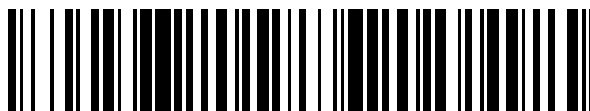


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 412**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2008** **E 08725654 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014** **EP 2129389**

54 Título: **Método para aumentar la respuesta de los linfocitos T**

30 Prioridad:

15.02.2007 US 901980 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2015

73 Titular/es:

MANNKIND CORPORATION (100.0%)
28903 NORTH AVENUE PAINE
VALENCIA, CA 91355, US

72 Inventor/es:

KUNDIG, THOMAS;
BOT, ADRIAN;
SMITH, KENT ANDREW y
QIU, ZHIYONG

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 527 412 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

Método para aumentar la respuesta de los linfocitos T

Campo de la invención

5 Las realizaciones de la invención se refieren a los campos de desarrollo de inmunología y vacunas. Las realizaciones de la invención que se desvelan en el presente documento se refieren a métodos y composiciones para aumentar la inmunización y la vacunación. Más particularmente, las realizaciones de la presente invención se refieren a un método para mejorar la estimulación de las respuestas de los linfocitos T. Algunas realizaciones de la invención presentan adicionalmente utilidad como una estrategia de vacunación en el tratamiento de enfermedades tales como enfermedades infecciosas o cáncer.

10 **Antecedentes**

Las vacunas atenuadas vivas normalmente inducen respuestas inmunes fuertes y de larga duración después de una inyección, y muchas vacunas virales de este tipo tienen eficacias superiores a un 90 % (Nossal, G. Vaccines in Fundamental Immunology (ed., Paul, W.E.) 1387-1425; Lippincot-Raven Publishers, Filadelfia, 1999. Por el contrario, las vacunas que consisten en microorganismos muertos, toxinas, vacunas subunitarias que incluyen vacunas de péptidos, o vacunas de ADN desnudo, presentan una eficacia considerablemente menor, y las inmunizaciones de refuerzo son fundamentales. Aunque las vacunas vivas producen dosis crecientes de antígeno que exigen respuestas inmunes fuertes, las vacunas de no replicación producen una disminución del perfil antigénico es decir, tal como se demuestra en los ejemplos en el presente documento, un estímulo bastante débil para los linfocitos T.

El documento de patente WO 2006/120474 describe composiciones de sensibilización y refuerzo y métodos para inducir una respuesta inmune, en particular una respuesta de los linfocitos T CD8⁺ a un antígeno. En algunas realizaciones, la segunda composición de refuerzo se administra a una dosis mayor que la primera composición de refuerzo. El documento de patente WO 2003/103636 describe un régimen de inmunización/vacunación y un medio de administración del mismo en el que se administran uno o más agentes biológicamente activos a un animal en una sola ocasión, pero que se libera durante un período de tiempo predeterminado.

25 Existe una necesidad continua de desarrollar modelos de inmunización que aumenten las respuestas de los linfocitos T frente a enfermedades tales como, pero no limitadas a, enfermedades infecciosas o cáncer. Por lo tanto, las realizaciones de la invención que se desvelan en el presente documento se refieren a un enfoque inmunoterapéutico que implica el aumento de la estimulación antigénica durante el transcurso de la inmunización, independientemente de la dosis de antígeno total acumulativa, para aumentar la inmunogenicidad. Por lo tanto, las realizaciones de la invención que se desvelan en el presente documento proporcionan una revisión de los modelos de inmunización actuales y métodos y composiciones para el diseño y uso de vacunas e inmunoterapias.

Sumario de la invención

Las realizaciones de la invención que se desvelan en el presente documento se refieren a métodos y composiciones para optimizar las respuestas de los linfocitos T CD8⁺. Por lo tanto, algunas realizaciones de la invención se refieren a métodos para estimular una respuesta de los linfocitos T restringida por MHC de clase I en un mamífero; el método comprende la administración de una pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica al mamífero en el que cada dosis posterior a la dosis inicial es mayor a la dosis inmediatamente precedente.

En otra realización más, las dosis secuenciales aumentan como una función exponencial de la dosis inicial. La función exponencial se define con un factor exponencial $\geq 2^{n-1}$. En otras realizaciones, el factor exponencial es 5^{n-1} .

40 En algunas realizaciones, la composición inmunogénica comprende un inmunógeno más un inmunopotenciador o modificador de la respuesta biológica. El inmunopotenciador o modificador de la respuesta biológica puede ser, por ejemplo, pero no se limita a una citoquina, una quimioquina, un PAMP, un ligando unido a TLR, una secuencia inmunoestimuladora, un ADN que contiene CpG, un ARNs, un ligando Receptor de Reconocimiento de Patrones endocíticos (PRR), un LPS, una saponina de quillaja, a tucaresol, y similares.

45 La pluralidad de dosis puede ser más de 2 dosis. En otras realizaciones, la pluralidad de dosis comprende más de seis dosis. En algunas realizaciones de la invención, la pluralidad de dosis se puede ver afectada por la vida media ($t_{1/2}$) del inmunógeno. Por ejemplo, un inmunógeno con una vida media relativamente más corta puede necesitar administración más frecuente, y por lo tanto un número de dosis mayor, que un inmunógeno con una vida media relativamente más larga para conseguir resultados similares.

50 En algunas realizaciones, la última dosis se puede administrar dentro de 6 días de la primera dosis. En algunas realizaciones, la última dosis y por administrar dentro de 7, 8, 9, 10 o más días después de la primera dosis.

Las realizaciones de la invención se refieren a métodos en los que se obtiene un aumento de la respuesta en comparación con una inmunización usando la misma dosis acumulativa sin un aumento lineal o un aumento exponencial en la dosificación con el tiempo. El aumento de la respuesta puede comprender un aumento del número

- de linfocitos T que responden. En algunas realizaciones, el aumento de la respuesta puede comprender un aumento de la producción de una citoquina inmunoestimuladora. La citoquina puede ser, por ejemplo, IL-2 o IFN- γ . En algunas realizaciones, el aumento de la respuesta puede comprender un aumento de la actividad citolítica. En algunas realizaciones, el aumento de la respuesta puede comprender un retraso de la producción máxima de una citoquina inmunosupresora. La citoquina inmunosupresora puede ser, por ejemplo, IL-10.
- 5 Las realizaciones de la invención se refieren a métodos para administrar una composición inmunogénica a un mamífero mediante la administración directamente al sistema linfático. Por ejemplo, el método para administrar una composición inmunogénica a un mamífero puede ser por administración intranodal.
- 10 En algunas realizaciones de la invención, la composición inmunogénica se puede administrar a un mamífero por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intradérmica, por vía transdérmica, por vía transmucosal, por vía nasal, por vía bronquial, por vía oral, por vía rectal o similares.
- En algunas realizaciones, el inmunógeno se puede proporcionar como una proteína, péptido, polipéptido, epítipo sintético, mimótopo, o ácido nucleico que codifica a un antígeno.
- 15 El inmunógeno estimula una respuesta a un antígeno asociado con la enfermedad a tratar o proteger frente a ella. El antígeno puede ser, por ejemplo, pero no se limita, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno de diferenciación, un antígeno tumoral, un antígeno embrionario, un antígeno de oncogenes y genes supresores de tumores mutados, un antígeno tumoral único que tiene su origen en translocaciones cromosómicas. El antígeno puede ser un autoantígeno.
- 20 En algunas realizaciones, el inmunopotenciador puede ser un ligando unido a TLR. El ligando unido a TLR puede ser un ADN que contiene CpG. En algunas realizaciones, el inmunopotenciador puede ser un ARN bicatenario, por ejemplo poli IC.
- En el presente documento también se desvela un conjunto de composiciones inmunogénicas, en el que el conjunto incluye un inmunógeno, más un inmunopotenciador o modificador de la respuesta biológica, en el que las dosificaciones de los miembros individuales del conjunto se relacionan como una serie exponencial. En algunas realizaciones, las series exponenciales de dosificaciones se definen con un factor exponencial $\geq 2^{n-1}$. En algunas realizaciones, las series exponenciales de dosificaciones se definen con un factor exponencial de 5^{n-1} .
- 25 En el presente documento también se desvela un kit que comprende el conjunto de composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno y un inmunopotenciador o modificador de la respuesta biológica e instrucciones para la administración de las composiciones a un sujeto con necesidad de las mismas.
- 30 El inmunopotenciador o modificador de la respuesta biológica puede ser, por ejemplo, pero no se limita a, una citoquina, una quimioquina un PAMP, un ligando unido a TLR, una secuencia inmunoestimuladora, un ADN que contiene CpG, un ARNs, un ligando Receptor de Reconocimiento de Patrones endocíticos (PRR), un LPS, una saponina de quillaja, un tucaresol, y similares. Cada uno del inmunógeno, y el inmunopotenciador o modificador de la respuesta biológica, puede estar contenido en envases separados fue en el mismo envase.
- 35 El kit puede comprender dos o más dosis de una composición inmunogénica cada una en un envase adecuado separado. El envase adecuado puede ser, por ejemplo, pero no se limita a, una jeringa, una ampolla, un vial, y similares, o una combinación de los mismos.
- En el presente documento también se desvela un conjunto de jeringas que comprende dosis que aumentan secuencialmente de una composición inmunogénica en la que cada dosis posterior a una dosis inicial es mayor que la dosis inmediatamente precedente en cada jeringa del conjunto de jeringas y, en la que la composición inmunogénica comprende un inmunógeno, y un inmunopotenciador o modificador de la respuesta biológica, para aumentar la respuesta de los linfocitos T en un sujeto.
- 40 En otras realizaciones, la composición inmunogénica comprende una célula. La célula puede ser una célula tumoral o una célula que presenta antígeno, pero no se limita a la misma. En otras realizaciones, la célula que presentar antígeno puede ser una celular dendrítica. En otras realizaciones más, la composición inmunogénica comprende una célula.
- 45 En realizaciones adicionales, la dosis mayor comprende un aumento del número de células. En otra realización más, la dosis mayor comprende un aumento del número de complejos epítipo-MHC en la superficie de la célula.
- En el presente documento también se presenta un conjunto de viales que comprende dosis que aumentan secuencialmente de una composición inmunogénica en el que cada dosis posterior a una dosis inicial es mayor que la dosis inmediatamente precedente en cada vial del conjunto de viales y, en el que la composición inmunogénica comprende un inmunógeno, y un inmunopotenciador o modificador de la respuesta biológica, para aumentar una respuesta de los linfocitos T en un sujeto.
- 50 Algunas realizaciones se refieren al uso de una pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica

para estimular una respuesta de los linfocitos T restringida por MHC de clase I, en la que cada dosis posterior a una dosis inicial es mayor que la dosis inmediatamente precedente. En algunas realizaciones, la estimulación de una respuesta de los linfocitos T restringida por MHC de clase I es para el tratamiento de una enfermedad neoplásica o para el tratamiento de una enfermedad infecciosa, o ambas. En algunas realizaciones, la estimulación de una respuesta de los linfocitos T restringida por MHC de clase I es para la prevención de una enfermedad neoplásica o para la prevención de una enfermedad infecciosa, o ambas.

Algunas realizaciones se refieren al uso de una pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica que comprende un inmunógeno, y un inmunopotenciador o modificador de la respuesta biológica, en la preparación de un medicamento, en la que cada dosis posterior a una dosis inicial es mayor que la dosis inmediatamente precedente. Algunas realizaciones se refieren al uso de un conjunto de composiciones inmunogénicas que comprenden un inmunógeno, más un inmunopotenciador o modificador de la respuesta biológica, en la preparación de un medicamento, en el que las dosificaciones de los miembros individuales del conjunto se relacionan como una serie exponencial. Preferentemente, el medicamento estimula una respuesta de los linfocitos T restringida por MHC de clase I en un mamífero. Por lo tanto, el medicamento puede ser para el tratamiento de una enfermedad neoplásica o para el tratamiento de una enfermedad infecciosa, o ambas. En algunas realizaciones, el medicamento es para la prevención de una enfermedad neoplásica o para la prevención de una enfermedad infecciosa, o ambas.

Otros objetivos y características serán evidentes en parte y en parte se señalarán en lo sucesivo en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de realizaciones de la invención que se desvelan en el presente documento. La invención se puede comprender mejor por referencia a una o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas que se presentan en el presente documento.

La FIGURA 1 ilustra datos que indican que las dosis que aumentan exponencialmente tanto de gp33 como de CpG aumentan la respuesta de los linfocitos T CD8⁺.

La FIGURA 2 es un gráfico de barras que indica que el aumento de la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ es independiente de la ayuda de los linfocitos T.

La FIGURA 3 muestra datos que indican que cuatro días de estimulación con antígenos es óptima para la inducción de linfocitos T CD8⁺.

La FIGURA 4 ilustra datos que indican que el aumento de dosis exponencialmente tanto de gp33 como de CpG aumentan las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ antivirales.

La FIGURA 5 muestra datos que indican que la cinética antigénica no afecta a la activación de DC.

La FIGURA 6A ilustra datos de citometría de flujo que indican que la inmunización exponencial favorece la proliferación de linfocitos T persistentes.

La FIGURA 6B ilustra datos de citometría de flujo que indican que la inmunización exponencial favorece la proliferación de linfocitos T persistentes.

La FIGURA 7 muestra datos que indican que la inmunización exponencial con células dendríticas cargadas con péptidos induce fuertes respuestas de linfocitos T y antitumorales.

La FIGURA 8 ilustra datos que indican que la estimulación *in vitro* exponencial de los linfocitos T CD8⁺ aumenta la producción de IL-2 y la citotoxicidad.

Descripción detallada de la invención

El sistema inmune ha evolucionado para responder de forma óptima a los patógenos (Janeway, C.A., Jr. *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1, 1-13, 1989; Zinkernagel, R.M., *Science* 271, 173-8, 1996; Germain, R.N., *Nat Med* 10, 1307-20, 2004. La inmunización se puede optimizar, y la eficacia de las vacunas se puede aumentar, adoptando características de patógenos. Por ejemplo, para aumentar la fagocitosis y la presentación de antígenos, las vacunas se creen administrar en una forma de partículas con dimensiones comparables a los patógenos, tales como emulsiones, micropartículas, complejos de estimulación inmune, liposomas, virosomas y virus como partículas para aumentar la fagocitosis y la presentación de antígenos (O'Hagan, D.T. y Valiante, N.M. *Nat Rev Drug Discov* 2, 727-35, 2003. Además, se pueden usar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) que estimulan el sistema inmune a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), incluyendo receptores de tipo toll (TLR), como adyuvantes para activar las células que presentan antígenos y para aumentar la respuesta inmune a las vacunas (Johansen, P., *et al.*, *Clin Exp Allergy* 35, 1591-1598, 2005b; O'Hagan, D.T. y Valiante, N.M. *Nat Rev Drug Discov* 2, 727-35, 2003; Krieg, A.M., *Annu Rev Immunol* 20, 709-60, 2002. Una evidencia fundamental de los patógenos es la replicación. La replicación

de patógenos expone el sistema inmune a cantidades crecientes de antígeno y PAMP inmunoestimuladores en el tiempo.

Un paradigma actual en inmunología es que la resistencia y la calidad de las respuestas de los linfocitos T se pueden gobernar mediante la dosis de localización del antígeno así como mediante señales coestimuladoras. Las estrategias para mejorar la eficacia de la vacunación se pueden dirigir hacia el aumento de la duración de la presentación de antígenos (Lofthouse, S. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 863-70, 2002; Ehrenhofer, C. y Opdebeeck, J.P., *Vet Parasitol* 59, 263-73, 1995; Guery, J.C., *et al.*, *J Exp Med* 183, 485-97, 1996; Zhu, G., *et al.*, *Nat Biotechnol* 18, 52-7, 2000; Borbulevych, O.Y., *et al.*, *J Immunol* 174, 4812-20, 2005; Levitsky, V., *et al.*, *J Exp Med* 183, 915-26, 1996; van der Burg, S.H., *et al.*, *J Immuno* 156, 3308-14, 1996; Chen, J.L. *et al.*, *J Exp Med* 201, 1243-55, 2005; Rivoltini, L. *et al.*, *Cancer Res* 59, 301-6, 1999; Blanchet, J.S. *et al.*, *J Immunol* 167, 5852-61, 2001; Brinckerhoff, L.H. *et al.*, *Int J Cancer* 83, 326-34, 1999; Ayyoub, M. *et al.*, *J Biol Chem* 274, 10227-34, 1999; Stemmer, C. *et al.*, *J Biol Chem* 274, 5550-6, 1999; O'Hagan, D.T. y Valiante, N.M., *Nat Rev Drug Discov* 2, 727-35, 2003.

Los métodos para optimizar la inducción de los linfocitos T aún sigue siendo un desafío en la técnica. La teoría de "liberación prolongada" de inmunización, tal como se conoce bien en la técnica, postula que el antígeno que se filtra lentamente en los tejidos durante un período de tiempo prolongado se correlaciona con la potencia inmunogénica de una vacuna. En la actualidad, este paradigma de liberación prolongada de antígeno sirve como la estructura principal para la mayoría de los programas de desarrollo de adyuvantes. Sin embargo, la presente divulgación demuestra que es mucho más ventajoso administrar una vacuna de una forma de dosis creciente durante varios días consecutivos o muy próximas entre sí en lugar de una formulación de liberación prolongada o como un solo bolo. En el presente documento se muestra que la estimulación antigénica diaria con dosis que aumentan exponencialmente mejora la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ cuando se compara con un solo bolo o múltiples administraciones de dosis invariables. Tal como se usa en el presente documento, la estimulación de una respuesta de los linfocitos T restringida por MHC de clase I incluye sin limitación inducción, cebado, inicio, prolongación, mantenimiento, amplificación, aumento, o refuerzo de la respuesta.

En la técnica se conoce bien que las vacunas atenuadas vivas normalmente inducen respuestas inmunes fuertes y de larga duración después de una inyección, y que muchas vacunas virales de este tipo presentan eficacias superiores a un 90 % (Nossal, G. *Vaccines in Fundamental Immunology* (ed, Paul, W.E.) 1387-1425; Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, 1999. Por el contrario, las vacunas que consisten en microorganismos muertos, toxinas, vacunas subunitarias que incluyen vacunas de péptidos, o vacunas de ADN desnudo, presentan una eficacia considerablemente menor, y las inmunizaciones de refuerzo son fundamentales. Aunque las vacunas vivas producen dosis crecientes de antígeno que exigen respuestas inmunes fuertes, las vacunas de no replicación producen una disminución del perfil antigénico es decir, tal como se demuestra en los ejemplos en el presente documento, un estímulo bastante débil para los linfocitos T.

Se conoce bien que las vacunas incapaces de replicación son más seguras que las vacunas vivas. Las realizaciones de la invención sirven para desafiar la tendencia en el desarrollo de vacunas para usar vacunas incapaces de replicación sin tener en cuenta la cinética de dosis de estimulación antigénica. Además, las realizaciones de la invención proporcionan un enfoque inmunoterapéutico para aumentar las respuestas de los linfocitos T frente a enfermedades tales como, pero no limitadas a, enfermedades infecciosas o cáncer.

Las realizaciones de la invención que se desvelan en el presente documento se destinan a abordar las deficiencias en la técnica de diseño de vacunas y en la práctica de la inmunoterapia mediante manipulación de la cinética de la estimulación antigénica como un parámetro clave de la inmunogenicidad. Tal como se desvela en el presente documento, la estimulación inmunogénica que aumentaba de forma lineal o exponencial indujo respuestas de los linfocitos T CD8⁺ significativamente más fuertes con respecto a la estimulación que se proporcionó a un nivel constante. Los inmunógenos se administraron de una sola vez o como múltiples dosis decrecientes indujeron las respuestas inmunes más débiles. Una explicación evolutiva para los hallazgos que se desvelan en el presente documento puede ser que los patógenos que se replican y por lo tanto producen cantidades crecientes de antígeno requieren la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ más fuerte. Por el contrario, las cantidades uniformes o decrecientes de antígeno indican estímulos o infecciones no patogénicas bien controlados por la inmunidad innata o ya adquirida regularmente.

Aunque no se desea quedar ligado por esa teoría, se cree que los candidatos probables para la mediación del aumento de la sensibilidad al peligro son células que presentan antígenos y, en particular para la inducción de linfocitos T CD8⁺, células dendríticas (DC). Esto se ve apoyado en los ejemplos que siguen a continuación en los que cuando los diferentes protocolos de vacunación no diferían en los números de DC absolutas o en el nivel de activación de DC en el ganglio linfático, diferían en el tiempo que era necesario para alcanzar el máximo de activación y números de DC. En el modelo de vacunación de aumento de forma exponencial, el máximo de activación de DC se retrasó tres días en comparación con la vacunación de bolo. Con ambos regímenes de vacunación, el máximo de activación de DC se produjo un día después de que se administrará la dosis máxima de la vacuna. Esta observación podría implicar que una programación de vacunación óptima podría usar una sola inyección de CpG precedida por una sola inyección de péptido durante un día, de modo que el péptido se presenta en las DC activadas de forma máxima. Sin embargo, los datos presentados demuestran que tal protocolo de inmunización, así como las dosis de aumento de forma exponencial de CpG seguido de una sola dosis de péptido,

fue significativamente menos inmunogénica que las dosis de aumento de forma exponencial de CpG y péptido en paralelo.

Para examinar si la cinética de la dosis de antígeno, independiente de la dosis total durante el transcurso del tratamiento (la dosis acumulativa), es un parámetro separado de inmunogenicidad, se inmunizaron ratones con una dosis acumulativa fija de un péptido antigénico, tal como gp33, y un inmunopotenciador o modificador de la respuesta biológica (BRM), tal como oligodesoxinucleótidos de citoquina-guanina (ODN de CpG). Se pusieron en práctica diferentes cinéticas, es decir, inmunización con las dosis de aumento o disminución de forma exponencial, dosis diarias constantes, o inmunización de un solo bolo. Como antígenos se eligieron péptidos de unión de clase I de MHC, dado que su vida media *in vivo* corta permite la producción de cinética antigénica intensa (Falo *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8347-8350, 1992; Widmann *et al.*, *J Immunol.* 147, 3745-3751, 1991. Dado que los ratones se inmunizaron con la misma dosis total de la vacuna, la inducción específica de linfocitos T se podría controlar como una función de la cinética de la administración de péptidos y BRM (CpG).

Tal como se desvela en los ejemplos y en cualquier parte, en el presente documento, las dosis de vacuna acumulativas fijas que comprenden tanto péptido como BRM (CpG) se administraron mediante diferentes programaciones para producir distintas cinéticas de dosis de estimulación antigénica. El aumento de la estimulación antigénica de forma exponencial incrementó un estímulo significativamente más fuerte para los linfocitos T CD8⁺ y aumentó la inmunidad a largo plazo frente a las infecciones virales y tumores en comparación con la estimulación antigénica diaria uniforme o constante o la administración de la vacuna como un solo bolo. Se observó el mismo fenómeno cuando se estimularon los linfocitos T *in vitro*.

Por lo tanto, algunas realizaciones se refieren a métodos y composiciones para aumentar de forma exponencial la estimulación antigénica de respuestas de los linfocitos T CD8⁺ de MHC de clase I sobre la que se describe en la técnica. El dato muestra aumento de la estimulación antigénica independiente de la inmunogenicidad aumentada por la dosis de antígeno. Por lo tanto, la invención proporciona un nuevo método para aumentar la inmunogenicidad, mejorando de este modo el desarrollo de vacunas.

En el presente documento también se desvelan conjuntos de composiciones inmunogénicas que comprenden un inmunógeno, más un inmunopotenciador o BRM. Algunas realizaciones implican la coadministración de un antígeno con un inmunopotenciador para obtener un aumento de la respuesta inmune (CTL) proporcionando tanto al antígeno como el inmunopotenciador de una forma que aumenta exponencialmente.

La inmunogenicidad de un antígeno se puede determinar mediante un número de parámetros que incluyen la dosis de antígeno (Mitchison, N.A., *Proc R Soc Lond Biol Sci* 161, 275-92, 1964; Weigle, W.O., *Adv Immunol* 16, 61-122, 1973; Nossal, G.J., *Annu Rev Immunol* 1, 33-62, 1983; la localización del antígeno (Zinkmagel, R.M., *Semin Immunol* 12, 163-71; análisis 257-344, 2000; Zinkmagel, R.M. y Hengartner, H., *Science* 293, 251-3, 2001; la naturaleza en forma de partículas o soluble del antígeno (O'Hagan, D.T. y Valiante, N.M. *Nat Rev Drug Discov* 2, 727-35, 2003; Bachmann, M.F., *et al.*, *Science* 262, 1448-51, 1993; y si el antígeno se presenta o no junto con señales coestimuladoras (Janeway, C.A., Jr. *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1, 1-13, 1989; Germain, R.N., *Nat Med* 10, 1307-20, 2004; Matzinger, P., *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045, 1994; Schwartz, R.H., *Cell* 71, 1065-8, 1992).

Además se cree que cuanto más se parece un inmunógeno y un protocolo de inmunización a una infección con un patógeno virulento, éste será más inmunogénico. Dosis elevadas de antígeno y la presencia de antígeno en órganos linfoides, correspondiendo ambos a una replicación extendida de un patógeno virulento, inducen fuertes respuestas inmunes. Los antígenos en forma de partículas que se parecen a la estructura de los virus o bacterias inducen respuestas inmunes más fuertes que los antígenos solubles. Además, la presentación de un antígeno junto con componentes patógenos tales como, por ejemplo, ADN bacteriano, lipopolisacárido o ARN viral aumentan fuertemente la respuesta inmune. Tal como se enseñan el presente documento, el aumento de forma exponencial de la estimulación antigénica también puede ser reconocido por el sistema inmune común patrón asociado con patógenos, que dirigen respuestas inmunes fuertes.

Por lo tanto, a la vista de lo mencionado anteriormente, un antígeno contemplado para uso en realizaciones de la invención es uno que estimula el sistema inmune de un sujeto que tiene un tumor maligno o enfermedad infecciosa para que ataque al tumor o patógeno para que inhiba su crecimiento o lo elimine, tratando o curando de este modo la enfermedad. El antígeno, en algunos casos, se puede emparejar con la enfermedad específica encontrada en el animal que se está tratando para inducir una respuesta de CTL (también denominada una respuesta inmune mediada por células), es decir, una reacción citotóxica por el sistema inmune que da como resultado la lisis de las células diana (por ejemplo, las células del tumor maligno o células infectadas por patógenos). Tal como lo entiende un experto habitual en la materia, un aumento de la actividad citolítica puede ser una medida del número de células diana eliminadas o lisadas en presencia de la composición inmunogénica con respecto a la que se produce en ausencia de la composición inmunogénica. Los métodos para determinar medir el número de células diana eliminadas o lisadas debe ser cualquier método conocido por alguien con experiencia habitual en la materia que incluyen, pero no se limitan a, un ensayo de liberación de cromo, un ensayo de tetrámeros, y similares.

Tal como se usa en el presente documento, la estimulación de una respuesta de los linfocitos T restringida por MHC

de clase I incluye sin limitación inducción, cebado, inicio, prolongación, mantenimiento, amplificación, aumento, o refuerzo de la respuesta.

Los antígenos contemplados como útiles en los métodos que se desvelan en el presente documento incluyen, pero no se limitan a proteínas, péptidos, polipéptidos y derivados de los mismos, así como macromoléculas no peptídicas.

5 Tal derivado se puede preparar mediante cualquier método conocido por aquellos con experiencia habitual en la materia y se puede someter a ensayo mediante cualquier medio conocido por aquellos con experiencia habitual en la materia. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los antígenos para uso en la presente invención pueden incluir antígenos tumorales tales como, pero no limitados a, antígenos de diferenciación, antígenos embrionarios, antígenos de cáncer de testículo, antígenos de oncogenes y genes supresores de tumores mutados, antígenos tumorales
10 únicos que tiene su origen en translocaciones cromosómicas, antígenos virales, y otros que pueden ser evidentes en el momento actual o en el futuro para alguien con experiencia en la materia. Los antígenos útiles en los métodos y composiciones desvelados también incluyen los que se encuentran en organismos de enfermedades infecciosas, tales como proteínas virales estructurales y no estructurales. Los microbios diana potenciales contemplados para uso en las composiciones y métodos que se reivindican, incluyen sin limitación, virus de la hepatitis (*por ejemplo*, B, C, y delta), virus del herpes, VIH, HTLV, HPV, EBV, y similares. Un término general para estos antígenos, que se van a reconocer o dirigir por la respuesta inmune, es antígeno asociado a diana (TAA).

Los antígenos proteicos que se pueden usar en los métodos y composiciones que se desvelan incluyen, pero no se limitan a: antígenos de diferenciación tales como, por ejemplo, MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2 y antígenos de múltiples linajes específicos de tumores tales como, por ejemplo, MAGE-1,
20 MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; antígenos embrionarios sobreexpresados tales como, por ejemplo, CEA; oncogenes sobreexpresados y genes supresores de tumores mutados tales como, por ejemplo, p53, Ras, HER-2/neu; antígenos de tumor único que tienen su origen en translocaciones cromosómicas tales como, por ejemplo, BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; y antígenos virales, tales como, por ejemplo, los antígenos EBVA del virus Epstein Barr y de los antígenos E6 y E7 del virus del papiloma humano (HPV). Otros antígenos proteicos pueden incluir, por ejemplo: TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17,1, NuMa, K-ras, β -Catenina, CDK4, Mum-1, p15, p16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteína, β -HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, PLA2, TA-90\proteína de unión a Mac-2\proteína asociada a ciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP, y TPS. Estos antígenos basados en proteínas se conocen y están disponibles para el experto en la materia tanto en la bibliografía como comercialmente.

En otros ejemplos de la invención, se contemplan antígenos peptídicos de 8-15 aminoácidos de longitud. Tal péptido puede ser un epítipo de un antígeno más grande, es decir, es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde al sitio en la molécula más grande que se presenta mediante moléculas de MHC/HLA y se puede
35 reconocer mediante, por ejemplo, un receptor de antígenos o receptor de linfocitos T. Estos péptidos más pequeños están disponibles para un experto en la materia y se pueden obtener, por ejemplo, siguiendo las enseñanzas de las Patentes de Estados Unidos N° 5.747.269 y N° 5.698.396; y la Solicitud PCT con Número PCT/EP95/02593 (publicada como documento de patente WO 96/01429), presentada el 4 de julio de 1995, con el título MÉTODO PARA IDENTIFICAR Y PRODUCIR PÉPTIDOS ANTIGÉNICOS Y USO DE LOS MISMOS COMO VACUNAS y la
40 Solicitud PCT N° PCT/DE96/00351 (publicada como documento de patente WO 96/27008), presentada el 26 de febrero de 1996, con el título AGENTE PARA TRATAR TUMORES Y OTRAS HIPERPLASIAS. Se describen enfoques adicionales al descubrimiento de epítopos en las Patentes de Estados Unidos N° 6.037.135 y N° 6.861.234.

Aunque en general la molécula que determina por último el reconocimiento específico de antígenos por un linfocito T es un péptido, se indica que, la forma de antígeno administrada realmente en la preparación inmunogénica, el inmunógeno, no es necesario que sea un péptido per se. Cuando se administran, el péptido o péptidos epitópicos se pueden encontrar dentro de un polipéptido más largo, como el antígeno de proteína completa, algún segmento de la misma, o alguna secuencia sometida para ingeniería. En tales secuencias sometidas a ingeniería estarían incluidos e poliepítopos y epítopos incorporados en una secuencia vehículo tal como un anticuerpo o proteína de cápside viral.
50 Tales polipéptidos más largos pueden incluir grupos de epítopos tal como se describe, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 09/561.571, presentada el 28 de abril de 2000 y con el título "GRUPOS DE EPÍTOPOS". El péptido epitópico, o el polipéptido más largo en el que está contenido, puede ser un componente de un microorganismo (por ejemplo, un virus, bacteria, protozoo, etc.), o una célula de mamífero (*por ejemplo*, una célula tumoral o célula que presenta antígeno), o lisados, total o parcialmente purificados, de cualquiera de los anteriores. Éstos se pueden usar como complejos con otras proteínas, por ejemplo proteínas de choque térmico. El péptido epitópico también se puede modificar de forma covalente, tal como por lipidación, o preparar un componente de un compuesto sintético, tal como dendrímeros, sistemas de péptidos de antígenos múltiples (MAPS), y polioximas, o se pueden incorporar en liposomas o microesferas, y similares. Tal como se usa en la presente divulgación la expresión "antígeno polipeptídico" incluye todas las posibilidades y combinaciones mencionadas. La
60 invención incluye que el antígeno puede ser un componente nativo del microorganismo o célula de mamífero. El antígeno también se puede expresar por el microorganismo o célula de mamífero a través de tecnología de ADN recombinante o, especialmente en el caso de células que presentan antígenos, impulsando la célula con antígeno polipeptídico o péptido epitópico antes de la administración. Además, el antígeno se puede administrar codificado

por un ácido nucleico que posteriormente se expresa con las APC. Por último, aunque las moléculas de MHC de clase I clásicas presentan antígenos peptídicos, existen moléculas adicionales de clase I que se adaptan para presentar macromoléculas no peptídicas, particularmente componentes de paredes celulares microbianas, que incluyen sin limitación lípidos y glicolípidos. Tal como se usan en la presente divulgación los términos antígeno, inmunógeno, y epítipo también pueden incluir tales macromoléculas. Además, una vacuna basada en ácido nucleico puede codificar una enzima o enzimas necesarias para o la síntesis de tal macromolécula y transmitir por lo tanto expresión antigénica en una APC.

También se contempla que los nuevos péptidos identificados mediante el método que se desvela en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con N° de Serie 09/560.465, presentada el 28 de abril de 2000 y con el título "SINCRONIZACIÓN DE EPÍTOPOS EN CÉLULAS QUE PRESENTAN ANTÍGENOS", que pueden ser evidentes en el momento actual o en el futuro para un experto habitual en la materia, son útiles a realizaciones de la invención que se desvelan en el presente documento.

Los péptidos adicionales, y análogos etílicos que se pueden usar en las realizaciones de la invención que se desvelan en el presente documento se desvelan, por ejemplo, en la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/581.001, presentada el 17 de junio de 2004 y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 11/156.253, presentada el 17 de junio de 2005, ambas tituladas ANÁLOGOS DE PÉPTIDOS SSX-2; y Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/580.962, presentada el 17 de junio de 2004 y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 11/155.929, presentada el 17 de junio de 2005, ambas tituladas ANÁLOGOS DE PÉPTIDOS NY-ESO; en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 09/999.186, presentada el 7 de noviembre de 2001, con el título MÉTODOS PARA COMERCIALIZAR UN ANTÍGENO; en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 11/323.572 (publicada como documento de patente US 2006/0165711 A1), presentada el 29 de diciembre de 2005, con el título, MÉTODOS PARA OBTENER, AUMENTAR Y MANTENER RESPUESTAS INMUNES FRENTE A EPÍTOPOS RESTRINGIDOS DE CLASE DE MHC I, PARA FINES PROFILÁCTICOS O TERAPÉUTICOS; y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 11/323.520, presentada el 29 de diciembre de 2005, con el título MÉTODOS PARA DERIVAR CÉLULAS CD4⁺ EN LA INDUCCIÓN DE UNA RESPUESTA INMUNE. Los principios de selección de epítipo beneficiosos para inmunoterapia se desvelan, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 09/560.465, presentada el 28 de abril de 2000, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/026.066 (publicada como documento de patente US 2003/0215425 A1), presentada el 7 de diciembre de 2001, y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/005.905, presentada el 7 de noviembre de 2001, todas tituladas SINCRONIZACIÓN DE EPÍTOPOS EN CÉLULAS QUE PRESENTAN ANTÍGENOS; en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 09/561.571, presentada el 28 de abril de 2000 y con el título GRUPOS DE EPÍTOPOS; en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/094.699 (en la actualidad Patente de Estados Unidos N° 7.252.824), presentada el 7 de marzo de 2002 y con el título PREPARACIONES ANTI-NEOVASCULATURA PARA CÁNCER; en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/117.937 (publicada como documento de patente US 2003/0220239 A1), presentada el 4 de abril de 2002, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/657.022 (publicada como documento de patente US 2004/0180354 A1), presentada el 5 de septiembre de 2003, y Solicitud de PCT N° PCT/US2003/027706 (publicará como documento de patente WO 04/022709A2), presentada el 5 de septiembre de 2003, todas tituladas SECUENCIAS DE EPÍTOPOS; y Patente de Estados Unidos N° 6.861.234.

En algunos aspectos de la invención, se pueden usar plásmidos de vacuna. El diseño general de plásmidos de vacuna se desvela, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 09/561.572, presentada el 28 de abril de 2000 y con el título VECTORES DE EXPRESIÓN QUE CODIFICAN EPÍTOPOS DE ANTÍGENOS ASOCIADOS A DIANA; en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/292.413 (publicada como documento de patente US 2003/0228634 A1), presentada el 7 de noviembre de 2002 y con el título VECTORES DE EXPRESIÓN QUE CODIFICAN EPÍTOPOS DE ANTÍGENOS ASOCIADOS A DIANA Y MÉTODOS PARA SU DISEÑO; en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/225.568 (publicada como documento de patente US 2003/0138808), presentada el 20 de agosto de 2002 y Solicitud de PCT N° PCT/US2003/026231 (publicada como Publicación N° WO 2004/018666), presentada el 19 de agosto de 2003, ambas tituladas VECTORES DE EXPRESIÓN QUE CODIFICAN EPÍTOPOS DE ANTÍGENOS ASOCIADOS A DIANA; y Patente de Estados Unidos N° 6.709.844, con el título "ANULACIÓN DE COMPUESTOS INTERMEDIOS DE REPLICACIÓN NO DESEADA EN PROPAGACIÓN DE PLÁSMIDOS.

Además, en realizaciones de la invención se contemplan combinaciones antigénicas específicas de beneficio particular en la dirección de una respuesta inmune frente a cánceres en particular tal como se desvela, por ejemplo, en el documento Provisional de Estados Unidos N° 60/479.554, presentado el 17 de junio de 2003, y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/871.708 (publicada como documento de patente US 2005/0118186), presentada el 17 de junio de 2004, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 11/323.049 (publicada como documento de patente US 2006/0159694 A1), presentada el 29 de diciembre de 2005, y Solicitud de Patente PCT N° PCT/US2004/019571, presentada el 17 de junio de 2004, todas tituladas "COMBINACIONES DE ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMOR EN VACUNAS PARA DIVERSOS TIPOS DE CÁNCERES".

Un epítipo tal como se denomina en el presente documento y tal como lo conoce un experto en la materia, se define como esa porción de un antígeno que interactúa con un receptor de antígeno de un sistema inmune; en el presente caso esa porción de un antígeno presentada por una molécula de MHC para reconocimiento por un receptor de linfocitos T (TCR). Un inmunógeno es una molécula capaz de estimular una respuesta inmune. Los inmunógenos

que se contemplan en la invención que se desvela en el presente documento pueden incluir, de una forma no limitante, un polipéptido o un ácido nucleico que codifica un polipéptido, en los que el polipéptido es capaz de estimular una respuesta inmune. Los inmunógenos pueden ser idénticos a un TAA correspondiente o un fragmento del mismo, pero no lo son necesariamente de ese modo. Los inmunógenos pueden incluir, pero no se limitan necesariamente a, péptidos epitópicos presentados en la superficie de células y péptidos no unidos de forma covalente (formando complejos) a la hendidura de unión de MHC de clase I, de modo que pueden interactuar con receptores de linfocitos T (TCR). Además, los inmunógenos pueden incluir complejos de epítipo-MHC o células que expresan tales complejos en su superficie.

Un mimótopo, tal como se denomina en el presente documento y es bien conocido por el experto en la materia, se define como un compuesto que imita la estructura de un epítipo y provoca una respuesta inmune idéntica o de reacción cruzada. Un epítipo sintético, tal como se denomina en el presente documento y es bien conocido por el experto en la materia, es una molécula de epítipo no natural sintetizada químicamente. En la técnica se conocen bien métodos para sintetizar proteínas, péptidos y similares.

Inmunopotenciadores y Modificadores de la Respuesta Biológica (BRM)

Las realizaciones de la invención que se desvelan en el presente documento incluyen métodos para aumentar una respuesta inmune de los linfocitos T mediante administración de una composición inmunogénica que comprende un inmunógeno más un inmunopotenciador u otro modificador de la respuesta biológica (BRM). Los BRM pueden actuar de una forma inmunosupresora o inmunoestimuladora para modular una respuesta inmune, por ejemplo, estimulando una respuesta efectora inhibiendo una respuesta reguladora de T. Los inmunopotenciadores o BRM tal como se usan en el presente documento pueden hacer referencia a cualquier molécula que modula la actividad del sistema inmune, o las células del mismo, a través de una interacción distinta con un receptor de antígeno. Los BRM tal como se usan en el presente documento pueden incluir adicionalmente moléculas orgánicas pequeñas naturales o sintéticas que ejercen efectos de modulación inmune mediante la estimulación de rutas de inmunidad innata.

Los BRM de inmunopotenciación preferentes que se pueden usar en realizaciones de la invención son moléculas que desencadenan la producción de citoquinas o quimioquinas, tales como, pero no se limitan a, ligandos para receptores de tipo Toll (TLR), peptidoglicanos, LPS o análogos, imiquimodes, oligodesoxinucleótidos de CpG sin metilar (ODN de CpG), ARNs, tales como ADNs bacteriano (que contiene motivos de CpG) y ARNs sintético (poliI:C) en APC células inmunes innatas que se unen a TLR9 y TLR3, respectivamente, y similares. Se indica que estos BRM son motivadores inmunes potentes asociados con problemas de seguridad cuando se administran de forma sistémica. Especialmente CpG (ligando de TLR-9) ha mostrado aplicación experimentan generalizada y potencial clínico como un adyuvante al permitir la maduración eficaz de células que presentan antígenos y posterior activación de linfocitos específicos de antígeno (Krieg, A. M., *Annu Rev Immunol* 20: 709-760 2002; Weigel, B. J. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 9: 3105-3114, 2003; Verthelyi, D. *et al.*, *Aids* 18: 1003-1008, 2004; Stomi, T. *et al.*, *J Immunol* 172: 1777-1785, 2004. Un enfoque para evitar estos problemas de seguridad es el uso de administración intralinfática tal como se desvela, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 11/321.967 (publicada como documento de patente US. 2006/0153844 A1), presentado el 29 de diciembre 2005 y con el título MÉTODOS PARA DESENCADENAR, MANTENER, Y MANIPULAR RESPUESTAS INMUNES POR ADMINISTRACIÓN DIRIGIDA DE MODIFICADORES DE RESPUESTA BIOLÓGICA EN ÓRGANOS LINFÓIDES.

Tal como se usa en el presente documento, el término BRM puede hacer referencia a cualquier molécula que modula la actividad del sistema inmune, o las células del mismo, a través de una interacción distinta que con un receptor de antígeno. BRM también se aplica normalmente a preparaciones biológicas complejas que comprenden la entidad activa, o entidades, sin tener en cuenta si se había definido el componente o componentes activos de la mezcla. Los ejemplos de preparaciones biológicas complejas usadas como los BRM incluyen OK 432, PSK, AIL, lentinano, y similares. En algunas realizaciones de la invención se define el componente o componentes activos de tal mezcla. En otras realizaciones de la invención los BRM procedentes de preparaciones biológicas complejas están purificados al menos parcialmente, o básicamente purificados, tal como, por ejemplo, OK-PSA (Okamoto *et al.*, *Journal of the National Cancer Institute*, 95: 316-326, 2003 o AILb-A (Okamoto *et al.*, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11: 483-495, 2004. En realizaciones preferentes, el BRM es de composición molecular definida. Los BRM incluyen adyuvantes de inmunopotenciación que activan pAPC o linfocitos T que incluyen, por ejemplo: ligandos de TLR, ligandos de Receptor de Reconocimiento de Patrones endocíticos (PRR), saponinas de quillaja, tucareol, citoquinas, y similares. Algunos adyuvantes preferentes se desvelan, por ejemplo, en Marciani, D.J. *Drug Discovery Today* 8: 934-943, 2003.

En algunas realizaciones que implican la administración de células como el inmunógeno, el BRM puede ser una molécula expresada por la célula. En un aspecto, la molécula de BRM se puede expresar de forma natural por la célula de forma constitutiva o como respuesta a algún estímulo biológico. En otro aspecto, la expresión depende del ADN recombinante u otra tecnología de ingeniería genética.

Una clase de BRM incluye en su mayoría moléculas naturales o sintéticas orgánicas pequeñas, que ejercen efectos de modulación inmune al estimular rutas de inmunidad innata. Se ha mostrado que los macrófagos, dendríticos y otras células llevan los denominados receptores de tipo Toll (TLR), que reconocen patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP) en microorganismos (Thoma-Uszynski, S. *et al.*, *Science* 291: 1544-1547, 2001; Akira, S.,

Curr. Opin. Immunol., 15: 5-11, 2003. Además se contemplan moléculas pequeñas que se unen a los TLR tales como una nueva generación de imidazoquinolinas antivirales puramente sintéticas, por ejemplo, imiquimod y resiquimod, que se ha encontrado que estimulan la ruta celular de inmunidad mediante la unión a los TLR 7 y 8 (Hemmi, H. *et al.*, *Nat Immunol* 3: 196-200, 2002; Dummer, R. *et al.*, *Dermatology* 207: 116-118, 2003.

Los BRM que interactúan directamente con receptores que detectan componentes microbianos se usan en realizaciones preferentes. Sin embargo, también se pueden usar moléculas que actúan corriente abajo en la ruta de señalización. Por lo tanto, los anticuerpos que se unen a moléculas coestimuladoras (tales como, por ejemplo, anti-CD40, CTLA-4, anti-OX40, y similares) se pueden usar como los BRM en realizaciones de la invención. De forma análoga, aún en realizaciones adicionales, los BRM usados en realizaciones de la invención pueden incluir, por ejemplo, IL-2, IL-4, TGF-beta, IL-10, IFN-gamma, y similares; o moléculas que desencadenan su producción. Además, otros BRM tal como se contempla en el presente documento mediante la presente invención pueden incluir citoquinas tales como, por ejemplo, IL-12, IL-18, GM-CSF, ligando de flt3 (flt3L), interferones, TNF-alfa, y similares; o quimioquinas tales como IL-8, MIP-3 alfa, MIP-1 alfa, MCP-1, MCP-3, RANTES, y similares.

Los adyuvantes son moléculas y preparaciones que mejoran la inmunogenicidad de antígenos. Éstas pueden presentar actividad de inmunopotenciación tal como se ha descrito anteriormente, pero también pueden tener, en lugar de o además de tal actividad, propiedades para alterar el estado físico del inmunógeno. Los efectos de los adyuvantes no son específicos del antígeno. Si se administran junto con un antígeno purificado, sin embargo, se pueden usar para estimular de forma selectiva la respuesta al antígeno. Por ejemplo, la respuesta inmune aumenta cuando los antígenos proteicos se hacen precipitar con alumbre. La emulsificación de antígenos también prolonga la duración de la presentación del antígeno. Los adyuvantes adecuados incluyen todos los compuestos inmunoestimuladores aceptables, tales como citoquinas, toxinas o composiciones sintéticas. A modo de ejemplo, los adyuvantes preferentes a menudo incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund completo (un estimulador no específico de la respuesta inmune que contiene *Mycobacterium tuberculosis* muerta), adyuvantes de Freund incompletos, y adyuvante de hidróxido de aluminio.

Un procedimiento actual para conseguir que los péptidos sean más inmunogénicos es inyectarlos en el contexto de células se presentan antígenos profesionales (APC) tales como células dendríticas (DC), (Steinmann, R. M., *Ann Rev Immunol* 9, 271-96, 1991. Las DC son las APC potentes del sistema inmune. Otros adyuvantes que también se pueden usar incluyen compuestos de MDP, tales como, por ejemplo, thur-MDP y nor-MDP, CGP (MTP-PE), lípido A, y monofosforil lípido A (MPL). También se contempla RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, MPL, dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS) en una emulsión de escualeno al 2 %/Tween 80. Los agentes anfipáticos y tensioactivos, por ejemplo, saponina y derivados tales como QS21 (Cambridge Biotech), forman además otro grupo de adyuvantes contemplados para uso en realizaciones de la presente invención. También se pueden usar tensioactivos no iónicos de copolímero en bloque (Rabinovich *et al.*, 1994.

Administración de Composiciones Inmunogénicas de la Presente Invención

Las realizaciones de la invención que se desvelan en el presente documento se refieren a métodos para administrar una composición inmunogénica que comprende un inmunógeno, más un inmunopotenciador o BRM, a un sujeto induciendo o aumentando de ese modo una respuesta de linfocitos T específica de antígenos. En realizaciones preferentes, la composición inmunogénica se proporciona al sujeto de una manera que aumenta de forma exponencial.

De acuerdo con los métodos que se desvelan en el presente documento, la composición inmunogénica se puede administrar a un sujeto mediante cualquier método conocido por alguien con una experiencia habitual en la materia para administrar una composición. Por lo tanto, la administración de una composición inmunogénica de la presente invención a un sujeto se puede realizar por vía intradérmica, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía mucosal, y por vía intranodal a los órganos linfoides (*por ejemplo*, ganglios linfáticos), pero sin limitarse a los mismos. Por ejemplo, en algunas organizaciones, la administración de la composición inmunogénica se puede realizar a través de medios transdérmicos, transmucosales, nasales, bronquiales, orales, rectales y/o subcutáneos. En algunas realizaciones, la administración de la composición inmunogénica puede comprender la administración directa al sistema linfático. En otras realizaciones, la administración de la composición inmunogénica puede consistir en la administración directa al sistema linfático. El sistema linfático humano, tal como es bien conocido para un experto habitual en la materia, incluye linfa, linfocitos, vasos linfáticos, ganglios linfáticos, amígdalas, el bazo, el timo y médula ósea.

En algunas realizaciones, es deseable que una cantidad eficaz de la composición inmunogénica que comprende un inmunógeno, más un inmunopotenciador o un BUM se administre o se reparta por vía intranodal a un sujeto provocando de este modo un aumento de la respuesta de los linfocitos T. En algunas realizaciones, un aumento de la respuesta incluye una estimulación que aumenta de forma lineal de una respuesta de los linfocitos T. En algunas realizaciones, un aumento de la respuesta incluye una estimulación que aumenta de forma exponencial de una respuesta de los linfocitos T. La administración intranodal se desvela, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 6.994.851 y N° 6.977.074; Publicación de Patente PCT N° WO/9902183A2; y en la Solicitud de Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20050079152. La integración de técnicas de diagnóstico para evaluar

y controlar la respuesta inmune con métodos de inmunización se analiza con más detalle, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 11/155.928, presentada el 17 de junio de 2005 y con el título "AUMENTO DE LA EFICACIA DE INMUNOTERAPIA ACTIVA POR INTEGRACIÓN DE DIAGNÓSTICO CON MÉTODOS TERAPÉUTICOS".

5 Dispositivos para Administración

Las composiciones inmunogénicas que se desvelan en el presente documento se pueden administrar por inyección de bolo con una jeringa hipodérmica, tal como en los ejemplos que siguen a continuación, o con otros dispositivos funcionales de forma similar conocidos en la técnica para vacunación. Otros métodos de reparto/administración pueden incluir infusión, por ejemplo por vía subcutánea o directamente en el sistema linfático mediante un vehículo para administración de inmunógeno, tal como, por ejemplo, una bomba. En realizaciones preferentes el vehículo para la administración es externo al animal pero contiene un medio (*por ejemplo*, una aguja o catéter) para administrar el antígeno en el organismo, preferentemente a un órgano linfático o área con flujo linfático elevado. Una ventaja de un vehículo para la administración de inmunógeno es que evita múltiples inyecciones regularmente.

Los dispositivos/vehículos para administración colocados fuera del organismo del paciente (un dispositivo externo), están formados por un depósito para mantener la composición inmunogénica, una bomba programable para bombear la composición fuera del depósito, un canal o línea de transmisión para transmitir la composición, y un medio para introducir la composición en el organismo del paciente ataque por último alcance del sistema linfático. En una realización preferente, la bomba se puede programar para que aumente el volumen infundido con el fin de que proporcione el aumento de concentración de inmunógeno deseado. En realizaciones alternativas, el depósito de la bomba se rellena con composiciones que comprenden concentraciones mayores de inmunógeno sucesivamente. Preferentemente, el depósito para la composición inmunogénica es lo suficientemente grande para administrar la cantidad deseada de inmunógeno en el tiempo y se puede refutar o sustituir fácilmente sin que sea necesario que el usuario vuelva a insertar el medio para introducir la composición de inmunógeno al sistema linfático. El uso de bombas externas para inmunización, incluyendo bombas a modo de ejemplo, se analiza adicionalmente, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 6.997.074 con el título "*Método para Inducir una Respuesta de CTL*".

Tratamiento y Régimen de Dosificación

En general, las realizaciones de la presente invención son útiles para tratar un sujeto que tiene una enfermedad para la que el sistema inmune del sujeto aumenta una respuesta mediada por células a un antígeno relacionado con la enfermedad con el fin de atacar la enfermedad. El tipo de enfermedad puede ser, por ejemplo, un tumor maligno o una enfermedad infecciosa causada por una bacteria, virus, protozoo, helminto, o cualquier patógeno microbiano que entra por vía intracelular y se ve atacado, por ejemplo, por linfocitos T citotóxicos. En una modalidad terapéutica el método es muy adecuado para afecciones persistentes o crónicas, pero no se limita necesariamente a las mismas. Además, la presente invención es útil para inmunizar a un sujeto que puede estar en riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa o tumor.

En el tratamiento de enfermedades y/o afecciones contempladas en la presente invención, se puede usar un régimen de dosificación y programa de administración de la composición inmunogénica que comprende un inmunógeno más un inmunopotenciador o BRM. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica que se desvela en el presente documento se puede administrar como una pluralidad de dosis secuenciales en la que cada dosis posterior a una dosis inicial es una dosis mayor. Tal dosis que aumenta de forma secuencial se puede proporcionar como una dosis que aumenta de forma exponencial. Por dosis que aumenta de forma exponencial, se hace referencia a una serie de dosis iguales a $x^{n-1}d_i$, en la que $x > 1$, de modo que la serie de dosis es $d_i, xd_i, x^2d_i, x^3d_i, \dots, x^{n-1}d_i$. Por lo tanto, si $x = 2$ cada dosis es dos veces la dosis inmediatamente precedente en la serie; si $x = 5$ cada dosis es cinco veces la dosis inmediatamente precedente en la serie. Por lo tanto, en una realización preferente, la composición inmunogénica de la invención se puede administrar como una pluralidad de dosis secuenciales en la que cada dosis se proporciona a un factor exponencial de x^{n-1} veces la dosis inicial. Tal pluralidad de dosis puede ser 3, 4, 5, 6 o las dosis si fuera necesario. En casos cuando la dosis o dosis iniciales administradas pueden ser a una dosis demasiado baja para generar una respuesta inmune, se puede administrar un número de dosis mayor (es decir, 7, 8, 9, 10, 12, 15 o más dosis) al sujeto para conseguir una respuesta a la dosis inmunológicamente más eficaz.

En algunas realizaciones de la invención, la composición inmunogénica comprende una célula que comprende el antígeno o una porción inmunogénica del mismo. En algunas de estas realizaciones la célula sirve como una célula que presenta antígeno, que expresa y que procesa el antígeno, o que se impulsa con el antígeno o un péptido epitópico u otra porción inmunogénica del antígeno. La célula puede expresar de forma natural el antígeno (o inmunógeno), por ejemplo una célula cancerígena que expresa un TuAA, o se puede manipular para que lo, por ejemplo una célula dendrítica transfectada con un ARNm que codifica a un inmunógeno. Por ejemplo, la célula puede ser una célula cancerígena o tumoral, o una célula que presenta antígenos, pero no se limita a las mismas. La célula tumoral puede ser una célula de vejiga, una célula de mama, una célula de pulmón, una célula de colon, una célula de próstata, una célula de hígado, una célula de páncreas, una célula de estómago, una célula de testículo, una célula de cerebro, una célula de ovario, una célula linfática, una célula de piel, una célula de cerebro, una célula de hueso, una célula de tejido blando, o similar. La célula que presenta antígeno puede ser, por ejemplo, una célula

dendrítica. En estas realizaciones la dosificación se puede aumentar aumentando de forma secuencial el número de de células administradas con respecto a las de la dosis inmediatamente precedente, o aumentando de forma secuencial el número de complejos de epítipo-MHC en la superficie de la células con respecto a esos de la dosis inmediatamente precedente, en la que el epítipo es de un antígeno diana, o ambos. El número de complejos de epítipo-MHC en la superficie de la células se puede manipular lo más fácilmente pulsando con diferentes concentraciones del epítipo.

Por lo tanto, la administración es compatible en cualquier forma con la formulación de dosificación y en tal cantidad de modo que sea terapéutica o profilácticamente eficaz. Una cantidad dosis eficaz de una composición inmunogénica de la invención es esa cantidad necesaria para proporcionar una respuesta deseada en el sujeto a tratar que incluye, pero no se limita a: prevención, disminución, reversión, estabilización, otra mejora de una enfermedad o afección, su progresión, o los síntomas de la misma. La dosificación de la composición inmunogénica y el programa de dosificación pueden variar en un sujeto en base al sujeto, teniendo en cuenta, por ejemplo, factores tales como el peso y la edad del sujeto, el tipo de enfermedad y/o afección que se está tratando, la gravedad de la enfermedad o afección, intervenciones terapéuticas previas o simultáneas, la capacidad del sistema inmune del individuo para responder, el grado de protección deseado, la forma de administración y similares, todos los cuales los puede determinar fácilmente el médico.

Las composiciones de uso en el presente documento pueden incluir diversas "dosis individuales". Dosis individual se define como que contiene una cantidad predeterminada de la composición terapéutica calculada para que produzca las respuestas deseadas en asociación con su administración, es decir, la ruta y régimen de tratamiento apropiados. La cantidad para administrar, y la ruta y formulación en particular, están dentro de la experiencia de los expertos en las técnicas clínicas. También tiene importancia el sujeto a tratar, en particular, el estado del sujeto y la protección deseados. No es necesaria la administración de una dosis individual como una sola inyección pero puede comprender infusión continua durante un periodo de tiempo establecido.

En realizaciones adicionales de la invención, se contempla que la pluralidad de dosis de la composición inmunogénica se administren dentro de aproximadamente 24 a 48 horas entre sí, dentro de aproximadamente 12-24 h entre sí, y lo más preferentemente dentro de aproximadamente 6-12 h entre sí, siendo lo más preferente con un intervalo de aproximadamente 24 h entre dosis. En algunas realizaciones, puede ser deseable administrar la pluralidad de dosis de la composición inmunogénica de la invención en un intervalo de días, en un lapso de varios días (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7) entre administraciones posteriores. Por ejemplo, la dosis inicial se puede administrar a una dosificación baja seguido de una segunda dosis baja o dosis elevada posterior y tal segunda dosis se puede administrar a los 1, 2, 3 o más días después de la dosis inicial; a continuación se puede administrar una tercera dosis a los 1, 2, 3 o más días después de la segunda dosis; a continuación se puede administrar una cuarta dosis a los 1, 2, 3 o más días después de la tercera dosis y así sucesivamente. En algunas realizaciones, las dosis secuenciales se pueden proporcionar en un intervalo afectado por la vida media del antígeno. La vida media del antígeno es el tiempo que se necesita para que un cincuenta por ciento del antígeno se metabolice o elimine mediante procesos biológicos normales desde el sujeto. Por lo tanto, el médico o profesional médico experto determinaría el periodo de tiempo en el que administrar la pluralidad de dosis de la composición inmunogénica y el lapso de tiempo entre administraciones posteriores con el fin de optimizar una respuesta inmune a linfocitos T CD8⁺.

El intervalo o intervalos de administración de una composición inmunogénica de la invención puede variar de minutos a días dependiendo del régimen de dosificación y eficacia de la dosis administrada. Sin embargo, se pretende que la última dosis se administre dentro de un determinado número de días de la primera dosis para aumentar el número de linfocitos T que responden que corresponden al aumento exponencial en la dosis en el tiempo. En diversas realizaciones, el intervalo de tiempo entre la primera y la última dosis puede ser inferior a 7 días, preferentemente puede ser de 4 o 5 días, y más preferentemente, la última dosis se puede administrar dentro de 6 días de la primera dosis. Por lo tanto, la última dosis a administrar no solamente dependerá del día en que se administra y de la eficacia de las dosis iniciales, sino que también será determinada por el aumento del número de linfocitos T para generar una respuesta inmune. En el tiempo, la respuesta inmune provocada se reducirá y el procedimiento se puede repetir para prolongar o reestablecer la inmunidad.

Un sujeto al que se puede administrar la composición inmunogénica de la invención como un agente terapéutico puede incluir seres humanos de todas las edades y animales, tales como, pero no limitados a, ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras, y mascotas domésticas tales como perros, gatos, conejos, hámsters, ratones, ratas, y similares. La composición inmunogénica de la invención se puede usar principalmente en el tratamiento de seres humanos que están en necesidad de tener una respuesta inmunológica específica inducida, sostenida, o estimulada de forma exponencial en el tratamiento de una enfermedad o afección tal como cáncer o enfermedad infecciosa.

Kits

Cualquiera de las composiciones que se describen en el presente documento se pueden ensamblar en conjunto en un kit. En un ejemplo no limitante, uno o más agentes o reactivos para la administración de una composición inmunogénica se pueden proporcionar en un kit solo, o en combinación con un agente adicional para el tratamiento de una enfermedad o afección debido a enfermedad infecciosa o cáncer. Sin embargo, estos componentes no pretenden ser limitantes. Los kits proporcionarán medios de envase adecuados para almacenar y distribuir los

agentes o reactivos.

Los kits por lo general contendrán, en medio de envase adecuado, una composición inmunogénica que comprende una formulación farmacéuticamente aceptable de un inmunógeno, más un inmunopotenciador o BRM, para administración a un sujeto e instrucciones para la administración. El kit puede tener un solo medio de envase, y/o puede tener distintos medios de envase para compuestos adicionales tales como una formulación eficaz inmunológica/terapéutica de un agente o agentes terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad o afección debido a enfermedad infecciosa o cáncer. El kit puede contener adicionalmente, en medio de envase adecuado, varias dosis de la composición inmunogénica cada una en un medio de envase separado. Las varias dosis de composición inmunogénica pueden ser dos o más dosis que aumentan de forma secuencial de una composición inmunogénica, en la que cada dosis posterior es mayor que la dosis que la precede inmediatamente. El kit contiene dos o más dosis de una composición inmunogénica, cada dosis en medios de envase separado adecuados. Por ejemplo, el kit puede contener 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más dosis de la composición inmunogénica, cada dosis en medios de envase separado adecuados. El kit puede incluir varias dosis del inmunógeno, o el inmunopotenciador o BRM, cada una en medios de envase separado.

Cuando los componentes del kit se proporcionan en una y/o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, con una solución acuosa estéril siendo particularmente preferente. Las composiciones también se pueden formular en una composición inyectable, en cuyo caso, el medio de envase puede ser en sí mismo una jeringa, pipeta, y/u otro aparato similar, a partir del que se puede administrar la formulación o inyectar en un sujeto, y/o incluso aplicar a y/o mezcla con los otros componentes del kit. En algunas realizaciones, los componentes del kit se pueden proporcionar en forma de polvo o polvos secos. Cuando se proporcionan componentes (por ejemplo, reactivos) como un polvo seco, el polvo se puede reconstituir mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también se pueda proporcionar en otro medio de envase.

Las dosis crecientes usadas de acuerdo con la invención se pueden proporcionar mediante la administración de volúmenes cada vez mayores de la misma concentración, o el mismo volumen de concentración cada vez mayor, o alguna combinación de los mismos. Por lo tanto, los kits pueden contener dosis envasadas de forma individual; o uno o más envases de dosis múltiples desde los que se proporcionan o administran volúmenes crecientes; o uno o más envases de dosis múltiples desde los que se proporciona un volumen, sometido a una dilución sucesivamente menor y un volumen fijo administrado; o ensamblajes y usos similares tal como se le ocurrirá a un experto en la materia.

Los medios de envase incluirán por lo general al menos un vial, ampolla, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa y/o otros medios de envase, que contienen el inmunógeno y/o inmunopotenciador o BRM. El kit también puede comprender un segundo medio de envase para contener un tampón y/u otro diluyente farmacéuticamente, estéril. El kit también incluirá por lo general un medio para contener los materiales para poner en práctica los métodos de la invención, y cualquier otro envase de cada reactivo en aislamiento estricto para venta comercial. Tales envases pueden incluir envases de plástico para inyección o moldeados por soplado en los que se retienen los viales deseados. Independientemente del número o tipo de envases, el kit o kits de la invención también pueden comprender, o se pueden envasar con, un instrumento para que ayude con la inyección/administración de la composición inmunogénica que comprende un inmunógeno, más un inmunopotenciador o BRM dentro del organismo de un sujeto. Tal instrumento puede ser una jeringa, bomba y/o cualquiera de tal vehículo para administración médicamente aprobado.

Además se proporciona un conjunto de jeringas que contienen dosis crecientes de la composición inmunogénica, en el que cada dosis posterior a una dosis inicial es mayor que la dosis inmediatamente precedente. Además se proporciona un conjunto de viales que contiene dosis crecientes de la composición inmunogénica, en el que cada dosis posterior a una dosis inicial es mayor que la dosis inmediatamente precedente. Las dosis crecientes se pueden aumentar de forma secuencialmente por medios lineales o por medios exponenciales.

Al haber descrito la invención con detalle, será evidente que son posibles modificaciones, variaciones, y realizaciones equivalentes sin apartarse del alcance de la invención definida en las reivindicaciones adjuntas. Además, se debería observar que todos los ejemplos en la presente divulgación se proporcionan como ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitantes se proporcionan para ilustrar adicionalmente la presente invención. Los expertos en la materia deberían observar que las técnicas que se desvelan en los ejemplos que siguen a continuación representan enfoques que los inventores han encontrado que funcionan bien en la práctica de la invención, y por lo tanto se puede considerar que constituyen ejemplos de modos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deberían observar, a la vista de la presente divulgación, que se pueden hacer muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y además obtener un resultado igual o similar sin apartarse del espíritu y del alcance de la invención.

Ejemplo 1: materiales y métodos

Ratones. Se adquirieron ratones C57BL/6 de seis a 12 semanas de edad en Harlan (Horst, Países Bajos). Se obtuvieron ratones transgénicos TCR318 que expresan un receptor de linfocitos T específico para el péptido gp33 (aa33-41), que representa el epítipo inmunodominante del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) en ratones H-2^b, localizado en la glicoproteína (Pircher, H., *et al.* 1989, *Nature* 342: 559-561; Pircher, H. *et al.*, *Nature* 346, 629-633, 1990 en Cytos Biotechnology AG (Schlieren, Suiza). Se obtuvieron ratones transgénicos HHD que expresan HLA A2.1 originalmente en MannKihd Corporation (Valencia, CA; Pascolo, S. *et al.* *J Exp Med* 185, 2043-2051, 1997. Los ratones se criaron y se mantuvieron en una instalación libre de patógenos específica en el Hospital Universitario de Zurich de acuerdo con las directrices de las autoridades veterinarias suizas.

Virus, péptidos y oligodesoxinucleótidos. Se obtuvo aislado WE de LCMV en el Instituto de Inmunología Experimental, Hospital Universitario, Zurich, Suiza. Los títulos de LCMV se determinaron usando un ensayo de formación de enfoque en fibroblastos MC57 (Battegay, M. *et al.*, *J Virol Methods* 33, 191-198; 1991. Virus de vaccinia recombinante que expresa la glicoproteína LCMV (vacc-gp) (Bachmann, M.F. *et al.*, *Eur J Immunol* 24, 2228-2236, 1994 se cultivó y se sembró en placa en células BSC40 (Kundig, T.M. *et al.*, *J Virol* 67, 3680-3683; 1993. Los péptidos gp33 de glicoproteína LCMV (aa33-41; KAVYNFATM, SEC ID N°: 3) y gp61 (aa61-80; GLNGPDIYKGVYQFKSVEFD, SEC ID N°: 4) y péptido np52 de VSV (SDLRGYVYQGLKSG, SEC ID N°: 5) se adquirieron en EMC Microcollections (Tubingen, Alemania). El péptido de matriz de influenza (GILGFVFTL, SEC ID N°: 6) se obtuvo en Neosystems (Estrasburgo, Francia). El péptido HPV16 E7 (aa49-57; RAHYNIVTF, SEC ID N°: 7) usado se sintetizó en MannKind Corporation (Valencia, CA) hasta > 99 % de pureza. El oligodesoxinucleótido 1668 rico en CG modificado con fosforotioato (5'-TCC ATG ACG TTC CTG AAT AAT-3', SEC ID N°: 8) se sintetizó en Microsynth (Balgach, Suiza).

Programas de inmunización. Los diferentes programas de inmunización (s1 a s6) se diseñaron para administrar una dosis acumulativa fija de 125 µg de péptido gp33 (KAVYNFATM, SEC ID N°: 3) o péptido de matriz de influenza (GILGFVFTL, SEC ID N°: 6; Falk, K. *et al.* *Immunology* 82, 337-342, 1994 y 12,5 nmol de CpG 1668 en un marco temporal de uno a cuatro días (Tabla 1). Observar que los programas 3 (s3) y 4 (s4) siguen un patrón de disminución o aumento de forma exponencial en las etapas con un factor de dilución de 5, respectivamente. La inmunización con péptido de matriz de influenza se realizó con la misma dosis acumulativa de 125 µg y siguió el mismo programa.

Experimentos de transferencia adoptivos. 1×10^6 linfocitos T transgénicos de TCR se volvieron a suspender en 250 µl de PBS y se inyectaron en la vena de la cola de ratones C57BL/6 emparejados por sexo con el fin de aumentar las frecuencias de los linfocitos T precursores y facilitar la evaluación de la respuesta inmune. Un día después, los receptores se vacunaron por vía subcutánea en la región del cuello con dosis variables de péptido gp33 mezclado con oligodesoxinucleótido de citosina-guanina (CpG ODN) tal como se indica en la Tabla 1. Como alternativa, los ratones se infectaron por vía intravenosa con la cepa LCMV-WE (250 pfu). La inmunización con péptido de matriz de influenza se realizó con la misma dosis acumulativa de 125 µg siguiendo los mismos programas.

Análisis de FACS. Para el análisis de FACS de antígenos de superficie, se prepararon suspensión de células individuales libre de RBC de sangre, bazo o ganglios linfáticos. Las células se incubaron en hielo durante cinco minutos con anti-CD16/CD32 para el bloqueo del receptor de Fc, y se hizo tinción con tetrámero de clase I de MHC de gp33 marcado con PE (gp33/H-2Db) durante 15 minutos a 37 °C seguido de tinción para otros antígenos de superficie en hielo durante 20 minutos. Todas las tinciones se prepararon en PBS/FCS al 2 % con azida sódica al 0,01 %. Para la tinción intracelular de IFN-γ, se cultivaron suspensiones de células individuales *in vitro* con 2×10^6 M de péptido gp33 y 10 µg/ml de Brefeldina A (Sigma, Buchs, Suiza) en medio completo durante cuatro horas. A continuación, los linfocitos se tiñeron en la superficie tal como anteriormente, se fijaron en PBS/PFA al 1 % libre de proteína durante 10 minutos, se permeabilizó en PBS/NP40 al 0,1 % durante tres minutos en hielo, y por último se incubó con anticuerpos anti-IFN-γ en PBS/FCS al 2 % en hielo durante 35 minutos. Las muestras se adquirieron en un FACSCalibur y se analizaron usando el software CellQuest de BD Biosciences (San Jose, CA) o el software FlowJo de TreeStar Inc. (Ashland, OR). Todos los otros anticuerpos se adquirieron en BD Pharmingen (San Diego, CA).

Evaluación de la inmunidad antiviral *in vivo*. Ratones C57BL/6 hembra vacunados se infectaron por vía intraperitoneal con $1,5 \times 10^6$ pfu de vacc-gp. Cinco días más tarde, se aislaron los ovarios y los títulos de a vaccinia se determinaron en células BSC 40 tal como se describe en Kundig, T.M. *et al.*, en *J Virol* 67, 3680-3; 1993, *mencionado anteriormente*. Como alternativa, los ratones se infectaron con 250 pfu de LCMV-WE, y los títulos virales en los bazo se determinaron en células MC57 (Battegay *et al.*, 1991, *mencionado anteriormente*).

Ensayo de citotoxicidad y análisis de secreción de citoquinas. 1×10^5 linfocitos T específicos de gp33 transgénicos se cultivaron durante seis días en placas de 24 pocillos junto con células alimentadoras irradiadas singeneicas (2×10^6 células/pocillo; 2000 rads) y se pulsaron con las cantidades indicadas de péptido gp33. A continuación, las células receptoras se volvieron a suspender en 300 µl de medio recién preparado y se realizaron discusiones tres veces. Las células EL-4 se expulsaron con péptido gp33 10^{-6} M y se usaron como células diana en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de cinco horas (Bachmann, M.F. *et al.*, *Eur J Immunol* 24, 2228-36, 1994, *mencionado anteriormente*). La radiactividad en los sobrenadantes del cultivo celular se midió con un Contador Cobra II (Canberra Packard, Downers Grove, IL). Los sobrenadantes del cultivo no radiactivos se sometieron a ensayos

diariamente para las concentraciones de IFN- γ , IL-2 e IL-10. El análisis de citoquinas se realizó usando ensayos múltiplex con perlas y citometría de flujo.

Preparación de células dendríticas derivadas de médula ósea para vacunación. Se aislaron células de médula ósea de los fémures de ratones C57BL/6 jóvenes y se sembraron a 2×10^6 células en placa de 100 mm en 10 ml el medio complementado con 50 ng/ml de rmGM-CSF y 25 ng/ml de rmlL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN). En el día siete, las células se cosecharon, y las DC se purificaron por selección positiva usando microperlas de 1c anti-CD1 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Las células purificadas se sembraron en placas de seis pocillos y se estimularon durante una noche con CpG ODN 1668 2 μ M. El fenotipo de DC se evaluó por citometría de flujo usando un panel de mAb marcado frente a CD80, CD86, CD40, CD11c, y un cóctel de anticuerpo de linaje de ratón (CD3e, Cd11b, CD45R/B220, Ly-76, Ly-6G, Ly-6C). Todos los anticuerpos se obtuvieron en BD Pharmingen. Posteriormente, las DC se pulsaron con el péptido E7 del HPV (aa49-57) (RAHYNIVTF, SEC ID N°: 7) a 10 μ g/ml a 37 °C durante dos horas. Las DC se lavaron tres veces con PBS antes de la administración de 25 μ l de la DC bilateralmente en los ganglios linfáticos inguinales de ratones C57/B6 anestesiados (Johansen *et al.* 2005a. *Eur J Immunol* 35: 568-574. Los grupos de diez ratones recibieron una inyección de bolo individual de las DC ($1,11 \times 10^5$) en el Día 1 (s1), o inyecciones de número de las DC exponencialmente o de forma creciente (10^3 , 10^4 , y 10^5) en los Días 1, 3 y 6 (s4).

Análisis de Tetrámero por E7. Se aislaron PBMC de ratones (n = 10) en el día 17 y las células mononucleares se separaron de las RBC siguiendo centrifugación por densidad (Lympholyte Mammal, Cedarlane Labs). La respuestas de CTL específica para E7₄₉₋₅₇ se cuantificó por tinción de células con tetrámero de H-2Db HPV16 E7 (RAHYNIVTF, SEC ID N°: 7)-PE MHC (Beckman Coulter) y mAb anti-CD8a conjugado con FITC (Ly-2) (BD Pharmingen) a 40 °C durante una hora. Los datos se recogieron usando un FACSCalibur y se analizaron usando el software CellQuest.

Análisis de ELISPOT. Para la cuantificación de células que producen IFN- γ , se aislaron bazo en el día 21 y se prepararon suspensiones de células individuales (n = 7). Las células mononucleares se aislaron mediante centrifugación por densidad y se volvieron a suspender en medio completo de HL-1 libre de suero que contenía aminoácidos no esenciales, piruvato sódico, glutamina pen-estrep, beta-mercaptoetanol, y HEPES. Se incubaron triplicados de $2,5 \times 10^5$ esplenocitos con 10 μ g/pocillo de péptido HPV16 E7 a 37 °C durante 72 horas en placas con filtros de membrana de 96 pocillos (placa de 96 pocillos de membrana Multi-screen IP, Millipore). Los ELISPOT se cuantificaron usando Lector de ELISpot y el software de AID (Strassberg, Alemania) después de 24 horas de desarrollo usando revestimiento y detección de anticuerpos de IFN- γ de U-Cytech biosciences (Utrecht, Países Bajos).

Estudios de Protección Tumoral. En el día 21 (15 días después de la última inyección de las DC), tres ratones de cada grupo vacunado y siete ratones C57/B6 sin tratamiento previo se estimularon con 10^5 células de la línea celular tumoral C3.43 transformada por HPV, (Feltkamp *et al.* 1993, *Eur J Immunol* 23: 2242-2249; Feltkamp *et al.* 1995, *Eur J Immunol* 25: 2638-2642, y se cultivaron en DMEM, FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, y 2-mercaptoetanol 50 μ M. Las células se administraron por vía subcutánea en el flanco izquierdo. La progresión del tumor se controló por medidas con calibre (mm) y volúmenes tumorales calculados.

Análisis Estadístico. Se realizó ensayo de t de student que supone varianzas iguales y los datos se consideraron significativos con un valor p de dos colas no emparejados inferior a 0,05. Los datos no paramétricos o no distribuidos de forma normal se analizaron usando el ensayo U de Mann Whitney o con el ANOVA de Kurskal-Wallis. La comparación de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se realizaron usando el ensayo de rango logarítmico.

Ejemplo 2: la estimulación antigénica que aumenta de forma exponencial aumenta la respuesta de los linfocitos T CD8⁺

Se investigó si una respuesta de los linfocitos T se puede aumentar con el aumento de la estimulación antigénica. En un primer experimento, se transfirieron 1×10^6 linfocitos T específicos de gp33 transgénicos en ratones receptores de tipo silvestre C57BL/6 para aumentar las frecuencias de los linfocitos T precursores y facilitar la evaluación de la respuesta inmune.

Todos los ratones se inmunizaron con la misma dosis acumulativa de péptido gp33 mezclado con CpG ODN (en total 125 μ g de gp33 y 12,5 nmol de CpG), usando diferentes protocolos de vacunación tal como se desvela en la FIG. 1D y en la Tabla 1: s1) de una sola dosis en una inyección de bolo el día 0; s2) cuatro dosis iguales durante cuatro días; s3) dosis decrecientes durante cuatro días; y s4) dosis crecientes durante cuatro días. Además, se inmunizaron grupos de ratones con una sola dosis de CpG seguido de dosis de aumento de forma exponencial de péptido gp33 (s5), o con una sola dosis de gp33 seguido de dosis de aumento de forma exponencial de CpG (s6). Los ratones infectados por vía intravenosa con 250 pfu de virus LCMV en el día cero sirvieron como un control positivo. En el día 6 (FIG. 1A, día 12 (FIG. 1B) y día 8 (FIG. 1C), las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ se cuantificaron mediante tinción de IFN- γ intracelular de linfocitos sanguíneos reestimulados con péptido gp33 *in vitro*. La FIG. 1B representa ejemplos de FACS representativos del análisis en el día 12.

Se eligió CpG ODN como el adyuvante ya que aumenta fuertemente las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ (Krieg, A.M., *Annu Rev Immunol* 20, 709-60, 2002; Schwarz, K. *et al.*, *Eur J Immunol* 33, 1465-70, 2003. Los ODN

estabilizados con fosforotioato se eliminan del plasma con una vida media de 30-60 minutos (Farman, C.A. y Kombrust, D.J., *Toxicol Pathol* 31 *Suppl*, 119-22, 2003. Sin embargo, en tejidos los CpG ODN son relativamente estables con una vida media de 48 horas (Mutwiri, G.K., *et al.*, *J Control Release* 97, 1-17, 2004. Además, en la bibliografía se indica que dentro de 60 minutos las proteasas del suero degradan los péptidos libres por debajo de los niveles de detección (Falo, L.D., Jr., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 8347-50, 1992; Widmann, C., *et al.*, *J Immunol* 147, 3745-51, 1991, mencionado anteriormente).

Los datos muestran que la inmunización que conduce a respuestas de los linfocitos T CD8⁺ de una magnitud comparable a la infección con LCMV de tipo silvestre requirió que tanto gp33 como CpG se administrarán de una forma que aumentaba de forma exponencial. La inmunización usando dosis diarias uniformes de gp33 y CpG indujo las segundas respuestas más fuertes de los linfocitos T CD8⁺ que, sin embargo, eran significativamente menores que la estimulación de dosis creciente ($p = 0,0001$ en el día seis). Si alguno de los componentes de la vacuna se administraba como una sola dosis, la eficacia de la inmunización se reducía de forma significativa pero significativa en comparación con el control sin tratamiento previo ($2,23 \pm 0,84$ % frente a $0,19 \pm 0,12$ % $p = 0,02$ en el día seis).

Se realizaron observaciones similares en ratones de tipo silvestre sin tratamiento previo que no recibieron células transgénicas de TCR (FIG. 1C). Los ratones C57BL/6 inmunizados con dosis de vacuna de aumento de forma exponencial (gp33 y CpG) mostraron una inducción aumentada de forma significativa de los linfocitos T CD8⁺ ($2,1 + 0,4$ %) en comparación con los otros protocolos de vacunación ($p < 0,008$), que indujeron frecuencias apenas detectables de linfocitos T CD8⁺ específicos. Ninguno de los grupos sometidos a ensayo mostró respuestas inmunes medibles en el día cuatro (no se muestran los datos). Estos datos demuestran que, independientemente de la dosis total, la cinética de la vacunación es un parámetro fundamental de la inmunogenicidad.

Ninguno de los grupos sometidos a ensayo mostró respuestas inmunes medibles en el día cuatro (los datos no se muestran). En general, estos resultados mostraron que independientemente de la dosis total, la cinética del antígeno y del adyuvante son parámetros fundamentales de inmunogenicidad.

En las figuras: s1: dosis individual de péptido gp33 y CpG; s2: dosis equivalentes de péptido gp33 y CpG; s3: dosis que disminuyen de forma exponencial de péptido gp33 y CpG; s4: dosis que aumentan de forma exponencial de péptido gp33 y CpG; s5: dosis que aumentan de forma exponencial de péptido gp33 y una sola dosis inicial de CpG; s6: dosis individual inicial de péptido gp33 y dosis que aumentan de forma exponencial de CpG; sin tratamiento previo: ratones sin tratar; LCMV: ratones inmunizados por vía intravenosa con 250 pfu de LCMV en el día cero. Los valores representan la media y ETM de cuatro ratones por un grupo. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos similares.

La FIG. 1B es un ejemplo de FACS representativo del análisis en el día 12. Panel superior: Reestimulación con péptido gp33, panel inferior: Tinción de control sin reestimulación con gp33 (panel inferior).

		Tabla I: Programas de Inmunización				
Programa		Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Dosis acumulativa
s1	Péptido (μ g)	125	0	0	0	125 μ g
	CpG (nmol)	12,5	0	0	0	12,5 nmol
s2	Péptido (μ g)	31,25	31,25	31,25	31,25	125 μ g
	CpG (nmol)	3,1	3,1	3,1	3,1	12,4 nmol
s3	Péptido (μ g)	100	20	4	0,8	125 μ g
	CpG (nmol)	10	2	0,4	0,08	12,5 nmol
s4	Péptido (μ g)	0,8	4	20	100	125 μ g
	CpG (nmol)	0,08	0,4	2	10	12,5 nmol
s5	Péptido (μ g)	0,8	4	20	100	125 μ g
	CpG (nmol)	12,5	0	0	0	12,5 nmol
s6	Péptido (μ g)	125	0	0	0	125 μ g
	CpG (nmol)	0,08	0,4	2	10	12,5 nmol

Ejemplo 3: el aumento de la respuesta de los linfocitos t cd8⁺ es independiente de la ayuda de los linfocitos t

El papel de la ayuda de los linfocitos T con respecto al cebado de los linfocitos T CD8⁺ es bien conocido en la técnica. Los epítomos de Th pueden ser esenciales para la inmunidad de los linfocitos T CD8⁺ funcionales (Johansen *et al.*, *Eur J Immunol.*, 34, 91-97, 2004; Shedlock y Shen, *Science*, 300, 337-339, 2003; Sun y Bevan, *Science*, 300, 339-342, 2003. Por otro lado, en situaciones en las que la frecuencia del precursor es elevada, las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ son menos dependientes de Th (Mintern *et al.*, *J Immunol*, 168, 977-980, 2002 especialmente cuando se usa un inmunógeno fuerte, *por ejemplo*, gp33 de LCMV. Además, la vía de administración también puede realizar el requisito para la ayuda de T (Bour *et al.*, *J Immunol*, 160, 5522-5529, 1998. Por lo tanto, la dependencia

de Th de CTL depende en gran medida del ajuste experimental. En base a esta hipótesis, los inventores examinaron si el aumento de la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ era independiente de la ayuda de los linfocitos T mediante vacunación con dosis de vacuna que aumentan de forma exponencial.

Los ratones inmunizaron con dosis de vacuna de aumento de forma exponencial tal como en los protocolos que se han descrito anteriormente (véase la Tabla 1) usando una mezcla del péptido gp33 de LCMV de clase I (aa33-41) y el epítipo de Th de gp61 de LCMV de clase II (aa61-80) de LCMV. Se observó que el aumento de la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ mediante la vacunación con dosis de vacuna que aumentan de forma exponencial era independiente de la ayuda de los linfocitos T, dado que se obtuvieron los mismos efectos de la cinética de la dosis en las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ en ratones inmunizados con los protocolos que se han descrito anteriormente (no se muestran los datos).

Para examinar si la inmunización exponencial observada anteriormente se puede conseguir con otros péptidos, el análisis se expandió a otro péptido derivado de la proteína de matriz de influenza que se une a la molécula de clase I HLA A2.1 humana (Falk, K. *et al.*, *Immunology*: 82, 337-42, 1994, *mencionado anteriormente*). Los ratones transgénicos que expresan HLA A2.1 (HHD; Pascolo, S. *et al.*, *J. Exp. Med.* 185, 2043-51, 1997, *mencionado anteriormente*) se inmunizaron por vía subcutánea con un péptido de matriz de influenza (GILGFVFTL, SEC ID N°: 1) y CpG ODN. En programa de inmunización fue tal como se describe en la Tabla 1 (mencionada anteriormente). La vacuna se administró como un solo bolo (125 µg de péptido y 12,5 nmol CpG, s1) o la misma dosis total se administró durante cuatro días de una forma que aumenta con la dosis (s4). Como un control positivo se usó adyuvante de Freund incompleto (IFA), un aceite mineral que libera el antígeno lentamente (Miconnet, I. *et al.*, *J Immunol*, 168, 1212-8, 2002; Speiser, D.E. *et al.*, *J Clin. Invest.* 115, 739-46, 2005; Aichele, P., *et al.*, *J Exp. Med.* 182, 261-6; 1995. Después de ocho días se analizaron los linfocitos T CD8⁺ para la producción de IFN-γ después de la reestimulación *in vitro* de linfocitos sanguíneos con péptido (media ± ETM; n = 3-4). Se observó que las dosis de vacuna que aumentan de forma exponencial generaron frecuencias más elevadas de células que producen IFN-γ (6,2 % ± 1,5) que lo que se produce con una sola dosis de péptido y CpG (0,6 % ± 0,2) o péptido y CpG emocionados en IFA (2,5 % ± 1,9); (FIG. 2).

Ejemplo 4: la administración de antígeno durante cuatro días o más induce respuestas máximas de los linfocitos t cd8⁺

Tal como se muestra en los Ejemplos anteriores, el antígeno que aumenta de forma exponencial durante un periodo de tiempo de cuatro días indujo respuestas de los linfocitos T significativamente más fuertes que una inyección de bolo o inyecciones diarias de dosis de vacuna uniforme. Por lo tanto se realizaron experimentos para examinar si una prolongación adicional de una presentación de antígenos podría aumentar las respuestas incluso adicionalmente. Los grupos de ratones C57BL/6 se inmunizaron por vía subcutánea con la misma dosis total de péptido gp33 y CpG (125 µg de p33 y 12,5 nmol de CpG), pero siguiendo una cinética exponencial diferente, por inyección de la dosis en forma de un bolo o durante cuatro, seis u ocho días (FIG. 3A) con máximos en el día cero (bolo), tres, cinco o siete días.

En diferentes puntos temporales después de la última inyección, se aislaron linfocitos sanguíneos y se reestimularon *in vitro* con péptido gp33 para la determinación de la expresión de CD44 e IFN-γ intracelular mediante citometría de flujo. Tal como se ilustra en la FIG. 3B, en comparación con una sola inyección de bolo, las inyecciones durante cuatro, seis u ocho días dieron como resultado frecuencias significativamente aumentadas comparables de linfocitos T CD8⁺ específicos a la altura de la respuesta inmune, que era de cuatro a siete días después de la última inyección. Las transferencias de densidad de FACS representan las frecuencias de linfocitos positivos para CD8 que producen CD44hi e IFN-γ tal como se mide por FACS en el máximo de la respuesta inmune, y los números muestran el porcentaje medio de linfocitos T CD8⁺ de CD44hi que producen IFN-γ. Se muestra uno de cada dos experimentos similares (n = 3-4).

El porcentaje medio de linfocitos T CD8⁺ de CD44hi que producen IFN-γ también se representa con una función del tiempo (FIG. 3C). Se muestra uno de cada dos experimentos similares (n = 3-4). La cinética del antígeno que presenta un máximo en el día cuatro indujo respuestas de CTL significativamente más fuertes en comparación con un perfil antigénico más corto o más largo que inducía respuestas significativamente más débiles. Además, no había diferencia estadística en el número de células de memoria de descanso tal como se mide cuatro semanas después de la última inyección. Una razón biológica para estas observaciones puede ser que la proliferación y la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ en células efectoras necesitan varios días, y sería difícil para el sistema inmune competir incluso con un patógeno que infecta en su inmensa mayoría huésped en uno o dos días. Por otro lado, los patógenos que se replican durante periodos de tiempo prolongado causan más daño cuando están luchando constantemente por CTL.

Ejemplo 5: la estimulación antiigénica que aumenta de forma exponencial aumenta la respuesta antiviral protectora

Para esclarecer adicionalmente la relevancia funcional de las observaciones anteriores, ratones C57BL/6 de tipo silvestre hembra se inmunizaron con dosis acumulativas fijas de péptido gp33 y CpG de acuerdo con diferentes regímenes (s1-s4 tal como se muestra en la Tabla 1) y a continuación se estimularon con LCMV o un virus vaccinia recombinante que expresa la glicoproteína de LCMV (vacc-gp) en puntos temporales cuando las respuestas de los

linfocitos T ya están en una fase de contracción o de memoria (Kaech, S.M., *et al.*, *Nat Rev Immunol* 2, 251-62, 2002. la protección frente a ambos virus depende exclusivamente de los linfocitos T CD8⁺ (Binder, D. y Kundig, T.M., *J Immunol* 146, 4301-7, 1991; Kundig, T.M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Set., USA*: 93, 9716-23, 1996.

Se inmunizaron ratones (n = 4) con cantidades que aumentan de forma exponencial (s4) o con una inyección de bolo (s1) de péptido gp33 y CpG tal como se ha descrito anteriormente (Tabla 1). Los ratones de control negativo se dejaron sin tratar (sin tratamiento previo) y los ratones del control positivo se infectaron con LCMV (250 pfu). Se extrajo sangre a los ratones en el día 10 y en el día 30 para el análisis de CTL efectores o de memoria específicos de gp33 usando tetrámeros de gp33-MHG y citometría de flujo (FIG. 4A) o en el día 30 para el análisis de linfocitos T CD8⁺ que producen IFN-γ después de la reestimulación *in vitro* con gp33 (FIG. 4B). La FIG. 4A representa la expresión de CD44^{hi} positiva para tetrámero de gp33 en el día 10 y en el día 30, y de izquierda a derecha, Sin tratamiento previo, s1, s4 y LCMV. En línea con los resultados que se han descrito anteriormente, las dosis de péptido que aumentan de forma exponencial (gp33) y CpG indujeron frecuencias significativamente más elevadas de células efectoras y de memoria que producen IFN-γ (FIG. 4B) y células de memoria positiva para tetrámero de gp33 (CD44^{hi}) (FIG. 4A) que lo que consiguió una vacuna de una sola descarga. En el día 30, todos los ratones estimularon mediante inyección intraperitoneal con 250 pfu de LCMV. Cuatro días más tarde, se midieron los títulos virales en los bazo. En el día 30, los ratones se estimularon por vía intraperitoneal con 250 pfu de LCMV. Cuatro o cinco días después, se toman bazo u ovarios para la determinación de LCMV. Aunque los ratones vacunados con bolo (s1) no estaban protegidos de forma significativa frente a la replicación viral (FIG. 4C), la vacuna que aumenta de forma exponencial indujo una protección significativa que inhibe los títulos de LCMV aproximadamente de 10 a 20 veces cuando se compara con los ratones sin tratamiento previo o vacunados con bolo (p < 0,01).

En otro conjunto de experimentos, los ratones C57BL/6 se inmunizaron usando diferentes regímenes y a continuación se estimularon por vía intravenosa en el día 8 (FIG. 4D) o 24 (FIG. 4E) con 1,5 x 10⁶ pfu del virus vaccinia recombinante (vacc-gp). Cinco días después, la replicación de vacc-gp se determinó en ovarios (FIG. 4D y 4E). De nuevo, solamente los ratones inmunizados en una forma de aumento de dosis fueron capaces de aumentar de forma significativa las respuestas protectoras de los linfocitos T CD8⁺, inhibiendo la replicación viral con una media de dos a tres órdenes de magnitud mejores que los de los otros protocolos de inmunización con péptido.

Por lo tanto, estos resultados, atestiguan la importancia biológica de la cinética de la presentación del antígeno durante la inmunización.

Ejemplo 6: el número de apc activadas no depende del tipo de cinética de estimulación

Para someter a ensayo si la cinética de inmunización afectaba al estado de activación y los números de APC activadas, se inmunizaron ratones C57BL/6 con péptido gp33 y CpG de acuerdo con el protocolo de inmunización s1 (inyección de bolo) y s4 (dosis que aumentan de forma exponencial) tal como se describe en las Figuras 1-3 y en la Tabla 1. Las vacunas se administraron por vía subcutánea en la región inguinal. Después de uno, cuatro, seis y ocho días, se retiraron los ganglios linfáticos inguinales y se analizaron suspensiones de células individuales de los mismos por citometría de flujo para la expresión del marcador de DC CD11c, así como CD86 y el marcador I-Ab de clase II de MHC (FIG. 5A). Los resultados muestran la expresión de la fluorescencia media con respecto a los controles sin tratamiento previo (día cero). Los resultados sugieren que la cinética diferente no afectaba de forma significativa a los números de DC en los ganglios linfáticos de drenaje, ni a su estado de activación mediante la expresión de clase II de MHC (I-Ab) y CD86 (FIG. 5A). Sin embargo, aunque los máximos de los números de DC y la activación eran comparables, se separaron en el tiempo en 2-3 días. La activación de DC alcanzó su máximo un día después de la dosis de CpG máxima, independiente del tipo de cinética de inmunización.

Por lo tanto, se sometió a ensayo la posibilidad de que la vacuna que aumenta de forma exponencial fuera óptima para la inducción de los linfocitos T CD8⁺, simplemente porque el péptido antigénico se administra en un punto temporal en el que las DC es cuando están más activadas. Si esto fuera cierto, la administración de una dosis elevada de péptido como un bolo un día después de una inspección de bolo de CpG o un día después de la última dosis de CpG proporcionada en un patrón que aumenta de forma exponencial durante cuatro días, daría como resultado una respuesta de los linfocitos T CD8⁺ comparable a la que proporcionan tanto el partido como CpG de una forma que aumenta con la dosis. En un experimento separado, los ratones inmunizaron con péptido gp33 y CpG de acuerdo con protocolos modificados tal como se representa (FIG. 5B). Un grupo recibió un bolo de CpG en el día tres y un bolo de péptido gp33 en el día cuatro. Un grupo recibió dosis de CpG que aumentan de forma exponencial espacio en los días cero a tres seguido de un bolo de péptido gp33 en el día cuatro. El último grupo recibió dosis que aumentan de forma exponencial de péptido gp33 y CpG en los días uno a cuatro tal como se ha descrito anteriormente (s4). La frecuencia de los linfocitos T CD8⁺ que producen IFN-γ se midió en sangre periférica en el día 10. Los resultados muestran la media y ETM de uno de cada dos experimentos comparables (n = 3). Tal como es evidente a partir de la FIG. 5B, la estimulación previa de las APC con CpG dio como resultado respuestas inmunes específicas de gp33 que eran significativamente menores que es la respuesta producida por el patrón que aumenta de forma exponencial de administración de gp33 y CpG en conjunto (p = 0,016).

Ejemplo 7: la estimulación antigénica que aumenta de forma exponencial favorece la estimulación prolongada de linfocitos t

Para someter a ensayo cómo afectaba la cinética de inmunización a la proliferación de los linfocitos T CD8⁺, los ratones se inyectaron con una sola dosis (s1), dosis diarias uniformes (s2) o con dosis que aumentan de forma exponencial (s4) de péptido gp33 y CpG tal como se ha descrito anteriormente y en la Tabla 1. Un grupo de ratones se dejó sin tratar como un control negativo. Para controlar la proliferación, todo los ratones recibieron 10⁷ o 1,5 x 10⁶ esplenocitos marcados con CFSE a partir de ratones TCR318 transgénicos por vía intravenosa un día antes de la primera inmunización. En diferentes puntos temporales, los linfocitos se aislaron por extracción de sangre en la cola y se analizó la expresión de CD8 y la tinción con CFSE por citometría de flujo. Los valores de *p* indican diferencias estadísticas entre los programas s1 y s4 con respecto al porcentaje de linfocitos T CD8⁺ marcados con CFSE que han entrado en división. Los resultados muestran uno de dos experimentos comparables. Una inyección de bolo de péptido gp33 y CpG estimuló a los linfocitos T CD8⁺ marcados con CFSE para que se dividieran tres días después de la inmunización (FIGs. 6A y 6B). La proliferación ya se podía detectar después de dos días (FIG. 6B). En el día cinco, las células precursoras aún entraban en división aunque en menor medida que en el día tres, y hacia el día siete, las células marcadas con CFSE habían acabado de entrar en nuevas divisiones. Por el contrario, la estimulación que aumenta de forma exponencial prolongó de forma notable la proliferación de linfocitos T. Las células que entran en división se podían determinar ya a los tres días después del cebado, a pesar de que aún no han recibido todo el régimen de inmunización, y la división se prolongó durante los días cinco y siete (FIG. 6B). Incluso en el día nueve, aún se podía observar proliferación (no se muestra). Además, el índice de división, es decir, el índice medio de la división experimentada, era significativamente más elevado (*p* < 0,05 según Mann Whitney) para s4 que para s2.

Ejemplo 8: los números de dc pulsadas con péptido que aumentan de forma exponencial aumentan las respuestas de los linfocitos tcd8⁺

Para investigar la contribución de diferentes números de APC, se inmunizaron ratones C57BL/6 con los mismos números totales de DC pulsadas con péptido, pero usando cinética diferente. Se cargaron DC derivadas de médula ósea con el péptido E7 del HPV (aa49-57, RAHYNIVTF, SEC ID N°: 2), y se inyectó un total de 1,11 x 10⁵ células en los ganglios inguinales como un bolo en el día uno (s1), o se administró el mismo número total de células en un patrón creciente (s4) en los días uno (10³ células), tres (10⁴ células), y seis (10⁵ células). Además, las vacunas se administraron por vía intralinfática con el fin de garantizar un número total constante de DC disponibles para el cebado de linfocitos T. Se usaron ratones sin tratamiento previo como controles negativos. En el día 17 y el día 22, la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ positivos para tetrámero E7 en sangre periférica (FIG. 7A (■)) se analizó por citometría de flujo. Los valores representan media y ETM (*n* = 10). Se analizaron ELISPOT de IFN-γ (FIG. 7A (□)) a partir de bazos (*n* = 7). Los valores representan media y ETM (*n* = 7). En el día 21, tres ratones vacunados y diez ratones sin tratamiento previo se estimularon con la línea celular C3.43 transformada con HPV (FIG. 7B). La progresión del tumor se controló con medidas de calibre (mm) a partir de las que se calcularon los volúmenes tumorales. La supervivencia después de la estimulación se estudió en ratones C57BL/6 (*n* = 4) inmunizados mediante inyección s. c. de DC cargadas con el péptido np52 del VSV (FIG. 7C). Ensayos de clasificación logarítmica de curvas de Kaplan Meier: s4 ≠ s2: *p* = 0,0084; s2 ≠ s1: *p* = 0,0082; s1 ≠ Sin tratamiento previo: *p* = 0,401.

Las dosis que aumentan de forma exponencial (s4) indujeron de nuevo un número más elevado de linfocitos T CD8⁺ específicos de antígeno que una inyección de bolo de la vacuna (s1). Esto era evidente tanto para las frecuencias de linfocitos T CD8⁺ positivos para el tetrámero de MHC-E7 (FIG. 7A (■)) como para las que producen IFN-γ (FIG. 7A (□)) medido en los días 17 y 22, respectivamente. En correlación con la resistencia de la respuesta medida de los linfocitos T CD8⁺, los ratones vacunados con el protocolo de aumento de dosis rechazaron una estimulación con la línea celular tumoral C3.43 transformada con HPV (FIG. 7B). Por el contrario, los ratones vacunados simplemente por un solo bolo no estaban protegidos.

Por la misma razón, los ratones inmunizados con el protocolo (s4) de DC cargadas con el péptido np52 del VSV mostraron un aumento de la supervivencia después de un estímulo con células de linfoma de ratón EL-4 tras décadas para expresar la nucleoproteína del VSV (FIG. 7C). Se inmunizaron ratones C57BL/6 mediante inyección s. c. de DC cargadas con el péptido np52 del VSV (*n* = 4). Se administraron 1,11 x 10⁵ DC como un bolo en el día 1 (s1) o como dosis iguales (s2) por dosis que aumentan con la dosis (s4) en dos días 1, 3, y 6. Se usaron ratones sin tratamiento previo como controles. En el día 14, todos los ratones se estimularon con dosis de 10⁶ de células EL-4 N.1 i. p. (Kundig *et al.*, *J Immunol.* 150, 4450-4456, 1993, *mencionado anteriormente*). Los datos ilustran que la supervivencia de ratones inmunizados (s4) también era significativa mejor que la de los ratones inmunizados de acuerdo con el protocolo (s2) con las DC administradas en dos números uniformes en los tres días (*p* = 0,084).

Por lo tanto, la vacunación que aumenta de forma exponencial demostró ser más inmunogénica que la vacunación de bolo. Dado que estos experimentos mantienen la activación de DC en el mismo nivel a través de toda la inmunización, el número total de las DC es el mismo, esto confirma que la cinética de la aparición de las DC que presentan péptidos activados determinaría la resistencia de la respuesta de los linfocitos T CD8⁺. Por lo tanto, los inventores concluyeron que la sincronización de los números de DC a la frecuencia de los linfocitos T específicos aumenta el tamaño del estallido final de la respuesta de los linfocitos T. aunque la baja frecuencia de los linfocitos T. específicos durante la respuesta temprana se puede estimular de forma eficaz con un número bajo de DC pulsadas con antígeno, parece importante reestimar la frecuencia elevada de los linfocitos T. específicos durante la respuesta primaria tardía con un número elevado de DC.

Ejemplo 9: la estimulación antigénica que aumenta de forma exponencial aumentó la producción de il-2 en los linfocitos t: el impacto de la cinética antigénica al nivel de clones de linfocitos t

A continuación los inventores investigaron si las observaciones en los Ejemplos anteriores se podrían explicar a nivel de un clon de linfocito T, o si eran el resultado de procesos de selección de linfocitos T *in vivo* que implican clonotipos de linfocitos T de afinidad diferencial, avidez y funcionalidad.

Se cocultivaron 1×10^5 linfocitos T transgénicos de TCR con 2×10^6 esplenocitos singeneicos irradiados que sirven como células alimentadoras. Los linfocitos T que expresan un receptor de linfocitos T transgénicos que reconoce gp33 en el contexto de D^b se estimularon *in vitro* con the la misma dosis total de antígeno, pero correspondiente a diversos perfiles, es decir, con un bolo de gp33 10^{-9} M en el día cero (■); con dosis de gp33 que aumentan de forma exponencial de 10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-10} , y 10^{-9} M los días cero, uno, dos y tres, respectivamente durante 4 días (◆); con la misma dosis de gp33 de $0,25 \times 10^{-9}$ M cada día durante cuatro días (▲); o con dosis de gp33 que disminuyen de forma exponencial de 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} y 10^{-12} M los días cero, uno, dos y tres, respectivamente (*). Las células de control sin estimulación con gp33 se ilustran como (*). IL-2, IL-10 e IFN- γ se determinaron diariamente en sobrenadantes (FIG. 8B), y después de seis días se determinó la actividad de CTL en un ensayo de liberación de ^{51}Cr de cinco horas (FIG. 8A). Los valores representan medios de cultivos por duplicado (FIG. 8A) y por triplicado (FIG. 8B).

De forma similar a los hallazgos *in vivo*, las dosis de inmunógeno que aumentan de forma exponencial indujeron la respuesta de CTL más fuerte, seguido de administraciones diarias de la misma dosis de gp33, aunque la administración del inmunógeno como un bolo o con un perfil de dosis de creciente generó respuestas de CTL más débiles. La diferencia fue incluso superior cuando las células se estimularon con una décima parte de las dosis de péptido. La actividad de CTL se correlacionaba con la producción de IL-2 (FIG. 8B, panel superior). Las dosis de inmunógeno que aumentan de forma exponencial indujeron las cantidades más elevadas de IL-2, aunque las dosis de inmunógeno diarias constantes indujeron mucho menos IL-2. La estimulación antigénica constante indujo cantidades elevadas de IL-10 con un inicio más temprano en comparación con la estimulación antigénica que crece de forma exponencial (FIG. 8B, panel central). IFN- γ se produjo de forma transitoria en una etapa más temprana en las células estimuladas con un bolo de inmunógeno o cantidades que disminuyen de forma exponencial de inmunógeno (FIG. 8B, panel inferior). Por el contrario, la estimulación diaria con dosis constantes o que crecen de forma exponencial indujo la secreción de cantidades más elevadas de IFN-gamma por los linfocitos T específicos.

Por lo tanto, tal como se observa, la estimulación antigénica continua y suficiente era necesaria para mantener la producción de IFN- γ . El hecho de que la estimulación antigénica que aumenta de forma exponencial parece que produce menos IFN- γ que las dosis diarias constantes se puede explicar por la estabilidad *in vitro* elevada de IFN- γ y la acumulación consecutiva debido a la producción de IFN- γ más temprana.

Tomado en conjunto, la estimulación *in vitro* de linfocitos T clonotípicos con dosis de inmunógeno que aumentan de forma exponencial produjo cantidades más elevadas de IL-2 e IFN- γ y estimuló IL-10 en un punto temporal posterior que todos los otros perfiles antigénicos. Estas observaciones son coherentes con la conclusión de que el aumento de la respuesta inmune provocada por el aumento de la estimulación antigénica funciona a un nivel clonotípico. También se ha mostrado que estos fenómenos están acompañados por una avidez de los linfocitos T más elevada, que es fundamental para la interacción eficaz entre los linfocitos T y las células dendríticas (Bousso y Robey. 2003, *Nat Immunol* 4: 579-585).

La producción de IL-2 es una evidencia de la activación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y desempeña un papel fundamental en la regulación de varias etapas de la respuesta de los linfocitos T. El compromiso de las moléculas de TCR (señal 1) y coestimuladoras (señal 2) solamente induce la expansión limitada de los linfocitos T. La amplificación extensa de los linfocitos T así como la diferenciación en células efectoras para aumentar una respuesta productiva de los linfocitos T requiere señalización a través del IL-2R (señal 3; Malek, T.R. y Bayer, A.L., *Nat. Rev. Immunol.*, 4, 665-74, 2004 y la producción autocrina de IL-2 por los linfocitos T CD8⁺ es una directora fundamental de la expansión de los linfocitos T CD8⁺ *in vivo* (Malek, T.R. y Bayer, A.L., *Nat. Rev. Immunol.*, 4, 665-74, 2004, mencionado anteriormente; D'Souza, W.N., *et al.*, *J Immunol*, 168, 5566-72, 2002. Por otro lado, IL-10 es un inhibidor principal de la proliferación de los linfocitos T sobre todo a través de la modulación de las células dendríticas (Moore, K.W., *et al.*, *Annu. Rev. Immunol*, 19, 683-765, 2001. Por lo tanto, los datos *in vivo* de la presente invención indicaron que, a un nivel clonal, los linfocitos T son capaces de decodificar la cinética de la exposición antigénica.

Ejemplo 10: la estimulación antigénica que aumenta de forma lineal aumenta las respuestas de los linfocitos t cd8⁺

Se realizó una investigación para determinar si una respuesta de los linfocitos T se puede potenciar aumentando la estimulación antigénica. En un experimento, se transfieren 1×10^6 linfocitos T específicos de gp33 transgénicos en ratones receptores de tipo silvestre C57BL/6 para aumentar las frecuencias de los linfocitos T precursores y facilitar la evaluación de la respuesta inmune.

Todos los ratones se inmunizan con la misma dosis acumulativa de péptido gp33 mezclado con CpG ODN (en total 125 μg de gp33 y 12,5 nmol de CpG), usando diferentes protocolos de vacunación tal como sigue a continuación:

s1) una sola dosis en una inyección de bolo el día 0; s2) cuatro dosis iguales durante cuatro días; s3) dosis que disminuyen de forma lineal durante cuatro días; y s4) dosis que aumentan de forma lineal durante cuatro días. Además, se inmunizaron grupos de ratones con una sola dosis de CpG seguido de dosis que aumentan de forma lineal de péptido gp33 (s5), o con una sola dosis de gp33 seguido de dosis que aumentan de forma lineal de CpG (s6). Los ratones infectados por vía intravenosa con 250 pfu de virus LCMV en el día cero sirven como un control positivo. En el día 6, día 12 y día 18, las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ se cuantifican mediante tinción de IFN- γ intracelular de linfocitos sanguíneos reestimulados con péptido gp33 *in vitro*.

Se elige CpG ODN como el adyuvante ya que aumenta fuertemente las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ (Krieg, A.M., *Annu Rev Immunol* 20, 709-60, 2002; Schwarz, K. *et al.*, *Eur J Immunol* 33, 1465-70, 2003, *mencionado anteriormente*). Los ODN estabilizados con fosforotioato se eliminan del plasma con una vida media de 30-60 minutos (Farman, C.A. y Kornbrust, D.J., *Toxicol Pathol* 31 Suppl, 119-22, 2003, *mencionado anteriormente*). Sin embargo, en tejidos los CpG ODN son relativamente estables con una vida media de 48 horas (Mutwiri, G.K., *et al.*, *J Control Release* 97, 1-17, 2004, *mencionado anteriormente*). Además, en la bibliografía se indica que dentro de 60 minutos las proteasas del suero degradan los péptidos libres por debajo de los niveles de detección (Falo, L.D., Jr., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 8347-50, 1992; Widmann, C, *et al.*, *J Immunol* 147, 3745-51, 1991, *mencionado anteriormente*).

Se observa que se proporciona inmunización que conduce a respuestas de los linfocitos T CD8⁺ de una magnitud comparable a la infección con LCMV de tipo silvestre por administración tanto de gp33 como de CpG de una forma que aumenta linealmente. También se observa que la inmunización usando dosis diarias uniformes de gp33 y CpG, aunque induciendo respuestas fuertes de los linfocitos T CD8⁺, son significativamente menores que la estimulación de dosis creciente. Además, se observa que cuando uno de los componentes de la vacuna se administra como una sola dosis, la eficacia de la inmunización se reduce de forma significativa pero significativa en comparación con el control sin tratamiento previo.

Se realizan observaciones similares en ratones de tipo silvestre sin tratamiento previo que no reciben células transgénicas de TCR. Los ratones C57BL/6 inmunizados con dosis de vacuna de aumento de forma lineal (gp33 y CpG) muestran una inducción aumentada de forma significativa de los linfocitos T CD8⁺ en comparación con los otros protocolos de vacunación, que inducen frecuencias apenas detectables de linfocitos T CD8⁺ específicos. Estos resultados indican que, independientemente de la dosis total, la cinética de la vacunación es un parámetro fundamental de la inmunogenicidad.

Ejemplo 11: la estimulación antigénica que aumenta de forma lineal aumenta la respuesta antiviral protectora

Se realiza una investigación para determinar si la respuesta antiviral protectora se puede potenciar con el aumento de la estimulación antigénica. En un experimento, se inmunizan ratones C57BL/6 de tipo silvestre hembra con dosis acumulativas fijas de péptido gp33 y CpG (en total 125 μ g de gp33 y 12,5 nmol de CpG) de acuerdo con diferentes regímenes (s1-s4 tal como se ha descrito en el Ejemplo 10) y a continuación se estimulan con LCMV o un virus vaccinia recombinante que expresa la glicoproteína de LCMV (vacc-gp) en puntos temporales cuando las respuestas de los linfocitos T ya se encuentran en una fase de contracción o de memoria (Kaech, S.M., *et al.*, *Nat Rev Immunol* 2, 251-62, 2002 *mencionado anteriormente*). La protección frente a ambos virus depende exclusivamente de los linfocitos T CD8⁺ (Binder, D. y Kundig, T.M., *J Immunol* 146, 4301-7, 1991; Kundig, T.M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*: 93, 9716-23, 1996, *mencionado anteriormente*).

Se inmunizan ratones (n = 4) con cantidades que crecen de forma lineal (s4) o con una inyección de bolo (s1) de péptido gp33 y CpG tal como se ha descrito en el Ejemplo 10. Los ratones de control negativo se dejan sin tratar (sin tratamiento previo) y los ratones de control positivo se infectan con LCMV (250 pfu). Se extrae sangre de los ratones en el día 10 y el día 30 para el análisis de CTL efectoras o de memoria específicas de gp33 usando tetrámeros de gp33-MHC y citometría de flujo o en el día 30 para el análisis de linfocitos T CD8⁺ que producen IFN- γ después de la reestimulación *in vitro* con gp33. Se observa que las dosis de péptido (gp33) que aumentan de forma lineal y CpG inducen frecuencias significativamente mayores de células efectoras y de memoria que producen IFN- γ y células de memoria positiva para tetrámero de gp33 (CD44^{hi}) que las que produce una vacuna de una sola descarga. En el día 30, todos los ratones estimulan por inyección intraperitoneal con 250 pfu LCMV. Cuatro días después, se miden los títulos virales en los bazo. En el día 30, los ratones se estimulan por vía intraperitoneal con 250 pfu de LCMV. Cuatro o cinco días después, se toman bazo u ovarios para la determinación de LCMV. Se observa que aunque los ratones vacunados con bolo (s1) no se protegen de forma significativa frente a la replicación viral, la vacunación que aumenta de forma lineal induce una protección significativa en la inhibición de los títulos de LCMV cuando se compara con los ratones sin tratamiento previo o vacunados con bolo (p < 0,01).

En otro conjunto de experimentos, los ratones C57BL/6 se inmunizan usando los diferentes regímenes y a continuación se estimulan por vía intravenosa en el día 8 fue en el día 24 con $1,5 \times 10^6$ pfu del virus vaccinia recombinante (vacc-gp). Cinco días después, la replicación de vacc-gp se determina en ovarios. Se observa que solamente los ratones inmunizados en una forma de aumento de dosis son capaces de aumentar de forma significativa las respuestas protectoras de los linfocitos T CD8⁺, inhibiendo la replicación viral en órdenes de magnitud mejores que los de los otros protocolos de inmunización con péptido.

Ejemplo 12: la estimulación antigénica que aumenta de forma lineal favorece la estimulación prolongada de los linfocitos t

Para someter a ensayo cómo afecta la cinética de inmunización a la proliferación de los linfocitos T CD8⁺, los ratones se inyectan con una sola dosis (s1), dosis diarias uniformes (s2) o con dosis que aumentan de forma lineal (s4) de péptido gp33 y CpG tal como se ha descrito en el Ejemplo 10. Un grupo de ratones se deja sin tratar como un control negativo. Para controlar la proliferación, todos los ratones reciben 10⁷ esplenocitos marcados con CFSE de ratones TCR318 transgénicos por vía intravenosa un día antes de la primera inmunización. En diferentes puntos temporales, los linfocitos se aíslan por extracción de sangre de la cola y se analizan para la expresión de CD8 y tinción de CFSE por citometría de flujo. Se observa que la estimulación que aumenta de forma lineal prolonga de forma notable la proliferación de linfocitos T con respecto al protocolo de estimulación con inyección de un solo bolo.

Ejemplo 13: los números de dc pulsadas con péptido que aumentan de forma lineal aumentan las respuestas de los linfocitos t cd8⁺

Para investigar la contribución de los diferentes números de APC, los ratones C57BL/6 se inmunizan con los mismos números totales de DC pulsadas competidos, pero usando diferentes genéticas. Las DC que se originan en la médula ósea se cargan con el péptido E7 del HPV (aa49-57, RAHYNIVTF, SEC ID N°: 2), y se inyecta un total de 1,2 x 10⁵ células en los ganglios inguinales como un bolo en el día 1 (s1), o el mismo número total de células se administra en un patrón de aumento de forma lineal (s4) en los días uno (2 x 10⁴ células), tres (4 x 10⁴ células), y seis (6 x 10⁴ células). Además, las vacunas se administran por vía intralinfática con el fin de garantizar un número toda constante de DC disponibles para el cebado de linfocitos T. Los ratones sin tratamiento previo se usan como controles negativos. En el día 17 y el día 22, la frecuencia de los linfocitos T CD8⁺ positivos para el tetrámero E7 en sangre periférica se analiza por citometría de flujo, y se analizan los ELISPOT de IFN-γ a partir de bazos). En el día 21, tres ratones vacunados y diez ratones sin tratamiento previo se estimulan con la línea celular tumoral C3.43 transformada con HPV. La progresión del tumor se controla con medidas de calibre (mm) a partir de las que se calculan los volúmenes tumorales. La supervivencia después de la estimulación se estudia en ratones C57BL/6 inmunizados mediante inyección s. c. de las DC cataratas con el péptido np52 del VSV.

Se observa que las dosis que aumentan de forma lineal (s4) inducen un número más elevado de linfocitos T CD8⁺ específicos de antígenos que una inyección de bolo de la vacuna (s1), tal como se pone en evidencia tanto con las frecuencias de MHC-tetrámero E7 positivo como de los linfocitos T CD8⁺ que producen IFN-γ que se miden en los días 17 y 22, respectivamente. También se observa que los ratones vacunados con el protocolo de aumento de dosis rechazan una estimulación con la línea celular tumoral C3.43 transformada por el HPV, aunque los ratones simplemente vacunados con un solo bolo no se protegen.

En un experimento adicional, los ratones C57BL/6 se inmunizan mediante inyección s. c. de las DC cargadas con el péptido np52 del VSV. Se administran 1,2 x 10⁵ DC en forma de un bolo en el día 1 (s1) o como dosis iguales (s2) o que aumentan con la dosis (s4) en los días 1, 3, y 6. Los ratones sin tratamiento previo se usan como controles. En el día 14, todos los ratones estimulan con dosis de 10⁶ células EL-4 N.1 i. p. (Kundig *et al.*, *J Immunol.* 150, 4450-4456, 1993, *mencionado anteriormente*). Se observa que la supervivencia de los ratones inmunizados con el protocolo (s4) de DC cargadas con el péptido np52 del VSV es significativamente mejor que la de los ratones inmunizados de acuerdo con el protocolo (s1) o (s2) con las DC proporcionadas en los números uniformes en los tres días.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para uso en la estimulación de una respuesta de linfocitos T restringida por MHC de clase I en el tratamiento o la prevención de una enfermedad infecciosa o neoplásica en la que cada dosis posterior a una dosis inicial es mayor que la dosis inmediatamente precedente, en la que las dosis secuenciales aumentan como una función exponencial de la dosis inicial.
- 10 2. Uso de una pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica en la preparación de un medicamento para estimular una respuesta de linfocitos T restringida por MHC de clase I en el tratamiento o la prevención de una enfermedad infecciosa o neoplásica en la que cada dosis posterior a una dosis inicial es mayor que la dosis inmediatamente precedente, en la que las dosis secuenciales aumentan como una función exponencial de la dosis inicial.
- 15 3. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que la composición inmunogénica comprende un inmunógeno, más un inmunopotenciador o modificador de la respuesta biológica.
- 20 4. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 3, en la que el inmunopotenciador o modificador de la respuesta biológica se selecciona entre el grupo que consiste en una citoquina, una quimioquina, un PAMP, un ligando unido a TLR, una secuencia inmunoestimuladora, un ADN que contiene CpG, un ARNs, un ligando Receptor de Reconocimiento de Patrones endocíticos (PRR), un LPS, una saponina de quillaja, y tucaresol.
- 25 5. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que la función exponencial se define con un factor exponencial $\geq 2^{n-1}$.
- 30 6. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 5, en la que el factor exponencial es 5^{n-1} .
- 35 7. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que la pluralidad de dosis comprende más de 2 dosis.
- 40 8. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 7, en la que la pluralidad de dosis comprende más de 6 dosis.
- 45 9. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que la última dosis se administra dentro de 6 días de la primera dosis.
- 50 10. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que se obtiene un aumento de la respuesta en comparación con una inmunización usando la misma dosis acumulativa sin aumento de la dosis de forma secuencial.
11. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 10, en la que el aumento de la respuesta comprende un aumento del número de linfocitos T que responden, un aumento de la producción de una citoquina o un aumento en la actividad citolítica.
12. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 11, en la que la citoquina es IL-2 o IFN- γ .
13. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 10, en la que el aumento de la respuesta comprende un retraso en la producción máxima de una citoquina inmunosupresora.
14. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 13, en la que la citoquina inmunosupresora es IL-10.
15. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que la composición inmunogénica es para administración directamente al sistema linfático de un mamífero.
16. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 15, en la que la administración directa al sistema linfático comprende administración intranodal.
17. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que la composición inmunogénica es para administración subcutánea, intramuscular, intradérmica, transdérmica, transmucosal, nasal, bronquial, oral, o rectal a un mamífero.
18. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 3, en la que la composición inmunogénica comprende un inmunógeno proporcionado como una proteína, péptido, polipéptido, epítipo sintético, mimótopo o ácido nucleico que codifica un antígeno.

19. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 3, en la que el inmunógeno estimula una respuesta a un antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de diferenciación, antígenos tumorales, antígenos embrionarios, antígenos de oncogenes y genes supresores de tumores mutados y antígenos tumorales únicos que tienen su origen en translocaciones cromosómicas.
20. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 19, en la que el antígeno es un autoantígeno.
21. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 4, en la que el inmunopotenciador es un ligando de TLR.
22. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 21, en la que el ligando de TLR es un ADN que contiene CpG.
23. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que la composición inmunogénica comprende una célula.
24. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 23, en la que la célula es una célula tumoral o una célula que presenta antígeno.
25. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 24, en la que la célula que presenta antígeno es una célula dendrítica.
26. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en la que la dosis mayor comprende un número mayor de células.
27. La pluralidad de dosis secuenciales de una composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 26, en la que la dosis mayor comprende un número mayor de complejos de epítipo-MHC en la superficie de la célula.

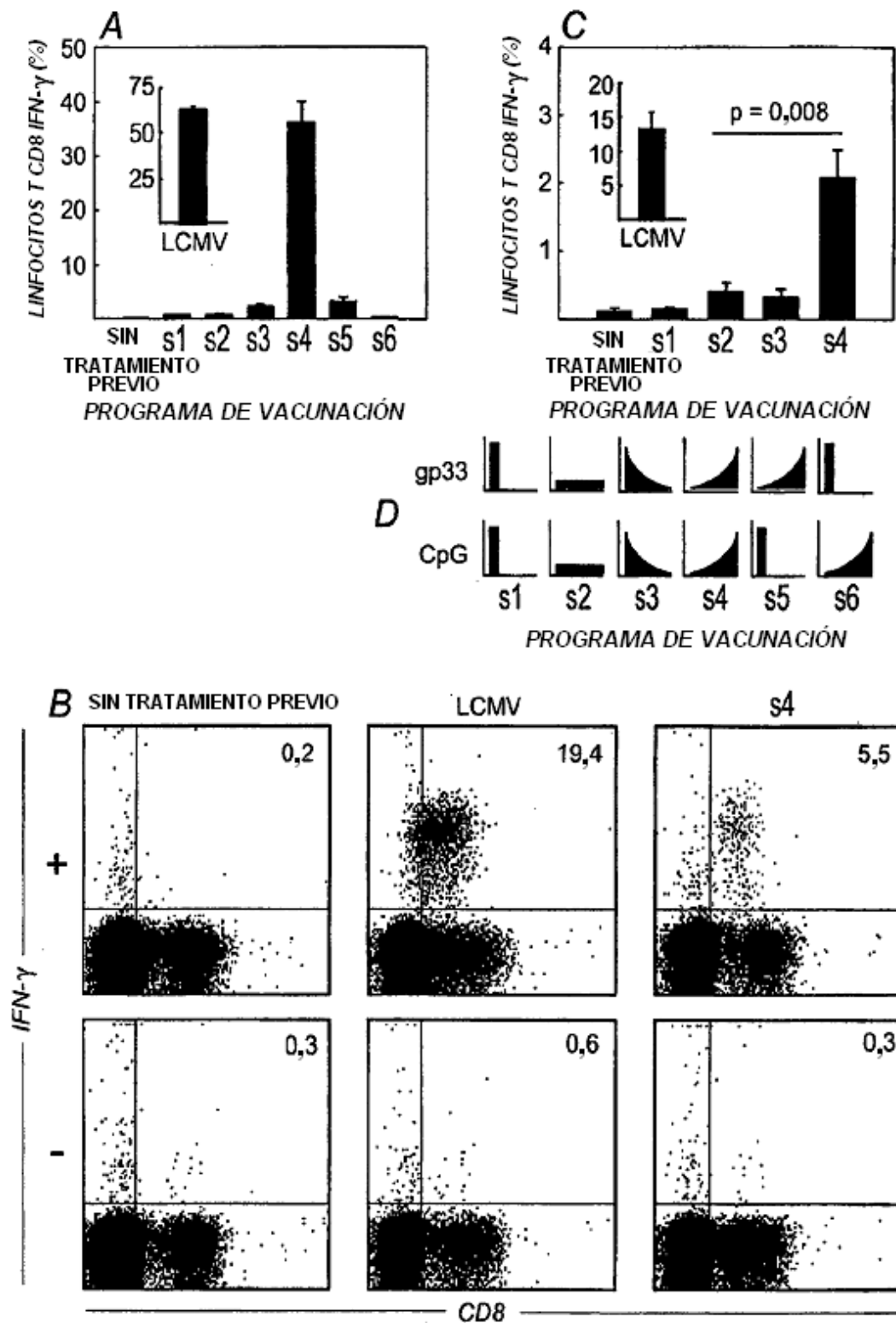


Fig. 1

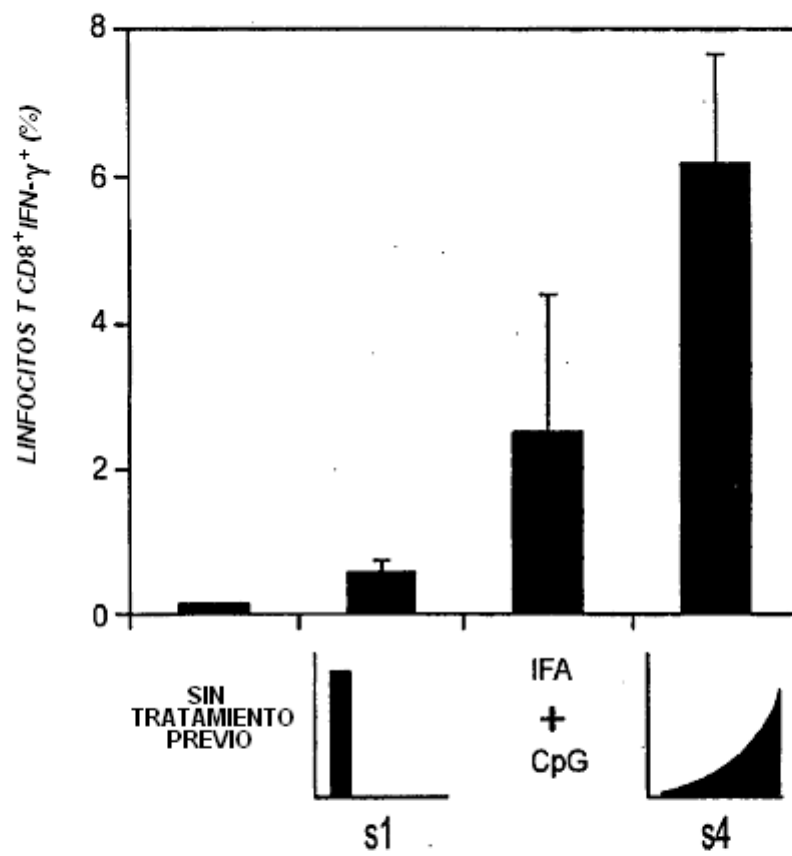


Fig. 2

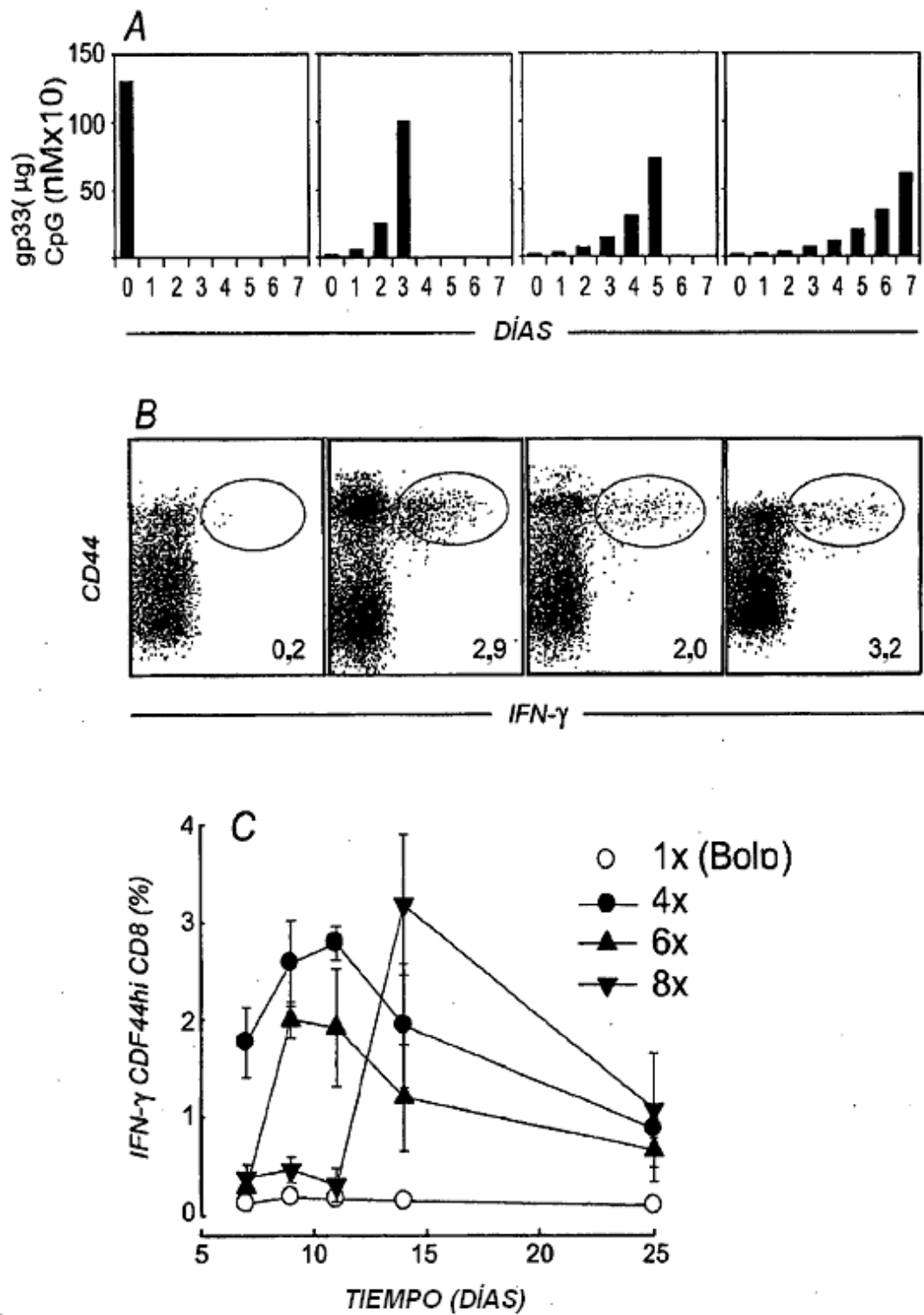
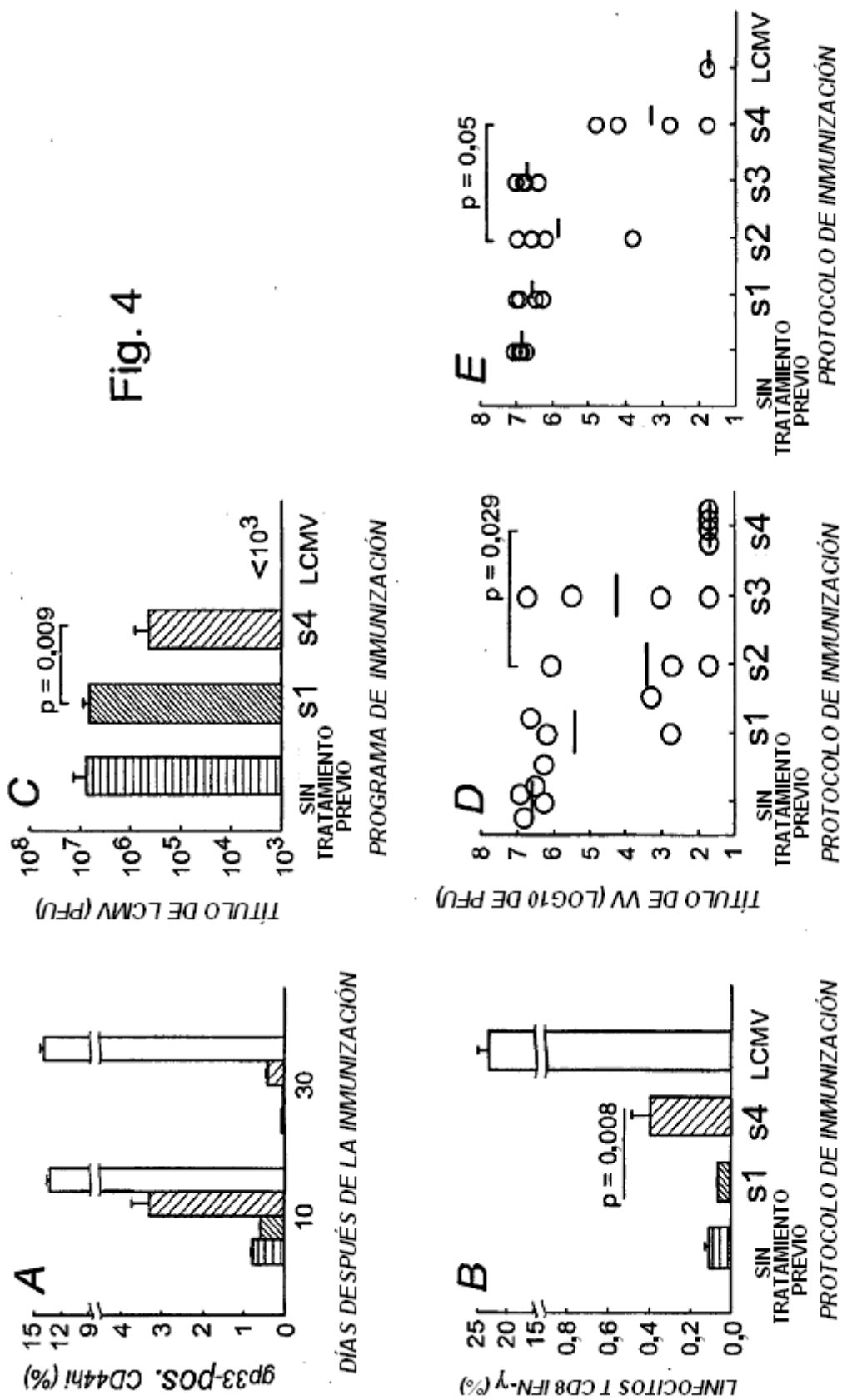


Fig. 3



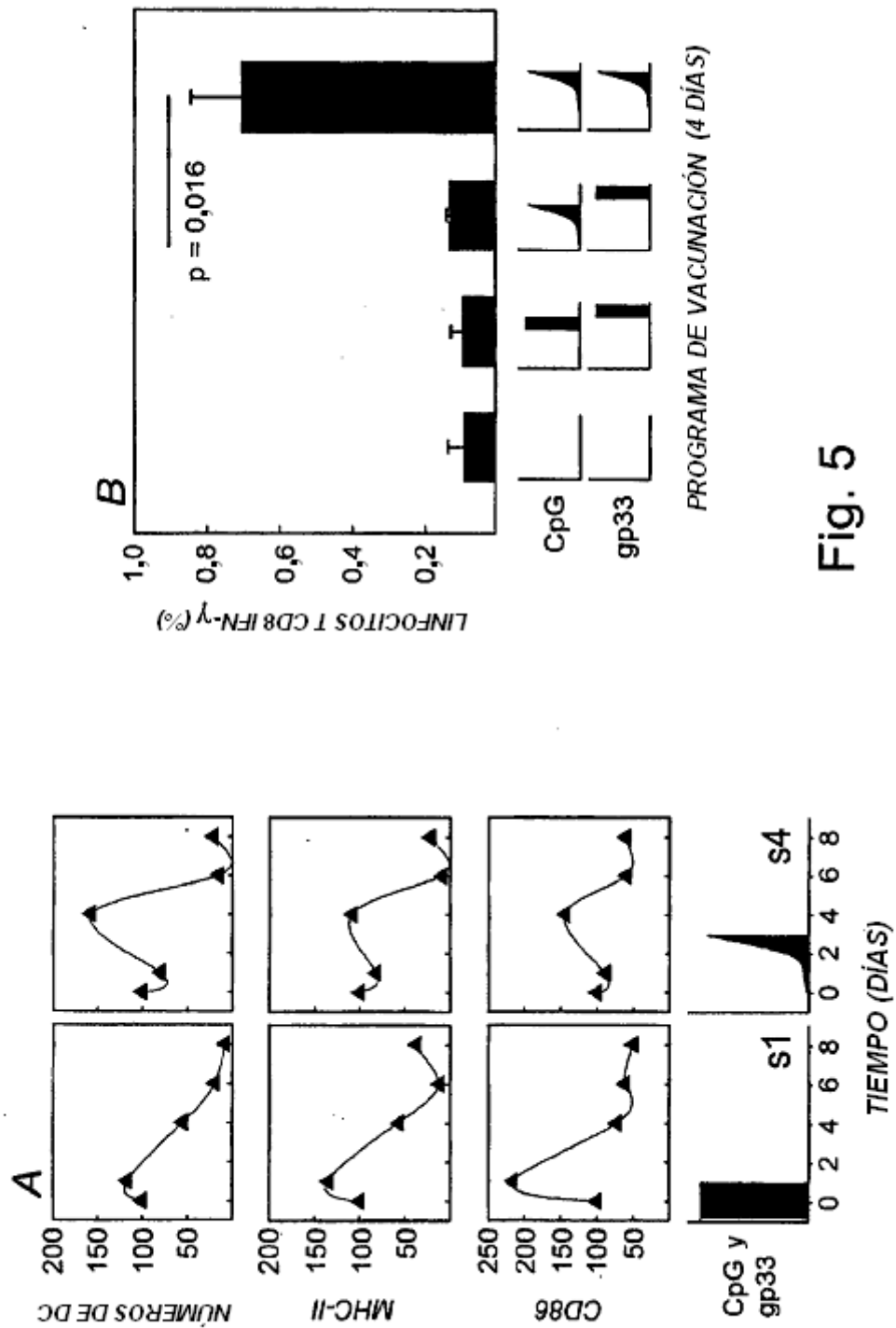


Fig. 5

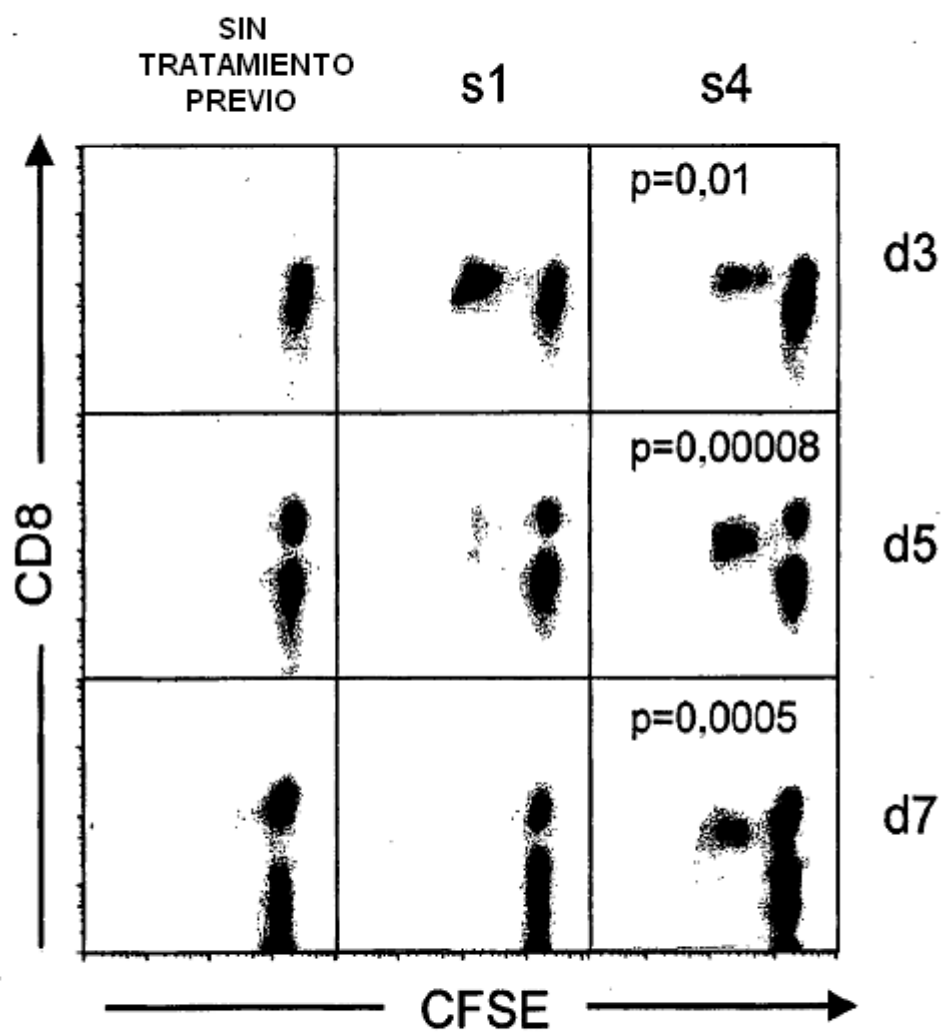


Fig. 6A

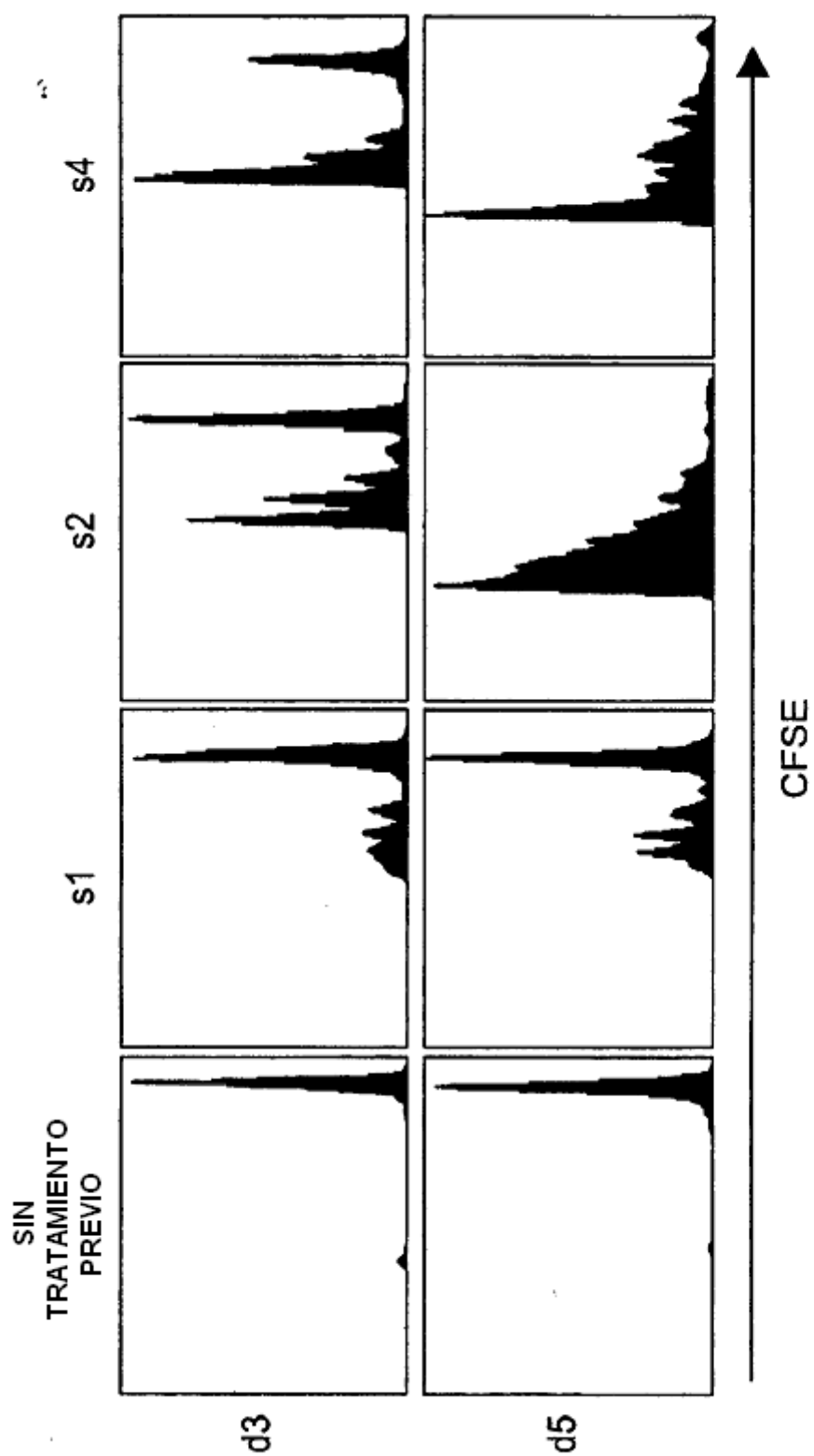


Fig. 6B

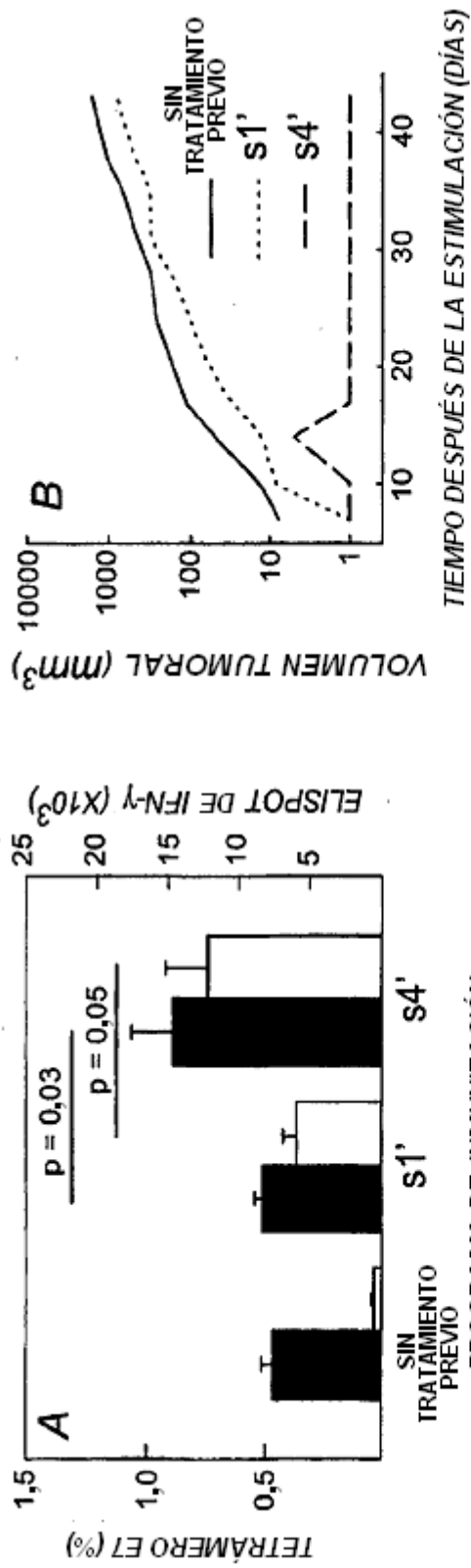
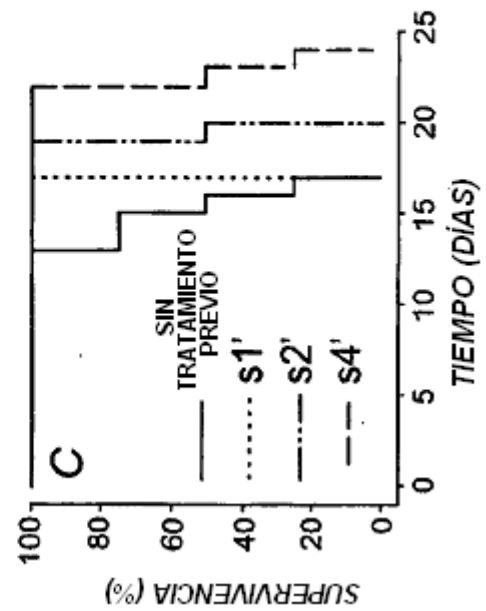


Fig. 7



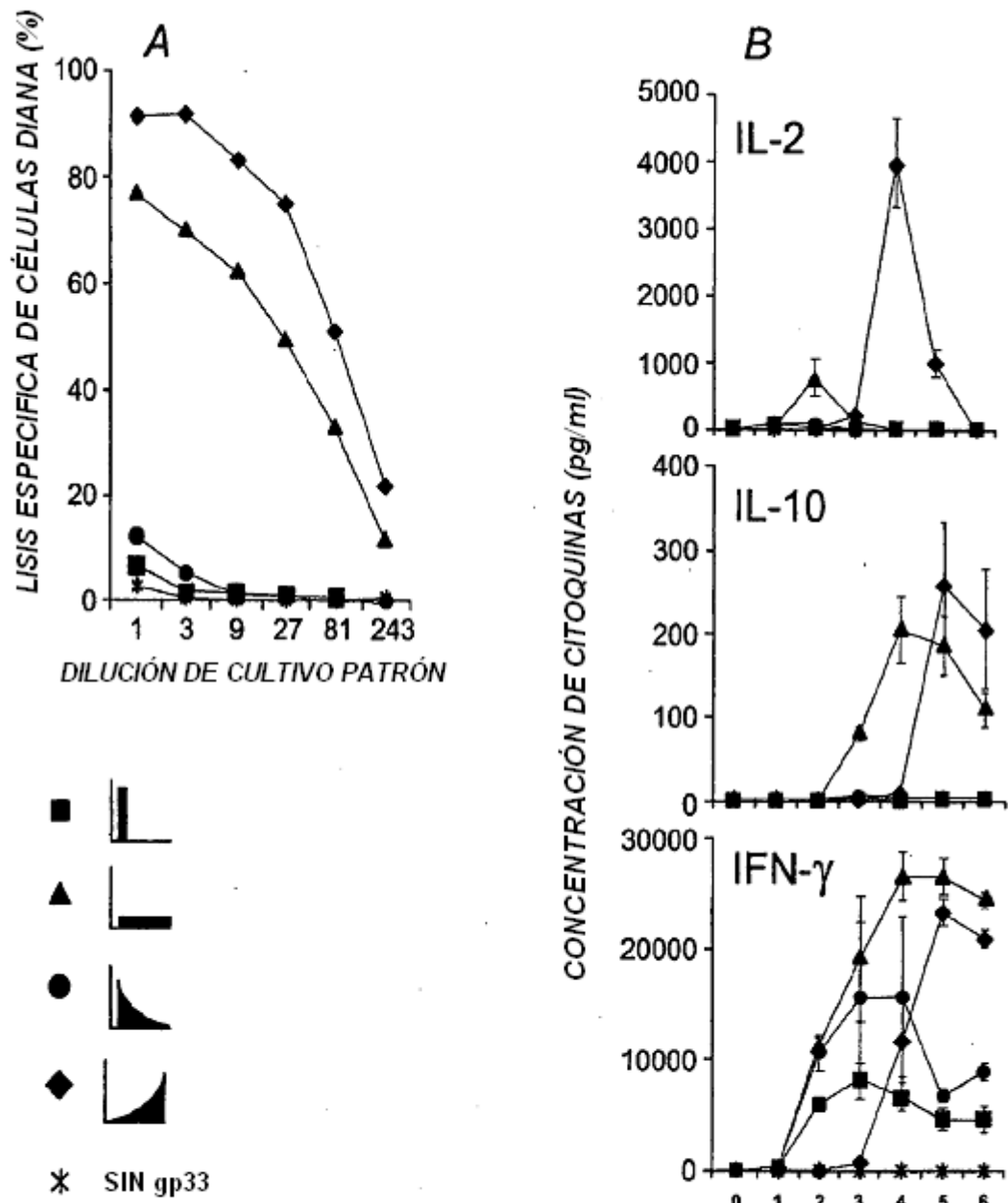


Fig. 8