



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 340 617**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07015414 .1**
96 Fecha de presentación : **03.11.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1913957**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2008**

54 Título: **Vacunas genéticas con adyuvantes.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.06.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.06.2010

73 Titular/es: **Powderject Vaccines, Inc.**
235 East 42nd Street
New York, New York 10017-5755, US

72 Inventor/es: **Haynes, Joel R.;**
Widera, Georg;
Fuller, James T.;
Shiple, Timothy;
Fuller, Deborah y
Wu, Mary

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 340 617 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

Vacunas genéticas con adyuvantes.

5 **Divulgación****Campo técnico**

10 La invención se refiere al campo general de biología molecular e inmunología, y se refiere, en general, a reactivos útiles en técnicas de inmunización con ácidos nucleicos. Más particularmente, la invención se refiere a composiciones de vacunas y procedimientos de uso de dichas composiciones para inducir una respuesta inmune potenciada contra un antígeno seleccionado.

Antecedentes de la invención

15 Las técnicas para la inyección de ADN y ARNm en tejido de mamíferos para fines de inmunización contra un producto de expresión ya se han descrito anteriormente. Véase, por ejemplo, la memoria descriptiva de patente europea EP 0 500 799 y la patente de Estados Unidos N° 5.589.466. Las técnicas, denominadas “inmunización con ácido nucleico” en este documento, han demostrado provocar respuestas inmunes tanto humorales como mediadas por células. Por ejemplo, los sueros de ratones inmunizados con una construcción de ADN que codifica la glicoproteína de la envuelta, gp160, demostraron reaccionar con gp160 recombinante en inmunoensayos y los linfocitos de los ratones inyectados demostraron proliferar en respuesta a gp120 recombinante. Wang *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4156-4160. Análogamente, los ratones inmunizados con un gen de la hormona del crecimiento humana (hGH) demostraron una respuesta inmune basada en anticuerpos. Tang *et al.* (1992) *Nature* 356: 152-154. La inyección intramuscular de ADN que codifica la nucleoproteína del virus de la gripe impulsada por un promotor de mamífero ha demostrado provocar una respuesta de linfocitos T citolíticos CD8+ (CTL) que puede proteger a los ratones contra una exposición posterior letal al virus. Ulmer *et al.* (1993) *Science* 259: 1745-1749. Los estudios inmunohistoquímicos de los sitios de inyección mostraron que el ADN era captado por los mieloblastos y la producción citoplasmática de la proteína viral pudo demostrarse durante al menos 6 meses.

30 Estas llamadas “vacunas genéticas” han demostrado por lo tanto provocar una respuesta inmune en animales tratados, similar a la que se observa después de la administración de vacunas atenuadas vivas, la forma de vacuna más eficaz usada en la actualidad. La teórica eficacia de las vacunas basadas en ácidos nucleicos parte de la capacidad de las composiciones de vacuna para provocar la producción *de novo* de antígenos de proteína plegados correctamente, lo que puede dar como resultado la producción de respuestas de anticuerpo que reconocen a los epítopos tridimensionales complejos. Además, la producción *in vivo* de estos antígenos en células de presentación de antígeno profesionales, da como resultado la presentación de fragmentos peptídicos procesados por moléculas MHC de clase I, dando como resultado la activación y la participación de linfocitos T citolíticos (CTL) específicos de antígeno.

40 Hasta la fecha, la técnica de inmunización con ácido nucleico más eficaz implica el suministro de una composición de vacuna de ADN mediante el suministro intracelular mediado por partículas en la epidermis. Véase por ejemplo, la Patente Europea N° 0 500 799. Esta técnica evita las dificultades del suministro extracelular (por ejemplo, mediante suministro con aguja y jeringa a la piel o al músculo) ya que se cree que la mayor parte de dicho ADN suministrado de forma extracelular se degrada rápidamente, lo que hace necesario inocular una cantidad excesiva de ADN para conseguir un nivel suficiente de expresión del antígeno. El suministro de ADN mediado por partículas a la epidermis, por otro lado, consigue el depósito directo e intracelular de ADN de plásmidos en las células epidérmicas, incluyendo las células de Langerhans epidérmicas. Debido al suministro directo intracelular, el ADN está protegido de las nucleasas extracelulares y es necesario suministrar solamente pequeñas cantidades de ADN. De hecho, la inmunización mediada por partículas con cantidades cercanas al nanogramo de un ADN de plásmido dado puede dar como resultado la producción de respuestas humorales y de CTL muy fuertes, a menudo después de una única inmunización.

55 La malaria está muy extendida y es una enfermedad humana significativa, particularmente en países tropicales. La enfermedad está causada por el mosquito portador de los parásitos *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*. La investigación sobre la vacuna de la malaria aún no ha dado como resultado el desarrollo de un producto de vacuna seguro, práctico, profiláctico y eficaz. Aunque se han producido muchos ejemplos de respuesta inmune significativa en modelos animales y en voluntarios humanos usando diversas vacunas experimentales, la protección real provocada por dicha vacunación en ensayos clínicos humanos ha sido lamentablemente baja. La cada vez mayor comprensión científica del ciclo vital del parásito de la malaria y la identificación de importantes antígenos para diversas etapas de la vida del parásito han permitido el desarrollo de diversas estrategias de vacuna diseñadas para provocar la formación de anticuerpos protectores así como de células efectoras celulares tales como CTL.

65 El ciclo de la enfermedad de la malaria comienza con una picadura del mosquito que inyecta los esporozoitos infecciosos de la malaria en el torrente sanguíneo. Por lo tanto sería razonable que los anticuerpos específicos para el esporozoito fueran un medio eficaz para prevenir o limitar significativamente la infección de los hepatocitos en esta etapa. Sin embargo, después de la infección de los hepatocitos, el parásito se desarrolla de forma intracelular en el hepatocito y puede escapar a los anticuerpos circulantes. En esta etapa, la presentación de antígenos específicos del esporozoito en la superficie del hepatocito infectado antes del merozoito y del merozoito o de la liberación del de

la etapa sanguínea, proporciona una diana atractiva para las CTL específicas de la malaria. Dichas células efectoras podrían eliminar los hepatocitos infectados o provocar la destrucción de los parásitos intracelulares, antes de la primera liberación de merozoitos de la etapa sanguínea maduros.

5 Sumario de la invención

Es un objeto principal de la presente divulgación proporcionar nuevas composiciones para su uso en procedimientos de vacunación con ácido nucleico (genética). Estas composiciones combinan moléculas de ácido nucleico que contienen secuencias que codifican un antígeno de interés y un adyuvante, en las que el adyuvante está presente en la composición en una forma diferente al ADN y pretenden el suministro directo intracelular de la composición, la secuencia que codifica el antígeno y el adyuvante no de ADN. Por consiguiente, las composiciones presentes representan un alejamiento significativo de las composiciones de vacuna de ADN anteriores que pueden combinar secuencias que codifican el antígeno con secuencias que codifican el adyuvante. Además, el suministro determinado del adyuvante no de ADN en una célula diana es contrario a la intuición, puesto que se sabe que los adyuvantes funcionan en base extracelular, por ejemplo formando un depósito extracelular y es cuando estos restos están presentes en el entorno extracelular que las células inmunocompetentes pueden encontrarse e interactuar con el adyuvante para producir un efecto adyuvante deseado. El componente adyuvante de estas nuevas partículas recubiertas puede proporcionarse en varias formas diferentes tales como, aunque sin limitación, en forma de una proteína, un lípido, una hormona no proteica o un análogo de la misma, una vitamina o un análogo de la misma, un derivado de proteína purificado a partir de un cultivo bacteriano (por ejemplo, *Bacillus calmette* guerin), un material esquelético de la pared celular de micobacterias, una saponina o un derivado de la misma, o similares.

Por consiguiente, la invención proporciona una composición que contiene (a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un antígeno de interés; y (b) un adyuvante que es eficaz para potenciar al menos un componente de una respuesta inmune provocada contra el antígeno cuando está expresado en las células de un individuo vacunado, en el que el adyuvante está presente en dicha composición en una forma diferente a ADN y en el que el ácido nucleico y el adyuvante recubren partículas vehículo de núcleo separadas, por ejemplo partículas vehículo balística de oro o de tungsteno. En realizaciones particulares, la molécula de ácido nucleico se proporciona en el contexto de una construcción de vector, preferiblemente un plásmido. El antígeno seleccionado se puede obtener o extraer de cualquier agente contra el que se desee provocar una respuesta inmune y puede ser por lo tanto un agente de enfermedad infecciosa o parasitaria, un antígeno específico de tumor o un "auto" antígeno, un alérgeno o similares. En realizaciones particulares, el antígeno es un antígeno viral, tal como un antígeno de un virus de la hepatitis B (HBV), un virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o un virus de la gripe. En otras realizaciones, el antígeno es de un parásito, tal como un parásito de la malaria. El adyuvante seleccionado puede ser cualquier composición adyuvante adecuada. En realizaciones particulares, el adyuvante es al menos parcialmente soluble en etanol. Los adyuvantes preferidos incluyen monofosforil lípido A (MPL), y saponinas tales como Quil-A. Otros adyuvantes preferidos son los llamados adyuvantes de cambio inmune como se describen en este documento. Todas estas composiciones pueden usarse en la fabricación de un medicamento para su uso en técnicas de inmunización con ácido nucleico.

La divulgación también proporciona procedimientos de usos de las composiciones descritas anteriormente para provocar una respuesta inmune contra un antígeno seleccionado en un individuo vacunado. Los procedimientos suponen suministrar las composiciones directamente a las células que están presentes en un sitio diana en el individuo en una cantidad suficiente para producir la respuesta inmune deseada. En realizaciones particulares, la composición primero recubre una partícula vehículo núcleo (por ejemplo, una partícula balística de oro o de tungsteno) y se administra usando una técnica de suministro transdérmico, tal como una técnica de suministro mediado por partículas. Un tejido diana preferido es por lo tanto el tejido epidérmico.

También es un objeto principal de la presente divulgación proporcionar nuevas composiciones para su uso en procedimientos de vacunación con ácido nucleico (genética), composiciones que se forman a partir de la combinación de una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia que codifica un antígeno de interés y un adyuvante de cambio inmune que es eficaz para potenciar el componente Th1 de una respuesta inmune provocada contra el antígeno en un individuo vacunado. En este caso de nuevo, el adyuvante de cambio inmune está presente en la composición en una forma distinta a ADN, y la composición está destinada al suministro directo intracelular. En realizaciones particulares, el antígeno puede ser de un agente de enfermedad infecciosa o parasitaria y/o el adyuvante de cambio inmune puede ser monofosforil lípido A. La composición puede recubrir una partícula vehículo núcleo para proporcionar una preparación farmacéutica.

Es todavía un objeto adicional de la presente divulgación proporcionar un procedimiento para provocar una respuesta inmune contra un antígeno seleccionado en un individuo (por ejemplo, vacunación contra un agente de enfermedad infecciosa) que incluye las etapas de suministrar a las células del individuo una construcción genética que causa la expresión en las células del individuo de un antígeno a niveles suficientes para producir una respuesta inmune específica del antígeno; y coadministrar al individuo en las proximidades del punto de suministro de la construcción genética, una cantidad eficaz de un adyuvante de cambio inmune suficiente para causar un cambio en el equilibrio de las repuestas inmunes de tipo Th1 y Th2 provocadas en el individuo vacunado a partir de la respuesta que se obtendría sin el adyuvante de cambio inmune. La presente invención facilita de este modo el uso de vacunas genéticas a través del uso de adyuvantes de cambio inmune que alteran o redirigen la respuesta inmunológica de un individuo a una vacuna genética.

Por consiguiente, la divulgación proporciona un procedimiento para generar una respuesta inmune, que comprende: (a) suministrar una composición de vacuna genética en células presentes en un sitio diana en un sujeto, en el que la composición de vacuna comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno; y (b) coadministrar un adyuvante, en el que la composición de adyuvante se puede administrar al mismo o diferente sitio de la composición de vacuna. La composición de adyuvante también se puede suministrar antes de, posterior a o al mismo tiempo que la composición de vacuna. Las composiciones de vacuna y adyuvante se pueden administrar en una sola composición o en forma de composiciones separadas. En una realización particular, la composición de adyuvante está en forma particulada y se suministra usando una técnica de suministro transdérmico, preferiblemente usando un dispositivo de inyección de polvo con jeringa sin aguja. En una realización relacionada, el adyuvante se administra usando una técnica de suministro mediado por partículas. Para ambas realizaciones, el sitio diana preferido es tejido epidérmico. En todavía otra realización, el adyuvante se administra tópicamente al sitio diana.

Es todavía un objeto adicional de la divulgación proporcionar una composición de vacuna genética eficaz para malaria. La composición incluye una construcción genética que codifica la expresión en un individuo de uno o más antígenos de malaria, por ejemplo, un antígeno CS; y una cantidad eficaz de un adyuvante de cambio inmune suficiente para cambiar la naturaleza de la respuesta inmune provocada en un individuo vacunado a partir de una respuesta predominantemente de Th2 hacia una respuesta de Th1.

Es una ventaja de la presente invención que pueda potenciarse la eficacia de las composiciones de vacuna genética. Es otra ventaja que los procedimientos y las composiciones descritas en este documento puedan usarse para modificar o alterar específicamente la naturaleza de una respuesta inmune generada usando una composición de vacuna genética.

Este y otros objetos, realizaciones y ventajas de la invención serán evidentes para los especialistas en la técnica en vista de la divulgación en este documento.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un histograma que representa los resultados del Experimento 1.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a formulaciones de vacuna o parámetros de proceso particulares ya que, por supuesto, estos podrían variar. También debe entenderse que la terminología usada en este documento es solamente para fines de divulgación de realizaciones particulares de la invención y no pretende ser limitante.

Debe observarse que, como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “uno” y “el” incluyen los referentes plurales a menos que el contenido indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “una partícula” incluye dos o más partículas, la referencia a “un antígeno” o “un adyuvante” incluye una mezcla o una combinación de dos o más de dichos agentes, la referencia a “un excipiente” incluye mezclas o combinaciones de dos o más excipientes y similares.

A. Definiciones

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un especialista en la técnica a la que se refiere la invención. Aunque en la práctica de la presente invención pueden usarse varios procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento, en este documento se describen los materiales y procedimientos preferidos.

Para describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos, que pretenden definirse como se indica a continuación.

Como se usa en este documento, el término “suministro transdérmico” incluye el suministro intradérmico (por ejemplo, en la dermis o epidermis) y transdérmico (por ejemplo, “percutáneo”) es decir, el suministro mediante el paso de un agente en o a través de al menos una capa superior de la piel. Véase por ejemplo, el documento *Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives*, Hadgraft and Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989); *Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications*, Robinson and Lee (eds.), Marcel Dekker Inc., (1987); y *Transdermal Delivery of Drugs*, Vols. 1-3, Kydonieus and Berner (eds.), CRC Press, (1987).

Un “antígeno” se refiere a cualquier resto o agente inmunogénico, generalmente una macromolécula, que puede provocar una respuesta inmune en un individuo. El término puede usarse para referirse a una macromolécula individual o a una población homogénea o heterogénea de macromoléculas antigénicas. Como se usa en este documento, el término “antígeno” incluye alérgenos. Por lo tanto, el término “antígeno” abarca ampliamente restos que incluyen proteínas, polipéptidos, fragmentos de proteína antigénicos, oligosacáridos, polisacáridos, productos o composiciones químicas orgánicas o inorgánicas y similares. Además, el antígeno puede extraerse u obtenerse de cualquier virus, bacteria, parásito, protozoo u hongo y puede ser un organismo completo. El término también incluye antígenos tumorales o los llamados “auto” antígenos, que están implicados en la enfermedad autoinmune. Análogamente, un oligonucleótido o polinucleótido que expresa un antígeno, tal como en aplicaciones de inmunización con ácido nucleico, también se

incluye en la definición. También se incluyen los antígenos sintéticos, por ejemplo, poliepítopos, epítopos flanqueantes, y otros antígenos obtenidos de forma recombinante o sintética (Bergmann *et al.* (1993) *Eur. J. Immunol.* 23: 2777-2781; Bergmann *et al.* (1996) *J. Immunol.* 157: 3242-3249; Suhrbier, A. (1997) *Immunol. And Cell Biol.* 75: 402-408; Gardner *et al.* (1998) 12th World AIDS Conference, Ginebra, Suiza, 28 de junio-3 de julio de 1998).

5 Los términos “molécula de ácido nucleico” y “polinucleótido” se usan de forma intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótido de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen un gen, un fragmento de un gen, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN transferente, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores.

15 Un “gen”, como se usa en el contexto de la presente invención, es una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico (cromosoma, plásmido, etc.) con el que se asocia una función genética. Un gen es una unidad hereditaria, por ejemplo de un organismo, que comprende una secuencia de polinucleótidos (por ejemplo, una secuencia de ADN para mamíferos) que ocupa una ubicación física específica (un “locus del gen” o “locus genético”) dentro del genoma de un organismo. Un gen puede codificar un producto expresado, tal como un polipéptido o un polinucleótido (por ejemplo, ARNt). Como alternativa, un gen puede definir una ubicación genómica para un suceso/función particular, tal como la unión de proteínas y/o ácidos nucleicos (por ejemplo, sitios de unión al fago), en el que el gen no codifica un producto expresado. Típicamente, un gen incluye secuencias codificantes, tales como secuencias que codifican polipéptidos y secuencias no codificantes, tales como secuencias promotoras, secuencias de poli-adenilación, secuencias reguladoras de la transcripción (por ejemplo, secuencias potenciadoras). Muchos genes eucariotas tienen “exones” (secuencias codificantes) interrumpidos por “intrones” (secuencias no codificantes). En algunos casos, un gen puede compartir secuencias con otro(s) gen(es) (por ejemplo, genes solapantes).

25 Una “secuencia codificante” o una secuencia que “codifica” un polipéptido seleccionado, es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) a un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de las secuencias reguladoras apropiadas (o “elementos de control”). La expresión abarca a un gen. Los límites de la secuencia codificante se determinan mediante un codón de inicio en el extremo 5’ (amino) y el codón de terminación de la traducción en el extremo 3’ (carboxilo). Una secuencia codificante puede incluir, aunque sin limitación, ADNc de ARNm eucariota, procariota o viral, secuencias de ADN genómicas de ADN procariota o viral o incluso secuencias de ADN sintéticas. Una secuencia de terminación de la transcripción puede situarse en posición 3’ con respecto a la secuencia codificante. La transcripción y la traducción de secuencias codificantes están reguladas típicamente mediante “elementos de control” incluyendo, aunque sin limitación, promotores de la transcripción, elementos potenciadores de la transcripción, señales de terminación de la transcripción, secuencias de poliadenilación (situadas en posición 3’ con respecto al codón de terminación de la traducción), secuencias para la optimización del inicio de la traducción (situadas en posición 5’ con respecto a la secuencia codificante) y secuencias de terminación de la traducción.

40 Un “vector” es cualquier resto que es capaz de transferir moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, polinucleótidos o secuencias génicas) a células diana (por ejemplo, vectores virales, vectores no virales, vehículos particulados y liposomas). Típicamente, “construcción de vector”, “vector de expresión” y “vector de transferencia de genes”, significan cualquier construcción de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen de interés y que puede transferir secuencias génicas a células diana. Por lo tanto, la expresión incluye vehículos de clonación y de expresión, así como vectores virales.

50 “Unido de forma operativa” se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes descritos están configurados de modo que realicen su función habitual. Por lo tanto, un promotor dado que se une de forma operativa a una región codificante (por ejemplo, una secuencia que codifica un antígeno de interés) es capaz de provocar la expresión de la secuencia codificante cuando las proteínas reguladoras y las enzimas apropiadas están presentes. En algunos casos, algunos elementos de control no necesitan ser contiguos a la secuencia codificante, mientras funcionan dirigiendo la expresión de la misma. Por ejemplo, pueden estar presentes secuencias ya transcritas aunque no traducidas intermedias entre la secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora puede seguir considerándose “unida de forma operativa” a la secuencia codificante.

55 “Recombinante” como se usa en este documento para describir una molécula de ácido nucleico, significa un polinucleótido de ADNc genómico, de origen semisintético o sintético que, gracias a su origen o a la manipulación: (1) no se asocia con toda o una parte de polinucleótido con el que se asocia de forma natural; y/o (2) está unido a un polinucleótido diferente al que está unido en la naturaleza. El término “recombinante” como se usa respecto a una proteína o polipéptido, significa un polipéptido producido mediante la expresión de un polinucleótido recombinante.

65 Las técnicas para determinar la “identidad de secuencia” de un ácido nucleico y de un aminoácido se conocen en la técnica. Típicamente, dichas técnicas incluyen determinar la secuencia de nucleótidos del ARNm para un gen y/o determinar la secuencia de aminoácidos codificada en su interior y comparar estas secuencias con una segunda secuencia de nucleótidos o aminoácidos. En general, “identidad” se refiere a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, respectivamente. Pueden compararse dos o más secuencias (polinucleótido o aminoácido) determinando su “identidad porcentual”. La identidad porcentual de dos secuencias, ya sean secuencias de ácido nucleico o de aminoácido, es la cantidad de coincidencias

exactas entre dos secuencias alineadas dividido por la longitud de la secuencia más corta y multiplicado por 100. Un alineamiento aproximado para las secuencias de ácidos nucleicos se proporciona mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489. Este algoritmo puede aplicarse a secuencias de aminoácidos usando la matriz de valoración desarrollada por Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M.O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. USA, y normalizada por Gribskov (1986) *Nucl. Acids Res.* 14(6): 6745-6763. Una implementación ejemplar de este algoritmo para determinar la identidad porcentual de una secuencia se proporciona por el grupo Genetics Computer Group (Madison, WI) en la aplicación de utilidad "BestFit". Los parámetros por defecto para este procedimiento se describen en el Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Versión 8 (1995) (disponible del Genetics Computer Group, Madison, WI). Un procedimiento preferido para establecer la identidad porcentual en el contexto de la presente invención es usar el paquete de programas MPSRCH registrado por la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). Para este tipo de paquetes informáticos puede emplearse el algoritmo de Smith-Waterman usando parámetros por defecto para la tabla de valoración (por ejemplo, penalización de apertura de hueco de 12, penalización de extensión de hueco de uno, y un hueco de seis). A partir de los datos generados, el valor de "Coincidencia" refleja la "identidad de secuencia". Otros programas adecuados para calcular la identidad o similitud porcentuales entre secuencias se conocen generalmente en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineamiento es BLAST, usado con los parámetros por defecto. Por ejemplo, pueden usarse BLASTN y BLASTP usando los siguiente parámetros por defecto: código genético = convencional; filtro = ninguno; cadena = ambas; límite = 60; valor esperado = 10; matriz = BLOSUM62; descripciones = 50 secuencias; clasificada mediante = VALOR MÁS ALTO; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR. Los detalles acerca de estos programas pueden encontrarse en la siguiente dirección de Internet: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

Como alternativa, la homología puede determinarse mediante hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguida de digestión con nucleasa(s) específica(s) de cadena sencilla y la determinación del tamaño de los fragmentos dirigidos. Dos secuencias de ADN, o de polipéptidos son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando las secuencias muestran al menos aproximadamente el 80%-85%, preferiblemente al menos el 90% y más preferiblemente al menos el 95%-98% de identidad de secuencia en una longitud definida de las moléculas, según lo determinado usando los procedimientos anteriores. Como se usa en este documento, sustancialmente homólogas también se refiere a secuencias que muestran identidad completa con la secuencia de ADN o de polipéptido especificadas. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas pueden identificarse en un experimento de hibridación de Southern en, por ejemplo, condiciones rigurosas, como se define para este sistema en particular. Por ejemplo, las condiciones de hibridación rigurosas pueden incluir formamida al 50%, 5 volúmenes de solución de Denhardt, 5 volúmenes de SSC, SDS al 0,1% y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y las condiciones de lavado pueden incluir 2 volúmenes de SSC, SDS al 0,1% a 37°C seguido de un volumen de SSC y SDS al 0,1% a 68°C. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas está dentro del alcance de la técnica. Véase por ejemplo el documento Sambrook *et al.*, *supra*; *DNA Cloning*, *supra*; *Nucleic Acid Hybridization*, *supra*.

El término "composición de vacuna" se refiere a cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno (particularmente, como se usa en este documento, el término se refiere a una composición que contiene una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que codifica un antígeno), composición que puede usarse para prevenir o tratar una enfermedad o afección en un sujeto. Las composiciones de vacuna también pueden contener uno o más adyuvantes. Típicamente, una composición de vacuna se usa para la profilaxis de una enfermedad causada por un patógeno, sin embargo, las composiciones de vacuna de la presente invención también pueden usarse en un contexto terapéutico.

Una "respuesta inmunológica" o "respuesta inmune" contra un agente, un antígeno o una composición de interés seleccionada es el desarrollo en un individuo de una respuesta inmune humoral y/o celular a moléculas (por ejemplo, un antígeno) presentes en el agente o composición de interés. Para los fines de esta invención, una "respuesta inmune humoral" se refiere a una respuesta inmune mediada por moléculas de anticuerpo, mientras que una "respuesta inmune celular" es una respuesta mediada por linfocitos T y otros glóbulos blancos sanguíneos.

Se entiende que las respuestas inmunes de mamífero implican una cascada inmune después de una de dos amplias categorías de respuesta, caracterizada por la clase de célula T ayudante que inicia la cascada. Por lo tanto, una respuesta inmune a un antígeno específico puede caracterizarse como una respuesta de tipo ayudante T 1 (Th1) o de tipo ayudante T 2 (Th2), dependiendo del tipo de citocinas que se liberen de los linfocitos T específicos del antígeno, después de la presentación del antígeno. Las respuestas inmunes de Th1 se caracterizan generalmente por la liberación de citocinas inflamatorias, tales como IL-2, interferón-gamma (IFN-γ), y factor alfa de necrosis tumoral (TNF-α) a partir de las células T ayudantes estimuladas con el antígeno. Las respuestas Th1 también se asocian con una fuerte inmunidad celular (por ejemplo CTL) y la producción de subclases de anticuerpos anti-IgG que poseen actividad opsonizadora y de fijación al complemento, tales como IgG2a en el modelo de ratón usado habitualmente. Por otro lado, las respuestas inmunes de Th2 se caracterizan por la liberación de citocinas no inflamatorias, tales como IL-4 e IL-10, después de la estimulación de células T ayudantes específicas del antígeno. Las respuestas Th2 no favorecen generalmente la máxima actividad de CTL, sino que se asocian con fuertes respuestas de anticuerpos, representando subclases de IgG tales como IgG1 en el ratón, clases de anticuerpos que carecen de actividad opsonizadora y de fijación al complemento. En general, los niveles de anticuerpo asociados con las respuestas Th2 se consideran más fuertes que los asociados con las respuestas Th1.

El término “adyuvante” significa cualquier material o composición capaz de alterar, promover, dirigir, redirigir, potenciar o iniciar de forma específica o no específica una respuesta inmune específica de antígeno. Por lo tanto, la coadministración de un adyuvante y un antígeno (por ejemplo, en forma de composición de vacuna) puede dar como resultado una dosis menor o una menor cantidad de dosis de antígeno necesarias para conseguir una respuesta inmune deseada en el sujeto al que se le administra el antígeno. En algunas realizaciones de la invención, la coadministración de un adyuvante con un ácido nucleico que codifica un antígeno puede redirigir la respuesta inmune contra el antígeno, por ejemplo, donde la respuesta inmune se redirige de una respuesta inmune de tipo Th2 a una de tipo Th1, o viceversa. La eficacia de un adyuvante puede determinarse administrando el adyuvante con una composición de vacuna y controles de composición de vacuna a animales y comparando los títulos de anticuerpo y/o la inmunidad mediada por células contra los dos usando ensayos convencionales tales como radioinmunoensayos, ELISA, ensayos CTL y similares, bien conocidos en la técnica. Típicamente, en una composición de vacuna, el adyuvante es un resto diferente del antígeno, aunque una única molécula puede tener propiedades adyuvantes y antigénicas (por ejemplo, la toxina del cólera). Para los fines de la presente invención, se usa un adyuvante para potenciar la respuesta inmune a un antígeno específico, por ejemplo cuando un adyuvante se coadministra con la composición de vacuna, la respuesta inmune resultante es mayor que la respuesta inmune provocada por una cantidad equivalente de la composición de vacuna administrada sin el adyuvante, o el adyuvante se usa para redirigir la naturaleza de la respuesta inmune. Además, para los fines de la presente invención, una “cantidad eficaz” de un adyuvante será la cantidad que potencia una respuesta inmunológica a un antígeno coadministrado en una composición de vacuna de modo que se necesiten dosis menores o menos dosis para generar una respuesta inmune eficaz, o una “cantidad eficaz” de un adyuvante será la cantidad suficiente para producir un cambio o redirección de la respuesta inmune en relación con la respuesta inmune al antígeno en solitario. Una “composición adyuvante” se refiere a cualquier composición farmacéutica que contiene un adyuvante.

Un “adyuvante de cambio inmune” es un adyuvante que es eficaz para alterar o dirigir (redirigir) la naturaleza de una respuesta inmune contra un antígeno seleccionado, que recibe el antígeno y el adyuvante de cambio inmune. La alteración o redirección está en relación con la naturaleza de la respuesta inmune que se dirige contra el antígeno en ausencia del adyuvante de cambio inmune. Por lo tanto, dichos adyuvantes se usan en este documento para cambiar la naturaleza de una respuesta inmune provocada contra un antígeno seleccionado (un antígeno codificado por una secuencia de ácido nucleico presente en una composición de vacuna genética) para favorecer una respuesta de tipo Th1 en lugar de una respuesta de tipo Th2 o para favorecer una respuesta de tipo Th2 en lugar de una respuesta de tipo Th1. Pueden usarse varios adyuvantes conocidos en este documento como adyuvantes de cambio inmune incluyendo, aunque sin limitación el adyuvante monofosforil lípido A (MPL). La capacidad de un adyuvante para servir como adyuvante de cambio inmune puede determinarse ensayando la naturaleza de las respuestas inmunes generadas por la administración de la composición de vacuna en solitario y la administración de la composición de vacuna con el adyuvante. Estos ensayos pueden implicar una caracterización o identificación de los tipos de citocinas que se liberan a partir de linfocitos T específicos de antígeno después de la presentación del antígeno en un individuo y/o de la caracterización o identificación de las subclases de IgG predominantes que provoca la combinación antígeno/adyuvante en relación con el antígeno en solitario. Toda esta caracterización o identificaciones están dentro del alcance del especialista en la técnica de acuerdo con la presente memoria descriptiva.

Como se usa en este documento, el término “coadministrado” tal como cuando un adyuvante se “coadministra” con un ácido nucleico que codifica un antígeno (por ejemplo, una composición de vacuna) abarca la administración simultánea o concurrente del adyuvante y el antígeno, por ejemplo, cuando los dos están presentes en la misma composición o se administran en composiciones diferentes casi al mismo tiempo pero en sitios diferentes, así como el suministro de adyuvante y antígeno en composiciones diferentes en momentos diferentes. Por ejemplo, la composición adyuvante puede suministrarse antes de o posteriormente al suministro del antígeno en el mismo sitio o en un sitio diferente. La temporización entre los suministros de adyuvante y de antígeno puede variar entre una separación de aproximadamente varios minutos y una separación de varias horas o incluso una separación de varios días.

Como se usa en este documento, el término “tratamiento” incluye cualquiera de los siguientes: la prevención de infección o reinfección; la reducción o eliminación de los síntomas; y la reducción o la completa eliminación de un patógeno. El tratamiento puede realizarse de forma profiláctica (antes de la infección).

Los términos “individuo” y “sujeto” se usan de forma intercambiable en este documento para referirse a cualquier miembro del subfilo cordados, incluyendo, aunque sin limitación, seres humanos y otros primates (incluyendo primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de mono), animales de granja tales como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; animales domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y cobayas; aves (incluyendo aves domésticas, salvajes y de caza, tales como gallinas, pavos y otras gallináceas, patos, gansos); peces y similares. Los términos no delimitan una edad en particular. Por lo tanto, pretende abarcarse individuos adultos y recién nacidos. Los procedimientos descritos en este documento se refieren al uso en cualquiera de las especies de vertebrado anteriores, puesto que los sistemas inmunes de todos estos vertebrados funcionan de forma similar.

B. Procedimientos generales

Una premisa básica de la presente invención es el descubrimiento de que puede incorporarse un adyuvante no ADN en una composición de vacuna basada en ácido nucleico (por ejemplo, una composición de vacuna genética o de ADN) y puede usarse para alterar, potenciar, dirigir o redirigir la naturaleza de la respuesta inmune a un antígeno en un individuo tratado. Las composiciones, que contienen una combinación de una molécula de ácido nucleico que incluye

una secuencia que codifica un antígeno de interés y un adyuvante que está en una forma distinta a ADN, se administran directamente a las células presentes en el tejido diana de un individuo a tratar. Se prefiere, pero no es necesario, que la composición recubra a unas partículas vehículo núcleo, lo que facilita enormemente el suministro directo intracelular de las nuevas composiciones. El componente adyuvante de la composición es eficaz para potenciar al menos un aspecto de una respuesta inmune provocada contra el antígeno acompañante. En algunos aspectos de la invención, el adyuvante se selecciona para cambiar o redirigir la naturaleza de la respuesta inmune específica del antígeno en relación con la respuesta inmune específica del antígeno que se genera en ausencia del adyuvante coadministrado. En otros aspectos de la invención, el adyuvante se selecciona para potenciar el componente de ayudante T 1 (Th1) de la respuesta inmune específica del antígeno.

En un aspecto particular de la invención, se ha descubierto que la adición de un adyuvante de cambio de la respuesta inmune apropiado a una vacuna de ADN tiene el efecto de estimular y cambiar la respuesta inmune específica de antígeno provocada por la vacuna para favorecer una respuesta Th1 en lugar de una respuesta Th2. Un adyuvante particular que se ha descubierto que tiene este efecto es el monofosforil lípido A (MPL), aunque se han identificado otros adyuvantes que tienen efectos similares. Dicho cambio de respuesta inmune en una vacuna de ADN aumenta la eficacia de vacunas de ADN para diversas enfermedades infecciosas, tales como la malaria.

Antígenos

Las moléculas de ácido nucleico para el componente de vacuna genética de las presentes composiciones no necesitan técnicas de preparación muy elaboradas. La etapa de preparación más crítica es, evidentemente, la selección de una secuencia apropiada que codifica un antígeno de interés. El antígeno se selecciona de tal modo que la respuesta inmune, cuando se provoca, proporcionará algún nivel de efecto terapéutico al individuo vacunado, por ejemplo algún nivel de protección eficaz contra un agente de la enfermedad. En aquellas realizaciones en las que se pretende que la respuesta inmune a partir de una vacuna de ADN pueda modificarse para potenciar el carácter Th1 de respuesta inmune, el antígeno codificado por el ADN en la vacuna se seleccionará teniendo en cuenta este efecto.

Por lo tanto, en general, el antígeno se seleccionará teniendo en cuenta un procedimiento de suministro, el tejido diana y el adyuvante acompañante particulares. Por ejemplo, la inmunización mediada por partículas de ratones con vectores que codifican el antígeno de la nucleoproteína del virus de la gripe (NP), antígeno carcinoembrionario humano (CEA), o antígeno CS de *P. falciparum* dan como resultado predeciblemente la inducción de respuesta a anticuerpos indicativas de una respuesta Th2. Por otro lado, la inmunización de ratones con vectores que codifican proteínas de VIH da como resultado inicialmente respuestas de tipo Th1 que pueden convertirse en respuestas Th2 con inmunizaciones adicionales. Además, la inmunización con vectores que codifican los antígenos de la superficie y del núcleo del virus de la hepatitis B (HBV) dan como resultado una respuesta que puede clasificarse como Th0 debido a la representación por igual de las principales subclases de IgG en la respuesta inmune específica del antígeno. Por lo tanto, para algunas enfermedades infecciosas o parasitarias, es posible que el resultado inmunológico después de la vacunación con ADN sea apropiado para proporcionar una protección óptima, mientras que para otras, es necesaria la modulación o la redirección del resultado inmunológico para conseguir un nivel eficaz de protección que sea superior al observado sin el uso del adyuvante. Por ejemplo, también es posible que para algunas enfermedades infecciosas o parasitarias, las respuestas inmunes, aún siendo de potencia significativa, puedan no ser apropiadas para proporcionar un efecto terapéutico óptimo, por ejemplo protección. En otras palabras, la respuesta inmune puede ser cuantitativamente suficiente, pero cualitativamente insuficiente. Éste puede ser el caso de la malaria, en la que los datos de vacunas anteriores indican que las respuestas Th1 pueden ser importantes, pero donde, cuando se usa un vector de plásmido que codifica CS, se provocan respuestas Th2 mediante vacunación con ADN de la epidermis. Por lo tanto el efecto del tipo de adyuvante previsto en este documento puede no potenciar el nivel cuantitativo de respuesta inmune, sino en su lugar redirigir simplemente la respuesta inmune para potenciar el componente Th1 de esa respuesta.

Por consiguiente, para el componente de ácido nucleico de las presentes composiciones, un sistema promotor adecuado será una secuencia unida de forma operativa que codifica un antígeno de interés. El antígeno de interés estará asociado preferiblemente con un patógeno, tal como un patógeno viral, bacteriano o parasitario o el antígeno puede ser un antígeno específico de tumor, o un auto-antígeno o un alérgeno. El antígeno puede ser una proteína de longitud completa. Como alternativa, el antígeno puede estar constituido esencialmente por un epítipo de células B o un epítipo de células T de un antígeno.

Los antígenos específicos de tumor incluyen, aunque sin limitación, cualquiera de los diversos MAGE (antígeno E asociado a melanoma), incluyendo MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3 (péptido HLA-A1), MAGE 4, etc. cualquiera de las diversas tirosinasas (péptido HLA-A2); ras mutante; p53 mutante; y antígeno de melanoma p97. Otros antígenos específicos de tumor incluyen el péptido Ras y el péptido p53; asociados con cánceres avanzados, los antígenos HPV 16/18 y E6/E7 asociados con cánceres cervicales, el antígeno MUC1-KLH asociado con carcinoma de mama, CEA (antígeno carcinoembrionario) asociado con cáncer colorrectal, antígenos gp100 o MART1 asociados con melanoma y el antígeno PSA asociado con cáncer de próstata. La secuencia del gen *p53* se conoce (véase por ejemplo el documento Harris *et al.* (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 4650-4656) y está depositada en el GenBank con el número de acceso M14694.

Los antígenos virales adecuados incluyen, aunque sin limitación, antígenos obtenidos o extraídos de la familia del virus de la hepatitis, incluyendo virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la hepatitis delta (HDV), virus de la hepatitis E (HEV) y virus de la hepatitis G (HGV). Como ejemplo, se conoce la secuencia del genoma viral del HBV, y también procedimientos para obtener secuencias que codifican

antígenos a partir de ésta. Véase por ejemplo Ganem *et al.* (1987) *Annu. Rev. Biochem.* 56: 651-693; Hollinger, F.B. (1990) *Hepatitis B virus*, vol. II, pág. 2171-2235, en Fields *et al.* (eds.), *Virology* 2ª ed. Raven Press, Nueva York, NY; y Valenzuela *et al.*, (1980) *The nucleotide Sequence of the Hepatitis B viral Genome and the Identification of the Major Viral Genes*, pág. 57-70; en Fields *et al.* (eds.), *Animal Virus Genetics*, Academic Press, Nueva York, NY). El genoma de HBV codifica varias proteínas virales, incluyendo los polipéptidos antigénicos de superficie grande, mediano y principal, el polipéptido del gen X, y el polipéptido del núcleo. Véase por ejemplo, Yokosuka *et al.* (1986) *N. Engl. J. Med.* 315: 1187-1192; Imazeki *et al.* (1987) *Hepatology* 7: 753-757; Kaneko *et al.* (1988); *J. Virol.* 62: 3979-3984; y Ou *et al.* (1990) *J. Virol.* 64: 4578-4581. De igual modo, se conoce la secuencia genómica viral de HCV, al igual que procedimientos para obtener la secuencia. Véase por ejemplo, las Publicaciones Internacionales N° WO 89/04669; WO 90/11089; y WO 90/14436. El genoma de HCV codifica varias proteínas virales, incluyendo E1 y E2. Véase por ejemplo, el documento Houghton *et al.* (1991) *Hepatology* 143: 381-388. Las secuencias que codifican estas proteínas de HBV y HCV, así como los fragmentos antigénicos de las mismas, se usarán en los presentes procedimientos. Análogamente, se conoce la secuencia codificante del antígeno δ de HDV (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.378.814).

De igual modo, en la presente invención pueden usarse secuencias que codifican una amplia variedad de antígenos proteicos de la familia del herpesvirus incluyendo antígeno extraídos u obtenidos de virus herpes simplex (HSV) tipos 1 y 2, tales como las glicoproteínas de HSV-1 y HSV-2 gB, gD y gH; antígenos del virus varicela zoster (VZV), virus Epstein-Barr (EBV) y citomegalovirus (CMV) incluyendo gB y gH de CMV; y antígenos de otros herpesvirus humanos tales como HHV6 y HHV7. (Véase por ejemplo Chee *et al.* (1990) *Cytomegaloviruses* (J.K. McDougall, ed., Springer-Verlag, pág. 125-169; McGeoch *et al.* (1988) *J. Gen. Virol.* 69: 1531-1574; Patente de Estados Unidos N° 5.171.568; Baer *et al.* (1984) *Nature* 310: 207-211; y Davison *et al.* (1986) *J. Gen. Virol.* 67: 1759-1816).

Los antígenos de VIH, tales como las secuencias gp120 de múltiples aislados de VIH-1 y VIH-2 incluyendo miembros de los diversos subtipos genéticos de VIH, se conocen y se presentan (véase por ejemplo, Myers *et al.*, Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico (1992); y Modrow *et al.* (1987) *J. Virol.* 61: 570-578) y los antígenos obtenidos de cualquiera de estos aislados podrán usarse en los presentes procedimientos. Además, la invención también es aplicable a otros restos inmunogénicos obtenidos de cualquiera de los diversos aislados de VIH, incluyendo cualquiera de las diversas proteínas de la envuelta tales como gp160 y gp41, antígenos gag tales como p24gag y p55gag, así como proteínas obtenidas de las regiones *pol*, *env*, *tat*, *vif*, *rev*, *nef*, *vpr*, *vpu* y LTR del VIH.

Las secuencias que codifican antígenos extraídos u obtenidos de otros virus también podrán usarse en los procedimientos reivindicados, tales como, pero sin limitación, secuencias de miembros de las familias Picornaviridae (por ejemplo poliovirus, etc); Caliciviridae; Togaviridae (por ejemplo, virus de la rubéola, virus del dengue, etc); Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae; Birnaviridae; Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la rabia, etc.); Filoviridae; Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, etc.); Bunyaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (por ejemplo, HTLV-I; HTLV-II; VIH-1 (también conocido como HTLV-III, LAV, ARV; hTLR, etc.)), incluyendo aunque sin limitación antígenos de los aislados VIH_{IIIb}, VIH_{SF2}, VIH_{LAV}, VIH_{LA1}, VIH_{MN}; VIH-1_{CM235}, VIH-1_{US4}; VIH-2 entre otros. Véase por ejemplo, el documento *Virology*, 3ª Edición (W. K. Joklik ed. 1988); *Fundamental Virology*, 2ª Edición (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds. 1991), para una divulgación de estos y de otros virus.

Las secuencias que codifican antígenos bacterianos y parasitarios adecuados se obtienen o se extraen de agentes causantes conocidos responsables de enfermedades tales como Difteria, Tos ferina, Tétanos, Tuberculosis, Neumonía Bacteriana o Fúngica, Cólera, Fiebres Tifoideas, Peste, Shigelosis o Salmonelosis, Enfermedad del Legionario, Enfermedad de Lyme, Lepra, Malaria, Anquilostomosis, Oncocerciasis, Esquistosomiasis, Tripanosomiasis, Lesmaniasis, Giardiasis, Amebiasis, Filariasis, Boreliasis y Triquinosis. Otros antígenos pueden obtenerse o extraerse de virus no convencionales o agentes similares a virus, tales como los agentes causantes de Kuru, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), escurpie, encefalopatía transmisible del visón y enfermedades de desgaste crónico o partículas infecciosas proteicas, tales como priones, que se asocian con la enfermedad de las vacas locas.

Las secuencias que codifican alérgenos adecuados que pueden usarse en la presente invención incluyen, aunque sin limitación, alérgenos de polen, polvillo procedente de animales, gramíneas, mohos, polvo, antibióticos, venenos de picadura de insecto y diversos alérgenos ambientales, farmacológicos y alimentarios. Los alérgenos de árboles comunes incluyen polen de álamo, árbol de la tulipas, fresno, abedul, arce, roble, olmo, nogal y pecana; los alérgenos de plantas comunes incluyen los de centeno, ambrosía, musa inglesa, acedera, y verdolaga; los alérgenos vegetales de contacto incluye los de zumaque venenoso, hiedra venosa y ortigas; los alérgenos comunes de gramíneas incluyen alérgenos de Timothy, Jonson, Bermuda, festuca y grama azul; también pueden obtenerse alérgenos comunes de mohos u hongos tales como *Alternaria*, *Fusarium*, *Hormodendrum*, *Aspergillus*, *Micropolyspora*, *Mucor* y actinomicetos termófilos; la penicilina y tetraciclina son alérgenos de antibióticos comunes; los alérgenos epidérmicos pueden obtenerse de polvos domésticos y orgánicos (típicamente de origen fúngico), de insectos tales como ácaros domésticos (dermatophagoides pterossinosis), o de fuentes animales tales como plumas y polvillo procedente de perros y gatos; los alérgenos alimentarios comunes incluyen leche y queso (lácteos), huevos, trigos, nueces (por ejemplo, cacahuets), alimentos marinos (por ejemplo, marisco), alérgenos de guisantes, judías y gluten; los alérgenos farmacológicos comunes incluyen alérgenos de anestesia local y de salicilatos; y los alérgenos de antibióticos incluyen alérgenos de penicilina y sulfonamida, y los alérgenos de insectos comunes incluyen veneno de abeja, de avispa y de hormigas, y alérgenos de cucaracha. Los alérgenos particularmente bien caracterizados incluyen, aunque sin limitación, los epítomos principales y crípticos

del alérgeno Der p I (Hoyne *et al.* (1994) *Immunology* 83 190-195), la fosfolipasa A2 del veneno de abeja (PLA) (Akdis *et al.* (1996) *J. Clin. Invest.* 98: 1676-1683), el alérgeno del polen de abedul Bet v I (Bauer *et al.*, (1997) *Clin. Exp. Immunol.* 107: 536-541), y el alérgeno de gramíneas recombinante multiepitópico rKBG8.3 (Cao *et al.* (1997) *Immunology* 90: 46-51). Estos y otros alérgenos adecuados están disponibles en el mercado y/o pueden prepararse fácilmente de acuerdo con técnicas conocidas.

La secuencia codificante del antígeno de interés puede obtenerse y/o prepararse usando procedimientos conocidos. Por ejemplo, pueden obtenerse preparaciones de antígeno sustancialmente puro usando herramientas de biología molecular convencionales. Esto es, las secuencias de polinucleótidos que codifican los antígenos descritos anteriormente pueden obtenerse usando procedimientos recombinantes, tales como la exploración de bibliotecas de ADNc y genómicas de células que expresan el gen, o extrayendo el gen de un vector que se sabe que incluye el mismo. Además, la secuencia deseada puede aislarse directamente de células y tejidos que la contienen, usando técnicas convencionales, tales como extracción con fenol y PCR de ADNc o de ADN genómico. Véase por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra* para una divulgación de técnicas usadas para obtener un ADN aislado. Las secuencias de polinucleótidos también pueden producir de forma sintética, en lugar de clonarse.

Todavía otro procedimiento conveniente para aislar moléculas de ácido nucleico específicas es mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mullis *et al.* (1987) *Methods Enzymol* 155: 335-350. Esta técnica usa ADN polimerasa, normalmente una ADN polimerasa termoestable, para replicar una región de ADN deseada. La región de ADN a replicar se identifica mediante oligonucleótidos de secuencia especificada complementaria a los extremos opuestos y a las cadenas opuestas del ADN deseado para iniciar la reacción de replicación. El producto de la primera ronda de replicación es, en sí mismo, una plantilla para las posteriores replications, por lo tanto los ciclos sucesivos de replicación dan como resultado la amplificación geométrica del fragmento de ADN delimitado por el par de cebadores usados.

Una vez que se ha obtenido la secuencia codificante de interés particular, ésta puede unirse de forma operativa a elementos de control adecuados para proporcionar una molécula de ácido nucleico expresable usando técnicas de clonación o de biología molecular convencionales. Véase por ejemplo, los documentos Edge (1981) *Nature* 292: 756; Nambair *et al.* (1984) *Science* 223: 1299; y Jay *et al.* (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 6311. La molécula de ácido nucleico puede usarse *per se* o simplemente se puede insertar en un vector adecuado tal como una construcción de vector de expresión viral o de plásmidos.

Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención comprenden típicamente una secuencia promotora homóloga o heteróloga y otras secuencias de control adecuadas. Estas otras secuencias de control pueden comprender una secuencia de terminación y/o de inicio de la traducción (por ejemplo GCCACCATGG o GCCCCCATGG) y/o un codón de terminación de la traducción (por ejemplo TAA, TAG o TGA) y/o una señal de poliadenilación y/o un sitio de pausa en el ARN. Además, pueden estar presentes secuencias potenciadoras nativas o heterólogas para la secuencia promotora. Una vez construidas, las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse usando protocolos de suministro de genes convencionales. Los procedimientos para el suministro de genes se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466. Los genes pueden suministrarse directamente a un sujeto o, como alternativa, suministrarse *ex vivo*, a células obtenidas del sujeto y las células pueden reimplantarse en el sujeto.

Adyuvantes

El segundo componente de las nuevas composiciones de la presente invención es el componente adyuvante que puede comprender cualquier adyuvante o combinación de adyuvantes adecuados. Por ejemplo, los adyuvantes adecuados incluyen, sin limitación, adyuvantes formados a partir de sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; formulaciones de emulsión de aceite en agua y de agua en aceite, tales como adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); geles minerales; copolímeros de bloque; lípido-amina Avridine™; SEAM62; adyuvantes formados a partir de componentes de la pared celular bacteriana tales como adyuvantes que incluyen lipopolisacáridos (por ejemplo, lípido A o monofosforil lípido A (MPL), Imoto *et al.* (1985) *Tet. Lett.* 26: 1545-1548), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS); proteína de choque térmico o derivados de la misma; adyuvantes obtenidos de toxinas bacterianas que ribosilán ADP, incluyendo la toxina de difteria (DT), la toxina de tos ferina (PT), la toxina del cólera (CT), las toxinas lábiles al calor de *E. coli* (LT1 y LT2); la endotoxina A de *Pseudomonas*, la exotoxina S de *Pseudomonas*, la exoenzima de *B. cereus*, la toxina de *B. sphaericus*, las toxinas C2 y C3 de *C. botulinum*, la exoenzima de *C. limosum*, así como las toxinas de *C. perfringens*, *C. spiriformis* y *C. difficile*, EDIN de *Staphylococcus aureus* y mutantes de toxinas bacterianas que ribosilán ADP tales como CRM197, un mutante no tóxico de la toxina de difteria (véase por ejemplo, Bixler *et al.* (1989) *Adv. Exp. Med. Biol.* 251: 175; y Constantino *et al.* (1992) *Vaccine*); adyuvantes de saponina tales como Quil A (Patente de Estados Unidos N° 5.057.540) o partículas generadas a partir de saponinas tales como ISCOM (complejos inmunoestimuladores); quimiocinas y citocinas tales como interleucinas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo interferón gamma), factor estimulador de colonia de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), defensinas 1 ó 2, RANTES, MIP1- α y MIP-2, etc.; péptidos de muramilo tales como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina (MTP-PE) etc.; adyuvantes obtenidos de la familia de moléculas de CpG, dinucleótidos y oligonucleótidos de GpC que comprenden motivos CpG (véase por ejemplo los documentos Krieg *et al.*, *Nature*

ES 2 340 617 T3

(1995) 374: 546, Medzhitov *et al.*, (1997) *Curr. Opin. Immunol.* 9: 4-9; y Davis *et al. J. Immunol.* (1998) 160: 870-876) tales como TCCATGACGTTCCCTGATGCT y exoenzima GACTCTCGAGCGTTCTC de *C. limosum* ATC; y adyuvantes sintéticos tales como PCPP (poli[di(carboxilatofenoxi)fosfaceno] (Payne *et al.*, *Vaccines* (1998) 16: 92-98). Dichos adyuvantes están disponibles en el mercado de diversos distribuidores tales como Accurate Chemicals; 5 Ribi Immunechemicals, Halmilton, MT; GIBCO; Sigma, St. Louis, MO.

Los adyuvantes preferidos para su uso en las composiciones presentes son los que son al menos parcialmente solubles en etanol. Una clase de adyuvantes particularmente preferidos para su uso en este documento son los clasificados como "saponinas" esto es, adyuvantes que se originan a partir de plantas productoras de saponina de los 10 géneros *Quillaja*, *Saponaria* o *Gypsophilia*. Las saponinas son productos vegetales glicosídicos naturales, constituidos por una estructura en anillo (la aglicona) a la que se unen una o más cadenas de azúcares. La aglicona puede ser asteroidea, triterpenoidea o esteroidelalcaloidea y la cantidad de azúcares unidos a los enlaces glicosílicos pueden variar enormemente. Las saponinas más comunes usadas como adyuvantes farmacéuticos son los glicósidos de triterpeno extraídos del árbol sudamericano *Quillaja saponaria* y que se denominan Quill A (véase por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.688.772; 5.057.540; y 4.432.969; y Publicación Internacional N° WO 88/09336, publicada el 1 de diciembre de 1988), cuyo componente activo se denomina QS-21. Otro adyuvante preferido es un análogo de muramil dipéptido denominado "GMTP-N-DPG" (N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-Lalanil-dipalmitoilpropilamida). Véase Fast *et al.* (1997) *Vaccine* 15: 1748-1752.

Se prefieren varios adyuvantes para su uso como adyuvante de cambio inmune en la presente invención. El atributo crítico de dicho adyuvante es que tiende a redirigir la respuesta inmune provocada en una dirección deseada particular en relación con el uso del ADN que codifica el antígeno en sí mismo. Esto es particularmente deseable si el adyuvante tiene el atributo de dirigir o cambiar la respuesta inmune hacia Th1 en oposición a respuestas Th2. Puesto que todas las respuestas inmunes a un antígeno son complejas, y muchas si no todas las respuestas inmunes implican elementos de respuesta Th1 y Th2, no es práctico buscar una redirección total de la respuesta. En su lugar, lo que se pretende es un cambio relativo del tipo de respuesta inmune, por ejemplo usando un adyuvante para potenciar una respuesta de tipo Th1. Por ejemplo, si se ha descubierto que un antígeno particular produce predominantemente una respuesta Th2, y un resultado deseado es una respuesta Th1, un cambio en la dirección de Th1 mostrará una mayor eficacia clínica para la vacuna. Un adyuvante de cambio inmune como se describe en este documento, puede o no provocar un aumento en la respuesta inmune cuantitativa total en el individuo, que es el resultado que se busca habitualmente con la incorporación de adyuvantes a la vacunas. En su lugar, el adyuvante de cambio inmune pretende cambiar o redirigir la naturaleza o calidad de la respuesta inmune en lugar de su magnitud o cantidad.

Un ejemplo de un adyuvante de cambio inmune que favorece la respuesta Th1 es monofosforil lípido A o MPL disponible de Ribi Immunochemical Research Inc. Un ejemplo de un adyuvante de cambio inmune que favorece la respuesta Th2 es 1,25-dihidroxi vitamina D₃. Otros adyuvantes de cambio inmune posibles incluyen PPD, un derivado de proteína purificada de *Bacillus calmette* guerin (BCG), dimicolato de trehalosa y material del esqueleto de la pared celular de micobacterias.

El adyuvante puede estar presente en las composiciones presentes individualmente o en una combinación de dos o más adyuvantes. A este respecto, los adyuvantes combinados pueden tener un efecto de adición o sinérgico para promover o cambiar una respuesta inmune. Un efecto sinérgico es uno en el que el resultado que se consigue combinando dos o más adyuvantes es mayor que el que se esperaría simplemente sumando el resultado conseguido por cada adyuvante cuando se administran de forma individual.

Desafortunadamente, se sabe que la mayor parte de los adyuvantes mencionados anteriormente son altamente tóxicos, y se consideran generalmente demasiados tóxicos para uso en el ser humano. Por esta razón el único adyuvante aprobado actualmente para su uso en el ser humano es alumbre, una composición de sal de aluminio. Sin embargo, varios de los adyuvantes anteriores se usan habitualmente en animales y son por lo tanto adecuados para numerosos sujetos pretendidos y varios se están sometiendo a estudios preclínicos y clínicos para su uso en el ser humano. Sin embargo, se ha descubierto que los adyuvantes que se consideran generalmente demasiado tóxicos para su uso en el ser humano pueden administrarse con una técnica de inyección de polvo (tal como la técnica de suministro mediada por partículas preferida que se usa en este documento) sin problemas de toxicidad concomitante. Sin vincularse a ninguna teoría en particular, parece que el suministro de pequeñas cantidades de adyuvantes a la piel permite la interacción con las células de Langerhans en la capa epidérmica y con células dendríticas en la capa cutánea de la piel. Estas células son importantes en el inicio y el mantenimiento de una respuesta inmune. Por lo tanto, puede obtenerse un efecto adyuvante potenciado dirigiendo el suministro en o cerca de estas células. Además, el suministro transdérmico de adyuvantes puede evitar los problemas de toxicidad debido a que (1) las capas superiores de la piel están poco vascularizadas, y por lo tanto la cantidad de adyuvante que entra en el sistema circulatorio es reducida, lo que reduce el efecto tóxico; (2) las células de la piel se están desprendiendo constantemente, por lo tanto el adyuvante residual se elimina en lugar de absorberse, y (3) puede administrarse sustancialmente menos adyuvante para producir un efecto adyuvante adecuado (en comparación con el adyuvante que se suministra usando técnicas convencionales tales como inyección intramuscular).

Una vez seleccionados, se pueden disponer uno o más adyuvantes en una forma farmacéutica adecuada para suministro parenteral, cuyas formas de preparación están dentro de la práctica general de la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Company, Easton, Penn., edición 18ª. De forma alternativa, el adyuvante se puede obtener en forma particulada como se describe a continuación en detalle. El(los)

ES 2 340 617 T3

adyuvante(s) estarán presentes en la forma farmacéutica en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado, esto es, para potenciar la respuesta de la mucosa contra el antígeno coadministrado de interés y/o para dirigir una respuesta inmune de la mucosa contra el antígeno de interés. Generalmente, de aproximadamente 0,1 μg a 1000 μg de adyuvante, más preferiblemente de aproximadamente 1 μg a 500 μg de adyuvante y más preferiblemente de aproximadamente 5 μg a 300 μg de adyuvante, serán eficaces para potenciar una respuesta inmune para un antígeno dado. Por lo tanto, por ejemplo, para Quil A, se usarán dosis en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 50 g, preferiblemente de aproximadamente 1 a 25 μg , y más preferiblemente de aproximadamente 5 a 20 μg , con los presentes procedimientos. Para MPL, se usará una dosis en el intervalo de aproximadamente 1 a 250 g, preferiblemente de aproximadamente 20 a 150 μg y más preferiblemente de aproximadamente 40 a 75 μg , con los presentes procedimientos.

Las dosis para otros adyuvantes pueden determinarse fácilmente por un especialista en la técnica usando procedimientos rutinarios. La cantidad que se administrará dependerá de diversos factores incluyendo el antígeno coadministrado, así como la capacidad del adyuvante para actuar como estimulador de una respuesta inmune o para actuar como adyuvante de cambio inmune.

Preparación de las composiciones

Una vez obtenida, la molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno de interés y el adyuvante seleccionado se pueden formular juntos en forma de una sola preparación farmacéutica. Las sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulgentes, sustancias tamponadoras de pH, y similares, pueden estar presentes en el vehículo o excipiente. Estos excipientes, vehículos y sustancias auxiliares son por lo general agentes farmacéuticos que no inducen por sí mismos una respuesta inmune en el individuo que recibe la composición, y que se pueden administrar sin excesiva toxicidad. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, líquidos tales como agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico, glicerol y etanol. Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden incluir en los mismos, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. También se contempla, aunque no es necesario, que la composición pueda contener un vehículo farmacéuticamente aceptable que sirve como estabilizante, en particular para ácidos nucleicos y/o péptidos, proteínas u otros adyuvantes similares. Los ejemplos de vehículos adecuados que también actúan como estabilizantes para ácidos nucleicos y péptidos incluyen, sin limitación, clases farmacéuticas de dextrosa, sucrosa, lactosa, trehalosa, manitol, sorbitol, inositol, dextrano, y similares. Otros vehículos adecuados incluyen, otra vez sin limitación, almidón, celulosa, fosfatos de sodio o de calcio, ácido cítrico, ácido tartárico, glucina, polietilenglicoles de alto peso molecular (PEG), y combinaciones de los mismos. En REMINTONG'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co. N.J. 1991) está disponible una discusión rigurosa de excipientes, vehículos, estabilizantes y otras sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables.

Ya que las composiciones de vacuna de la presente invención están pensadas para suministrarse directamente a las células presentes en un sitio diana, el suministro mediado por partículas es el procedimiento preferido para administrar las composiciones en la práctica de la invención. Por consiguiente, las moléculas de ácido nucleico y/o adyuvantes recubren a las distintas partículas vehículo núcleo que son adecuadas para el suministro intracelular, por ejemplo, de oro o de tungsteno. Los procedimientos mediados por partículas para suministrar dichas preparaciones de vacuna se conocen en la técnica. Más particularmente, una vez preparadas y purificadas adecuadamente, las moléculas de ácido nucleico que codifican antígenos y/o adyuvantes pueden recubrir a las partículas vehículo núcleo (por ejemplo, vehículos núcleo balísticos) usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Las partículas vehículo se seleccionan entre materiales que tienen una densidad adecuada en el intervalo de tamaños de partícula típicamente usados para el suministro intracelular mediante un dispositivo de pistola génica. El tamaño de partícula vehículo óptimo dependerá, por supuesto, del diámetro de las células diana.

El suministro usando técnicas mediadas por partículas se emplea por diversas razones. Una razón muy importante es que esta técnica de suministro génico en mamíferos ha demostrado tener el mismo nivel de eficacia en todos los sistemas de mamífero ensayados hasta ahora. El significado de este hecho es que los datos de modelos animales pueden transferirse y aplicarse más directamente al tratamiento de seres humanos de forma más directa que con otras técnicas, tales como el suministro intramuscular de genes que ha demostrado tener una eficacia drásticamente diferente en roedores. Los dispositivos de suministro mediado por partículas, generalmente aceleran el material genético en el animal a través del uso de una fuerza propulsora ajustable, una descarga eléctrica o una descarga de gas comprimido, haciendo posible de este modo seleccionar fácilmente los tejidos diana a los que se suministrarán las composiciones de vacuna de ácido nucleico.

De acuerdo con las técnicas de suministro mediado por partículas establecidas, el material genético que se suministrará puede prepararse en solución acuosa y después precipitarse sobre pequeñas partículas vehículo núcleo biológicamente inertes. Puede usarse cualquier partícula vehículo adecuada, por ejemplo, partículas formadas a partir de polímeros o metales, (por ejemplo, tungsteno, oro, platino e iridio); sin embargo, se prefieren partículas vehículo de tungsteno y de oro. Las partículas de tungsteno están fácilmente disponibles en un tamaño medio de 0,5 μm a 2,0 μm de diámetro. Aunque dichas partículas tienen una densidad óptima para su uso en procedimientos de suministro mediado por partículas, y permiten un recubrimiento muy eficaz con ADN, el tungsteno puede ser potencialmente tóxico para algunos tipos celulares. Las partículas de oro o el oro microcristalino (por ejemplo, polvo de oro A1570, disponible de Engelhard Corp., East Newark, NJ) se usarán también con los presentes procedimientos. Las partículas de oro proporcionan una uniformidad de tamaño (disponibles en Alpha Chemicals en tamaños de partícula de 1-3 μm , o disponibles en Degussa, South Plainfield, NJ en un intervalo de tamaños de partícula que incluye 0,95 μm) y toxi-

ES 2 340 617 T3

cidad reducida. El oro microcristalino proporciona una diversa distribución de tamaño de partícula, típicamente en el intervalo de 0,5-5 μm . Sin embargo, el área de superficie irregular del oro microcristalino posibilita un recubrimiento altamente eficaz con ácidos nucleicos, antígenos y adyuvantes. En esta invención pueden usarse partículas de oro que tienen un tamaño nominal de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 10 μm .

5 Se conocen y se han descrito una serie de procedimientos para recubrir con o precipitar ADN o ARN sobre partículas de oro o tungsteno. Dichos procedimientos combinan generalmente una cantidad predeterminada de oro y tungsteno con ADN de plásmido, CaCl_2 y espermidina. La solución resultante se agita en vórtice de forma continua durante el procedimiento de recubrimiento para asegurar la uniformidad de la mezcla de reacción. Después de la precipitación del ácido nucleico, las partículas recubiertas pueden transferirse a membranas adecuadas y pueden dejarse secar antes de su uso, recubrir superficies de un módulo, cartucho o casete de muestra o introducirse en una casete de suministro para su uso en dispositivos de suministro mediado por partículas (por ejemplo, instrumentos de pistolas génicas).

15 Los adyuvantes peptídicos pueden unirse en el mismo lote o en un lote diferente de partículas vehículo núcleo mezclando simplemente los dos componentes en una proporción determinada de forma empírica, mediante precipitación con sulfato de amonio u otros procedimientos de precipitación en disolvente conocidos por los especialistas en la técnica, o mediante acoplamiento químico del péptido con la partícula vehículo. El acoplamiento de restos de L-cisteína a oro se ha descrito anteriormente (Brown *et al.* (1980) *Chemical Society Reviews* 9: 271-311). Otros procedimientos incluyen, por ejemplo, disolver el péptido en etanol absoluto, agua, o en una mezcla de alcohol/agua, añadiendo la solución a una cantidad de partículas vehículo y secando la mezcla en un chorro de aire o gas de nitrógeno mientras se agita en vórtice. Como alternativa, los péptidos pueden secarse sobre partículas vehículo mediante centrifugado al vacío. Una vez secas, las partículas recubiertas pueden resuspenderse en un disolvente adecuado (por ejemplo, acetato de etilo o acetona) y triturarse (por ejemplo, mediante sonicación) para proporcionar una suspensión sustancialmente uniforme.

25 En una realización, la invención supone el uso de un adyuvante MPL en una composición de vacuna genética, siendo el MPL una molécula lipídica compleja. Aunque algunos compuestos pueden mezclarse simplemente en la preparación acuosa de ácido nucleico (por ejemplo ADN) antes de recubrir con ellas las partículas vehículo, y aunque esto puede funcionar en el caso de MPL, el MPL u otros compuestos solubles en etanol simplemente pueden añadirse a la solución de etanol que se usa típicamente para suspender las partículas de oro recubiertas de ADN. Aunque el etanol se evapora finalmente de las partículas de oro recubiertas con ADN, permanece la suficiente cantidad de adyuvante (por ejemplo MPL que no es volátil) después de la evaporación. Pueden usarse las mismas técnicas generales con otras clases de materiales biológicos en el proceso de suministro génico mediado por partículas, tales como adyuvantes formados a partir de hormonas no proteicas, vitaminas, o análogos de las mismas.

30 Las técnicas de suministro mediado por partículas permiten dirigir a las composiciones de vacuna a cualquier tipo o categoría de tejido diana en el cuerpo. Sin embargo, es más conveniente suministrar partículas vehículo que tienen ADN a la epidermis. De forma adecuada, la epidermis ha demostrado ser una ubicación especialmente deseable para el suministro de vacunas de ADN. Se ha demostrado también que puede provocarse una respuesta inmune cuantitativamente superior a una vacuna genética en la epidermis en comparación con otros tejidos diana posibles. La potente respuesta inmune provocada con suministro de genes a la epidermis puede deberse a células inmunes, tales como células de Langerhans u otras células que presentan antígenos, que regularmente penetran en la capa epidérmica de la piel en busca de dianas antigénicas.

45 Por consiguiente, después de su formación, las partículas vehículo recubiertas con preparaciones de antígeno y/o adyuvante se suministran en el sitio diana de la piel usando una técnica de suministro mediado por partículas. En la técnica se conocen diversos dispositivos de aceleración de partículas adecuados para el suministro mediado por partículas y todos son adecuados para su uso en la práctica de la invención. Los diseños de dispositivos actuales emplean una descarga explosiva, eléctrica o gaseosa para propulsar las partículas vehículo recubiertas hacia las células diana. Las propias partículas vehículo recubiertas pueden estar unidas de forma reversible a una lámina vehículo móvil, o unirse de forma reversible a una superficie junto a la que pasa un chorro de gas, desprendiendo las partículas de la superficie y acelerándolas en dirección a la diana. Un ejemplo de un dispositivo de descarga gaseosa se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.204.253. Un dispositivo de tipo explosivo se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.945.050. Un ejemplo de un aparato de aceleración de partículas tipo descarga de helio es el instrumento PowderJect® XR (PowderJect Vaccines, Inc., Madison), instrumento que se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.120.657. Un aparato de descarga eléctrica adecuado para su uso en esta invención se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.149.655.

60 Las dosificaciones únicas de las partículas vehículo recubiertas pueden proporcionarse en un recipiente adecuado, por ejemplo, proporcionarse en un cartucho que comprende un tramo de tubería que contiene una dosis de las partículas que recubren la superficie interna del mismo. Los procedimientos para preparar dichos recipientes se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 5.733.600 y 5.780.100 de propiedad común, cuyas descripciones se incorporan mediante referencia en la presente memoria descriptiva.

65 Las composiciones de partículas o partículas recubiertas se administran al individuo de forma compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que será eficaz para los fines de la invención. La cantidad de la composición que se suministrará (por ejemplo, de aproximadamente 0,01 μg a 10 mg, más preferiblemente de 1 a 50

ES 2 340 617 T3

μg de la secuencia del antígeno, depende del individuo a ensayar y del(los) antígeno(s) o alérgeno(s) particulares que se administran. La cantidad exacta necesaria variará dependiendo de la edad y del estado general del individuo a tratar, y una cantidad eficaz apropiada puede determinarse fácilmente por un especialista en la técnica después de la lectura de la presente memoria descriptiva.

5

Programas de Administración y Dosificación

Las composiciones de vacuna (que contienen la secuencia que codifica el antígeno y/o el adyuvante) se administran al sujeto de forma compatible con la formulación de dosificación y en cantidades eficaces para producir una respuesta inmune de la mucosa deseada. La cantidad del antígeno que se suministra en cada administración está generalmente, en el caso de moléculas de ácido nucleico que codifican el antígeno, en el intervalo de entre aproximadamente 0,001 μg y 10 mg, y preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 5000 μg de molécula de ácido nucleico por dosis (generalmente en el intervalo de entre 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de molécula de ácido nucleico por dosis). La cantidad exacta dependerá, por supuesto, del sujeto y de la afección que se va a tratar o prevenir. Más particularmente, la cantidad exacta necesaria variará dependiendo de la edad y del estado general del individuo y del(los) antígeno(s) y adyuvante(s) particulares seleccionados, así como de otros factores. Una cantidad eficaz apropiada puede determinarse fácilmente por un especialista en la técnica después de la lectura de la presente memoria descriptiva y/o puede determinarse a través de ensayos rutinarios.

El tratamiento de la dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis. Para composiciones de vacuna, un programa de múltiples dosis es uno en el que un ciclo primario de vacunación puede estar constituido por 1-10 dosis diferentes, seguido de otras dosis administradas a intervalos de tiempo posteriores, seleccionados para mantener y/o reforzar la respuesta inmune, por ejemplo, a los 1-4 meses una segunda dosis, y si fuera necesario, dosis posteriores después de varios meses. La pauta de dosificación también se determinará, al menos en parte, por la necesidad del sujeto y dependerá del juicio del médico. Además, si se desea la prevención de la enfermedad, las composiciones se administran generalmente antes de la infección primaria con el patógeno de interés. Si se desea el tratamiento, por ejemplo, reducción de síntomas o de recurrencia, las composiciones se administran generalmente de forma posterior a la infección primaria.

30 C. Ejemplos

A continuación se presentan ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solamente para fines ilustrativos y no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la presente invención.

35

Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero debe tenerse en cuenta por supuesto algún error y desviación experimentales.

40 Ejemplo 1

Redirección de una Respuesta Inmune a CEA usando una Técnica de Suministro Mediado por Partículas

Para demostrar la influencia del adyuvante MPL sobre la respuesta inmune para una vacuna de ADN desnudo, se realizó el siguiente estudio. El adyuvante y la molécula de ácido nucleico que contenía la secuencia que codifica el antígeno de interés se coadministraron mediante suministro mediado por partículas usando una pistola génica. El antígeno particular usado para este ejemplo era el antígeno carcinoembrionario humano ("CEA"), un antígeno tumoral humano usado ampliamente en experimentos que investigan tratamientos terapéuticos del cáncer. Los trabajos anteriores habían demostrado que cuando un gen que codifica CEA se suministraba mediante suministro mediado por partículas a ratones, era dominante una respuesta inmune de tipo Th2, según lo indicado por la predominancia de IgG1 en los títulos de anticuerpos del suero del animal. Sin adyuvante, se detectan anticuerpos específicos de CEA de tipo Th2 (IgG1) a niveles más de veinte veces superiores que los niveles de anticuerpos específicos de CEA de tipo Th1 (IgG2a) en ratones Balb/c. Los trabajos realizados en este documento se usaron para demostrar que la respuesta inmune de tipo Th2 podía redirigirse hacia una respuesta de tipo Th1 a través del uso de un adyuvante de cambio inmune.

55

Para este protocolo, se usó una construcción de plásmido que contenía una región codificante del antígeno CEA bajo el control del promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) con el intrón A de CMV entre el promotor y la región codificante. Para formar la composición, se añadieron 64 μg del plásmido, que se denominó WRG7083, en 120 μl de agua a 32 miligramos de partículas de oro de 0,9 micrómetros en un tubo Eppendorf, es decir, 2 μg de ADN/mg de oro. A continuación, se añadieron 13,5 μl de solución de acetato de amonio y 135 μl de isopropanol y el tubo se agitó en vórtice brevemente. La mezcla se incubó durante 15 minutos a -20°C para precipitar el ADN sobre el oro. Las perlas recubiertas con ADN se sedimentaron mediante un centrifugado de 10 segundos y los sobrenadantes se eliminaron. Los sedimentos de oro/ADN se lavaron cuatro veces agitando en vórtice en 1 ml de etanol, microcentrifugando durante 10 segundos y eliminando los sobrenadantes. Después del lavado final, las partículas vehículo de oro recubiertas con ADN se resuspendieron en 1,14 ml de etanol, de modo que cada 250 μl de la suspensión de etanol contenían 7 mg de partículas vehículo de oro con 2 μg de ADN por mg de oro.

65

ES 2 340 617 T3

Por separado, se preparó una solución de 1 mg/ml de MPL en etanol y se usó como solución madre de MPL. Después se prepararon cada una de las siguientes soluciones:

5 (0 MPL)-250 μ l de suspensión de partículas vehículo, 750 μ l adicionales de etanol y 0 μ l de solución madre de MPL.

(0,05 mg/ml de MPL)-250 μ l de suspensión de partículas vehículo, 750 μ l adicionales de etanol y 50 μ l de solución madre de MPL.

10 (0,2 mg/ml de MPL)-250 μ l de suspensión de partículas vehículo, 750 μ l adicionales de etanol y 200 μ l de solución madre de MPL.

(0,5 mg/ml de MPL)-250 μ l de suspensión de partículas vehículo, 750 μ l adicionales de etanol y 500 μ l de solución madre de MPL.

15 (1 mg/ml de MPL)-250 μ l de suspensión de partículas vehículo con el etanol eliminado centrifugado y sustituido con solución madre de MPL.

20 Cada preparación se sometió a sonicación durante diez segundos en un sonicador para generar una suspensión uniforme de partículas vehículo de oro en el etanol.

La transferencia mediada por partículas descrita en este documento se realizó usando un dispositivo de suministro de genes impulsado por gas comprimido. Este instrumento se obtuvo de Agracetus, Inc., y se denominó dispositivo ACCELL[®] y actualmente puede obtenerse sustancialmente el mismo instrumento de PowderJect Vaccines, Inc., y se denomina dispositivo PowderJect[™] XR. El diseño general de este instrumento, que se describe en la solicitud de patente PCT/US95/00780 y en las Patentes de Estados Unidos N^o 5.865.796 y 5.584.807 se construye de modo que las partículas vehículo recubiertas con ADN se colocan sobre o recubren ellas mismas el interior de un vehículo de partículas cilíndrico. Para este vehículo, se usaron secciones cilíndricas de tubo de Tefzel[™]. Usando una jeringa equipada con un adaptador fabricado para este fin, la suspensiones anteriores se introdujeron cada una en un tubo de Tefzel[™] de 30 pulgadas (76,2 cm) de longitud, rellenando con 1 ml (7 mg de partículas de oro recubiertas con ADN) de cada suspensión una longitud de 7 pulgadas (17,78 cm) del tubo, proporcionando una distribución nominal de 1 mg de partículas vehículo de oro recubiertas con ADN, con o sin MPL, por pulgada (2,54 cm) de tubo. El tubo se transfirió a un elemento fijo que mantenía al tubo en configuración horizontal lineal. Después de permitir durante un momento que las partículas vehículo se asentaran visiblemente, se extrajo del tubo el exceso de etanol a partir de un extremo y el tubo se hizo girar durante treinta segundos para distribuir de forma más uniforme a las partículas vehículo alrededor del interior del tubo cilíndrico. El etanol residual se eliminó después haciendo pasar nitrógeno a través del tubo durante 3 minutos. El tubo se cortó en secciones, cada una de las cuales tenía media pulgada (1,27 cm) de longitud. Cada sección del tubo se usó como una carga o dosis para el dispositivo de aceleración, que liberaba un chorro de gas de helio comprimido a través del interior de las secciones del tubo para liberar las partículas vehículo del tubo y transportarlas hacia el sujeto experimental.

Los animales del modelo eran ratones Balb/c de seis a ocho semanas de edad (Harlan/Sprague/Dawley, Indianápolis Indiana), que se habían anestesiado y a los que se había afeitado el pelo del abdomen. En cada uno de los dos sitios adyacentes del abdomen de cada animal, se suministró una única dosis de partículas vehículo recubiertas con ADN en la epidermis mediante una carga de helio que tenía una presión de 400 psi (2,76 MPa). Por tanto, cada sitio recibía 1 μ g de ADN sobre 0,5 mg de partículas vehículo de oro, con cantidades variables de MPL, y cada animal tenía dos sitios.

50 En un experimento paralelo, la solución madre de MPL se aplicaba directamente sobre la piel de los sitios de tratamiento del animal, frotando antes del suministro de los genes. Esto se realizó frotando sobre el abdomen un aplicador de algodón sumergido en la solución madre de MPL, después de lo cual se dejaba evaporar el etanol durante 10 segundos antes del suministro de las partículas vehículo recubiertas con ADN a una dosis correspondiente.

55 Cuatro semanas después del tratamiento se obtuvieron muestras de suero de los animales inmunizados y se cuantificaron los anticuerpos específicos de CEA (IgG e IgG2a) usando un kit de ELISA de Southern Biotech. Comparando con los isotipos de inmunoglobulina convencionales de concentración conocida, se realizó la cuantificación de los tipos de inmunoglobulinas específicas para CEA.

60 Los resultados del estudio se representan en la Figura 1. Como puede observarse, los tres ratones sometidos a cada uno de los niveles de dosificación del adyuvante de vacuna genética y el adyuvante se representan mediante una única barra en el gráfico. En el borde izquierdo del gráfico, las tres barras representan los animales que no recibieron MPL en sus dosificaciones y las respuestas inmunes de estos animales, como puede observarse, eran predominantemente similares a Th2, con una media de 27,5 veces más anticuerpos de tipo IgG1 en comparación con anticuerpos IgG2a. El mayor cambio de la naturaleza de la respuesta inmunológica en los animales tratados era de una tasa de 0,2 mg/ml de MPL, donde la proporción de IgG1 con respecto a IgG2a se había reducido a 4,5. Cuando se frotaba MPL sobre los animales, como se indica en las barras de la derecha de la Figura 1, los resultados eran comparables con el procedimiento de suministro de pistola génica de 0,2 mg/ml, siendo la relación de IgG1 con respecto a IgG2a de

ES 2 340 617 T3

aproximadamente 4,0. El resto de dosificaciones de MPL mostraron variación en el nivel de redirección de la respuesta inmune, pero todas mostraron claramente una respuesta de IgG_{2a} más robusta que la que podía obtenerse con la vacuna genética en solitario sin el adyuvante. Estos resultados demuestran que el uso de adyuvante MPL altera efectivamente la naturaleza de la respuesta inmunológica a la vacuna genética cambiando la respuesta a favor de la producción de un anticuerpo de tipo Th1.

Los estudios de los Ejemplos 2-5, que se describen a continuación en este documento, se realizaron para evaluar el efecto del adyuvante proporcionado mediante la coadministración intracelular de diversas secuencias que codifican antígeno con un adyuvante Quil A. En cada estudio, se combinaron moléculas de ADN que contenían secuencias que codifican antígenos virales con el adyuvante Quil A y se recubrieron con ellas partículas de oro para proporcionar composiciones ejemplares de acuerdo con la presente invención. Las partículas recubiertas se administraron a sujetos animales y se comparó la capacidad de las composiciones para producir respuestas de Th, CTL y anticuerpo específicas del antígeno, con la administración intradérmica o subcutánea extracelular del adyuvante Quil A inmediatamente antes del suministro del ADN. En cada uno de los estudios, se usaron las siguientes técnicas generales.

Recubrimiento de las Partículas Vehículo Núcleo: se pesaron los pesos apropiados de partículas de oro directamente en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Después se añadieron 400-500 μ l de espermidina 0,05 M y se disolvieron masas de oro en la solución de oro/espermidina usando un sonicador de baño de agua durante 3-5 segundos. Se añadió la solución madre de ADN que contenía la molécula de plásmido de ADN pertinente a la solución de oro/espermidina para dar como resultado un índice de carga de las perlas de 2,0 μ g de ADN/mg de Au, y los tubos se taparon y se invirtieron para el mezclado y después se agitaron en vórtice brevemente. Después de reducir la velocidad del agitador y agitar en vórtice suavemente, se añadió gota a gota un volumen de CaCl₂ al 10% a una cantidad igual del volumen de espermidina añadida al oro seco. Una vez que se había añadido todo el volumen de CaCl₂, la solución resultante se agitó en vórtice a una velocidad mayor durante aproximadamente 5 segundos. Después se permitió a la solución precipitar a temperatura ambiente durante al menos 10 minutos. Al mismo tiempo, se formó una solución madre de polivinilpirrolidona (PVP)/etanol a una concentración de 0,03 mg de PVP/ml de EtOH. Después de los diez minutos de precipitación, los tubos se centrifugaron brevemente (10-15 segundos) para sedimentar todo el oro. El sobrenadante se aspiró y los tubos se colocaron en una gradilla Eppendorf para liberar el sedimento de oro. Se añadieron 800 μ l de EtOH los tubos se invirtieron varias veces para lavar el oro recubierto con ADN. Esta etapa se repitió dos veces, después de lo cual los tubos se centrifugaron de nuevo y el sobrenadante se aspiró. Después se añadieron las partículas de oro recubiertas con ADN lavadas a la solución madre de PVP y se añadieron 50 μ g de Quil A a la solución de partículas de oro recubiertas con ADN-PVP con sonicación durante 3 segundos. Las partículas resultantes que estaban recubiertas con la composición de vacuna de ADN + Quil A se introdujeron en tubos de Tefzel™ como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

Ensayos ELISPOT en Ratonés: Los materiales y reactivos eran los siguientes. Los anticuerpos de recubrimiento incluían anticuerpo anti Ab IFN- γ de rata anti-ratón, AB IL-4 de rata anti-ratón, o Ab IL-5 de rata anti-ratón (Pharmin-gen); los anticuerpos de detección incluían IFN- γ de rata anti-ratón biotinilado, e IL-4 de rata anti-ratón biotinilado o IL-5 de rata anti-ratón biotinilado (Pharmin-gen); tampón carbonado filtrado estéril a pH 9,6 (Pierce), placas de ELISPOT de 96 pocillos (Millipore), solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS, Gibco), conjugado de estreptavidina y fosfatasa alcalina (Mabtech); el kit de sustrato de fosfatasa alcalina (BioRad), y el medio de cultivo celular FCS RPMI-10% (sigma). La estimulación celular se realizó de la siguiente manera. Para la liberación de citoquinas de las células T ayudantes, se cultivaron esplenocitos de los animales vacunados a 6 x 10⁶ células/ml en RPMI FCS al 10% suplementado con piruvato sódico y aminoácidos no esenciales. Se transfirió un ml de células a cada pocillo de una placa de 24 pocillos y para cada sujeto un pocillo = solamente los medios (para control de fondo), y un pocillo = el antígeno de elección o el péptido de Clase II de elección. Después se incubaron las placas en una incubadora de cultivo tisular durante 3 días. Para liberación de IFN- γ de precursores de CTL, se cultivaron esplenocitos de los animales vacunados a 6 x 10⁶ células/ml en RPMI-FCS al 10% suplementado con piruvato sódico y aminoácidos no esenciales. Se transfirió un ml de células a cada pocillo de una placa de 24 pocillos y después se incubó la placa durante 2 días, después de lo cual se añadió el péptido CTL a los pocillos de péptido. Para cada sujeto, un pocillo = solamente los medios, un pocillo = el péptido CTL de elección a 10⁻⁵ M, y un pocillo = el péptido CTL irrelevante. Después se incubaron las placas durante 24 horas adicionales, después de la adición del péptido y antes de colocar las células en la placa de ELISPOT.

El recubrimiento y el bloqueo de las placas de ELISPOT se realizaron de la siguiente manera. Las placas de ELISPOT se recubrieron un día antes de colocar las células en las placas, usando 50 μ l por pocillo de 15 μ g/ml de anticuerpo de recubrimiento en tampón carbonato estéril, pH 9,6. Las placas recubiertas se incubaron durante una noche a 4°C, después de lo cual se lavaron 6 veces con 100 μ l de PBS para eliminar el Ab de recubrimiento sin unir, y después se sometieron a transferencia cuidadosamente. Cada pocillo se bloqueó usando 200 μ l de RPMI-FCS al 10% durante 1-2 horas en una incubadora de cultivo tisular a temperatura ambiente. Se eliminó todo el medio de bloqueo inmediatamente antes de colocar las células en placas. Las células se colocaron en las placas de la siguiente manera. Después de 3 días, se recogieron las células y el sobrenadante de cada pocillo y se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml. Las células se centrifugaron en una centrífuga para recoger el sobrenadante que se almacenó después a -80°C hasta que se usó en los análisis de ELISA. Las células sedimentadas se resuspendieron en 2-5 ml de medios y después se llevaron a una concentración final de 1 x 10⁷/ml. Las células se añadieron a los pocillos de ELISPOT a 1 x 10⁶/pocillo.

Las placas de ELISPOT se desarrollaron de la siguiente manera. Las células se retiraron y las placas se lavaron dos veces con PBS usando un frasco lavador. Las células se lavaron con agua DI (dejando el agua en los pocillos

ES 2 340 617 T3

durante varios minutos para lisar las células restantes) y las placas se lavaron dos veces más. Se diluyó anticuerpo de detección a 1 $\mu\text{g/ml}$ en PBS estéril y después se añadió a 50 μl /pocillo y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cinco veces con PBS y 50 μl de conjugado de estreptavidina y fosfatasa alcalina (diluido a 1:1000 en PBS) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas. Después se lavaron las placas cinco veces con PBS y se añadieron 50 μl de sustrato cromogénico de fosfatasa alcalina y se dejó a las placas incubadas a temperatura ambiente hasta que aparecieron puntos negros (aproximadamente 2 horas). La reacción de color se interrumpió lavando tres veces con 200 μl de agua corriente, las placas se dejaron secar al aire y se contaron los puntos en un microscopio de disección (40 aumentos).

10 *Ensayos de CTL Pulsado con Péptidos de Ratón:* Los materiales y reactivos eran los siguientes. Medio RPMI-10 (500 ml de RPMI 1640 con L-glutamina y Hepes, 55 ml de suero fetal bovino inactivado con calor (FBS), 0,5 ml de gentamicina, 5,5 ml de solución de anticuerpos antimicóticos); medio de sensibilización ("SM") sin IL-2 (500 ml de RPMI-10, 5,0 ml de piruvato sódico 100 mM, 5,0 ml de aminoácidos no esenciales 100 x) y SM con IL-2 (SM con una concentración final de 20 U/ml de IL-2 recombinante de rata); péptido epítipo de CTL (péptido disuelto en DMSO de calidad cultivo tisular hasta la concentración de solución madre de 10^{-2} M); tampón de lisis ACK (BioWhittaker); IL-2 de rata recombinante (Collaborative); mitomicina C C (de Aldrich disuelta en PBS estéril para obtener una solución madre de 500 $\mu\text{g/ml}$; tubos cónicos de 50 ml (Falcon), filtros coladores de malla de nylon (Falcon); ^{51}Cr Cromo y placas Lumaplates (Packard).

20 Para estimuladores pulsados por péptidos, se proporcionan bazos singénicos sin tratamiento previo (aproximadamente $1,2 \times 10^7$ estimuladores/ratón) recogiendo los bazos y triturándolos mediante presión entre 2 portaobjetos esmerilados y esterilizados mediante autoclave para romper el saco y liberar las células a una pequeña placa de petri. Las masas de células se rompen pipeteando las células arriba y abajo con una pipeta de transferencia de 3 ml, y la suspensión celular resultante se pasa a través de un filtro colador de células de nylon de 70 μm a un tubo cónico de 50 ml usando 5-10 ml de medio RPMI-10 para lavar las células. Los esplenocitos recuperados se centrifugan a 1500 rpm durante 5 minutos para sedimentar y el sobrenadante se descarta. Las RBC se lisaron resuspendiendo los esplenocitos en 5 ml de tampón de lisis ACK durante 1-2 minutos, después de los cual las células se lavaron dos veces con 20 ml de RPMI suplementado, y una vez con RPMI-10. Después se resuspendieron las células a aproximadamente 1×10^7 células/ml. Los estimuladores se trataron con mitomicina C (por cada 10 ml de células, se añadieron 500 ml de 0,5 mg/ml de mitomicina C), y las células se incubaron con la mitomicina C durante 25-45 minutos a 37°C, CO₂ al 5%. Después del tratamiento, las células se lavaron dos veces con RPMI sin suplementar y una vez con RPMI-10. Las células lavadas se resuspendieron a 2×10^6 células/ml en SM con 20 U/ml de IL-2 de rata y se añadió el epítipo de CTL de la solución madre. Las células estimuladoras se dispersaron a una relación de 3/1 respondedor/estimulador en placas de 24 pocillos y se incubaron durante una noche a 37°C, CO₂ al 5%.

35 La estimulación *in vitro* de las células respondedoras se realizó de la siguiente manera. Se extrajeron bazos de ratones vacunados y de control, y los esplenocitos respondedores se aislaron triturando los bazos como se ha descrito anteriormente. Las RBC se lisaron con 5 ml de tampón de lisis ACK durante 2-3 minutos y las células se lavaron dos veces con 20 ml de RPMI sin suplementar y una vez con RPMI-10. Después se resuspendieron los esplenocitos a 6×10^6 células/ml en SM sin IL-2. Para cada ratón, se dispuso 1 ml de esplenocitos en cada uno de los pocillos de una placa de 24 pocillos que contenía 1 ml de células estimuladoras pulsadas con péptido a 2×10^6 células/ml descritas anteriormente en SM con IL-2 (la concentración final de IL-2 era de 10 U/ml) y las placas se incubaron a 37°C, CO₂ al 5% durante 5-7 días.

45 *Ensayo de Liberación de ^{51}Cr Cromo a partir de CTL:* Para la lisis específica de péptidos, se realizaron las siguientes técnicas. Se colocaron células diana singénicas en fase de crecimiento logarítmico en placas de 96 pocillos a aproximadamente 30.000 células diana/pocillo. Se sedimentaron cantidades apropiadas de células diana en tubos cónicos y se resuspendieron en 20 μl de FBS inactivado con calor. Se añadieron 100-200 μl de ^{51}Cr (cromato sódico) a cada sedimento, se mezclaron bien y después se incubaron durante 1 hora a 37°C. Las células se lavaron después cuatro veces con 6-10 ml de RPMI-10 por sedimento y después se resuspendieron a 3×10^5 células/ml en RPMI-10. Para las dianas pulsadas con péptido, se añadió una cantidad apropiada del péptido de epítipo de CTL hasta alcanzar una concentración final de péptido óptima (aproximadamente 10^{-5} M). Se dejó pulsar a las células diana con los péptidos durante 30 minutos (a 37°C) antes de colocarlas en placas con las células efectoras.

55 Después de 5-7 días de estimulación *in vitro*, se recogieron esplenocitos efectoras de las placas de 24 pocillos y las células de cada ratón se reunieron en tubos cónicos de 15 ml y después se resuspendieron a $1,5 \times 10^7$ células/ml. Para colocarlas en las placas, se colocaron esplenocitos de cada ratón a proporciones de 50, 17, 5,6 y 1,9 células efectoras/células diana. Después de las diluciones, se añadieron 100 μl de las células diana marcadas con ^{51}Cr a cada pocillo. Después se centrifugaron brevemente las placas y se incubaron durante 4-6 horas a 37°C. La lisis se midió frente a células diana pulsadas con péptido y de control sin pulsar para cada ratón.

65 Para la lisis no específica, se siguió el mismo protocolo excepto que también se colocaron en placas 100 μl de células diana sin pulsar. Después de una incubación de 4-6 horas, las placas se centrifugaron para sedimentar las células y se lisaron. Después se transfirieron 25 μl del sobrenadante a placas Lumaplates y se dejaron secar durante 2 horas o durante una noche. Después se cerraron herméticamente las placas y se contaron usando un programa convencional para ^{51}Cr -sólido. Para calcular el % de lisis (cpm del ensayo-cpm espontáneas) se dividió por (cpm máximas-cpm espontáneas) y se multiplicó por 100. Para obtener el % de lisis específica, se restó el % de lisis de células diana sin pulsar del % de lisis de las células diana pulsadas con péptido.

ES 2 340 617 T3

ELISA: La respuesta de anticuerpos de las diversas composiciones de vacuna se determinó mediante un procedimiento de ELISA convencional. Más particularmente, se recubrieron placas de unión al medio (Costar) con 100 μ l/pocillo con 1 μ g/ml de solución madre del antígeno (en PBS) y se incubaron durante una noche a 4°C. Se aspiró la solución del antígeno y las placas se bloquearon con leche en polvo al 5%/PBS durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado (TBS 10 mM/Brij-35 al 0,1%) y se añadieron 100 μ l de suero de muestra y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente (tampón de dilución: leche en polvo al 2%/PBS/Tween 20 al 0,05%). Las placas se lavaron 3 veces y se incubaron con anticuerpos de cabra marcados con biotina específicos para inmunoglobulina IgG de ratón o subclases de IgG específicas durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados adicionales, las placas de ELISA se incubaron con conjugados de estreptavidina-peroxidasa de rábano rústico durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se lavaron y se desarrollaron con un sustrato TMB (kit de Bio-Rad, Richmond, CA) y se dejaron desarrollar durante 30 minutos. Las reacciones se interrumpieron con H₂SO₄ 1 N y las placas se leyeron a A₄₅₀. Se determinó la absorbancia media mediante pocillos que recibieron todos los reactivos excepto los sueros de ensayo.

15 Ejemplo 2

20 *Coadministración Intracelular de Quil A con ADN en Perlas de Oro para Potenciar una Respuesta Inmune Específica de la NP del virus de la Gripe*

Para determinar si la coadministración de una composición que contiene un vector de vacuna de ADN que codifica el antígeno de NP de la gripe y el adyuvante Quil A directamente en las células puede potenciar una respuesta inmune específica del antígeno, se realizó el siguiente estudio. Los grupos experimentales de ratones Balb/c se establecieron de la siguiente manera: (Grupo 1) 3 ratones de control que recibían perlas de oro recubiertas con ADN intrascendente mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR; (Grupo 2) 3 ratones que recibían perlas de oro recubiertas solamente con el vector de ADN de NP mediante el dispositivo PowderJect™ XR; (Grupo 3) 4 ratones que recibían perlas de oro recubiertas solamente con el vector de ADN de NP mediante el dispositivo PowderJect™ XR y se les inoculaba trehalosa o solución salina antes de la administración del ADN; (Grupo 4) 3 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de NP y el adyuvante Quil A; (Grupo 5) 3 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de NP coadministrado inmediatamente después de una inyección intradérmica de Quil A; y (Grupo 6) 3 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de NP administrado inmediatamente antes de una inyección subcutánea de una solución que contenía Quil A.

El vector de ADN de NP contenía una secuencia que codificaba el antígeno de NP de la gripe (de la cepa PR8) y se describe en el documento Pertmer *et al.* (1995) *Vaccine* 13: 1427-1430. Todas las perlas de oro se recubrieron como se ha descrito anteriormente a un índice de carga de la perla de 0,5 μ g de Au/célula diana y un índice de carga de ADN de 2,0 μ g/mg de Au. La administración con el dispositivo PowderJect™ XR era en dos sitios diana a una presión de funcionamiento de 400 psi (2,76 Mpa) y era un experimento exclusivamente de sensibilización. Después de un mes, los ratones se sacrificaron y se recogieron muestras de sangre y del bazo para su análisis como se ha descrito anteriormente. Para el ensayo ELISPOT, el péptido usado para estimular a los precursores de CTL era TYQRTRALV (a 10⁻⁸ M) y se usó el virus de la gripe PR8 lisado a 5 μ g/ml para la estimulación de Th. Para el análisis de cromo, el péptido usado para estimular la respuesta era TYQRTRALV (a 10⁻⁸ M); y el péptido usado para pulsar las células diana era TYQRTRALV (a 10⁻⁵ M). Para el ELISA, el antígeno de captura era antígeno de NP de PR8 (Sprafas) a 1 mg/ml.

Los resultados del estudio se representan a continuación en la Tabla 1. Como puede observarse, la administración intracelular de Quil A junto con el vector de ADN (Grupo 4) potencia la respuesta de células T ayudantes de específicas de antígeno, las respuestas de CTL y de anticuerpo y es superior a la coadministración intracelular intradérmica (Grupo 5) o subcutánea (Grupo 6) del Quil A inmediatamente antes del suministro de ADN para la inducción de la respuesta de CTL y de anticuerpo.

ES 2 340 617 T3

TABLA 1

Grupo Nº	SCF medias para CTLp / 10 ⁶ células	% medio de lisis (40:1 E/T)	Respuesta Th1 (IFN- γ)	Respuesta Th2 (IL-4)	IgG (Titulación)
1	0	0	0	0	<100
2	18	12,6	15	3	14.642
3	Nd	17,5	Nd	Nd	5.171
4	52	43,0	53	14	40.637
5	6	5,7	55	28	5.283
6	4	19,7	Nd	Nd	25.600

Ejemplo 3

Coadministración Intracelular de Quil A con ADN en Perlas de Oro para Potenciar una Respuesta Inmune Específica de NP del Virus de la Gripe

Para ayudar a la confirmación de los resultados observados anteriormente con el Ejemplo 2, se realizó el siguiente estudio. Los Grupos experimentales de ratones Balb/c se establecieron de la siguiente manera: (Grupo 1) 4 ratones de control que recibían perlas de oro recubiertas con ADN intrascendente mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR; (Grupo 2) 4 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con ADN intrascendente y Quil A coadministrado mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR; (Grupo 3) 4 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de NP solamente mediante el dispositivo PowderJect™ XR; y (Grupo 4) 4 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de NP y el adyuvante Quil A.

En este caso de nuevo, el vector de ADN de NP contenía una secuencia que codificaba el antígeno de la NP de la gripe (de la cepa PR8) y se describe en el documento Pertmer *et al.* (1995) *Vaccine* 13: 1427-1430. Todas las perlas de oro se cargaron como se ha descrito anteriormente a un índice de carga de perla de 0,5 mg de Au/célula diana y un índice de carga de ADN de 2,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de Au. La administración con el dispositivo PowderJect™ XR era en dos sitios diana a una presión de funcionamiento de 400 psi (2,76 MPa), y era un experimento exclusivamente de sensibilización. La vacunación se administró solamente una vez, y después de 1 mes se sacrificaron los ratones y se recogieron muestras de sangre y del bazo para su análisis como se ha descrito anteriormente. Para el ensayo ELISPOT, el péptido usado para estimular los precursores de CTL era TYQRTRALV (a 10^{-8} M) y se usó el virus de la gripe PR8 lisado a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para la estimulación de Th. Para los análisis de cromó, el péptido usado para estimular las células sensibles era TYQRTRALV (a 10^{-8} M); y el péptido usado para pulsar las células diana era TYQRTRALV (a 10^{-5} M). Para el ELISA, el antígeno de captura era antígeno de la NP de PR8 (Sprafas) a 1 mg/ml.

Los resultados del estudio se representan a continuación en la Tabla 2. Como puede observarse, la administración intracelular de Quil A junto con el vector de ADN (Grupo 4) posibilita una respuesta de células T ayudantes, una respuesta de CTL y una respuesta de anticuerpo específicas del antígeno potenciadas.

ES 2 340 617 T3

TABLA 2

Grupo Nº	SCF medias para CTLp / 10 ⁶ células	% medio de lisis (50:1 E/T)	IgG (Titulación)
1	6,5	0,3	<100
2	0,5	0	<100
3	14,5	17,0	16.846
4	25,0	28,8	62.706

Ejemplo 4

Coadministración Intracelular de Quil A con ADN en Perlas de Oro para Potenciar una Respuesta Inmune de CTL Específica de gp 120 de VIH

Para determinar si la coadministración de una composición que contenía un vector de vacuna de ADN que codifica el antígeno gp 120 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el adyuvante Quil A directamente en las células puede potenciar una respuesta inmune específica del antígeno, se realizó el siguiente estudio. Los grupos experimentales de ratones Balb/c se establecieron de la siguiente manera: (Grupo 1) 4 ratones de control que recibían perlas de oro recubiertas con ADN intrascendente mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR; (Grupo 2) 4 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con vector de ADN intrascendente y Quil A y suministradas mediante el dispositivo PowderJect™ XR; (Grupo 3) 3 ratones que recibían perlas de oro recubiertas solamente con el vector de ADN de gp 120 de VIH suministradas mediante el dispositivo PowderJect™ XR, sensibilizados una vez y reforzados tres veces; (Grupo 4) 3 ratones que recibían perlas de oro recubiertas solamente con el vector de ADN de gp 120 de VIH, suministradas mediante el dispositivo PowderJect™ XR, sensibilizados una vez y reforzados una vez, (Grupo 5) 3 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de gp 120 de VIH y el adyuvante Quil A y coadministradas mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR, sensibilizados una vez y reforzados 3 veces; y (Grupo 6) 3 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de gp 120 de VIH y el adyuvante Quil A y administradas mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR, sensibilizados una vez y reforzados una vez.

El vector de ADN de gp 120 de VIH contenía una secuencia que codificaba el antígeno de gp 120 de VIH (de la cepa LAI) y se describe en el documento Heydenburg *et al.* (1994) *AIDS Res. And Hum. Retroviruses* 10: 1433-1441. Todas las perlas de oro se cargaron como se ha descrito anteriormente a un índice de carga de la perla de 0,5 µg de Au/célula diana y un índice de carga de ADN de 2,0 µg/mg de Au. La administración con el dispositivo PowderJect™ XR era en dos sitios diana a una presión de funcionamiento de 400 psi (2,76 MPa). Se realizaron cantidades variables de vacunaciones (teniendo algunas un refuerzo, teniendo otras tres refuerzos), con la vacunación administrada cada cuatro semanas. El sacrificio de todos los ratones se realizó en la semana 14 del estudio, y se recogieron muestras del bazo para el análisis como se ha descrito anteriormente. Para el ensayo ELISPOT, el péptido usado para estimular a los precursores de CTL era RGPGRAFVTI (a 10⁻⁷ M). Para el análisis de cromó, el péptido usado para estimular a las células respondedoras a CTL y pulsar las células diana era RGPGRAFVTI (a 10⁻⁷ M).

Los resultados del estudio se representan a continuación en la Tabla 3. Como puede observarse, los resultados confirman los datos observados anteriormente con el antígeno de la gripe en el que la coadministración intracelular de Quil A y del vector de ADN potenció la respuesta de CTL específica de gp 120 de VIH después de una sensibilización y un refuerzo en ratones vacunados, sin diferencias significativas cuando los ratones se reforzaban 3 veces.

ES 2 340 617 T3

TABLA 3

Grupo N ^o	% medio de lisis (50:1 E/T)
1	3,2
2	3,5
3	36,7
4	14,7
5	32,7
6	35,4

Ejemplo 5

Coadministración Intracelular de Quil A con ADN en Perlas de Oro para Potenciar una Respuesta Inmune de CTL específica de HBsAg

Para determinar si la coadministración de una composición que contiene un vector de vacuna de ADN que codifica el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y el adyuvante Quil A, directamente a las células puede potenciar una respuesta inmune específica del antígeno, se realizó el siguiente estudio. Los grupos experimentales de ratones Balb/c se establecieron de la siguiente manera: (Grupo 1) 4 ratones de control que recibían perlas de oro recubiertas con ADN intrascendente mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR; (Grupo 2) 4 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de HBsAg y se administraban mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR; y (Grupo 3) 4 ratones que recibían perlas de oro recubiertas con el vector de ADN de HBsAg y el adyuvante Quil A y se administraban mediante el dispositivo de suministro mediado por partículas PowderJect™ XR. El experimento se repitió usando exactamente los mismos grupos experimentales.

El vector de ADN de HBsAg contenía una secuencia que codificaba el antígeno de superficie de HBV se denomina pWRG7128. El plásmido pWRG7128 contiene, además de los elementos de control adecuados, una secuencia que codifica el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) que está bajo el control transcripcional de un promotor de citomegalovirus (CMV), y que ha demostrado producir partículas de HBsAg después de la transfección en la mayoría de los tipos celulares. El plásmido pWRG7128 se construyó de la siguiente manera. Se preparó un vector de clonación pWRG7077 (Schmaljohn *et al.* (1997) *J. Virol.* 71: 9563-9569) para aceptar una secuencia codificante de HBsAg digiriendo el vector hasta su finalización con *Bam*H1, seguido de una digestión parcial con *Hind*3. Después de hacer romos a los salientes 5' mediante el tratamiento con el fragmento de Klenow y desoxirribonucleótidos, se aisló el fragmento del vector de 4,3 kB. El fragmento de inserción de HBsAg de 1,35 kB (que contenía la secuencia pre-S2 sin traducir, la secuencia codificante de HBsAg de 226 aminoácidos de la cepa *adw* y el elemento potenciador HBV) se escindió del plásmido pAM6 (ATCC, Rockford, MD) digiriendo con *Bam*H1. Después de hacer romos los extremos mediante el tratamiento con el fragmento de Klenow y desoxirribonucleótidos, el fragmento se aisló y se ligó en el fragmento del vector de 4,3 kB descrito anteriormente. Los recombinantes resultantes se seleccionaron para la orientación apropiada del inserto y se identificó un aislado correcto que se designó como plásmido intermedio (pWRG7074). Para eliminar el inicio del codón de la proteína X (presente en el extremo 3' del inserto pAM6 de 1,35 kB), se aisló un fragmento del vector de 4,86 kB a partir del plásmido pWRG7074 digiriendo con *Bgl*2, haciendo romos los extremos con el fragmento de Klenow y desoxirribonucleótidos y después digiriendo con *Bst*X1. A continuación, se aisló un fragmento del inserto de 754 pb de la construcción pWRG7074 mediante digestión con *Nco*1, tratándolo con nucleasa de fríjol mungo y digiriéndolo con *Bst*X1. El vector y los fragmentos de inserción resultantes se ligaron después conjuntamente para formar el plásmido clínico pWRG7128. Todas las perlas de oro se cargaron como se ha descrito anteriormente a un índice de carga de las perlas de 0,5 μ g de Au/célula diana y un índice de carga de ADN de 2,0 μ g/mg de Au. La administración con el dispositivo PowderJect™ XR era a dos sitios diana a una presión de funcionamiento de 400 psi (2,76 MPa). La vacunación se administró solamente una vez, y después de un mes, se sacrificaron todos los ratones y se recogieron muestras del bazo para el análisis de la liberación de cromó (lisis específica) como se ha descrito anteriormente. Para el ensayo ELISPOT, el péptido usado para estimular a los precursores de CTL era IPQSLDSWWTSL (a 10^{-6} M). Para el análisis de cromó, se usó una línea celular P815, que expresaba el antígeno de superficie de HBV, en lugar del péptido para estimulación de las células respondedoras (a 40.000/pocillo) y de las células efectoras (a 30.000/pocillo).

ES 2 340 617 T3

Los resultados del estudio se representan a continuación en la Tabla 4. Como puede observarse, los resultados confirman los datos que se han observado anteriormente con el antígeno de la gripe y el antígeno del VIH y que la coadministración intracelular de Quil A y del vector de ADN potenció las respuestas de CTL específicas de HBsAg.

5

TABLA 4

% de lisis específica a la proporción de efector / diana	Animales del Grupo 2, primer experimento	Animales del Grupo 3, primer experimento	Animales del Grupo 2, segundo experimento	Animales del Grupo 3, segundo experimento
17:1	26,9	44,2	53,4	78,6
5,6:1	16,5	36,3	34,7	70,9
1,9:1	7,4	18,0	22,3	41,9

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un antígeno para la fabricación de partículas recubiertas, en forma de medicamento, que comprenden partículas vehículo núcleo recubiertas con dicha molécula de ácido nucleico para su uso en inmunización de ácido nucleico mediada por partículas, en el que dichas partículas recubiertas se coadministran con un adyuvante en una forma distinta al ADN que es eficaz para potenciar al menos un componente de una respuesta inmune provocada contra el antígeno, en el que el adyuvante recubre distintas partículas vehículo núcleo.

10 2. Uso de un adyuvante en forma distinta al ADN que es eficaz para potenciar al menos un componente de una respuesta inmune provocada contra el antígeno, para la fabricación de partículas recubiertas, en forma de medicamento, que comprenden partículas vehículo núcleo recubiertas con dicho adyuvante para su uso en inmunización de ácido nucleico mediada por partículas, en el que dichas partículas recubiertas se coadministran con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un antígeno, en el que la molécula de ácido nucleico recubre distintas partículas vehículo núcleo.

15 3. Productos que comprenden partículas vehículo núcleo recubiertas con una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 1 ó 2 y partículas vehículo núcleo recubiertas con un adyuvante como se define en una cualquiera de la reivindicación 1 ó 2 en forma de una preparación combinada para la administración separada, o al mismo tiempo, en una administración de ácido nucleico mediada por partículas.

25

30

35

40

45

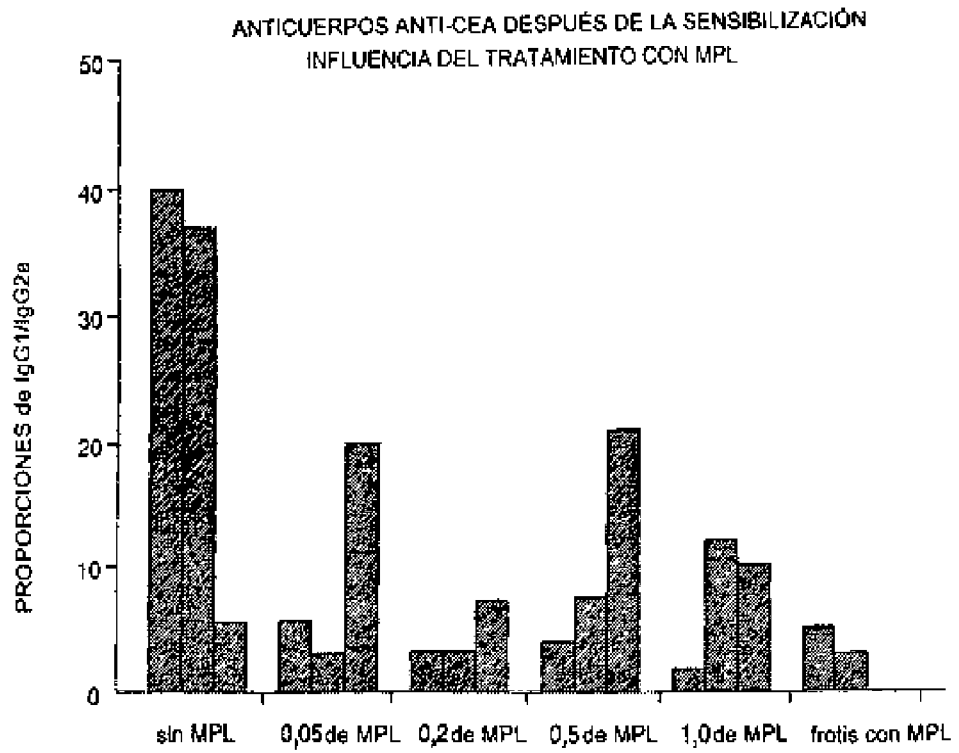
50

55

60

65

FIGURA 1



ES 2 340 617 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> POWDERJECT VACCINES, INC.

5 <120> VACUNAS GENÉTICAS CON ADYUVANTE(S)

<130> N85436C

10 <140> EP07015414.1

<141> 1999-11-03

15 <150> EP99956885.0

<151> 1999-11-03

<150> PCT/US99/25854

20 <151> 1999-11-03

<160> 7

25 <170> PATENTIN V. 3.5

<210> 1

<211> 10

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia iniciación traducción

<400> 1

40 gccacatgg

10

<210> 2

<211> 10

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Secuencia iniciación traducción

<400> 2

55 gccccatgg

10

<210> 3

<211> 20

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Oligonucleótido sintético

ES 2 340 617 T3

<400> 3
tccatgacgt tctgatgct 20

5
<210> 4
<211> 17
<212> ADN
10 <213> *Clostridium limosum*

<400> 4

15 gactctcgag cgttctc 17

<210> 5
<211> 9
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> péptido

<400> 5
30 Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val
1 5

<210> 6
<211> 10
35 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> péptido

<400> 6
45 Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile
1 5 10

<210> 7
<211> 12
50 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> péptido

<400> 7
60 Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu
1 5 10

65