

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 154**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/29** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05722399 .2**  
96 Fecha de presentación: **07.01.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1706140**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2006**

54 Título: **PROCEDIMIENTOS PARA LA ADAPTACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE A UN ANTÍGENO O INMUNÓGENO.**

30 Prioridad:  
**07.01.2004 US 534923 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.11.2011**

73 Titular/es:  
**BIOMEDICAL RESEARCH MODELS, INC.  
10 NEW BOND STREET  
WORCESTER, MA 01606, US y  
ORAL VACCINE TECHNOLOGIES, INC.**

72 Inventor/es:  
**YANG, Kejian;  
WHALEN, Barbara, J.;  
KISLAUSKIS, Edward, H. y  
GUBERSKI, Dennis, L.**

74 Agente: **Temño Ceniceros, Ignacio**

ES 2 368 154 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

Procedimientos para la adaptación de la respuesta inmune a un antígeno o inmunógeno

### 5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/534.923, presentada el 7 de enero de 2004.

### 10 FINANCIACIÓN GUBERNAMENTAL

La invención descrita en este documento contó con el apoyo, en su conjunto o en parte, de la Subvención R31/CCR922413-01; R31/CCR924378-01 de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades. El gobierno de Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre la invención.

### 15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 El desarrollo de vacunas preventivas y terapéuticas eficaces frente a una diversidad de agentes (tales como microorganismos infecciosos) es un objetivo importante para el control de enfermedades en todo el mundo. En muchos casos, la vacuna más eficaz se dirige específicamente al portal de entrada más común para los microorganismos, las superficies mucosas del cuerpo, incluyendo los conductos nasales, los pulmones, los tractos reproductores y el intestino.

25 La inmunidad protectora frente a patógenos específicos se consigue por respuestas inmunes humorales, celulares y mucosales. Las respuestas humorales o de anticuerpos son importantes en la neutralización de patógenos y pueden ser muy eficaces en algunas enfermedades infecciosas. Los anticuerpos circulan en la sangre, y proporcionan una medida del total de las respuestas inmunes humorales. La inmunidad mediada por células, específicamente la implicación de los linfocitos T citotóxicos (CTL) es necesaria para la inmunidad protectora frente a muchos patógenos intracelulares y el cáncer. La inmunidad localizada en las superficies mucosas de los conductos nasales, los pulmones, los tractos reproductores y el intestino también es crucial para producir respuestas inmunes eficaces frente a patógenos que acceden al cuerpo a través de estos sitios. El sello distintivo de las respuestas inmunes mucosales eficaces es la producción local del anticuerpo de IgA secretor en las superficies mucosas. La IgA también circula por la sangre y sus niveles en ésta proporcionan una estimación sobre el total de las respuestas inmunes de las mucosas. La IgG mucosal también es importante en la neutralización de ciertos patógenos. La inmunización repetida puede dar como resultado respuestas inmunes mejoradas y puede conferir una protección aumentada. Una inmunización primaria establece un nivel base de inmunidad y puede conducir al desarrollo de linfocitos de memoria T y B. Una inmunización secundaria en un momento posterior puede movilizar estos linfocitos de memoria y conducir a respuestas inmunes mayores y más específicas.

40 La mayor parte de las respuestas inmunes se regulan por linfocitos T, que inician y conforman la naturaleza de la respuesta. A medida que las respuestas inmunes maduran, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> pueden polarizarse hacia respuestas inmunes de T colaboradores de tipo 1 (Th1) o T colaboradores de tipo 2 (Th2). El sello distintivo de las respuestas de tipo Th1 y Th2 es el patrón predominante de las citocinas que están presentes. Las respuestas de Th1 se caracterizan por altos niveles de IFN- $\gamma$  y bajos niveles de IL-4 e IL-10, mientras que las repuestas de Th2 se caracterizan por bajos niveles de IFN- $\gamma$  y altos niveles de IL-4 e IL-10. Estas citocinas juegan una función importante en la determinación de las capacidades funcionales de los linfocitos T. Las repuestas de tipo Th2 conducen a la producción preferida de anticuerpos de la subclase IgG1, con poca o sin generación de CTL. Las respuestas de tipo Th1 conducen a la producción preferida de anticuerpos de la subclase IgG2a y la inducción de CTL que pueden matar de forma eficaz células infectadas con virus u otros organismos.

50 La Tabla A que se muestra a continuación resume las características inmunológicas de las respuestas inmunes polarizadas de Th1 y Th2. Las respuestas polarizadas de Th1 se generan típicamente durante infecciones con virus o bacterias. Por el contrario, las respuestas polarizadas de Th2 se observan a menudo en infección es parasitarias, en respuestas alérgicas y por vacunas de proteínas administradas por vía intramuscular basadas en alumbre convencionales que se usan en seres humanos. La genética también puede determinar el tipo de respuesta inmune generada. Por ejemplo, las respuestas de Th1 predominan en la cepa C57BL/6 de ratón, mientras que las respuestas de Th2 predominan en la cepa Balb/c de ratón. Las respuestas inmunes también pueden contener tanto componentes de Th1 como Th2, proporcionando protección mediante brazos tanto humorales como mediados por células de la respuesta inmune. La determinación directa de las frecuencias de las células productoras de citocinas se realiza mediante el uso de ELISPOT (ensayos de PUNTOS Inmunoabsorbentes Ligados a Enzimas) o mediante tinción inmunofluorescente para revelar la producción de citocina intracelular. Las proporciones de IgG1:IgG2a en suero también son un criterio ampliamente aceptado y seguido para determinar los tipos de T colaboradores (Tabla A). Una proporción de IgG1 con respecto a IgG2a para obtener una respuesta de Th1 y Th2 equilibrada ha de estar entre 0,5 y 2,0.

65

Tabla A: Características de respuestas de Th1 y Th2 de linfocitos T polarizados

Respuestas inmunes	Respuestas inmunes de tipo Th1	Respuestas inmunes de tipo Th2
Inmunidad humoral	IgG1/IgG2a en suero <0,5	IgG1/IgG2a en suero >2,0
Secreción de citocinas de linfocitos T	↑ IFN- $\gamma$ , ↓ IL-10 e IL-4	↑ IL-10 e IL-4, ↓ IFN- $\gamma$ ,
CTL	Altas	Bajas o ausente
Cepas prototipo de ratón	C57BL/6	Balb/c

Como se usa en este documento, "respuesta de T colaboradores de tipo 1" y "respuesta de Th1" se usan de forma intercambiable para referirse a una gama de respuestas de animales huésped que incluyen una o más, normalmente todas, las características enumeradas en la columna central de la Tabla A anterior. Estas características incluyen una proporción de IgG1:IgG2a de no más de 0,5; secreción de IFN- $\gamma$  aumentada (y otras citocinas Th1) por linfocitos T colaboradores 1 y secreción de IL-10 y IL-4 reducida (y otras citocinas Th2) por linfocitos T colaboradores 2; y una alta actividad de CTL.

De forma similar, como se usa en este documento, "la respuesta de T colaboradores de tipo 2" y "respuesta de Th2" se usan de forma intercambiable para referirse a una gama de respuestas de animales huésped que incluyen una o más, normalmente todas, las características enumeradas en la columna derecha de la Tabla A anterior. Estas características incluyen una proporción de IgG1:IgG2a de no más de 2,0; secreción de IFN- $\gamma$  reducida (y otras citocinas Th1) por linfocitos T colaboradores 1 y secreción de IL-10 y IL-4 aumentada (y otras citocinas Th2) por linfocitos T colaboradores 2; y una baja o ninguna actividad de CTL.

La administración de la vacuna toma una diversidad de formas, dependiendo del agente que se va a administrar y la vía de administración. Los sistemas de administración de vacunas a menudo se diseñan para administrar vacunas a áreas específicas del cuerpo. En el tracto gastrointestinal es importante que la vacuna no se degrade o elimine antes que haya tenido la oportunidad de ejercer un efecto localizado o de pasar al torrente sanguíneo o de interactuar con tejido linfoide en el entorno local. En el tracto nasofaríngeo, es importante que la vacuna permanezca en la proximidad de las células absortivas; también es importante que los antígenos permanezcan en contacto con las células linfoides antes de que el antígeno se lave a través del tracto nasal o se ingiera. Además, es importante que el antígeno, vehículo y el estimulador inmune se coadministren en un solo complejo.

Tradicionalmente, la inmunización se ha realizado administrando organismos o células enteras inactivados, extractos de microorganismos o células, o componentes aislados de aquellos, tales como antígenos proteicos o peptídicos. La inmunización se ha realizado por administración oral, intranasal (IN) o intramuscular (IM) de organismos vivos atenuados. Típicamente, a los seres humanos y los animales se les inyectan dichas composiciones e presencia de conservantes, adyuvantes y otros excipientes por vía intramuscular o subcutánea para provocar la inmunidad protectora en vacunas normales pediátricas o de adultos de uso común. La inmunización parenteral raramente es capaz de provocar una respuesta inmune mucosal eficaz que de como resultado la producción de anticuerpos, particularmente, la producción de inmunoglobulina A (IgA), lo que es importante como una primera barrera de defensa para la invasión de microorganismos.

Actualmente, sólo los virus o bacterias vivos atenuados son capaces de inducir una respuesta inmune protectora en seres humanos o animales cuando se administran por vía oral o por vía intranasal. Hasta la fecha, se han desarrollado muy pocas vacunas que puedan administrarse por vía oral, intranasal o intravaginal, y estas vacunas son invariablemente organismos vivos, tales como las vacunas orales contra el virus de la polio y una vacuna oral contra la fiebre tifoidea de la salmonella usada comúnmente. Por ejemplo, puede usarse el virus de la gripe vivo atenuado preparado por adaptación al frío (FluMist™) para vacunar a los seres humanos frente a la gripe por administración intranasal. Ha habido preocupación sobre los riesgos potenciales asociados con el uso de vacunas de vectores o basadas en virus vivos debido a la tendencia natural de la mutación genética, así como los problemas de eficacia y seguridad cuando se aplican en pacientes inmunodeprimidos.

Típicamente, se preparan vacunas de uso común a partir de extractos celulares o se producen por una metodología de producción recombinante; estas vacunas están compuestas normalmente de proteínas, toxoides microbianos, virus completos inactivados o polisacáridos de origen microbiano. Estos tipos de materiales normalmente son eficaces en la inducción de respuestas inmune protectoras contra enfermedades cuando se administran por inyección. Sin embargo, dichos materiales son escasamente inmunogénicos o no inmunogénicos cuando se administran a través de una administración oral o intranasal, incluso aunque el tracto intestinal y nasofaríngeo de los seres humanos y la mayor parte de los animales sea rico en células y tejidos capaces de la inducción de la respuesta inmune a antígenos no huésped. Uno de los principales fallos de las vacunas administradas por vía oral o por vía intranasal es que los antígenos se absorben mal y son inestables durante el paso. Las proteínas y péptidos que se administran por vía oral se degradan invariablemente en el tracto GI por la acción de las proteasas y otras enzimas hidrolíticas, y los ácidos del estómago. Así, las vacunas compuestas de inmunógenos subcelulares son ineficaces cuando se administran por vía oral o intranasal. Por lo tanto, las composiciones que pueden usarse

repetidamente como vehículos protectores de antígenos, así como adyuvantes eficaces que pueden inducir respuestas inmunes eficaces después de su administración oral o intranasal proporcionarán un medio más útil y conveniente para vacunar a animales y seres humanos.

5 El Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (MALT) es un sistema de redes que consiste en el tracto gastrointestinal (tejido linfoide asociado al intestino, GALT), glándulas mamarias, tracto reproductor y tracto respiratorio (tejido linfoide asociado a los bronquios y la nasofaringe, BALT y NALT). Una de las características únicas del sistema inmune mucosal común es que la inducción inmunológica en un sitio mucosal a menudo da como resultado  
10 respuestas inmunes en sitios mucosales distales. Esto se debe a la migración de los linfocitos a través de las vénulas de endotelio alto. Sin embargo, se han observado claras diferencias tras la administración de vacunas a las diferentes superficies mucosas y que puede producirse la compartimentación de las respuestas. Además, algunos sitios mucosales inducen mejores respuestas en sitios distales y no todos los sitios distales responden de la misma manera.

15 La inmunización intranasal es una ruta eficaz para la exposición de la inmunidad mucosal a diversos patógenos, proteínas solubles y antígenos administrados por micropartículas. La inmunización intranasal tiene la ventaja añadida de inducir tanto a nivel local y distal las respuestas inmunes mucosales. Por ejemplo, la vacunación intranasal puede obtener la inmunidad del tracto genito-urinario, en el que la inmunización directa a menudo se ve  
20 obstaculizada por la renovación de las células epiteliales y las influencias hormonales. (Csencsits KL y col. 1999. JI. 1382-1389). La vacunación intranasal puede inducir fuertes respuestas inmunes específicas de antígenos a través del NALT, o a través de la inmunización pulmonar profunda. NALT, el principal sitio inductor mucosal para las vías respiratorias superiores, es importante para el desarrollo de la inmunidad mucosal a nivel local y distal al antígeno inmunizado por vía intranasal. Se han observado respuestas de IgA e IgG mucosales y elevadas respuestas de CTL a péptidos víricos después de la exposición a NALT. El pulmón es un órgano inmune-sensible que puede producir a  
25 nivel local respuestas inmunes IgA, IgG, IgE y mediadas por células (Liu M y col. 1982. J Immunology. 129(6): 2653-2661) (Bice DE, y col., 1980. IntArch Allergy Appl Immunol. 63(4): 438-45). Se han demostrado respuestas inmune protectoras en el pulmón después de la infección del virus de la gripe o la vacunación con la vacuna contra la gripe, mientras que la producción de anticuerpos a largo plazo tras la inmunización del pulmón y la exposición se han relacionado con tejidos asociados al pulmón (Bice DE, y col 1993. Am J Respir Cell Mol Biol. 8(6): 662-667).

30 El Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (MALT) es un sistema de redes que consiste en el tracto gastrointestinal (tejido linfoide asociado al intestino, GALT), glándulas mamarias, tracto reproductor y tracto respiratorio (tejido linfoide asociado a los bronquios y la nasofaringe, BALT y NALT). Una de las características únicas del sistema inmune mucosal común es que la inducción inmunológica en un sitio mucosal a menudo da como resultado  
35 respuestas inmunes en sitios mucosales distales. Esto se debe a la migración de los linfocitos a través de las vénulas de endotelio alto. Sin embargo, se han observado claras diferencias tras la administración de vacunas a las diferentes superficies mucosas y que puede producirse la compartimentación de las respuestas. Además, algunos sitios mucosales inducen mejores respuestas en sitios distales y no todos los sitios distales responden de la misma manera.

40 La inmunización intranasal es una ruta eficaz para la exposición de la inmunidad mucosal a diversos patógenos, proteínas solubles y antígenos administrados por micropartículas. La inmunización intranasal tiene la ventaja añadida de inducir tanto a nivel local y distal las respuestas inmunes mucosales. Por ejemplo, la vacunación intranasal puede obtener la inmunidad del tracto genito-urinario, en el que la inmunización directa a menudo se ve  
45 obstaculizada por la renovación de las células epiteliales y las influencias hormonales. (Csencsits KL y col. 1999. JI. 1382-1389). La vacunación intranasal puede inducir fuertes respuestas inmunes específicas de antígenos a través del NALT, o a través de la inmunización pulmonar profunda. NALT, el principal sitio inductor mucosal para las vías respiratorias superiores, es importante para el desarrollo de la inmunidad mucosal a nivel local y distal al antígeno inmunizado por vía intranasal. Se han observado respuestas de IgA e IgG mucosales y elevadas respuestas de CTL a péptidos víricos después de la exposición a NALT. El pulmón es un órgano inmune-sensible que puede producir a  
50 nivel local respuestas inmunes IgA, IgG, IgE y mediadas por células (Liu M y col. 1982. J Immunology. 129(6): 2653-2661) (Bice DE, y col., 1980. IntArch Allergy Appl Immunol. 63(4): 438-45). Se han demostrado respuestas inmune protectoras en el pulmón después de la infección del virus de la gripe o la vacunación con la vacuna contra la gripe, mientras que la producción de anticuerpos a largo plazo tras la inmunización del pulmón y la exposición se han relacionado con tejidos asociados al pulmón (Bice DE, y col 1993. Am J Respir Cell Mol Biol. 8(6): 662-667). La  
55 inmunidad óptima del tracto respiratorio superior es inducida por la inoculación combinada del tracto respiratorio superior e inferior (Thompson AH. Vaccine 17: 1404-15).

60 La inmunización con ADN es un método para la generación de inmunidad protectora frente a las enfermedades infecciosas (Liu y col., Ann. N.Y. Acad. Sci. 772, 1995). A diferencia de las vacunas de subunidades basadas en proteínas o péptidos, la inmunización con ADN proporciona una inmunidad protectora a través de la expresión de proteínas extrañas por las células huésped, permitiendo de esta manera la presentación del antígeno al sistema inmune de una forma más similar a la que ocurre durante la infección por virus o patógenos intracelulares (Pardoll y  
65 Beckerieg, Immunity 3: 165, 1995; McDonnell y Askari, N. Engl. J. Med. 334: 42, 1996). A pesar de que se ha generado un considerable interés por esta técnica, la inmunidad con éxito se ha inducido más consistentemente por la inmunización con ADN para enfermedades virales (Manickan y col., J. Immunol. 155: 259, 1995). Los resultados

han sido más variables con los patógenos no-virales patógenos que pueden reflejar diferencias en la naturaleza de los patógenos, en los antígenos inmunizantes elegidos y en las vías inmunizante (Sedegah y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9866, 1994; Barry y col., Nature 377: 632, 1995; Xu y Liew, Vaccine 12: 1534, 1994). Un mayor desarrollo de la vacunación con ADN dependerá de la elucidación de los mecanismos inmunológicos subyacentes y ampliación de su aplicación a otras enfermedades infecciosas para las que han fracasado las actuales estrategias de desarrollo de la vacuna.

Las vacunas de ADN fueron bien toleradas en seres humanos de acuerdo a varios ensayos clínicos recientes, pero hay una necesidad urgente de conseguir una mejor potencia inmunizante. Por lo tanto, se encuentran en desarrollo varias vacunas de ADN de segunda generación que usan diversos sistemas y dispositivos. Además, se está evaluando un nuevo enfoque a la inmunización, llamada vacunación de modalidad mixta o vacuna principal. Se trata de una vacunación inicial que utiliza un tipo de vacuna, seguido de un refuerzo que usa de un tipo diferente de vacuna. Por ejemplo, se han obtenido resultados preclínicos prometedores mediante la inmunización en primer lugar con ADN y después mediante el refuerzo con una vacuna o un vector de adenovirus que codifica el mismo antígeno, o con una proteína recombinante del mismo antígeno que la vacuna de ADN codificado. El documento WO-A-00/11140 describe un procedimiento para provocar una respuesta inmune en un mamífero administrando una composición primaria que comprende una secuencia de ADN que codifica un antígeno seguido de la administración intranasal de una composición secundaria que comprende el ADN que codifica el antígeno. Sin embargo, existen dudas acerca de la vacuna y el adenovirus que se utiliza como refuerzo. Esto se debe a que el anticuerpo preexistente frente al vector viral podría bloquear la respuesta inmune, estos virus recombinantes por lo general no se pueden usar varias veces y también hay un problema de seguridad especialmente para pacientes inmunodeprimidos. Además, generalmente las proteínas puras usadas como refuerzo de las vías inmunizante parenterales pueden no inducir una respuesta inmune mucosal ni mejorar la respuesta inmune mediada por células.

Las respuestas inmune protectoras mucosales son cruciales en la lucha contra las enfermedades causadas por muchos organismos y microorganismos infecciosos de origen natural que pueden usarse con fines bioterroristas. Las respuestas inmunes mediadas por células, incluyendo CTL, también son importantes en el control de patógenos intracelulares, tanto sistémicamente como en sitios mucosales. Las vacunas de proteínas administradas por vía intramuscular tradicionales, que usan alumbre como adyuvante, generan una respuesta de Th2 típica con principalmente respuestas de anticuerpos IgG1, pero no estimulan las respuestas CTL o la inmunidad local en los sitios mucosales. Por tanto, existe la necesidad de vacunas eficaces que sean capaces de producir una amplia gama de respuestas inmunes deseadas para proteger al animal de la enfermedad.

### RESUMEN DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención se refiere a una preparación primaria para administración intramuscular que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno: y una preparación secundaria para administración intranasal que comprende el antígeno encapsulado en liposomas, para provocar una respuesta inmune en un animal en el que la administración de la preparación secundaria produce una respuesta inmune que comprende:

- (1) un aumento en el nivel en suero de la IgA específica de antígeno en comparación con el nivel en suero de la IgA específica de antígeno anterior a la administración de la preparación secundaria y,
- (2) un aumento en comparación con un animal no tratado en la proporción de linfocitos T citotóxicos CD8-IFN $\gamma$ + específicos del antígeno tanto en el pulmón como en el bazo.

Los aspectos preferidos de la composición se detallan en las reivindicaciones 2 a 10 y la reivindicación 18.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para provocar una respuesta inmune en un animal huésped que comprende:

- a) un primer componente inmunizante para administración intramuscular que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno;
- b) un segundo componente inmunizante para administración intranasal que comprende el antígeno encapsulado en liposomas;
- c) una instrucción para un usuario para administrar al animal el primer componente inmunizante seguido de la administración del segundo componente inmunizante para provocar una respuesta inmune en el animal. Los aspectos preferidos del kit se detallan en las reivindicaciones 12 a 17 y 19.

También se describe un procedimiento para provocar una respuesta inmune deseada en un animal, que comprende administrar al animal una preparación primaria que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno y una preparación secundaria que comprende el antígeno y liposomas (preparación de antígenos-liposomas) (inmunización heteróloga), provocando de esta manera la respuesta inmune deseada en el animal).

La respuesta inmune deseada es frente a un patógeno y el antígeno es un antígeno específico de patógeno.

La preparación primaria se administra por una vía seleccionada entre: vía subcutánea, vía intramuscular, vía

## ES 2 368 154 T3

intradérmica y vía mucosa, y la preparación secundaria se administra por una vía seleccionada entre: vía subcutánea, vía intramuscular, vía intradérmica y vía mucosa.

- 5 También se describe un procedimiento en el que la preparación primaria para la inmunización heteróloga se administra por vía intramuscular a dicho animal, y en el que dicha preparación secundaria se administra por vía intranasal a dicho animal.

La preparación secundaria comprende un antígeno proteico específico de patógenos encapsulado en liposomas.

- 10 Los liposomas en la preparación secundaria tienen un tamaño medio de aproximadamente 0,5-5  $\mu\text{m}$ .

Cada una de la preparación primaria y la preparación secundaria, cuando se administra sola en el animal, es suficiente para realizar el nivel deseado de respuesta inmune.

- 15 La respuesta inmune confiere inmunidad frente al patógeno.

El cebado comprende una o dos administraciones separadas por aproximadamente 3-6 semanas, y en el que dicha preparación secundaria se administra aproximadamente 3 a 10 semanas después del último cebado.

- 20 El cebado comprende una o dos administraciones separadas por 3 días, en el que dicha preparación secundaria se administra 3 semanas después del último cebado.

Los liposomas en dicha preparación de antígenos-liposomas tienen un tamaño medio de aproximadamente 0,5-5  $\mu\text{m}$ .

- 25 La dosis secundaria de refuerzo se administra por vía intranasal a dicho animal para inducir una respuesta de IgA.

La respuesta de IgA incluye respuesta sistémica y mucosal.

- 30 También se describe un procedimiento para provocar una respuesta inmune tendió a una respuesta de Th2 en un animal. El procedimiento comprende administrar una preparación primaria y una preparación secundaria, cada una de las cuales comprende el mismo antígeno y liposomas (inmunización homóloga).

- 35 El animal huésped es un mamífero, tal como un ser humano o un animal no humano, incluyendo un animal de ganado doméstico (vacas, cerdos, caballos u ovejas, etc.), una mascota (perro o gato, etc.), o un animal de experimentación pequeño (ratón o rata, etc.).

El patógeno es un virus, tal como el virus de la Hepatitis B (VHB).

- 40 Opcionalmente, el patógeno es uno de las cepas de *Chlamydia*.

Opcionalmente, el patógeno es una cepa bacteriana, tal como *Bacillus anthracis*.

- 45 Opcionalmente, el antígeno específico de patógeno es un antígeno protector (PA), tal como el antígeno PA de *Bacillus anthracis*.

Opcionalmente, el inmunógeno atrapado en liposomas es un péptido que activa linfocitos T o una partícula de virus entero inactivado.

- 50 Opcionalmente, el antígeno específico de patógeno es un antígeno de superficie viral, tal como HBsAg.

Opcionalmente, el antígeno específico de patógeno es un péptido.

- 55 Opcionalmente, el antígeno específico de patógeno es un tipo de virus o bacteria inactivados.

Opcionalmente, el antígeno específico de patógeno (péptido, proteína o virus inactivado) está encapsulado en liposomas.

- 60 Opcionalmente, el antígeno específico de patógeno (péptido, proteína o virus/bacteria inactivados) se mezcla con liposomas vacíos.

Opcionalmente, la preparación de antígenos-liposomas está recién preparada.

- 65 Opcionalmente, la preparación de antígenos-liposomas está liofilizada antes de su uso.

Opcionalmente, el procedimiento comprende adicionalmente administrar una o más preparaciones secundarias de la

misma dicha preparación de antígenos-liposomas (inmunización homóloga), en el que cada administración está separada por aproximadamente 2-16 semanas, preferiblemente aproximadamente 3-6 semanas.

- 5 Opcionalmente, todas las preparaciones tienen la misma cantidad de dicho antígeno específico de patógeno.
- Opcionalmente, se administran diferentes cantidades de cebador y refuerzo a dicho animal a través de la misma vía.
- 10 Opcionalmente, se administran diferentes cantidades de preparaciones primarias y secundarias a dicho animal a través de vías separadas.
- Opcionalmente, la preparación o preparaciones secundarias y el cebado inicial se administran a dicho animal a través de la misma vía.
- 15 Opcionalmente, la preparación secundaria y el cebado inicial se administran a dicho animal a través de vías separadas.
- Opcionalmente, el procedimiento comprende adicionalmente medir las respuestas inmunes humorales y/o celulares a dicho antígeno específico de patógeno.
- 20 Opcionalmente, la respuesta inmune humoral incluye titulaciones de anticuerpos (Ig) específicas de antígeno totales en suero o en superficies mucosas; titulaciones de anticuerpos específicos de anti-HBsAg en suero o en superficies mucosas; titulaciones de isotipos y/o subtipos de anticuerpos específicos de antígenos, incluyendo IgG, IgA, IgG1 e IgG2a; proporción de IgG1 e IgG2a.
- 25 Opcionalmente, la respuesta inmune celular incluye la aparición de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (CTL); actividad de destrucción de CTL mejorada; secreción de citocinas características de la respuesta de Th1, incluyendo IFN- $\gamma$ ; secreción de citocinas características de la respuesta de Th2, incluyendo IL-10 e IL-4; y polarización del perfil de linfocitos T colaboradores (por ejemplo, respuesta de Th1 frente a respuesta de Th2).
- 30 Opcionalmente, las respuestas inmunes humorales y/o celulares se miden generalmente a partir de muestras obtenidas de dichos animales huésped aproximadamente 2, 4, 6 u 8 semanas después del último refuerzo. Sin embargo, las respuestas pueden medirse durante muchos meses después del último refuerzo.
- Opcionalmente, la respuesta inmune incluye respuestas de IgA, IgG y linfocitos T.
- 35 Opcionalmente, la respuesta de IgA incluye respuesta o respuestas de IgA sistémicas y/o mucosales.
- Opcionalmente, la respuesta de IgG incluye respuesta o respuestas de IgG sistémicas y/o mucosales.
- 40 También se describe una composición inmunogénica que comprende dos componentes inmunizantes, en la que el primer componente inmunizante comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno, y el segundo componente inmunizante comprende el antígeno y el liposoma. Opcionalmente, la respuesta inmune deseada es frente a un patógeno y el antígeno es un antígeno específico de patógeno.

#### 45 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La *Figura 1* muestra el perfil de distribución del tamaño de los liposomas de un tamaño medio de 4  $\mu$ m de diámetro. El eje x muestra el tamaño en  $\mu$ m y el eje y muestra el número de partículas.

La *Figura 2* es representativa del grado de variación en suero de las titulaciones de Ig específico de HBsAg que se observa entre ratones individuales CD1 (panel superior) y Balb/c (panel inferior) en un experimento. Las respuestas se muestran de ratones que recibieron una (círculos cerrados) o dos (triángulos cerrados) inmunizaciones homólogas con liposomas de HBsAg IN, liposomas de HBsAg IM, o la vacuna de GSK disponible en el mercado para HBsAg IM. Las titulaciones terminales se definen como una titulación en suero >2 x que se observó para ratones sin tratar. Las líneas horizontales representan la respuesta media (n = 5 ratones por grupo).

La *Figura 3* ilustra la cinética de los niveles de Ig en suero específica de HBsAg en ratones CD1 después de la inmunización intranasal con liposomas de HBsAg. Los datos se muestran como el DO a 450 nm en el ensayo ELISA de Ig específico de HBsAg después de la dilución seriada de muestras en suero diversos momentos después de la inmunización primaria (símbolos cerrados) y dos semanas después de una inmunización secundaria (símbolos cerrados con sombreados en cruz, +). Los valores son promedios a partir de combinaciones en suero (n = 5 ratones por grupo). Las respuestas a la vacuna de HBsAg de GSK se muestran para su comparación.

La *Figura 4* ilustra la respuesta a la dosis de liposomas de HBsAg en ratones CD1 inmunizados por vía

intranasal en la semana 0 (símbolos cerrados) o en las semanas 0 y 6 (símbolos cerrados con sombreados en cruz, +). Las respuestas a la vacuna de HBsAg de GSK se muestran para su comparación. Los niveles de Ig en suero específica de HBsAg se midieron en combinaciones de muestras en suero tomadas 8 semanas después de la primera inmunización (n = 5 ratones por grupo).

- La *Figura 5* muestra el efecto de la vía de administración y la entrega de una inmunización secundaria en un anticuerpo en suero específico de HBsAg total en ratones CD1 administrados con liposomas de HBsAg (15 µg/dosis). Los símbolos cerrados muestran respuestas en ratones (n = 5) que recibieron una única inmunización primaria. Los símbolos cerrados con sombreados en cruz (+) muestran respuestas en ratones (n = 5) que recibieron inmunizaciones primarias y secundarias de refuerzo homólogas idénticas. Las respuestas a la vacuna de HBsAg de GSK se muestran para su comparación.
- La *Figura 6* muestra el efecto de la vía de administración y la entrega de una inmunización secundaria en un anticuerpo en suero específico de HBsAg total en ratones Balb/c administrados con liposomas de HBsAg (15 µg/dosis). Los símbolos cerrados muestran respuestas en ratones (n = 5) que recibieron una única inmunización primaria. Los símbolos cerrados con sombreados en cruz (+) muestran respuestas en ratones (n = 5) que recibieron inmunizaciones primarias y secundarias de refuerzo homólogas idénticas. Las respuestas a la vacuna de HBsAg de GSK se muestran para su comparación.
- La *Figura 7* muestra una comparación de respuestas de Ig en suero específicas de HBsAg en ratones CD1 inmunizados por vía intranasal con liposomas de HBsAg frescos (cuadrados) o liofilizados (triángulos), o inmunizados por vía intramuscular con la vacuna de GSK disponible en el mercado (círculos). Los símbolos cerrados muestran respuestas en ratones (n = 5) que recibieron una sola inmunización primaria. Los símbolos cerrados con sombreado en cruz (+) muestran respuestas en ratones (n = 5) que recibieron inmunizaciones primaria y secundaria de refuerzo homólogas. Las respuestas de anticuerpos en suero específicos de HBsAg totales se midieron en suero 8 semanas después de la inmunización primaria.
- La *Figura 8* muestra una comparación de respuestas de Ig en suero específicas de HBsAg en ratones CD1 inmunizados por vía intramuscular con liposomas de HBsAg frescos (cuadrados) o liofilizados (triángulos), o inmunizados por vía intramuscular con la vacuna de GSK disponible en el mercado (círculos). Los símbolos cerrados muestran respuestas en ratones (n = 5) que recibieron una sola inmunización primaria. Los símbolos cerrados con sombreado en cruz (+) muestran respuestas en ratones (n = 5) que recibieron inmunizaciones primaria y secundaria de refuerzo homólogas. Las respuestas de anticuerpos en suero específicos de HBsAg totales se midieron en suero 8 semanas después de la inmunización primaria.
- La *Figura 9* muestra el efecto del tamaño de los liposomas en respuestas de IgG en suero específicas de HBsAg en ratones Balb/c (6 semanas después de la inmunización primaria y 2 semanas después del refuerzo). Los liposomas que contenían HBsAg (15 µm) tenían un tamaño de 4 µm, 1 µm y 0,2 µm y se administraron por vía intranasal a ratones Balb/c (n = 5) en un solo tamaño, o en forma de una mezcla igual de los tres tamaños. Se usó un ELISA cuantitativo para la IgG específica de HBsAg para determinar los niveles de IgG en suero en muestras de suero combinadas (n = 5 ratones por grupo). La barra vertical en el grupo mixto muestra el valor predicho si las respuestas de anticuerpos son aditivas.
- La *Figura 10* muestra las proporciones de IgG1:IgG2a de anticuerpos específicos de HBsAg en el suero de ratones CD1 inmunizados mediante diferentes protocolos. Las barras grises son las proporciones IgG1:IgG2a de ratones que recibieron una inmunización en la semana 0. Las barras negras son las proporciones de IgG1:IgG2a de ratones que recibieron 2 inmunizaciones homólogas en las semanas 0 y 6. Los ensayos ELISA cuantitativos específicos de HBsAg se usaron para determinar el nivel de IgG1 e IgG2a específica de HBsAg en el suero de una combinación en suero (cantidades iguales de suero a partir de 4 o 5 ratones individuales por grupo) 8 semanas después de la inmunización primaria. Dos líneas verticales en 0,5 y en 2,0 en cada panel demarcan tres patrones diferentes de respuestas de anticuerpos. La proporción de 0,5 o menor indica una respuesta con tendencia a Th1. Una proporción de 2,0 o mayor indica una respuesta con tendencia a Th2. Las proporciones entre 0,5 y 2,0 indican una respuesta mixta o equilibrada.
- La *Figura 11* muestra las proporciones de IgG1:IgG2a de anticuerpos específicos de HBsAg en el suero de ratones CD1 inmunizados mediante diferentes protocolos. Las barras grises son las proporciones IgG1:IgG2a de ratones que recibieron una inmunización en la semana 0. Las barras negras son las proporciones de IgG1:IgG2a de ratones que recibieron 2 inmunizaciones

homólogas en las semanas 0 y 6. Los ensayos ELISA cuantitativos específicos de HBsAg se usaron para determinar el nivel de IgG1 e IgG2a específica de HBsAg en el suero de una combinación en suero (cantidades iguales de suero a partir de 4 o 5 ratones por grupo de tratamiento) 8 semanas después de la inmunización primaria. Dos líneas verticales en 0,5 y en 2,0 en cada panel demarcan tres patrones diferentes de respuestas de anticuerpos. La proporción de 0,5 o menor indica una respuesta con tendencia a Th1. Una proporción de 2,0 o mayor indica una respuesta con tendencia a Th2. Las proporciones entre 0,5 y 2,0 indican una respuesta mixta o equilibrada.

La Figura 12

muestra que el ADN de HBsAg es un inmunógeno débil para respuestas de anticuerpos en ratones CD1 (cuadrados) y Balb/c (triángulos). La respuestas a la vacuna de GSK en ratones CD1 (círculos rellenos con sombreados en cruz,  $\pm$ ) y en ratones Balb/c (círculos abiertos con sombreados en cruz, +) se muestran para fines comparativos. Los símbolos cerrados muestran respuestas en ratones (n = 5) que recibieron una sola inmunización primaria. Los símbolos con sombreados en cruz (+) muestran respuestas en ratones (n = 5) que recibieron inmunizaciones primaria y secundaria de refuerzo homologas. Las respuestas anticuerpos en suero específicas de HBsAg totales se midieron en el suero 8 semanas después de la inmunización primaria. Los ratones recibieron 100  $\mu$ g de ADN de HBsAg o 3  $\mu$ g de la vacuna de HBsAg proteica basada en alumbre (GSK) IM.

La Figura 13

muestra que la inmunización IM de ratones Balb/c con ADN de HBsAg polariza el comportamiento de los linfocitos T periféricos (células del bazo) a un perfil de citocinas con tendencia a Th1. El panel de la izquierda muestra los resultados del ensayo ELISPOT de IFN $\gamma$ , y el panel de la derecha muestra los resultados del ensayo ELISPOT de IL-10. El gráfico muestra una comparación entre el péptido CTL de HBsAg y la proteína de HBsAg en la activación de linfocitos T para la producción de citocinas en ambos ensayos. También se incluyen péptidos y proteínas irrelevantes como controles de la especificidad. Las respuestas policlonales para la Concanavalina A de mitógenos de linfocitos T (Con A) se muestran para una respuesta máxima para IL-10. Los resultados para la estimulación con A en el ensayo de IFN- $\gamma$  no se muestran, ya que los puntos eran demasiado numerosos para cuantificarlos con precisión. Tanto el péptido como la proteína son capaces de estimular la producción de IFN- $\gamma$  en ratones inmunizados con ADN de HBsAg, pero ninguno produce una producción de IL-10 significativa, demostrando directamente una fuerte tendencia de las citocinas a Th1 en ratones inmunizados con ADN. Los ratones no inmunizados no produjeron números detectables de puntos para la citocina en la estimulación con el péptido proteína de HBsAg (datos no mostrados).

La Figura 14

ilustra el efecto de la inmunización heteróloga en ratones Balb/c: Los ratones inmunizados con ADN de HBsAg producen altos niveles de Ig en suero específica de HBsAg después del refuerzo con una dosis baja de liposomas de HBsAg IN. Los ratones se inmunizaron con ADN de HBsAg por vía intramuscular (100  $\mu$ g en las semanas 0 y 6) y se reforzaron con una dosis baja de liposomas de HBsAg (3  $\mu$ g/dosis en la semana 12, n = 8 ratones por grupo). Los símbolos cerrados muestran las respuestas de anticuerpos Ig en suero específica de HBsAg totales antes del refuerzo IN. Los símbolos cerrados con sombreados en cruz (+) muestran las respuestas de Ig en suero específica de HBsAg totales 4 semanas después del refuerzo IN

La Figura 15

ilustra el efecto de la inmunización heteróloga en ratones Balb/c: los ratones inmunizados con ADN de HBsAg producen altos niveles de IgA en suero y vaginales específica de HBsAg después del refuerzo con una dosis baja de liposomas de HBsAg IN. Los ratones se inmunizaron con ADN de HBsAg por vía intramuscular (100  $\mu$ g en las semanas 0 y 6) y se reforzaron con una dosis baja de liposomas de HBsAg (3  $\mu$ g/dosis en la semana 12). Los símbolos cerrados muestran las respuestas de anticuerpos de IgA específica de HBsAg totales justo antes del refuerzo IN. Los símbolos cerrados con sombreados de cruces (+) muestran las respuestas de IgA específica de HBsAg 4-5 semanas después del refuerzo IN. Como control positivo, se muestran respuestas de IgA en suero para ratones inmunizados homológamente en las semanas 0 y 6 con 15  $\mu$ g de liposomas de HBsAg y que se ensayaron dos semanas mas tarde (círculos con sombreados de cruces, +). Todos los grupos contenían 8 ratones.

La Figura 16

muestra que la IgG mucosal también se genera en ratones inmunizados con el protocolo de inmunización heteróloga. Los ratones Balb/c recibieron dos inmunizaciones primarias IM con ADN de HBsAg (100  $\mu$ g cada vez) seguido de inmunización IN con liposomas de HBsAg (15  $\mu$ g), liposomas vacíos, o se dejaron sin tratar (n = 5 por grupo). Cuatro semanas después de la inmunización final, los ratones se sacrificaron y se midieron los lavados pulmonares y vaginales. Se obtuvieron titulaciones de IgG específica de HBsAg en las combinaciones de muestras usando un ensayo ELISA sándwich específico de antígenos. Sólo los ratones que recibieron la

combinación ADN de HBsAg y liposomas de HBsAg IN generaron respuestas de IgG específica de antígeno mucosales por encima de los niveles de fondo observados en ratones sin tratar.

La *Figura 17* muestra las proporciones de IgG1:IgG2a en el suero de ratones individuales Balb/c después de un protocolo de inmunización heteróloga que consistió en el cebado IM con ADN de HBsAg (100 µg las semanas 0 y 6) y el refuerzo con liposomas de HBsAg (3 µg en la semana 16). Las muestras en suero se tomaron cuatro semanas después del refuerzo. Todos los ratones mostraron una respuesta inmune con tendencia a Th1 (proporción de IgG1:IgG2a de < 0.5). Estos resultados indican que la respuesta con tendencia a Th1 que se ha observado después de la única inmunización con ADN de HBsAg se conserva incluso después de la administración de liposomas de HBsAg, que promueven respuestas con tendencia a Th2 en ratones Balb/c (compárese con la *Figura 11*).

La *Figura 18* ilustra índices de avidéz de IgG en suero específica de HBsAg en ratones Balb/c inmunizados por protocolos de inmunización homologa (panel izquierdo) o protocolos de inmunización heteróloga (panel derecho). Los ratones se inmunizaron en las semanas 0 y 4 (inmunización homologa) o se cebaron en las semanas 0 y 4, y se reforzaron en la semana 8 (inmunización heteróloga). Las avidéces de los anticuerpos se midieron en suero obtenido dos semanas después de la última inmunización. La línea discontinua muestra los valores de avidéz máxima que son posibles en este ensayo cuantitativo. El protocolo de inmunización heteróloga genera los anticuerpos de IgG en suero específica de HBsAg con la avidéz más alta. La inmunización homologa con liposoma de Ag IN del mismo experimento se muestra en el panel de la derecha para su comparación.

La *Figura 19* ilustra resultados representativos de un ensayo de destrucción de CTL *in vivo*. Panel izquierdo: células esplénicas de ratones sin tratar Balb/c. Panel derecho: células esplénicas de ratones Balb/c que recibieron el régimen de inmunización heteróloga (2 x ADN de HBsAg IM + 1 x de liposomas de HBsAg IN). Todos los ratones recibieron una mezcla de células esplénicas singénicas sin pulsar con CFSE<sup>bajo</sup> y células esplénicas singénicas pulsadas con péptido de HBsAg con CFSE<sup>alto</sup>. 20 horas más tarde, los bazos de los receptores se cultivaron y se analizaron para obtener la fluorescencia CFSE (eje x) por citometría de flujo. La región 1 se selecciona en células esplénicas (receptor) no fluorescentes. La región 2 se selecciona en células (donante sin pulsar) con CFSE<sup>bajo</sup>. La región 3 se selecciona en células con CFSE<sup>alto</sup> (donantes pulsadas con péptidos de HBsAg). Se analizaron 200.000 células viables. La desaparición de las células con CFSE<sup>alto</sup> (R3) en el panel derecho indica la destrucción específica de péptidos de HBsAg de las células diana de transfusión por CTL en los ratones inmunizados.

La *Figura 20* ilustra la aclaración del virus vaccinia de HBsAg (VV-HBsAg) de los pulmones de ratones que recibieron el régimen de inmunización heterólogo. Los ratones Balb/c se inmunizaron como se ha indicado (grupos de tratamiento; n = 5 ratones por grupo) a intervalos de cuatro semanas. Los ratones recibieron dosis de 100 µg de ADN de HBsAg IM y 15 µg de liposomas de HBsAg IN. Los ratones se infectaron 14 días después del refuerzo con 2 x 10<sup>5</sup> PFU de VV-HBsAg administrado en un volumen de 50 µl por vía intranasal. Los ratones se sacrificaron el día 5 después de la exposición al virus, las titulaciones víricas se determinaron en homogenados de pulmón usando células Vero. Los valores mostrados son la media ± SD de cuatro ratones por grupo.

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

### **I. Visión General**

5 La presente invención se basa al menos parcialmente en el sorprendente descubrimiento de los Solicitantes de que la combinación del protocolo de inmunización heterólogo con un antígeno o inmunógeno mezclado con liposomas provoca con éxito un gran conjunto de fuertes respuestas inmunes. Los solicitantes han desarrollado nuevos procedimientos para provocar las respuestas inmunes deseadas a un antígeno o inmunógeno. Dos ejemplos ponen

10 de relieve las fuertes respuestas inmunes que los procedimientos de la invención son capaces de provocar en un animal. En primer lugar, los procedimientos de la invención pueden usarse para provocar respuestas inmunes que protegen a los animales de exposiciones a patógenos vivos, tales como un virus vivo. En segundo lugar, la vacunación usando los procedimientos de la invención confieren inmunidad a los individuos personas que no responden a las vacunas actualmente disponibles. Además, los nuevos procedimientos proporcionados en este

15 documento consiguen las respuestas inmunes deseadas sin la necesidad de ningún otro adyuvante distinto de liposomas, evitando de esta manera riesgos y complicaciones asociados con muchos adyuvantes, especialmente las toxinas bacterianas, tales como la toxina del cólera (CT) y la enterotoxina lábil (LT) al calor de la *E. coli*. Dependiendo del protocolo de inmunización particular usado, los procedimientos descritos en este documento son capaces de inducir una amplia gama de respuestas inmunes que incluye una combinación de las siguientes: fuertes

respuestas de anticuerpos, respuestas de linfocitos T, tales como generación de CTL, y producción de citocina de tipo Th1 e inmunidad local en sitios mucosales.

5 Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para provocar una respuesta inmune deseada en un animal, que comprende ácidos nucleicos que codifican un antígeno y una preparación secundaria que comprende el antígeno y liposomas para provocar la respuesta inmune deseada en el animal. El procedimiento es particularmente útil para provocar una respuesta inmune en un animal huésped frente a un patógeno. En dicho contexto, la preparación primaria comprende ácido nucleico que codifica un antígeno específico de patógeno y la preparación secundaria comprende el antígeno específico de patógeno y liposomas. En ciertas realizaciones, el patógeno es el Virus de la Hepatitis B (VHB). Los regímenes de inmunización heteróloga de la presente invención incluyen un cebado y un refuerzo con diferentes formas de vacunas de HBsAg (por ejemplo, ADN de HBsAg IM y liposomas de HBsAg IN o IM) que dan como resultado respuestas inmune sistémicas más fuertes y también la inducción de inmunidad local en sitios mucosales. En una realización, el cebado con una vacuna de ADN de HBsAg por vía intramuscular y el refuerzo con liposomas de HBsAg por vía intranasal indujeron potentes respuestas de anticuerpos sinérgicas, CTL activados y perfiles de citocinas de tipo Th1, y provocaron la producción de IgA e IgG secretora en sitios mucosales. En otra realización, el cebado con una vacuna de ADN de HBsAg por vía intramuscular y el refuerzo con liposomas de HBsAg por vía intranasal generaron CTL de pulmón específicos de antígeno y el aclaramiento del virus completo tras la exposición intranasal a un virus vaccinia recombinante que expresa HBsAg (VV-HBsAg). La entrega del refuerzo por vía intranasal se estableció como un factor determinante para la generación de inmunidad local.

La presente invención también proporciona un kit para provocar una respuesta inmune en un animal. El kit comprende un primer componente inmunizante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno, un segundo componente inmunizante que comprende el antígeno y liposomas, y una instrucción para un usuario para administrar al animal el primer componente inmunizante seguido de la administración del segundo componente inmunizante para provocar una respuesta inmune en el animal.

La invención proporciona adicionalmente un procedimiento para modular respuestas inmunes de tal forma que puede provocarse una respuesta inmune deseada que tienda a una respuesta de Th1 en un animal huésped. El procedimiento comprende administrar por vía intramuscular al animal una preparación primaria que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno; y posteriormente, administrar al animal una preparación secundaria que comprende el antígeno y el liposoma. "Que tienda a" se refiere a la situación en la que la respuesta inmune observada se acerca más a una respuesta de Th1 o Th2 en comparación con antes de la inmunización. En ciertas realizaciones, la inmunización cambiará completamente de una respuesta de Th2 a una respuesta de Th1. En otras realizaciones, la inmunización no puede cambiar completamente de una respuesta de Th2 a una respuesta de Th1, pero en su lugar, da como resultado una respuesta mixta o una respuesta de Th2 más débil.

La presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento para desarrollar vacunas y protocolos de vacunación eficaces dirigidos específicamente al portal de entrada más común para microorganismos, las superficies mucosas del cuerpo. La invención proporciona vacunas que pueden ser más eficaces encapsulándolas en liposomas con una composición/tamaño definidos, y entregándolas directamente a las superficies mucosas. Combinando vacunas encapsuladas con liposomas adyuvantes y regímenes de inmunización apropiados, las respuestas inmunes pueden adaptarse para proporcionar vacunas más eficaces y específicas. En ciertas realizaciones, la vacuna ideal generará una respuesta inmune equilibrada o polarizada con T colaboradores 1 (Th1) que también incluye fuertes respuestas de anticuerpos, generación de CTL y producción de citocina de tipo Th1, e inmunidad local en sitios mucosales. En otras realizaciones, puede ser posible adaptar la respuesta inmune para generar una respuesta inmune polarizada de T colaboradores 2 (Th2), que puede ser beneficiosa en la prevención del rechazo de injerto en el huésped y en la protección frente a ciertas infecciones parasitarias.

La presente invención proporciona procedimientos para determinar las condiciones óptimas para la encapsulación de diversos antígenos (tales como HBsAg) en liposomas (por ejemplo, dosis de HBsAg, tamaño de liposoma, proporción de liposoma:proteína, y liposomas frescos frente a liofilizados y reconstituidos) para generar las respuestas de anticuerpos más fuertes. Las respuestas de anticuerpos en suero se compararon en ratones que recibieron dichos antígenos encapsulados en liposomas (liposoma de HBsAg) por vía de administración intranasal (IN) e intramuscular (IM). La invención también describe el efecto de la respuesta de anticuerpos en suero después de una administración (principal) o dos administraciones (principal y secundaria) de la misma forma de antígeno (inmunización homóloga). Se descubrió que los liposomas son tanto un adyuvante muy eficaz como un vehículo de administración para inducir inmunidad al HBsAg por las vías intranasal o intramuscular. En una realización, las respuestas de anticuerpos para el antígeno HBsAg de la prueba alcanzaron o superaron los niveles observados en los ratones tratados con la vacuna del HBsAg disponible en el mercado (GlaxoSmithKline) que actualmente se usa en los seres humanos. Distribución selectiva de antígeno de las superficies mucosas de los conductos nasales también estimuló la producción local de IgA secretora en las secreciones mucosas en todas las superficies mucosas muestreadas.

Por lo tanto, la invención proporciona varios protocolos de administración de vacunas que promueven diferentes tipos de respuestas inmunes (producción de anticuerpos, perfiles de citocinas de linfocitos T, inmunidad celular por

CTL e inmunidad local en las superficies mucosas). Las combinaciones racionales de estas plataformas de administración Las combinaciones racionales de estas plataformas de distribución permiten el desarrollo de vacunas que se adaptan para proporcionar la mejor protección frente a patógenos específicos en determinadas circunstancias, por ejemplo, para favorecer respuestas inmunes de tipo Th1 o Th2, o una respuesta mixta/más equilibrada.

En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos y reactivos para provocar de forma eficaz respuestas inmunes en animales, especialmente en mamíferos, frente a ciertos antígenos, tales como antígenos virales. Una característica sobresaliente de la invención se refiere al uso de antígenos proteicos encapsulados en liposomas administrados por vía intranasal (IN) o intramuscular (IM) al animal huésped.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos y reactivos para generar vacunas más eficaces encapsulando antígenos en liposomas de una composición y tamaño definidos, y administrando la preparación de antígenos-liposomas resultante directamente al sistema inmune mucosal. En otras realizaciones, la aplicación de las tecnología de plataformas de administración específicas de la invención proporciona una combinación racional de dichas vacunas encapsuladas en liposomas con adyuvantes y regímenes de inmunización apropiados, para adaptar las respuestas inmunes a fin de proporcionar vacunas más eficaces y específicas (mejorando la respuesta inmune mediada por células y humoral, adaptando la respuesta de Th2 y mixta/equilibrada de Th1/Th2 a Th1, aumentando la secreción de IFN- $\gamma$ , la inducción del alto nivel de IgA, IgG y CTL mucosal).

## II. Protocolos de Inmunización

Un componente de los procedimientos y kits de la presente invención es el uso de una inmunización "primaria", que comprende la administración inicial de uno o más antígenos a un animal, especialmente un paciente humano, en la preparación para una o más administraciones posteriores del mismo antígeno. Específicamente, el término "primaria", como se usa en este documento, se refiere a una primera inmunización que usa un antígeno que induce una respuesta inmune al antígeno deseado y reclama un nivel más alto de respuesta inmune al antígeno deseado tras la reinmunización posterior con el mismo antígeno cuando se administra en el contexto del mismo o un sistema de administración de vacuna diferente.

Otro componente de los procedimientos y kits de la presente invención es el uso de una "inmunización secundaria", o un "refuerzo", que se refiere a la administración de una composición que suministra el mismo antígeno como se codificó en la inmunización primaria. A veces, un refuerzo se refiere a una respuesta anamnésica, es decir, una respuesta inmune en un animal previamente sensibilizado. Pueden administrarse múltiples refuerzos, utilizando las mismas o diferentes cantidades para cada refuerzo. Un refuerzo que usa un sistema de administración de antígeno diferente del cebado puede denominarse un "refuerzo heterólogo", mientras que un refuerzo que usa el mismo sistema de administración de antígeno que el cebado puede denominarse un "refuerzo homólogo".

Como una alternativa a la administración secuencial que se ha descrito anteriormente, la preparación primaria y la preparación secundaria pueden administrarse simultáneamente, es decir, sustancialmente al mismo tiempo. Los procedimientos de la invención conducen a potentes efectos sinérgicos entre la inmunización primaria y la inmunización secundaria en cuanto a repuestas inmunes que los procedimientos son capaces de provocar en un animal. Como resultado, los procedimientos de la invención permiten provocar un nivel deseado de respuesta inmune, en los que cada una de la preparación primaria y la preparación secundaria, cuando se administran solas al animal, es insuficiente para conseguir el nivel deseado de respuesta inmune. En ciertas realizaciones particulares, la inmunización heteróloga con refuerzo genera CTL mucosales (fenotipo CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> y destrucción de CTL *in vivo*), y proporciona una protección completa frente a la exposición a patógenos vivos, tales como exposiciones al VHB vivo, como se muestra por los Solicitantes en los ejemplos ilustrativos.

Los efectos de la respuesta inmune en el animal huésped pueden evaluarse mediante diversos ensayos, incluyendo respuestas inmunes humorales y celulares. La respuesta inmune humoral incluye titulaciones (Ig) de anticuerpos específicos de antígeno totales en suero o en las superficies mucosas; titulaciones de anticuerpos específicos de HBsAg en suero o en las superficies mucosas; titulaciones de isotipos y/o subtipos de anticuerpos específicos que incluyen IgG, IgA, IgG1 e IgG2a; proporción de IgG1 e IgG2a. La respuesta inmune celular incluye el fenotipo y actividad de linfocitos T citotóxicos (CTL). La respuesta inmune celular también incluye la secreción de citocinas características de las respuestas de Th1, incluyendo IFN- $\gamma$ , y secreción de citocinas características de la respuesta de Th2, incluyendo IL-10 e IL-4. Las citocinas se detectan directamente por ensayos ELISPOT de citocinas (es decir, IFN- $\gamma$  e IL-10) y se deducen de proporciones de IgG1:IgG2a (por ejemplo, respuesta de Th1 frente a Th2).

Cada una de la preparación primaria y la preparación secundaria puede administrarse por una cualquiera de las siguientes vías: por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intradérmica y por vía mucosal. La preparación primaria y la preparación secundaria pueden administrarse por la misma vía, o por vías diferentes. En ciertas realizaciones preferidas, la preparación primaria se administra por vía intramuscular y la preparación secundaria se administra por vía intramuscular o por vía intranasal, lo que da como resultado no solo fuertes respuestas sistémicas, sino también la inducción de inmunidad local en sitios mucosales. En una realización particular, el cebado con una vacuna de ADN de HBsAg por vía intramuscular y el refuerzo con liposomas de HBsAg por vía

intranasal indujo potentes respuestas de anticuerpos sinérgicas, CTL activados y perfiles de citocinas de tipo Th1, y conservó la producción de IgA secretora en sitios mucosales. La administración del refuerzo por vía intranasal se estableció como un factor determinante importante para la generación de inmunidad local.

5 Pueden usarse diferentes intervalos entre la administración primaria y la administración secundaria. La administración secundaria puede hacerse 2-8 semanas, preferiblemente 4-6 semanas a parte de la administración previa (inicial o un refuerzo anterior). Típicamente, un refuerzo administrado 4-6 semanas después de la administración inicial es suficiente. La invención contempla que la preparación primaria o la preparación secundaria, o ambas, pueden administrarse al animal una o más veces.

10 La administración o administraciones secundarias y la administración o administraciones iniciales pueden usarse la misma o diferentes cantidades de preparaciones de antígeno-liposoma, y el refuerzo y las administraciones iniciales pueden administrarse a través de las mismas o diferentes vías. La administración o administraciones iniciales y la administración o las administraciones secundarias pueden usarse diferentes cantidades de antígeno de ADN  
15 administrado de acuerdo con diferentes programaciones, y diferentes cantidades de preparaciones de antígeno-liposoma administradas.

### III. Antígenos

20 Como se usa en este documento, los términos "antígeno" o "inmunógeno", usados de forma intercambiable, pretenden incluir todas las secuencias peptídicas o proteicas que sean capaces de inducir una respuesta inmune en el animal en cuestión. Los términos "antígeno" o "inmunógeno" incluyen análogos peptídicos o proteicos de antígenos conocidos o de tipo silvestre, cuyos análogos pueden ser más solubles o más estables que el antígeno de tipo silvestre, y que también pueden contener mutaciones o modificaciones que convierten al antígeno más activo  
25 inmunológicamente u optimizado para la expresión en ciertos tipos de células (es decir, uso de codones humanizados). Un antígeno también puede ser un péptido en el que las sustituciones de aminoácidos particulares se han hecho a un antígeno de origen natural que alteran la estructura de la proteína, una porción del antígeno de origen natural que incluye epítopes protectores conocidos (es decir, epítopes CTL), o una cadena de origen sintético de epítopes conocidos que pueden o no estar limitados a un patógeno (vacuna multivalente).

30 También son útiles los péptidos o proteínas adicionales que tienen secuencias homólogas con una secuencia de aminoácidos de los antígenos deseados, en los que el antígeno homólogo induce una respuesta inmune a los respectivos patógenos. Los genes que son homólogos a la secuencia que codifica antígeno deseada deben interpretarse para que se incluyan en la presente invención, siempre que codifiquen una proteína o polipéptido que  
35 tenga una actividad biológica sustancialmente similar a la del antígeno deseado.

Los análogos de los antígenos descritos en este documento pueden diferir de proteínas o péptidos de origen natural por el aminoácido conservador, las diferencias de la secuencia o por modificaciones que no afectan a la secuencia, o por ambos. Por ejemplo, pueden hacerse cambios en aminoácidos conservadores, que a pesar de que modifican la  
40 secuencia primaria de la proteína o péptido, normalmente no alteran su función. Las modificaciones (que normalmente no alteran la secuencia primaria) incluyen derivación química *in vivo* o *in vitro* de polipéptidos, por ejemplo, acetilación o carboxilación. También se incluyen como antígenos las proteínas modificadas por glicosilación, por ejemplo, las realizadas mediante la modificación de los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales; por ejemplo, por exposición del  
45 polipéptido a las enzimas que afectan a la glicosilación, por ejemplo, las enzimas de glicosilación o deglicosilación de mamíferos. También se incluyen como antígenos según esta invención secuencias que han fosforilado residuos de aminoácidos, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina. También se incluyen como antígenos polipéptidos que se han modificado usando técnicas de biología molecular ordinaria con el fin de mejorar su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad. Los análogos de dichos polipéptidos incluyen los que contienen residuos distintos de L-aminoácidos de origen natural, por ejemplo, D-  
50 aminoácidos o aminoácidos sintéticos que no son de origen natural. Los antígenos de la invención no se limitan a los productos de cualquiera de los procesos ejemplares específicos enumerados en este documento.

Un antígeno puede ser un antígeno de longitud completa, un fragmento inmunogénico del mismo, o un epítope obtenido a partir del antígeno. En ciertas realizaciones, el antígeno específico de patógeno en la preparación secundaria puede estar en forma de un patógeno atenuado o destruido. Los antígenos eficaces también incluyen antígenos de superficie de estos patógenos.

El término "epítope", como se usa en este documento, se refiere a una secuencia de al menos aproximadamente 3 a 5, preferiblemente de aproximadamente 5 a 10 ó 15, y no más de aproximadamente 1.000 aminoácidos (o cualquier número entero entre los mismos), que definen una secuencia que por sí misma o como parte de una secuencia mayor, se une a un anticuerpo generado en respuesta a dicha secuencia o estimula una respuesta inmune celular. El término "epítope" incluye secuencias idénticas a la secuencia nativa, así como modificaciones para la secuencia nativa, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservadoras en la naturaleza). Los antígenos usados en la invención pueden comprender un solo epítope, tal como, por ejemplo un solo epítope de CTL.

Los antígenos codificados por ácidos nucleicos en la preparación primaria y los antígenos en la preparación secundaria preferiblemente tienen epítopes solapantes. En ciertas realizaciones, los dos antígenos pueden ser idénticos entre sí. Como alternativa, los dos antígenos pueden tener solapamiento pero diferentes conjuntos de epítopes. A modo de ejemplo ilustrativo, en el protocolo de vacunación para VHB, puede usarse HBsAg de ADN en la preparación primaria, y la preparación secundaria puede inactivarse por el VHB. A modo de otro ejemplo ilustrativo, la preparación primaria puede ser un minigen que codifica un solo epítope que se encuentra en el HBsAg, y la preparación secundaria puede comprender el antígeno HBsAg, o viceversa.

Los siguientes son ejemplos ilustrativos de antígenos que pueden usarse en la presente invención.

Los antígenos pueden obtenerse a partir de VIH-1, (tal como tat, nef, gp120 o gp160, gp40, p24, gag, env, vif, vpr, vpu, rev), virus del herpes humano, tales como gH, gL, gM, gB, gC, gK, gE o gD o derivados de los mismos o proteína inmediata temprana, tal como ICP27, ICP47, IC P4, ICP36 de HSV1 o HSV2, citomegalovirus, especialmente humano, (tales como, gB o derivados de los mismos), virus Epstein Barr (tal como, gp350 o derivados del mismo), Virus de la Varicela Zoster (tal como, gpl, II, III e IE63), o a partir de un virus de hepatitis, tal como virus de la hepatitis B (por ejemplo, antígeno de superficie de Hepatitis B o antígeno núcleo de la Hepatitis o pol), antígeno del virus de la hepatitis C y antígeno del virus de la hepatitis E, o a partir de otros patógenos virales, tales como paramixovirus: Virus Sincitial Respiratorio (tal como, proteínas F y G o derivados de las mismos), o antígenos del virus de la parainfluenza, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano (por ejemplo, HPV6, 11, 16, 18, por ejemplo, L1, L2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7), flavivirus (por ejemplo, Virus de la Fiebre Amarilla, Virus del Dengue, Virus de la encefalitis por Garrapatas, Virus de la Encefalitis Japonesa) o células del virus de la gripe, tales como HA, NP, NA o proteínas M, o combinaciones de los mismos), o antígenos obtenidos a partir de patógenos bacterianos, tales como *Neisseria spp.*, incluyendo *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis* por ejemplo, proteínas de unión a transferrina, proteínas de unión a lactoferrina, PilC, adhesinas); *S. pyogenes* (por ejemplo, proteínas M o fragmentos de las mismas, proteasa C5A), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp.*, incluyendo *M. catarrhalis*, también denominado *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo, adhesinas e invasinas de alto y bajo peso molecular); *Bordetella spp.*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo, pertactina, toxina pertussis o derivados de los mismos, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclasa, fimbrias), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis* (por ejemplo, ESAT6, Antígeno 85A, -B o -C, MPT 44, MPT59, MPT45, HSP10, HSP65, HSP70, HSP 75, HSP90, PPD 19 kDa [Rv3763], PPD 38 kDa [Rv0934]), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp.*, incluyendo *L. pneumophila*; *Escherichia spp.*, incluyendo *E. coli* enterotóxico (por ejemplo, factores de colonización, toxinas lábiles al calor o derivados de las mismas, toxinas estables al calor o derivados de las mismas), *E. coli* enterohemorrágico, *E. coli* enteropatógeno (por ejemplo, toxina semejante a la toxina shiga o derivados de las mismas); *Vibrio spp.*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo, toxina del cólera o derivados de la misma); *Shigella spp.*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp.*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo, una proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp.*, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo, toxinas, adhesinas e invasinas) y *C. coli*; *Salmonella spp.*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp.*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo, ureasa, catalasa, toxina vacuolizante); *Pseudomonas spp.*, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetani* (por ejemplo, toxina del tétanos y derivados de la misma), *C. botulinum* (por ejemplo, toxina botulínica y derivados de la misma), *C. difficile* (por ejemplo, toxinas de clostridium A o B y derivados de las mismas); *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo, toxina botulínica y derivados de la misma); *Coryne-bacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo, toxina de la difteria y derivados de la misma); *Borrelia spp.*, incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la Erliquiosis Granulocítica Humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo, MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo, MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo, las proteínas de membrana externa raras), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; u obtenerse a partir de parásitos, tales como *Plasmodium spp.*, incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.*, incluyendo *T. gondii* (por ejemplo, SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba spp.*, incluyendo *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluyendo *B. microti*; *Trypanosoma spp.*, incluyendo *T. cruzi*; *Giardia spp.*, incluyendo *G. lamblia*; *Leshmania spp.*, incluyendo *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*; *Schistosoma spp.*, incluyendo *S. mansoni*, u obtenidos a partir de levaduras, tales como *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, incluyendo *C. neoformans*.

Otros antígenos específicos preferidos para *M. tuberculosis* son, por ejemplo, Rv2557, Rv2558, RPFs: Rv0837c, Rv1884c, Rv2389c, Rv2450, Rv1009, aceA (Rv0467), PstS1, (Rv0932), SodA (Rv3846), Rv2031c 16kDa1., Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1 (documento WO 99/51748). Las proteínas para *M. tuberculosis* también incluyen proteínas de fusión y variantes de las mismas en las que al menos dos, preferiblemente tres polipéptidos de *M. tuberculosis* se fusionan en una proteína mayor. Las fusiones preferidas incluyen Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14-DPV-MTI-MSI-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI (documento WO 99/51748). Los antígenos más preferidos para *Chlamydia* incluyen, por ejemplo, la Proteína de Alto Peso Molecular (HWMP) (documento WO 99/17741), ORF3 (documento

EP 366412), y proteínas de miembros putativos (Pmps). Otros antígenos de Chlamydia de la formulación de la vacuna pueden seleccionarse entre el grupo descrito en el documento WO 99/28475.

5 Las vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos obtenidos a partir de *Streptococcus spp.*, incluyendo *S. pneumoniae* (PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a colina) y la neumolisina de proteína de antígeno (Biochem Biophys Acta, 1989, 67,1007; Rubins y col., Microbial Pathogenesis, 25, 337-342), y derivados detoxificados de los mismos (documentos WO 90/06951; WO 99/03884). Otras vacunas preferidas comprenden antígenos obtenidos a partir de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae* de tipo B (por ejemplo, PRP y conjugados del mismo), *H. influenzae no tipificable*, por ejemplo, OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, 10 proteína D y lipoproteína D, y péptidos obtenidos a partir de fimbrina y fimbrina (documento US 5.843.464) o múltiples variantes de copia o proteínas de fusión de los mismos.

15 Los antígenos que pueden usarse en la presente invención pueden comprender adicionalmente antígenos obtenidos a partir de parásitos que causan la Malaria. Por ejemplo, los antígenos preferidos de *Plasmodia falciparum* incluyen RTS,S y TRAP. RTS es una proteína híbrida que comprende sustancialmente todas las porciones C-terminales de la proteína circumsporozoito (CS) de *P-falciparum* unido a través de cuatro aminoácidos de la porción preS2 del antígeno de superficie de la Hepatitis B al antígeno de superficie (S) del virus de la hepatitis B. Su estructura completa se describe en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/EP92/02591, publicada con el Número WO 93/10152 que reivindica prioridad sobre la Solicitud de Patente de Reino Unido N° 9124390.7. Cuando se expresa en levaduras, se produce RTS como una partícula de lipoproteínas, y cuando se co-exprea con el antígeno S del VHB produce una partícula mixta conocida como RTS,S. Los antígenos TRAP se describen en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/GB89/00895, publicada con el N° WO 90/01496. Una realización preferida de la presente invención es una vacuna contra la Malaria en la que la preparación antigénica comprende una combinación de los 20 antígenos RTS,S y TRAP. Otros antígenos de plasmodia que son candidatos posibles a ser componentes de una vacuna contra la malaria de varias etapas son *P. faciparum* MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Sequestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 y sus análogos en *Plasmodium spp.*

30 Las vacunas de la presente invención también pueden usarse para la profilaxis o la terapia de trastornos crónicos además de enfermedades alérgicas o infecciosas. Dichos trastornos crónicos son enfermedades tales como asma, aterosclerosis y Alzheimer, y otras enfermedades autoinmunes. También pueden considerarse vacunas para su uso como un anticonceptivo.

35 Los antígenos relevantes para la profilaxis y la terapia de pacientes susceptibles a o que padecen la enfermedad neurodegenerativa de Alzheimer son, en particular, el fragmento de aminoácidos 39-43 N-terminal (AB, la proteína del precursor amiloide y fragmentos más pequeños. Este antígeno se describe en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 99/27944 - (Athena Neurosciences).

40 Los autoantígenos potenciales que pueden incluirse como vacunas para trastornos autoinmunes o como una vacuna anticonceptiva incluyen: citocinas, hormonas, proteínas de factor de crecimiento o extracelulares, más preferiblemente una citocina de 4 hélices, más preferiblemente IL13. Las citocinas incluyen, por ejemplo, IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL20, IL21, TNF, TGF, GMCSF, MCSF y OSM. Las citocinas de 4 hélices incluyen IL2, IL3, IL4, IL5, IL13, GMCSF y MCSF. Las hormonas incluyen, por ejemplo, hormona luteinizante (LH), hormona estimuladora del folículo (FSH), gonadotropina coriónica (CG), 45 VGF, GHrelina, agouti, proteína relacionada con agouti y neuropéptido Y. Los factores de crecimiento incluyen, por ejemplo, VEGF.

#### IV. Preparación primaria y preparación secundaria

50 Los ácidos nucleicos usados en la preparación primaria pueden ser ARN o ADN que incluyen ADN, ADN sintético o ADNc. Preferiblemente, la secuencia nucleotídica es una secuencia de ADN y más preferiblemente, una secuencia de ADNc. Con el fin de obtener la expresión del péptido antigénico en las células de mamíferos, es necesario para la secuencia nucleotídica codificar el péptido antigénico que estará presente en un sistema de vector apropiado. Por "vector apropiado", como se usa en este documento, se refiere a cualquier vector que permita al péptido antigénico expresarse en un mamífero en cantidades suficientes para provocar una respuesta inmune.

60 Por ejemplo, el vector seleccionado puede ser un plásmido, un fagémido o un vector viral. El vector puede comprender una secuencia de terminación promotor y poliadenilación/transcripción dispuesta en el orden correcto para obtener la expresión de péptidos antigénicos. La construcción de vectores que incluyen estos componentes y opcionales otros componentes, tales como potenciadores, sitios de enzima de restricción y genes de selección, tales como genes de resistencia a antibióticos, es bien conocida por los expertos en la técnica y se explica en detalle en Maniatis y col "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour Press, Volúmenes 1-3, 2ª Edición, 1989.

65 Un vector que lleva los ácidos nucleicos que codifican un péptido antigénico puede administrarse en una diversidad de maneras. Esto es posible para el vector que se administra en una forma simple (que es como la secuencia de

nucleótidos desnuda que no está en asociación con formulaciones de liposomas, con vectores virales o proteínas que facilitan la transfección) suspendido en un medio apropiado, por ejemplo, una solución salina tamponada, tal como PBS, y después inyectado por vía intramuscular, subcutánea, intradérmica o mucosal. Esto es adicionalmente posible para los vectores que se van a encapsular por partículas de liposomas o en poliláctido co-glicólido (PLG) (25) para su administración por vía nasal o pulmonar.

Esto también es posible, de acuerdo con una realización de la invención, para la administración intradérmica del vector, preferiblemente mediante el uso de técnicas de administración con pistola de genes (particularmente bombardeo de partículas). Dichas técnicas pueden implicar el recubrimiento del vector sobre perlas de oro que después se administran a alta presión en la epidermis, tal como, por ejemplo, como se describe en Haynes y col J. Biotechnology 44: 37-42 (1996).

También pueden usarse vectores virales recombinantes para administrar antígenos de ADN. Las ventajas de este enfoque incluyen la expresión abundante de proteínas codificadas con ADN en múltiples tipos de células, fuerte mejora de respuestas CTL y la capacidad del virus de codificar múltiples genes. El virus vaccinia (que incluye el virus Ankara modificado) y adenovirus (no replicante) son dos virus populares usados para el desarrollo de vacunas (Im y Hanke, Expert, Rev. Vaccines 3: S89-S97 (2004); Basak y col., Viral Immunol. 17: 182-196 (2004)).

Las recientes modificaciones de vacunas de ADN incluyen el desarrollo de minigenes que codifican epítopes de CTL individuales, el uso de señales dirigidas a la codificación génica para permitir una presentación más eficaz de epítopes por la trayectoria de MHC y la generación de proteínas secretadas a la trayectoria de clase II de MHC diana (Doria-Rose y Haigwood, Methods 31: 207-216 (2003); Leifert y col., Immunol. Rev. 199: 40-53 (2004)).

Las preparaciones primaria y secundaria se administran en una cantidad tal que eran profiláctica y terapéuticamente eficaces. La cantidad exacta puede variar considerablemente dependiendo de la especie y el peso del animal que se va a inmunizar, la vía de administración, la potencia y la dosis de las preparaciones primarias y secundarias, la naturaleza de la patología que se va a tratar o a proteger frente a, la capacidad del sistema inmune del sujeto para producir una respuesta inmune y el grado de protección o efecto terapéutico deseado. En base a estas variables, un veterinario podrá fácilmente determinar el nivel de dosificación apropiado.

Se contempla que los procedimientos y kits de la invención también pueden practicarse con la adición de uno o más adyuvantes conocidos en la técnica. Un adyuvante es una sustancia o procedimiento que aumenta las respuestas inmunes específicas a antígenos modulando la actividad de células inmunes. Los adyuvantes ejemplares incluyen adyuvantes basados en sal, tales como sales de alumbre, adyuvantes derivados de bacterias como lipopolisacáridos y toxinas bacterianas, emulsiones de adyuvantes que permiten la liberación lenta de antígeno, anticuerpos agonistas para co-estimular las moléculas, adyuvante de Freund, dipéptidos muramilo, y adyuvantes recombinantes/sintéticos. El alumbre es el adyuvante basado en sales más común usado para estimular respuestas inmunes a vacunas de proteínas y es el único adyuvante aprobado para uso humano en los Estados Unidos (Alving, Vaccine 20(3): S56-S64 (2002); Hunter, Vaccine 20(3): S7-12 (2002)). Sin embargo, el alumbre favorece respuestas con tendencia a Th2 y no estimula la inmunidad mediada por células. La inmunidad mucosal puede inducirse a través del uso de toxinas bacterianas, tales como toxina del cólera (CT) y la enterotoxina lábil al calor E. coli (LT), sin embargo, la seguridad de estos adyuvantes es cuestionable (Alving, Vaccine 20(3): S56-S64 (2002); Hunter, Vaccine 20(3): S7-12 (2002)). El desarrollo de adyuvantes más nuevos y seguros se ha centrado recientemente en la estimulación de trayectorias de respuestas inmunes particulares. La co-administración de citocinas, tales como interferón- $\gamma$  y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), se ha mostrado prometedora en la estimulación de respuestas inmunes celulares (revisado en (Petrovsky y Aguilar, Immunol. Cell Biol. 82: 488-496 (2004)). Sin embargo, los altos niveles de citocinas pueden causar citotoxicidad, y los regímenes de dosificación han de modularse cuidadosamente. La administración de citocinas es particularmente prometedora para la vacunación con ADN en la que los genes que codifican tanto la citocina como el antígeno pueden expresarse simultáneamente por el mismo vector. Los adyuvantes adicionales que se van a explorar incluyen los que se dirigen a la trayectoria de señalización toll. Los motivos de ADN CpG que se encuentran normalmente en el ADN bacteriano son potentes activadores de respuestas inmunes celulares, y las vacunas basadas en ADN de nueva generación a menudo codifican múltiples motivos CpG (revisado en (Petrovsky y Aguilar, Immunol. Cell Biol. 82: 488-496 (2004)).

## V. Patógenos

El término "patógeno", como se usa en este documento, se refiere a cualquier virus, bacteria y parásitos que sean capaces de provocar una infección en un animal huésped.

La presente invención puede usarse para inmunizar de forma eficaz animales huésped frente a una gama de patógenos. A la luz de las enseñanzas en este documento, un experto en la técnica apreciará que los procedimientos y composiciones de la invención se aplican a un amplio intervalo de virus, tales como, por ejemplo, reovirus, virus de ARN, virus de ADN y virus encapsulados. En una realización, la presente invención se aplica a reovirus. En otra realización, la presente invención se aplica adicionalmente a retrovirus (retroviridae). En otra realización más, la presente invención se aplica a lentivirus, incluyendo un grupo lentivirus de los primates. En una realización adicionalmente, la presente invención se aplica al Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de

la Inmunodeficiencia Humana de tipo 1 (VIH-1), virus de la Hepatitis B (VHB), Virus de la Hepatitis A (VHA), Virus de la Hepatitis C (VHC) y Virus de Leucemia de Linfocitos T humanos (HTLV).

5 Aunque no se pretende que sean limitativos, los retrovirus son relevantes incluyen: retrovirus de tipo C que provoca linfosarcoma en lucios, el retrovirus de tipo C, que infecta a los visones, los lentivirus caprino que infectan a las ovejas, el virus de Anemia Infecciosa Equina (EIAV), el retrovirus de tipo C, que infecta a los cerdos, el virus de la Leucosis del Sarcoma Aviar (ALSV), el virus de la leucemia felina (FeLV), el virus felino del SIDA, el virus de la leucemia bovina (BLV), el virus de la leucemia de los simios (SLV), el virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV), el virus de la leucemia de linfocitos T humanos de tipo I (HTLV-I), el virus de la leucemia de linfocitos T humanos de tipo II (HTLV-II), el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2 (VIH-2) y el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1).

15 El procedimiento y las composiciones de la presente invención se aplican adicionalmente a virus de ARN, incluyendo virus de cepas negativas de ARNs y virus de cepas positivas de ARNs. Estos virus de cepas positivas de ARNs incluyen el virus de la Hepatitis C (VHC). En una realización preferida, la presente invención se aplica a mononegavirales, incluyendo filovirus. Los filovirus incluyen adicionalmente los virus ébola y los virus de Marburg. Otros virus de ARN incluyen picomavirus, tales como enterovirus, poliovirus, coxsackievirus y el virus de la hepatitis A, los calcivirus, que incluyen virus semejantes a Norwalk, los rabdovirus, incluyendo el virus de la rabia, los togavirus, incluyendo alfavirus, virus Semliki Forest, denguevirus, virus de la fiebre amarilla y el virus de la rubéola, los ortomixovirus, incluyendo virus de la gripe de tipo A, B y C, rotavirus, los bunyavirus, incluyendo el virus de la fiebre del valle del Rift y el hantavirus, los filovirus, tales como el virus ébola y el virus de Marburg, y los paramixovirus, incluyendo virus de las paperas y el virus del sarampión. Otros virus que pueden tratarse con los procedimientos de la presente invención incluyen virus del Herpes Simplex de tipo I (HSV1), virus del Herpes Simplex de tipo II (HSV2), Bacillus anthracis, virus sincitial respiratorio, Coronavirus (patógeno para SARS) y virus de enfermedad de pata y boca (FMDV). Los patógenos adicionales que pueden tratarse incluyen Chlamydia y parásitos que causan la malaria (incluyendo Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malariae y Plasmodium ovale).

30 Los procedimientos y kits de acuerdo con la presente invención pueden usarse en relación con los procedimientos profilácticos o de tratamiento de todos los animales, incluyendo, por ejemplo, los animales domésticos, animales de laboratorio, animales de granja, animales salvajes en cautiverio y, los más preferibles, seres humanos.

35 Los procedimientos y los kits de la invención son útiles para la vacunación terapéutica. El objetivo de la vacunación terapéutica es dirigir respuestas inmunes en un individuo infectado para erradicar las células que hay están infectadas con el virus. Los virus que establecen las infecciones crónicas sin estimular respuestas inmunes fuertes requieren la generación de nuevas estrategias de vacunación terapéutica (revisado en (Berzofsky y col., J. Clin. Invest. 114: 450-462 (2004)). El virus del papiloma humano (HBV), los virus de la hepatitis B y C (HBV, HCV), herpes virus y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) son varios de los virus que establecen infecciones a largo plazo. El desarrollo de vacunas terapéuticas para los virus se ha centrado en la activación de CTL para reconocer y destruir las células infectadas. Los Solicitantes han demostrado que los procedimientos de la invención son eficaces en la mejora de las respuestas inmunes celulares, haciéndolas adecuadas para proporciona la vacunación terapéutica. La eficacia de los procedimientos puede mejorarse adicionalmente por inclusión de adyuvantes de citocinas y motivos CpG que se han mostrado particularmente prometedores en el desarrollo de vacunas anticancerosas (Belardelli y col., Cancer Res. 64: 6827-6830 (2004)).

45 Las vacunas de la presente invención son particularmente adecuadas para el tratamiento inmunoterapéutico de enfermedades, tales como afecciones crónicas, pero también para la terapia de infecciones persistentes. Por consiguiente, las vacunas de la presente invención son particularmente adecuadas para la inmunoterapia de enfermedades infecciosas, tales como Tuberculosis (TB), infecciones por VIH, tales como SIDA e infecciones de VHB.

VI. Preparación de Liposomas

55 La presente invención también proporciona una tecnología de plataforma de administración de antígenos basada en liposomas para aplicaciones de vacunas a través de sitios mucosales. La invención combina una tecnología de encapsulación de liposomas, la administración específica a sitios mucosales, y el uso de adyuvantes y protocolos de inmunización heteróloga para conseguir una respuesta de Th equilibrada o mixta.

60 Los liposomas tienen varias ventajas potenciales como plataformas de administración para vacunas. La encapsulación de antígenos en liposomas secuestra estos antígenos, por lo tanto, los liposomas sirven como un depósito de antígenos capaz de liberar antígeno de forma sostenida. Además, los liposomas son biocompatibles y biodegradable, y bajos en toxicidad e inmunogenicidad. Cuando tienen el tamaño apropiado (por ejemplo, >0,2 µm hasta 5 µm), los liposomas se recogen selectivamente por las células que presentan antígeno en el cuerpo, y tienen el potencial de inducir tanto respuestas de anticuerpos humorales como CTL. Los liposomas sirven como un transportador/vehículo de antígeno, así como que es un adyuvante que puede administrarse repetidamente sin toxicidad o inmunogenicidad.

Los liposomas son estructuras compuestas de una membrana bicapa compuesta de fosfolípidos de origen biológico o sintético, normalmente de forma esférica. Los liposomas se forman naturalmente cuando los fosfolípidos o los lípidos entran en contacto con el agua. La estructura de los liposomas puede manipularse mediante procedimientos para su formación en el laboratorio, incluyendo el aporte de energía en forma de calor, energía sonora, los ciclos de congelación y descongelación, o fuerzas de cizalla. Debido a que los liposomas tienen las características de las membranas biológicas, pueden crearse por ingeniería en el laboratorio para contener una diversidad de moléculas de complejos biológicos y terapéuticos relevantes, incluyendo proteínas. La membrana bicapa de fosfolípidos de los liposomas separa y protege el material atrapado en el núcleo acuoso interno desde el exterior. Tanto las sustancias solubles como insoluble en agua puede quedar atrapadas en los distintos compartimientos, el núcleo acuoso y membrana de dos capas, respectivamente, del mismo liposoma. La interacción física y química de estas sustancias puede eliminarse ya que las sustancias se encuentran en estos compartimientos diferentes.

Los liposomas usados con los procedimientos y kits de la presente invención pueden prepararse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Estos liposomas pueden tener un diámetro medio de aproximadamente 0,5-5 micrómetros, aunque también pueden ser útiles liposomas de 0,2-8 micrómetros. En ciertas realizaciones, los liposomas que pueden ser útiles en los procedimientos y kits de la invención son "liposomas circulantes largos" (también conocidos como "liposomas estabilizados estéricamente"), que son liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan en los liposomas, dan como resultado una vida de circulación mejorada en relación con liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas circulantes largos conocidos en la técnica incluyen aquellos en los que el liposoma (A) comprende uno o más glucolípidos, tales como monosialogangliosida GM1 o (B) comprende uno o más lípidos derivados con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Sin desear quedar ligado a teoría alguna, al menos para los liposomas circulantes largos que contienen gangliósidos, esfingomiélinea o lípidos modificados con PEG, la semivida de circulación mejorada de estos liposomas se obtiene a partir de una recaptación reducida en células del sistema reticuloendotelial (RES) (Allen y col., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu y col., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

A. Liposoma que Comprenden Glucolípidos: Se conocen en la técnica diversos liposomas que comprenden uno o más glucolípidos. Papahadjopoulos y col. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) indicaron la capacidad de la monosialogangliosida GM1, sulfato de galactocerebrosida y el fosfatidilinositol de mejorar las semividas en sangre de los liposomas. Estos hallazgos se expusieron por Gabizon y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 6949). Pat. de Estados Unidos N° 4.837.028 y la Solicitud PCT publicada WO 88/04924, ambas de Allen y col., describen liposomas que comprenden (1) esfingomiélinea y (2) el gangliósido GM1 o un éster sulfato de galactocerebrosida. La Pat. de Estados Unidos N° 5.543.152 (de Webb y col.) describe liposomas que comprenden esfingomiélinea. Se describen liposomas que comprenden 1,2-sn-dimiristoilfosfatidicolina en la solicitud PCT publicada WO 97/13499 (de Lim y col.).

B. Liposomas Modificados con Polímeros Hidrófilos: Se conocen en la técnica muchos liposomas que comprenden lípidos modificados con uno o más polímeros hidrófilos, y procedimientos de preparación de los mismos. Sunamoto y col. (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) describieron liposomas que comprendían un detergente no iónico, 2C1215G, que contenía un resto PEG. Illum y col. (FEBS Letters, 1984, 167, 79) indicaron que el recubrimiento hidrófilo de las partículas de poliestireno con glicoles poliméricos da como resultado semividas en sangre significativamente mejoradas. Se describen fosfolípidos sintéticos modificados por la unión de grupos carboxílicos de polialquilenglicoles (por ejemplo, PEG) y liposomas que comprenden dichos fosfolípidos por Sears (Pat. de Estados Unidos N° 4.426.330 y 4.534.899). Klibanov y col. (FEBS Letts., 1990, 268, 235) describieron experimentos demostrando que los liposomas que comprenden fosfatidiletanolamina (PE) modificada con PEG o estearato de PEG tienen aumentos significantes de las semividas de circulación en sangre. Blume y col. (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) ampliaron dichas observaciones a otros fosfolípidos modificados con PEG, por ejemplo, DSPE-PEG, formado a partir de la unión química de PEG a DSPE (distearoilfosfatidiletanolamina).

Se describen liposomas que tienen unión covalente a restos PEG en su superficie externa en la Patente Europea N° 0 445 131 B1 y la solicitud PCT publicada WO 90/04384 de Fisher. Las composiciones de liposomas que contienen el 1-20% en moles (% mol) de PE modificado con PEG, y procedimientos de uso de los mismos, se describen por Woodle y col. (Pat. de Estados Unidos N° 5.013.556 y 5.356.633) y Martin y col. (Pat. de Estados Unidos N° 5.213.804 y Patente Europea N° EP 0 496 813 B1). Se describen liposomas que comprenden varios conjugados de lípidos-polímeros distintos en la solicitud PCT publicada WO 91/05545 y la Pat. de Estados Unidos N° 5.225.212 (ambas de Martin y col.) y en la solicitud PCT publicada WO 94/20073 (Zalipsky y col.). Se describen liposomas que comprenden lípidos de ceramida modificados con PEG en la solicitud PCT publicada WO 96/10391 (Choi y col.). La Pat. de Estados Unidos N° 5.540.935 (Miyazaki y col.) y 5.556.948 (Tagawa y col.) describen liposomas que contienen PEG que pueden modificarse sobre sus superficies con restos funcionales.

C. Liposomas que Contienen DMPG: Se han descrito diversos liposomas que comprenden dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG). Generalmente, sin embargo, dichos liposomas comprenden DMPG es un % en mol de aproximadamente el 10% o mayor (véase, por ejemplo, Akhtar y col. (Nucl. Acids Res., 1991, 19, 5551; Yachi y col. (Biopharm. Drug Dispos., 1996, 17, 699; y Farmer y col. (Meth. Enz., 1987, 149, 184). Se han descrito liposomas que tienen DMPG al

3% en mol, pero dichos liposomas incluían un componente (en particular, un derivado de fosfatidilcolina) que no se encuentra en las composiciones liposomales de la presente invención. Dichos componentes de derivados de fosfatidilcolina incluyen, por ejemplo, distearoilfosfatidilcolina al 10% en mol (DSPC) (Brodt y col., Cancer Immunol. Immunother., 1989, 28, 54) o dimiristoilfosfatidilcolina al 7% en mol (DMPC) (Perez-Soler y col., J. Nuclear Med., 1985, 26, 743; Wasan y col., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1993, 37, 246; y Li y col., Oncology Res., 1995, 7, 611).

La preparación de liposomas puede estar preparada recientemente o liofilizada para su almacenamiento a largo plazo. Ambas preparaciones pueden usarse con una eficacia comparable. Los liposomas usados en los procedimientos de la invención pueden ser todos el mismo (por ejemplo, mismas composiciones o mismo tamaño), o incluir más de un tipo de liposoma.

En ciertas realizaciones, pueden usarse liposomas disponibles en el mercado. Por ejemplo, los liposomas pueden prepararse por contratación de Northern Lipids Inc. (Vancouver, BC), una Organización de Investigación Contratada que se especializa en el desarrollo de formaciones de liposomas basadas en lípidos. En algunas otras realizaciones, pueden prepararse liposomas de diversos tamaños usando la metodología que se describe a continuación. Los liposomas resultantes, dependiendo de los protocolos de preparación específicos, tienen típicamente un tamaño de 4  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$  o 0,2  $\mu\text{m}$  pasando las preparaciones por un microfluidizador. En resumen, se prepararon liposomas a las siguientes concentraciones lipídicas: 7/3/0,5% en mol de fosfatidilcolina/colesterol/fosfato de dicetilo. Se incorpora un antígeno, tal como HBsAg a los liposomas multilaminares a varias concentraciones para el ensayo de la respuesta inmune. Se incorporó una media del 60% del HBsAg a los liposomas en los ejemplos que se indican a continuación. El tamaño de los liposomas también se midió con un Analizador del tamaño de partículas N4 MC Submicron (Coulter Electronics). Se muestra un perfil representativo de los liposomas con un tamaño de 4  $\mu\text{m}$  en la Figura 1. En un experimento, la proporción liposoma:proteína disminuyó a 1/2 y normalmente se uso 1/3 del contenido para encapsular 15  $\mu\text{g}$  de HBsAg. En ciertas realizaciones, las preparaciones de antígenos pueden liofilizarse para su almacenamiento y después reconstituirse antes de su uso. Tanto el tamaño como el potencial  $\zeta$  (zeta, una medida de carga) pueden medirse antes de su uso. El potencial  $\zeta$  se determinó usando un analizador de potencial  $\zeta$  Zeta-Puls (Brookhaven Instruments). La proporción lípido:antígeno puede variar en algunas preparaciones con el fin de determinar la importancia de esta proporción en las respuestas inmunes al antígeno específico (por ejemplo, HBsAg).

#### A. Procedimiento básico para liposomas con un intervalo de tamaño de 2-4 $\mu\text{m}$ .

Los liposomas de la invención objeto se prepararon a las siguientes concentraciones lipídicas: 7/3/0,5% en mol de fosfatidilcolina/colesterol/fosfato de dicetilo. El fosfato de dicetilo se disolvió en cloroformo más el 5% de etanol, se sonicó y después se añadieron la fosfatidilcolina y el colesterol. Los lípidos se secaron en un evaporador rotatorio Labconco durante una hora y se eliminaron las trazas de cloroformo por liofilización con un Sistema de Liofilizado Freezone 4.5 durante una noche. La película lipídica se hidrató con antígeno, tal como el antígeno de superficie de Hepatitis B (HBsAg), a una concentración de 125-300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en tampón HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 (HBS) y se filtró con 0,2  $\mu\text{m}$  de filtro de nylon. La mezcla se agitó vorticialmente a fondo y se dejó en reposo durante 1 hora, y después se agitó vorticialmente de nuevo para garantizar la formación de vesículas multilamelares. Después, los liposomas se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación (1 ciclo = congelación durante una hora y descongelación durante una hora a temperatura ambiente). El tamaño de los liposomas se midió con un Analizador del Tamaño de Partículas N4 MD Submicron (Coulter Electronics). El potencial  $\zeta$  se midió usando un analizador de potencial  $\zeta$  Zeta-Puls (Brookhaven Instruments) en tampón HEPES 5 mM HEPES, NaCl 1,0 mM, pH 7,4.

#### B. Liposomas con un tamaño de 1,0 $\mu\text{m}$

Los liposomas de la invención objeto se prepararon a las siguientes concentraciones lipídicas: 7/3/0,5% en mol de fosfatidilcolina/colesterol/fosfato de dicetilo. El fosfato de dicetilo se disolvió en cloroformo más el 5% de etanol, se sonicó y después se añadieron la fosfatidilcolina y el colesterol. Los lípidos se secaron en un evaporador rotatorio Labconco durante una hora y se eliminaron las trazas de cloroformo por liofilización con un Sistema de Liofilizado Freezone 4.5 durante una noche. La película lipídica se hidrató con antígeno (por ejemplo, HBsAg) a una concentración de 125-300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en tampón HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 y se filtró con 0,2  $\mu\text{m}$  de filtro de nylon. La mezcla se agitó vorticialmente a fondo y se dejó en reposo durante 1 hora, y después se agitó vorticialmente de nuevo para garantizar la formación de vesículas multilamelares. Después, los liposomas se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación (1 ciclo = congelación durante una hora y descongelación durante una hora a temperatura ambiente). Después del tercer ciclo, los liposomas se calentaron en un baño de agua a 50  $^{\circ}\text{C}$  y se extruyeron a través de un filtro de policarbonato con un tamaño de poro de 1,0  $\mu\text{m}$  usando una microextrusora portátil Avanti. El tamaño de los liposomas se midió como antes.

#### C. Liposomas con un tamaño de 0,2 $\mu\text{m}$

Los liposomas de la invención objeto se prepararon a las siguientes concentraciones lipídicas: 7/3/0,5% en mol de fosfatidilcolina/colesterol/fosfato de dicetilo. El fosfato de dicetilo se disolvió en cloroformo más el 5% de etanol, se

sonicó y después se añadieron la fosfatidilcolina y el colesterol. Los lípidos se secaron en un evaporador rotatorio Labconco durante una hora y se eliminaron las trazas de cloroformo por liofilización con un Sistema de Liofilizado Freezone 4.5 durante una noche. La película lipídica se hidrató con antígeno (por ejemplo, HBsAg) a una concentración de 125-300 µg/ml en tampón HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 y se filtró con 0,2 µm de filtro de nylon. La mezcla se agitó vorticialmente a fondo y se dejó en reposo durante 1 hora, y después se agitó vorticialmente de nuevo para garantizar la formación de vesículas multilamelares. Después, los liposomas se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación (1 ciclo = congelación durante una hora y descongelación durante una hora a temperatura ambiente). Después del tercer ciclo, los liposomas se calentaron en un baño de agua a 50 °C y se extruyeron a través de un filtro de policarbonato con un tamaño de poro de 1,0 µm, después con un tamaño de poro de 0,4 µm y finalmente 0,2 µm usando una microextrusora portátil Avanti. Después, el tamaño de los liposomas se midió como se ha indicado previamente.

#### D. Preparación de liposomas liofilizados.

Los liposomas de la invención objeto se prepararon a las siguientes concentraciones lipídicas: 7/3/0,5% en mol de fosfatidilcolina/colesterol/fosfato de dicetilo. El fosfato de dicetilo se disolvió en cloroformo más el 5% de etanol, se sonicó y después se añadieron la fosfatidilcolina y el colesterol. Los lípidos se secaron en un evaporador rotatorio Labconco durante una hora y se eliminaron las trazas de cloroformo por liofilización con un Sistema de Liofilizado Freezone 4.5 durante una noche. La película lipídica se hidrató con antígeno (por ejemplo, HBsAg) a una concentración de 125-300 µg/ml en HBS con 100 mg/ml de maltosa, y se filtró con 0,2 µm de filtro de nylon. La mezcla se agitó vorticialmente a fondo y se dejó en reposo durante 1 hora, y después se agitó vorticialmente de nuevo para garantizar la formación de vesículas multilamelares. Después, los liposomas se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación (1 ciclo = congelación durante una hora y descongelación durante una hora a temperatura ambiente). El tamaño de los liposomas se midió y los liposomas se liofilizaron con un Sistema de Liofilización Freezone 4.5 durante una noche. Los liposomas liofilizados se reconstituyeron por agitación vorticial con una cantidad correspondiente de agua para alcanzar la concentración de antígenos necesaria.

#### VII. Ensayos

Los siguientes ensayos pueden ser necesarios para realizar ciertas etapas de la invención.

En general, como sabe un experto, pueden usarse muchos ensayos diferentes pero funcionalmente equivalentes para lograr el mismo propósito. Por lo tanto, ninguno de los ensayos descritos específicamente es limitante a menos que se indique explícitamente.

#### A. Ensayos Inmunoabsorbentes Ligados a Enzimas (ELISA)

Las respuestas de anticuerpos específicos de anti-HBsAg, tales como Ig, IgG, IgA, IgG1 e IgG2a en las muestras recogidas de los ratones inmunizados se ensayaron por ELISA. Se diseñó un ELISA de tres capas (anticuerpo que detecta antígeno-muestras de ensayo o HRP conjugado de estándares de Ig) para ensayar anticuerpos Ig, IgG, IgG1 e IgG2a. Se recubrieron 50 µl de 10 µg/ml de HBsAg puro (Advanced Immune Chemical) en placas de ELISA de 96 pocillos. Se añadieron diluciones seriadas de muestras en suero o secretoras después del procedimiento de bloqueo. Se usaron Cabra anti Ig(H+L) de ratón-HRP, cabra anti IgG de ratón-HRP, cabra anti IgG1 de ratón-HRP y cabra anti IgG2a de ratón-HRP (SouthernBiotech) como anticuerpos de detección para el ensayo de Ig, IgG, IgG1 e IgG2a específica de anti-HBsAg, respectivamente en muestras. Se usaron estándares de IgG, IgG1 e IgG2a diluidos en serie para generar curvas convencionales para ELISA de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2a, respectivamente. Se usaron ELISA de captura de cinco capas para ensayar muestras mucosales para ratón IgA y ratón IgG. Se recubrieron 50 µl de un anticuerpo de captura de 4 µg/ml de rata anti IgA de ratón en placas de ELISA para capturar anticuerpo IgA de sitios en suero o mucosales (fecal, vaginal, lavado pulmonar y saliva). Se añadieron 100 µl de 2 µg/ml de HBsAg purificado para la unión al anticuerpo IgA específico de anti-HBsAg. Se usó un anti-HBsAg de cabra para unir específicamente el HBsAg capturado en la etapa previa. Burro anti IgA de cabra-HRP fue el anticuerpo de detección final antes del desarrollo del color del sustrato-TMB. Para la detección de IgG mucosal se usó un anticuerpo rata anti IgG de ratón como un anticuerpo de captura, seguido de HBsAg, anti-HBsAg de cabra, y burro anti IgG de cabra-HRP a las mismas concentraciones que se usaron en el ELISA de IgA.

#### B. Medición de las avides de los anticuerpos de IgG

La avides de los anticuerpos IgG específicos de HBsAg se evalúa usando ensayos de avides de ELISA cuantitativos. Los ensayos se realizaron usando condiciones optimizadas para los anticuerpos IgG, con la adición de la adición del reactivo caotrópico de urea para interrumpir las interacciones antígeno-anticuerpo. Para asegurar resultados consistentes y precisos, la cantidad relativa de IgG en las diluciones de muestra analizadas se encuentra entre 100-150 ng/ml, que está dentro de la porción lineal y cuantitativa de la curva estándar. Las muestras diluidas se incuban en primer lugar en placas de ELISA recubiertas con HBsAg durante 1 hora a temperatura ambiente para permitir que se produzca la unión antígeno-anticuerpo. Los pocillos se lavaron y posteriormente se incubaron con tampón ELISA convencional (PBS con Tween-20 al 0,05% y albúmina de suero bovino al 1%), o con concentraciones variables de

urea en tampón ELISA durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de los lavados adicionales, el ELISA se realizó como normalmente. Los índices de avidéz (AI) se calculan de acuerdo con la siguiente fórmula: ng/ml de IgG en ausencia de urea/ng/ml de IgG en presencia de urea.

#### 5 **C. Detección de células secretoras de IFN- $\gamma$ e IL-10 mediante ensayos ELISPOT (Ensayo de PUNTOS por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)**

Se cultivaron *in vivo* células esplénicas o de sangre periférica de ratones inmunizados y sin tratar para la medición de células secretoras de IFN- $\gamma$  e IL-10 mediante ensayos ELISPOT. Los ensayos ELISPOT se establecieron usando pares de anticuerpos y reactivos disponibles en el mercado (BD Pharmingen) y placas de ELISPOT multipocillo Multiscreen-IP (Millipore, Hopkington, MA). Se estimularon cultivos *in vitro* con péptido de HBsAg a una concentración de 10  $\mu$ g/2,5 x 10<sup>6</sup> células por ml durante 20-22 horas. Los cultivos sin péptido se usaron como controles negativos, y los cultivos estimulados con anti-CD3 o Con A se usaron como controles positivos. Las placas de ELISPOT de IFN- $\gamma$  e IL-10 de este estudio se analizaron cuantitativamente por Cellular Technology Ltd. (Cleveland, OH) para analizar tanto frecuencias de puntos como el tamaño de los puntos usando un lector de placas digital y software diseñado para este fin.

#### D. Ensayos de citotoxicidad de CTL *in vivo*

Se han descrito recientemente ensayos de CTL *in vivo* en la bibliografía (referencias: Estcourt, M. J. y col. 2002. Int. Immunol. 14(1): 31-37; Barber, D. L. y col. 2003. J. Immunol. 171: 27-31; Kumaraguru, U. y col. 2004. J. Immunol. 172: 3719-3724) para medir la actividad de CTL en animales inmunizados. El ensayo de CTL *in vivo* usa ratones que han recibido dos rondas de una vacuna de ADN de HBsAg IM seguido de la preparación de liposomas objeto IN (por ejemplo, liposoma de HBsAg). Después de que se complete la recogida de muestra para la medición de las respuestas de anticuerpos (seis semanas o más después del refuerzo IN), los ratones reciben un refuerzo de ADN para movilizar los linfocitos T de memoria a las células efectoras activadas. 7-12 días después, la actividad de las células efectoras se cuantifica determinando su capacidad para destruir específicamente dianas pulsadas con péptidos de HBsAg que se transfieren adoptivamente por vía intravenosa al ratón. Los ratones reciben dos poblaciones de células de ratones sin tratar que están marcados de forma diferente con tinte CFSE intravital (emisión fluorescente en el canal FITC): células CFSE<sup>bajo</sup> que no están pulsadas con péptido, y células CFSE<sup>alto</sup> que están pulsadas con el péptido inmunodominante L (d)-restringido de HBsAg (28-39 de HBsAg). La desaparición de la población CFSE<sup>alto</sup> pulsada con péptido con respecto a la población CFSE<sup>bajo</sup> sin pulsar es la medida de la destrucción específica de péptidos de acuerdo con la fórmula que se muestra a continuación. Los porcentajes de estas dos poblaciones en las cohortes de los receptores sin tratar sirven como control interno para el injerto celular. A continuación, se muestra un resumen de este ensayo.

---

#### Preparación de células diana:

Esplenocitos sin tratar: Marca con CFSE<sup>bajo</sup>. Pulsados sin péptido. Verificar marcado por citometría de flujo.

Esplenocitos sin tratar: Marca con CFSE<sup>alto</sup>. Pulsados con péptido. Verificar marcado por citometría de flujo.

Mezcla de números iguales de células CFSE<sup>bajo</sup> y CFSE<sup>alto</sup> (1-1,5 x 10<sup>7</sup> células de cada uno).

#### Ensayo de CTL *in vivo*:

Transferir células a cohortes de ratones tanto inmunizados como no tratados por vía intravenosa.

20-24 horas más tarde, cosechar bazos y procesar por citometría de flujo y ensayos ELISPOT.

Proporción = Porcentaje de células CFSE<sup>bajo</sup>:células CFSE<sup>alto</sup>

$$\% \text{ de Lisis Específica} = 1 - \frac{\text{proporción en ratones sin tratar}}{\text{proporción en ratones inmunizados}} \times 100$$


---

#### Medición de la inmunidad mucosal protectora tras la exposición intranasal al virus vaccinia vivo recombinante que expresa HBsAg (VV-HBsAg)

El virus de la hepatitis B es altamente específico de la especie y sólo infecta a seres humanos y algunos primates no humanos. Para evitar este problema, el virus recombinante que expresa HBsAg se usó para la exposición al virus vivo en ratones para probar la eficacia protectora de los protocolos de vacunación contra el VHB. Se usó un vector del virus vaccinia atenuado creado por ingeniería genética que expresaba el antígeno HBsAg (VV-HBsAg) para su exposición a los ratones, amablemente proporcionado por el Dr. Bernard Moss, Laboratory of Viral Diseases, NIAID, NIH (Smith, Mackett y Moss. 1983. Nature 302: 490-495). La viabilidad y la utilidad de usar el virus vaccinia recombinante que expresa antígenos de patógenos para la exposición al virus se ha demostrado recientemente en ratones en varios modelos de virus de enfermedades, incluyendo hepatitis C y el VIH (Pancholi, P. y col. 2004. J.

Virol. 77(1): 382-90; Marata, K. y col. 2003. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(11); Belyakov, IM y col. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci USA 95(4): 1709-14).

Los ratones sin tratar o inmunizados se infectaron por vía intranasal con  $2 \times 10^5$  PFU de virus en un volumen de 50  $\mu$ l. Los ratones se sacrificaron después de 5 días, y se determinaron las titulaciones virales en homogenados de pulmón. Los lavados pulmonares y las células esplénicas también se evaluaron para evaluar la presencia de CTL, definidos por un fenotipo  $CD8^+ IFN\gamma^+$ .

#### F. Detección de CTL mediante el fenotipo $CD8^+ IFN\gamma^+$ tras la exposición intranasal con VV-HBsAg vivo

Los CTL pueden definirse por un fenotipo de superficie  $CD8^+$  de  $IFN\gamma^+$  intracelular de acuerdo con protocolos bien reconocidos y normalizados (por ejemplo, véase reactivos y kits ofrecidos por BD Biosciences, San Diego, CA). Usando estos reactivos, la frecuencia de los CTL definidos por el fenotipo se determinó mediante análisis de citometría de flujo. Para ello, las células mononucleares recuperadas del pulmón y el bazo se activaron con el péptido de HBsAg de CTL (28-39 de HBsAg) durante cinco horas *in vitro*, en presencia de un inhibidor golgi para evitar la secreción de citocinas intracelulares acumuladas. Después, se tintó la superficie de las células para  $CD8$ , se permeabilizaron y se tintaron para el  $IFN\gamma$  intracelular de acuerdo con las directrices del fabricante.

#### VIII. Ejemplos

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

En los siguientes ejemplos, el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) se seleccionó como un antígeno ilustrativo para las vacunas basadas en liposomas en cuestión. La infección por Hepatitis B es un riesgo significativo para la salud y es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Se sabe que la respuesta de los anticuerpos frente al HBsAg confiere protección contra la infección por el virus vivo en el 5-10% de los seres humanos. El HBsAg es un antígeno bien caracterizado que contiene numerosos epítopes de linfocitos T y B que lo hacen un antígeno modelo adecuado para demostrar las respuestas inmunes en ratones. Además, la proteína recombinante del virus de la hepatitis B y las construcciones de expresión génica también están disponibles en el mercado, eliminando el requisito de desarrollar costosos reactivos. Sin embargo, no debe interpretarse que la invención está limitada a la vacuna del HBsAg. Por el contrario, la presente invención tiene muchas aplicaciones en una amplia gama de patógenos, incluyendo diversos virus y bacterias.

#### EJEMPLO 1: Efecto del Protocolo de Inmunización Primario y Secundario sobre las Respuestas de Anticuerpos

Para inmunizar un animal huésped, tal como ratones CD1 o Balb/c, la inmunización primaria que usa la preparación de liposoma de HBsAg en cuestión se administró al animal en la semana 0. En la semana 6, se administró la inmunización de refuerzo secundaria de liposoma de HBsAg.

Para optimizar la plataforma de administración de la vacuna, se realizaron varios experimentos usando diferentes estrategias de inmunización, como se describe en los Ejemplos 1-5. En esta serie de experimentos, los liposomas tenían un tamaño de 4  $\mu$ m, un tamaño que se indicó que era eficaz en la estimulación de respuestas inmunes a antígenos proteicos. Los experimentos iniciales se ensayaron con los siguientes parámetros: el efecto de una (primaria, semana 0) frente a dos (primaria y secundaria, semanas 0 y 6) rondas de inmunización (Ejemplo 1), cinética de la respuesta de anticuerpos (Ejemplo 2), dosis de las preparaciones de liposoma de HBsAg (Ejemplo 3; 3  $\mu$ g o 15  $\mu$ g/ratón), vía de administración (Ejemplo 4; intranasal o intramuscular), y forma física de la vacuna (Ejemplo 5; fresca o liofilizada). Las muestras se recogieron en los momentos indicados para el análisis de respuestas inmunes humorales y mucosales.

Los controles negativos incluyeron ratones sin tratar, liposomas en solitario y proteína de HBsAg en solitario. Los animales también se inmunizaron con 3  $\mu$ g de vacuna por vía intramuscular de GSK (Engerix™-B de GSK Biologicals, o "HBsAg de GSK") como control positivo. Tanto los ratones CD1 no consanguíneos genéticamente heterogéneos (N = 225 a 5/grupo) como en ratones endogámicos con tendencia a Th2 (N = 50 a 5/grupo) se inmunizaron con fines comparativos. Los ratones CD1 son una cepa no consanguínea (es decir, genéticamente heterogénea) y por lo tanto, son representativos de la diversa genética que se encuentra en los seres humanos.

Por ejemplo, en una serie de experimentos, se inmunizaron 10 ratones en la semana 0 por el antígeno primario. En la semana 6, se administró una dosis de refuerzo a 5 de los 10 ratones. Las muestras se recogieron (por ejemplo, de sangre, heces y lavados vaginales) en las semanas 2, 4, 6, 8 y 12 para la determinación de anticuerpos por ELISA.

Los ejemplos a continuación muestran datos representativos de estos estudios para demostrar las condiciones óptimas para la vacunación con los liposomas de HBsAg en cuestión. La respuesta inmune humoral a las diferentes vacunas se midió mediante la determinación de respuestas de anticuerpos en suero específicos de HBsAg totales

usando ensayos ELISA que se desarrollaron (anteriormente). A pesar de que se analizaron las muestras tomadas a las 2, 4, 6, 8 y 12 semanas después del cebado, sólo se muestran las respuestas a las ocho semanas después de la primera inmunización para la mayoría de los ejemplos.

5 La mayoría de los gráficos incluyen respuestas a la vacuna de HBsAg de GSK disponible en el mercado como un control positivo, y sirven como un punto de referencia que se quiere lograr para las vacunas de prueba. No se detectaron respuestas específicas de HBsAg en ningún ratón sin tratar (datos no mostrados). Los símbolos cerrados identifican las respuestas de los ratones que recibieron una inmunización, mientras que los símbolos cerrados con sombreado en cruz (+) muestran las respuestas de los ratones que recibieron tanto una inmunización primaria como una inmunización secundaria. Los resultados se presentan como la dilución de la muestra ensayada (eje x) frente a la densidad óptica a 450 nm en los ensayos de ELISA para anticuerpos en suero totales específicos de HBsAg (eje y). Los resultados de ELISA expresados como unidades arbitrarias se leyeron a 450 nm ( $DO_{450}$ ).

10 Para mayor claridad, la mayor parte de los datos aquí presentados son promedios de las muestras combinadas de 5-10 ratones por experimento (cantidades iguales de muestras individuales de los grupos de ratones). La Figura 2 es representativa del grado de variación que se observa entre los ratones CD1 y los ratones Balb/c individuales de un experimento.

20 En las Figuras 2-8, se muestra que en todas las condiciones examinadas, con la excepción de una dosis de 3  $\mu$ g de liposoma de HBsAg administrado por vía intranasal (Figura 4), una inmunización secundaria mejoró considerablemente las respuestas de anticuerpos en suero específicas de HBsAg para tanto los liposomas de HBsAg como para la vacuna de control de HBsAg de GSK. Por lo tanto, los liposomas son un adyuvante muy eficaz y un vehículo de administración para el antígeno HBsAg y las respuestas de anticuerpos se aumentan sustancialmente después de una segunda inmunización secundaria de refuerzo idéntica.

### 25 **EJEMPLO 2: Cinética de las Respuestas de Anticuerpos en Ratones CD1 después de la Inmunización Intranasal (IN) con HBsAg encapsulado en liposomas (liposomas de HBsAg)**

30 La Figura 3 ilustra la titulación en suero de anticuerpos específicos de HBsAg después de la inmunización de ratones CD1 por vía intranasal con 15  $\mu$ g de liposoma de HBsAg. Se observó un refuerzo significativo en la titulación de un anticuerpo específico de HBsAg si se usó una segunda administración de refuerzo de la misma preparación de Ag. Sin embargo, sin una administración de refuerzo la titulación alcanzó su pico a las 4 semanas después de la inmunización inicial, y se mantuvo en niveles similares hasta la semana 8. Además, 15  $\mu$ g de liposoma de HBsAg son al menos tan eficaces como la vacuna de GSK disponible en el mercado en dosificaciones de 3  $\mu$ g.

### 35 **EJEMPLO 3: Respuesta a la Dosis de Liposomas de HBsAg**

40 Los ratones CD1 se inmunizaron, con o sin una segunda administración de refuerzo, con 3  $\mu$ g o 15  $\mu$ g de HBsAg encapsulado en la preparación de liposomas. La Figura 4 muestra que 15  $\mu$ g de liposomas de HBsAg eran al menos tan eficaces como la vacuna de GSK disponible en el mercado (3  $\mu$ g). Sin embargo, 3  $\mu$ g del HBsAg en la misma preparación de liposomas era significativamente menos eficaz, y una segunda administración de refuerzo no parece dar como resultado un aumento significativo en la titulación.

### 45 **EJEMPLO 4: Vías de Administración de Liposomas de HBsAg**

50 Para probar el efecto de las vías de administración, se inmunizaron ratones CD1 y ratones Balb/c con la misma preparación de liposomas de HBsAg que se ha descrito anteriormente, a través de administración intranasal (IN) o intramuscular (IM). Las titulaciones de anticuerpos se midieron 8 semanas después de la inmunización (inicial). Tanto en los ratones CD1 como Balb/c, tanto por administración IN como IM de 15  $\mu$ g de liposomas de HBsAg, con o sin un segundo refuerzo, eran al menos tan eficaces como 3  $\mu$ g de la vacuna de GSK (Figuras 5 y 6).

### 55 **EJEMPLO 5: Efectos de las Preparaciones Frescas o Liofilizadas de Liposomas de HBsAg sobre las Respuestas de Anticuerpos**

60 Para probar si la preparación de liposomas de HBsAg tiene que usarse en forma fresca o liofilizada, se inmunizaron ratones CD1 con preparaciones de liposomas frescos o liofilizados, por vía de administración intranasal o intramuscular. Todas las titulaciones de Ig en suero se midieron 8 semanas después de la inmunización inicial.

65 La administración intranasal de liposoma de HBsAg era al menos tan eficaz como los 3  $\mu$ g de la vacuna de control de GSK si la preparación de liposomas era fresca (Figura 7). Se observaron niveles comparables de titulaciones entre la vacuna de GSK y la preparación fresca de liposomas de HBsAg, con o sin refuerzo. Los liposomas de HBsAg liofilizados eran ligeramente menos eficaces que la preparación fresca en este experimento. Sin embargo, en otro experimento por separado, la preparación de liposomas de HBsAg liofilizados era ligeramente mejor que la contraparte fresca (datos no mostrados).

Se obtuvo un resultado similar con la administración IM (Figura 8). Tanto la preparación de liposomas de HBsAg fresca como liofilizada tenían titulaciones finales similares en comparación entre sí, y para el control positivo de GSK.

5 Estos resultados indican que las preparaciones liofilizadas reconstituidas de liposomas de HBsAg eran generalmente tan eficaces como las preparaciones frescas cuando se administran por vía IN o IM. La eficacia de los preparados liofilizados simplificará la distribución y el almacenamiento de las formulaciones de vacunas futuras.

**EJEMPLO 6: El Efecto del Tamaño de los Liposomas sobre las Respuestas de Anticuerpos a Liposomas de HBsAg**

10 El efecto del tamaño de los liposomas se evaluó encapsulando HBsAg (15 µg/ratón) en liposomas con un tamaño de 4 µm, 1 µm y 0,2 µm. Los ensayos de ELISA cuantitativos se usaron para medir los niveles de IgG en suero específicos de HBsAg después de la inmunización intranasal con liposomas de un solo tamaño o después de la inmunización intranasal con una mezcla a partes iguales de los tres tamaños. Es posible que una mezcla de liposomas de diferentes tamaños pueda ser más inmunogénica que un solo tamaño de liposomas. Las cantidades totales de HBsAg y de los lípidos fueron las mismas en los cuatro grupos.

15 La Figura 9 muestra que los liposomas de tamaño de 1 µm y 4 µm eran los más eficaces, mientras que los liposomas menores de 0,2 µm son menos eficaces en la generación de IgG en suero específica de HBsAg. Una mezcla de partes iguales de los tres tamaños generó un aditivo, pero no una respuesta sinérgica. La respuesta predicha, si los efectos de los tres tamaños de los liposomas combinados son aditivos, se muestra en la Figura 9 en forma de una barra vertical.

**EJEMPLO 7: El Efecto de la Proporción de Liposoma con respecto a Proteína sobre Respuestas de Anticuerpos a Liposomas de HBsAg**

25 Se determinó la importancia de las proporciones de liposoma con respecto a proteína en la generación de anticuerpos de IgG en suero específicos de HBsAg por la inmunización de ratones por vía intranasal con liposomas de HBsAg (15 µg/ratón, cebado en la semana 0 y reforzado en la semana 6) en el contenido convencional de liposomas, o a 1/2 y 1/3 de la concentración de liposomas. La reducción de la proporción de liposomas con respecto a HBsAg por 1/2 y 1/3 redujo las respuestas de IgG en suero de manera desproporcionada al 35% y el 2% de la respuesta obtenida de la preparación de liposomas convencional, respectivamente (n = 8 animales por grupo; la IgG en suero se midió en combinaciones de suero de cada grupo dos semanas después del refuerzo). Por lo tanto, la cantidad de liposoma usado para encapsular el HBsAg tiene un efecto significativo para la generación de altos niveles de respuestas de anticuerpos en suero específicos de HBsAg.

**EJEMPLO 8: Caracterización de Respuestas de Th Polarizadas Tras los Protocolos de Inmunización Homóloga**

40 Las citocinas son los mensajes hormonales responsables de la mayor parte de los efectos biológicos en el sistema inmune, tales como inmunidad mediada por células y respuestas de tipo alérgico. A pesar de que son numerosas, las citocinas pueden dividirse funcionalmente en dos grupos: las que son pro-inflamatorias y los que son básicamente anti-inflamatorias, pero que promueven respuestas alérgicas.

45 Los linfocitos T son una fuente principal de citocinas. Estas células tienen receptores específicos de antígenos en su superficie celular para permitir el reconocimiento de patógenos extraños. También pueden reconocer los tejidos normales durante episodios de enfermedades autoinmunes. Existen dos subconjuntos de linfocitos T, que se distinguen por la presencia de moléculas de superficie celular conocidas como CD4 y CD8. Los linfocitos T que expresan CD4 son también conocidos como linfocitos T ayudantes, y estos son considerados como los productores de citocinas más prolíficos. Este subconjunto puede subdividirse en Th1 y Th2, y las citocinas que producen son conocidas como citocinas de tipo Th1 y citocinas de tipo Th2.

50 Las citocinas de tipo Th1 tienden a producir las respuestas pro-inflamatorias responsables de la destrucción de parásitos intracelulares y de perpetuar las respuestas autoinmunes. El interferón gamma (IFN-γ) y la interleucina 12 (IL-12) son las citocinas de Th1 principales. La actividad CTL también es alta en una respuesta inmune de tipo Th1. Por el contrario, las citocinas de tipo Th2 incluyen interleucinas 4, 5 y 13, que se asocian con la promoción de la IgE y las respuestas de eosinófilos en la atopía, y también la interleucina 10 (IL-10), que cuenta con más de una respuesta anti-inflamatoria. La respuesta de Th2 proporciona ayuda para la maduración de linfocitos B a células secretoras de inmunoglobulina, activando principalmente de esta manera los mecanismos de defensa humoral. La actividad CTL es generalmente baja en una respuesta inmune de tipo Th2. En exceso, las respuestas de Th2 también contrarrestan la acción microbicida mediada por Th1.

55 En general, el escenario óptimo parece ser que los seres humanos deben producir una respuesta bien equilibrada de Th1 y Th2, adecuada para la estimulación inmune. Sin embargo, en realidad, es fundamental para el concepto de la generación de subconjunto de Th1 y Th2 la tendencia de estas respuestas a polarizarse. Por lo tanto, un perfil de

producción de citocinas de Th1 o Th2 a menudo dominará durante una respuesta inmune amplificando preferentemente un subconjunto de Th y disminuyendo la respuesta contraria. Esta respuesta polarizada parece ser fundamental para la defensa del huésped frente a muchos organismos patógenos. La resistencia a patógenos intracelulares (tales como virus) a menudo requiere una respuesta predominantemente de Th1, mientras que las respuestas de Th2 típicamente son necesarias para combatir los parásitos extracelulares. Por lo tanto, las citocinas obtenidas de linfocitos T producidas por el huésped en respuesta a un agente infeccioso determinan las consecuencias de la infección en muchos modelos de enfermedades infecciosas.

Mientras que una respuesta de Th1 pro-inflamatoria suele ser necesaria para controlar las infecciones intracelulares, también hay una necesidad de equilibrar la respuesta (Taylor-Robinson, *Int J Parasitol.* 28(1): 135-48, 1998). Es importante producir una respuesta de tipo 1 lo suficientemente potente para mantener la infección intracelular bajo control, produciendo al mismo tiempo una respuesta de tipo 2 o inmunosupresora suficiente para evitar que la respuesta protectora cause daños al huésped. Los datos disponibles sugieren que el IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-10 cooperan para mantener la respuesta de Th2 en jaque. Por lo tanto, un resultado positivo después de una infección requiere la valoración precisa de las respuestas de Th1 y Th2, apropiadas para el tipo de infección. Esto no es sólo en términos de cantidad, sino también dónde, cuándo y por cuánto tiempo se producen estas respuestas.

Se han propuestos varios factores, incluyendo las propiedades de los antígenos, la dosis de antígeno, lugar de exposición y la respuesta inmune en curso en el huésped, para impulsar una respuesta de linfocitos T hacia un fenotipo predominantemente de Th1 o Th2. Las respuestas de los linfocitos T colaboradores a antígenos pueden caracterizarse como polarizadas o mixtas. Las respuestas de linfocitos Th polarizados se obtienen a partir de una tendencia de la población de linfocitos Th específicos de antígenos a un perfil de citocinas de Th1 o Th2, y se reflejan por las proporciones de IgG1:IgG2a específicas de antígenos de <0,5 y > 2,0, respectivamente. Las respuestas de linfocitos Th mixtos pueden contener ambas poblaciones de linfocitos T, y se reflejan por las proporciones de IgG1:IgG2a específicas de antígenos entre 0,5 y 2,0. Véase la Tabla B que se indica a continuación.

Tabla B. Características de Respuestas de Th1 y Th2 Polarizadas

Respuesta Inmune	Tipo 1 (Th1)	Tipo 2 (Th2)
Inmunidad Humoral	Proporción de IgG1:IgG2a <0,5	Proporción de IgG1:IgG2a >2,0
Secreción de Citocinas	↑ IFN- $\gamma$ , IL-12; ↓ IL-4, IL-10	↑ IL-4, IL-10; ↓ IFN- $\gamma$ ,
Actividad CTL	Alta	Baja

La naturaleza de las respuestas inmunes a las formulaciones de vacunas de HBsAg se evaluaron determinando las proporciones de IgG1:IgG2a en el suero de ratones CD1 y Balb/c 8 semanas después de la inmunización primaria. Se diseñaron ensayos de ELISA cuantitativos para medir anticuerpos de IgG1 e IgG2a específicos para HBsAg. Las Figuras 10 y 11 muestran las proporciones de IgG1:IgG2a en el suero de ratones CD1 (Figura 10) y Balb/c (Figura 11) inmunizados por una vacuna de HBsAg de GSK disponible en el mercado, una vacuna de HBsAg de ADN y una vacuna de liposomas de HBsAg administrada por vía intranasal o por vía intramuscular. Dos líneas verticales en 0,5 y en 2,0 en cada panel demarcan tres patrones diferentes de respuesta de anticuerpo (Th1, mixta o neutra, o Th2) en las regiones de izquierda a derecha.

De acuerdo con los resultados publicados, la vacuna de HBsAg disponible en el mercado preferentemente generó una respuesta inmune de tipo Th2, tanto en cepas de ratones CD1 mestizos como en cepas de ratones Balb/c endogámicos. Como era de esperar, la vacuna de HBsAg de ADN generó una respuesta inmune de tipo Th1 en ambas cepas. La administración de liposomas de HBsAg por vía intranasal generó una respuesta mixta en ratones CD1 y una respuesta que tiende a Th2 en ratones Balb/c. En contraste, la administración de liposomas de HBsAg por vía intramuscular generó una respuesta inmune neutra en ambas cepas de ratones.

La vacuna de GSK era la formulación humana basada en alumbre diseñada para la administración por vía intramuscular (Engerix™-B de GSK Biologicals, subtipo adw). La vacuna de HBsAg de ADN era un ADN plasmídico (pRc/CMV-HBs(S) y se adquirió en una fuente comercial (Aldebron, Fargo, ND). El plásmido expresa el antígeno de superficie de hepatitis B pequeño bajo el control del promotor inmediato-temprano del CMV. (Referencia: Davis, H.L., M. L. Michel y R. G. Whalen. DNA-based immunization for Hepatitis B induces continuous secretion of antigen and high levels of circulating antibody. *Human Molecular Genetics* 2: 1847-1851. 1993).

**EJEMPLO 9: Respuestas de IgA Únicas Tras la Administración Intranasal de Liposomas de HBsAg**

A partir de finales de 1960, se reconoció la inmunidad mucosal como una defensa importante frente a virus respiratorios cuando se mostró la correlación con protección frente a virus respiratorios en los seres humanos. Al mismo tiempo, se descubrió que la clase IgA de anticuerpos era especialmente frecuente en el tracto respiratorio y en otras superficies mucosas y que era la mediadora de la inmunidad mucosal. Otros estudios han confirmado que la

inmunidad mucosal podría estimularse idealmente al desarrollar la protección frente a la infección a través de la vacunación a nivel local.

5 Tanto los anticuerpos IgG como IgA parecen ser bastante específicos de la cepa. Con la infección natural por virus respiratorios, tales como el virus de la gripe, puede producirse tanto una respuesta inmune humoral como una respuesta inmune sistémica. El nivel de anticuerpos anti-virales en el suero también se correlaciona con la protección.

10 Uno aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para provocar respuestas inmunes mucosales administrando HBsAg en liposomas directamente a los sitios mucosales. Un ensayo ELISA de tipo sándwich específico de IgA se diseñó para medir la IgA específica de HBsAg en el suero y de los sitios mucosales. Se ensayó suero, heces y lavados vaginales de todos los grupos experimentales que se han analizado anteriormente y algunas muestras de saliva para IgA. Los criterios de valoración de las titulaciones se establecieron para cada combinación de muestra (N = 4-5 ratones por grupo) por dilución seriada de muestras de ensayo. Los criterios de valoración de las titulaciones se definieron como una DO a 450 nm en el ensayo ELISA de IgA de más de dos veces el valor observado en las muestras de ratones de la misma cepa sin tratar no inmunizados en la misma dilución de la muestra.

20 Las únicas muestras que mostraron respuestas de IgA detectable fueron de los ratones que recibieron la vacuna de liposomas de HBsAg por vía intranasal. La Tabla C resume los resultados de las muestras que dieron positivo en el ensayo ELISA de IgA específica de HBsAg. Las respuestas de IgA se detectaron en el suero y en la mayor parte de las muestras obtenidas de sitios mucosales después de sólo una inmunización. El refuerzo con una inmunización secundaria aumentó adicionalmente los niveles de IgA en la mayoría de las muestras. Adicionalmente, la inmunización local por vía intranasal generó respuestas de IgA secretora en todos los sitios mucosales remotos muestreados, incluyendo gránulos fecales, lavados vaginales y saliva (datos no mostrados para la saliva, debido al número limitado de muestras). Estos resultados demuestran que la inmunización con liposomas de HBsAg por una vía (intranasal) generó inmunidad de IgA mucosal específica de HBsAg en todos los sitios mucosales muestreados. La vacuna de liposomas de HBsAg, a diferencia de la proteína de HBsAg o los liposomas solos, potencia las titulaciones de Ig inunes en suero y también induce tanto respuestas de IgA en suero como secretoras cuando se administra por vía intranasal.

30 Ninguno de los demás inmunógenos produce respuestas de IgA detectable (resultados no mostrados).

Tabla C: Resumen de respuestas de IgA en ratones inmunizados con liposomas de HBsAg

Inmunización	Cepa	IgA en suero	IgA fecal	IgA vaginal	IgA salival
Liposoma de HBsAg IN (1 x)	CD1	Medio	Negativo	ND§	NA¶
Liposoma de HBsAg IN (2 x)	CD1	Medio	Bajo	ND§	Alto
Liposoma de HBsAg IN (1 x)	Balb/c	Bajo	Bajo	Medio	NA¶
Liposoma de HBsAg IN (2 x)	Balb/c	Alto	Alto	Alto	Alto

Muestras de suero, heces y lavados vaginales se recogieron de cinco ratones individuales por grupo. Las muestras se procesaron individualmente, y las combinaciones de muestras se hicieron usando volúmenes equivalentes de muestra por ratón. Los criterios de valoración de las titulaciones se determinaron para cada muestra y se definieron como una titulación en suero >2 x que se observó para ratones inmunizados sin tratar CD1 o Balb/c. El intervalo de valores de titulación que se usó para la determinación de la titulación relativa se muestra a continuación.  
 § No determinado.  
 ¶ Muestra no disponible.

35

Valoración relativa	Suero	Heces	Lavado vaginal
Negativa	<100	<100	<25
Baja	100-200	100-200	25-100
Media	400-800	400-800	200-400
Alta	>1600	>1600	400-1600

**EJEMPLO 10: Las Respuestas de Anticuerpos a Sólo Inmunización de HBsAg de ADN son Débiles**

40 Recientemente se ha descrito la inmunización de la vacuna de ADN para generar una respuesta inmune protectora en un huésped, incluyendo seres humanos. Véase la Patente de Estados Unidos N° 6.632.663 y el documento WO 03/075955 A1 (incorporados en este documento por referencia).

Para probar la eficacia de HBsAg de ADN como inmunógeno, se inmunizaron ratones CD1 y ratones Balb/c por vía intramuscular con HBsAg de ADN, con o sin un segundo refuerzo. Se midió la Ig en suero total específica de HBsAg 8 semanas después de la inmunización como se ha descrito anteriormente. La vacuna de HBsAg de GSK se usó como control positivo.

La Figura 12 indica que, a diferencia de las vacunas proteicas de HBsAg con adyuvantes de proteínas, la inmunización intramuscular con HBsAg de ADN produjo una respuesta de anticuerpos débil a HBsAg tanto en cepas de ratones CD1 y Balb/c. La respuesta inmune provocada, incluso con un refuerzo, es débil a moderada en la mejor en comparación con la vacuna de control sin reforzar de GSK.

**EJEMPLO 11: La Inmunización Homóloga de HBsAg de ADN Genera una Potente Actividad CTL y un Perfil de citocinas Polarizadas Th1**

La inmunización de HBsAg de ADN es un inductor débil de las respuestas de anticuerpos (Ejemplo 10), pero es un inductor muy fuerte de las respuestas de linfocitos T. Después de la inmunización con HBsAg de ADN y por vía intramuscular (100 µg en las semanas 0 y 6, con una dosis de refuerzo en la semana 11 para movilizar CTL de memoria), se observó un promedio destrucción específica de HBsAg del 87% ± 8% HBsAg usando el ensayo CTL *in vivo* como una lectura (n = 4 ratones). La inmunización con HBsAg de ADN también polarizó fuertemente la respuesta de citocinas por linfocitos T específicos de HBsAg hacia un perfil de citocinas de Tipo 1. La Figura 13 muestra los resultados de los ensayos de ELISPOT para IFN-γ e IL-10 por las células esplénicas de ratones inmunizados con HBsAg de ADN. Tanto la proteína HBsAg, que contiene epítopes de linfocitos T, como el péptido inmunodominante CTL de HBsAg (Ishikawa, T. y col. 1998. J. Immunol. 161: 5842) generaron altas frecuencias de células secretoras de IFN-γ, pero un número muy reducido de células secretoras de IL-10. Por lo tanto, la inmunización homóloga con HBsAg de ADN genera un perfil típico fuertemente polarizado de tipo Th1, de acuerdo con las proporciones de IgG1:IgG2a de tipo Th1 que se observaron en dos cepas diferentes de ratones (Figuras 10 y 11).

**EJEMPLO 12: Efectos de la Inmunización Heteróloga con HBsAg de ADN como Cebador y Liposomas de HBsAg como Refuerzo en las Respuestas de Anticuerpos Sistémicas y Mucosales**

Aunque la inmunización intramuscular de ADN con liposomas de HBsAg era un débil estímulo para la producción de anticuerpos totales (Ejemplo 11), era muy eficaz en la estimulación de respuestas inmunes mediadas por linfocitos polarizados Th1 (Ejemplo 11). Con el fin de determinar si la inmunización con ADN fue eficaz en la generación de respuestas de linfocitos T y B de memoria, se desarrolló un protocolo de inmunización heterólogo. En este protocolo, se usó la inmunización con HBsAg de ADN como la dosis primaria, y se usó liposomas de HBsAg como la dosis secundaria. Si el ADN es eficaz en la generación de respuestas de linfocitos T y B de memoria, entonces estos pueden revelarse después de un refuerzo con una forma diferente del antígeno (liposomas de HBsAg). Así, la invención proporciona un diseño experimental de inmunización heteróloga. Las variaciones del protocolo son simplemente de rutina y están dentro del alcance de la invención (véase el Ejemplo 16 para permutaciones en el protocolo).

En un protocolo representativo, los ratones se inmunizaron en primer lugar y se cebaron con una vacuna de HBsAg de ADN por vía intramuscular, y después se expusieron a una dosis baja de liposomas de HBsAg por vía intranasal. En ciertas realizaciones, la baja dosis es por sí misma insuficiente para provocar una respuesta inmune significativa cuando se administran en solitario. En comparación con una dosis suficiente para inducir una respuesta inmune a gran escala, la dosis baja es a lo sumo del 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o menor.

Los ratones Balb/c se inmunizaron por vía intramuscular por 100 µg de HBsAg de ADN en la semana 0, y otra vez en la semana 6. En la semana 16, se administró un refuerzo de liposoma de HBsAg por vía intramucosal en una dosis reducida de 3 µg. Se obtuvieron muestras en suero 2, 4 y 6 semanas después del refuerzo. Como control positivo, se inmunizaron por vía intranasal ratones CD1 con 15 µg de liposomas de HBsAg con un segundo refuerzo. Se obtuvo suero de control positivo 8 semanas después de la inmunización inicial. Como control negativo, se obtuvieron sueros de ratones CD1 sin tratar en la semana 8.

La Figura 14 muestra los resultados de este protocolo de inmunización heteróloga. Dos rondas de inmunizaciones con HBsAg de ADN IM o una ronda de una sola inmunización de liposomas de HBsAg IN (dosis baja) indujo respuestas débiles de anticuerpos en suero. Sin embargo, al añadir un segundo refuerzo de dosis baja con liposomas de HBsAg (3 µg) IN a la inmunización con ADN, el régimen aumento notablemente la respuesta de anticuerpos específicos de HBsAg total a un nivel aún más alto que el observado en ratones después de dos rondas de liposomas de HBsAg IN (dosis alta).

Los ensayos de ELISA cuantitativos se usaron para determinar la cantidad de microgramos de IgG específica de HBsAg en el suero de este experimento. Los niveles de IgG después de dos rondas de ADN eran de una media de 43,2 µg/ml, y aumentaron a 248 µg/ml después del refuerzo con liposomas de HBsAg. La administración de la

preparación de liposomas en solitario generó sólo 0,6 µg/ml de IgG en suero.

Cabe destacar que la inmunización con ADN también fortalece al sistema inmunológico de respuestas de IgA mucosales, que también se movilizan tras la administración intranasal de una dosis baja de refuerzo de liposomas de HBsAg. La Figura 15 muestra que el ADN y los componentes de liposomas del régimen de inmunización heteróloga en solitario no estimulan las respuestas de IgA detectables. Sin embargo, se indujeron respuestas de IgA sustanciales en el suero y en la vagina usando el protocolo de cebado de ADN heterólogo y de refuerzo de liposomas de HBsAg. La IgA secretora también se indujo en muestras de materia fecal que usaban este protocolo (datos no mostrados). La Figura 15 también muestra respuestas típicas de IgA en suero después del cebado y el refuerzo con una dosis más alta de únicamente liposomas de HBsAg (15 µg de HBsAg), que son un punto de referencia para fuertes respuestas de IgA. El refuerzo con liposomas de HBsAg ha de administrarse por vía intranasal con el fin de generar respuestas de IgA en suero o mucosales. Si el refuerzo se administra IM en lugar de IN, sólo se genera un bajo nivel de IgA secretora a pesar de que las respuestas de IgG en suero circulantes son fuertes (datos no mostrados).

Los anticuerpos IgG específicos para HBsAg también se detectaron en el pulmón y los lavados vaginales de ratones a los que se administró el protocolo de inmunización heterólogo (Figura 16). Ni los ratones no tratados, ni los ratones que recibieron HBsAg de ADN IM seguido de liposomas blancos IN, generaron niveles detectables de IgG en el pulmón o los lavados vaginales que estaban por encima de los valores de fondo. Sin embargo, los ratones que fueron inmunizados con una combinación de HBsAg de ADN IM seguido de liposomas de HBsAg IN produjeron IgG mucosales fácilmente detectables tanto en el pulmón como en sitios vaginales. Esto es relevante ya que también se ha demostrado que la IgG mucosal desempeña una función protectora en la protección frente a ciertos patógenos, tales como el VHS-2 y la gripe (Parr, E.L. y col. 1997. *J. Virology* 71: 8109-8115 para el VHS-2; Tamura, S. y T. Kurata. 2004. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57(6): 236-47; Renegar, K.B. y col. 2004. *J. Immunol.* 173(3): 1978-86).

Los Solicitantes también determinaron la proporción de IgG1:IgG2a para evaluar el efecto del refuerzo IN con liposomas de HBsAg en la polarización de la respuesta de linfocitos T, siguiendo el protocolo de inmunización heterólogo. La Figura 17 muestra las proporciones de IgG1:IgG2a en los sueros de ratones individuales después del refuerzo con liposomas de HBsAg. Significativamente, la adición de este refuerzo en el protocolo de inmunización con ADN no cambió las respuestas inmunes hacia un perfil de tipo Th2. Las respuestas de anticuerpos 4 semanas después de la segunda inmunización con ADN mostraron una tendencia de tipo Th1 (proporción de IgG1:IgG2a de 0,47). Una respuesta con tendencia a Th1 todavía estaba presente después de un refuerzo intranasal con liposomas de HBsAg (proporción de IgG1:IgG2a de 0,50). Este experimento muestra que la inmunización con ADN establece una base sólida y estable de memoria de tipo Th1 que se moviliza de forma eficaz cuando se administran liposomas de HBsAg por vía intranasal.

Los protocolos de inmunización heteróloga en cuestión promueven respuestas de Th neutras o Th polarizadas de tipo 1 e inmunidad mediada por células, mientras que se inducen opcionalmente las respuestas de IgA e IgG mucosales (si la preparación de antígeno-liposoma de dosis de refuerzo se administra por vía intranasal). Para la inmunidad protectora frente a patógenos intracelulares, a menudo es deseable iniciar respuestas inmunes mediadas por células, particularmente para mejorar la secreción de citocinas de Th1 y para la generación de CLT. Esto es particularmente útil para ciertas realizaciones, en las que puede ser deseable que un protocolo de antígeno y/o inmunización dé como resultado una respuesta de Th1, en lugar de una respuesta de Th2 o una respuesta de tipo mixta, ya que las respuestas de Th2 puede estar asociadas con ciertos efectos secundarios indeseables similares a una reacción alérgica, especialmente en niños.

En otras realizaciones, en las que la dosis inicial es la preparación de liposomas de HBsAg en cuestión administrada por vía intranasal, y la dosis de refuerzo es HBsAg de ADN administrado por vía intramuscular, la respuesta inmune moderada resultante en el animal huésped tiende a ser de un tipo mixto, en lugar de una respuesta de tipo Th1. Esto ilustra el argumento de que el orden de la inmunización heteróloga en cuestión es importante para lograr la respuesta de Th1.

### **EJEMPLO 13: Efectos de la Inmunización Heteróloga con HBsAg de ADN como Cebador y Liposomas de HBsAg como Refuerzo sobre la Avidéz de los Anticuerpos de IgG en Suero para HBsAg**

La avidéz de los anticuerpos (es decir, la fuerza total de la unión antígeno-anticuerpo) puede desempeñar una función importante en el control de patógenos, siendo los anticuerpos con avidéz más alta generalmente más eficaces que los anticuerpos de baja avidéz. Para determinar la fuerza de unión de anticuerpos de IgG en suero específicos de HBsAg para el antígeno HBsAg, se desarrolló un ensayo cuantitativo de avidéz de IgG usando el reactivo de urea caotrópico para interrumpir complejos antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos con mayor avidéz requieren mayores concentraciones de urea para disociar el antígeno unido a los anticuerpos. La Figura 18 muestra resultados representativos de la avidéz de IgG en ratones inmunizados por un régimen de inmunización homóloga (panel de la izquierda) y un régimen de inmunización heteróloga (panel de la derecha). Los resultados se representan como los índices de avidéz, que son µg de IgG libre en ausencia de urea dividido por µg de IgG libre en presencia de urea. La proporción máxima que se puede obtener en este ensayo es de 1,0, que se muestra como una línea discontinua en la parte superior de cada gráfico.

La inmunización homóloga con liposomas de HBsAg genera avideces que son muy similares a las obtenidas con la vacuna de GSK actual a base de alumbre de HBsAg usada en seres humanos. La inmunización con HBsAg de ADN también genera buenas respuestas de avidez. La inmunización heteróloga con HBsAg de ADN seguida de liposomas de HBsAg aumenta la avideces anticuerpos adicionalmente, superando la respuesta de referencia de la vacuna humana disponible en el mercado. La administración del refuerzo de liposomas de HBsAg por vía intranasal da como resultado los anticuerpos de más avidez; sin embargo la administración IM también es muy eficaz. Se prevé que los anticuerpos de mayor avidez sean más eficaces en la neutralización del antígeno, lo que demuestra la superioridad del protocolo de inmunización heteróloga sobre los regímenes de inmunización homóloga con la vacuna de GSK disponible en el mercado (IM) o liposomas de HBsAg (IN o IM).

#### **EJEMPLO 14: La Inmunización Heteróloga con HBsAg de ADN como Cebador y Liposomas de HBsAg como Refuerzo Supera la Falta de Sensibilidad a HBsAg en Ratones C57BL/6**

Los ratones C57BL/6 no son sensibles a la proteína HBsAg (ref.: Schirmbeck, R. y col. J. Virol. 69(10): 5929-34), ya que son aproximadamente el 5-10% de seres humanos los que reciben la vacuna de GSK disponible en el mercado para HBsAg. Para determinar si la inmunización heteróloga puede inducir respuestas inmunes en los ratones que no responden, se realizó el siguiente experimento (Tabla D). Un grupo (Grupo A) de ratones C67BL/6 se inmunizó con dos rondas de liposomas de HBsAg administrados por vía intranasal. Como era de esperar, estos ratones no pudieron generar un nivel detectable de IgG en suero de anti-HBsAg. Después, estos ratones y un segundo grupo de ratones sin tratar (Grupo B) se inmunizaron con dos rondas de HBsAg de ADN administrado por vía intramuscular. Los niveles en suero de IgG en ambos grupos de ratones en respuesta a la vacuna de ADN eran comparables (12,8 µg/ml y 8,0 µg/ml, para los Grupos A y B, respectivamente). Después, cada grupo se potenció adicionalmente con liposoma de HBsAg antes de la determinación de niveles de IgG en suero finales. Sorprendentemente, ambos grupos de ratones C57BL/6 demostraron altos niveles equivalentes de IgG en suero de anti-HBsAg (Grupo A, 238 µg/ml; Grupo B, 310 µg/ml). Los resultados de este experimento ilustran tres puntos: 1) la inmunización heteróloga puede estimular altas respuestas de anticuerpos en las cepas de ratón no sensibles; 2) el orden de la inmunización es fundamental para la inducción de respuestas de IgG en suero; 3) respuestas sinérgicas de anticuerpos se observan después de la inmunización heteróloga.

**Tabla D. La inmunización de HBsAg de ADN seguida de liposomas de HBsAg IN supera la falta de sensibilidad a HBsAg en ratones C57BL/6**

Grupos de Tratamiento	A: IgG en Suero (µm/ml)	B: IgG en Suero (µm/ml)
A. 2 x liposomas de HBsAg IN	0	---
B. 2 x HBsAg de ADN IM	12,8	8,0
C. liposomas de HBsAg IN	238	310

#### **EJEMPLO 15: La Inmunización Heteróloga Genera Actividad CTL *in vivo* y Secreción de Citocinas con Tendencia a Th1**

La inmunidad protectora de muchos patógenos intracelulares a menudo requiere de una respuesta inmune con tendencia a Th1 con una elevada producción de IFN- $\gamma$ , y la generación de los linfocitos T citolíticos (CTL) que pueden destruir células infectadas con patógenos. Para evaluar las respuestas inmunes mediadas por células generadas los protocolos de administración de vacunas, los Solicitantes han establecido ensayos *in vivo* para medir las respuestas CTL, y los ensayos de ELISPOT para enumerar las frecuencias de células secretoras de IFN- $\gamma$  e IL-10 específicas de HBsAg (respuestas de Th1 y Th2, respectivamente).

Los ensayos de CTL *in vivo* se han publicado recientemente en la bibliografía. A diferencia de los ensayos *in vitro* de CTL, proporcionan una medida real de la capacidad de los CTL para destruir dianas en el entorno *in vivo*. Los Solicitantes midieron *in vivo* la actividad CTL en ratones que recibieron las dos rondas de HBsAg de ADN IM seguida de una dosis baja de refuerzo de liposomas de HBsAg IN. Después de que se completara la recogida de muestras para la medición de las respuestas de anticuerpos (seis semanas o más después del refuerzo IN), los ratones recibieron un refuerzo de ADN para movilizar los linfocitos T de memoria en las células efectoras activadas. 7 días más tarde, la actividad de las células efectoras de CTL movilizadas se cuantificó determinando su capacidad para destruir específicamente dianas marcadas con tinte pulsadas con péptidos de HBsAg que se transfirieron adoptivamente por vía intravenosa a los ratones, como se describe en los Procedimientos. La desaparición de la población CFSE<sup>alto</sup> marcada con tinte pulsada con péptido con respecto a la población CFSE<sup>bajo</sup> marcada con tinte sin pulsar es la medida de la destrucción específica de péptidos. Los porcentajes de estas dos poblaciones en las cohortes de los receptores sin tratar sirven como control interno para el injerto celular. El porcentaje de células donantes CFSE<sup>bajo</sup> y CFSE<sup>alto</sup> en los bazo se determinó por análisis de citometría de flujo.

Los análisis de citometría de flujo representativos se muestran en la Figura 19 para un ensayo. El panel de la izquierda muestra poblaciones CFSE<sup>bajo</sup> (R2 en el gráfico) y CFSE<sup>alto</sup> (R3 en el gráfico) de células donantes que se recogieron de los bazo de ratones sin tratar 22 horas después de la inyección de las células dianas marcadas con CFSE. La fluorescencia CFSE se muestra en el canal de FITC o FL1 en el eje x. La fluorescencia FL1 se muestra frente a la fluorescencia FL2 irrelevante únicamente con el fin de excluir células autofluorescentes del análisis. El panel derecho muestra el mismo análisis de ratones que habían recibido el protocolo de inmunización heterólogo. La desaparición de una población CFSE<sup>alto</sup> (pulsada con péptidos específicos) de la región R3 indica la destrucción específica por CTL.

Se observaron altos niveles de actividad destructora CTL específica de péptidos de HBsAg en ratones Balb/c que se cebaron por vía intramuscular con HBsAg de ADN y se potenciaron por vía intranasal con liposomas de HBsAg. La actividad CTL *in vivo* era una media del 78% (intervalo de destrucción específica del 65-91%) en una agrupación de cuatro ratones.

Las células del bazo de los ratones que recibieron el régimen de inmunización heteróloga también se cultivaron *in vitro* para la medición de células secretoras IFN- $\gamma$  e IL-4 mediante ensayos de ELISPOT. Los ensayos de ELISPOT se establecieron usando pares de anticuerpos disponibles en el mercado y reactivos (BD Pharmingen) y placas de ELISPOT multipocillo Multiscreen-IP (Millipore, Hopkington, MA). Los cultivos *in vitro* se estimularon con péptido de HBsAg a una concentración de 10  $\mu$ g por  $2,5 \times 10^6$  células por ml durante 20-22 horas. Los cultivos sin péptido se usaron como control negativo, y los cultivos estimulados con anti-CD3 o Con A se usaron como control positivo. Los puntos se analizaron cuantitativamente por CTL Inc.

Los Solicitantes observaron altas frecuencias de células secretoras de IFN- $\gamma$  específicas de HBsAg, pero únicamente frecuencias muy bajas de células secretoras de IL-10 específicas de HBsAg en ratones inmunizados con el protocolo de inmunización heteróloga (datos no mostrados). Estos resultados confirman directamente la conclusión derivada del análisis de las proporciones de IgG1:IgG2a en suero, de que el protocolo de inmunización heteróloga genera una respuesta inmune con tendencia a citocinas de tipo Th1.

**EJEMPLO 16: Variaciones en el Protocolo de Administración para los Componentes con HBsAg de ADN y Liposomas de HBsAg del Protocolo de Inmunización Heteróloga**

Otros estudios determinaron la medida en la que los dos parámetros del protocolo de inmunización heteróloga, el cebado de ADN y el refuerzo de antígeno-liposoma, podrían variar al tiempo que conservan buena inmunogenicidad para respuestas CTL y/o de los anticuerpos. La Tabla E muestra los resultados de la actividad destructora de CTL *in vivo* y las respuestas de IgG en suero en ratones en los que varió la dosis primaria de ADN con respecto a la dosis y el tiempo de administración. El primer protocolo (A) mostrado consiste en administración de ADN en las semanas 0 y 3 (dosis total de 200  $\mu$ g) y refuerzo de liposomas de HBsAg en la semana 6. Este protocolo genera casi la máxima actividad destructora de CTL específica y altos niveles de IgG en suero específica de HBsAg, como se ha mostrado en los ejemplos anteriores. La reducción del ADN de 2 administraciones por un total de 200  $\mu$ g de una administración por un total de 100  $\mu$ g (B) produce los mismos niveles de respuestas CTL y de anticuerpos. Una modificación adicional que consiste en dividir la dosis primaria de ADN 1 x en dos partes administradas en un lapso de tres días de tiempo, y el acortamiento de la administración secundaria de liposomas por tres semanas (C) conservó la alta actividad destructora de CTL y la respuesta de anticuerpos. En una dosis primaria de ADN reducida (D) hay una indicación de que tanto los niveles de CTL como los niveles de anticuerpos están comenzando a disminuir. En ADN (E) menor de 100 veces, la actividad CTL es todavía de aproximadamente 2/3 del máximo, mientras que los niveles de anticuerpos son casi indetectables. Por lo tanto, son posibles variaciones significativas tanto en la dosis como en el momento de la inmunización de refuerzo con ADN al mismo tiempo que conservan el resultado deseado de altos niveles de CTL y de anticuerpos.

**Tabla E. Efecto de los diferentes regímenes de cebado con ADN en la generación de actividad destructora CTL específica de HBsAg *in vivo* e IgG en suero en ratones Balb/c**

Grupos de tratamiento	% de destrucción <i>in vivo</i>	Suero $\mu$ g/ml
A. 2 x ADN en las semanas 0, 3 (200 $\mu$ g en total) + liposomas de HBsAg IN en la semana 6	87 $\pm$ 8	176
B. 1 x ADN en 3 días (100 $\mu$ g en total) + liposomas HBsAg IN en la semana 6	91 $\pm$ 4	197
C. 2 x ADN en 3 días (100 $\mu$ g en total) + liposomas de HBsAg IN en la semana 3	90 $\pm$ 5	318

D. 2 x ADN en 3 días (10 HBsAg-lipo IN semana 3) + liposomas de HBsAg IN en la semana 3	76 ± 14	125
E. 2 x ADN en 3 días (1 HBsAg-lipo IN semana 3) + liposomas de HBsAg IN en la semana 3	61 + 22	0,5

Leyenda de la Tabla E. Se inmunizaron grupos de 5 ratones como se indicó. Las combinaciones en suero se recogieron dos semanas después de la última inmunización para determinaciones de IgG en suero específicas de HBsAg. Se realizaron ensayos de CTL *in vivo* en ratones individuales 7 días después de la administración de un refuerzo de 1 x ADN (100 µg) IM como un estímulo para ayudar a revelar las diferentes en el cebado de ADN. Los números entre paréntesis en los grupos de tratamiento indican la dosis de ADN total administradas por ratón.

5 La segunda variable examinada era el volumen de liposoma de HBsAg administrado por vía intranasal a ratones que habían sido cebados con HBsAg de ADN. Esto se consiguió mezclando HBsAg y liposomas vacíos, manteniendo la cantidad total de proteína administrada a 15 µg/dosis y el contenido de liposomas constante. Este protocolo fue posible debido a que se demostró que la mezcla de HBsAg y liposomas proporciona respuestas que son aproximadamente el 70% de las respuestas observadas cuando el HBsAg se encapsula en liposomas. Se descubrió que los niveles de IgG específicos de anti-HBsAg en suero estaban dentro de un intervalo similar después de la instilación de 50, 40 ó 30 µl de volumen de inoculación.

10 **Tabla F. Efecto del volumen de liposomas de HBsAg sobre las respuestas de los anticuerpos usando el protocolo de inmunización heteróloga**

	Semana 0 Inmunización	Semana 3 Inmunización	Semana 5 Determinación de Anticuerpos
Grupo <sup>¶</sup>	2 x 50 µg IM	Volumen total para Inmunización IN	IgG en suero de anti-HBsAg µg/ml
A	ADN de HBsAg	50 µl (15 µg de HBsAg + liposoma)	198
B	ADN de HBsAg	40 µl (15 µg de HBsAg + liposoma)	285
C	ADN de ADN	30 µl (15 µg de HBsAg + liposoma)	309

<sup>¶</sup>N = 8 ratones por grupos

15 **EJEMPLO 17: La Inmunización Heteróloga (cebado con HBsAg de ADN y refuerzo de liposomas de HBsAg) Genera CTL Mucosal y Proporciona Protección frente a la Exposición de un Virus Vivo (VV-HBsAg)**

15 Para determinar si el régimen de inmunización heteróloga generó CTL mucosal o sistémico a nivel local, definidos por su fenotipo CD8<sup>+</sup> IFNγ<sup>+</sup>, se inmunizaron ratones Balb/c con dos rondas de HBsAg de ADN IM seguido de una ronda de liposomas de HBsAg IN. Los ratones Balb/c se inmunizaron con dos rondas de HBsAg de ADN seguida de una ronda de liposomas vacíos, y los ratones no inmunizados sirvieron como controles. Los ratones se estimularon por vía intranasal con el virus vaccinia recombinante que expresa el HBsAg (VV-HBsAg) 14 días después de la inmunización con liposomas. Las células mononucleares de pulmón (compartimento mucosal local) y esplénicas las células (compartimento sistémico) se aislaron y ensayaron para determinar la presencia de CTL cinco días después de la exposición al virus. Se identificaron CTL específicos de antígeno por su fenotipo CD8<sup>+</sup> IFNγ<sup>+</sup> determinado por análisis de citometría de flujo. La Tabla G muestra que los ratones sin tratar generaron pocos CTL en el pulmón o el bazo. Se generaron números sustanciales de CTL en el pulmón de ratones inmunizados con ADN y liposomas vacíos, y también se generaron números mucho más pequeños en el bazo. Sin embargo, los ratones inmunizados con una combinación de ADN y liposomas de HBsAg generaron una expansión masiva de CTL específicos de HBsAg a nivel local en el pulmón, y un número significativo en el compartimento esplénico. Estos datos demuestran que ambos elementos de este protocolo de inmunización heteróloga generan grandes cantidades de CTL locales específicos de antígeno en la mucosa pulmonar tras una exposición al virus. Significativamente, también se detectaron CTL específicos de antígeno en el compartimento esplénico indicando una respuesta sistémica de CTL específico de antígeno.

30 **Tabla G. Generación de CTL CD8<sup>+</sup> IFNγ<sup>+</sup> después de la inmunización heteróloga**

Grupos de tratamiento <sup>§</sup>	% de CD8 <sup>+</sup> IFNγ <sup>+</sup> en pulmón <sup>¶</sup>	% de CD8 <sup>+</sup> IFNγ <sup>+</sup> en bazo <sup>¶</sup>
No tratado	0,9%	0,05 ± 0,05%
HBsAg de ADN 2 x Liposoma blanco 1 x	38%	0,44 ± 0,11%
HBsAg de ADN 2 x Liposoma de HBsAg 1 x	73%	1,79 ± 0,31%

<sup>§</sup> Los ratones Balb/c se inmunizaron como se indicó (grupos de tratamiento; n= 5 ratones por grupo) a intervalos de cuatro semanas. Los ratones se inmunizaron con 100 µg de HBsAg de ADN por vía intramuscular (50 µl por cuádriceps), y 50 µl de vacío de liposomas de HBsAg por vía intranasal. Los ratones se infectaron con  $2 \times 10^5$  PFU de VV-HBsAg por vía intranasal en un volumen de 50 µl 14 días después de la última inmunización.

<sup>¶</sup> El análisis de inmunofluorescencia se realizó en células mononucleares pulmonares (n = 1 por grupo) y en esplenocitos (n = 5 por grupo) cinco días después de la exposición al virus. Las células se estimularon *in vitro* durante cinco horas con 10 µm de péptido de CTL de HBsAg por  $10^6$  células. Después, las células se tizaron para el CD8 en superficie y el IFN- $\gamma$  intracelular.

La Figura 20 muestra los resultados a partir de una exposición a VV-HBsAg administrada por vía intranasal a tres cohortes de ratones: ratones sin tratar, ratones que recibieron HBsAg de ADN y liposomas blancos IN, y ratones que recibieron HBsAg de ADN y liposomas de HBsAg IN. Las PFU logarítmicas (unidades formadoras de placa de virus) por pulmón se determinaron cinco días después de una exposición al VV-HBsAg. Los ratones vírgenes no tratados tienen altas titulaciones de virus en el pulmón, con una media de 3,72 PFU logarítmicas por pulmón (11.038 PFU). Los ratones que recibieron ADN y liposomas sencillos tenían dos logaritmos de menos PFU por pulmón que los ratones no tratados (1,86 PFU logarítmicas o 156 PFU). Los ratones que recibieron ADN y liposomas de HBsAg no tenían PFU detectable del virus en el pulmón, lo que indica un aclaramiento completo del virus del sitio de exposición mucosal. Dado que la proteína HBsAg en esta construcción sólo se expresará de forma intracelular, el aclaramiento del virus se debe probablemente a la actividad CTL en el compartimiento pulmonar.

#### IX. RESUMEN

La Tabla H resume las características de las respuestas inmunes que se generaron con las plataformas de administración de la vacuna de HBsAg. Se desarrollaron once protocolos de inmunización diferentes (homóloga y heteróloga) y las respuestas inmunes a estos protocolos se caracterizaron. La programación de la inmunización y los componentes de la vacuna son como se indican. Todas las respuestas de anticuerpos se determinaron dos semanas después de la última inmunización secundaria. Ha de apreciarse que los protocolos 8 y 9 son versiones cortas de la plataforma de inmunización heteróloga. Usando HBsAg como un antígeno modelo, los Solicitantes han demostrado que las respuestas inmunes pueden dirigirse a resultados específicos (es decir, niveles de respuesta de anticuerpos, perfiles de citocinas de T colaboradores (Th1 frente a Th2), desarrollo de inmunidad mucosal de IgA secretora, y provocación de los linfocitos T citolíticos). Estos estudios proporcionan una base racional que puede usarse para adaptar las respuestas inmunes para generar inmunidad protectora frente a patógenos específicos en las circunstancias específicas para favorecer respuestas inmunes de tipo Th1 o Th2, o una respuesta mixta/más equilibrada.

Tabla H. Resumen de la caracterización de respuestas inmunes a vacunas de HBsAg

<b>Diseño Experimental</b>	Immunización (semana 0)	Immunización (semana 3)	Immunización (semana 6)	Respuesta de los anticuerpos	Avidez de los anticuerpos	Tipo de Th	Respuestas de los anticuerpos mucosales
<b>Immunización Homóloga</b>							
1	Liposoma, IM	liposoma, IM	---	alta	media	Th2	ninguna o baja
2	Liposoma, IN	liposoma, IN	---	media	media	Th2	buena
3	ADN, IM	ADN, IM	---	baja	media	Th1	ninguna o baja
4	Vacuna de HBsAg de GSK, IM	Vacuna de HBsAg de GSK, IM	---	alta	media	Th2	ninguna o baja
<b>Immunización Heteróloga</b>							
5	ADN, IM	ADN, IM	liposoma, IN	alta	alta	Th1	buena
6	ADN, IM	ADN, IM	liposoma, IM	alta	alta	Th1	ninguna o baja
7	ADN, IM	ADN, IM	mezcla de liposoma + antígeno, IN	alta	alta	Th1	buena
8	ADN, IM	liposoma, IN	---	alta	alta	Th1	buena
9	ADN, IM, dosis dividida en 3 días	liposoma, IN	---	alta	alta	Th1	buena
10	ADN, IM + liposoma, IN	ADN, IM + liposoma, IN	---	alta	ND	Th2	buena
11	Liposoma, IN	liposoma, IN	I ADN, IM	media, sin sinergia	ND	Th2	buena
Abreviaturas: Liposoma: HBsAg encapsulado en liposoma de 1-4 µm de diámetro							
ADN: ADN HBsAg							
IM: inyección intramuscular; IN: administración intranasal							

En resumen, los resultados muestran que las dosis específicas de HBsAg, cuando se encapsulan en liposomas de una cierta composición y tamaño (tales como 4  $\mu$ m de tamaño medio), son vacunas potentes para la producción de anticuerpos en suero. Se observan respuestas fuertes cuando la vacuna se administra por vía intranasal o intramuscular. Por el contrario, el ADN HBsAg inyectado por vía intramuscular es menos eficaz en la inducción de un anticuerpo en suero específico de HBsAg. Los solicitantes observaron que los ratones toleraron las vacunas intranasales en todas las formulaciones sin evidencias de distrés o mortalidad.

Sólo la inmunización intranasal con liposoma HBsAg generó respuestas de IgA sistémicas y mucosales, mientras que todos los demás regímenes inmunizante fallaron en la producción de respuesta de IgA. Y finalmente, el régimen inmunizante heterólogo con vacuna de ADN HBsAg por vía IM, seguido de liposoma HBsAg por vía IN es una plataforma de administración de vacunas ideal, ya que produce respuesta de anticuerpos en suero sinérgica, una fuerte respuesta de IgA mucosal y en suero, y una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno potencialmente mejorada y secreción IFN-gamma sin cambiar la respuesta de tipo Th1 establecida por el cebado de la vacuna de ADN.

La biodistribución de liposomas HBsAg no se midió directamente. Sin embargo, se determinó la capacidad de las formulaciones de vacunas para estimular la inmunidad local de las superficies de las mucosas y los resultados se han presentado anteriormente.

Generalmente, la nomenclatura usada y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook y col., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se exponen en las Patentes de Estados Unidos N° 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites y col. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen detalladamente en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, las Pat. de Estados Unidos N° 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, Calif. (1990); Marshak y col., "Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); cada uno de los cuales se incorpora por referencia como si se expusieran en su totalidad en este documento. Se proporcionan otras referencias generales a lo largo de este documento. Los procedimientos en el mismo se cree que son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la comodidad del lector.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una preparación primaria para administración intramuscular que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno; y una preparación secundaria para administración intranasal que comprende el antígeno encapsulado en liposomas, para provocar una respuesta inmune en un animal en el que la administración de la preparación secundaria produce una respuesta inmune que comprende:
- 10 (1) un aumento en el nivel en suero de la IgA específica de antígeno en comparación con el nivel en suero de la IgA específica de antígeno anterior a la administración de la preparación secundaria y,  
 (2) un aumento en comparación con un animal no tratado en la proporción de linfocitos T citotóxicos CD8-IFN $\gamma$ + específicos del antígeno tanto en el pulmón como en el bazo.
- 15 2. La composición de la reivindicación 1, en la que la respuesta inmune provocada tiende a una respuesta Th1 en un animal huésped.
3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la respuesta inmune deseada es frente a un patógeno y el antígeno es un antígeno específico de patógeno.
- 20 4. La composición de la reivindicación 1, en la que los liposomas en la preparación secundaria tienen una media de aproximadamente 0,5-5  $\mu$ m de tamaño.
5. La composición de la reivindicación 3, en la que la respuesta inmune confiere inmunidad frente al patógeno.
- 25 6. La composición de la reivindicación 5, en la que la respuesta inmune protege a los animales de la exposición por dicho patógeno.
7. La composición de una de las reivindicaciones 3-6, en la que el patógeno es un virus.
- 30 8. La composición de la reivindicación 7, en la que el virus es VHB, y el antígeno específico de patógeno es HBsAg.
9. La composición de la reivindicación 8, en la que el animal es un ser humano.
- 35 10. La composición de la reivindicación 1, en la preparación secundaria no contiene un adyuvante distinto de liposomas.
- 40 11. Un kit para provocar una respuesta inmune en un animal huésped que comprende:  
 a) un primer componente inmunizante para administración intramuscular que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno;  
 b) un segundo componente inmunizante para administración intranasal que comprende el antígeno encapsulado en liposomas;  
 c) una instrucción para un usuario para administrar al animal el primer componente inmunizante seguido de la administración del segundo componente inmunizante para provocar una respuesta inmune en el animal.
- 45 12. El kit de la reivindicación 11, en el que la respuesta inmune deseada es frente a un patógeno y el antígeno es un antígeno específico de patógeno.
13. El kit de la reivindicación 11, en el que los liposomas en el segundo componente inmunizante tienen una media de aproximadamente 0,5-5  $\mu$ m de tamaño.
- 50 14. El kit de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que el patógeno es un virus.
15. El kit de la reivindicación 14, en el que el virus es VHB, y el antígeno específico de patógeno es HBsAg.
- 55 16. El kit de una de las reivindicaciones 11-15 en el que el animal es un ser humano.
17. El kit de la reivindicación 11, en el que el segundo componente inmunizante no contiene un adyuvante distinto de liposomas.
- 60 18. La composición de la reivindicación 1, en la que la preparación secundaria consiste en un antígeno encapsulado en liposomas en un disolvente adecuado.
19. El kit de la reivindicación 11, en el que el segundo componente inmunizante consiste en un antígeno encapsulado en liposomas y un disolvente adecuado.

Figura 1.

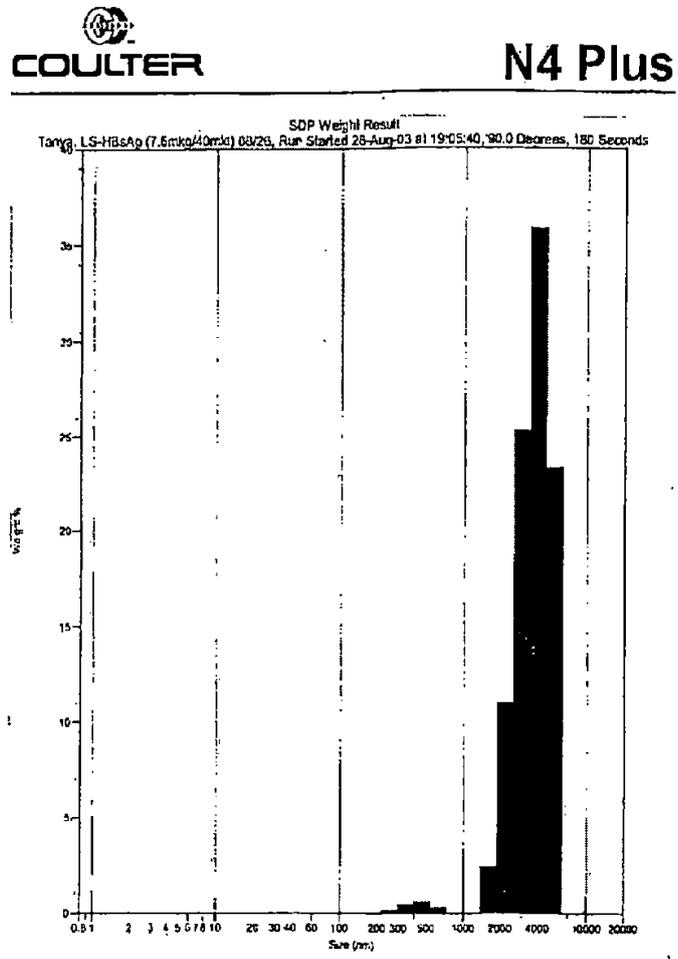
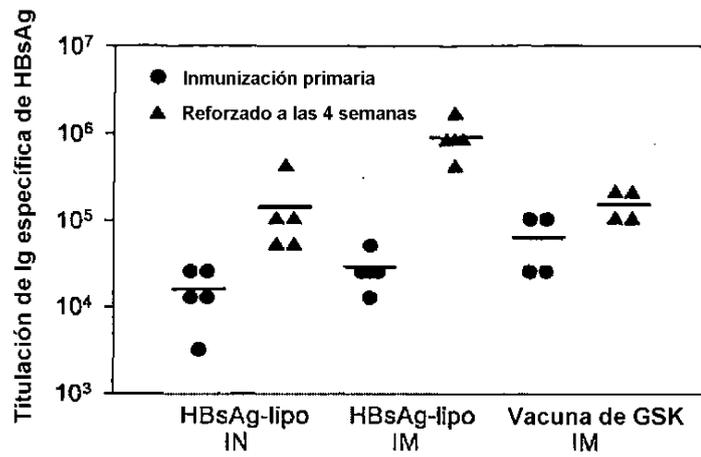


Figura 2.

Respuestas de Ig totales en ratones CD1 (8 semanas)



Respuestas de Ig totales en ratones Balb/c (8 semanas)

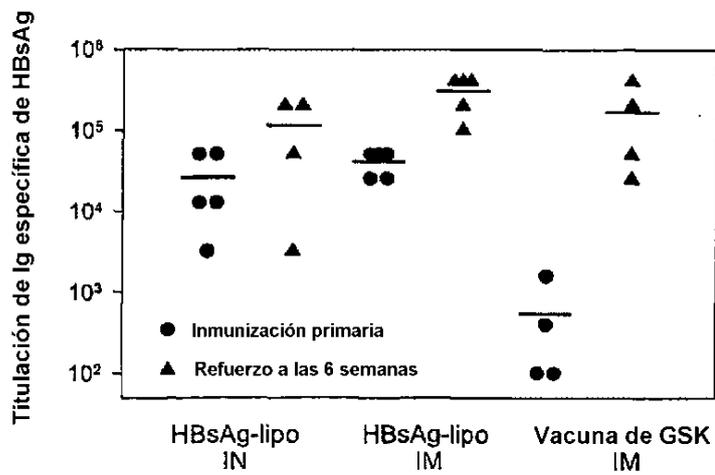


Figura 3.

Immunización intranasal con liposomas de HBsAg:  
 Cinética de los niveles de Ig en suero en ratones CD1:

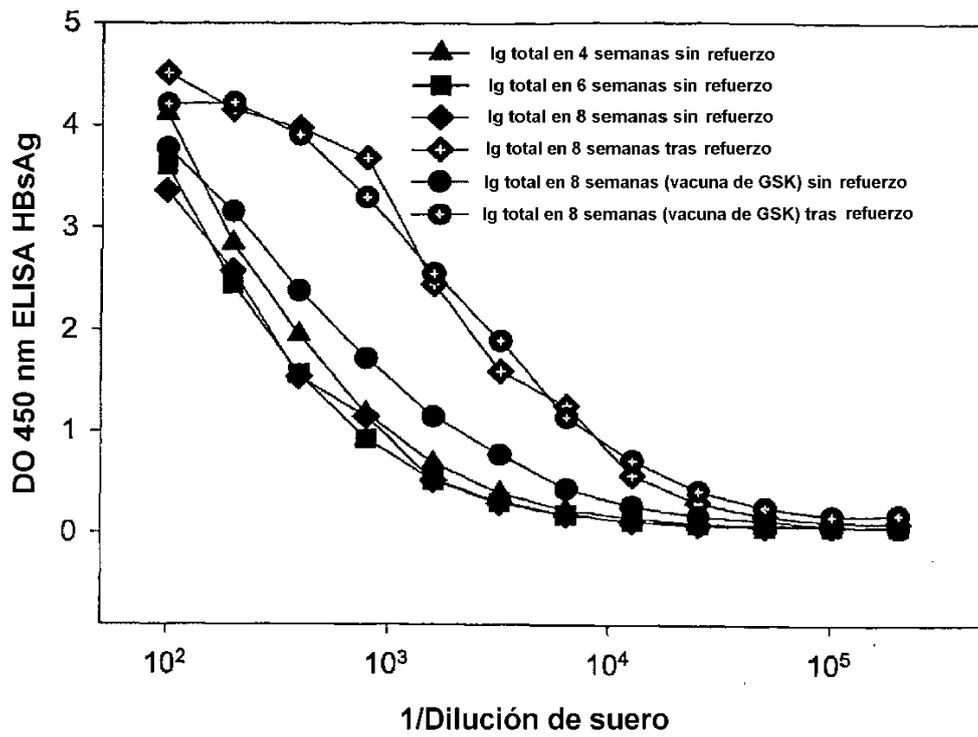


Figura 4.

Immunización intranasal de ratones CD1 con liposomas de HBsAg:  
 Respuesta a dosis de HBsAg

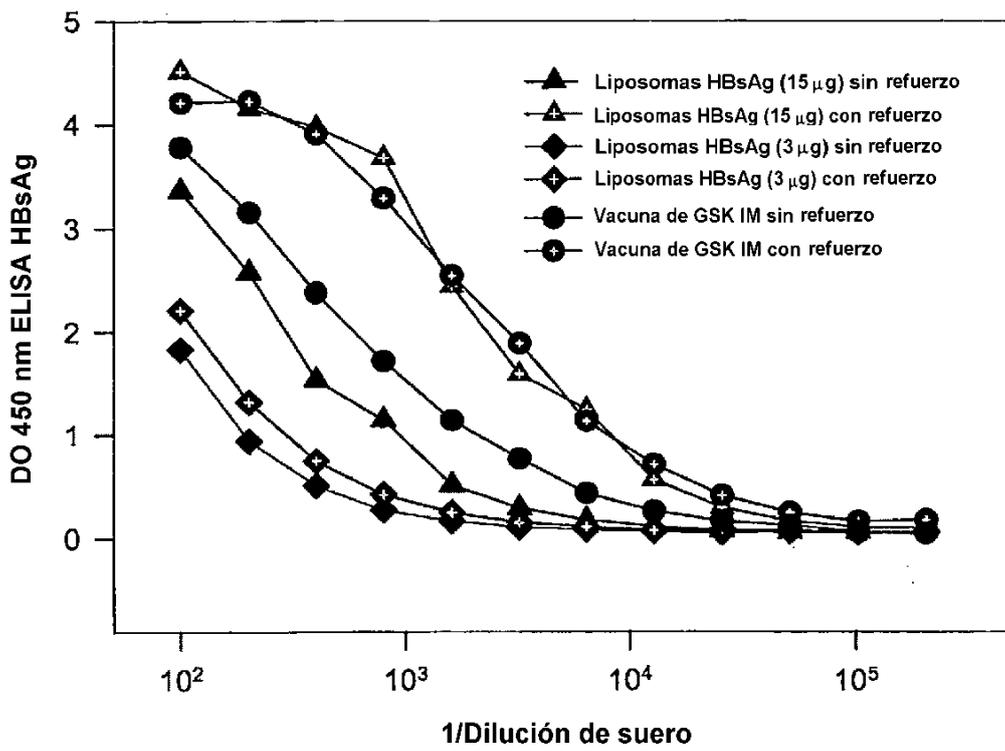


Figura 5.

Ig en suero total en ratones CD1 inmunizados con liposomas de HBsAg (8 semanas después de la inmunización primaria):

Vía de administración

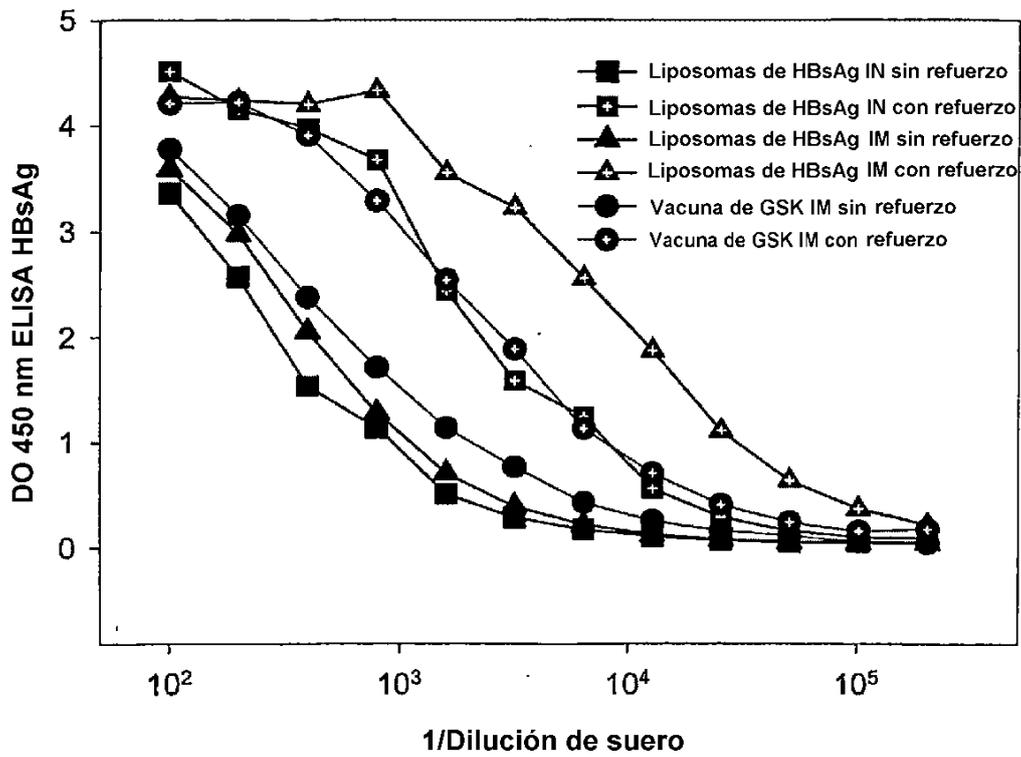


Figura 6.

Ig en suero total en ratones Balb/c inmunizados con liposomas de HBsAg (8 semanas después de la inmunización primaria):  
Vía de administración

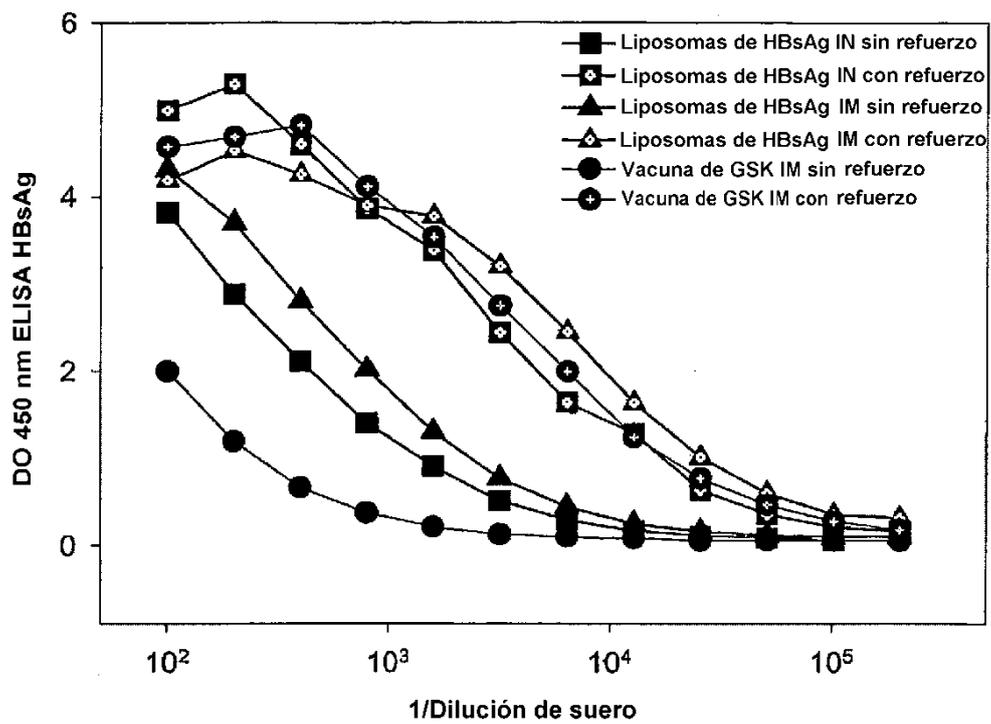


Figura 7.

Ig en suero total en ratones CD1 inmunizados por vía intranasal con liposomas de HBsAg: frescos frente a inmunizados (8 semanas después de la inmunización primaria)

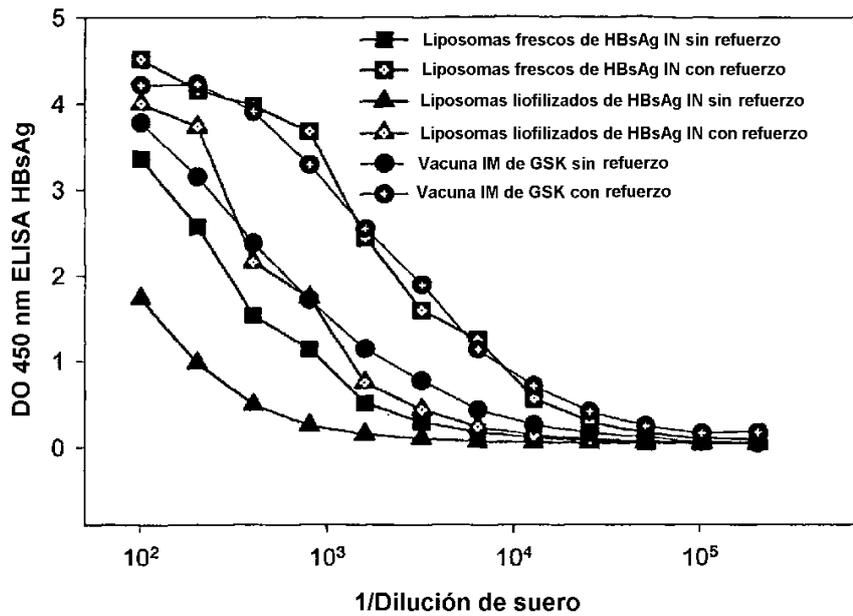


Figura 8.

Ig en suero total en ratones CD1 inmunizados por vía intramuscular con liposomas de HBsAg: frescos frente a liofilizados (8 semanas después de la inmunización primaria)

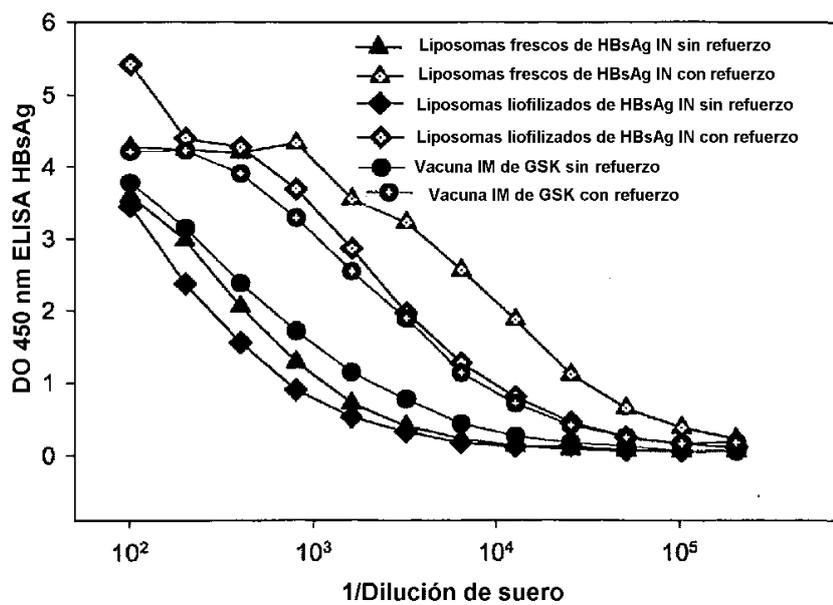
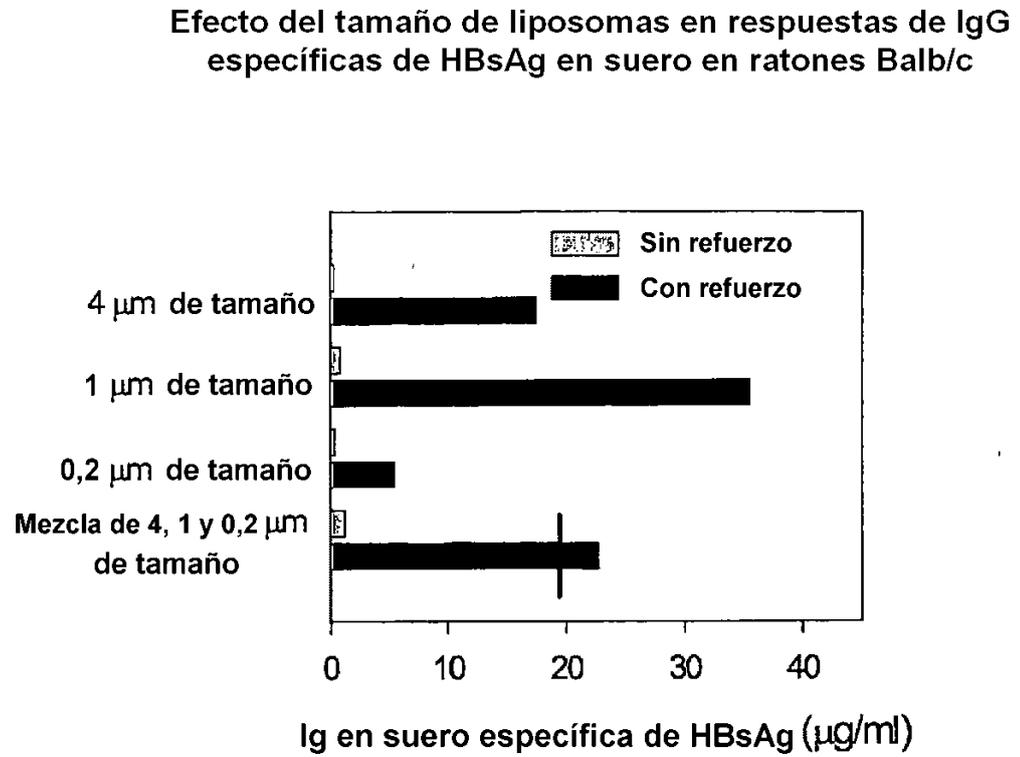
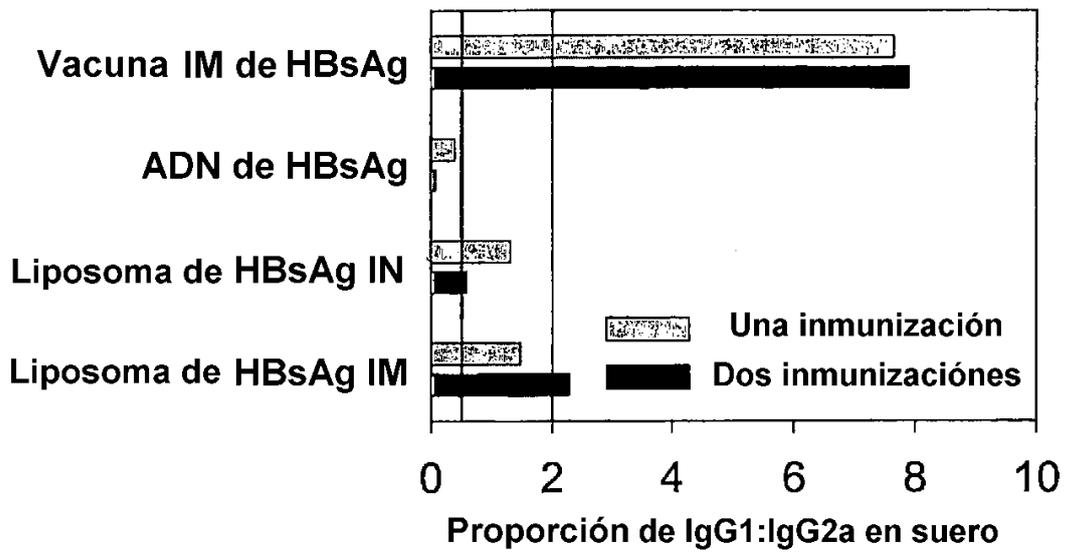


Figura 9.



**Figura 10.**

**Proporciones de IgG1:IgG2a en el suero de ratones CD1**



**Figura 11.**

**Proporción de IgG1:IgG2a en el suero de ratones Balb/c**

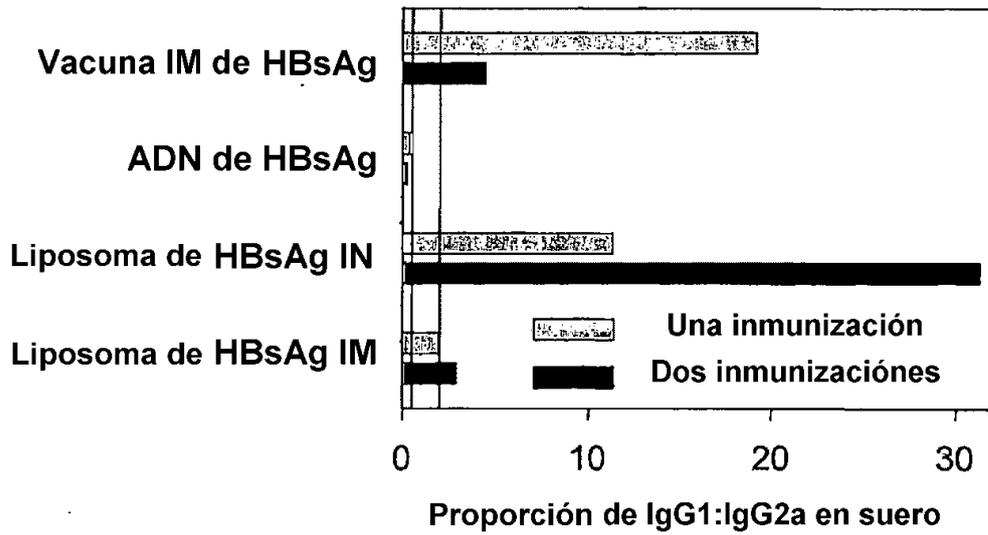
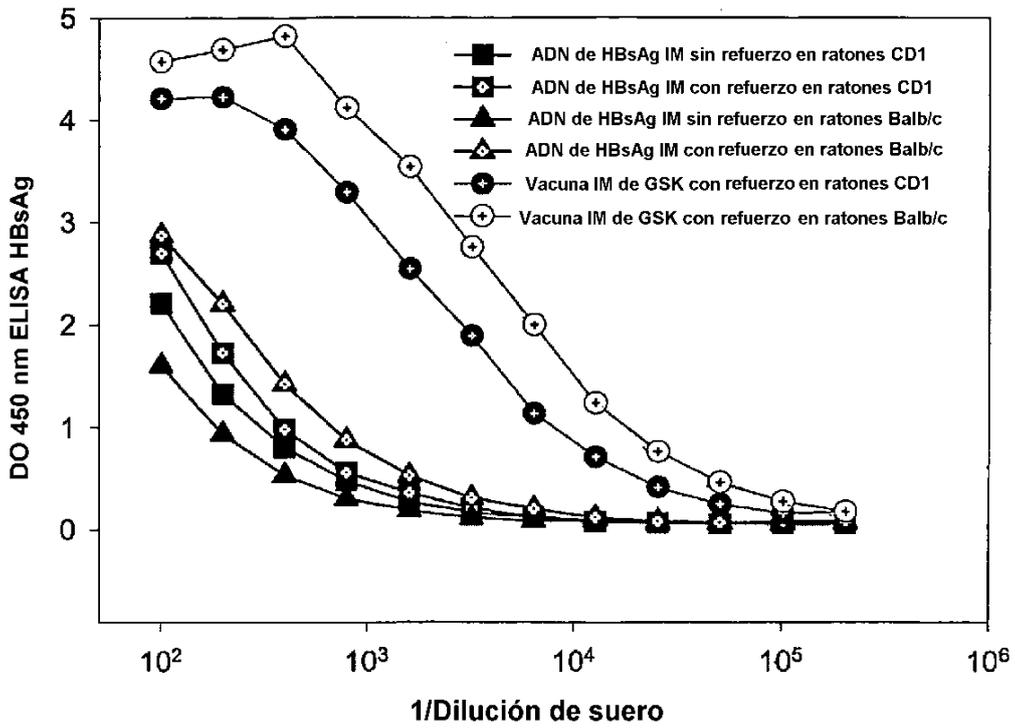


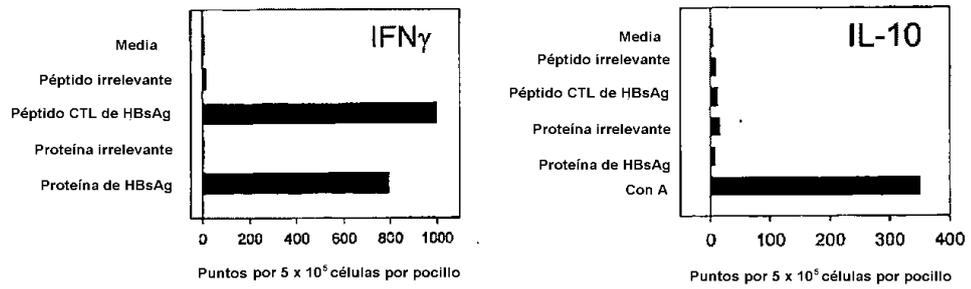
Figura 12.

Ig en suero total en ratones CD1 y Balb/c inmunizados con ADN de HBsAg (100µg) IM (8 semanas después de la inmunización primaria)



**Figura 13.**

**Producción de IFN $\gamma$  e IL-10 por esplenocitos  
Balb/c inmunizados con ADN de HBsAg**



**Figura 14.**

**La inmunización heteróloga induce altos niveles de Ig en suero específica de HBsAg**

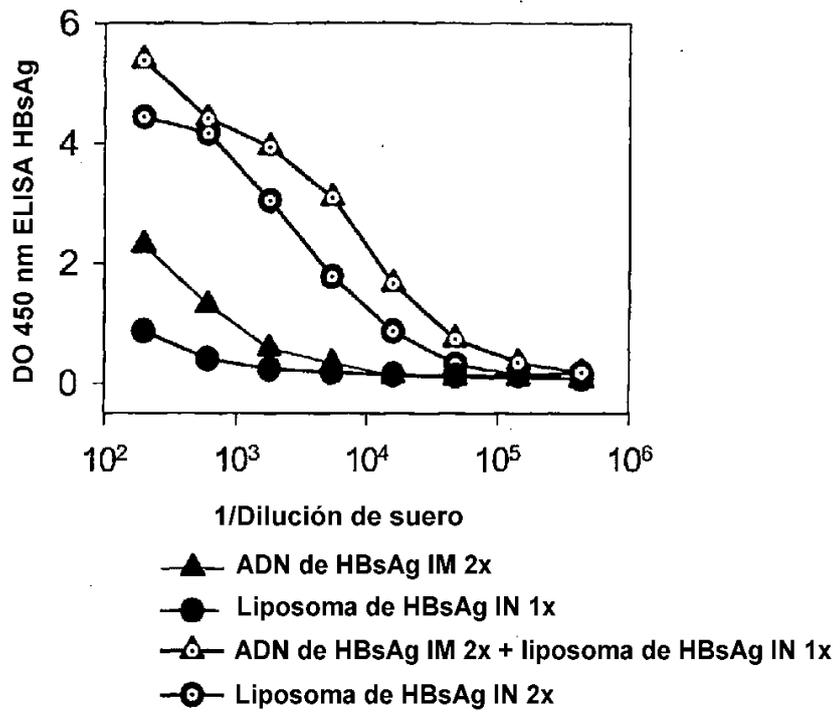


Figura 15.

**Inmunización heteróloga en ratones Blab/c:  
IgA en suero y mucosal**

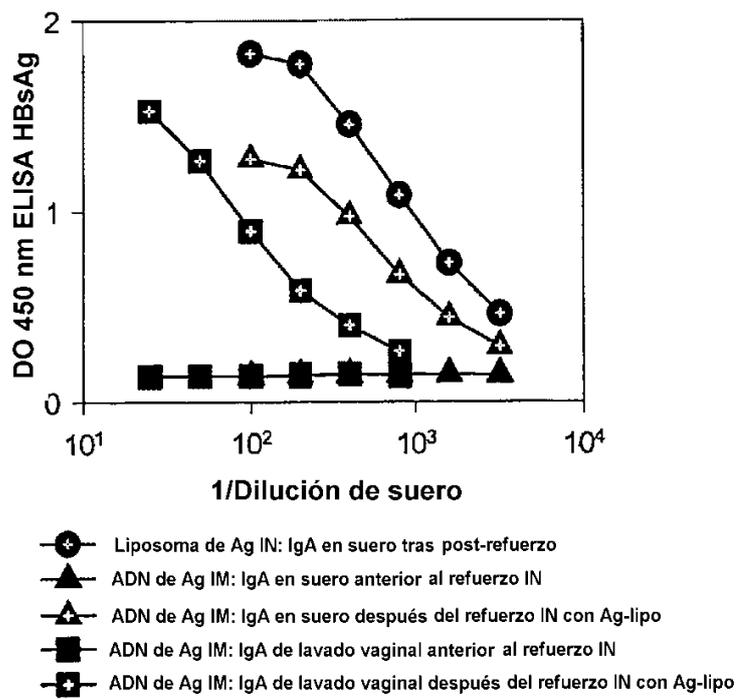
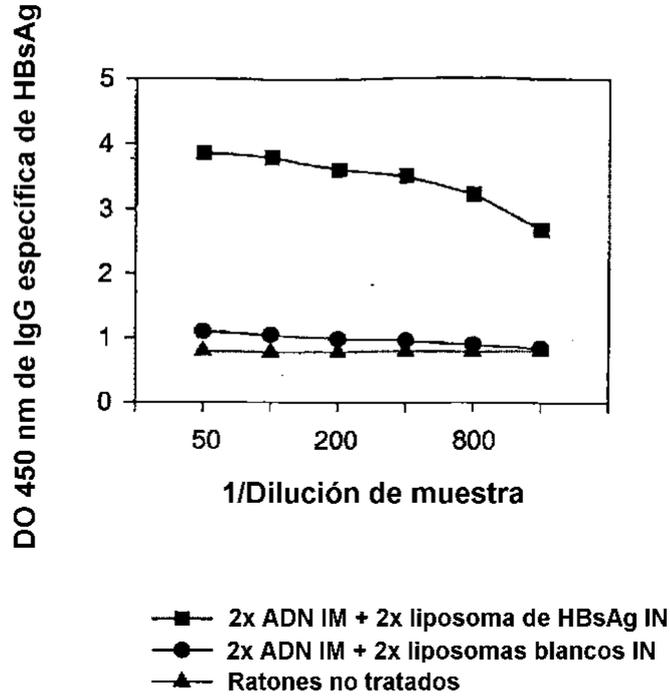
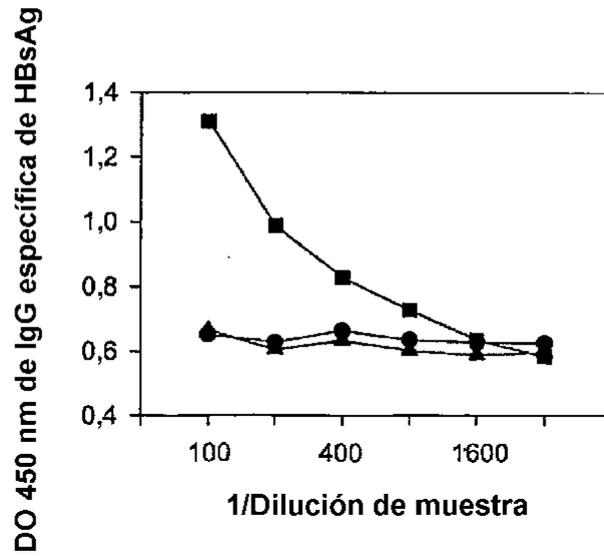


Figura 16.

IgG específica de HBsAg en lavados pulmonares

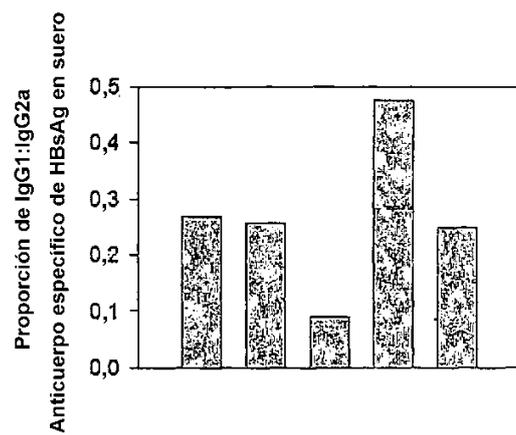


IgG específica de HBsAg en lavados vaginales



**Figura 17.**

**Respuestas con tendencia a Th1 en ratones individuales después de la inmunización heteróloga**



**Las proporciones de IgG1:IgG2a  $\leq 0,5$  definen un fenotipo de linfocitos T colaboradores de tipo 1.  
Datos provenientes de ratones individuales.**

Figura 18.

Avidez de IgG en suero específica de antígeno en ratones Balb/c

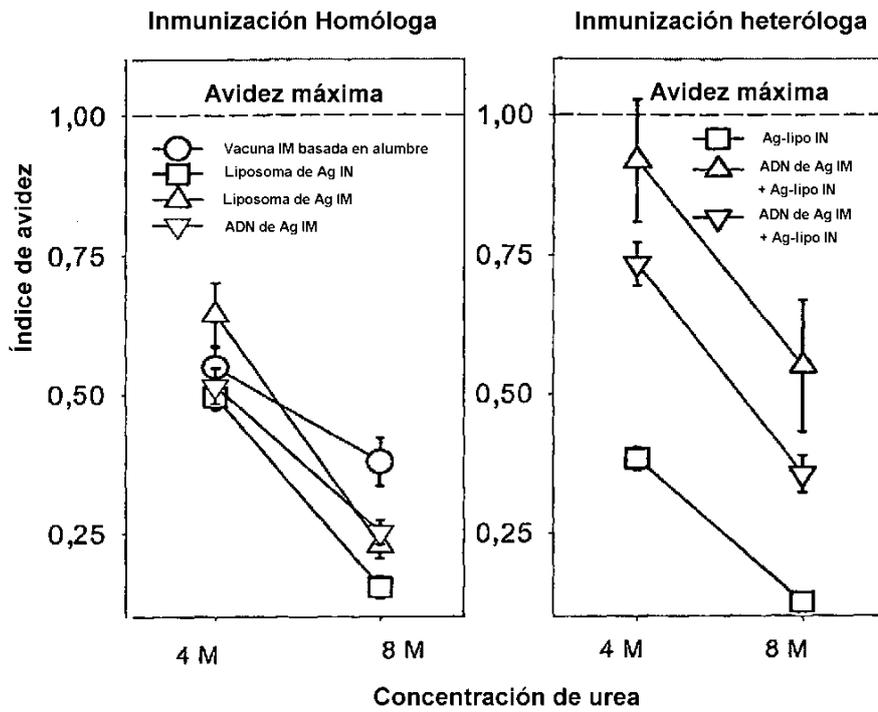
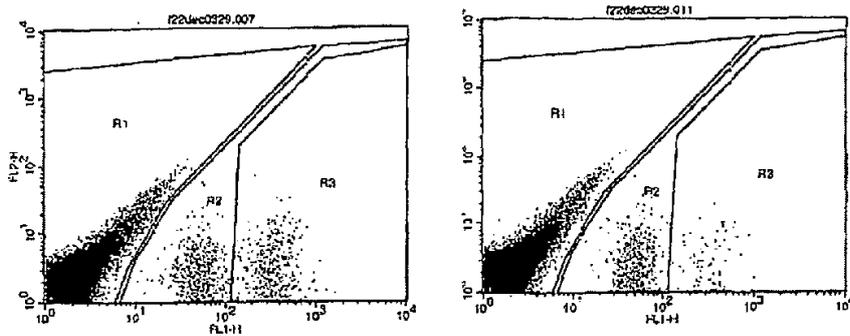


Figura 19.

El régimen primario-secundario induce una potente actividad CTL



Ratones Balb/c sin tratar

Ratones Balb/c inmunizados  
con ADN de HBsAg IM seguido  
de liposomas de HBsAg IN

R2: Población donante sin pulsar de CFSE<sup>bajo</sup>

R3: Población donante pulsada con péptidos de HBsAg de CFSE<sup>alto</sup>

**Figura 20.**

**El virus se aclara a partir de pulmones de ratones  
inmunizados con el protocolo de inmunización heteróloga**

