

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 346**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03720397 .3**
96 Fecha de presentación: **28.03.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1490100**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2004**

54 Título: **Composiciones de vacuna combinadas de ADN/proteína**

30 Prioridad:
28.03.2002 EP 02076276
10.02.2003 EP 03075383

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.04.2012

73 Titular/es:
BRENNTAG BIOSECTOR A/S
ELSENBAKKEN 23
3600 FREDERIKSSUND, DK

72 Inventor/es:
REIMANN, Hansjörg;
SCHIRMBECK, Reinhold, Alois y
LINDBLAD, Erik, B.

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 379 346 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

Composiciones de vacuna combinadas de ADN/proteína

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones de vacuna combinadas de ADN/proteína novedosas que comprenden al menos un antígeno codificado por una molécula de ácido nucleico y al menos un antígeno proteico adyuvados con un adyuvante de base mineral para potenciar la inmunogenicidad de ambos en una única formulación de vacuna.

Antecedentes de la invención

10 La vacunación con ADN es una importante estrategia de inmunización novedosa para cebar específicamente respuestas inmunitarias humorales y celulares (S. Gurunathan y col., Annu Rev. Immunol. (2000) 18:927-74). Con las vacunas de ADN basadas en la inyección de nucleótidos solos, se requieren 50-100 µg de nucleótido para producir una respuesta inmunitaria potente contra el antígeno codificado por el ADN. No se sabe en qué proporción se transcribe en realidad el ADN a proteínas y no está claro a qué cantidad de proteína subsiguiente da lugar. No obstante, se ha demostrado que no se detectan o prácticamente no se detectan respuestas inmunitarias detectables cuando se inyectan < 10 µg de ADN plasmídico en ratones.

20 Actualmente, las vacunas de ADN no están aún en el mercado. Las limitaciones que impiden la introducción de la vacunación con ADN en la práctica clínica incluyen la ausencia evidente de técnicas que pueden administrar dosis bajas de una vacuna de ADN en una forma suficientemente inmunogénica a una amplia variedad de animales y al ser humano. Resultará evidente que el desarrollo de técnicas que podrían conducir a la producción de una respuesta inmunitaria potente después la administración de dosis significativamente más bajas de nucleótidos de ADN atraería el interés tanto científico como económico entre los fabricantes de vacunas.

25 En publicaciones recientes se han propuesto diversos adyuvantes para potenciar la inmunogenicidad de las vacunas de ADN. Por ejemplo, las referencias interrelacionadas WO 00/02591, WO 98/35562 y S. Wang y col., Vaccine 18:1227-1235 (2000) divulgan formulaciones de vacuna que comprenden moléculas de ácido nucleico y un adyuvante a base de fosfato de aluminio o a base de fosfato de calcio proporcionado en una concentración biológicamente eficaz para mejorar la inducción de una respuesta inmunitaria subsiguiente a la vacunación. Se ha demostrado que las formulaciones con adyuvantes a base de fosfato de calcio o de aluminio antes de la inyección facilitan la administración de vacunas de ADN, ya que las valoraciones de anticuerpos se incrementan de 10 a 100 veces y la dosis inmunogénica de ADN se reduce 10 veces. Aunque el mecanismo mediante el cual el fosfato de aluminio o el hidroxifosfato de aluminio ejerce este efecto adyuvante no está claro, los adyuvantes tienen un extenso historial de uso en la vacunación práctica.

30 El documento WO 99/51269 divulga una vacuna de ADN que contiene un ADN desnudo que incorpora y expresa *in vivo* una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido antigénico y al menos un compuesto adyuvante seleccionado de la clase de polímeros (met)acrílicos y copolímeros de anhídrido maleico y derivados de alqueno, preferentemente un carbómero o un EMA®.

35 El documento WO 02/03961 divulga un sistema de administración de ácido nucleico que comprende moléculas de ácido nucleico encapsuladas en microesferas biodegradables, adecuado para administrar vacunas de ADN, que comprende un adyuvante para modular la eficacia inmunoestimuladora, comprendiendo dicho adyuvante un aminoalquil glucosaminido-4-fosfato (AGP).

40 El documento WO99/30733 divulga un procedimiento para potenciar una respuesta inmunitaria basada en una combinación de polinucleótido y polipéptido. Las composiciones farmacéuticas que comprenden ADN + polipéptido pueden contener un hidróxido de aluminio (Al(OH)₃) preparado especialmente. El antígeno proteico se adsorbió en hidróxido de aluminio (ejemplo 8) y, posteriormente, se coacervó con policaprolactona para crear una forma compleja con liberación lenta del antígeno desde el Al(OH)₃ tratado especialmente. Este complejo se mezcló después con el ADN en la proporción de 2 µg de proteína y 10 µg de ADN antes de su uso. No se investigaron más enfoques para la adyuvación de la combinación de péptido-nucleótido usando otros adyuvantes de base mineral.

45 El documento WO 97/28818 divulga vacunaciones y vacunas que comprenden un ácido nucleico que codifica un primer epítipo y un péptido que codifica un segundo epítipo, en particular la transfección *in vitro* de CPA (células presentadoras de antígeno) con antígeno codificado por ADN (y no tejido muscular, que es el tejido diana habitual para la inmunización con ADN), y se demostró la presencia simultánea de antígeno peptídico, así como de antígeno codificado por ADN y transcrito en APC. Se analizaron varios sistemas de administración y vectores y se especuló (pág. 42) sobre el posible uso de una amplia variedad de adyuvantes, pero no se proporcionó ningún dato experimental para el uso de ningún adyuvante.

55 El documento WO00/68259 revela el uso de seroalbúmina bovina como un antígeno proteico modelo, pero no se refiere a una composición de vacuna que comprende un componente de vacuna de polinucleótido y un componente de vacuna de antígeno proteico.

El documento WO93/24148 se refiere a vacunas combinadas que comprenden el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y otros antígenos, en las que el HBsAg se adsorbe a fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio. Sin embargo, el documento WO93/24148 no se refiere a una composición de vacuna que comprende un componente de vacuna de polinucleótido y un componente de vacuna de antígeno proteico.

- 5 Las vacunas convencionales permiten la combinación de antígenos diferentes, pero sólo dentro del grupo de componentes de vacuna adyuvadas o dentro del grupo de organismos pertinentes a vacunas vivas atenuadas no adyuvadas. El grupo anterior, que está adyuvado principalmente por sales minerales, da lugar a una respuesta de Th2 que es protectora frente a las enfermedades mencionadas, mientras que una adyuvación similar podría tener un efecto inhibitorio sobre la respuesta inmunitaria necesaria para la protección contra los componentes de la vacuna viva atenuada (E.B. Lindblad y col., Infect. Immun. 65(2):623-629 (1997)). Actualmente, esta dicotomía limita las posibilidades de preparar vacunas de combinación en la que estén representadas, respectivamente, las enfermedades de los dos grupos. Las enfermedades cubiertas por las vacunas vivas atenuadas requieren a menudo una respuesta inmunitaria de tipo Th1, ya que la protección contra estas enfermedades no depende sólo de una respuesta de anticuerpos.
- 10
- 15 Todavía existe la necesidad de investigar más para mejorar la inmunogenicidad de las vacunas de ADN. Cabe destacar a este respecto que, por lo que saben los inventores, la posibilidad de combinar vacunas de ADN a base de nucleótidos con vacunas convencionales a base de proteínas o proteínas adsorbidas para establecer una combinación eficaz de estas dos tecnologías no se ha explorado hasta el momento, especialmente no en relación con el uso de adyuvantes de base mineral cargados negativamente.
- 20 La tecnología de vacunas de ADN tiene el potencial de inducir la respuesta de tipo Th1 necesaria para la protección contra esas enfermedades que actualmente se evitan mediante el grupo de vacunas vivas atenuadas. La presente invención proporciona una combinación de al menos una vacuna de ADN con una o más vacunas estimuladoras de Th2 adyuvadas de forma clásica, superando de este modo tales limitaciones de preparar un programa extenso de vacunas de combinación.

25 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona una composición de vacuna combinada de ADN/antígeno proteico adecuada para su administración a un huésped vertebrado, incluido el ser humano, que comprende:

- 30 (a) un componente de vacuna de polinucleótido que comprende al menos un polinucleótido que codifica al menos un antígeno, de forma que la introducción de dicha formulación en dicho huésped vertebrado da como resultado la expresión de una cantidad biológicamente eficaz de dicho antígeno o antígenos para inducir una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica;
- (b) un componente de vacuna de antígeno proteico que comprende al menos un antígeno proteico seleccionado del grupo de antígenos proteicos modelo y antígenos proteicos de vacuna; y
- 35 (c) un adyuvante de base mineral cargado negativamente, que se caracteriza además por el hecho de que dicho adyuvante cargado negativamente, de base mineral, se incubaba previamente o se mezcla con dicho al menos un componente de vacuna de antígeno proteico antes de formularse con dicho componente de vacuna de polinucleótido.

40 En una realización preferida de la invención, dicho adyuvante cargado negativamente, de base mineral, es un adyuvante seleccionado del grupo de adyuvantes a base de fosfato de aluminio y a base de hidroxifosfato de aluminio.

En otra realización de la invención, dicho adyuvante de base mineral, cargado negativamente, es un adyuvante seleccionado del grupo de adyuvantes a base de fosfato de calcio y a base de hidroxifosfato de calcio.

Así, la presente invención se refiere a una composición de vacuna como se describe en el presente documento, en la que dicho adyuvante de base mineral cargado negativamente es una sal de aluminio o una sal de calcio.

- 45 En consecuencia, la presente invención se refiere a una composición de vacuna como se describe en el presente documento, en la que dicha sal de aluminio o calcio se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, hidroxifosfato de aluminio, hidróxido de aluminio tratado con fosfato, fosfato de calcio, hidroxifosfato de calcio e hidróxido de calcio tratado con fosfato.

50 Los componentes de vacuna de polinucleótido adecuados que pueden usarse en la composición de vacuna de acuerdo con la invención incluyen componentes de vacunas en las que los adyuvantes de aluminio clásicos se consideran inadecuados para producir la protección, por ejemplo, bacterias parásitas intracelulares como *Mycobacterium sp.* y *Leishmania sp.*, y virus como citomegalovirus (CMV), HTLV-I, VIH, hepatitis C y D, gripe, sarampión, rubéola y antígenos asociados a tumores.

Los antígenos proteicos modelo adecuados pueden variar desde proteínas con PIE ácido, tales como la

seroalbúmina bovina y la seroalbúmina humana, hasta proteínas con PIE básico, tales como lisozima.

Los antígenos proteicos de vacuna adecuados incluyen, pero no se limitan a, toxinas destoxificadas, así como otros antígenos pertinentes de vacuna usados actualmente en vacunas convencionales contra, por ejemplo, tétanos, difteria, botulismo, tos ferina, poliomieltis inactivada, hepatitis A y B y similares.

5 Así, la presente invención se refiere a una composición de vacuna como se describe en el presente documento, en el que dicho grupo de antígenos proteicos de vacuna incluye una proteína de superficie o una proteína del núcleo del VHB, una toxina destoxificada de la bacteria *Clostridium tetani* (es decir, toxoide tetánico), una toxina destoxificada de la bacteria *Clostridium botulinus* (es decir, toxoide botulínico) y una toxina destoxificada de la bacteria *Corynebacterium diphtheriae* (es decir, toxoide de difteria).

10 En consecuencia, la presente invención se refiere a una composición de vacuna como se describe en el presente documento, en la que dicho grupo de antígenos proteicos de vacuna incluye antígenos proteicos derivados de poliovirus inactivado.

15 En un aspecto más de la invención se proporciona el uso de un adyuvante cargado negativamente, de base mineral como un componente en una composición de vacuna combinada a base de ADN/proteína como se define en el presente documento.

En otro aspecto de la invención se proporciona un kit que comprende una composición de vacuna como se define anteriormente, en una forma de dosificación unitaria para su administración a un receptor vertebrado, incluido el ser humano.

20 En otro aspecto más de la invención se proporciona un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria en un huésped vertebrado que comprende introducir una composición de vacuna como se define anteriormente en dicho huésped vertebrado.

25 Así, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición de vacuna como se describe en el presente documento, en la que un adyuvante cargado negativamente se preincuba o se mezcla con al menos un componente de vacuna de antígeno proteico antes de la formulación con un componente de vacuna de polinucleótido.

En la siguiente descripción detallada se describirán con más detalle éstas y otras formas de realización de la presente invención.

Breve descripción del dibujo

30 La figura 1 muestra que la coadministración de ADN plasmídico y vacunas proteicas en fosfato de aluminio ($AlPO_4$) incrementa la valoración de Ac contra ambos antígenos. Se vacunaron ratones BALB/c por vía intramuscular mediante inyección única de la combinación de 5 µg de partículas recombinantes (HBcAg o HBsAg) y 50 µg de ADN plasmídico que codifica HBsAg o HBcAg (pCI/S, pST/C). Las vacunas que contenían rHBcAg y pCI/S (grupo 1,2) o rHBsAg y pST/C (grupo 3,4) se administraron solas (grupo 1,3) o formuladas con adyuvante de $AlPO_4$ (grupo 2,4). Se obtuvieron sueros 4 semanas después de la inmunización y se sometieron a pruebas para evaluar los anticuerpos anti-HBsAg (panel izquierdo) y anti-HBcAg (panel derecho) mediante ELISA. Se muestran las valoraciones de anticuerpos medias de 3 ratones individuales.

Definiciones

40 La expresión "vacuna de polinucleótido" (VPN) que es idéntica a "vacuna de ADN", como se usa en el presente documento, pretenden indicar un vector de ADN que contiene un gen que codifica un antígeno vírico, bacteriano, parasitario o tumoral que se ha demostrado que expresa ese antígeno correspondiente después de administrarse al vertebrado, por ejemplo, mediante inyección intramuscular.

45 La expresión "antígeno proteico modelo" como se usa en el presente documento pretende definir una proteína que no deriva de un microorganismo infeccioso que puede provocar una o más enfermedades. Por consiguiente, un antígeno proteico modelo no se incluye en una preparación de vacuna con el objetivo de producir una respuesta inmunitaria protectora frente a la proteína modelo misma.

La expresión "vacunas convencionales", como se usa en el presente documento, pretende definir vacunas bien establecidas, tanto si se basan en (1) componentes de vacunas vivas, atenuadas (no adyuvadas) como en (2) componentes de vacunas muertas inactivadas, células completas muertas, componentes peptídicos o de subunidad purificados (que están coadyuvadas), usando, p. ej., adyuvantes minerales.

50 La expresión "antígeno proteico de vacuna" como se usa en el presente documento, se refiere a un antígeno, independientemente de si es un fragmento celular que contiene proteínas, una proteína purificada, un péptido sintético o si, en su naturaleza se compone sólo de aminoácidos o de aminoácidos en combinación con otras moléculas biológicas, como hidratos de carbono o lípidos, derivado de un organismo infeccioso contra el que se pretende que proteja la vacuna. El propósito de incluir el antígeno proteico de vacuna es inducir inmunidad

protectora y específica frente a la infección provocada por el organismo a partir del que se derivó la vacuna proteica pertinente.

5 El término "adyuvante", como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más compuestos que potencian la respuesta inmunitaria contra los componentes antigénicos de la formulación de vacuna o contribuyen a la administración del nucleótido o proporcionan un efecto estimulador de la respuesta inmunitaria frente a los productos de transcripción de los nucleótidos de ADN inyectados.

10 La expresión "adyuvante de fosfato de base mineral cargado negativamente", como se usa en el presente documento, se refiere a adyuvantes en gel de hidroxifosfato de aluminio o fosfato de aluminio preformado y similares, que se caracterizan por tener un punto de carga cero (PCC) ácido. También se refiere a una formulación mediante la que un adyuvante de hidróxido de aluminio preformado (que normalmente tiene un PCC alcalino) se incuba con iones fosfato después de su formación para formar un complejo con éstos, procedimiento mediante el cual, posteriormente, logra un PCC ácido. También se refiere a adyuvantes a base de fosfato de calcio o hidroxifosfato de calcio.

15 La expresión "punto de carga cero" o "PCC", como se usa en el presente documento se refiere al valor de pH específico al que un adyuvante de base mineral dado no tiene carga neta. Así, el PCC es análogo al punto isoeléctrico (PIE) de una proteína como se sabe de la química de proteínas. A valores de pH por encima del PCC la carga neta del adyuvante de base mineral es negativa y por debajo del PCC la carga neta del adyuvante de base mineral es positiva.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento, después de una investigación y experimentación extensas, de que la potenciación mediada por fosfato de aluminio o hidroxifosfato de aluminio de la inmunogenicidad de las vacunas de ADN mejoraba adicionalmente preincubando fosfato de aluminio o hidroxifosfato de aluminio con al menos una proteína adecuada. También se descubrió que pueden usarse fosfato de aluminio e hidroxifosfato de aluminio y sus homólogos de calcio para combinar vacunación a base de proteínas y de ADN para cebar una
25 inmunidad específica potenciada y diferenciada.

La invención se refiere en un aspecto a una formulación de vacuna novedosa que comprende moléculas de ácido nucleico y un adyuvante de base mineral, cargado negativamente administrado en una concentración biológicamente eficaz para promover la inducción eficaz de una respuesta inmunitaria dirigida frente a uno o más antígenos específicos codificados por la(s) molécula(s) de ácido nucleico. De acuerdo con este aspecto, el adyuvante, cuando
30 se administra en combinación, p. ej., preincubado o premezclado con una proteína adecuada, parece tener un aspecto diferente en comparación con las formulaciones de vacuna originales en las que se basa esta mejora que se han descrito extensamente, entre otros, en el documento WO 00/2591. Además de la mejora definida anteriormente, puede aplicarse igualmente a la presente invención cualquier aspecto de dicha divulgación incluyendo definiciones, la preparación de las formulaciones farmacéuticas, la selección y las cantidades de ingredientes, los procedimientos de inducción de una respuesta inmunitaria en un huésped vertebrado usando las formulaciones farmacéuticas, la
35 manera de administrar las formulaciones al huésped vertebrado, las enfermedades o trastornos que se van a tratar con las formulaciones, etc.

La presente invención se basa además en el sorprendente descubrimiento de que la potenciación está mediada por el adyuvante de fosfato de base mineral cargado negativamente (como se ejemplifica por, entre otros, el fosfato de
40 aluminio y el hidroxifosfato de aluminio), con una proteína adecuada, como se ejemplifica, bien por una proteína modelo, tal como una proteína con PIE ácido, por ejemplo, seroalbúmina bovina (BSA), que tiene baja afinidad de adsorción o bien por una proteína con PIE básico, por ejemplo, la lisozima de huevo de gallina (HEL), que tiene alta afinidad de adsorción o, alternativamente, un antígeno proteico pertinente de vacuna, tal como se ejemplifica por,
45 pero sin limitarse a, dos antígenos pertinentes de vacuna del virus de la hepatitis B (VHB), es decir, su proteína de la envuelta (antígeno de superficie de hepatitis B, HBsAg) y su nucleoproteína (antígeno nuclear de la hepatitis B, HBcAg). En consecuencia, un antígeno proteico, se pretenda o no que provoque respuestas inmunitarias protectoras contra sí mismo, puede coadministrarse adecuadamente y de forma ventajosa con vacunas de ADN formuladas en fosfato de aluminio, hidroxifosfato de aluminio u otro adyuvante mineral cargado negativamente.

Se descubrió además que el $AlPO_4$ es particularmente adecuado como un adyuvante para formular una composición
50 de vacuna que administra antígenos de expresión codificada por plásmidos con antígenos proteicos recombinantes. La composición de vacuna combina (i) el efecto adyuvante de $AlPO_4$, (ii) el efecto adyuvante del ADN plasmídico, (iii) la administración inmunogénica potenciada de una vacuna de ADN por $AlPO_4$ y (iv) el co-cebado potente de respuestas inmunitarias humorales y celulares, multiespecíficas, frente a una variedad de antígenos que normalmente se logra sólo mediante inmunización con vacunas que contienen patógenos vivos atenuados o
55 muertos.

Al analizar el cebado de respuestas de CTL y humorales murinas frente a antígenos pertinentes de vacuna formulados en adyuvantes a base de aluminio, no se suministraron inyecciones de refuerzo para determinar exclusivamente la potencia de las formulaciones de vacuna bajo estudio al cebar las repuestas de CTL y

dependientes de linfocitos T. (Se entenderá que las inyecciones de refuerzo no están excluidas de la presente invención).

- Se sabe que el ADN plasmídico y las proteínas con un PIE ácido se adsorben de forma eficaz sobre $Al(OH)_3$, pero no sobre $AlPO_4$ [J.B. Ulmer y col., *Vaccine* (1999) 18:18-28; S.J. Seeber y col., *Vaccine* (1991) 9:201-203]. No se ha logrado una administración inmunogénica de vacunas de ADN con adyuvante convencional de $Al(OH)_3$, aunque el $Al(OH)_3$ se usa ampliamente para administrar antígenos proteicos en forma inmunogénica. Sin comprometerse con ninguna teoría, los presentes inventores creen que el elevado contenido de fosfato de la hebra de ADN puede dar lugar a la muy elevada afinidad de unión a $Al(OH)_3$ y que esta unión dificulta la transcripción posterior del antígeno proteico codificado por el ADN. Frecuentemente, se ha propuesto que un "efecto de depósito", es decir, la liberación lenta de antígeno in situ combinada con un efecto inmunoestimulador de la sal de aluminio, subyace a la actividad adyuvante. La falta de adsorción del ADN plasmídico sobre $AlPO_4$ (pero no $Al(OH)_3$) parece ser un requisito previo esencial para su capacidad de administrar vacunas de ADN de una forma adecuada y funcional. Cuando se inyectan i.m. dosis bajas de una vacuna de ADN "desnudo" sin adyuvantes, se observa un cebado específico de respuestas de CTL, pero no de anticuerpos en suero [W. Böhm y col., *J. Immunol. Methods* (1996) 193:29-40]. La administración de una vacuna de ADN por $AlPO_4$ no potenció su capacidad para cebar la polarización específica de la respuesta de los componentes individuales de la vacuna. Los antígenos codificados por vacunas de ADN cebarían de forma preferente la inmunidad de Th1, mientras que los antígenos formulados en el $AlPO_4$ como proteínas recombinantes inducirían de forma preferente la inmunidad de Th2. Esto se muestra claramente en la figura 1, donde puede verse que la respuesta de anticuerpos derivada de ADN se inclina hacia la subclase IgG2a, que indica inmunidad de Th1, mientras que la respuesta de anticuerpos derivada de proteínas se inclina hacia la subclase IgG1, que indica inmunidad de Th2. Esto no tiene en cuenta características intrínsecas de un antígeno que pueden dirigir la polarización de la respuesta inmunitaria que inducen hacia una desviación de Th1 o Th2 independiente del entorno de citocinas prevalente localmente [P. Riedl y col., *J. Immunol.* (2002) 168:4951-4959; J. Reimann y R. Schirmbeck, *Dev. Biol.* (2000) 104:15]. Sin embargo, el punto clave es que la administración de la vacuna de acuerdo con la presente invención respalda la formulación de una sola vacuna compuesta de tipos muy diferentes de construcciones de vacuna que ceban in situ un espectro de respuestas inmunitarias que difieren en la especificidad y en el repertorio de funciones efectoras específicas que pueden mediar, es decir, un Th1 diferenciado frente al antígeno codificado por el ADN, incluyendo una respuesta de CTL, y una respuesta de Th2 frente al antígeno proteico.
- Se formularon vacunas experimentales en las que se mezclaron dosis bajas (1-5 μ g/ratón) de ADN plasmídico codificador de antígeno junto con dosis bajas de un antígeno proteico modelo (BSA) o un antígeno proteico pertinente de vacuna (HBsAg o HbcAg) con fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio. Las respuestas inmunitarias producidas por esta vacuna de combinación contra el antígeno proteico adsorbido a fosfato de aluminio se potenciaron en presencia de la vacuna de ADN, y no interfirieron con las respuestas inmunitarias contra el antígeno codificado por la vacuna de ADN.

Para ser más específicos, dosis bajas de diferentes vacunas de ADN formuladas con $AlPO_4$ indujeron respuestas humorales potenciadas y apoyaron el cebado de la inmunidad celular restringida por el MHC de clase I. Las diferentes proteínas mezcladas con la vacuna de ADN plasmídico en la formulación de $AlPO_4$ no dificultaron su inmunogenicidad. La coinyección de dos antígenos diferentes pertinentes de vacuna en la misma formulación de $AlPO_4$, uno como vacuna de ADN, el otro como una proteína recombinante, produjo respuestas inmunitarias humorales y celulares polivalentes frente a todos los antígenos administrados. Los perfiles de isotipo de las respuestas humorales inducidas y los perfiles de citocina de las respuestas de linfocitos T cebadas específicamente indicaron que las vacunas combinadas apoyaban el co-cebado de respuestas desviadas hacia Th1 y Th2, así como de respuestas diferenciadas.

Por lo tanto, los adyuvantes cargados negativamente, de base mineral, tales como fosfato de aluminio y, por ejemplo, también hidroxifosfato de aluminio, que contienen antígeno proteico, no sólo pueden potenciar de forma eficaz las vacunas de ADN plasmídico, sino que también proporcionan una estrategia novedosa para la administración de vacunas combinadas de proteínas/ADN multivalentes inmunogénicas.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que, no obstante, no pretenden limitar la invención en modo alguno.

Experimentación

Se eligió la inmunización de ratones BALB/c con vacunas a base de proteínas o ADN como el modelo preclínico, ya que una cantidad significativa de la experiencia preclínica obtenida con enfoques de vacunación novedosos se ha generado en esta especie.

- Se usaron procedimientos de inmunización estándar basados en la inyección intramuscular de 5, 50 o 100 μ g de vacunas de ADN plasmídico o de 0,5-5 μ g de antígeno proteico.

1. Mezclar una proteína modelo (antígeno) junto con una vacuna de ADN plasmídico con fosfato de Al o hidroxifosfato de Al potencia la inmunogenicidad de este último

Se inmunizaron i.m. ratones BALB/c con 5, 50 o 100 µg de ADN del plásmido pCI/S (que codifica el HBsAg pequeño).

El ADN se administró:

- sin vehículo (como ADN plasmídico "desnudo")
- 5 - con fosfato de aluminio
- sin antígeno proteico añadido
- con (A) BSA o (B) HEL añadidas

La respuesta de anticuerpos se determinó 4 semanas después de una única inmunización.

(A) Sistema de BSA (véase la tabla 1)

10 Tabla 1

grupo	vacuna de ADN de pCI/S (µg/ratón)	proteína (BSA)	fosfato de aluminio	valoración de anticuerpo sérico anti-HBsAg mUI/ml
1	5	-	-	<10
2	50	-	-	978
3	100	-	-	1898
4	5	-	+	458
5	50	-	+	2889
6	5	+	-	<10
7	50	+	-	2756
8	5	+	+	1789
9	50	+	+	4572
10	-	+	-	<10

(B) Sistema de HEL (véase la tabla 2)

Tabla 2

grupo	vacuna de ADN de pCI/S (µg/ratón)	proteína (HEL)	fosfato de aluminio	valoración de anticuerpo sérico anti-HBsAg mUI/ml
1	5	-	-	<10
2	50	-	-	613
3	100	-	-	965
4	5	-	+	549
5	50	-	+	2790
6	5	+	-	<10
7	50	+	-	1473
8	5	+	+	753
9	50	+	+	3317
10	-	+	-	<10

Estos resultados permiten las conclusiones siguientes:

- Se induce una respuesta de anticuerpos dependiente de dosis contra un antígeno codificado por un nucleótido de ADN mediante una única inyección i.m. de la vacuna de ADN de pCI/S.
- 5 - La inmunogenicidad de la vacuna de ADN de pCI/S se potencia cuando se mezcla antes de la administración i.m. con fosfato de aluminio o hidroxifosfato de aluminio.
- Cuando se mezclan antígenos proteicos (BSA) con fosfato de aluminio o hidroxifosfato de aluminio también se potencia notablemente la inmunogenicidad de la vacuna de ADN de pCI/S mezclada también con fosfato de aluminio o hidroxifosfato de aluminio.

2. Mezcla de un antígeno proteico de vacuna y una vacuna de ADN plasmídico con fosfato de Al

10 Se inmunizaron i.m. ratones BALB/c con 5, 50 o 100 µg de ADN del plásmido pCI/LC149 (que codifica una variante truncada, segregada, del antígeno nuclear del VHB HBcAg).

La vacuna de ADN se administró:

- sin vehículo (como ADN plasmídico "desnudo")
- con fosfato de aluminio
- 15 - sin antígeno proteico añadido
- con HBsAg añadido

Se administró HBsAg (2 µg/ratón).

- sin vehículo (como partículas proteicas "desnudas")
- con fosfato de aluminio
- 20 - sin antígeno proteico añadido
- con vacuna de ADN añadida

La respuesta de anticuerpos se determinó 4 semanas después de una única inmunización. Los resultados se muestran en Tabla 3 siguiente.

Tabla 3

grupo	vacuna de ADN de pCI/CL ₁₄₉ (µg/ratón)	Antígeno proteico: HBsAg	fosfato de aluminio	valoración recíproca de anticuerpos anti-HBc/eAg a punto final	valoración de anticuerpo sérico anti-HBsAg mUI/ml
1	5	-	-	<10	<10
2	50	-	-	10000	<10
3	100	-	-	26000	<10
4	5	-	+	2500	<10
5	50	-	+	75000	<10
6	5	+	-	<10	2187
7	50	+	-	10000	3210
8	5	+	+	12500	2630
9	50	+	+	120000	3540
10	-	+	+	<10	2100

25

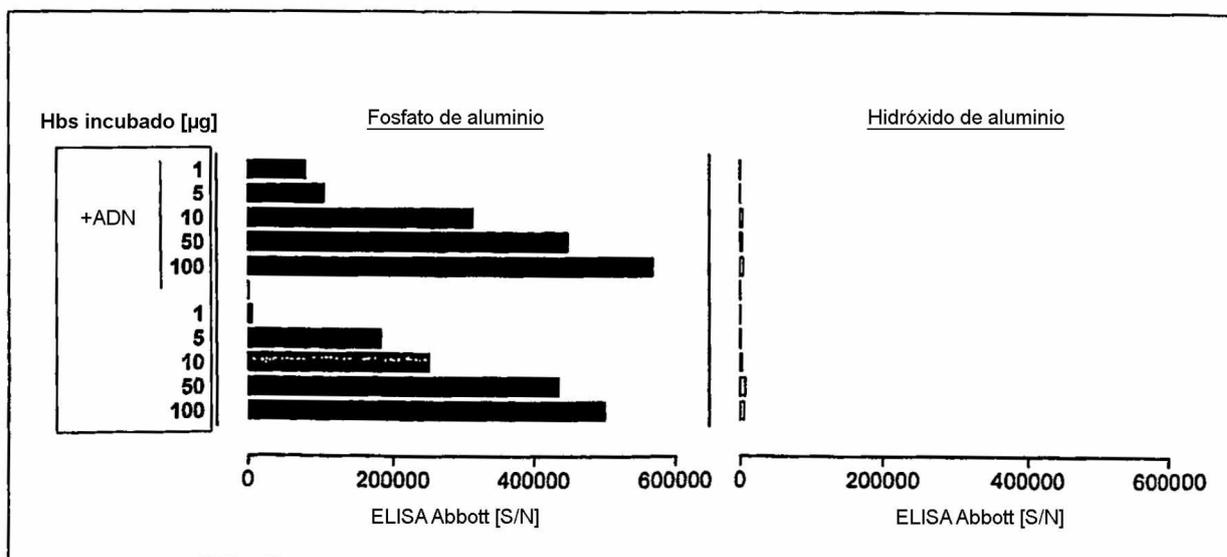
Estos resultados permiten las conclusiones siguientes:

- Se induce una respuesta dependiente de anticuerpos mediante una única inyección i.m. de la vacuna de ADN de plásmido pCI/LC₁₄₉; la inmunogenicidad de la vacuna de ADN se potencia cuando se mezcla antes de su administración i.m. con fosfato de aluminio o hidroxifosfato de aluminio.
- 5 - Los antígenos proteicos (HBsAg) y las vacunas de ADN que se mezclan con fosfato de aluminio o hidroxifosfato de aluminio ceban respuestas inmunitarias polivalentes.

3. Adsorción del antígeno proteico de vacuna (HBsAg) a fosfato de Al/hidroxifosfato de Al o hidróxido de Al

Experimentos *in vitro*:

- 10 i. se incubaron 91µl = 450 µg de Al, bien de fosfato de aluminio o bien de hidróxido de aluminio durante 24 horas a 4 °C (bajo agitación constante) con 100, 50, 10, 5 o 1 µg de HBsAg en un volumen total de 200 µl; adicionalmente, se incubó un juego de muestras en paralelo con 50 µg de ADN plasmídico.
- ii. se precipitó por centrifugación el alumbre y se recogieron los sobrenadantes.
- iii. el HBsAg (Abbott AxSym HBsAg V2-kit (n.º de cat. 7A 10-22, Abbott, Wiesbaden, Alemania) de los sobrenadantes (S/N) se midió mediante el ELISA de Abbott.
- 15 Los resultados se muestran el gráfico siguiente.



20 El antígeno HBsAg se detectó fácilmente en los S/N de mezclas de antígeno con fosfato de aluminio (incluso cuando se mezclaron cantidades tan bajas como sólo 1 µg de HBsAg con el adyuvante de fosfato), mientras que el HBsAg no fue detectable después de la incubación con hidróxido de aluminio. No se observaron diferencias en la liberación de HBsAg cuando el ADN plasmídico se mezcló también (junto con la proteína HBsAg) con la preparación de adyuvante de aluminio.

Estos resultados permiten las conclusiones siguientes:

- El fosfato de aluminio y el hidroxifosfato de aluminio no se adsorben a HBsAg pero el hidróxido de aluminio se adsorbe a HBsAg de forma eficaz.
- 25 - El ADN plasmídico en las cantidades aplicadas adecuadas para la vacunación no tiene influencia sobre la adsorción o la no adsorción de antígenos proteicos a adyuvantes de aluminio.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna adecuada para su administración a un huésped vertebrado, incluido el ser humano, que comprende:
- 5 (a) un componente de vacuna de polinucleótido que comprende al menos un polinucleótido que codifica al menos un antígeno, de forma que la introducción de dicha formulación en dicho huésped vertebrado da como resultado la expresión de una cantidad biológicamente eficaz de dicho antígeno o antígenos para inducir una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica;
- (b) un componente de vacuna de antígeno proteico que comprende al menos un antígeno proteico seleccionado del grupo de antígenos proteicos modelo y antígenos proteicos de vacuna; y
- 10 (c) un adyuvante cargado negativamente, de base mineral,
- además **caracterizada porque** dicho adyuvante cargado negativamente de base mineral se preincuba o se mezcla con dicho al menos un componente de vacuna de antígeno proteico antes de la formulación con dicho componente de vacuna de polinucleótido.
2. Una composición de vacuna según la reivindicación 1, en la que dicho adyuvante cargado negativamente de base mineral es una sal de aluminio o una sal de calcio.
- 15 3. Una composición de vacuna según la reivindicación 2, en la que dicha sal de aluminio o calcio se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, hidroxifosfato de aluminio, hidróxido de aluminio tratado con fosfato, fosfato de calcio, hidroxifosfato de calcio e hidróxido de calcio tratado con fosfato.
4. Una composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho grupo de antígenos proteicos modelo varía desde proteínas con punto isoelectrónico (PIE) ácido hasta proteínas con PIE alcalino.
- 20 5. Una composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho grupo de antígenos proteicos de vacuna incluye una proteína de superficie o una proteína del núcleo del VHB, una toxina destoxificada de la bacteria *Clostridium tetani*, el toxoide tetánico, una toxina destoxificada de la bacteria *Clostridium botulinus*, el toxoide botulínico, y una toxina destoxificada de la bacteria *Corynebacterium diphtheriae*, el toxoide de la difteria.
- 25 6. Una composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho grupo de antígenos proteicos de vacuna incluye antígenos proteicos derivados del poliovirus inactivado.
7. Un kit que comprende una composición de vacuna como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en una forma de dosificación unitaria para su administración a un receptor vertebrado, incluido el ser humano.
- 30 8. Procedimiento para preparar una composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que un adyuvante cargado negativamente con base mineral se preincuba o se mezcla con al menos un componente de vacuna de antígeno proteico antes de la formulación con un componente de vacuna de polinucleótido.

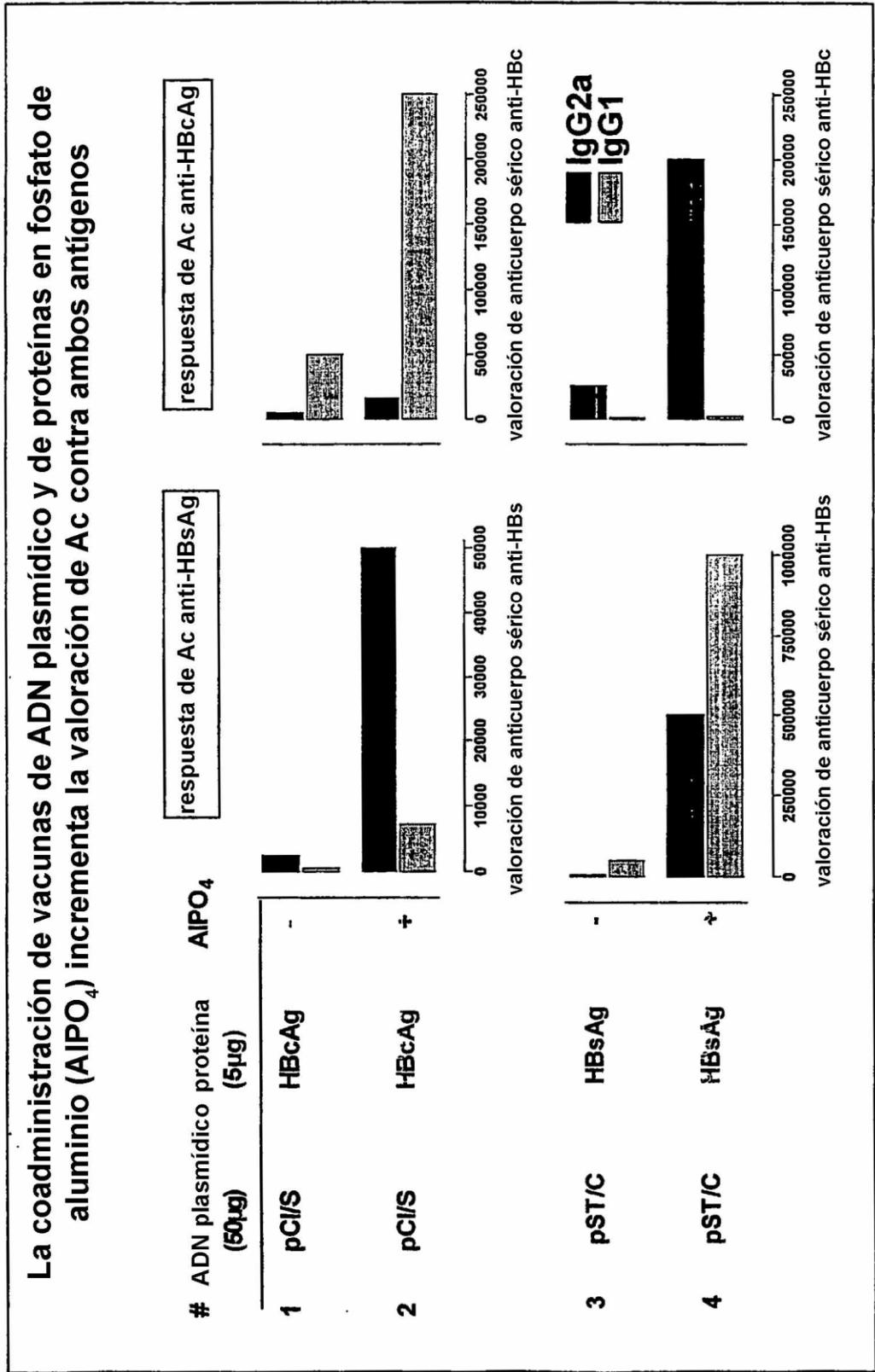


FIG. 1