptidos multiepítopos del VIS se usan en primates no humanos. Se realizó un estudio para evaluar si diversos péptidos en combinación con EE de MPL™ y GM-CSF podían generar una respuesta de los CTL. Se inmunizaron macacos Rhesus subcutáneamente en las semanas 0, 4, 8 y 18 con EE de MPL™ y GM-CSF junto con cualquiera de los siguientes conjuntos de tres péptidos (véase la Tabla 20):

(1) Cada péptido contenía un epítipo CTL restringido a Mamu A*01 como el siguiente:

Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met (SEC ID N.º 3) (*gag*) (38,39)

25 Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val (SEC ID N.º 4) (*pol*) (40)

Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile (SEC ID N.º 5) (*env*) (40)

(2) Alternativamente, se ligó cada uno de estos tres péptidos a un epítipo T cooperador promiscuo que tenía la siguiente secuencia:

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala (SEC ID N.º 6) (adaptada de 41).

30 Así pues, los tres péptidos tienen las siguientes secuencias:

**Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly
Val Ala Pro Thr Lys Ala Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln
Met (SEQ ID NO:7)**

35 **Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly
Val Ala Pro Thr Lys Ala Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu
Val (SEQ ID NO:8)**

40 **Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly
Val Ala Pro Thr Lys Ala Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln
Ile (SEQ ID NO:9) .**

Se recogió sangre heparinizada cada dos semanas y se analizaron los CTL de las células mononucleares de la sangre periférica mediante el análisis de liberación de ⁵¹Cr, la tinción de tetrámeros de las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) recién preparadas y la tinción de tetrámeros de las CMSP cultivadas. La tinción de tetrámeros de las CMSP recién preparadas y la muerte citotóxica mediante la liberación de ⁵¹Cr no revelaron ninguna actividad. Sin embargo, la inmunización de los macacos Rhesus con mezclas de péptidos Th/CTL restringidos a Mamu A*01 formuladas con EE de MPL™ y GM-CSF produjo la detección de los linfocitos T positivos en CD8 y

positivos en tetrámero. Los resultados presentados en las Tablas 21–24 se muestran como el porcentaje de positivos, los linfocitos T CD8+ (Tablas 21–23) o CD4+ (Tabla 24) positivos en tetrámero detectados en las CMSP cultivadas con el respectivo péptido durante 11 días.

5 En términos generales, los cuatro animales que dieron positivo en Mamu A*01 inmunizados con los epítomos CTL bien con los epítomos Th (Rh 55, Rh 142) o sin ellos (Rh 73, Rh 80) demostraron tener células positivas en tetrámero y positivas en CD8 específicas bien de *gag*, *pol* o *env*. Según lo esperado, no se detectaron células CD8 positivas en tetrámero en los animales negativos en Mamu A*01 (Rh 41, Rh 47). Se observaron respuestas inmunes específicas de *gag* y *env* del VIS tras la primera vacuna, mientras que se observó un positivo en tetrámero específico de *pol* tras la vacuna de recuerdo. Debido a que la dosis final de la vacuna de recuerdo administrada en la semana 18 no siguió elevando la respuesta, en las Tablas 21–24, no se presentan los datos posteriores a la semana 14.

10 En resumen, la inmunización de los macacos Rhesus con mezclas de péptidos epítomos CTL de *gag*, *pol* y *env* del VIS/Th restringidos a Mamu*A01 combinadas con EE de MPL™ y GM–CSF humano generaron respuestas celulares según lo demostrado por el análisis de los tetrámeros sensibles y específicos.

15 Se ha expresado recombinantemente (42) la proteína porina B de *Neisseria gonorrhoeae*, también conocida como proteína PIB, y ha resultado ser una candidata antigénica para prevenir o tratar las infecciones provocadas por *Neisseria gonorrhoeae*.

20 Se realizó una serie de estudios para comparar el MPL™ (bien con o sin EE) más GM–CSF o IL–12 con el MPL™ (bien con o sin EE) solo, junto con una versión modificada de la proteína porina B de *Neisseria gonorrhoeae*, en la que hay 16 aminoácidos del terminal amino procedente de un fago, seguidos por la forma madura de la proteína porina B. A continuación, se presentará un resumen de los resultados.

25 En un primer experimento, los ratones Swiss–Webster inmunizados subcutáneamente en la rabadilla con proteína porina B recombinante generaron títulos de anticuerpos específicos del antígeno, demostrando que la proteína porina B es una candidata antigénica viable. La adición de GM–CSF al MPL™ y la proteína porina B generaron una elevación de los títulos de anticuerpos IgG e IgG2a en suero en comparación con los receptores de MPL™ y la proteína porina B (véanse las Tablas 25 y 26).

30 En un segundo experimento, los ratones Swiss–Webster inmunizados subcutáneamente en la rabadilla con la proteína porina B más IL–12 y MPL™ o EE de MPL™ generaron más anticuerpo específico del antígeno (particularmente IgG) en comparación con los receptores de la proteína porina B más MPL™ o EE de MPL™. Se observaron títulos más altos tanto después de la inmunización primaria como la secundaria. La inclusión de IL–12 en las formulaciones produjo un aumento aproximadamente diez veces mayor de los títulos de IgG medidos en el líquido de lavado vaginal (véase la Tabla 27).

La proteína de fusión (F) nativa purificada del virus respiratorio sincitial (VRS) humano en la forma dimérica nativa es una candidata antigénica para la prevención de las infecciones provocadas por el VRS (43).

35 Se realizó una serie de estudios para comparar el MPL™ (bien con o sin EE) más GM–CSF o IL–12 con cada uno de los MPL™ (bien con o sin EE), fosfato de aluminio o Stimulon™ QS–21 individualmente, junto con la proteína F nativa purificada del VRS. A continuación, se presentará un resumen de los resultados.

40 En un primer experimento, los ratones Balb/c inmunizados intramuscularmente con la proteína F nativa del VRS generaron títulos de anticuerpos específicos del antígeno, demostrando que la proteína F es una candidata antigénica viable. La adición de GM–CSF a MPL™ produjo títulos finales más elevados que el MPL™ solo contra la proteína F tanto después de la inmunización primaria como de la secundaria (véase la Tabla 28), y también produjo una mayor respuesta celular a la estimulación *in vitro* de las células de bazo que el MPL™ solo (véase la Tabla 29). La adición de GM–CSF a EE de MPL™ produjo una elevada respuesta de IgG primaria hacia la proteína F en comparación con la EE de MPL™ sola (véase la Tabla 28).

45 En un segundo experimento, se repitió el protocolo del primer experimento. La adición de GM–CSF a MPL™ produjo títulos finales más elevados que el MPL™ solo contra la proteína F tanto después de la inmunización primaria como de la secundaria (véase la Tabla 30). La adición de GM–CSF a la EE de MPL™ produjo títulos finales más elevados que la EE de MPL™ sola contra la proteína F tras la inmunización primaria (véase la Tabla 30). La adición de GM–CSF a las formulaciones de proteína F más MPL™ o EE de MPL™ produjo un porcentaje más elevado de actividad CTL esplénica específica del VRS que la producida por las formulaciones que carecían de GM–CSF, medida en las células de bazo de ratones inmunizados (véase la Tabla 31).

50 En un tercer experimento, se sustituyó la IL–12 por el GM–CSF. La coformulación de IL–12 con MPL™ produjo títulos más altos de IgG tras la inmunización de la primera vacuna, en comparación con la administración de proteína

F sólo con MPL™ (véase la Tabla 32). Sin embargo, la adición de IL-12 a MPL™ o EE de MPL™ no tuvo efecto en la actividad CTL específica del VRS medida tras la estimulación *in vitro* de las células efectoras (véase la Tabla 33).

Se realizó un estudio para comparar el MPL™ (bien con o sin EE) más GM-CSF con el MPL™ (bien con o sin EE) individualmente, junto con la proteína NP (nucleocápside) del virus de la gripe. Las cantidades de NP resultaron insuficientes para realizar los experimentos de medición de los títulos de anticuerpos. Se analizaron las respuestas de las células de bazo hacia la estimulación antigénica de ratones inmunizados con el péptido NP con o sin adyuvantes 14 días después de la inmunización final. La inclusión de GM-CSF en las formulaciones que contenían MPL™ o EE de MPL™ produjeron una notable reducción de la actividad CTL (datos no mostrados).

No está claro por qué se obtuvo este resultado anómalo. Pudo haber habido problemas técnicos en la realización del análisis.

Las composiciones antigénicas de la presente invención modulan la respuesta inmune mejorando la respuesta de los anticuerpos y la inmunidad mediada por células de un huésped vertebrado tras la administración de una composición antigénica que comprende un antígeno seleccionado entre un virus patógeno, un hongo bacteriano o un parásito, y una cantidad adyuvante eficaz de MPL™ (en forma acuosa o de emulsión estable) combinado con GM-CSF.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “cantidad adyuvante eficaz” significa una dosis de la combinación de adyuvantes descrita en la presente memoria que es adecuada para generar un aumento de la respuesta inmune en un huésped vertebrado. La dosis concreta dependerá, en parte, de la edad, del peso y de la afección médica del huésped, así como del procedimiento de administración y del antígeno. En una realización preferida, la combinación de adyuvantes utilizará MPL™ en el intervalo de 1–100 µg/dosis. Las dosis adecuadas son determinadas fácilmente por los expertos en la técnica. Las composiciones antigénicas de la presente invención también se pueden mezclar con diluyentes o vehículos inmunológicamente aceptables de una manera convencional para preparar soluciones o suspensiones líquidas inyectables.

Las composiciones antigénicas de la presente invención se administran a un ser humano o vertebrado no humano mediante una variedad de vías, incluyendo, pero no limitándose a, intranasal, oral, vaginal, rectal, parenteral, intradérmica, transdérmica (véase, p.ej.: la solicitud internacional WO 98/20734 (44)), intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa e intraarterial. La cantidad de componente o componentes antigénicos de la composición antigénica variará dependiendo, en parte, de la identidad del antígeno, así como de la edad, del peso y de la afección médica del huésped, así como del procedimiento de administración. De nuevo, las dosis adecuadas son determinadas fácilmente por los expertos en la técnica. Es preferible, aunque no necesario, administrar a la vez el antígeno y la combinación de adyuvantes. El número de dosis y la pauta de dosificación de la composición antigénica también son fácilmente determinados por los expertos en la técnica. En algunos casos, las propiedades adyuvantes de la combinación de adyuvantes pueden reducir el número de dosis necesarias o la duración de la pauta de dosificación.

Las combinaciones de adyuvantes de la presente invención son adecuadas para su uso en composiciones antigénicas que contienen una amplia variedad de antígenos de una amplia variedad de microorganismos patógenos, incluyendo, pero no limitándose a, virus, bacterias, hongos o microorganismos parasitarios que infectan a seres humanos y vertebrados no humanos, o de una célula cancerosa o célula tumoral. El antígeno puede comprender péptidos o polipéptidos derivados de proteínas, así como fragmentos de cualquiera de los siguientes: sacáridos, proteínas, poli- u oligonucleótidos, células cancerosas o tumorales, alérgenos, péptido amiloide u otros componentes macromoleculares. En algunos casos, se incluye más de un antígeno en la composición antigénica.

Las vacunas virales deseables que contienen las combinaciones de adyuvantes de la presente invención incluyen las dirigidas a la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por, sin limitación, el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus de la inmunodeficiencia del simio, el virus respiratorio sincitial, los virus paragripales de tipos 1–3, virus gripal, virus del herpes simple, citomegalovirus humano, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, papilomavirus humano, poliovirus, rotavirus, calicivirus, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la rubéola, adenovirus, virus de la rabia, virus del moquillo canino, virus de la peste bovina, coronavirus, parvovirus, virus de las rinotraqueitis infecciosas, virus de la leucemia felina, virus de la peritonitis infecciosa felina, virus de la bursitis infecciosa aviar, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la enfermedad de Marek, virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino, virus de la arteritis equina y diversos virus de la encefalitis.

Las vacunas bacterianas deseables que contienen las combinaciones de adyuvantes de la presente invención incluyen aquéllas dirigidas a la prevención y/o al tratamiento de una enfermedad causada por, sin limitación, *Haemophilus influenzae* (tanto tipificable como no tipificable), *Haemophilus somnus*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Bordetella pertussis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*,

Shigella, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium–Mycobacterium intracellulare complex*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma gallisepticum*.

5 Las vacunas deseables contra los patógenos fúngicos que contienen las combinaciones de adyuvantes de la presente invención incluyen aquéllas dirigidas a la prevención y/o al tratamiento de una enfermedad causada por, sin limitación, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus* e *Histoplasma*.

10 Las vacunas deseables contra los parásitos que contienen las combinaciones de adyuvantes de la presente invención incluyen aquéllas dirigidas a la prevención y/o al tratamiento de una enfermedad causada por, sin limitación, *Leishmania major*, *Ascaris*, *Trichuris*, *Giardia*, *Schistosoma*, *Cryptosporidium*, *Trichomonas*, *Toxoplasma gondii* y *Pneumocystis carinii*.

15 Las vacunas deseables para producir un efecto anti-cancerígeno terapéutico o profiláctico en un huésped vertebrado que contienen las combinaciones de adyuvantes de la presente invención incluyen aquéllas que utilizan un antígeno canceroso o un antígeno asociado a un tumor, incluyendo, sin limitación, antígeno específico de la próstata, antígeno carcinoembrionario, MUC–1, Her2, CA–125 y MAGE–3.

20 Las vacunas deseables para moderar las respuestas hacia alérgenos en un huésped vertebrado que contienen las combinaciones de adyuvante de la presente invención incluyen aquéllas que contienen un alérgeno o un fragmento del mismo. Los ejemplos de tales alérgenos se describen en la patente estadounidense número 5.830.877 (45) y la solicitud de patente internacional publicada número WO 99/51259 (46), e incluyen polen, veneno de insectos, descamaciones de la piel de animales, esporas de hongos y fármacos (tales como la penicilina). Las vacunas interfieren en la producción de anticuerpos IgE, una causa conocida de las reacciones alérgicas.

25 Las vacunas deseables para prevenir o tratar la enfermedad caracterizada por la deposición amiloide en un huésped vertebrado que contienen las combinaciones de adyuvantes de la presente invención incluyen aquéllas que contienen partes de péptido amiloide (APP). Esta enfermedad tiene diversas denominaciones, tales como la enfermedad de Alzheimer, amiloidosis y la enfermedad amiloidogénica. El péptido β -amiloide (también denominado péptido A β) es un fragmento de 42 aminoácidos del APP que es generado por el procesamiento del APP por parte de las enzimas β y γ secretasa, y tiene la siguiente secuencia:

30 **Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His
Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
(SEQ ID NO:10) .**

35 En algunos pacientes, el depósito amiloide adopta la forma de un péptido A β agregado. Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que la administración de péptido A β aislado produce una respuesta inmune contra el componente de péptido A β de un depósito amiloide en un huésped vertebrado (47). Así pues, las vacunas de la presente invención incluyen las combinaciones de adyuvantes de la presente invención más péptido A β , así como fragmentos de péptido A β y anticuerpos contra el péptido A β o fragmentos del mismo. Uno de tales fragmentos del péptido A β es el péptido de 28 aminoácidos que tiene la siguiente secuencia (48):

40 **Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His
Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
(SEQ ID NO:11) .**

En el caso del VIH y el VIS, las composiciones antigénicas comprenden al menos una proteína, polipéptido, péptido o fragmento derivado de dicha proteína. En algunos casos, se incluyen múltiples proteínas, polipéptidos, péptidos y/o fragmentos del VIH o VIS en la composición antigénica.

45 Las formulaciones de las combinaciones de adyuvantes de la presente invención también son adecuadas para su inclusión como adyuvante en vacunas de polinucleótidos (también conocidas como vacunas de ADN). Tales vacunas pueden incluir además agentes facilitadores, tales como la bupivacaína (véase la patente estadounidense n.º 5.593.972 (49)).

50 El documento WO–A–98/57659 revela composiciones adyuvantes para vacunas. El documento WO–A–99/12565 revela vacunas. El documento WO–A–95/29700 revela una vacuna sintética para la protección contra la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. El documento WO–A–98/56415 revela saponinas purificadas como

adyuvantes orales. El documento WO-A-97/28273 revela la expresión de la proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* del grupo B (MB3) de levadura y vacunas. El documento WO-A-99/02132 revela el uso de emulsiones de aceite en agua submicrométricas con vacunas de ADN. "Vaccine", vol. 12, n.º 12, 1994, páginas 1132-1140 revela la inducción de inmunidad humoral y celular contra el virus de la inmunodeficiencia del simio. El documento WO-A-99/27944 revela la prevención y el tratamiento de la enfermedad amiloidogénica.

Ejemplos

Experimento 1

Inmunización de ratones Balb/c con un péptido del VIH y diversos adyuvantes

Ejemplo 1

10 Materiales y procedimientos

Animales

Los ratones Balb/c hembra, de 7-9 semanas de vida, fueron adquiridos en Taconic Farms, Inc. (Germantown, NY). Todos los ratones fueron alojados en una instalación autorizada por la Asociación Estadounidense para la Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio. Los ratones fueron aclimatados en la instalación durante una semana antes del inicio de los estudios.

Péptidos

La secuencia del péptido multiepítipo de VIH-1_{MN} T1SP10MN(A)(-Cys) es la siguiente:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEC ID N.º 2). Este péptido ha sido descrito anteriormente (28,29) y contiene secuencias de la gp120_{MN} de VIH-1 que producen respuestas de linfocitos Th CD4+ tanto en ratones como en seres humanos, un determinante neutralizante principal y un sitio que es reconocido por los CTL CD8+ de ratones Balb/c. El péptido fue proporcionado por el Dr. R. Searce (Universidad de Duke, Durham, NC). Para el análisis de los CTL, los péptidos correspondientes al epítipo CTL del bucle V3 de VIH-1_{III B} (Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile (SEC ID N.º 12), restringidos a H-2D^d) o HIV-1_{MN} (Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr (SEC ID N.º 13), restringidos a H-2D^d), se adquirieron en Genosys Biotechnologies Inc. (The Woodlands, TX). Se disolvieron los péptidos en agua estéril y se diluyeron en tampones apropiados o en medio de cultivo celular antes de su uso.

Adyuvantes

Todas las preparaciones adyuvantes que contenían MPL™ se obtuvieron en Ribi ImmunoChem Research, Inc. (Hamilton, MT). El MPL™ se preparó en forma de formulación acuosa usando trietanolamina (Sigma, St. Louis, MO). Tras la disolución, se sometió el MPL™ a ultrasonidos según las instrucciones del fabricante para generar una solución opalescente/transparente que fue filtrada en condiciones estériles. La EE de MPL™ se proporcionó como una emulsión de aceite en agua (aceite al 1-2%) basada en escualeno preformulado que tenía concentraciones de MPL™ que variaban de 0-2.500 µg/ml. El fosfato de aluminio fue preparado por los inventores. El adyuvante completo de Freund (CFA) y el adyuvante incompleto (IFA) fue adquirido en Difco Laboratories, Detroit, MI. Los péptidos T1SP10MN(A) y los adyuvantes de Freund se emulsionaron en una proporción 1:1 usando dos jeringas unidas. La IL-12 murina expresada recombinantemente fue preparada por Genetics Institute (Cambridge, MA). El GM-CSF murino recombinante fue suministrado por Immunex (Seattle, WA), proporcionado por R&D Systems (Mineápolis, MN) o adquirido en Biosource International (Camarillo, CA).

Inmunizaciones

Los ratones fueron inmunizados subcutáneamente en la rabadilla en un volumen total de 0,2 ml dividido en partes iguales a cada lado de la cola. Las inmunizaciones se administraron a intervalos temporales variables, según lo indicado más adelante. El antígeno y las citocinas se diluyeron en solución salina tamponada con fosfato hasta las concentraciones apropiadas y se formularon con adyuvantes menos de 16 horas antes de la inmunización en condiciones estériles. Las vacunas se mezclaron mediante una agitación suave y se almacenaron a 4°C. Las formulaciones se mezclaron mediante movimientos vorticiales inmediatamente antes de la inmunización.

Recogidas de muestras

Los animales fueron sangrados antes de la inmunización inicial y en los puntos temporales indicados. Se analizó el suero de los ratones individuales o de mezclas de los ratones de los grupos. Se realizaron lavados vaginales en los

animales sometidos a una eutanasia para analizar los niveles de anticuerpo. Estos se realizaron mediante la instilación de RPMI-10 (75:1) en la cavidad vaginal de ratones hembra usando una pipeta 200:1. Se lavó la cavidad mediante la aplicación y retirada del líquido varias veces, que luego fue añadido a 10:1 de SBF. Los lavados vaginales se analizaron como mezclas.

5 Preparaciones celulares

Para los análisis de proliferación y los análisis de citocinas *in vitro*, se obtuvieron células de bazo de ratones en los puntos temporales indicados. Se prepararon suspensiones de una sola célula de las mezclas de 3-5 ratones según lo indicado en los resultados. Para los análisis de proliferación y de citocinas, se suspendieron las células en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo previamente revestidas durante una noche con antígenos del péptido del VIH, proteínas control o RPMI-10 solo. Se añadieron las células de bazo a 5×10^5 células/pocillo usando medio de cultivo que tenía complementos x2. Se cosecharon los sobrenadantes de los cultivos celulares de los pocillos por triplicado para analizar las citocinas tres o seis días después del inicio del cultivo. Inmediatamente después de la recogida de los sobrenadantes, se sometieron los cultivos a pulsos con ^3H -timidina durante 18-24 horas y se cosecharon para cuantificar la proliferación celular.

15 Análisis de inmunoabsorción ligado a una enzima

Para el análisis de la distribución de anticuerpos y subclases específicos del péptido del VIH, se suspendió el péptido bien en tampón de carbonato (Na_2CO_3 15mM, NaHCO_3 35mM, pH 9,6) o en PBS a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se colocaron en placas de microvaloración de 96 pocillos (Nunc) en un volumen de 100:1. Tras una incubación de una noche a 37°C, se lavaron las placas y se bloquearon (gelatina al 0,1%/PBS) a temperatura ambiente durante 2-4 horas. Se lavaron las placas de ELISA con tampón de lavado (PBS, TweenTM 20 al 0,1%) antes de la adición de suero diluido en serie (PBS, gelatina al 0,1%, TweenTM 20 al 0,05%, azida de sodio al 0,02%). Tras una incubación de cuatro horas, se lavaron los pocillos y se añadieron las diluciones apropiadas de anticuerpos anti-isotipo/subclase biotinilados para una incubación a 4°C durante una noche. Se lavaron los pocillos y se incubaron con peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina. Tras la incubación, se lavaron los pocillos y se revelaron con ABTS. Se leyeron los pocillos a 405 nm. Se estandarizaron los títulos usando sueros control.

Para el análisis de las citocinas, se añadieron sobrenadantes de cultivos celulares a los pocillos revestidos con BVD6-11B11 (para anti-IL4) o R4-6A2 (para interferón gamma). Tras la incubación y el lavado, se revelaron los pocillos usando BVD6-24G2 marcado con biotina (para IL4) o XMG 1.2 (para interferón gamma). Se determinó la concentración de citocinas usando una curva estándar preparada a partir de interferón gamma o interleucina-4 murinos recombinantes. Todos los reactivos de citocina fueron adquiridos en Pharmingen (San Diego, CA).

Análisis de neutralización de VIH-1_{MN}

Los análisis de neutralización se realizaron en el laboratorio del Dr. Thomas Matthews en la Universidad de Duke. En síntesis, se proporcionó suero codificado para la neutralización del aislado viral de laboratorio VIH-1_{MN} (NIH). El análisis se llevó a cabo esencialmente según lo descrito anteriormente (25). En síntesis, se distribuyeron las diluciones de los sueros de análisis en alícuotas en pocillos de una placa de microvaloración de 96 pocillos (25:1/pocillo). Se añadió un volumen igual de cultivo patrón de virus diluido en serie a cada pocillo. Tras la incubación, se añadió la mezcla de virus/anticuerpo a células diana AA5. Se cultivaron las células en placas de microvaloración de 96 pocillos mediante la adición de medio recién preparado en días alternos. A los siete días de la infección, se analizaron los sobrenadantes en cuanto a la presencia de transcriptasa inversa viral como medida de la replicación viral y la infección o inhibición satisfactoria de la misma.

Ejemplo 2

Títulos finales recíprocos de IgG anti-T1SP10MN(A)

Se midieron los títulos recíprocos finales de IgG específicos del péptido del VIH del suero mezclado ($n = 5$ Balb/c) en los puntos temporales indicados tras la inmunización inicial. Los ratones fueron inmunizados subcutáneamente en la rabadilla con 25 μg de T1SP10MN(A)(-Cys), a no ser que se indique lo contrario el día 0 y el día 27. Los ratones receptores de adyuvantes de Freund recibieron una primera vacuna de péptido emulsionado en CFA y una vacuna de recuerdo de IFA. La EE de MPLTM se proporcionó en forma de emulsión que contenía aceite de escualeno al 2% y 50 μg de MPLTM por dosis. La EE es un vehículo de emulsión de aceite en agua constituida por escualeno, glicerol y un agente emulsionante. La IL-12 murina recombinante se administró a 50 ng/ratón. El GM-CSF murino recombinante se administró a 10 μg /ratón. Los resultados se ofrecen en la tabla 1.

Tabla 1

Títulos finales recíprocos de IgG anti-T1SP10MN(A)(-Cys)

| Adyuvante | Péptido del VIH (μ g) | Títulos finales | | |
|---------------------|----------------------------|-----------------|-------------|-----------|
| | | SEMANA 4 | SEMANA 6 | SEMANA 8 |
| Ninguno | 25 | <100 | <100 | <100 |
| CFA/IFA | 25 | 23.998 | 137.683 | 313.200 |
| IL-12r | 25 | <100 | <100 | <100 |
| GM-CSF | 25 | <100 | 17.579 | 12.537 |
| EE | 25 | <100 | 171.923 | 76.479 |
| EE de MPL™ | 25 | <100 | 104.331 | 79.021 |
| EE de MPL™ + IL-12r | 25 | <100 | 1.313.330 | 631.688 |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 25 | 14.824 | >10.000.000 | 3.752.870 |

Ejemplo 35 Títulos finales recíprocos de las subclases de IgG anti-T1SP10MN(A)(-Cys)

Se midieron los títulos finales recíprocos de las subclases de IgG de suero mezclado ($n = 5$ Balb/c) seis semanas después de la inmunización inicial y dos semanas después de la inmunización secundaria. Los ratones fueron inmunizados subcutáneamente en la rabadilla con 25 μ g de péptido, a no ser que se indique lo contrario. En el caso de los ratones receptores de adyuvantes de Freund, recibieron una primera vacuna de péptido emulsionado en adyuvante completo de Freund y luego una vacuna de recuerdo de adyuvante incompleto de Freund la cuarta y sexta semana. La EE de MPL™ se proporcionó en forma de emulsión que contenía aceite de escualeno al 2% y 50 μ g de MPL™ por dosis. La EE es una emulsión de aceite en agua vehículo constituida por escualeno, glicerol y un agente emulsionante. La IL-12 murina recombinante se administró a 50 ng/ratón. El GM-CSF murino recombinante se administró a 10 μ g/ratón. Los resultados se ofrecen en la tabla 2.

15

Tabla 2

Títulos finales recíprocos de las subclases de IgG anti-T1SP10MN(A)(-Cys)

| Adyuvantes | Péptido del VIH (μ g) | Títulos finales | | |
|-------------------------------------|----------------------------|-----------------|---------|---------|
| | | IgG1 | IgG2a | IgG2b |
| Ninguno | 25 | <100 | <100 | <100 |
| CFA/IFA | 25 | 29.907 | 143 | 798 |
| IL-12r (.05) | 25 | <100 | <100 | <100 |
| GM-CSF (10) | 25 | 1.783 | <100 | <100 |
| EE (2%) | 25 | 74.293 | <100 | 3.331 |
| EE (2%) de MPL™ (50) | 25 | 11.441 | 10.176 | 5.280 |
| EE (2%) de MPL™ (50) + IL-12r (.05) | 25 | 169.278 | 27.161 | 2.303 |
| EE (2%) de MPL™ (50) + GM-CSF (10) | 25 | 3.494.862 | 954.707 | 245.828 |

Ejemplo 4Títulos de anticuerpos IgG e IgA anti-T1SP10MN(A)(-Cys) de lavado vaginal

5 Se midieron los títulos de anticuerpos IgG e IgA anti-péptido vaginales del lavado obtenido 2 semanas después de la inmunización final. Se inmunizaron grupos de 5 ratones Balb/c hembra con 25 µg de T1SP10MN(A)(-Cys) y las formulaciones adyuvantes indicadas los días 0, 28 y 42. Se determinaron los títulos de los anticuerpos vaginales del líquido de lavado mezclado. Los resultados se ofrecen en la Tabla 3.

Tabla 3

| Títulos de anticuerpos IgG e IgA anti-T1SP10MN(A)(-Cys) de lavado vaginal | | |
|---|-------|-----|
| Adyuvante | IgG | IgA |
| Ninguno | <20 | <20 |
| CFA/IFA | 20 | <20 |
| IL-12r (.05) | <20 | <20 |
| GM-CSF (10) | <20 | <20 |
| EE (2%) de MPL™ (50) | <20 | <20 |
| EE (2%) de MPL™ (50) + IL-12r (.05) | 24 | <20 |
| EE (2%) de MPL™ (50) + GM-CSF (10) | 1.125 | 113 |
| EE (2%) | <20 | <20 |

Ejemplo 5Proliferación de células de bazo

10 Se midió la proliferación de células de bazo de ratones inmunizados con T1SP10MN(A)(-Cys) y diversas formulaciones adyuvantes. Se inmunizaron grupos de cinco ratones Balb/c hembra con 25 µg de T1SP10MN(A)(-Cys) y los adyuvantes indicados los días 0 y 28. Se establecieron las células de bazo en cultivo el día 56 y se cosecharon para medir la incorporación de ³H-timidina 96 horas después. Se inmunizaron los ratones con 50 ng de IL-12, 10 µg de GM-CSF, 50 µg de MPL™ en una formulación acuosa o en forma de emulsión estable con EE al 2%. Los datos se presentan en forma de valores de cpm delta en comparación con los valores de proliferación medidos en las células desarrolladas en cultivo sin estimulación. Los recuentos de la estimulación de fondo fueron de una cpm < 800. Los resultados se ofrecen en la tabla 4.

Tabla 4

| Proliferación de células de bazo | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Adyuvante | Antígeno | | | Con A (1 µg/ml) | Lisozima (30 µg/ml) | Medio (0 µg/ml) |
| | Péptido del VIH (10 µg/ml) | Péptido del VIH (3,3 µg/ml) | Péptido del VIH (1,1 µg/ml) | | | |
| Ninguno | 2.065 | 2.373 | 801 | 50.019 | 628 | - |
| CFA/IFA | 1.236 | 878 | 641 | 53.781 | - | - |
| IL-12 | 809 | 692 | 308 | 42.612 | - | - |
| GM-CSF | 25.821 | 19.784 | 14.249 | 55.578 | - | - |
| EE de MPL™ | 46.275 | 41.675 | 40.998 | 45.443 | 413 | - |
| EE de MPL™ + IL-12 | 26.560 | 19.907 | 9.600 | 38.989 | 934 | - |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 74.909 | 66.257 | 62.798 | 37.775 | 366 | - |

(continuación)

| Adyuvante | Antígeno | | | Con A (1 µg/ml) | Lisozima (30 µg/ml) | Medio (0 µg/ml) |
|-----------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| | Péptido del VIH (10 µg/ml) | Péptido del VIH (3,3 µg/ml) | Péptido del VIH (1,1 µg/ml) | | | |
| EE | 31.327 | 23.396 | 20.480 | 66.949 | – | – |

Ejemplo 6Secreción de IL-4 por células de bazo

- 5 Se midió la interleucina-4 secretada en cultivo por células de bazo estimuladas con 25 µg de T1SP10MN(A)(-Cys). Se cosecharon las células de bazo de mezclas de cinco ratones hembra Balb/c y se cultivaron con los estímulos antigénicos indicados (50 ng de IL-12, 10 µg de GM-CSF, 50 µg de MPL™ como se indica) bien durante tres o seis días. Se determinaron los niveles de interleucina-4 mediante ELISA y se compararon con un patrón que tenía una concentración conocida. Los pozos en blanco indican que el análisis no pudo detectar interleucina-4 en esas condiciones de cultivo. El límite inferior de la sensibilidad de detección fue de 22 unidades/ml. Los resultados se ofrecen en la Tabla 5.
- 10

Tabla 5

Secreción de IL-4 por células de bazo

Cultivos de tres días:

| Adyuvante | Antígeno | | | Con A (1 µg/ml) | Lisozima (30 µg/ml) | Medio (0 µg/ml) |
|------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| | Péptido del VIH (10 µg/ml) | Péptido del VIH (3,3 µg/ml) | Péptido del VIH (1,1 µg/ml) | | | |
| Ninguno | | | | 149 | | |
| CFA/IFA | | | | 156 | | |
| IL-12 | | | | 156 | | |
| GM-CSF | | | | 159 | | |
| EE de MPL™ | 297 | 79 | 90 | 134 | | |
| EE de MPL™ + IL-12 | | | | 77 | | |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 142 | 151 | 102 | 146 | | |
| EE | | | | 197 | | |

15

Cultivos de seis días:

| Adyuvante | Antígeno | | | Con A (1 µg/ml) | Lisozima (30 µg/ml) | Medio (0 µg/ml) |
|-----------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| | Péptido del VIH (10 µg/ml) | Péptido del VIH (3,3 µg/ml) | Péptido del VIH (1,1 µg/ml) | | | |
| Ninguno | | | | 124 | | |
| CFA/IFA | | | | 204 | | |

(continuación)

| Adyuvante | Antígeno | | | Con A (1 µg/ml) | Lisozima (30 µg/ml) | Medio (0 µg/ml) |
|------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| | Péptido del VIH (10 µg/ml) | Péptido del VIH (3,3 µg/ml) | Péptido del VIH (1,1 µg/ml) | | | |
| IL-12 | | | | 146 | | |
| GM-CSF | | | | 143 | | |
| EE de MPL™ | 163 | 96 | 57 | 63 | | |
| EE de MPL™ + IL-12 | 55 | | | 76 | | |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 511 | 457 | 204 | 76 | | |
| EE | 41 | | 36 | 88 | | |

Ejemplo 7Secreción de interferón gamma por células de bazo

- 5 Se midió el interferón gamma secretado en cultivo por células de bazo estimuladas con 25 µg de TISP10MN(A)(-Cys). Se cosecharon las células de bazo de mezclas de cinco ratones hembra Balb/c y se cultivaron con los estímulos antigénicos indicados (los mismos que en el Ejemplo 6) bien durante tres o seis días. Se determinaron los niveles de interferón gamma mediante ELISA y se compararon con un patrón que tenía una concentración conocida.
- 10 Los pozos en blanco indican que el análisis no pudo detectar interferón gamma en esas condiciones de cultivo. El límite inferior de la sensibilidad de detección fue de 4 picogramos/ml. Los resultados se ofrecen en la tabla 6.

Tabla 6

Secreción de interferón gamma por células de bazo

Cultivos de tres días:

| Adyuvante | Antígeno | | | Con A (1 µg/ml) | Lisozima (30 µg/ml) | Medio (0 µg/ml) |
|------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| | Péptido del VIH (10 µg/ml) | Péptido del VIH (3,3 µg/ml) | Péptido del VIH (1,1 µg/ml) | | | |
| Ninguno | | | | 23,0 | | |
| CFA/IFA | | | | 5,0 | | |
| IL-12 | | | | 5,9 | | |
| GM-CSF | | | | 17,6 | | |
| EE de MPL™ | 6,6 | 4,2 | 4,3 | 18,2 | | |
| EE de MPL™ + IL-12 | | | | 9,2 | | |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 11,5 | 5,1 | 5,3 | 14,6 | | |
| EE | | | | 8 | | |

(continuación)

Cultivos de seis días:

| Adyuvante | Antígeno | | | Con A (1 µg/ml) | Lisozima (30 µg/ml) | Medio (0 µg/ml) |
|------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| | Péptido del VIH (10 µg/ml) | Péptido del VIH (3,3 µg/ml) | Péptido del VIH (1,1 µg/ml) | | | |
| Ninguno | | | | 71,8 | | |
| CFA/IFA | | | | 15,9 | | |
| IL-12 | | | | 8,4 | | |
| GM-CSF | | | | 7,3 | | |
| EE de MPL™ | 190,1 | 51,5 | 319,0 | 187,3 | | |
| EE de MPL™ + IL-12 | 18,0 | 15,6 | 42,0 | 83,4 | | 12,7 |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 62,2 | 20,2 | 39,2 | 134,7 | | |
| EE | 13,3 | | | 54,6 | | |

Experimento 25 Inmunización de ratones Balb/c con péptido del VIH y diversos adyuvantes**Ejemplo 8**Materiales y procedimientosAnimales

Se usaron ratones Balb/c hembra de 7-9 semanas de edad según el Ejemplo 1 anterior.

10 Péptidos

Se usó el péptido de VIH-1-MN T1SP10MN(A) descrito en el Ejemplo 1. Se rehidrató el péptido en solución salina hasta una concentración de 1 mg/ml.

Adyuvantes

15 Los adyuvantes usados fueron los descritos en el Ejemplo 1, a excepción de que en algunos casos, se conservó el MPL™ en forma de formulación acuosa en lugar de usar la forma de emulsión estable.

Inmunizaciones

20 Los ratones fueron inmunizados subcutáneamente en la rabadilla en un volumen total de 0,2 ml dividido en partes iguales a cada lado de la cola. Las inmunizaciones se administraron los días 0 y 21 con 25 µg de péptido del VIH junto con la cantidad indicada de adyuvante(s). Los ratones a los que se administró CFA/IFA recibieron CFA el día 0 e IFA el día 21. Las diluciones y el mezclado se realizaron como se describe en el Ejemplo 1.

Recogidas de muestras

Las recogidas de muestras de los animales se llevaron a cabo según el protocolo del Ejemplo 1 un día antes de cada inmunización y 14 días después de la segunda inmunización.

Preparaciones celulares

25 Las preparaciones celulares se generaron y se trataron según el protocolo el Ejemplo 1.

Análisis de inmunoabsorción ligado a una enzima

Los ELISA se llevaron a cabo según el protocolo el Ejemplo 1.

Análisis de neutralización de VIH-1_{MN}

Se volvieron a realizar los análisis de neutralización en la Universidad de Duke según el protocolo el Ejemplo 1.

5 Ejemplo 9Títulos finales recíprocos de IgG anti-T1SP10MN(A)(-Cys)

10 Se midieron los títulos finales recíprocos de IgG anti-péptido de cada media geométrica de los ratones individuales (TGM) o de suero mezclado (n = 5 Balb/c) obtenido 14 días después de la segunda inmunización. También se midieron los títulos finales de las subclases IgG1 e IgG2a de suero mezclado. En el caso de los ratones receptores de adyuvantes de Freund, recibieron una primera vacuna de 25 µg de péptido emulsionado en CFA y luego una vacuna de recuerdo de IFA. La EE de MPL™ se proporcionó en forma de emulsión que contenía aceite de escualeno al 1% y 50 µg de MPL™ por dosis. El MPL™ acuoso se administró a 50 µg por dosis. La IL-12 murina recombinante se administró a 40 ng/ratón. El GM-CSF murino recombinante se administró a 10 µg/ratón. Los resultados se ofrecen en la tabla 7.

15

Tabla 7

Títulos finales recíprocos de IgG anti-T1SP10MN(A)(-Cys)

| Adyuvante (µg/dosis) | IgG (mezcla) | IgG (TGM) | Títulos finales | |
|-------------------------|--------------|-----------|-----------------|----------------|
| | | | IgG1 (mezcla) | IgG2a (mezcla) |
| Ninguno | <1000 | 720 | <1000 | <1000 |
| CFA/IFA | 72.387 | 135.740 | 126.433 | 9.023 |
| EE de MPL™ | 183.802 | 197.808 | 162.480 | 98.342 |
| EE | 2.426 | 6.029 | 1.859 | <1000 |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 148.139 | 133.171 | 103.298 | 50.415 |
| EE de MPL™ + IL- 12r | 182.852 | 611.076 | 6.610 | 111.662 |
| GM-CSF | 27.333 | 1.756 | 14.538 | 4.864 |
| IL-12r | <1000 | 500 | <1000 | <1000 |
| MPL™ | 219.705 | 241.918 | 134.428 | 7.127 |
| MPL™ + GM-CSF | 946.695 | 1.101.449 | 545.444 | 12.291 |
| MPL™ + IL-12r | 377.972 | 2.378.702 | 204.334 | 12.795 |

Ejemplo 10Títulos finales recíprocos de subclases de IgG anti-T1SP10MN(A)(-Cys)

20 Se midieron los títulos recíprocos finales de los anticuerpos IgG e IgA de los lavados vaginales específicos del péptido del VIH de suero mezclado (n = 5 Balb/c) 15 días después de la inmunización secundaria. Los ratones se inmunizaron como en el Ejemplo 9. La EE de MPL™ se proporcionó en forma de emulsión que contenía aceite de escualeno al 1% y 50 µg de MPL™ por dosis. El MPL™ acuoso se administró a 50 µg por dosis. La IL-12 murina recombinante se administró a 40 ng/ratón. El GM-CSF murino recombinante se administró a 10 µg/ratón. Los resultados se ofrecen en la tabla 8.

25

Tabla 8

Títulos finales recíprocos de IgG e IgA anti-T1SP10MN(A)(-Cys)

| Adyuvantes | Títulos finales | |
|-----------------------------|-----------------|-----|
| | IgG | IgA |
| Ninguno | <10 | <10 |
| CFA/IFA | <10 | <10 |
| EE de MPL™ (1%) | 32 | <10 |
| EE | <10 | <10 |
| EE de MPL™ (1%) + GM-CSF | 129 | <10 |
| EE de MPL™ (1%) + IL-12 | 40 | <10 |
| GM-CSF | 26 | <10 |
| IL-12r | <10 | <10 |
| MPL™ | <10 | <10 |
| MPL™ + GM-CSF | <10 | <10 |
| MPL™ + IL-12 | 260 | 197 |

Ejemplo 115 Proliferación de células de bazo

Se midió la proliferación de células de bazo como respuesta a la estimulación *in vitro* con T1SP10MN(A)(-Cys) y diversas formulaciones adyuvantes (las mismas que en el Ejemplo 10). Las células se cultivaron durante un total de 96 horas. Se añadió ³H-timidina a los cultivos durante las últimas 18 horas. Los datos se presentan como un índice de proliferación normalizado con respecto a las células estimuladas en cultivo con ConA (cpm media de antígeno/cpm media de ConA) – [cpm media de medio/cpm media de ConA] x 100. Como resultado, las células cultivadas en medio tienen una proliferación de fondo de 0. Los resultados se ofrecen en la tabla 9. Los valores entre paréntesis corresponden a valores de proliferación inferiores a los de las células desarrolladas en cultivo sin estimulación.

Tabla 9

15 Proliferación de células de bazo

| Adyuvante | Antígeno | | | | |
|---------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------|
| | Péptido del VIH (10 µg/ml) | Péptido del VIH (3,3 µg/ml) | Péptido del VIH (1,1 µg/ml) | Con A (5 µg/ml) | Lisozima (10 µg/ml) |
| Ninguno | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 98,3 | 0,4 |
| CFA/IFA | 2,0 | 0,8 | 0,4 | 98,0 | 0,9 |
| EE de MPL™ | 0,7 | 0,4 | (0,2) | 99,2 | 0,4 |
| EE | 0,5 | 0,3 | 0,1 | 99,0 | 0,4 |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 4,3 | 2,7 | 2,3 | 99,1 | 0,8 |
| EE de MPL™ + IL-12 | 6,6 | 4,9 | (1,3) | 83,8 | 17,4 |

(continuación)

| Adyuvante | Antígeno | | | | |
|---------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------|
| | Péptido del VIH (10 µg/ml) | Péptido del VIH (3,3 µg/ml) | Péptido del VIH (1,1 µg/ml) | Con A (5 µg/ml) | Lisozima (10 µg/ml) |
| GM-CSF | 6,8 | 2,7 | 1,6 | 99,0 | 0,1 |
| IL-12 | 0,2 | 0,2 | 0,5 | 99,1 | 0,2 |
| MPL™ | 1,0 | 1,4 | 0,5 | 99,2 | 0,4 |
| MPL™ + GM-CSF | 27,5 | 19,2 | 13,3 | 97,5 | 0,5 |
| MPL™ + IL-12 | 2,3 | 1,5 | 1,3 | 99,4 | (0,0) |

Ejemplo 12Secreción de IL-4 por células de bazo

- 5 Se midió la interleucina-4 secretada en cultivo por células de bazo estimuladas con T1SP10MN(A)(-Cys). Las células se cultivaron durante un total de 96 horas. Se analizó la IL-4 de los sobrenadantes de los cultivos celulares mediante ELISA. Todos los valores se ofrecen tras restarlos de los determinados en sobrenadantes de células estimuladas con 10 µg de una proteína irrelevante (lisozima).
- 10 Los resultados se ofrecen en la tabla 10 en pg/ml. Los resultados que se encuentran bajo el límite de detección, tras restarlos de la estimulación inducida con lisozima se indican como "bd". Los adyuvantes fueron 40 ng de IL-12, 10 µg de GM-CSF y 50 µg de MPL™.

Tabla 10

Secreción de IL-4 por células de bazo

| Adyuvante | Antígeno | | | |
|---------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| | Péptido del VIH (10 µg/ml) | Péptido del VIH (3,3 µg/ml) | Péptido del VIH (1,1 µg/ml) | Con A (5 µg/ml) |
| Ninguno | bd | bd | bd | 336 |
| CFA/IFA | bd | bd | bd | 117 |
| EE de MPL™ | bd | bd | bd | 187 |
| EE | bd | bd | bd | 450 |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 40 | 42 | 24 | 214 |
| EE de MPL™ + IL-12 | 5 | bd | bd | 266 |
| GM-CSF | bd | 9 | 36 | 226 |
| IL-12 | bd | bd | 15 | 411 |
| MPL™ | 5 | bd | 17 | 286 |
| MPL™ + GM-CSF | bd | bd | bd | 241 |
| MPL™ + IL-12 | bd | bd | bd | 665 |

Ejemplo 13Secreción de interferón gamma por células de bazo

5 Se midió el interferón gamma secretado en cultivo por células de bazo estimuladas con T1SP10MN(A)(-Cys). Las células se cultivaron durante un total de 96 horas. Se analizó el interferón gamma de los sobrenadantes de los cultivos celulares mediante ELISA. Todos los valores se presentan tras restarlos de los determinados en sobrenadantes de células estimuladas con 10 µg de lisozima. Los resultados se ofrecen en la Tabla 11 en unidades/ml. Los resultados que están bajo el límite de detección, tras la restarlos de la estimulación inducida con lisozima se indican como "bd". Los adyuvantes fueron los mismos que los del Ejemplo 12.

10

Tabla 11

Secreción de interferón gamma por células de bazo

| Adyuvante | Antígeno | | | Con A (5 µg/ml) |
|---------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| | Péptido del VIH (10 µg/ml) | Péptido del VIH (3,3 µg/ml) | Péptido del VIH (1,1 µg/ml) | |
| Ninguno | bd | bd | 1 | 189 |
| CFA/IFA | bd | bd | 3 | 193 |
| EE de MPL™ | 2 | bd | bd | 170 |
| EE | bd | bd | bd | 130 |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 12 | 3 | 5 | 138 |
| EE de MPL™ + IL-12 | 23 | 8 | 9 | 168 |
| GM-CSF | 2 | 3 | 4 | 167 |
| IL-12 | 4 | 2 | 41 | 179 |
| MPL™ | 5 | bd | bd | 203 |
| MPL™ + GM-CSF | bd | 20 | 19 | 31 |
| MPL™ + IL-12 | 10 | 4 | 3 | 51 |

Experimento 3Inmunización de ratones Swiss-Webster con un péptido del VIH y diversos adyuvantes

15 Se siguieron los protocolos del Experimento 2, con ratones Swiss-Webster en lugar de ratones Balb/c. En este experimento, sólo se midieron los títulos finales recíprocos de IgG anti-péptido y los títulos finales recíprocos de anticuerpos IgG e IgA de los lavados vaginales.

Ejemplo 14Títulos finales recíprocos de IgG anti-péptido del VIH

20 Se midieron los títulos finales recíprocos de IgG anti-T1SP10MN(A)(-Cys) a partir de las medias geométricas de los ratones Swiss-Webster individuales (TGM) obtenidas 14 días después de la segunda inmunización. También se midieron los títulos finales de las subclases IgG1 e IgG2a de suero mezclado. Los ratones receptores de adyuvantes de Freund recibieron una primera vacuna de péptido emulsionado en CFA y una vacuna de recuerdo de IFA. La EE de MPL™ se proporcionó en forma de emulsión que contenía aceite de escualeno al 1% y 50 µg de MPL™ por dosis. El MPL™ acuoso se administró a 50 µg por dosis. La IL-12 murina recombinante se administró a 40 ng/ratón. El GM-CSF murino recombinante se administró a 10 µg/ratón. Los resultados se ofrecen en la tabla 12.

25

Tabla 12

Títulos finales recíprocos de IgG anti-péptido del VIH

| Adyuvante | Títulos finales | | |
|---------------------|-----------------|---------------|----------------|
| | IgG (TGM) | IgG1 (mezcla) | IgG2a (mezcla) |
| Ninguno | 500 | <1000 | <1000 |
| CFA/IFA | 9.038 | 62.358 | 54.053 |
| EE de MPL™ | 15.831 | 3.835 | 8.872 |
| EE | 625 | <1000 | <1000 |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 1.374 | <1000 | 1.328 |
| EE de MPL™ + IL-12r | 6.142 | <1000 | 2.170 |
| GM-CSF | 500 | <1000 | <1000 |
| IL-12r | 500 | <1000 | <1000 |
| MPL™ | 1.960 | <1000 | <1000 |
| MPL™ + GM-CSF | 58.211 | 35.724 | 37.959 |
| MPL™ + IL-12r | 5.489 | 8.535 | 17.769 |

5 **Ejemplo 15**Títulos finales recíprocos de las subclases de IgG anti-péptido del VIH

10 Se midieron los títulos recíprocos finales de los anticuerpos IgG e IgA de los lavados vaginales específicos del péptido del VIH de suero mezclado (n = 5 Swiss-Webster) 15 días después de la inmunización secundaria. Los ratones se inmunizaron como en el Ejemplo 14. La EE de MPL™ se proporcionó en forma de emulsión que contenía aceite de escualeno al 1% y 50 µg de MPL™ por dosis. El MPL™ acuoso se administró a 50 µg por dosis. La IL-12 murina recombinante se administró a 40 ng/ratón. El GM-CSF murino recombinante se administró a 10 µg/ratón. Los resultados se ofrecen en la tabla 13.

Tabla 13

Títulos finales recíprocos de IgG e IgA anti-péptido del VIH

| Adyuvantes | Títulos finales | |
|--------------------------|-----------------|-----|
| | IgG | IgA |
| Ninguno | <10 | <10 |
| CFA/IFA | 118 | <10 |
| EE de MPL™ (1%) | <10 | <10 |
| EE | <10 | <10 |
| EE de MPL™ (1%) + GM-CSF | <10 | <10 |
| EE de MPL™ (1%) + IL-12 | <10 | <10 |
| GM-CSF | <10 | <10 |
| IL-12r | <10 | <10 |
| MPL™ | <10 | <10 |

(continuación)

| Adyuvantes | Títulos finales | |
|---------------|-----------------|-----|
| | IgG | IgA |
| MPL™ + GM-CSF | 25 | <10 |
| MPL™ + IL-12 | <10 | <10 |

Experimento 4**Imunización de ratones Balb/c con un péptido del VIH y diversos adyuvantes**

5 Se siguieron los protocolos del Experimento 2 a excepción de que los ratones fueron inmunizados los días 0 y 28, y sangrados para la evaluación serológica los días 0, 27 y 41. El CFA/IFA se formuló con CFA el día 0 e IFA el día 28. La EE de MPL™ se formuló con 50 µg de MPL™ y EE al 2%, mientras que se usaron 50 ng de IL-12 y 10 µg de GM-CSF.

Ejemplo 16**Títulos finales recíprocos de IgG anti-péptido del VIH**

10 Se midieron los títulos finales recíprocos de IgG anti-T1SP10MN(A)(-Cys) de los ratones individuales y sus medias geométricas (n = 5 Balb/c) 41 días después de la inmunización inicial y 13 días después de la inmunización secundaria. Los resultados se ofrecen en la tabla 14. El día cero, todos los títulos individuales fueron inferiores 50. La anotación “[sin datos]” significa que el animal murió antes de finalizar el protocolo. “DE” significa desviación estándar.

15 **Tabla 14**
Títulos de IgG en suero específicos de T1SP10MN(A)(-Cys) individuales y de media geométrica

| Adyuvante | Ratón 1 | Ratón 2 | Ratón 3 | Ratón 4 | Ratón 5 | TGM | DE |
|--------------------|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CFA/IFA | 2.806.160 | 4.856.380 | 148.038 | 172.947 | 972.484 | 805.599 | 2.025.740 |
| IL-12 | 594 | 50 | 50 | 50 | 50 | 82 | 243 |
| GM-CSF | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 0 |
| EE | 11.469 | [sin datos] | 5.519 | 12.620 | 50 | 2.514 | 5.813 |
| EE + IL-12 | 38.042 | 8.030 | 35.081 | 50 | 37.932 | 7.271 | 18.320 |
| EE + GM-CSF | 485.985 | 223.518 | 63.377 | 38.050 | 1.857.860 | 217.494 | 761.374 |
| MPL™ | 50 | 151.846 | 249.054 | 436.378 | 1.246.470 | 63.452 | 490.091 |
| MPL™ + IL-12 | 1.855.170 | 1.117.800 | 1.255.290 | 692.219 | 7.001.540 | 1.660.297 | 2.614.417 |
| MPL™ + GM-CSF | 115.527 | 1.049.310 | 301.636 | 316.223 | 736.959 | 385.568 | 380.380 |
| EE de MPL™ | 904.947 | 5.805.010 | 291.382 | 346.835 | 354.449 | 716.000 | 2.396.968 |
| EE de MPL™ + IL-12 | 244.171 | 8.545.550 | 455.380 | 377.697 | 1.095.650 | 829.707 | 3.593.727 |
| EE de MPL™ + GMCSF | 3.016.000 | 724.940 | 1.718.590 | 1.483.990 | 28.259 | 691.033 | 1.124.414 |

Ejemplo 17Títulos finales recíprocos de las subclases de IgG anti-péptido del VIH

Se midieron los títulos finales recíprocos de las subclases de IgG anti-péptido de suero mezclado (n = 5 Balb/c) 41 días después de la inmunización inicial y 13 días después de la inmunización secundaria. Los resultados se ofrecen en la tabla 15.

5

Tabla 15

Títulos finales recíprocos de subclases de IgG anti-T1SP10MN(A)(-Cys)

| Adyuvantes | Títulos finales | | |
|---------------------|-----------------|---------|---------|
| | IgG1 | IgG2a | IgG2b |
| CFA/IFA | 359.238 | 122.107 | 155.877 |
| IL-12 | <100 | <100 | <100 |
| GM-CSF | 5.514 | <100 | <100 |
| EE | 5.011 | <100 | <100 |
| EE + IL-12 | 7.331 | <100 | <100 |
| EE + GM-CSF | 67.111 | <100 | <100 |
| MPL™ | 33.544 | 212 | <100 |
| MPL™ + IL-12 | 608.163 | 6.019 | <100 |
| MPL™ + GM-CSF | 114.959 | 8.000 | <100 |
| EE de MPL™ | 142.404 | 29.141 | 1.564 |
| EE de MPL™ + IL-12 | 164.866 | 34.439 | 558 |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 274.241 | 33.843 | 29.965 |

Ejemplo 1810 Títulos de anticuerpos IgG e IgA anti-péptido del VIH de lavado vaginal

Se midieron los títulos de anticuerpos IgG e IgA anti-péptido vaginales del lavado realizado 41 días después de la inmunización final y 13 días después de la inmunización secundaria. Los resultados se ofrecen en la tabla 16.

Tabla 16

Títulos de anticuerpos IgG e IgA anti-T1SP10MN(A)(-Cys) de lavado vaginal

| Adyuvante | IgG | IgA |
|---------------|-----|-----|
| CFA/IFA | 464 | 13 |
| IL-12 | <10 | <10 |
| GM-CSF | <10 | <10 |
| EE | <10 | <10 |
| EE + IL-12 | <10 | <10 |
| EE + GM-CSF | 32 | 14 |
| MPL™ | 12 | <10 |
| MPL™ + IL-12 | 643 | 44 |
| MPL™ + GM-CSF | 211 | 65 |

(continuación)

| Adyuvante | IgG | IgA |
|---------------------|-----|-----|
| EE de MPL™ | 153 | 16 |
| EE de MPL™ + IL-12 | 88 | 30 |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 190 | 53 |

Ejemplo 19Proliferación de células de bazo

- 5 Se midió la proliferación de células de bazo de ratones inmunizados con T1SP10MN(A)(-Cys) y diversas formulaciones adyuvantes. Se estimularon las células de bazo *in vitro* durante cuatro días con 3,3 µg/ml de T1SP10MN(A)(-Cys). Los resultados se muestran en la Figura 4 como el cambio en la incorporación de timidina marcada como resultado de una estimulación *in vitro* con 3,3 µg/ml de T1SP10MN(A)(-Cys) frente a la incorporación en ausencia de estimulación (cpm delta).

10 Experimento 5Inmunización de ratones Balb/c con un péptido del VIH y diversos adyuvantes

Se siguieron los protocolos del Experimento 2 a excepción de que los ratones fueron inmunizados subcutáneamente los días 0 y 22, y sangrados para la evaluación serológica el día 42. La EE de MPL™ se formuló con 50 µg de MPL™ y EE al 1%, mientras que se usaron 10 µg de GM-CSF.

15 **Ejemplo 20**Títulos finales recíprocos de IgG anti-péptido del VIH

Se midieron los títulos finales recíprocos de las subclases de IgG anti-péptido de suero mezclado (n = 5 Balb/c) 42 días después de la inmunización inicial y 13 días después de la inmunización secundaria. También se midieron las medias geométricas con desviación estándar para IgG. Los resultados se ofrecen en la tabla 17.

20

Tabla 17

Títulos finales recíprocos de IgG anti-T1SP10MN(A)(-Cys)

| Adyuvante | IgG | IgG1 | IgG2a | IgG2b | TGM de IgG | DE |
|---------------------|-----------|-----------|---------|---------|------------|-----------|
| Ninguno | <1000 | <1000 | <1000 | <1000 | <1000 | - |
| CFA/IFA | 390.931 | 144.564 | 33.137 | 13.134 | 741.966 | 834.567 |
| GM-CSF | 11.639 | 3.815 | <1000 | <1000 | 5.133 | 32.762 |
| EE | <1000 | <1000 | <1000 | <1000 | <1000 | - |
| EE + GM-CSF | 84.965 | 55.998 | <1000 | <1000 | 28.247 | 165.628 |
| MPL™ | 2.635.118 | 1.314.771 | 9.688 | 13.716 | 2.032.441 | 5.638.450 |
| MPL™ + GM-CSF | 835.218 | 322.441 | 26.976 | 35.697 | 1.133.423 | 881.331 |
| EE de MPL™ | 1.577.357 | 642.436 | 113.917 | 45.025 | 1.450.821 | 5.876.690 |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 6.598.573 | 1.212.160 | 238.440 | 214.570 | 6.418.920 | 2.925.687 |

Experimento 6Inmunización de ratones Balb/c con un péptido del VIH y diversos adyuvantes

5 Se siguieron los protocolos del Experimento 2, a excepción de que el péptido del VIH contenía una cisteína en la posición de aminoácido 17 y los ratones (n = 3 Balb/c) fueron inmunizados subcutáneamente los días 0 y 21, y sangrados para la evaluación serológica los días -1 (el día de antes de la primera inmunización), 13, 20 y 28. La EE de MPL™ se formuló con 50 µg de MPL™ y EE al 1%, mientras que se usaron 10 µg de GM-CSF. El péptido del VIH T1SP10MN(A)+Cys (26) contiene una cisteína en la posición de aminoácido 17 y tiene una longitud de 40 residuos. El T1SP10MN(A)+Cys fue adquirido en Genosys Biotechnologies (The Woodlands, TX).

Ejemplo 2110 Títulos finales recíprocos de IgG anti-T1SP10MN(A)

Se midieron los títulos finales recíprocos de IgG anti-T1SP10MN(A) de los ratones individuales y sus medias geométricas (n = 3 Balb/c) 28 días después de la inmunización inicial. Los resultados se ofrecen en la tabla 18.

Tabla 18

Efecto de la EE de MPL™ + GM-CSF sobre la respuesta de IgG hacia el péptido del VIH (+Cys)

| Adyuvante | IgG | TGM | IgG1 | TGM | IgG2a | TGM | IgG2b | TGM |
|---------------------|------------|-----------|-----------|-----------|---------|---------|---------|---------|
| EE de MPL™ + GM-CSF | 14.275.585 | 8.942.480 | 2.097.104 | 1.437.319 | 251.235 | 239.615 | 210.746 | 210.178 |
| | 13.618.523 | | 2.484.849 | | 225.253 | | 296.429 | |
| | 3.678.324 | | 569.823 | | 243.103 | | 148.621 | |
| EE de MPL™ | 1.913.110 | 5.206.349 | 644.377 | 990.194 | 22.557 | 114.913 | 23.141 | 70.632 |
| | 11.405.649 | | 1.937.492 | | 152.430 | | 127.600 | |
| | 6.467.553 | | 777.643 | | 441.326 | | 119.338 | |
| MPL™ | 91.728 | 350.486 | 23.249 | 84.978 | 500 | 2.859 | 500 | 2.906 |
| | 529.663 | | 155.199 | | 1.628 | | 1.102 | |
| | 886.156 | | 170.071 | | 28.722 | | 44.531 | |
| Ninguno | <500 | - | <500 | - | <500 | - | <500 | - |
| | <500 | | <500 | | <500 | | <500 | |
| | <500 | | <500 | | <500 | | <500 | |

15

Experimento 7Inmunización de ratones Balb/c con un péptido del VIH y diversos adyuvantes

20 Se siguieron los protocolos del Experimento 6 a excepción de que los ratones (n = 3 Balb/c) fueron inmunizados subcutáneamente los días 0 y 32, y sangrados para la evaluación serológica el día 38. La EE de MPL™ se formuló con 50 µg de MPL™ y EE al 1%, mientras que se usaron 10 µg de GM-CSF.

Ejemplo 22Títulos finales recíprocos de IgG anti-péptido del VIH

25 Se midieron los títulos finales recíprocos de IgG anti-T1SP10MN(A)+Cys de los ratones individuales y sus medias geométricas (n = 3 Balb/c) 38 días después de la inmunización inicial. Los resultados se ofrecen en la tabla 19.

Tabla 19

Efecto de la EE de MPL™ + GM-CSF sobre la respuesta de IgG hacia el péptido del VIH (+Cys)

| Adyuvante | IgG | TGM | IgG1 | TGM | IgG2a | TGM | IgG2b | TGM |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|---------|--------|--------|
| EE de MPL™ + GM-CSF | 4.144.648 | 4.782.117 | 922.507 | 1.090.760 | 115.290 | 328.097 | 74.130 | 64.521 |
| | 5.055.375 | +/- | 985.180 | +/- | 629.615 | +/- | 76.257 | +/- |
| | 5.219.387 | 472.745 | 1.427.916 | 224.940 | 486.563 | 216.753 | 47.515 | 13.077 |
| EE de MPL™ | 736.325 | 559.033 | 288.659 | 293.160 | 58.506 | 103.260 | 33.047 | 27.180 |
| | 696.393 | +/- | 809.341 | +/- | 244.559 | +/- | 46.703 | +/- |
| | 340.712 | 177.831 | 107.844 | 297.378 | 76.951 | 83.698 | 13.010 | 13.837 |
| MPL™ + GM-CSF | 444.774 | 1.367.343 | 146.146 | 611.040 | 3.342 | 8.546 | 2.155 | 7.067 |
| | 3.993.897 | +/- | 3.568.062 | +/- | 17.469 | +/- | 14.130 | +/- |
| | 1.439.116 | 1.494.876 | 437.511 | 1.549.005 | 10.691 | 5.769 | 11.590 | 5.152 |
| MPL™ | 404.755 | 442.259 | 148.818 | 115.544 | 11.874 | 3.429 | 9.685 | 4.980 |
| | 446.952 | +/- | 90.380 | +/- | 1.674 | +/- | 3.605 | +/- |
| | 478.163 | 30.080 | 114.686 | 23.969 | 2.028 | 4.727 | 3.538 | 2.882 |
| EE | <1.000 | <1.000 | <1.000 | <1.000 | <1.000 | <1.000 | <1.000 | <1.000 |
| | <1.000 | | <1.000 | | <1.000 | | <1.000 | |
| | 1.214 | | <1.000 | | <1.000 | | <1.000 | |
| Ninguno | <1.000 | <1.000 | <1.000 | <1.000 | <1.000 | <1.000 | <1.000 | <1.000 |
| | <1.000 | | <1.000 | | <1.000 | | <1.000 | |
| | <1.000 | | <1.000 | | <1.000 | | <1.000 | |

Experimento 8**5 Análisis de CTL en ratones Balb/c**

Se siguieron los protocolos del Experimento 6 con respecto a la inmunización de los ratones. Se midió la actividad CTL de células de bazo aisladas de ratones siete días después de la inmunización secundaria. La EE de MPL™ se formuló con 50 µg de MPL™ en EE al 1%, con o sin 10 µg de GM-CSF, más 50 µg de T1SP10MN(A)(+Cys).

Ejemplo 23**10 Análisis de CTL en ratones Balb/c**

Para el análisis de los CTL, se extirparon células de bazo de ratones inmunizados a los 14 días de la inmunización primaria y a los siete días de la inmunización secundaria. Se siguió esencialmente un protocolo anteriormente descrito (34). En síntesis, se mezclaron células de bazo sin eritrocitos de tres ratones de cada grupo. Se volvieron a estimular las células efectoras de bazo (4×10^6 /ml) en placas de cultivo de 24 pocillos en un volumen de 1,5–2 ml durante siete días con 1 µg/ml bien del péptido epítipo CTL 10–mero “MN” o “IIIB”. Ambos epítipos CTL estaban restringidos a H-2D^d. Se complementaron los cultivos con 10U/ml de IL-2 murina recombinante (Biosource) durante los últimos cinco días de cultivo. Para el análisis de la actividad citotóxica, se marcaron las células P815 con Cr⁵¹ y se pulsaron con 5 µg/ml de péptido (IIIB o MN) durante cuatro horas, y se añadieron a células efectoras esplénicas cultivadas. Se usaron diluciones por tres de proporciones entre las células efectoras y las células diana de 100:1 a 3,7:1. Se calculó el porcentaje de actividad CTL como el porcentaje de liberación de cromo usando ((liberación específica de cromo – liberación espontánea de cromo)/(liberación máxima de cromo – liberación espontánea de

romo)) x 100. Se midió la liberación de cromo tras un periodo de incubación de seis horas. La liberación espontánea media de cromo fue, en todo momento, inferior al 15% de la liberación máxima. En la Figura 5, se muestran los resultados de los datos del día 28.

Experimento 9

5 Inmunización de macacos Rhesus con diversos péptido del VIS y adyuvantes

Se probó la formulación adyuvante de EE de MPL™ y GM-CSF en macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) en cuanto a su capacidad para inducir CTL con especificidad antigénica. En este experimento, se probó la formulación adyuvante con un inmunógeno peptídico trivalente constituido por tres epítomos CTL restringidos a Mamu A*01 separados (uno de *gag*, otro de *pol* y otro de *env*), cada uno sintetizado químicamente con o sin un epítomo cooperador T promiscuo de *env* del VIS en el laboratorio del Dr. Barton Haynes, Universidad de Duke.

Los péptidos que contenían un epítomo CTL restringido a Mamu A*01 fueron los siguientes:

Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met (SEC ID N.º 3) (*gag*)

Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val (SEC ID N.º 4) (*pol*)

Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile (SEC ID N.º 5) (*env*)

15 También se ligó cada uno de estos epítomos que contenía CTL al epítomo cooperador T que tenía la siguiente secuencia:

**Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly
Val Ala Pro Thr Lys Ala (SEQ ID NO:6)**

Así pues, los tres péptidos multiepítomos tenían las siguientes secuencias:

20 **Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly
Val Ala Pro Thr Lys Ala Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln
Met (SEQ ID NO:7)**

25 **Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly
Val Ala Pro Thr Lys Ala Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu
Val (SEQ ID NO:8)**

30 **Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly
Val Ala Pro Thr Lys Ala Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln
Ile (SEQ ID NO:9)**

El análisis de los CTL se realizó mediante un análisis de tinción de tetrámeros restringido a Mamu A*01 en el laboratorio del Dr. Norman Letvin, Harvard Medical School.

35 Animales, dosis e inmunógenos:

Se identificaron mediante PCR los macacos Rhesus que expresaban la molécula homóloga a HLA-A Mamu A*01 y el subtipo DRβ0201 y se alojaron en la colonia de New Iberia, LA.

El estudio incluyó tres grupos de dos macacos Rhesus jóvenes (*Macaca mulatta*) cada uno descrito en la Tabla 20. El grupo 1 estaba constituido por dos animales positivos en Mamu A*01 y negativos en DRβ0201 Rh 73 y Rh 80. Se administraron a estos animales los péptidos epítomos CTL de *gag*, *env* y *pol* del VIS restringidos a Mamu A*01

40

5 trivalentes (mezcla de péptidos cortos), junto con EE de MPL™ y GM-CSF. El grupo 2 estaba constituido por dos macacos positivos en Mamu A*01 y positivos en DRβ0201 que recibieron los péptidos epítomos CTL de *gag*, *pol* y *env* de VIS/Th (mezcla de péptidos largos), junto con EE de MPL™ y GM-CSF. El grupo 3 comprendía dos animales negativos en Mamu A*01 y positivos en DRβ0201 inoculados con péptidos CTL de *gag*, *pol* y *env* de VIS/Th (mezcla de péptidos largos). La Tabla 20 presenta los grupos por tipo de HLA y los inmunógenos peptídicos usados.

Tabla 20

| Animales, dosis e inmunógenos | | | |
|-------------------------------|---------------|--|---|
| Grupo | N.º de animal | Tipo de HLA | Inmunógenos peptídicos |
| 1 | Rh 73, Rh 80 | Mamu A*01 ⁺ DR*β020 ⁻ | p11C de <i>gag</i> del VIS/CTL (SEC ID N.º 3) p68A de <i>pol</i> del VIS/CTL (SEC ID N.º 4) p41A de <i>env</i> del VIS/CTL (SEC ID N.º 5) 0,75 mg de cada péptido |
| 2 | Rh 55, Rh 142 | Mamu A*01 ⁺ DR*β0201 ⁺ | p11C de <i>gag</i> del VIS/CTL/Th1 (SEC ID N.º 7) p68A de <i>pol</i> del VIS/CTL/Th1 (SEC ID N.º 8) p41A de <i>env</i> del VIS/CTL/Th1 (SEC ID N.º 9) 2,4 mg de cada péptido |
| 3 | Rh 41, Rh 47 | MamuA*01 ⁻ DR*β0201 ⁺ | p11c de <i>gag</i> del VIS/CTL/Th1 (SEC ID N.º 7) p68A de <i>pol</i> del VIS/CTL/Th1 (SEC ID N.º 8) p41A de <i>env</i> del VIS/CTL/Th1 (SEC ID N.º 9) 2,4 mg de cada péptido |

10 Se inmunizaron todos los grupos subcutáneamente con 1 ml de la respectiva mezcla de péptidos formulada en 50 µg de EE de MPL™ en aceite al 1% y 250 µg de GM-CSF humano en las semanas 0, 4 y 8. Se aumentó la dosis de EE de MPL™ hasta 125 µg en aceite al 1% para la inmunización de la semana 18. Para todos los grupos, se disolvieron 2,4 mg de cada péptido largo y 0,75 mg de cada péptido corto en 900 µl de agua destilada desionizada. Entonces se usó la solución peptídica para reconstituir el GM-CSF humano y se añadieron 100 µl de la formulación de EE de MPL™.

Ejemplo 24

15 Análisis de CTL en macacos Rhesus

20 Se sangraron los animales cada dos semanas y se analizaron los CTL restringidos a Mamu A*01 de la sangre heparinizada mediante la tinción de tetrámeros de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) recién preparadas y cultivadas (50). Se estimularon las células CMSP bien con p11c, p68A, p41A o p46 el día 0 y luego se cultivaron en presencia de IL-2 y se analizaron el día 11. También se llevó a cabo un análisis de liberación de ⁵¹Cr estándar en las CMSP cultivadas (50).

25 Se llevó a cabo un análisis de tetrámeros como se explica a continuación: se incubaron los péptidos epítomos p11c de *gag*, p68A de *pol* o p68A de *pol* o p41A de *env* con Mamu A*01 biotinilado purificado en presencia de β2-microglobulina, luego se unieron a avidina y se conjugaron con PE (ficoeritrina). Luego se usó este tetrámero para la tinción de células CD8+ de macaco con receptores de linfocitos T que reconocían al epítipo p11C, p68A o p41A. Un tetrámero DRβ0201 diferente plegado alrededor del epítipo p46 de *env* dominante permitió la tinción de las células CD4+ que reconocían específicamente el epítipo Th p46. Los resultados se muestran en las tablas 21-24.

Tabla 21

| Porcentaje de células CD8+ positivas en tetrámero de <i>gag</i> del VIS/p11c | | | | | | | | | |
|--|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Semanas | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 9 | 10 | 14 |
| Grupo 1 | Rh 73 | 0,1 | 3,9 | 5,1 | 4,2 | 2,7 | 2,6 | 0,1 | 2,7 |
| | Rh 80 | 0,1 | 0,4 | 0,1 | 0,6 | 0,2 | 0,2 | 1,4 | 0,2 |
| Grupo 2 | Rh 55 | 0,1 | 3,1 | 4,5 | 5,9 | 4,0 | 4,0 | 4,1 | 2,7 |
| | Rh 142 | 0,2 | 4,7 | 2,5 | 5,4 | 3,9 | 3,9 | 2,5 | 4,1 |
| Grupo 3 | Rh 41 | 0 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 |
| | Rh 47 | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,1 |

Tabla 22

| Porcentaje de células CD8+ positivas en tetrámero de <i>pol</i> de CTL del VIS/p68A | | | | | | | | | |
|---|---------|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|
| | Semanas | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 9 | 10 | 14 |
| Grupo 1 | Rh 73 | 0,1 | 0,4 | 0,1 | 10,1 | 2,5 | 0,5 | 1,8 | 1,5 |
| | Rh 80 | 0,2 | 0,2 | 0,6 | 2,3 | 0,5 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Grupo 2 | Rh 55 | 0,1 | 1,1 | 1,1 | 5,5 | 5,6 | 1,5 | 11,7 | 6,4 |
| | Rh 142 | 0,2 | 0,6 | 0,2 | 1,0 | 1,8 | 0,3 | 2,3 | 1,2 |
| Grupo 3 | Rh 41 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,3 |
| | Rh 47 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | |

5

Tabla 23

| Porcentaje de células CD8+ positivas en tetrámero de <i>env</i> del VIS/p41A | | | | | | | | | |
|--|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Semanas | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 9 | 10 | 14 |
| Grupo 1 | Rh 73 | 0,8 | 3,5 | 2,5 | 2,0 | 3,5 | 1,7 | 1,5 | 1,6 |
| | Rh 80 | 0,2 | 0,2 | 3,4 | 0,5 | 0,1 | 0,0 | 0,2 | 0,2 |
| Grupo 2 | Rh 55 | 0,2 | 1,1 | 0,4 | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,6 |
| | Rh 142 | 0,3 | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,4 |

(continuación)

| Porcentaje de células CD8+ positivas en tetrámero de <i>env</i> del VIS/p41A | | | | | | | | | |
|--|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Semanas | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 9 | 10 | 14 |
| Grupo 3 | Rh 41 | 0 | 0,2 | 0,1 | | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,2 |
| | Rh 47 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,0 | 0,2 |

Tabla 24

| Porcentaje de células CD4+ positivas en tetrámero DR β 0201 cooperador T del VIS/p46 | | | | | | | | | |
|--|---------|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Semanas | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 9 | 10 | 14 |
| Grupo 1 | Rh 73 | | | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | Rh 80 | | | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 |
| Grupo 2 | Rh 55 | | | 0,2 | 0,5 | 0,7 | 0,4 | 0,3 | 0,3 |
| | Rh 142 | | | 0,2 | 0,9 | 0,6 | 1,0 | 0,6 | 0,5 |
| Grupo 3 | Rh 41 | | | | | 0,6 | 0,4 | 0,3 | 0,3 |
| | Rh 47 | | | | | 1,2 | 0,8 | 1,6 | 1,2 |

5 Experimento 10Inmunización de ratones Swiss–Webster con proteína porina B de *Neisseria gonorrhoea* y diversos adyuvantes

Se dividieron los ratones Swiss–Webster no consanguíneos en cinco grupos de 10 ratones cada uno. Cada grupo recibió 1 μ g de proteína porina B recombinante (de la cepa FA1090 con 16 aminoácidos en el terminal amino de un fago, seguidos por la forma madura de la proteína porina B). El primer grupo no recibió ningún adyuvante; el segundo grupo recibió 50 μ g de MPLTM; el tercer grupo recibió MPLTM más 5 μ g de GM–CSF; el cuarto grupo recibió 25 μ g de EE de MPLTM; el quinto grupo recibió EE de MPLTM más 5 μ g de GM–CSF. Los ratones fueron inmunizados subcutáneamente en la rabadilla en un volumen total de 0,2 ml dividido en partes iguales a cada lado de la base de la cola/rabadilla. Las inmunizaciones se administraron en la semana 0 y la semana 4.

Ejemplo 2515 Títulos finales recíprocos de las subclases de IgG anti–proteína porina B

Se sangraron los ratones el día de antes de cada inmunización y a los 13 días de la inmunización final. Se analizó el suero de las mezclas de los ratones de cada grupo. Se midieron los títulos finales recíprocos de las subclases de IgG anti–proteína porina B del suero mezclado (n = 10 Swiss–Webster) mediante lavado vaginal la semana 3 y la semana 6. Los resultados se ofrecen en la tabla 25. Todos los títulos previos a la inmunización del día 0 fueron menores de 50.

Tabla 25

Títulos finales recíprocos de las subclases de IgG anti–proteína porina B

| Adyuvante | Semana 3 | | | Semana 6 | | |
|-----------|----------|------|-------|----------|-------|-------|
| | IgG | IgG1 | IgG2a | IgG | IgG1 | IgG2a |
| Ninguno | 4.146 | 531 | 293 | 157.203 | 4.467 | 9.782 |

(continuación)

| Adyuvante | Semana 3 | | | Semana 6 | | |
|---------------------|----------|------|--------|-----------|--------|---------|
| | IgG | IgG1 | IgG2a | IgG | IgG1 | IgG2a |
| MPL™ | 3.381 | 171 | 318 | 431.529 | 23.465 | 20.422 |
| MPL™ + GM-CSF | 7.895 | 50 | 980 | 790.193 | 2.478 | 82.690 |
| EE de MPL™ | 135.016 | 297 | 13.339 | 3.945.614 | 10.805 | 342.322 |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 106.008 | 725 | 8.772 | 3.304.231 | 31.920 | 201.787 |

También se determinaron las medias geométricas de los títulos de IgG individuales de la semana 6 contra la proteína porina B recombinante. Los resultados se ofrecen en la tabla 26.

5

Tabla 26

Títulos de IgG individuales

| Adyuvante | Media geométrica | Error estándar |
|---------------------|------------------|----------------|
| Ninguno | 100.089 | 63.467 |
| MPL™ | 217.114 | 451.611 |
| MPL™ + GM-CSF | 649.801 | 353.863 |
| EE de MPL™ | 1.917.908 | 1.478.357 |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 2.144.567 | 858.184 |

Experimento 11Inmunización de ratones Swiss-Webster con proteína porina B de *Neisseria gonorrhoea* y diversos adyuvantes

10 Se dividieron los ratones Swiss-Webster no consanguíneos en seis grupos de cinco ratones cada uno. Cada grupo recibió 1 µg de proteína porina B recombinante (de la cepa FA1090 con 16 aminoácidos en el terminal amino de un fago, seguidos por la forma madura de la proteína porina B). El primer grupo no recibió ningún adyuvante (la proteína se formuló en PBS); el segundo grupo recibió 40 ng de IL-12; el tercer grupo recibió 50 µg de MPL™; el cuarto grupo recibió MPL™ más 40 ng de IL-12; el quinto grupo recibió 25 µg de EE de MPL™; el sexto grupo recibió EE de MPL™ más 40 ng de IL-12. Los ratones fueron inmunizados subcutáneamente en la rabadilla en un volumen total de 0,2 ml. Las inmunizaciones se administraron en la semana 0 y la semana 4.

15

Ejemplo 26Títulos finales recíprocos de las subclases de IgG anti-proteína porina B y títulos de IgG e IgA de lavados vaginales

20 Se sangraron los ratones el día de antes de cada inmunización y a los 13 días de la inmunización final. Se analizó el suero de las mezclas de los ratones de cada grupo. Se midieron los títulos recíprocos finales de las subclases de IgG anti-proteína porina B del suero mezclado (n = 5 Swiss-Webster) mediante lavado vaginal y se midieron los títulos de IgG e IgA de los lavados vaginales la semana 3 y la semana 6. Los resultados se ofrecen en la tabla 27. Todos los títulos previos a la inmunización del día 0 fueron menores de 50. La dilución inicial para el análisis de los lavados vaginales fue de 1/5.

25

Tabla 27

| Adyuvante | Semana 3 | | | Semana 6 | | | Lavado vaginal | |
|--------------------|----------|-------|--------|------------|---------|---------|----------------|-----|
| | IgG | IgG1 | IgG2a | IgG | IgG1 | IgG2a | IgG | IgA |
| Ninguno | 9.084 | 1.872 | 2.872 | 408.944 | 8.314 | 64.500 | 80 | 5 |
| IL-12 | 7.266 | 2.578 | 2.071 | 571.325 | 6.278 | 58.552 | 93 | 5 |
| MPL™ | 5.656 | 500 | 1.925 | 265.127 | 76.640 | 60.910 | 54 | 5 |
| MPL™ + IL-12 | 28.274 | 1.442 | 11.348 | 3.747.987 | 120.112 | 44.997 | 88 | 5 |
| EE de MPL™ | 53.056 | 8.543 | 17.550 | 5.133.154 | 513.236 | 622.514 | 338 | 5 |
| EE de MPL™ + IL-12 | 757.133 | 5.622 | 33.259 | 10.935.000 | 210.478 | 471.552 | 3.036 | 5 |

Experimento 125 Inmunización de ratones Balb/c con proteína F del virus respiratorio sincitial y diversos adyuvantes

Se dividieron ratones Balb/c en siete grupos de cinco ratones cada uno. Cada grupo recibió 3 µg de proteína F nativa purificada del virus respiratorio sincitial (VRS) humano (en forma dimérica). El primer grupo no recibió ningún adyuvante (la proteína se formuló en PBS); el segundo grupo recibió 100 µg de fosfato de aluminio (alumbre); el tercer grupo recibió 20 µg de Stimulon™ QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, MA); el cuarto grupo recibió 50 µg de MPL™; el quinto grupo recibió MPL™ más 5 µg de GM-CSF; el sexto grupo recibió 25 µg de EE de MPL™; el séptimo grupo recibió EE de MPL™ más 5 µg de GM-CSF. Los ratones fueron inmunizados intramuscularmente con un volumen total de 0,2 ml en el muslo superior. Las inmunizaciones se administraron en la semana 0 y la semana 4.

Ejemplo 2715 Títulos finales recíprocos de las subclases de IgG anti-proteína F del VRS

Se sangraron los ratones el día de antes de cada inmunización y a los 13 días de la inmunización final. Se analizó el suero de las mezclas de los ratones de cada grupo. Se midieron los títulos recíprocos finales de las subclases de IgG anti-proteína F del VRS de suero mezclado (n = 5 Balb/c). Los resultados se ofrecen en la tabla 28. Todos los títulos previos a la inmunización del día 0 fueron menores de 50.

20

Tabla 28

Títulos finales recíprocos de las subclases de IgG anti-proteína F del VRS

| Adyuvante | Semana 3 | | | Semana 6 | | |
|---------------------|-----------|---------|---------|------------|-----------|-----------|
| | IgG | IgG1 | IgG2a | IgG | IgG1 | IgG2a |
| Ninguno | 18.452 | 3.698 | 319 | 539.156 | 3.119.905 | 80.855 |
| Alumbre | 66.710 | 35.839 | 4.321 | 5.417.001 | 3.226.833 | 291.474 |
| Stimulon™ QS-21 | 313.665 | 150.988 | 176.080 | 12.113.156 | 2.902.521 | 4.324.004 |
| MPL™ | 124.197 | 28.134 | 11.882 | 3.310.838 | 900.863 | 1.057.108 |
| MPL™ + GM-CSF | 419.873 | 91.649 | 65.453 | 10.343.803 | 753.890 | 688.554 |
| EE de MPL™ | 374.992 | 44.115 | 147.366 | 19.333.189 | 1.493.284 | 6.314.264 |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 1.748.272 | 51.966 | 267.265 | 30.816.193 | 1.716.850 | 2.641.258 |

Ejemplo 28Proliferación de células de bazo

Se midió la proliferación de células de bazo como respuesta a la estimulación *in vitro* con 2,5 µg/ml de proteína F del VRS y diversas formulaciones adyuvantes (las mismas que en el Ejemplo 27). Las células de bazo se cosecharon a los 14 días de la inmunización secundaria y se establecieron en cultivo a una densidad de 5×10^5 células. Las células se cultivaron durante un total de 96 horas. Se añadió ³H-timidina a los cultivos durante las últimas 18 horas. Los datos se presentan como un índice de proliferación normalizado con respecto a las células estimuladas en cultivo con ConA (cpm media de antígeno/cpm media de ConA) – [cpm media de medio/cpm media de ConA] x 100. Como resultado, las células cultivadas en medio tienen una proliferación de fondo de 0. Los resultados se ofrecen en la tabla 29.

Tabla 29

Proliferación de células de bazo

| Adyuvante | Índice de proliferación normalizado |
|---------------------|-------------------------------------|
| Ninguno | 18,1 |
| Alumbre | 13,1 |
| Stimulon™QS-21 | 0,8 |
| MPL™ | 0,4 |
| MPL™ + GM-CSF | 20,0 |
| EE de MPL™ | 17,8 |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 16,3 |

Experimento 1315 Inmunización de ratones Balb/c con proteína F del virus respiratorio sincitial y diversos adyuvantes

Se repitió el protocolo del Experimento 12 (inmunizaciones en la semana 0 y la semana 4 con la proteína F del VRS con o sin diversos adyuvantes).

Ejemplo 29Títulos finales recíprocos de las subclases de IgG anti-proteína F del VRS

20 Se sangraron los ratones el día de antes de cada inmunización y a los 13 días de la inmunización final. Se analizó el suero de las mezclas de los ratones de cada grupo. Se midieron los títulos recíprocos finales de las subclases de IgG anti-proteína F del VRS de suero mezclado (n = 5 Balb/c). Los resultados se ofrecen en la tabla 30. Todos los títulos previos a la inmunización del día 0 fueron menores de 50.

Tabla 30

25 Títulos finales recíprocos de las subclases de IgG anti-proteína F del VRS

| Adyuvante | Semana 3 | | | Semana 6 | | |
|----------------|----------|---------|---------|------------|-----------|-----------|
| | IgG | IgG1 | IgG2a | IgG | IgG1 | IgG2a |
| Ninguno | 6.442 | 2.808 | 713 | 5.195.059 | 963.203 | 38.791 |
| Alumbre | 128.695 | 36.841 | 1.975 | 4.285.993 | 567.972 | 27.668 |
| Stimulon™QS-21 | 528.036 | 296.292 | 176.703 | 37.221.721 | 1.823.402 | 1.724.319 |
| MPL™ | 104.702 | 21.930 | 61.253 | 6.153.833 | 1.384.927 | 955.685 |
| MPL™ + GM-CSF | 262.128 | 79.888 | 55.249 | 21.054.796 | 3.412.710 | 2.070.305 |

(continuación)

| Adyuvante | Semana 3 | | | Semana 6 | | |
|---------------------|----------|--------|---------|------------|-----------|-----------|
| | IgG | IgG1 | IgG2a | IgG | IgG1 | IgG2a |
| EE de MPL™ | 184.246 | 47.194 | 180.932 | 31.731.335 | 4.376.601 | 6.406.591 |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 375.575 | 70.422 | 289.542 | 27.079.086 | 2.124.043 | 6.341.497 |

Ejemplo 30Actividad CTL de células de bazo

5 Se midió la actividad CTL (de los linfocitos T citotóxicos) de célula de bazo como consecuencia de la inmunización con proteína F del VRS y los adyuvantes indicados dos semanas después de la inmunización final. Los datos representan el porcentaje de actividad CTL específica de las células de bazo cultivadas con células diana infectadas por el VRS a una proporción de células efectoras con respecto a células diana de 33:1. Se determinó el porcentaje de actividad CTL específica como en el Ejemplo 24, restando la actividad CTL contra las dianas no infectadas de la actividad específica de las células diana infectadas por el VRS. Se infectaron células de bazo preinmunes con el VRS a una Mdl (multiplicidad de infección) de 1,5 durante dos horas como fuente de células estimulantes *in vitro*. Se añadieron las células respondedoras de los bazos de los ratones inmunizados a las células estimulantes en una proporción de 5:1 y se cultivaron durante seis días. El día 5, se infectaron células diana (línea celular MHC-H-2d de Balb/c) con el VRS a una Mdl de 10 durante dos horas y se incubaron durante una noche. El día 6, se cosecharon las células diana infectadas y no infectadas, y se pulsaron con ⁵¹Cr. Entonces las células efectoras *in vitro* se añadieron a las células diana en una proporción de E:D que variaba de 100:1 a 3:1. Se midió la liberación de ⁵¹Cr tras cuatro horas de incubación. Los resultados se ofrecen en la tabla 31.

Tabla 31

Actividad CTL de células de bazo

| Adyuvante | Porcentaje de actividad CTL |
|---------------------|-----------------------------|
| Ninguno | 1 |
| Alumbre | 4 |
| Stimulon™ QS-21 | 53 |
| MPL™ | 6 |
| MPL™ + GM-CSF | 15 |
| EE de MPL™ | 30 |
| EE de MPL™ + GM-CSF | 36 |

Experimento 14Inmunización de ratones Balb/c con proteína F del virus respiratorio sincitial y diversos adyuvantes

25 Se dividieron los ratones Balb/c en seis grupos de cinco ratones cada uno. Cada grupo recibió 3 µg de proteína F nativa purificada del VRS (en forma dimérica). El primer grupo no recibió ningún adyuvante (la proteína se formuló en PBS); el segundo grupo recibió 40 ng de IL-12; el tercer grupo recibió 50 µg de MPL™; el cuarto grupo recibió MPL™ más 40 ng de IL-12; el quinto grupo recibió 25 µg de EE de MPL™; el sexto grupo recibió EE de MPL™ más 40 ng de IL-12. Los ratones fueron inmunizados subcutáneamente con un volumen total de 0,2 ml en la rabadilla, dividido en partes iguales a cada lado de la cola. Las inmunizaciones se administraron en la semana 0 y la semana 4.

30

Ejemplo 31Títulos finales recíprocos de las subclases de IgG anti-proteína F del VRS

5 Se sangraron los ratones el día de antes de cada inmunización y a los 13 días de la inmunización final. Se analizó el suero de las mezclas de los ratones de cada grupo. Se midieron los títulos recíprocos finales de las subclases de IgG anti-proteína F del VRS del suero mezclado (n = 5 Balb/c). Los resultados se ofrecen en la tabla 32. Todos los títulos previos a la inmunización del día 0 fueron menores de 50.

Tabla 32

Títulos finales recíprocos de las subclases de IgG anti-proteína F del VRS

| Adyuvante | Semana 3 | | | Semana 6 | | |
|--------------------|-----------|--------|---------|------------|-----------|-----------|
| | IgG | IgG1 | IgG2a | IgG | IgG1 | IgG2a |
| Ninguno | 5.332 | 12.925 | 500 | 2.381.899 | 977.782 | 76.226 |
| IL-12 | 13.557 | 3.442 | 500 | 4.459.059 | 1.345.099 | 65.951 |
| MPL™ | 26.179 | 55.767 | 8.397 | 3.467.097 | 402.128 | 170.252 |
| MPL™ + IL-12 | 186.516 | 22.321 | 10.800 | 1.546.443 | 420.322 | 253.465 |
| EE de MPL™ | 1.708.358 | 53.608 | 144.876 | 9.075.480 | 565.403 | 1.000.459 |
| EE de MPL™ + IL-12 | 329.050 | 15.788 | 69.794 | 10.935.000 | 386.639 | 1.284.274 |

Ejemplo 32Actividad CTL de células de bazo

10 Se midió la actividad CTL de células de bazo como consecuencia de la inmunización con proteína F del VRS y los adyuvantes indicados dos semanas después de la inmunización final. Los datos representan el porcentaje de actividad CTL específica de las células de bazo cultivadas con células diana infectadas por el VRS en una proporción de células efectoras con respecto a células diana de 33:1. Se determinó el porcentaje de actividad CTL específica como en el Ejemplo 24, restando la actividad CTL contra las dianas no infectadas de la actividad específica de las células diana infectadas por el VRS. Se infectaron células de bazo preinmunes con el VRS a una Mdl de 1,5 durante dos horas como fuente de células estimulantes *in vitro*. Se añadieron las células respondedoras de los bazos de los ratones inmunizados a las células estimulantes en una proporción de 5:1 y se cultivaron durante seis días. El día 5, se infectaron células diana (línea celular MHC-H-2d de Balb/c) con el VRS a una Mdl de 10 durante dos horas y se incubaron durante una noche. El día 6, se cosecharon las células diana infectadas y no infectadas, y se pulsaron con ⁵¹Cr. Entonces se añadieron las células efectoras *in vitro* a las células diana en una proporción de E:D que variaba de 100:1 a 3:1. Se midió la liberación de ⁵¹Cr tras cuatro horas de incubación. Los resultados se ofrecen en la tabla 33.

Tabla 33

Actividad CTL de células de bazo

| Adyuvante | Porcentaje de actividad CTL |
|--------------------|-----------------------------|
| Ninguno | 6 |
| IL-12 | 22 |
| MPL™ | 15 |
| MPL™ + IL-12 | 13 |
| EE de MPL™ | 33 |
| EE de MPL™ + IL-12 | 28 |

Experimento 15Inmunización de ratones Balb/c con proteína de la nucleocápside del virus gripal y diversos adyuvantes

Se dividieron los ratones Balb/c en seis grupos de cinco ratones cada uno. Cada grupo recibió 1 µg de proteína NP (nucleocápside) del virus gripal de la cepa A/dorn/307/72. [grupos de prueba] El primer grupo no recibió ningún adyuvante (el péptido se formuló en PBS); el segundo grupo recibió 100 µg de fosfato de aluminio (alumbre); el tercer grupo recibió 50 µg de MPL™; el cuarto grupo recibió MPL™ más 5 µg de GM-CSF; el quinto grupo recibió 25 µg de EE de MPL™; el sexto grupo recibió EE de MPL™ más 5 µg de GM-CSF. Los ratones fueron inmunizados subcutáneamente en la rabadilla con un volumen total de 0,2 ml. Las inmunizaciones se administraron en la semana 0 y la semana 4.

10 **Ejemplo 33**Actividad CTL de células de bazo

Se midió la actividad CTL de células de bazo como consecuencia de la inmunización con el péptido NP gripal y los adyuvantes indicados dos semanas después de la inmunización final. La medición se llevó a cabo siguiendo el procedimiento del Ejemplo 32 con células p815 diana pulsadas con péptido (el péptido correspondía a los aminoácidos 147–155 de la NP y tenía la secuencia: Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val (SEC ID N.º 14)). La inclusión de GM-CSF en las formulaciones que contenían MPL™ o EE de MPL™ produjeron una notable reducción de la actividad CTL (datos no mostrados).

Bibliografía

1. Mosmann, T.R., *et al.*, *J. Immunol.*, 136, 2348–2357 (1986).
- 20 2. Patente estadounidense n.º 4.912.094.
3. Ahlers, J.D., *et al.*, *J. Immunol.*, 158, 3947–3958 (1997).
4. Scharton–Kersten, T., *et al.*, *J. Immunol.* 154, 5320–5330 (1995).
5. Ghalib, H.W., *et al.*, *J. Immunol.*, 154, 4623–4629 (1995).
6. Murray, H.W. y Hariprashad, J., *J. Exp. Med.*, 181, 387–391 (1995).
- 25 7. Patente estadounidense n.º 5.571.515.
8. Finkelman, F.D. y Holmes, J., *Ann. Rev. Immunol.*, 8, 303–333 (1990).
9. Snapper, C.M., *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175, 1367–1371 (1992).
10. Kobayashi, M., *et al.*, *J. Exp. Med.*, 170, 827–845 (1989).
11. Solicitud de patente internacional publicada n.º WO 90/05147.
- 30 12. Patente estadounidense n.º 5.078.996.
13. Patente estadounidense n.º 5.229.496.
14. Patente estadounidense n.º 5.073.627.
15. Alderson, M.R., *et al.*, *J. Exp. Med.*, 178, 669–674 (1993).
16. Snapper, C.M., *et al.*, *J. Immunol.*, 154, 5842–5850 (1995).
- 35 17. Patente estadounidense n.º 5.013.548.
18. Patente estadounidense n.º 5.019.387.
19. Charbit, A., *et al.*, *Vaccine*, 11, 1221–1228 (1993).
20. Natuk, R.J., *et al.*, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 9, 395–404 (1993).
21. Johnson, R.P., *et al.*, *J. Virol.*, 68, 3145–3153 (1994).
- 40 22. Fuller, D.H., *et al.*, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 10, 1433–1441 (1994).

23. Berzofsky, J.A., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 88, 876–884 (1991).
24. Palker, T.J., *et al.*, *J. Immunol.*, 142, 3612–3619 (1989).
25. Hart, M.K., *et al.*, *J. Immunol.*, 145, 2677–2685 (1990).
26. Haynes, B.F., *et al.*, *J. Immunol.*, 151, 1646–1653 (1993).
- 5 27. Hart, M.K., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU., 88, 9448–9452 (1991).
28. Bartlett, J.A., *et al.*, *AIDS*, 12, 1291–1300 (1998).
29. Haynes, B.F., *et al.*, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 11, 211–221 (1998).
30. Patente estadounidense n.º 5.861.243.
31. Patente estadounidense n.º 5.932.218.
- 10 32. Patente estadounidense n.º 5.939.074.
33. Patente estadounidense n.º 5.993.819.
34. Patente estadounidense n.º 6.037.135.
35. Solicitud de patente internacional publicada n.º 671.947.
36. Staats, H.F., *et al.*, *J. Immunol.*, 157, 462–472 (1996).
- 15 37. Porgador, A., *et al.*, *J. Immunol.*, 158, 834–841 (1997).
38. Allen, T.M., *et al.*, *J. Immunol.*, 160, 6062–6071 (1998).
39. Miller, M.D., *et al.*, *J. Immunol.*, 147, 320–329 (1991).
40. Egan, M.A., *et al.*, *J. Virol.*, 73, 5466 (1999).
41. Hart, M.K., *J. Immunol.*, 145, 2677–2685 (1990).
- 20 42. Patente estadounidense n.º 5.736.361.
43. Patente estadounidense n.º 5.223.254.
44. Solicitud de patente internacional publicada n.º WO 98/20734.
45. Patente estadounidense n.º 5.830.877.
46. Solicitud de patente internacional publicada n.º WO 99/51259.
- 25 47. Solicitud de patente internacional publicada n.º WO 99/27944.
48. Patente estadounidense n.º 4.666.829.
49. Patente estadounidense n.º 5.593.972.
50. Kuroda, M.J., *et al.*, *J. Exp. Med.*, 187, 1373–1381 (1998).

Listado de secuencias

- 30 <110> American Cyanamid Company
- <120> Formulaciones de combinaciones de adyuvantes
- <130> 33482–00/PCT
- <140>
- <141>
- 35 <160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 40

<212> PRT

5 <213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

<400> 1

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
 1 5 10 15

Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro
 20 25 30

10

Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys
 35 40

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

15 <213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

<400> 2

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
 1 5 10 15

Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly
 20 25 30

20

Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys
 35

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Virus de la Inmunodeficiencia del Simio

<400> 3

Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met
 1 5

<210> 4

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Virus de la Inmunodeficiencia del Simio

<400> 4

Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val
 1 5

<210> 5

35 <211> 9

<212> PRT

<213> Virus de la Inmunodeficiencia del Simio

<400> 5

Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile
1 5

5 <210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Virus de la Inmunodeficiencia del Simio

<400> 6

10 Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala
1 5 10 15

Pro Thr Lys Ala
20

<210> 7

<211>29

15 <212> PRT

<213> Virus de la Inmunodeficiencia del Simio

<400> 7

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala
1 5 10 15

20 Pro Thr Lys Ala Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met
20 25

<210> 8

<211> 29

<212> PRT

<213> Virus de la Inmunodeficiencia del Simio

25 <400> 8

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala
1 5 10 15

Pro Thr Lys Ala Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val
20 25

<210> 9

30 <211> 29

<212> PRT

<213> Virus de la Inmunodeficiencia del Simio

<400> 9

ES 2 367 625 T3

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala
 1 5 10 15

Pro Thr Lys Ala Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile
 20 25

5 <210> 10

<211> 42

<212> PRT

<213> Organismo desconocido

<220>

10 <223> Descripción del organismo desconocido: proteína peptídica amiloide humana

<400> 10

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

15

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

20 <210> 11

<211> 28

<212> PRT

<213> Organismo desconocido

<220>

25 <223> Descripción del organismo desconocido: proteína peptídica amiloide humana

<400> 11

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 20 25

30 <210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

<400> 12

Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile
 1 5 10

35

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

5

<400> 13

Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr
1 5 10

<210> 14

<211> 9

10

<212> PRT

<213> Virus gripal

<400> 14

Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una composición antigénica que comprende un antígeno seleccionado procedente de un virus, una bacteria, un hongo o un parásito patógeno, o de una célula cancerosa o una célula tumoral, o de un alérgeno o de una proteína A β , y una cantidad adyuvante eficaz de una combinación de adyuvantes constituida por:

5 (i) monofosforil lípido A 3-O-desacilado o monofosforil lípido A y

(ii) factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

2. Una composición antigénica según lo reivindicado en la reivindicación 1, en la que el antígeno seleccionado es un polipéptido, un péptido o un fragmento derivado de una proteína.

10 3. Una composición antigénica según lo reivindicado en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además un diluyente o un vehículo.

4. Una composición antigénica según lo reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el antígeno seleccionado procede del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

5. Una composición antigénica según lo reivindicado en la reivindicación 4, en la que el antígeno seleccionado es el péptido del VIH que tiene la secuencia de aminoácidos:

15 **Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Cys Thr**
Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe
Tyr Thr Thr Lys (SEQ ID NO:1).

6. Una composición antigénica según lo reivindicado en la reivindicación 4, en la que el antígeno seleccionado es el péptido del VIH que tiene la secuencia de aminoácidos:

20 **Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg**
Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr
Thr Thr Lys (SEQ ID NO:2).

7. Una composición antigénica según lo reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el antígeno seleccionado procede del virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS).

25 8. Una composición antigénica según lo reivindicado en la reivindicación 7, en la que el antígeno del VIS es un péptido del VIS seleccionado entre los péptidos constituidos por las secuencias de aminoácidos:

Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met (SEC ID N.º 3),

Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val (SEC ID N.º 4),

Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile (SEC ID N.º 5),

30 **Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr**
Lys Ala Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met (SEQ ID NO:7),

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr
Lys Ala Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val (SEQ ID NO:8)

35 y

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro
Thr Lys Ala Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile (SEQ ID NO:9).

9. Una composición antigénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el antígeno seleccionado procede de *Neisseria gonorrhoeae*.

10. Una composición antigénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el antígeno seleccionado procede del virus respiratorio sincitial (VRS) humano.

11. Una vacuna que comprende una composición antigénica según lo reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la vacuna es:

- 5 a) una vacuna contra patógenos virales,
b) una vacuna contra patógenos bacterianos,
c) una vacuna contra patógenos fúngicos,
d) una vacuna que produce un efecto terapéutico o profiláctico contra el cáncer en un huésped vertebrado,
e) una vacuna que modera las respuestas a alergias en un huésped vertebrado,
- 10 o
f) una vacuna que previene o trata una enfermedad **caracterizada por** la deposición amiloide en un huésped vertebrado.

FIGURA 1

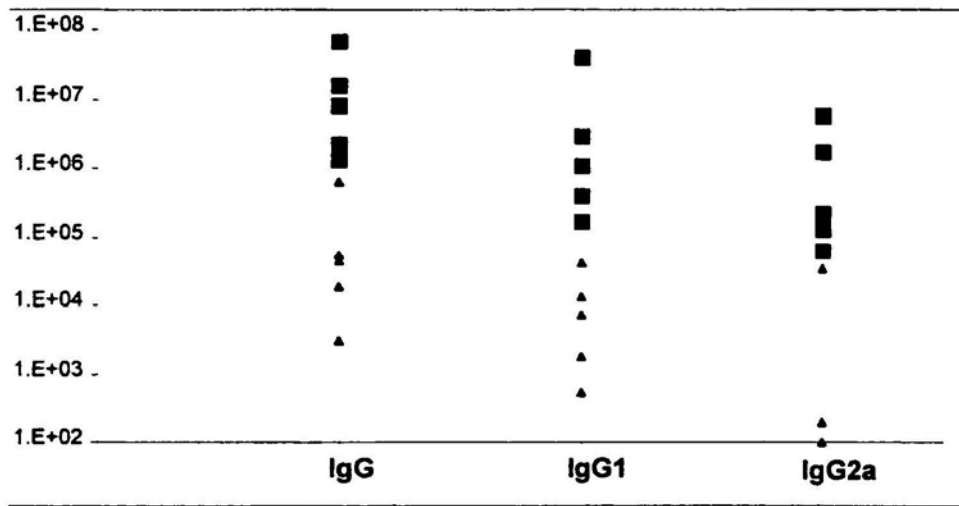


FIGURA 2

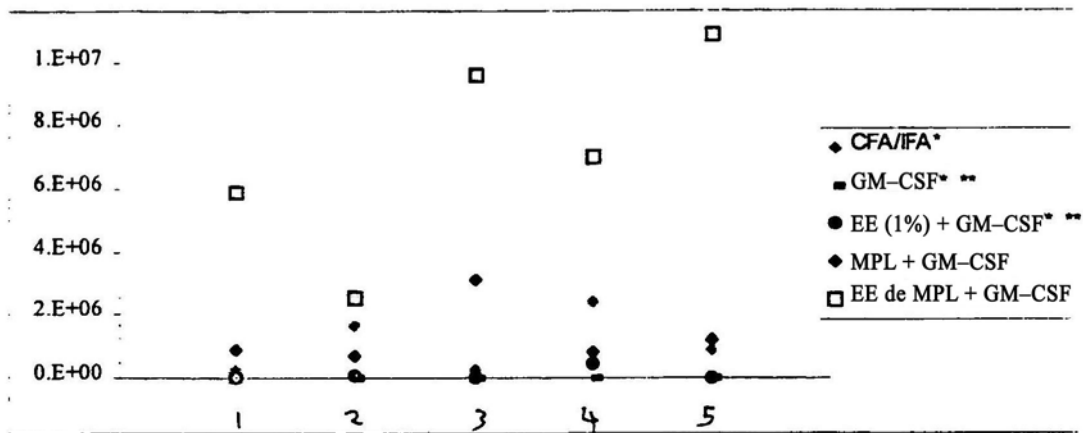


FIGURA 3

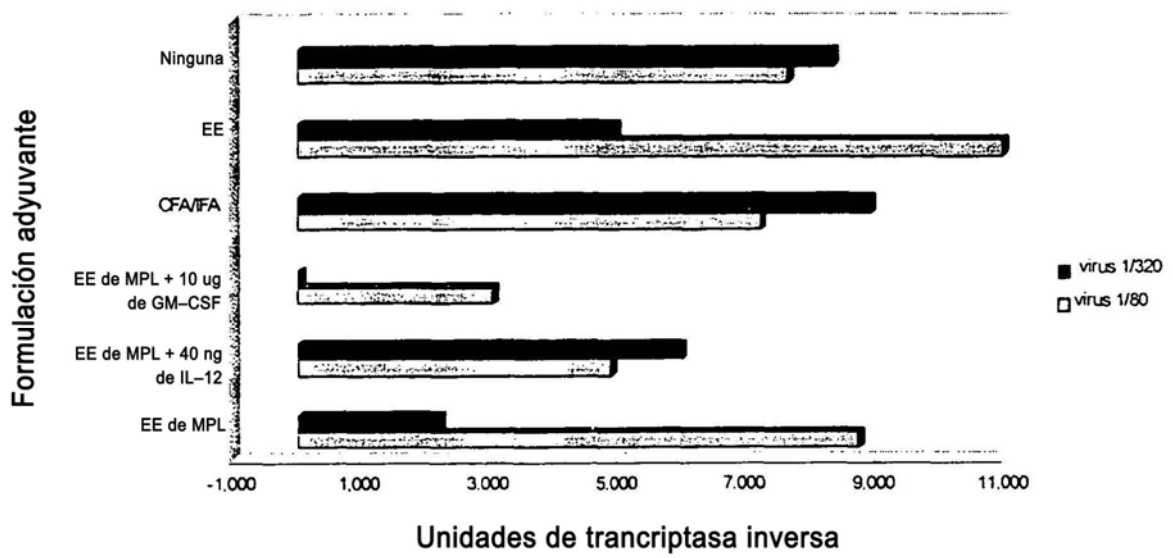


FIGURA 4

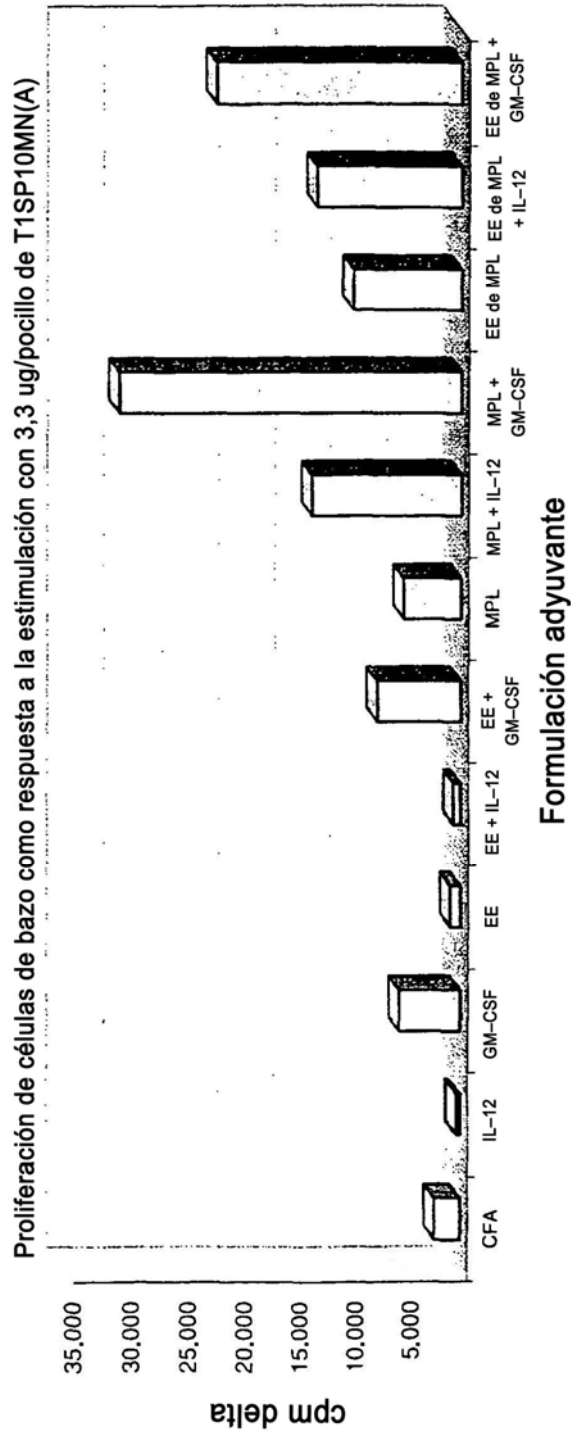


FIGURA 5

