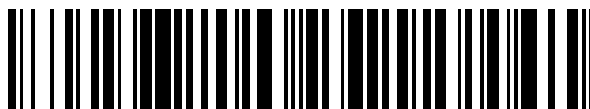


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 456**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01)
C07K 14/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2004 E 10173930 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2345420**

54 Título: **Uso de un adyuvante que induce una respuesta inmune Th1 para mejorar las respuestas inmunes**

30 Prioridad:

24.03.2003 EP 03450072
11.04.2003 EP 03450084
11.07.2003 EP 03450171

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2016

73 Titular/es:

VALNEVA AUSTRIA GMBH (100.0%)
Campus Vienna Biocenter 3
1030 Vienna, AT

72 Inventor/es:

BUSCHLE, MICHAEL;
HABEL, ANDRÉ;
FRITZ, JÖRG;
PRINZ, KARIN y
LINGNAU, KAREN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 562 456 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

Uso de un adyuvante que induce una respuesta inmune Th1 para mejorar las respuestas inmunes

La presente invención se refiere a vacunas mejoradas, especialmente a vacunas virales y a métodos de preparación de las mismas.

- 5 La protección del huésped frente a patógenos invasores implica a efectores celulares y humorales y es el resultado de la acción concertada de la inmunidad tanto no adaptativa (innata) como adaptativa (adquirida). La última se basa en el reconocimiento inmunológico específico mediado por receptores, es una adquisición reciente del sistema inmune, y está presente sólo en vertebrados. La primera evolucionó antes del desarrollo de la inmunidad adaptativa, y consiste en una diversidad de células y moléculas distribuidas por todo el organismo con la tarea de
- 10 mantener a los patógenos potenciales bajo control.

Los linfocitos B y T son los mediadores de la inmunidad adaptativa específica de antígeno adquirida, incluyendo el desarrollo de memoria inmunológica, que es el objetivo principal de generar una vacuna con éxito. Las células presentadoras de antígeno (CPA) son células altamente especializadas que pueden procesar antígenos y presentar sus fragmentos procesados en la superficie celular junto con moléculas necesarias para la activación de linfocitos.

- 15 Esto significa que las CPA son muy importantes para el inicio de reacciones inmunes específicas. Las CPA principales para la activación de linfocitos T son células dendríticas (CD), macrófagos y células B, mientras que las CPA principales para las células B son células dendríticas foliculares. En general, las CD son las CPA más potentes en términos del inicio de respuestas inmunes que estimulen linfocitos B y T sin exposición previa y de memoria quiescentes.

- 20 La tarea natural de las CPA en la periferia (por ejemplo, CD o células de Langerhans) es capturar y procesar antígenos, activándose de este modo, comienzan a expresar moléculas coestimulantes de linfocitos, a migrar a órganos linfoides, a secretar citoquinas y a presentar antígenos a diferentes poblaciones de linfocitos, iniciando respuestas inmunes específicas de antígeno. No sólo activan linfocitos, en determinadas circunstancias, también inducen tolerancia de células T a antígenos.

- 25 El reconocimiento de antígenos por linfocitos T está restringido por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Un linfocito T dado reconocerá un antígeno solamente cuando el péptido esté unido a una molécula del CMH particular. En general, los linfocitos T se estimulan solamente en presencia de moléculas propias del CMH y el antígeno se reconoce solamente como péptidos unidos a moléculas propias del CMH. La restricción por CMH define la especificidad del linfocito T en términos del antígeno reconocido y en términos de la molécula de CMH que se une a su fragmento peptídico.
- 30

Los antígenos intracelulares y extracelulares representan desafíos completamente diferentes para el sistema inmune, tanto en términos del reconocimiento como de la respuesta apropiada. La presentación de antígenos a células T está mediada por dos clases distintas de moléculas CMH de clase I (CMH-I) y CMH de clase II (CMH-II), que utilizan rutas de procesamiento de antígenos diferentes. Principalmente se podría distinguir entre dos rutas de procesamiento de antígenos principales que han evolucionado. Los péptidos derivados de antígenos intracelulares se presentan a células T CD8⁺ por moléculas del CMH de clase I, que se expresan en prácticamente todas las células, mientras que los péptidos derivados de antígenos extracelulares se presentan a células T CD4⁺ por moléculas del CMH-II. Sin embargo, existen ciertas excepciones a esta dicotomía. Varios estudios han demostrado que los péptidos generados a partir de particulados endocitados o proteínas solubles se presentan en moléculas del CMH-I en macrófagos, así como en células dendríticas. Por lo tanto, las CPA, como células dendríticas que se asientan en la periferia, que ejercen una alta potencia para capturar y procesar antígenos extracelulares y que los presentan en moléculas del CMH-I a los linfocitos T, son dianas interesantes para estimularlas extracelularmente con antígenos *in vitro* e *in vivo*.

- 45 El papel importante y único de las CPA, incluyendo su actividad estimulante sobre diferentes tipos de leucocitos, es reflejar su posición central como dianas para estrategias apropiadas en el desarrollo de vacunas de éxito. Teóricamente, una forma de hacerlo es aumentar o estimular su tarea natural, la captación de un antígeno o antígenos. Una vez estimuladas con los antígenos apropiados contra los que se dirige la vacuna, las CPA deberían comenzar a procesar el antígeno o antígenos captados, activándose de este modo, expresando moléculas coestimulantes de linfocitos, migrando a órganos linfoides, secretando citoquinas y presentando antígenos a
- 50 diferentes poblaciones de linfocitos, iniciando de este modo respuestas inmunes.

Las células T activadas generalmente secretan varias citoquinas efectoras de una forma altamente regulada, por ejemplo, interleuquina 2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-10 e interferón gamma (IFN-g). La detección funcional de respuestas de linfocitos T citotóxicos a antígenos específicos (por ejemplo, antígenos tumorales, en general antígenos

administrados en una vacuna) se controla comúnmente mediante un ensayo ELISpot (ensayo inmune de manchas ligado a enzimas), una técnica que analiza la producción de citoquinas a nivel celular individual. En la presente invención, se usa un ensayo ELISpot para la inmunidad celular (respuesta inmune de tipo 1) que promueve la citoquina IFN- γ para controlar el éxito de la activación de células T específicas de antígeno. Además, la citoquina IL-4 se determina como un indicador para una respuesta de tipo 2, habitualmente implicada en promover respuestas humorales potentes. Además, la respuesta inmune humoral se determinó por ELISA (IgG1 como indicador para una respuesta de tipo 2, IgG2b como indicador para una respuesta de tipo 1).

Se ha mostrado previamente que los policones aumentan eficazmente la captación de los péptidos correspondientes al CMH clase I en células tumorales, un proceso de estimulación con péptido o proteína que se denominó "TRANScarga". Además, se ha mostrado que los policones son capaces de "TRANScargar" péptidos o proteínas en células presentadoras de antígenos *in vivo* así como *in vitro*. Además, la coinyección de una mezcla de poli-L-arginina o poli-L-lisina junto con un péptido apropiado como vacuna protege a los animales del desarrollo de tumores en modelos de ratón. Esta vacuna definida químicamente es capaz de inducir un alto número de células T específicas de antígeno/péptido. Se mostró que eso era al menos parcialmente atribuible a una captación aumentada de péptidos en CPA mediada por el policon lo que indica que cuando las CPA se estimulan *in vivo* con antígenos pueden inducir una inmunidad mediada por células T contra el antígeno administrado.

Al contrario que la inmunidad adaptativa, que se caracteriza por una respuesta altamente específica pero relativamente lenta, la inmunidad innata se basa en mecanismos efectores que se desencadenan por diferencias en la estructura de los componentes microbianos respecto al huésped. Estos mecanismos pueden generar una respuesta inicial bastante rápida que, principalmente, conduce a la neutralización de los agentes nocivos. Las reacciones de la inmunidad innata son la única estrategia de defensa de los filos inferiores y se han conservado en vertebrados como defensa del huésped de primera línea antes de que se movilice el sistema inmune adaptativo.

En vertebrados superiores las células efectoras de la inmunidad innata son neutrófilos, macrófagos y linfocitos citolíticos naturales, y probablemente también células dendríticas, mientras que los componentes humorales en esta ruta son la cascada del complemento y una diversidad de proteínas de unión diferentes.

Un componente rápido y eficaz de la inmunidad innata es la producción de una gran diversidad de péptidos microbicidas con una longitud de habitualmente entre aproximadamente 12 y aproximadamente cien restos aminoácidos. Se han aislado varios cientos de péptidos antimicrobianos diferentes a partir de una diversidad de organismos, que varían de esponjas, insectos a animales y seres humanos, lo que apunta a una amplia distribución de estas moléculas. También se producen péptidos antimicrobianos por bacterias como sustancias antagonistas contra organismos competidores.

Se han identificado dos subconjuntos principales de células T CD4⁺ (T auxiliares 1 (Th1) y T auxiliares 2 (Th2)) en ratones y seres humanos, basándose en su secreción de diferentes perfiles de citoquinas y sus diferentes funciones efectoras. Las células Th1 están principalmente implicadas en la generación de las denominadas respuestas inmunes de tipo 1, que se caracterizan típicamente por la inducción de respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado, inmunidad mediada por células, cambio de clase de inmunoglobulina a IgG2a/IgG2b y secreción de, entre otros, interferón gamma. Por el contrario, las células Th2 están implicadas en la generación de las denominadas respuestas de tipo 2, que se caracterizan por la inducción de inmunidad humoral por activación de células B, conduciendo a la producción de anticuerpos, que incluye el cambio de clase a IgG₁ e IgE. Las respuestas de tipo 2 también se caracterizan por la secreción de las siguientes citoquinas: IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.

En la mayoría de situaciones, el tipo de respuesta inducida (tipo 1 o tipo 2) tiene un impacto significativo sobre la eficacia protectora de una vacuna. Los adyuvantes alternativos tienden a favorecer tipos específicos de respuestas. Sin embargo, la selección de adyuvante se complica por imprevisibilidades funcionales y también por limitaciones comerciales y de disponibilidad.

Las infecciones con virus de Influenza pertenecen a las infecciones más importantes y frecuentes y tienen un índice de mortalidad significativo, especialmente para personas mayores o personas con deficiencias en el sistema inmune. Actualmente, existen varias vacunas de Influenza en el mercado; sin embargo no todas las vacunaciones conducen a protección frente a infecciones por influenza. Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar las vacunas de Influenza actuales para ampliar la eficacia de protección.

Además, puesto que la mayoría de las vacunas actuales están generando casi exclusivamente respuestas de tipo 2, también existe la necesidad de proporcionar vacunas mejoradas que muestren una respuesta inmune dirigida de tipo 1 o vacunas que también permitan -además de una respuesta de tipo 2- una reacción inmune de un tipo significativo. Además, las vacunas ya disponibles deberían proporcionarse en una forma mejorada que permita la

inducción de una respuesta de tipo 1.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una vacuna mejorada frente a infecciones víricas que comprende un antígeno viral, un péptido de la secuencia de aminoácidos KLKL₅KLK y ácidos desoxinucleicos inmunoestimulantes que contienen d(IC)₁₃.

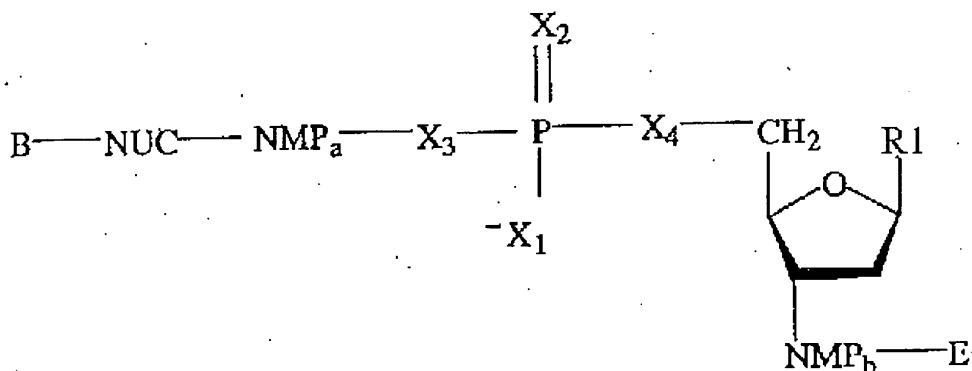
- 5 De acuerdo con los experimentos realizados en el transcurso de la presente invención, la combinación de estos dos tipos de agentes inmunizantes ha mostrado un efecto sinérgico con respecto a los antígenos. Esto se mostró específicamente con respecto a antígenos comunes de Influenza (especialmente hemaglutinina y neuraminidasa) y antígenos del virus de la Hepatitis. Este efecto sinérgico, especialmente para antígenos virales, no era deducible a partir de las propiedades conocidas de estas clases de sustancias. Aunque se sabe que cada una de estas dos
- 10 clases de sustancias tienen propiedades inmunoestimulantes excelentes (documentos WO 02/32451, WO 01/93905, WO 01/93903, WO 02/053185, WO 03/47602 y WO 02/095027), el efecto combinado para patógenos virales, especialmente para antígenos de virus de Influenza y Hepatitis, era significativamente mejor de lo que podría esperarse de la simple adición de estas eficacias individuales.

- 15 Con la presente invención, también es posible mejorar significativamente las vacunas virales, especialmente las vacunas de Influenza o de la Hepatitis A, B o C, que ya están disponibles o en el mercado, proporcionando simplemente además la combinación de los dos tipos de Inmunizantes de acuerdo con la presente invención.

La presente invención proporciona por lo tanto una vacuna para prevenir infecciones virales, que comprende

- un antígeno viral,
- un péptido con la secuencia de aminoácidos KLKL₅KLK, y
- 20 - una molécula de ácido oligodesoxinucleico inmunoestimulante (ODN), en el que el ODN comprende d(IC)₁₃.

Además, se describe una molécula de ácido oligodesoxinucleico inmunoestimulante que tiene la estructura de acuerdo con la fórmula (I)



en la que

- 25 R1 se selecciona de hipoxantina y uracilo,
cualquier X es O o S,

- cualquier NMP es un monofosfato o monotiofosfato de 2' desoxinucleósido, seleccionado del grupo que consiste en monofosfato o monotiofosfato de desoxiadenosina, deoxiguanosina, desoxiinosina, desoxicitosina, desoxiuridina, desoxitimidina, 2-metil-desoxiinosina, 5-metil-desoxicitosina, desoxipseudouridina, desoxiribosapurina, 2-amino-desoxiribosapurina, 6-S-desoxiguanina, 2-dimetil-desoxiguanosina, o N-isopentenil-desoxiadenosina,
- 30

NUC es un 2' desoxinucleósido, seleccionado del grupo que consiste en desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxiinosina, desoxicitosina, desoxiinosina, desoxitimidina, 2-metil-desoxiuridina, 5-metil-desoxicitosina, desoxipseudouridina, desoxiribosapurina, 2-amino-desoxiribosapurina, 6-S-desoxiguanina, 2-dimetil-desoxiguanosina, o N-isopentenil-desoxiadenosina,

- 35 a y b son números enteros de 0 a 100 con la condición de que a + b esté entre 4 y 150, y

B y E son grupos comunes para los extremos 5' o 3' de moléculas de ácido nucleico (en lo sucesivo también referidas como "I-/U-ODN").

Por supuesto, la presente vacuna puede contener además otras sustancias, por ejemplo, diluyentes o vehículos, tampones o sustancias estabilizantes, etc. adecuados farmacéuticamente aceptables.

- 5 La vacuna de acuerdo con la presente invención puede contener además adyuvantes adicionales, especialmente un adyuvante de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Alumbre).

El alumbre, como se entiende en el presente documento, incluye todas las formas de adyuvantes basados en Al^{3+} usados en medicina humana y animal y en investigación. Especialmente, incluye todas las formas de hidróxido de aluminio, como se definen en Römpf, 10ª Ed. páginas 139/140, formas de gel del mismo, fosfato de aluminio, etc.

- 10 Esto se prefiere especialmente para vacunas que ya están en el mercado y contienen dichos adyuvantes de $\text{Al}(\text{OH})_3$. En tal caso, la combinación de Inmunizantes de acuerdo con la presente invención puede añadirse simplemente a dicha vacuna existente.

- 15 El presente antígeno es un antígeno viral. Si fueran específicamente necesarias respuestas de tipo 1 de Th1 pronunciadas (o exclusivas), se prefieren como antígenos epítomos de células T (véase la introducción anterior). En la sección de ejemplos, la presente invención se demuestra en principio y específicamente eficaz con antígenos virales de influenza y hepatitis, concretamente con el antígeno de la superficie de hepatitis B y antígenos de hepatitis C que son antígenos preferidos de acuerdo con la presente invención.

- 20 Por supuesto, la preparación farmacéutica también puede comprender dos o más antígenos dependiendo de la respuesta inmune deseada. El antígeno o antígenos también pueden modificarse para aumentar adicionalmente la respuesta inmune.

- 25 Pueden usarse como antígenos proteínas o péptidos derivados de patógenos virales o bacterianos, de hongos o parásitos, así como antígenos tumorales (vacunas contra el cáncer) o antígenos con un supuesto papel en enfermedades autoinmunes (incluyendo antígenos derivatizados como antígenos glicosilados, lipidados, glicolipidados o hidroxilados). Además, los propios carbohidratos, lípidos o glicolípidos pueden usarse como antígenos. El procedimiento de derivatización puede incluir la purificación de una proteína o péptido específico del patógeno, la inactivación del patógeno, así como la estabilización o derivatización proteolítica o química de dicha proteína o péptido. Como alternativa, también el propio patógeno puede usarse como antígeno. Los antígenos son preferentemente péptidos o proteínas, carbohidratos, lípidos, glicolípidos o mezclas de los mismos.

- 30 De acuerdo con una realización preferida, se usan epítomos de células T como antígenos. Como alternativa, también puede preferirse una combinación de epítomos de células T y epítomos de células B.

- 35 Por supuesto, también es posible usar de acuerdo con la presente invención mezclas de diferentes antígenos. Preferentemente, se usan proteínas o péptidos aislados de un patógeno viral (o sus equivalentes recombinantes) como tales antígenos (incluyendo antígenos derivatizados o antígenos glicosilados o lipidados o polisacáridos o lípidos). Los patógenos preferidos se seleccionan del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de hepatitis A y B, virus de hepatitis C (VHC) u otros Flaviviridae, tal como virus de la encefalitis japonesa (JCV), virus del sarcoma de Rous (RSV), virus de Epstein Barr (EBV), virus de Influenza, virus del papiloma humano (HPV), Rotavirus.

- 40 En el caso de antígenos peptídicos, el uso de mimótopos/agonistas/superagonistas/antagonistas peptídicos o péptidos cambiados en determinadas posiciones sin afectar a las propiedades inmunológicas, o de mimótopos/agonistas/superagonistas/antagonistas no peptídicos, se incluye en la presente invención. Los antígenos peptídicos también pueden contener extensiones en el extremo carboxi o amino terminal del antígeno peptídico, facilitando la interacción con el compuesto o compuestos policatiónicos o el compuesto o compuestos inmunoestimulantes.

- 45 Los antígenos también pueden derivatizarse para incluir moléculas que aumentan la presentación de antígenos y el direccionamiento de antígenos a células presentadoras de antígenos.

- 50 El antígeno de Influenza o Hepatitis a usar de acuerdo con la presente invención generalmente no está restringido generalmente a una forma específica, parece que el efecto de acuerdo con la presente invención se aumenta aún más específicamente por patógeno para Influenza, Hepatitis B o Hepatitis C, pero no específico para un tipo determinado de antígeno de este patógeno de Influenza o VHB. Sin embargo se prefiere usar los antígenos de Influenza o VHB convencionales también en las presentes vacunas, es decir, un antígeno de hemaglutinina, un

antígeno de neuraminidasa, un antígeno combinado o una combinación de dos o más de estos antígenos

Preferentemente, se usan proteínas o péptidos aislados de una fuente de virus de Influenza, VHB o VHC (por ejemplo, un cultivo celular) o sus homólogos recombinantes como dichos antígenos, incluyendo antígenos derivatizados.

- 5 La vacuna de acuerdo con la presente invención contiene preferiblemente un péptido policatiónico adicional.

Los péptidos policatiónicos adicionales que se van a usar de acuerdo con la presente invención pueden ser cualquier compuesto policatiónico que muestra el efecto característico de acuerdo con el documento WO 97/30721. Los compuestos policatiónicos preferidos se seleccionan de polipéptidos básicos, policationes orgánicas, poliaminoácidos básicos o mezclas de los mismos. Estos poliaminoácidos deben tener una longitud de
10 cadena de al menos 4 residuos de aminoácidos. Los preferidos especialmente son sustancias que contienen enlaces peptídicos, como polilisina, poliarginina y polipéptidos que contienen más del 20%, especialmente más del 50% de aminoácidos básicos en un intervalo de más de 8, especialmente más de 20, residuos de aminoácidos o mezclas de los mismos. Otros policationes preferidos y sus composiciones farmacéuticas se describen en el documento WO 97/30721 (por ejemplo, polietilenimina) y WO 99/38528. Preferiblemente, estos polipéptidos
15 contienen entre 20 y 500 residuos de aminoácidos, especialmente entre 30 y 200 residuos.

Estos compuestos policatiónicos pueden producirse químicamente o recombinantemente o pueden derivar de fuentes naturales.

Los (poli)péptidos catiónicos también pueden ser péptidos microbianos anti-bacterianos policatiónicos. Estos (poli)péptidos pueden ser de origen procariota o eucariota o pueden producirse químicamente o
20 recombinantemente. Los péptidos también pueden pertenecer a la clase que ocurre naturalmente de péptidos antimicrobianos. Dichos péptidos o defensores de la defensa del huésped también son una forma preferida del polímero policatiónico de acuerdo con la presente invención. Generalmente, se usa como polímero policatiónico un compuesto que permite como un producto final la activación (o regulación a la baja) del sistema inmune adaptativo, preferiblemente mediado por CPA (incluyendo células dendríticas).

- 25 Además, también pueden usarse compuestos neuroactivos, tales como hormona del crecimiento (humana) (como se describe, por ejemplo, en el documento WO 01/24822) como inmunoestimulantes (Inmunizantes).

Los compuestos policatiónicos derivados de fuentes naturales incluyen VIH-REV o VIH-TAT (péptidos catiónicos derivados, péptidos antennapedia, quitosán u otros derivados de quitina) u otros péptidos derivados de estos péptidos o proteínas por producción bioquímica o recombinante. Otros compuestos policatiónicos preferidos son
30 catelina o sustancias relacionadas o derivadas de catelicidina, especialmente catelicidinas de ratón, bovina o especialmente humana y/o catelicidinas. Las sustancias de catelicidina relacionadas o derivadas contienen todo o partes de la secuencia de catelicidina con al menos 15-20 residuos de aminoácidos. Las derivaciones pueden incluir la sustitución o modificación de los aminoácidos naturales por aminoácidos que no están entre los 20 aminoácidos convencionales. Además, pueden introducirse residuos catiónicos adicionales en dichas moléculas de
35 catelicidina. Se prefiere que estas moléculas de catelicidina estén combinadas con la composición antígeno/vacuna de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, se ha descubierto sorprendentemente que estas moléculas de catelicidina también son efectivas como un adyuvante para un antígeno sin la adición de adyuvantes adicionales. Es posible por lo tanto usar dichas moléculas de catelicidina como adyuvantes eficientes en formulaciones de vacuna con o sin sustancias inmunoactivadoras adicionales.

- 40 La vacuna de acuerdo con la presente invención contiene como Péptido A KLKL₅KLK y como I-/U-ODN oligo d(IC)₁₃ (La combinación de Péptido A y Oligo-d(IC)₁₃ también se refiere como IC31). Estas dos sustancias han demostrado resultados específicamente ventajosos en los experimentos de acuerdo con la presente invención.

La vacuna de acuerdo con la presente invención puede contener además un oligodesoxinucleótido que contiene un motivo CpG como ácidos nucleicos inmunomoduladores. Los ácidos nucleicos inmunomoduladores a usar de
45 acuerdo con la presente invención pueden ser de origen sintético, procariota y eucariota. En el caso de un origen eucariota, el ADN debería proceder de, basándose en el árbol filogenético, especies menos evolucionadas (por ejemplo, insectos, pero también otras). En una realización preferida de la invención, el oligodesoxinucleótido (ODN) inmunogénico es una molécula de ADN producida sintéticamente, o mezclas de dichas moléculas. También se incluyen derivados o modificaciones de ODN tales como análogos sustituidos con tiofosfato (residuos de
50 tiofosfato sustituyen a fosfato) como, por ejemplo, los descritos en las Patentes de Estados Unidos US 5.723.335 y US 5.663.153 y otros derivados y modificaciones, que preferentemente estabilicen la composición o composiciones inmunoestimulantes pero no cambien sus propiedades inmunológicas. Un motivo de secuencia preferido es un motivo de ADN de seis bases que contiene un dinucleótido CpG (no metilado) flanqueado por dos purinas 5' y dos

pirimidinas 3' (5'-Pur-Pur-C-G-Pyr-Pyr-3'). Los motivos CpG contenidos en los ODN de acuerdo con la presente invención son más comunes en ADN microbiano que de vertebrado superior, y presentan diferencias en el patrón de metilación. Sorprendentemente, las secuencias que estimulan CPA de ratón no son muy eficaces para células humanas. Se describen ODN palindrómicos o no palindrómicos preferidos a usar de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, en las Solicitudes de Patente Austriaca A 1973/2000, A 805/2001, EP 0 468 520 A2, WO 96/02555, WO 98/16247, WO 98/18810, WO 98/37919, WO 98/40100, WO 98/52581, WO 98/52962, WO 99/51259 y WO 99/56755, incorporándose todas en el presente documento por referencia. Los ODN/ADN pueden producirse químicamente o de forma recombinante, o pueden obtenerse de fuentes naturales. Las fuentes naturales preferidas son insectos.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una combinación de KLKL₅KLK y d(IC)₁₃, ambos como se definen de acuerdo con la presente invención, para mejorar la eficacia protectora de una vacuna contra un patógeno viral, especialmente virus de influenza, VHC o VHB, VIH, HPV o JEV. Específicamente, la respuesta de tipo 1 específica de antígeno, especialmente la respuesta de anticuerpos IgG2 o respuesta de IFN-gamma, de una vacuna contra patógeno viral, especialmente virus de influenza, VHC o VHB, VIH, HPV o JEV, puede mejorarse y al mismo tiempo la respuesta de tipo 2, especialmente la respuesta de anticuerpos IgG1 o respuesta de interleuquina 4 (IL-4) de dicha vacuna puede conservarse o preferentemente aumentarse también.

Se ha mostrado previamente (documento WO 02/13857) qué péptidos antimicrobianos derivados de catelicidina de origen natural o derivados de los mismos tienen una actividad estimulante de la respuesta inmune y, por lo tanto, constituyen adyuvantes inductores de tipo 1 altamente eficaces (Inmunizantes). Las fuentes principales de péptidos antimicrobianos son gránulos de neutrófilos y células epiteliales que revisten los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario. En general, se encuentran en aquellos sitios anatómicos más expuestos a la invasión microbiana, se secretan en los fluidos corporales internos o se almacenan en gránulos citoplasmáticos de fagocitos profesionales (neutrófilos).

En el documento WO 02/32451 se describe un adyuvante inductor de tipo 1 (Inmunizante) que es capaz de aumentar claramente la respuesta inmune contra un antígeno coadministrado específico y, por lo tanto, constituye un adyuvante altamente eficaz, el péptido A, que comprende una secuencia R₁-XZX_NXZX-R₂. Un péptido específicamente preferido es KLKLLLLLKLK. Aparte de péptidos antimicrobianos de origen natural, se han producido e investigado péptidos antimicrobianos sintéticos. El péptido antimicrobiano sintético KLKLLLLLKLK-NH₂ se mostró que tenía una actividad quimioterapéutica significativa en ratones infectados con *Staphylococcus aureus*; los neutrófilos humanos se activaron para producir el anión superóxido (O₂⁻) por medio de la calreticulina de superficie celular. El número exacto y la posición de K y L se descubrió que era crítica para la actividad antimicrobiana del péptido sintético (Nakajima, Y. (1997); Cho, J.-H. (1999)).

La presente invención es especialmente beneficiosa si el medicamento combinado se administra, por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular, intradérmica o transdérmica. Sin embargo, otras formas de aplicación, tales como parenteral, intravenosa, intranasal, oral o tópica, también son adecuadas para la presente invención.

El antígeno de Influenza puede mezclarse con el adyuvante (Inmunizante) (composición) de acuerdo con la presente invención o formularse específicamente de otro modo, por ejemplo, como un liposoma, formulación retardada, etc.

Las vacunas de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un individuo en cantidades eficaces conocidas por los expertos en la materia de la vacunación frente a Influenza. La optimización de la cantidad de antígeno y la cantidad de Inmunizante puede comenzarse a partir de cantidades establecidas y usando métodos disponibles.

La invención se describirá con más detalle mediante los siguientes ejemplos y figuras, pero, por supuesto, la invención no se limita a los mismos.

La Fig. 1 muestra que péptidos catiónicos coinyectados con diferentes ODN inducen sinérgicamente respuestas humorales de tipo 1 potentes (IgG2b) contra una vacuna de Influenza disponible en el mercado;

la Fig. 2 muestra que KLK/o-d(IC)₁₃ mejora claramente la eficacia de una vacuna de Influenza disponible en el mercado;

la Fig. 3 muestra que una sola inyección de KLK/o-d(IC)₁₃ induce sinérgicamente respuestas celulares de tipo 1 y humorales de tipo 1 y 2 potentes contra una vacuna de Influenza disponible en el mercado

la Fig. 4 muestra que una sola inyección de KLK/o-d(IC)₁₃ mejora claramente la eficacia de una vacuna de

Influenza disponible en el mercado

la Fig. 5 muestra que la vacunación con péptidos derivados de ncORF del virus de la Influenza A en combinación con KLK/o-d(IC)₁₃ induce células T productoras de IFN- γ potentes y protección frente a la exposición viral

la Fig. 6 muestra que KLK/O-d(IC)₁₃ induce respuestas inmunes celulares de tipo 1 específicas de péptido del VHC

5 la Fig. 7 muestra que péptidos catiónicos coinyectados con diferentes ODN inducen una respuesta celular de tipo 1 específica de HBsAg (producción de IFN- γ), aunque la respuesta de tipo 2 inducida por HBsAg (producción de IL-4) no se ve afectada o disminuye.

10 la Fig. 8a muestra los resultados de una sola inyección de la combinación del péptido antimicrobiano catiónico KLK con el oligodesoxinucleótido sintético o-d(IC)₁₃ (ODN1a) y pequeñas cantidades de una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1), que induce sinérgicamente respuestas inmunes celulares de tipo I específicas de vacuna potentes

15 la Fig. 8b muestra los resultados de una sola inyección de la combinación del péptido antimicrobiano catiónico KLK con el oligodesoxinucleótido sintético o-d(IC)₁₃ (ODN1a) y pequeñas cantidades de una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1), que induce sinérgicamente respuestas inmunes humorales mixtas de tipo 1/tipo 2 potentes

la Fig. 9a: muestra los resultados de una sola inyección de baja dosis de la combinación del péptido antimicrobiano catiónico KLK con el oligodesoxinucleótido sintético o-d(IC)₁₃ (ODN1a), que induce sinérgicamente respuestas inmunes de tipo celular potentes contra una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1)

20 la Figura 9b: muestra los resultados de una sola inyección de baja dosis de la combinación del péptido antimicrobiano catiónico KLK con el oligodesoxinucleótido sintético o-d(IC)₁₃ (ODN1a) y pequeñas cantidades de una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1), que induce sinérgicamente respuestas inmunes humorales mixtas de tipo 1/tipo 2 potentes

25 la Fig. 10 muestra los resultados de una sola inyección de una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1) combinada con el péptido antimicrobiano catiónico KLK y el oligodesoxinucleótido sintético o-d(IC)₁₃ (ODN1a) en comparación con otros adyuvantes.

Ejemplos:

Ejemplo 1:

30 **Péptidos catiónicos (pR o KLK) coinyectados con diferentes oligodesoxinucleótidos (ODN) (Cpl, ntCpl, o-d(IC)₁₃) inducen sinérgicamente respuestas humorales de tipo 1 potentes (IgG2b) contra una vacuna de Influenza disponible en el mercado (Fluvirin)**

Ratones C57BL/6 (Harlan/Olac)

Vacuna de influenza Fluvirin (Evans vaccine); antígenos superficiales de virus de Influenza inactivado (hemaglutinina y neuraminidasa) purificados de las cepas: cepa tipo A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) (15 μ g de hemaglutinina), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17) (15 μ g de hemaglutinina), cepa tipo B/Sichuan/379/99 (15 μ g de hemaglutinina)

dosis: 1 μ g de proteína total/ratón

Al(OH)₃ Alhydrogel; Biosys, Dinamarca

dosis: mezcla 1:1 con antígeno

pR Poli-L-arginina con un grado promedio de polimerización de 43 residuos de arginina (determinado por MALLS); Sigma Aldrich Inc

dosis: 100 μ g/ratón

KLK	El KLKLLLLLLKLK-COOH se sintetizó por MPS (Multiple Peptide System, Estados Unidos)
	dosis: 168 µg/ratón
oligo-d(IC) ₁₃ (= ODN1a)	El ODN 5'ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' se sintetizó por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen
	dosis: 5 nmol/ratón
I-ODN 2	ODN sustituidos con tiofosfato, que contienen desoxiinosina: tcc atg aci ttc ctg atg ct, se sintetizaron por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen
	dosis: 5 nmol/ratón
I-ODN 2b	ODN que contienen desoxiinosina: tcc atg aci ttc ctg atg ct, se sintetizaron por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen
	dosis: 5 nmol/ratón
formulación	Tris 5 mM/sorbitol 270 mM, pH 7

grupo experimental (12 ratones/ grupo):

- 1.: sin exposición previa
- 2.: vacuna de la gripe
- 3.: vacuna de la gripe + pR
- 5 4.: vacuna de la gripe + KLK
- 5.: vacuna de la gripe + Al(OH)₃
- 6.: vacuna de la gripe + o-d(IC)₁₃
- 7.: vacuna de la gripe + I-ODN 2
- 8.: vacuna de la gripe + I-ODN 2b
- 10 9.: vacuna de la gripe + pR + I-ODN 2
- 10.: vacuna de la gripe+ KLK + o-d(IC)₁₃
- 11.: vacuna de la gripe + KLK + I-ODN 2
- 12.: vacuna de la gripe + KLK + ODN 2b

15 Los días 0, 28 y 56 se inyectó s.c. a ratones C57BL/6 en ambas almohadillas plantares traseras un volumen total de 100 µl/ratón (50 µl/almohadilla plantar) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. Se recogió suero los días 26, 54 y 82 y se analizó para anticuerpos IgG1 e IgG2b específicos de vacuna de Influenza por ELISA. Las titulaciones corresponden a esa dilución de suero que da como resultado una DO_{405 nm} semimáxima.

20 La Figura 1 indica que la inyección combinada de péptidos catiónicos (pR o KLK) y diferentes ODN (I-ODN 2, I-ODN 2b u o-d(IC)₁₃) induce respuestas humorales de tipo 1 específicas de antígeno (vacuna de Influenza) muy potentes (IgG2b) de una forma sinérgica. Tras la inyección de la vacuna de Influenza en solitario o en combinación con Al(OH)₃, péptidos catiónicos (pR, KLK) solamente o diferentes ODN (excepto I-ODN 2) solamente, no es detectable ninguna respuesta de IgG2b específica. Las vacunaciones de refuerzo aumentan claramente la respuesta observada.

25 La coinyección de la vacuna de Influenza con Al(OH)₃, KLK o combinaciones de pR/I-ODN 2, KLK/I-ODN 2, KLK/I-ODN 2b o KLK/o-d(IC)₁₃ induce la producción de IgG1 específica de vacuna de Influenza (respuesta de tipo 2).

Ejemplo 2:

La combinación de KLK/o-d (IC)₁₃ mejora claramente la eficacia de una vacuna de Influenza disponible en el mercado (Fluvirin)

Ratones	BALB/c (Harlan/Olac)
Vacuna de Influenza	Fluvirin (Evans vaccine); antígenos superficiales de virus de Influenza inactivado (hemaglutinina y neuraminidasa) purificados de las cepas: cepa tipo A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) (15 µg de hemaglutinina), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17) (15 µg de hemaglutinina), cepa tipo B/Sichuan/379/99 (15 µg de hemaglutinina) dosis: 1 µg de proteína total/ratón (= baja dosis/bibliografía: 10 µg/ratón)
Al(OH) ₃	Alhydrogel; Biosys, Dinamarca dosis: mezcla 1:1 con antígeno
KLK	EI KLKLLLLLLKLK-COOH se sintetizó por MPS (Multiple Peptide System, Estados Unidos) dosis: 168 µg/ratón
oligo-d(IC) ₁₃ (= ODN1a)	EI ODN 5'ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' se sintetizó por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen dosis: 5 nmol/ratón
formulación	Tris 5 mM/sorbitol 270 mM, pH 7

grupo experimental (12 ratones/ grupo):

- 1.: sin exposición previa
- 5 2.: vacuna de la gripe
- 3.: vacuna de la gripe + Al(OH)₃
- 4.: vacuna de la gripe + KLK + o-d(IC)₁₃

Los días 0, 28 y 56 se inyectó s.c. a ratones BALB/c en ambas almohadillas plantares traseras un volumen total de 100 µl/ratón (50 µl/almohadilla plantar) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. Se recogió suero los días 26, 54 y 82 y se analizó para anticuerpos neutralizantes anti-hemaglutinina usando un ensayo de inhibición de hemaglutinación convencional. En resumen, la presencia de hemaglutinina en la superficie del virus induce la hemaglutinación de los eritrocitos, que puede inhibirse por anticuerpos neutralizantes anti-hemaglutinina. Se determinaron las titulaciones de anticuerpos contra hemaglutinina de las diferentes cepas virales (A1 = cepa tipo A/NewCaledonia/20/99 (H1N1); A2 = A/Panama/2007/99 RESVIR-17; B = cepa tipo B/Sichuan/379/99). La titulación sérica corresponde a la dilución a punto final que muestra inhibición.

Al contrario que la inyección de vacuna de Influenza en solitario o en combinación con Al(OH)₃ la coinyección de vacuna de Influenza más KLK y o-d(IC)₁₃ induce altos niveles de anticuerpos neutralizantes contra las tres hemaglutininas ensayadas (Fig. 2). Puesto que se ha demostrado que la eficacia de una vacuna de Influenza se correlaciona con las titulaciones séricas de anticuerpos anti-hemaglutinina, los resultados obtenidos indican un alto potencial de KLK/o-d(IC)₁₃ para la inducción de protección frente a Influenza.

Ejemplo 3:

Una sola inyección de la combinación del péptido antimicrobiano catiónico KLK y el oligodesoxinucleótido sintético o-d(IC)₁₃ induce sinérgicamente respuestas inmunes celulares de tipo 1 y humorales de tipo 1/tipo 2 potentes contra una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1)

Materiales

Ratones	BALB/c (Harlan-Winkelmann, Alemania)
---------	--------------------------------------

Vacunas de influenza	Agrippal S1 (Chiron SpA, Italia; temporada 2002/2003); antígenos de virus de influenza inactivado purificados (hemaglutinina y neuraminidasa) de las cepas: cepa tipo A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) (A/New Caledonia/20/99 IVR-116), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17), cepa tipo B/Hong Kong/330/2001 (B/Shangdong/7/97). Contenido de antígeno total: 45 µg (15 µg para cada antígeno); Lote N° 4307; fecha de caducidad 05/2003. Dosis: 1 µg de proteína total/ratón. Fluad (Chiron SpA, Italia; temporada 2002/2003); antígenos de virus de influenza inactivado purificados (hemaglutinina y neuraminidasa) de las cepas: cepa tipo A/New Caledonia/20/99 (H1N1) (A/New Caledonia/20/99 IVR-116), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17), (B/Shangdong/7/97). Contenido de antígeno total: 45 µg (15 µg para cada antígeno); Adición de MF59C.1 como adyuvante. Lote N° 3403; fecha de caducidad 05/2003. Dosis: 1 µg de proteína total/ratón.
o-d(IC) ₁₃ (= ODN1a)	EI ODN 5'ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' se sintetizó por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen. Dosis: 0,4 nmol/ratón
KLK	EI KLKLLLLLKLK-COOH se sintetizó por MPS (Multiple Peptide System, Estados Unidos) Dosis: 10 nmol/ratón
Formulación	Tris 10 mM/NaCl 135 mM; pH-7

Preparación Experimental (10 ratones / grupo)

1.: sin exposición previa

2.: Agrippal S1

3.: Fluad

5 4.: Agrippal S1 + KLK + o-d(IC)₁₃

El día 0 se inyectó a ratones BALB/c por vía intramuscular en ambos músculos femorales posteriores una cantidad total de 100 µl de vacuna/ratón (50 µl/músculo) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. El día 21, se recogió suero y se analizó para anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos de vacuna de influenza por ELISA. Las titulaciones corresponden a la dilución de suero que da como resultado una DO405_{nm} semimáxima. Además, se combinaron los bazo de cada grupo experimental y se prepararon suspensiones de una sola célula. Se separó una alícuota de esplenocitos en células T CD4⁺ por separación magnética (separación MACS de CD4, Miltenyi). Los esplenocitos no separados o las células T CD4⁺ separadas en combinación con células presentadoras de antígenos irradiadas (CPA; obtenidas de ratones sin exposición previa) se estimularon en placas de ELISPOT de 96 pocillos para enumerar la cantidad de células productoras de citoquinas específicas de antígeno de Agrippal S1 para cada grupo experimental. Se analizó la producción de las citoquinas siguientes:

IFN-γ (como un indicador para una respuesta celular de tipo 1),

IL-4 e IL-5 (como indicadores para una respuesta celular de tipo 2)

Resultados (Fig. 3a)

La inyección de pequeñas cantidades de las vacunas de influenza Agrippal S1 (sin adyuvante) y Fluad (con adyuvante MF59) en solitario no es capaz de inducir IFN-γ específico de vacuna (Agrippal S1) por células T CD4⁺, mientras que tras la inyección de Agrippal S1 en combinación con KLK/o-d(IC)₁₃ se observa una producción de IFN-γ específico de vacuna (Agrippal S1) por células T CD4⁺ potente. En comparación con ratones sin exposición

previa, el Agrippal S1 en solitario sólo induce ligeramente la producción de IL-4 por células T CD4⁺, y la adición de KLK/o-d(IC)₁₃ a la vacuna no muestra un aumento adicional. Sin embargo, el Fluad es un inductor potente de la producción de IL-4 por células T CD4⁺ y la producción de IL-5 por esplenocitos no separados. La IL-5 sólo es detectable a niveles muy bajos tras la inyección de Agrippal S1 en solitario, pero no en combinación con KLK/o-d(IC)₁₃. Tras la reestimulación de esplenocitos no separados se obtuvieron resultados similares.

Resultados (Fig. 3b)

La Fig. 3b muestra que la inyección de la vacuna de influenza con adyuvante Fluad en solitario induce una respuesta humoral de tipo 2 específica de vacuna (Agrippal S1) potente (IgG1), pero sólo una respuesta de tipo 1 débil (IgG2a). Sin embargo, la inyección combinada de la vacuna de influenza sin adyuvante con KLK/o-d(IC)₁₃ induce IgG2a específica de vacuna (Agrippal S1) muy potente (respuesta inmune humoral de tipo 1) y mayores niveles de IgG1 que el Agrippal S1 en solitario. Puesto que la protección frente a influenza se correlaciona con la presencia de anticuerpos IgG2a específicos de antígeno vacunal, los resultados obtenidos indican un alto potencial de KLK/o-d(IC)₁₃ como adyuvante potente para vacunas de influenza.

Ejemplo 4:

La combinación de KLK/o-d(IC)₁₃ mejora claramente la eficacia de una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1) tras una sola inyección

Materiales

Ratones	BALB/c (Harlan-Winkelmann, Alemania)
Vacunas de influenza	Agrippal S1 (Chiron SpA, Italia; temporada 2002/2003); antígenos de virus de influenza inactivado (hemaglutinina y neuraminidasa) purificados de las cepas: cepa tipo A/New Caledonia/20/99 (H1N1) (A/New Caledonia/20/99 IVR-116), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17), cepa tipo B/Hong Kong/330/2001 (B/Shangdong/7/97). Contenido de antígeno total: 45 µg (15 µg para cada antígeno); Lote N° 4307; fecha de caducidad 05/2003. Dosis: 1 µg de proteína total/ratón. Fluad (Chiron SpA, Italia; temporada 2002/2003); antígenos de virus de influenza inactivado (hemaglutinina y neuraminidasa) purificados de las cepas: cepa tipo A/New Caledonia/20/99 (H1N1) (A/New Caledonia/20/99 IVR-116), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17), (B/Shangdong/7/97). Contenido de antígeno total: 45 µg (15 µg para cada antígeno); Adición de MF59C.1 como adyuvante. Lote N° 3403; fecha de caducidad 05/2003. Dosis: 1 µg de proteína total/ratón.
o-d(IC) ₁₃ (= ODN1a)	EI ODN 5'ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' se sintetizó por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen. Dosis: 0,5 nmol/ratón
KLK	EI KLKLLLLLKLK-COOH se sintetizó por MPS (Multiple Peptide System, Estados Unidos) Dosis: 10 nmol/ratón
Formulación	Tris 10 mM/Sorbitol 270 mM; pH~7

Preparación experimental (10 ratones/grupo)

1.: sin exposición previa

2.: Agrippal S1

3.: Fluad

4.: Agrippal S1 + KLK + o-d(IC)₁₃

El día 0 se inyectó a ratones BALB/c por vía intramuscular en ambos músculos femorales posteriores una cantidad total de 100 µl de vacuna/ratón (50 µl/músculo) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. El día 21, se recogió suero y se analizó para anticuerpos neutralizantes anti-hemaglutinina mediante el uso de un ensayo de inhibición de hemaglutinina (IH) convencional para sueros humanos. Se determinaron las titulaciones de anticuerpos contra hemaglutinina derivada de diferentes cepas virales de ambas vacunas de influenza Agrippal S1 y Fluad (véanse los Materiales).

Resultados (Fig. 4)

Al contrario que la inyección de Agrippal S1 en solitario, la coinyección de la vacuna de influenza con pequeñas cantidades de KLK/o-d(IC)₁₃ induce niveles claramente aumentados de anticuerpos neutralizantes contra las dos cepas de influenza A ensayadas (A/New Caledonia/20/99; A/Panama/2007/99). Sin embargo, la inmunización con Fluad induce los mismos niveles de anticuerpos neutralizantes que la coinyección de Agrippal S1 con pequeñas cantidades de KLK/o-d(IC)₁₃. Puesto que se ha demostrado que la eficacia de una vacuna de influenza se correlaciona con las titulaciones séricas de anticuerpos anti-hemaglutinina, los presentes resultados indican un alto potencial de KLK/o-d(IC)₁₃ como adyuvante para la inducción de protección frente a influenza.

Ejemplo 5:

Vacunación de ratones con péptidos derivados de la ncORF de virus de influenza A en combinación con KLK/o-d(IC)₁₃. La respuesta de células T específica se mide 7 días después de la vacunación, y los animales se exponen posteriormente a una dosis letal de virus de influenza A adaptado a ratón (x31). La supervivencia se controla durante 15 días.

Materiales

Ratones	C57B1/6 (Harlan-Winkelmann, Alemania)
Péptidos	p82 (GLCTLVAML) Péptido de control derivado de VEB; HLA-A*0201; AA inicio 280 p1574 (IASNENMETM). Péptido de control derivado de la nucleoproteína de influenza, AA inicio 365 p1569 (TMLYNKMEF). Péptido derivado de la ncORF de la gripe del segmento 1, marco 1, ORF 1, AA inicio 569 p1600 (SSIAAQDAL). Péptido derivado de la ncORF de la gripe del segmento 3, marco 6, ORF 2, AA inicio 83 P1664 (VTILNLALL). Péptido derivado de la ncORF de la gripe del segmento 4, marco 5, ORF 6, AA inicio 9. Dosis: 100 µg/péptido/ratón
o-d(IC)₁₃ (= ODN1a)	El ODN 5'ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI IC3' se sintetizó por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen Dosis: 5 nmol/ratón
KLK	El KLKLLLLLLKLK-COOH se sintetizó por MPS (Multiple Peptide System, Estados Unidos) Dosis: 127 nmol/ratón
Formulación	Sorbitol 270 mM/Hepes 10 mM
Virus de influenza A	x31, virus de influenza A adaptado a ratón, virus rec. derivado de A/Pr/8/34 (seg. 1, 2, 3, 5, 7, 8) y A/Aichi/2/68 (seg. 4, 6)

Preparación experimental (15 ratones/grupo)

1. p1574 + KLK + o-d(IC)₁₃

2. p1569 + KLK + o-d(IC)₁₃

3. p1600 + KLK + o-d(IC)₁₃

4. p1664 + KLK + o-d(IC)₁₃

5. p1600 + p1569 + KLK + o-d(IC)₁₃

5 El día 0 se inyectó s.c. a ratones en ambas almohadillas plantares traseras una cantidad total de 100 µl de vacuna/ratón (50 µl/pata) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. El día 7, se estimularon los esplenocitos no separados de 5 ratones en placas de ELISpot de 96 pocillos para enumerar la cantidad de células productoras de IFN-γ específicas de péptido para cada grupo experimental.

10 Los 10 ratones restantes se expusieron a virus de influenza A x31 adaptado a ratón (5*10E5 ufp). La supervivencia se controló durante 15 días.

Resultados del ELISpot (Fig. 5a)

15 Los esplenocitos de los grupos 1 y 3 (péptidos p1574 y p1600) no muestran ninguna mancha específica después de la reestimulación con los péptidos respectivos. Los grupos 2 y 4 (p1569 y p1664) liberan específicamente IFN-γ después de la reestimulación. El grupo 5 se vacunó con dos péptidos individuales (no como una mezcla, p1600 y p1569). Tras la reestimulación con la mezcla de ambos péptidos o con p1569, se detectó la liberación de citoquinas específicas. Por el contrario, tras la reestimulación con p1600 solamente, no eran detectables manchas de IFN-γ. Esto concuerda con el grupo 3 (p1600 solamente).

Resultados de la exposición (Fig. 5b)

20 La Fig. 5b muestra el índice de supervivencia de los ratones expuestos a una dosis letal de virus de la influenza A adaptado a ratón x31. El grupo 1 (p1574, epítipo protector descrito para H2-Db) protege el 30% de todos los ratones expuestos. El péptido p1569 no proporciona en absoluto protección (0%). Por el contrario, los péptidos p1600 y p1664 protegen al 50% y 62% de los animales expuestos, respectivamente. Cuando los animales se vacunan con dos péptidos diferentes (grupo 5, péptidos p1600 y p1569) se protegió hasta al 70% de los animales.

Ejemplo 6:

25 **Se inducen respuestas celulares de tipo 1 específicas de VHC potentes por la inyección combinada de cinco péptidos derivados del VHC diferentes, el péptido antimicrobiano KLK y el oligodesoxinucleótido sintético o-d(IC)₁₃**

Ratones Ratones transgénicos HLA-A*0201 (HHD.1)

Péptidos Los péptidos p83, p84, p87, p89, p1426 se usaron para la vacunación.

p83: péptido derivado del VHC, (KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPR).

p84: péptido derivado del VHC, (GYKVLVLNPSVAAT).

p87: péptido derivado del VHC, (DLMGYIPAV).

p89: péptido derivado del VHC, (CINGVCWTV)

p1426: péptido derivado del VHC, (HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA),

(p1274 usado para la reestimulación como péptido irrelevante (YMDGTMSQV; restringido por HLA-A*0201).

Todos los péptidos se sintetizaron por síntesis de F-moc en fase sólida convencional, se purificaron por HPLC y se analizaron por espectroscopía de masas para determinar su pureza.

dosis: 20 µg por péptido/ratón

KLK	El KLKLLLLLLKLK-COOH se sintetizó por MPS (Multiple Peptide System, Estados Unidos) dosis: 10 nmol/ratón
oligo-d(IC) ₁₃ (=ODN1a)	El ODN 5'ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' se sintetizó por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen dosis: 0,4 nmol/ratón
Formulación	Tris 10 mM/NaCl 135 mM; pH~7

Preparación experimental (5 ratones/grupo)

1. Péptidos del VHC

2. Péptidos del VHC + KLK + o-d(IC)₁₃

- Los días 0, 14 y 28 se inyectó s.c. a ratones HHD.1 en ambas almohadillas plantares traseras un volumen total de 100 µl/ratón (50 µl/almohadilla plantar) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. El día 35 (7 días después de la última vacunación) se aislaron células T CD4⁺ así como CD8⁺ por separación magnética (MACS, Miltenyi) a partir de suspensiones de una sola célula de esplenocitos. Las células T se incubaron con medio (control de fondo) o se reestimularon con esplenocitos irradiados a partir de ratones HHD.1 sin exposición previa como CPA en presencia de los diferentes péptidos usados para la vacunación o del péptido irrelevante p1274.
- Después de una incubación de una noche, la producción de IFN-γ se analizó usando un ensayo de ELISpot.

La Figura 6 muestra que tras la coinyección de los cinco péptidos derivados del VHC con KLK/o-d(IC)₁₃ se indujeron altas cantidades de IFN- producido por células T CD4⁺ contra p84, p87, p89, p1426. Además, era detectable una fuerte producción de IFN-γ por células T CD8⁺ contra p87, p89.

Ejemplo 7:

- 15 Péptidos catiónicos (pR o KLK) coinyectados con diferentes oligodesoxinucleótidos (ODN) (Cpl, ntCpl, o-d(IC)₁₃) inducen sinérgicamente respuestas celulares de tipo 1 potentes (IFN-γ) contra antígeno superficial de la Hepatitis B**

Ratones	C57BL/6 (Harlan-Winkelmann, Alemania); ratones de bajo nivel de respuesta para respuestas inmunes específicas de HbsAg
Antígeno	Antígeno superficial de la Hepatitis B (HBsAg) dosis: 5 µg/ratón
Al(OH) ₃	Alhydrogel; Biosys, Dinamarca dosis: mezcla 1:1 con antígeno
pR	Poli-L-Arginina con un grado promedio de polimerización de 43 residuos de arginina (determinado por MALLS); Sigma Aldrich Inc dosis: 100 µg/ratón
KLK	El KLKLLLLLLKLK-COOH se sintetizó por MPS (Multiple Peptide System, Estados Unidos) dosis: 168 µg/ratón
I-ODN 2	(= Cpl 2) ODN sustituidos con tiofosfato que contienen desoxiinosinas: 5'tcc atg aci ttc ctg atg ct 3' se sintetizaron por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen dosis: 5 nmol/ratón

I-ODN 2b (= Cpl 2b) ODN que contienen desoxiinosinas: 5'tcc atg aci ttc ctg atg ct 3' se sintetizaron por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen

dosis: 5 nmol/ratón

o-d(IC)₁₃ (= ODN1a) El ODN 5'ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' se sintetizó por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen

dosis: 5 nmol/ratón

Formulación Tris 5 mM/Sorbitol 270 mM; pH7

Preparación experimental (5 ratones/grupo/punto temporal):

1. HBsAg
2. HBsAg + Alumbre
3. HBsAg + I-ODN 2
- 5 4. HBsAg + I-ODN 2b
5. HBsAg + o-d(IC)₁₃
6. HBsAg + pR
7. HBsAg + KLK
8. HBsAg + pR + I-ODN 2
- 10 9. HBsAg + pR + I-ODN 2b
10. HBsAg + pR + o-d(IC)₁₃
11. HBsAg + KLK + I-ODN 2
12. HBsAg + KLK + I-ODN 2b
13. HBsAg + KLK + o-d (IC)₁₃
- 15 El día 0 y el día 56 se inyectó a ratones por vía subcutánea en el flanco derecho un volumen total de 100 µl/ratón que contenía los compuestos mencionados anteriormente. El análisis de la respuesta inmune se realizó el día 7, el día 21 y el día 50 después de la primera y segunda inyección, respectivamente. Los esplenocitos de cinco ratones por grupo por punto temporal se reestimularon *ex vivo* con HBsAg 10 µg/ml y se realizaron ensayos ELISpot para analizar la producción de IFN-γ específico de HBsAg (respuesta inmune de tipo 1), así como de IL-4 (respuesta
- 20 inmune de tipo 2).

Resultados (Fig. 7)

El HBsAg inyectado en solitario o en combinación con alumbre no induce, o sólo induce niveles muy bajos de IFN-γ, mientras que tras la inyección de HBsAg combinado con pR/ODN o KLK/ODN se induce una producción de IFN-γ específico de HBsAg que puede aumentarse adicionalmente mediante una vacunación de refuerzo. Es observable una producción de IL-4 ligeramente aumentada en comparación con la inyección de HBsAg en solitario tras la coinyección de alumbre, pR y KLK después del refuerzo, así como tras la coinyección de combinaciones de KLK/ODN.

Ejemplo 8:

Una sola inyección de la combinación del péptido antimicrobiano catiónico KLK con el oligodesoxinucleótido sintético o-d(IC)₁₃ (ODN1a) y pequeñas cantidades de una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1) induce sinérgicamente respuestas inmunes celulares de tipo I específicas de vacuna potentes.

Materiales

Ratones BALB/c (Harlam-Winkelmann, Alemania)

Vacuna de influenza **Agrippal S1** (Chiron SpA, Italia; temporada de vacunación 2003/2004); lote 035105, fecha de caducidad 06/2004. Antígenos de virus de influenza inactivado (hemaglutinina y neuraminidasa) purificados de las cepas: cepa tipo A/New Caledonia/20/99 (H1N1) (A/New Caledonia/20/99 IVR-116), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17), cepa tipo B/Hong Kong/330/2001 (B/Shangdong/7/97).

Contenido de antígeno total: 45 µg de hemaglutinina (15 µg para cada cepa viral)

Dosis: 9 µg de proteína total/ratón (usada directamente a partir de una jeringa precargada), 0,1 µg de proteína total/ratón

o-d(IC)₁₃ (= ODN1a) ODN sustituido con fosfodiéster que contiene 13 motivos desoxi (-inosina, -citosina) (ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC); sintetizado por Transgenomics; Número de parte: I02A03001N

Dosis: 4 nmol/ratón, 1,4 nmol/ratón, 0,4 nmol/ratón

KLK Poliaminoácido catiónico sintético que contiene lisina y leucina (KLKLLLLKLK-COOH); sintetizado por Bachem AG Lote: 0562101; Dosis: 100 nmol/ratón, 35 nmol/ratón, 10 nmol/ratón

Formulación por el Pharmaceutical Development Department en Intercell;
Tris 10 mM/NaCl 135 mM pH 7,5

Preparación experimental (10 ratones/grupo)

1. sin exposición previa

2. 9 µg de Agrippal S1

3. 0,1 µg de Agrippal S1

5 4. 0,1 µg de Agrippal S1 + KLK 100 nmol + ODN1a 4 nmol

5. 0,1 µg de Agrippal S1 + KLK 35 nmol + ODN1a 1,4 nmol

6. 0,1 µg de Agrippal S1 + KLK 10 nmol + ODN1a 0,4 nmol

10 El día 0, se inyectó a ratones BALB/c por vía intramuscular en ambos músculos femorales una cantidad total de 100 µl de vacuna/ratón (50 µl/músculo) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. El día 21, se recogió suero y se analizó para anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos de vacuna de influenza por ELISA. Las titulaciones corresponden a la dilución de suero que da como resultado una DO405_{nm} semimáxima. Además, los bazo de cada grupo experimental se combinaron y se prepararon suspensiones de una sola célula. Se separó una alícuota de esplenocitos en células T CD4⁺ y CD8⁺ por separación magnética (separación MACS de CD4 y CD8, Miltenyi). Los esplenocitos no separados o células T CD4⁺ y CD8⁺ separadas en combinación con células presentadoras de antígenos irradiadas (CPA; obtenidas de ratones sin exposición previa) se estimularon en placas de ELISPOT de 96 pocillos para enumerar la cantidad de células productoras de citoquinas específicas de antígeno de Agrippal S1 para cada grupo experimental. Se analizó la producción de las citoquinas siguientes:

IFN-γ (como un indicador para una respuesta celular de tipo 1),

IL-4 e IL-5 (como indicadores para una respuesta celular de tipo 2)

20 **Resultados (Fig. 8a)**

25 La vacunación de ratones con 9 µg y un 0,1 µg de Agrippal S1 en solitario no fue capaz de inducir IFN-γ específico de vacuna por esplenocitos CD4⁺, mientras que tras la inyección de Agrippal S1 en combinación con diferentes concentraciones de KLK/o-d(IC)₁₃ se observó una producción de IFN-γ potente por esplenocitos CD4⁺. Sin embargo, los esplenocitos CD8⁺ no eran capaces de inducir IFN-γ. En comparación con los ratones sin exposición previa, el Agrippal S1 en solitario inducía sólo ligeramente la producción de IL-4 por esplenocitos no separados y CD4⁺, y la adición de KLK/o-d(IC)₁₃ a la vacuna no mostraba un aumento adicional. Sin embargo, la IL-5 inducida por Agrippal S1 se suprimía totalmente tras la coinyección de KLK/o-d(IC)₁₃. Tras la reestimulación de esplenocitos

no separados se obtuvieron resultados similares.

Resultados (Fig. 8b)

5 Como se ilustra en la Fig. 8b, la inyección combinada de pequeñas cantidades de la vacuna de influenza sin adyuvante con diferentes concentraciones de KLK/o-d(IC)₁₃ inducía **IgG2a** específica de vacuna (Agrippal S1) muy potente (respuesta inmune humoral de tipo 1) y mayores niveles de **IgG1** que pequeñas cantidades de Agrippal S1 en solitario. Sin embargo, la alta dosis de Agrippal S1 mostraba las mayores titulaciones de anticuerpos IgG1 específicos de vacuna. Puesto que la protección frente a influenza se correlaciona con la presencia de anticuerpos IgG2a específicos de antígeno vacunal, los resultados obtenidos indican un alto potencial de KLK/o-d(IC)₁₃ como un adyuvante potente para vacunas de influenza.

Ejemplo 9:

Una sola inyección de baja dosis de la combinación del péptido antimicrobiano catiónico KLK con el oligodesoxinucleótido sintético o-d(IC)₁₃ (ODN1a) induce sinérgicamente respuestas inmunes celulares de tipo I específicas de vacuna potentes contra una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1)

Materiales

Ratones	BALB/c (Harlan-Winkelmann, Alemania)
Vacuna de influenza	Agrippal S1 (Chiron SpA, Italia; temporada de vacunación 2003/2004); lote 035105, fecha de caducidad 06/2004. Antígenos de virus de influenza inactivado (hemaglutinina y neuraminidasa) purificados de las cepas: cepa tipo A/New Caledonia/20/99 (H1N1) (A/New Caledonia/20/99 IVR-116), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17), cepa tipo B/Hong Kong/330/2001 (B/Shangdong/7/97). Contenido de antígeno total: 45 µg de hemaglutinina (15 µg para cada cepa viral) <u>Dosis:</u> 9 µg de proteína total/ratón (usada directamente a partir de una jeringa precargada) 0,1 µg de proteína total/ratón
o-d(IC)₁₃ (= ODN1a)	ODN sustituido con fosfodiéster que contiene 13 motivos desoxi (-inosina, -citosina) (ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC); sintetizado por Transgenomics; Número de parte: I02A03001N <u>Dosis:</u> 0,4 nmol/ratón, 0,2 nmol/ratón, 0,04 nmol/ratón
KLK	Poli aminoácido catiónico sintético que contiene lisina y leucina (KLKLLLLLKLK-COOH); sintetizado por Bachem AG Lote: 0562101; <u>Dosis:</u> 10 nmol/ratón, 5 nmol/ratón, 1 nmol/ratón
Formulación	por el Pharmaceutical Development Department en Intercell; Tris 10 mM/NaCl 135 mM pH 7,5

Preparación experimental (5 ratones/grupo)

1. sin exposición previa
2. 9 µg de Agrippal S1
3. 1 µg de Agrippal S1
4. 1 µg de Agrippal S1 + KLK 10 nmol + ODN1a 0,4 nmol
5. 1 µg de Agrippal S1 + KLK 5 nmol + ODN1a 0,2 nmol
6. 1 µg de Agrippal S1 + KLK 1 nmol + ODN1a 0,04 nmol

El día 0 se inyectó a ratones BALB/c por vía intramuscular en ambos músculos femorales una cantidad total de

100 µl de vacuna/ratón (50 µl/músculo) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. El día 21, se recogió suero y se analizó para anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos de vacuna de influenza por ELISA. Las titulaciones corresponden a la dilución de suero que da como resultado una DO405_{nm} semimáxima. Además, los bazos de cada grupo experimental se combinaron y se prepararon suspensiones de una sola célula. Se estimularon esplenocitos en placas de ELISPOT de 96 pocillos para enumerar la cantidad de células productoras de citoquinas específicas de antígeno de Agrippal S1 para cada grupo experimental. Se analizó la producción de las citoquinas siguientes:

IFN-γ (como un indicador para una respuesta celular de tipo 1),

IL-4 e IL-5 (como indicadores para una respuesta celular de tipo 2)

10 **Resultados (Fig. 9a)**

De nuevo, la vacunación de ratones con 9 µg y 1 µg de Agrippal S1 en solitario (véase también la Figura 8a) no fue capaz de inducir IFN-γ específico de vacuna por esplenocitos murinos, mientras que tras la inyección de Agrippal S1 en combinación con diferentes concentraciones reducidas de KLK/o-d(IC)₁₃ se observó una producción de IFN-γ potente. En comparación con ratones sin exposición previa, el Agrippal S1 en solitario inducía sólo ligeramente la producción de IL-4 por esplenocitos murinos y la adición de KLK/o-d(IC)₁₃ a la vacuna no tuvo efecto. La IL-5 inducida por Agrippal S1 se suprimió tras la coinyección de KLK/o-d(IC)₁₃ de una forma dependiente de la concentración. Aún a una dosificación muy baja, la combinación de KLK/o-d(IC)₁₃ induce una respuesta inmune celular de tipo I potente.

Resultados (Fig. 9b)

La inyección combinada de pequeñas cantidades de la vacuna de influenza sin adyuvante con diferentes concentraciones de KLK/o-d(IC)₁₃ inducía IgG2a específica de vacuna (Agrippal S1) muy potente (respuesta inmune humoral de tipo 1) y niveles de IgG1 aproximadamente comparables a pequeñas cantidades de Agrippal S1 en solitario. Sin embargo, la alta dosis de Agrippal S1 en solitario mostraba titulaciones ligeramente aumentadas de anticuerpos IgG1 específicos de vacuna y niveles comparables de anticuerpos IgG2a en comparación con la coinyección de Agrippal S1 y la menor concentración de KLK/o-d(IC)₁₃. Puesto que la protección frente a influenza se correlaciona con la presencia de anticuerpos IgG2a específicos de antígeno vacunal, los resultados obtenidos indican un alto potencial de KLK/o-d(IC)₁₃, incluso a una dosificación muy baja, como adyuvante potente para vacunas de influenza.

Ejemplo 10

Una sola inyección de una vacuna de influenza disponible en el mercado (Agrippal S1) combinada con el péptido antimicrobiano catiónico KLK y el oligodesoxinucleótido sintético o-d(IC)₁₃ (ODN1a) en comparación con otros adyuvantes

Materiales

Ratones BALB/c (Harlan-Winkelmann, Alemania)

Vacunas de influenza **Agrippal S1** (Chiron SpA, Italia; temporada de vacunación 2003/2004); lote 035105, fecha de caducidad 06/2004 y **Fluad** (Chiron SpA, Italia; temporada de vacunación 2003/2004); lote 4003, fecha de caducidad 05/2004. Adición de MF59C.1 como adyuvante. Ambas vacunas contienen antígenos de virus de influenza inactivado (hemaglutinina y neuraminidasa) purificados de las cepas: cepa tipo A/New Caledonia/20/99 (H1N1) (A/New Caledonia/20/99 IVR-116), cepa tipo A/Moscow/10/99 (H3N2) (A/Panama/2007/99 RESVIR-17), cepa tipo B/Hong Kong/330/2001 (B/Shangdong/7/97).

Contenido de antígeno total: 45 µg de hemaglutinina (15 µg para cada cepa viral)

Dosis: 9 µg de proteína total/ratón (usada directamente a partir de una jeringa precargada)

1 µg de proteína total/ratón

o-d(IC)₁₃ (= ODN1a)	ODN sustituido con fosfodiéster que contiene 13 motivos desoxi (-inosina, -citosa) (ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC); sintetizado por Transgenomics; Número de parte: I02A03001N <u>Dosis:</u> 0,4 nmol/ratón
KLK	Poli-aminoácido catiónico sintético que contiene lisina y leucina (KLKLLLLLKLK-COOH); sintetizado por Bachem AG Lote: 05 62101; <u>Dosis:</u> 100 nmol/ratón, 10 nmol/ratón
CpG1668	ODN sustituido con tiofosfato que contiene motivos CpG (5'-tcc atg acg ttc ctg atg ct-3'); sintetizado por Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen; lote 020614 <u>Dosis:</u> 5 nmol/ratón
Alumbre	Al(OH) ₃ [15 g/l]; suministrado por Chiron Behring, Alemania <u>Dosis:</u> mezcla 1:1 con antígeno
pR	Poli-L-Arginina con un grado promedio de polimerización de 43 residuos de arginina (determinado por MALLS); suministrado por Sigma; lote 50K7280; <u>Dosis:</u> 100 µg/ratón
IFA	Adyuvante Incompleto de Freud; suministrado por Difco Lab.; lote 2158430 <u>Dosis:</u> mezcla 1:1 con antígeno
CFA	Adyuvante Completo de Freud; suministrado por Difco Lab.; lote 3126639 <u>Dosis:</u> mezcla 1:1 con antígeno
Formulación	por el Pharmaceutical Development Department en Intercell; Tris 10 mM/NaCl 135 mM pH 7,5

Preparación experimental (5 ratones/grupo)

- | | |
|----|---|
| | 1. sin exposición previa |
| | 2. 9 µg de Fluad |
| | 3. 9 µg de Agrippal S1 |
| 5 | 4. 1 µg de Agrippal S1 |
| | 5. 1 µg de Agrippal S1 + KLK 10 nmol + ODN1a 0,4 nmol |
| | 6. 1 µg de Agrippal S1 + CpG1668 5 nmol |
| | 7. 1 µg de Agrippal S1 + 100 µg de pR43 |
| | 8. 1 µg de Agrippal S1 + KLK 100 nmol |
| 10 | 9. 1 µg de Agrippal S1 + Alumbre |
| | 10. 1 µg de Agrippal S1 + CFA |
| | 11. 1 µg de Agrippal S1 + IFA |

El día 0 se inyectó a ratones BALB/c por vía intramuscular en ambos músculos femorales una cantidad total de 100 µl de vacuna/ratón (50 µl/músculo) que contenía los compuestos enumerados anteriormente. El día 21, los bazo de cada grupo experimental se combinaron y se prepararon suspensiones de una sola célula. Se estimularon los esplenocitos en placas de ELISPOT de 96 pocillos para enumerar la cantidad de células productoras de citoquinas específicas de antígeno de Agrippal S1 para cada grupo experimental. Se analizó la producción de las citoquinas siguientes:

IFN- γ (como un indicador para una respuesta celular de tipo 1),
IL-4 e IL-5 (como indicadores para una respuesta celular de tipo 2)

Resultados (Fig. 10)

La inyección combinada de pequeñas cantidades de la vacuna de influenza sin adyuvante con pequeñas dosis de KLK/o-d(IC)₁₃ inducían mayores niveles de **IFN- γ** específico de vacuna (Agrippal S1) por esplenocitos murinos en comparación con la inmunización con Agrippal S1 y Fluad en solitario. Sólo se consiguieron cantidades comparables de IFN- γ tras la vacunación con CFA, todos los demás grupos experimentales mostraron aproximadamente ninguna producción (pR43, Alumbre, IFA) o una producción ligeramente aumentada (CpG1668, KLK) de IFN- γ por esplenocitos murinos en comparación con Agrippal S1 en solitario. En comparación con ratones sin exposición previa, sólo el Fluad inducía notablemente la producción de **IL-4** por esplenocitos murinos, mientras que todos los demás grupos experimentales mostraban casi los mismos bajos niveles de IL-4. La **IL-5** específica de antígeno vacunal era detectable a niveles muy elevados tras la vacunación de ratones con Fluad y a niveles moderados tras la inyección de Agrippal S1 en solitario o en combinación con KLK. La coinyección de Agrippal S1 con pR, Alumbre o IFA aumentaba sólo ligeramente los niveles de IL-5, mientras que todos los demás grupos mostraron una reducción en la producción de IL-5.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Intercell AG
 <120> Vacunas Mejoradas
 <130> R 56829
 5 <150> EP 03450072.8
 <151> 24-03-2003
 <150> EP 03450084.3
 <151> 11-04-2003
 <150> EP 03450171.8
 10 <151> 11-07-2003
 <160> 16
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido A
 <400> 1
 20 **Lys Leu Lys Leu Leu Leu Leu Lys Leu Lys**
1 5 10
 <210> 2
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> I-/U-ODN oligo d(IC)13
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1) .. (26)
 30 <223> I
 <400> 2
icicicicic icicicicic icicic
 <210> 3
 <211> 6

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> CG flanqueada	
5	<400> 3	
	rrcgyy	6
	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> I-ODN 2 (tiofosfato)	
	<220>	
	<221> base_modificada	
15	<222> (9)	
	<223> I	
	<400> 4	
	tccatgacit tcctgatgct	20
	<210> 5	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> I-ODN 2b	
25	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (9)	
	<223> I	
	<400> 5	
30	tccatgacit tcctgatgct	20
	<210> 6	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Virus de Epstein Barr	

<400> 6

Gly Leu Cys Thr Leu Val Ala Met Leu
1 5

<210> 7

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Virus de Influenza

<400> 7

Ile Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met
1 5 10

<210> 8

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Virus de Influenza

<400> 8

Thr Met Leu Tyr Asn Lys Met Glu Phe
1 5

15 <210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus de Influenza

<400> 9

Ser Ser Ile Ala Ala Gln Asp Ala Leu
1 5

20 <210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus de Influenza

25 <400> 10

Val Thr Ile Leu Asn Leu Ala Leu Leu
1 5

<210> 11

<211> 22

<212> PRT

30 <213> VHC

<400> 11

Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro
1 5 10 15

Arg Arg Gly Pro Arg Leu
20

<210> 12

<211> 14

5 <212> PRT

<213> VHC

<400> 12

Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr
1 5 10

<210> 13

10 <211> 9

<212> PRT

<213> VHC

<400> 13

Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Ala Val
1 5

15 <210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> VHC

<400> 14

20 Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val
1 5

<210> 15

<211> 23

<212> PRT

<213> VHC

25 <400> 15

His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly Leu Ser
1 5 10 15

Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala
20

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> HLA-A

<400> 16

5 Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna para prevenir infecciones virales que comprende
 - un antígeno viral,
 - un péptido con la secuencia de aminoácidos KLKL₅KLK, y
- 5 - una molécula de ácido oligodesoxinucleico inmunoestimulante (ODN), en la que el ODN comprende d(IC)₁₃ como se define por la SEQ ID NO. 2.
2. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque dicho antígeno viral es preferiblemente un antígeno de VHC, VHB, VIH, HPV o JEV, o una combinación de dos o más de estos antígenos.
- 10 3. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque dicho antígeno viral se selecciona del grupo que comprende antígenos peptídicos de VHC y antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg).
4. Una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque contiene además un adyuvante basado en Al³⁺.
5. Una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque contiene un péptido policatiónico adicional.
- 15 6. Una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque contiene además un oligodesoxinucleótido que contiene un motivo CpG.
7. Una combinación de un antígeno viral, un péptido con la secuencia de aminoácidos KLKL₅KLK y la molécula de ácido oligodesoxinucleico inmunoestimulante d(IC)₁₃, para uso en la prevención de una infección viral.

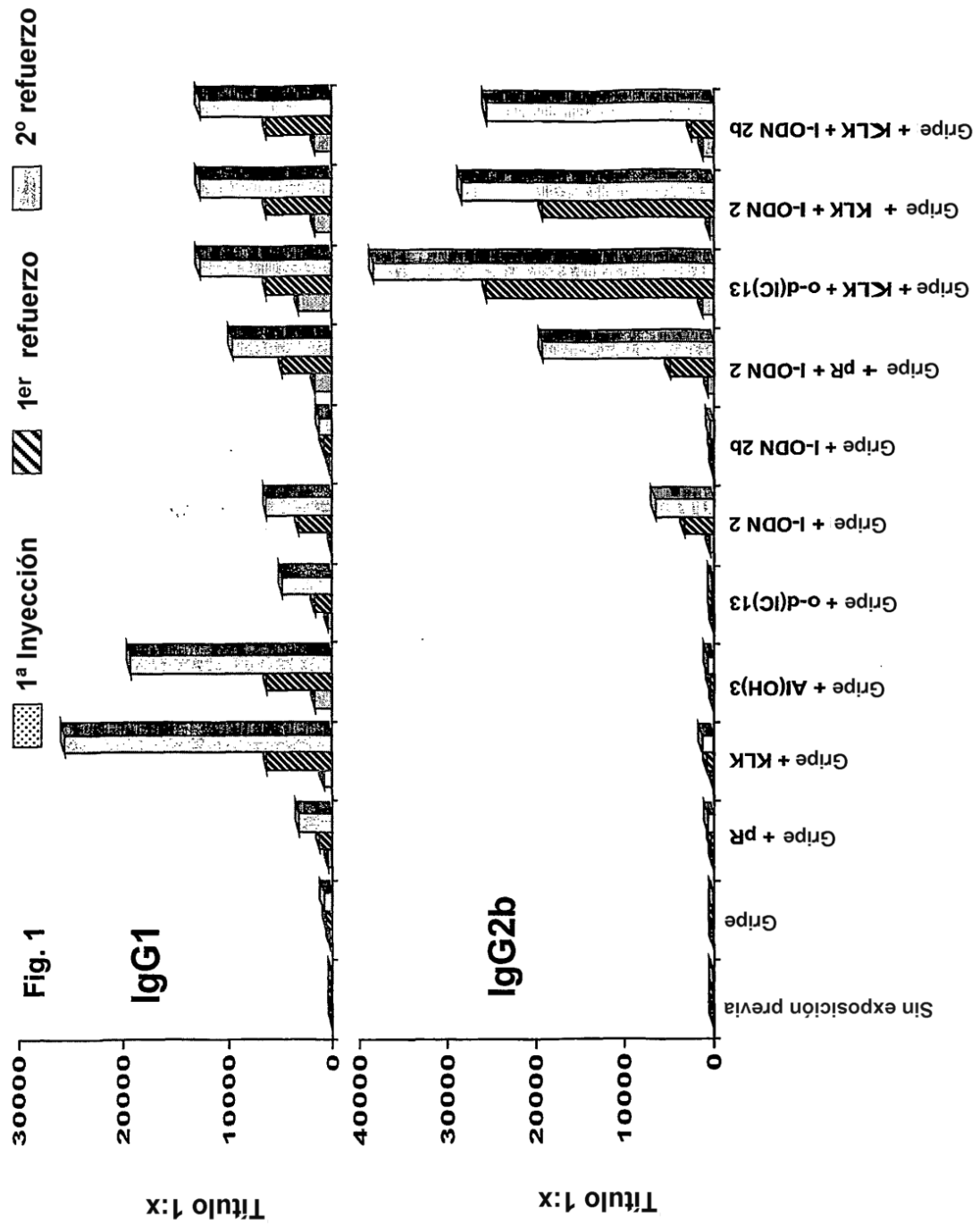


Fig. 2

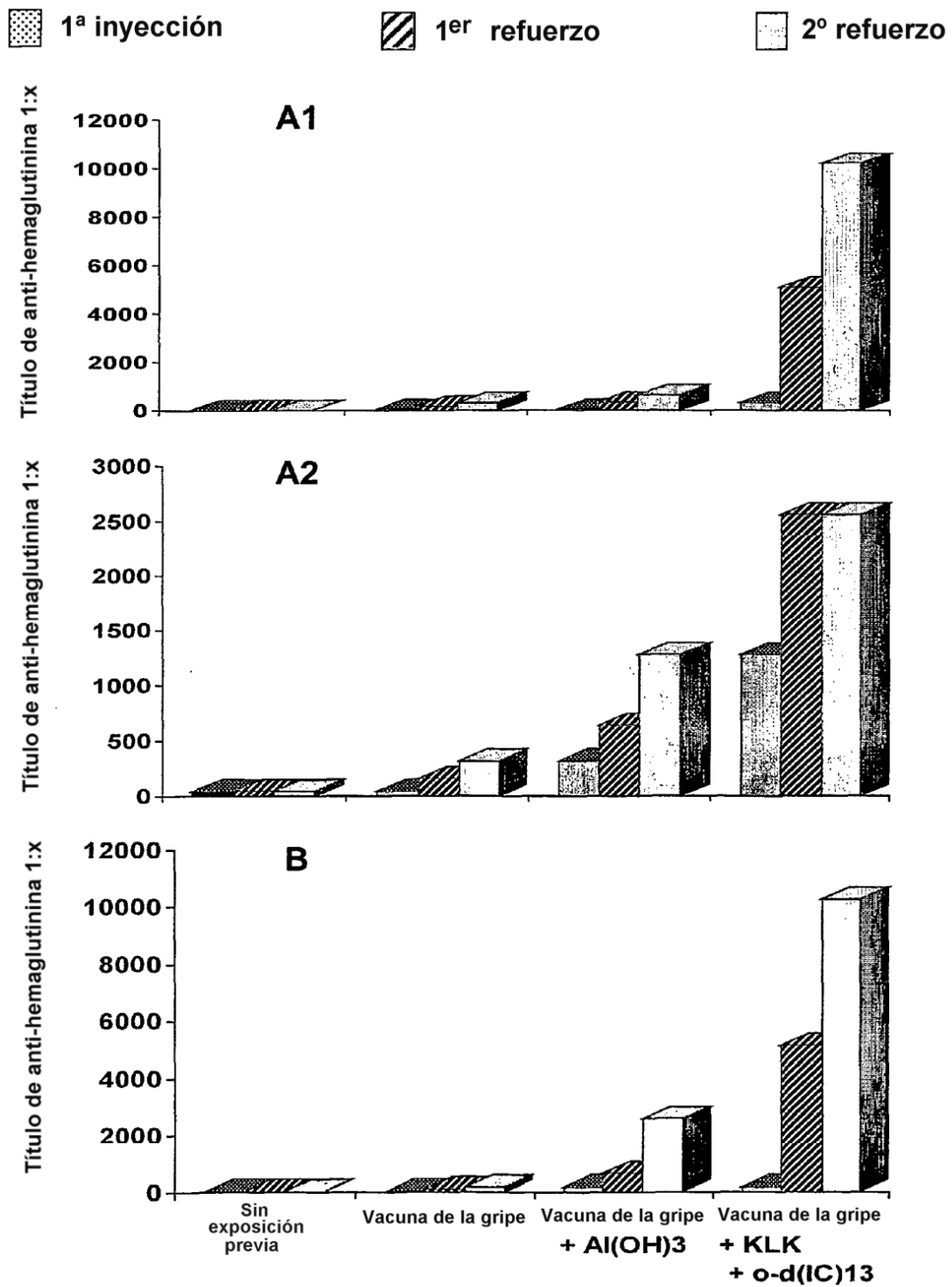
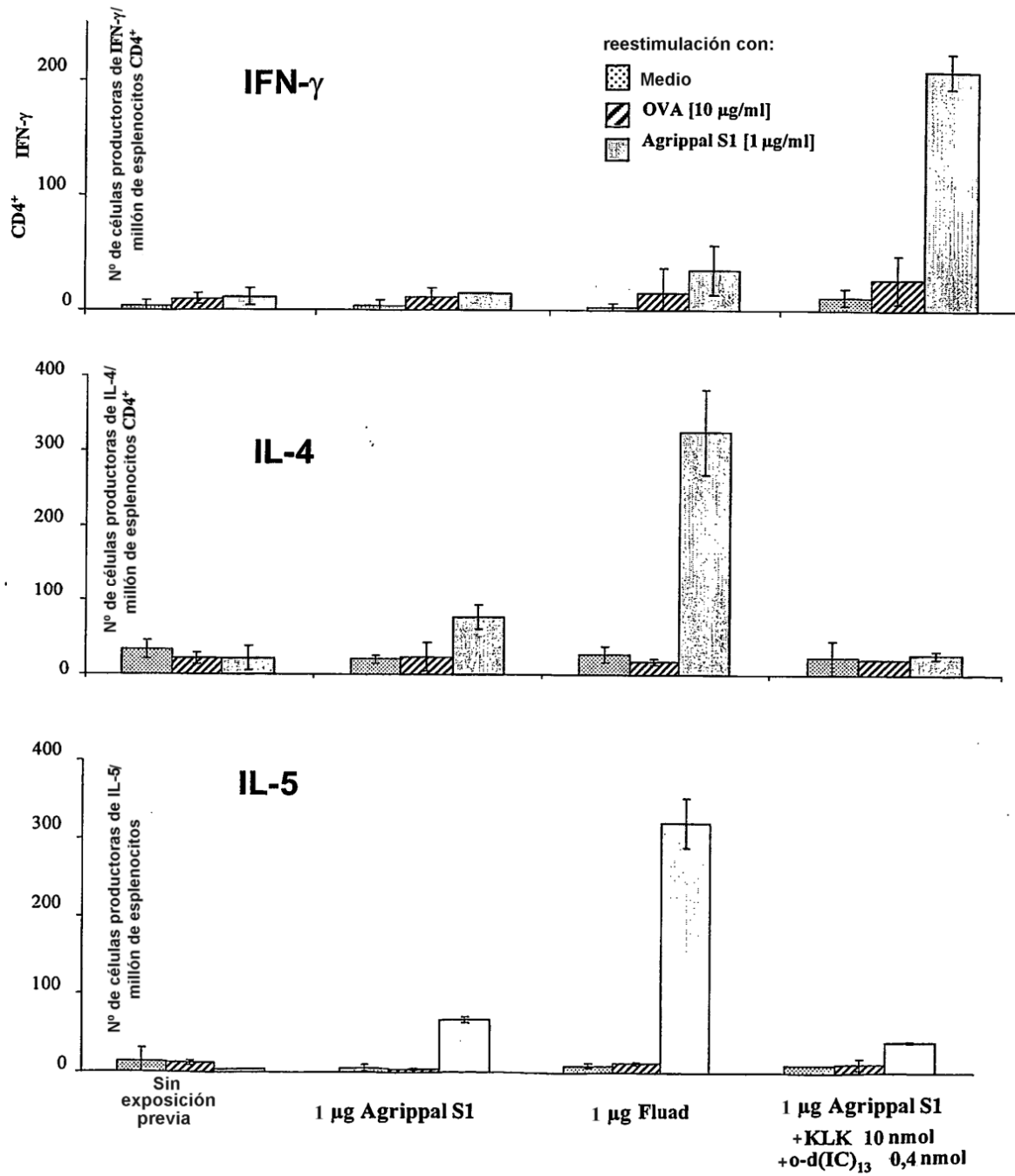


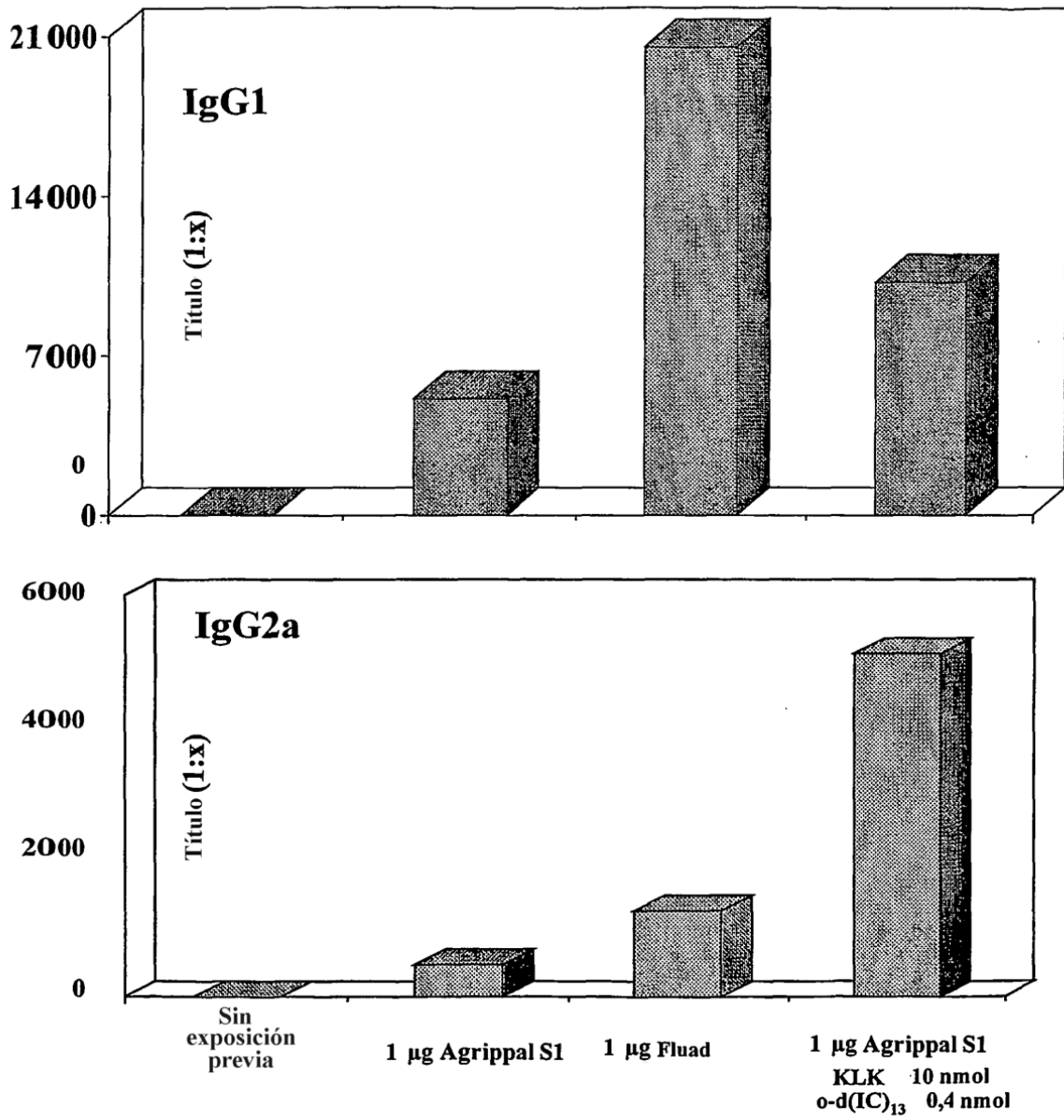
Fig. 3a:



ratones BALB/c inmunizados con

Fig. 3b:

Placa de ELISA revestida con:
Agrippal S1 1 µg/ml



ratones BALB/c inmunizados con

Fig. 4:

sueros de ratón ensayados contra hemaglutinina derivada de la cepa:

- ☒ A/New Caledonia/20/99 (H1/N1)
- ▨ A/Panama/2007/99 (H3/N2)

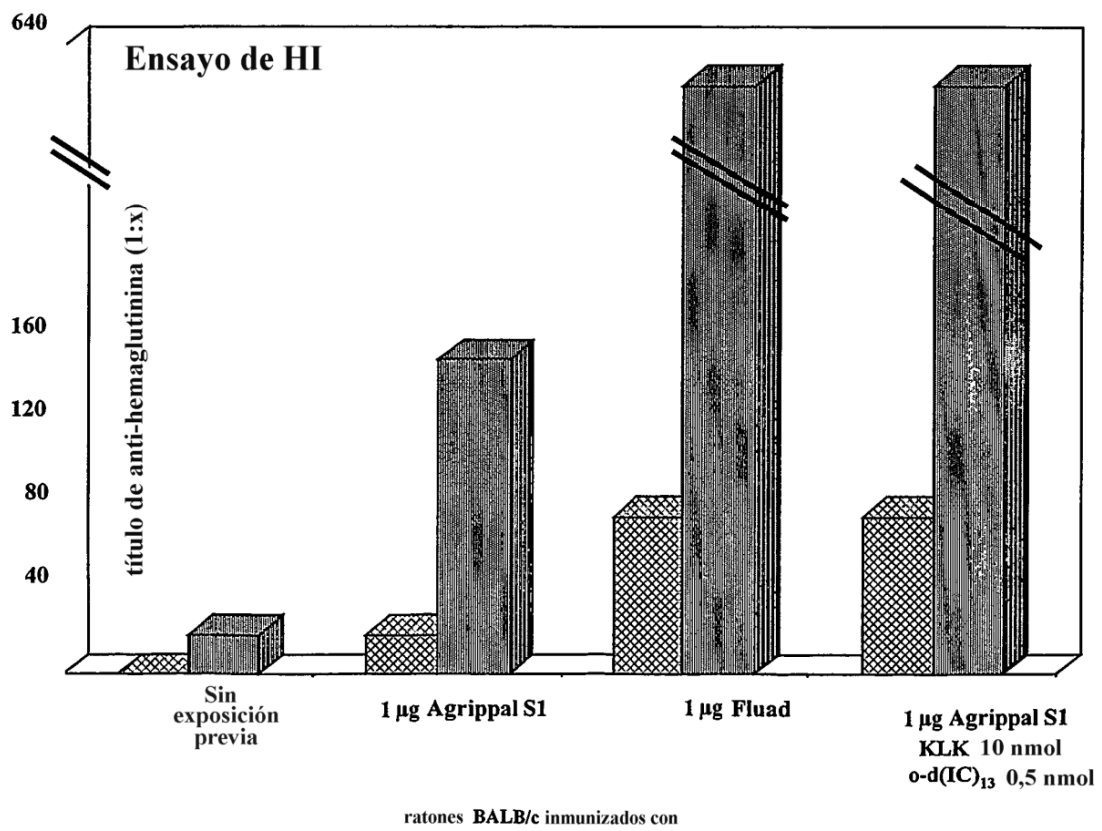


Fig. 5a:

Ratones C57BL/6 vacunados con péptido + KLK/o-d(IC)13

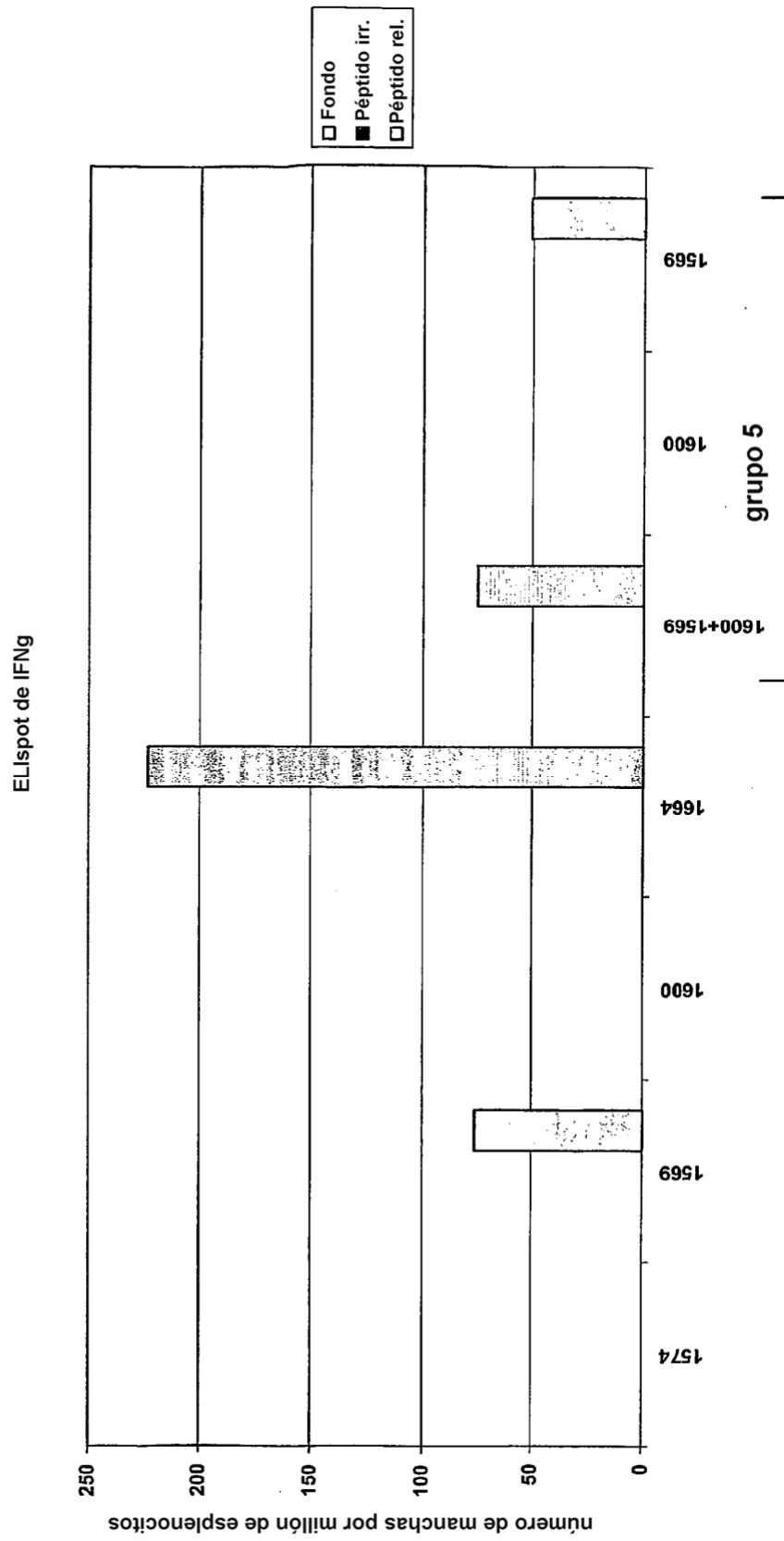


Fig. 5b:

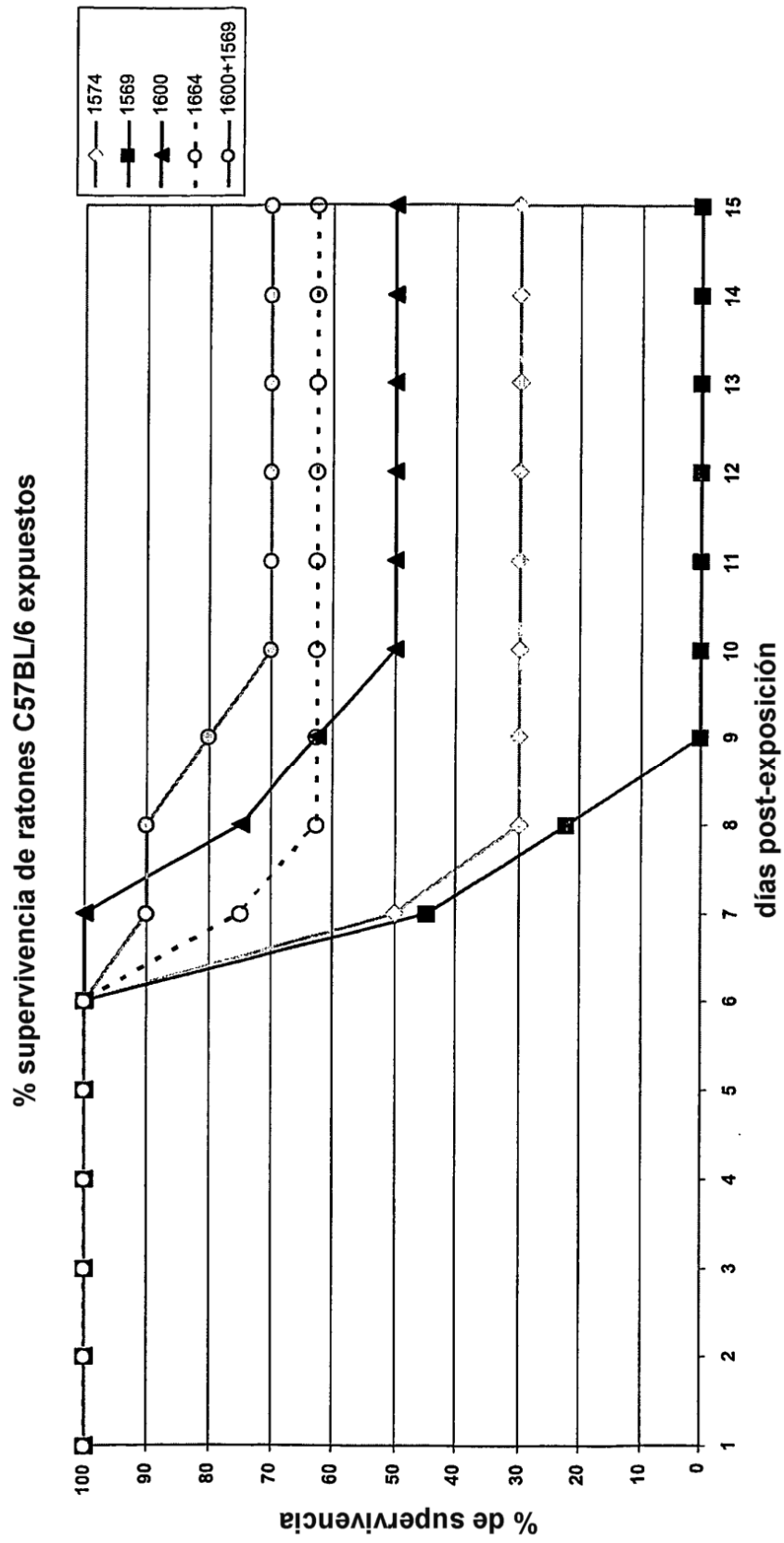
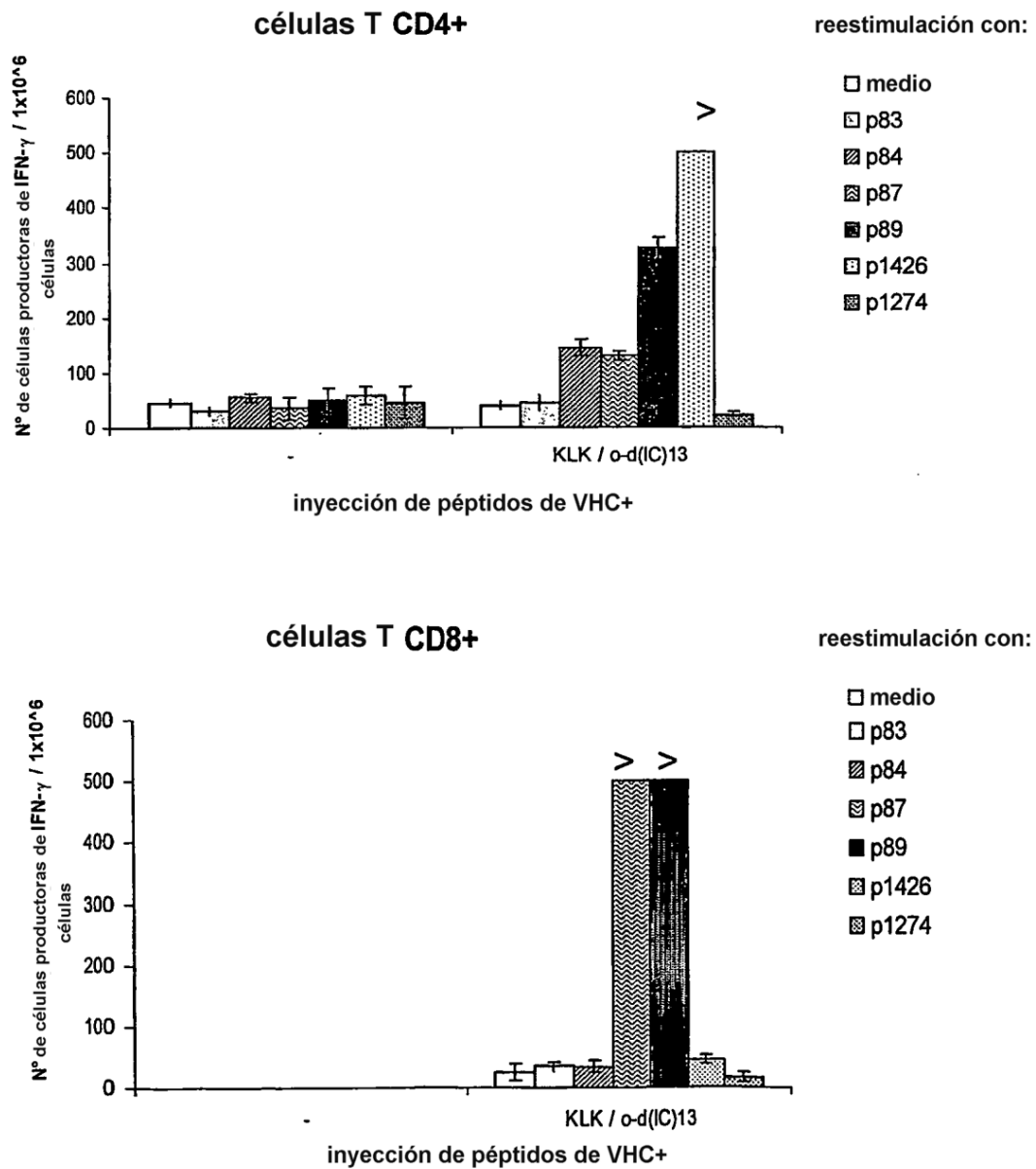
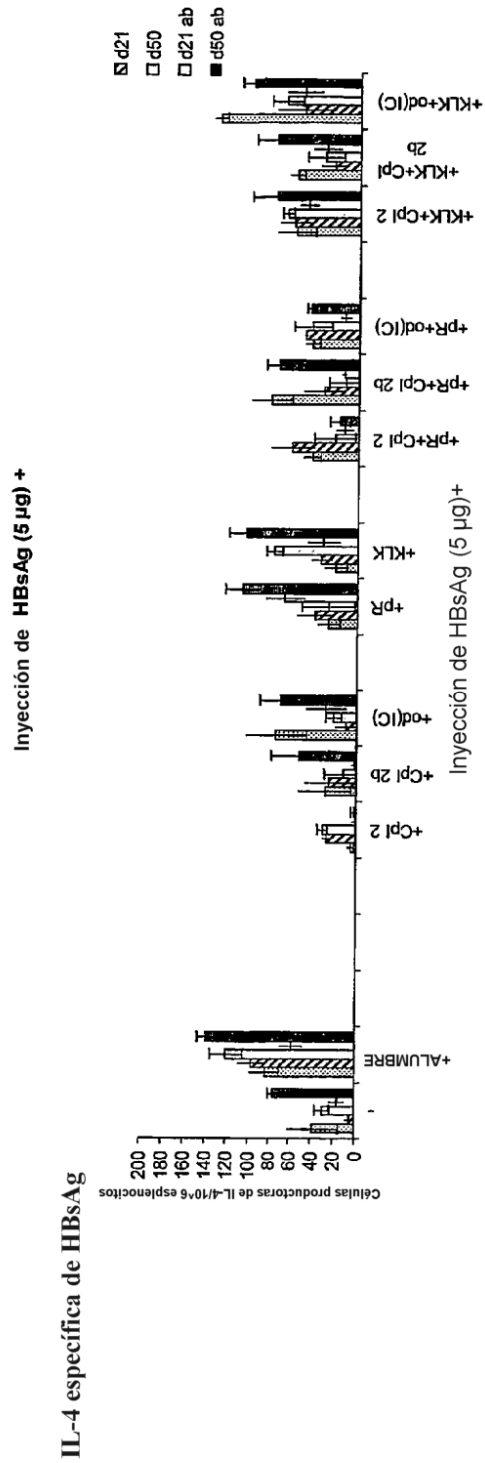
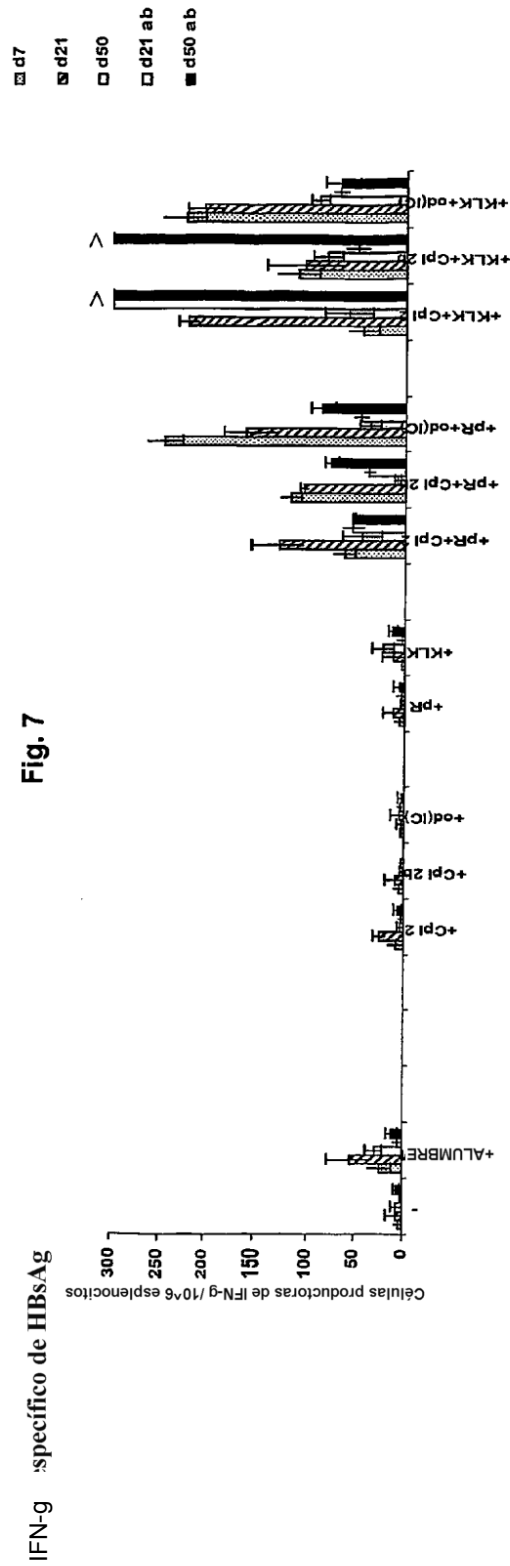


Fig. 6:





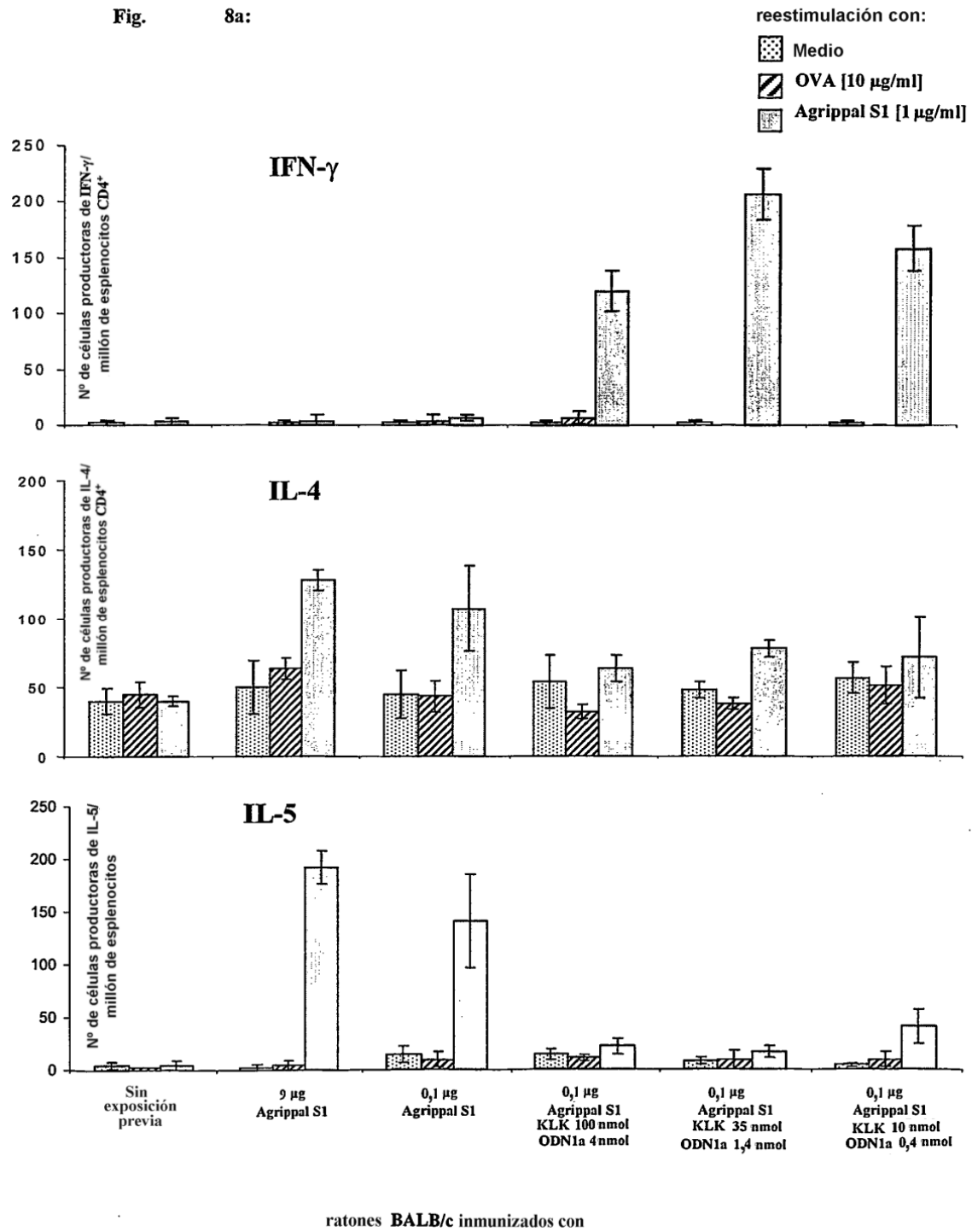
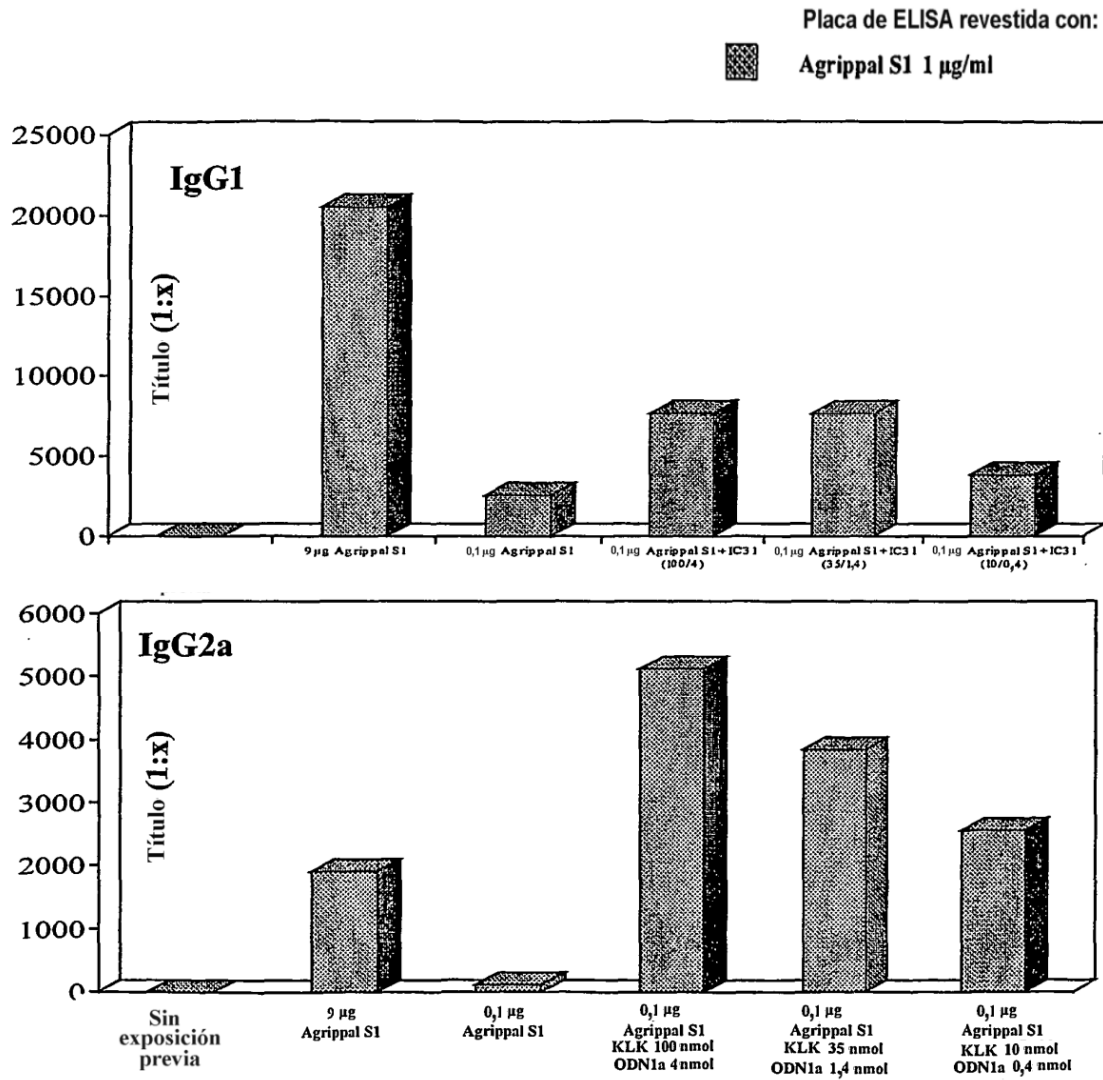


Fig. 8b:



ratones BALB/c inmunizados (i.m.) con

Fig. 9a:

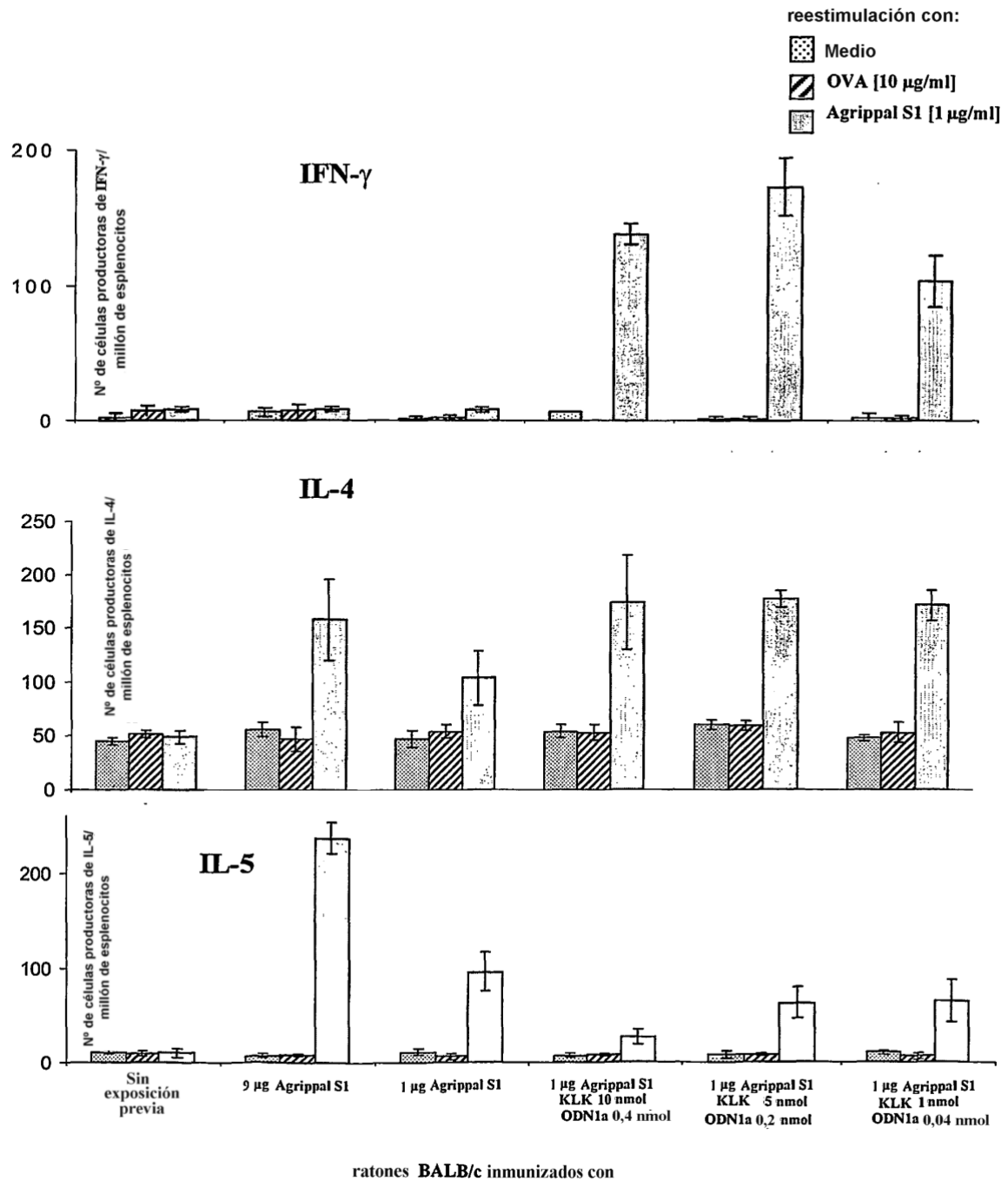


Fig. 9b:

