

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 240**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
A61K 39/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2006 E 06745450 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 1872793**

54 Título: **Poliaminoácido para usar como adyuvante**

30 Prioridad:

20.04.2005 JP 2005122650
02.08.2005 JP 2005224519
16.09.2005 JP 2005270146

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2013

73 Titular/es:

AKASHI, MITSURU (33.0%)
22-25, Yamadanishi 3-chome Suita-shi
Osaka 565-0824, JP;
BABA, MASANORI (33.0%) y
TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED
(33.0%)

72 Inventor/es:

AKASHI, MITSURU y
BABA, MASANORI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 396 240 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).

DESCRIPCION

Poli aminoácido para usar como adyuvante.

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al uso de un poliaminoácido como adyuvante, al uso de un poliaminoácido como adyuvante para la fabricación de una vacuna, y a una vacuna que comprende un poliaminoácido como adyuvante. La presente invención se refiere además a una nanopartícula en la que se inmoviliza un antígeno y a su uso como una vacuna.

Antecedentes

10 Se han desarrollado y usado diversas vacunas para prevenir y tratar una amplia variedad de enfermedades, incluyendo enfermedades víricas. Sin embargo, cuando un antígeno tal como una proteína vírica se administra sólo a un organismo vivo, la estabilidad de la molécula de antígeno en el organismo vivo es baja y la eficacia de su incorporación a las células es insuficiente. Después se han realizado esfuerzos en vacunoterapias actuales, por ejemplo administrando una mezcla formada por emulsificación con un vehículo en partículas apropiado o agente inmunoestimulante (adyuvante). Sin embargo, no ha habido por ejemplo publicación alguna de un caso en el que un adyuvante preexistente se use exitosamente para una vacuna HTLV-1 en una infección por HTLV-1. Esto es porque la actividad de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) frente al HTLV-1 y la frecuencia de su existencia son bajas. Además, se han hecho intentos por ejemplo para tratar una infección con un virus tal como el VIH o un cáncer en un paciente induciendo CTLs que atacan específicamente a las células infectadas o células cancerosas. En tal tratamiento, se considera que es importante si los CTLs se pueden inducir eficazmente. Con este fin se usa generalmente un adyuvante tal como adyuvante de Freund o hidróxido de aluminio. Sin embargo, ningún resultado satisfactorio se ha logrado con respecto a la seguridad o eficacia. Por tanto no se ha publicado que un poliaminoácido, en particular poli(ácido γ -glutámico), presenta un efecto excelente como adyuvante tal como se describe en la presente memoria.

25 Recientemente, se han promovido investigaciones y desarrollo de nanopartículas porque se espera que las nanopartículas desempeñen funciones novedosas en diversos campos debido a su tamaño. También se ha tratado de utilizar nanopartículas para terapias. Por ejemplo, una nanopartícula se usa como un vehículo para un fármaco en algunos estudios (ver los Documentos de Patente 1 y 2). Sin embargo, existe la preocupación por la influencia de la nanopartícula en un organismo vivo, porque su comportamiento en el organismo no se ha dilucidado todavía y, por tanto, la toxicidad o seguridad es desconocida. Es esencial para la contribución real al servicio médico desarrollar prácticamente una nanopartícula biodegradable que pueda sustituir a las nanopartículas no degradables. También ha habido preocupación de que se pierda la actividad de un antígeno, por ejemplo por desnaturalización o degradación tras la unión del antígeno a una nanopartícula, y la nanopartícula no puede mostrar la función como un adyuvante. Por tanto, no ha habido ninguna publicación sobre el uso, como adyuvante, de un poliaminoácido, en particular poli(ácido γ -glutámico), que se prepara como una nanopartícula, una nanopartícula en la que se inmoviliza un antígeno, o su uso como una vacuna como se describe aquí.

Documento de Patente 1: JP-A-92870/1994

Documento de Patente 2: JP-A-256220/1994

40 La publicación MATSUSAKI M ET AL (Chemistry Letters, Chemical Society of Japan, vol. 33, no. 4, 1 de Enero de 2004) se refiere a "Bionanopartículas Establemente Dispersas y Superficialmente Funcionales Preparadas Autoensamblando Polímeros Anfipáticos de Poli(ácido γ -glutámico) Hidrofílico que Lleva Aminoácidos Hidrofóbicos".

Descripción de la invención

Problemas a resolver por la invención

Los problemas a resolver por la presente invención son proporcionar un adyuvante seguro y eficaz para una vacuna, así como proporcionar una vacuna que utiliza el mismo.

45 Medios para resolver los problemas

Como resultado de estudios intensivos en vista de la situación descrita anteriormente, los presentes inventores han descubierto que un poliaminoácido, en particular poli(ácido γ -glutámico), promueve la diferenciación y maduración de una célula dendrítica, es decir, actúa como un adyuvante, además la acción se aumenta en la preparación como nanopartículas. Por lo tanto, la presente invención se ha completado.

50 La presente invención proporciona:

(1) Un copolímero de injerto de poli(ácido γ -glutámico) y éster etílico de L-fenilalanina para usar como un adyuvante para una vacuna, donde el poli(ácido γ -glutámico) se prepara como una nanopartícula y donde la nanopartícula tiene un tamaño de 100 nm – 500 nm.

5 (2) Una composición farmacéutica que comprende un copolímero de injerto de poli(ácido γ -glutámico) y éster etílico de L-fenilalanina para usar como un adyuvante para una vacuna, donde el poli(ácido γ -glutámico) se prepara como una nanopartícula y donde la nanopartícula tiene un tamaño de 100 nm – 500 nm.

(3) Un copolímero de injerto según el apartado (1) o una composición según el apartado (2) donde un antígeno viral se inmoviliza en la nanopartícula.

10 (4) Un copolímero de injerto o una composición según el apartado (3), donde el antígeno viral se selecciona del grupo consistente en un antígeno retroviral, un antígeno de virus influenza, un antígeno de flavivirus, un antígeno del virus de la diarrea y un antígeno de coronavirus.

(5) Un copolímero de injerto o una composición según el apartado (4), donde el antígeno viral es un antígeno retroviral.

15 (6) Un copolímero de injerto o una composición según el apartado (5), donde el antígeno retroviral es un antígeno VIH.

(7) Un copolímero de injerto o una composición según uno cualquiera de los apartados (3)-(6), donde el antígeno se incorpora a la nanopartícula.

(8) Un copolímero de injerto o una composición según uno cualquiera de los apartados (3)-(6), donde el antígeno está presente sobre la superficie de la nanopartícula.

20 (9) Un copolímero de injerto o una composición según uno cualquiera de los apartados (3) a (8) para la inmunización de un sujeto o para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un sujeto.

(10) Un copolímero de injerto o una composición según el apartado (9), donde la enfermedad es VIH.

Efectos de la invención

25 La presente invención proporciona el uso, como adyuvante, de un copolímero de injerto de poli(ácido γ -glutámico) y éster etílico de L-fenilalanina, donde el poli(ácido γ -glutámico) se prepara como una nanopartícula y donde la nanopartícula tiene un tamaño de 100 nm – 500 nm, que es muy segura porque es biodegradable, su uso para la fabricación de una vacuna, así como una vacuna que comprende el copolímero de injerto como adyuvante.

Breve descripción de los dibujos

30 La Fig. 1 es un gráfico que representa cambios en las cantidades ^3H -timidina incorporada en linfocitos T resultantes de la preparación de γ -PGA (poli(ácido γ -glutámico)) como nanopartículas.

La Fig. 2 representa resultados de la expresión molecular superficial en células dendríticas, que se miden por un citómetro de flujo.

La Fig. 3 es un gráfico que representa cantidades de citoquinas segregadas de células dendríticas, que se miden por ELISA.

35 La Fig. 4 muestra los efectos de iDCs (células dendríticas inmaduras), diferenciadas por nanopartículas de γ -PGA, en la activación de linfocitos T, que se representa por cantidades de ^3H -timidina incorporada en linfocitos T.

La Fig. 5 es un gráfico que representa el número de células que producen γ -interferón inducido por nanopartículas de γ -PGA que tienen un antígeno VIH-1 incorporado a ellas.

40 La Fig. 6 es un gráfico que representa títulos de anticuerpos inducidos por nanopartículas de γ -PGA que tienen un antígeno VIH-1 incorporado a ellas.

La Fig. 7 representa resultados de experimentos para prevenir injerto tumoral usando nanopartículas de γ -PGA con OVA inmovilizada.

La Fig. 8 representa resultados de experimentos para provocar la inducción de CTLs usando nanopartículas de γ -PGA con OVA inmovilizada.

45 La Fig. 9 representa resultados de experimentos para provocar la inducción de CTLs por nanopartículas de γ -PGA con Tax₃₈₋₄₆ inmovilizado.

La Fig. 10 representa resultados de pruebas tumorales para eliminar metástasis pulmonar por nanopartículas de γ -PGA con OVA inmovilizada.

El mejor modo para realizar la invención

5 En un aspecto la presente invención se refiere al uso de un copolímero de injerto de poli(ácido γ -glutámico) y éster etílico de L-fenilalanina, como adyuvante, donde el poli(ácido γ -glutámico) se prepara como una nanopartícula y donde la nanopartícula tiene un tamaño de 100 nm – 500 nm. Adyuvante significa una sustancia que estimula un sistema inmune para mejorar una inmunorreacción. El adyuvante permite por ejemplo promover la diferenciación y maduración de una célula dendrítica, activar una célula T, promover la secreción de diversas citoquinas y aumentar una proporción de inducción de CTLs.

10 El poliaminoácido usado en el copolímero de injerto de la presente invención es poli(ácido γ -glutámico). El aminoácido puede ser la forma-L o la forma-D, preferiblemente es la forma-L. Aunque los enlaces entre los aminoácidos constituyentes del poliaminoácido del copolímero de injerto de la presente invención son generalmente enlaces peptídicos, los aminoácidos constituyentes pueden estar unidos por medio de otro enlace o un eslabón. Los ejemplos de los enlaces distintos de un enlace peptídico incluyen, pero sin limitarse a, un enlace éster y un enlace
15 éter, y los ejemplos de los eslabones incluyen, pero sin limitarse a, glutaraldehído y diisocianato. Además, los grupos funcionales en el poliaminoácido de la presente invención pueden estar reticulados. La reticulación permite que se cambie una propiedad física del poliaminoácido y conseguir la propiedad deseada como adyuvante. Los ejemplos de agentes reticulantes incluyen, pero sin limitarse a, carbodiimida y diglicidiléster. Aunque el poliaminoácido es preferiblemente soluble, se puede disolver gradualmente a lo largo del tiempo. El peso molecular del poliaminoácido
20 no está limitado específicamente, y se puede cambiar dependiendo de la viscosidad o solubilidad deseadas. Generalmente el peso molecular varía de 1.000 a 5.000.000, preferiblemente de 5.000 a 2.000.000. Un poliaminoácido usado en la presente invención es poli(ácido γ -glutámico). El copolímero de injerto usado en la presente invención se prepara como nanopartículas. La acción como adyuvante se aumenta preparándolo como nanopartículas (ver Ejemplo 1). Para la preparación del poliaminoácido, se puede seleccionar y usar
25 apropiadamente un método conocido tal como un método de síntesis química o un método de fermentación. Un método para la preparación de la nanopartícula se describe más adelante.

El copolímero de injerto se usa como adyuvante para la fabricación de una vacuna. El copolímero de injerto se puede añadir en cualquier etapa de la preparación de una vacuna. Alternativamente, la vacuna se puede preparar
30 mezclando el copolímero de injerto con otros componentes para la vacuna en el momento de usar. Los componentes del copolímero de injerto, el enlace entre los aminoácidos constituyentes, el poliaminoácido preferible, la forma preferible del poliaminoácido y similares están descritos anteriormente. La cantidad del copolímero de injerto a añadir se puede ajustar apropiadamente dependiendo del tipo de antígeno, el tipo de enfermedad, la afección del sujeto o similares. La vacuna a preparar puede ser una cualquiera de los diversos tipos como se describen más adelante. Debido a que la capacidad del copolímero de injerto como adyuvante es alta y la toxicidad del copolímero de injerto está ausente o es baja, la vacuna obtenida usando el método de la presente invención es muy eficaz y da como resultado pocos efectos secundarios.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una vacuna que comprende el copolímero de injerto como adyuvante. El componente, el enlace entre los aminoácidos constituyentes, el tipo y forma y similares preferibles del poliaminoácido comprendido en la vacuna de la presente invención están descritos anteriormente. La vacuna de la
40 presente invención puede comprender, por ejemplo, un excipiente o un vehículo y, opcionalmente, un agente de suspensión, un agente isotonzante y un agente de conservación además del copolímero de injerto como adyuvante y un antígeno. La vacuna de la presente invención puede comprender además un adyuvante distinto del copolímero de injerto de la presente invención. Su forma de dosificación no está específicamente limitada. La vacuna puede formularse en cualquier forma, y la formulación se puede seleccionar dependiendo de diversos factores tales como la afección del sujeto o el tipo de enfermedad. Puede ser, por ejemplo, una suspensión o una disolución en un
45 vehículo acuoso adecuado, o un polvo, una cápsula o un comprimido. La vacuna puede estar en forma liofilizada, que se prepara en suspensión o se disuelve en un excipiente adecuado antes de usar. El método, vía y número de veces de administración de la vacuna de la presente invención no están específicamente limitados, y se pueden seleccionar dependiendo de diversos factores tales como la forma de dosificación, la afección del sujeto o el tipo de enfermedad. Por ejemplo, la vacuna de la presente invención se puede administrar por medio de inyección o infusión, o por administración oral. Alternativamente, se puede administrar localmente a un área afectada.

En la vacuna de la presente invención, el antígeno puede estar o no estar inmovilizado en el copolímero de injerto. Si el antígeno no está inmovilizado, hay una selección muy amplia para el antígeno. Seleccionando apropiadamente el antígeno dependiendo de factores tales como el tipo de enfermedad o afección del sujeto, la vacuna deseada se
55 puede preparar fácilmente. La vacuna en la que se inmoviliza el antígeno se describe más adelante.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una nanopartícula biodegradable en la que se inmoviliza un antígeno. Antígeno significa que puede provocar una inmunorreacción. La forma del antígeno puede ser, por ejemplo, un patógeno tal como un virus (por ejemplo, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)) o un microorganismo patógeno (por ejemplo, la tuberculosis) o una parte suya, o puede ser una proteína o un péptido, o un ácido nucleico. Preferiblemente, el antígeno usado en la presente invención es un antígeno viral. El tipo de
60

antígeno no está limitado específicamente, y se puede usar cualquier antígeno viral. Es preferible, por ejemplo, un antígeno retroviral tal como un antígeno VIH (por ejemplo, el antígeno VIH-1) o un antígeno HTLV (por ejemplo, el antígeno HTLV-1), un antígeno de virus influenza, un antígeno de flavivirus tal como un antígeno viral de la hepatitis C o un antígeno de virus West Nile, un antígeno del virus de la diarrea tal como un antígeno de rotavirus o un antígeno de norovirus, o un antígeno de coronavirus tal como un virus SARS. Un antígeno retroviral tal como un antígeno VIH o un antígeno HTLV es más preferible, y un antígeno VIH es lo más preferible. El antígeno inmovilizado en la nanopartícula biodegradable de la presente invención puede ser antígenos de múltiples tipos o formas diferentes.

Según la presente invención, inmovilizar el antígeno en una nanopartícula biodegradable significa que el antígeno y la nanopartícula biodegradable están físicamente enlazados entre sí. Preferiblemente, significa que el antígeno está incorporado o presente en la superficie de la partícula. La inmovilización del antígeno en la nanopartícula biodegradable se puede realizar por diversos métodos conocidos. Sus detalles se describen más adelante.

Como material para la nanopartícula biodegradable usada en la presente invención se pueden usar diversos materiales. La nanopartícula de la presente invención se administra a un organismo vivo. Por tanto, es preferible que la nanopartícula misma, o un producto de descomposición o metabolito suyo, sea segura. Preferiblemente, un componente principal (preferiblemente 50% en peso o más, sin un antígeno inmovilizado) de la nanopartícula biodegradable de la presente invención es un poliaminoácido, concretamente poli(ácido γ -glutámico). Los enlaces entre los aminoácidos que constituyen tal poliaminoácido pueden ser idénticos o diferentes unos a otros. Por ejemplo, todos los aminoácidos constituyentes se pueden unir por medio de enlaces peptídicos, o los aminoácidos se pueden unir parcial o totalmente por medio de enlaces distintos a los enlaces peptídicos. Los aminoácidos se pueden unir por medio de un eslabón.

Detalles del tipo, composición, método de preparación, forma, tamaño y similares de la nanopartícula biodegradable se describen más adelante.

En otro aspecto la presente invención se refiere a una vacuna que comprende la nanopartícula biodegradable en la que se inmoviliza el antígeno. Se puede usar como una vacuna la nanopartícula biodegradable obtenible como se ha descrito anteriormente, en la que se ha inmovilizado un antígeno. El antígeno inmovilizado en la nanopartícula biodegradable se puede seleccionar apropiadamente para obtener diversas vacunas. Preferiblemente puede ser una vacuna anti-VIH que comprende la nanopartícula biodegradable en la que se inmoviliza un antígeno VIH. En la vacuna de la presente invención, la nanopartícula biodegradable se usa como un soporte para la inmovilización del antígeno o un adyuvante. Finalmente, se descompone por enzimas catabólicas en un organismo vivo y se hace no tóxica o menos tóxica. La vacuna de la presente invención comprende la nanopartícula biodegradable en la que se inmoviliza el antígeno, y un excipiente o un vehículo, y opcionalmente otros componentes tales como un agente de suspensión, un agente isotonzante y un agente de conservación. Los ejemplos de vehículos o excipientes incluyen un vehículo acuoso tal como agua, etanol o glicerol, o un vehículo no acuoso tal como una grasa o aceite (por ejemplo, un ácido graso o un éster de ácido graso). La vacuna de la presente invención se puede formular en cualquier forma. La formulación se puede seleccionar dependiendo de factores tales como la afección del sujeto o el tipo de enfermedad. Puede ser, por ejemplo, una suspensión en un vehículo acuoso adecuado, o un polvo, una cápsula o un comprimido. Puede ser una vacuna liofilizada que se prepara en suspensión en un vehículo o excipiente adecuado antes de la administración y se usa. El método, vía y número de veces de administración de la vacuna de la presente invención no están limitados específicamente, y se pueden seleccionar dependiendo de factores tales como la formulación, las condiciones del sujeto o el tipo de enfermedad. Por ejemplo, la vacuna de la presente invención se puede administrar al sujeto por medio de inyección o infusión, o por administración oral. Alternativamente, se puede administrar localmente a un área afectada.

Además, cambiando apropiadamente el material, componente, peso molecular, tamaño u otros parámetros de la nanopartícula biodegradable, la proporción y tiempo de liberación del antígeno se pueden controlar. Se conocen en la técnica los métodos para proceder así. La nanopartícula de la invención se puede formular como una vacuna de liberación sostenida.

La vacuna de la presente invención se puede administrar a diversos sujetos con el fin de prevenir y tratar diversas enfermedades. La enfermedad y el sujeto administrado a los que la vacuna de la presente invención se puede aplicar no están limitados específicamente. Tal prevención y tratamiento se pueden realizar, por ejemplo, produciendo una célula presentadora de antígeno (APC) que presenta el antígeno junto con una molécula MHC de clase I, induciendo un CTL que lo reconoce específicamente, y dañando una célula cancerosa, una célula infectada o similares usando el CTL. Así, las enfermedades prevenidas y tratadas de acuerdo con la presente invención incluyen tumores malignos, e infecciones causadas por patógenos tales como virus o bacterias. Los tumores malignos incluyen cáncer de pecho, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer hepático, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, leucemia y melanoma maligno. Las infecciones incluyen leucemia de células T del adulto, hepatitis y síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Por ejemplo, la vacuna de la presente invención se puede usar para tratar la leucemia de células T del adulto (ver el Ejemplo 8).

También se describe aquí un método para la inmunización de un sujeto, que comprende administrar al sujeto la vacuna, que comprende la nanopartícula biodegradable en la que se inmoviliza un antígeno viral. Seleccionando

- 5 apropiadamente el antígeno viral inmovilizado en la nanopartícula biodegradable que está contenida en la vacuna de la presente invención, es posible inducir una inmunorreacción tal como inducción de un CTL o un anticuerpo específico para el antígeno viral en el sujeto. El método, vía, número de veces o similares de la administración de la vacuna de la presente invención se puede seleccionar apropiadamente dependiendo de diversos factores tales como la afección del sujeto o el tipo de antígeno viral.
- 10 También se describe aquí un método para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la vacuna, que comprende la nanopartícula biodegradable en la que se inmoviliza un antígeno viral. Seleccionando apropiadamente el antígeno viral inmovilizado en la nanopartícula biodegradable que está comprendida en la vacuna de la presente invención, es posible tratar y/o prevenir una amplia serie de enfermedades que incluyen, por ejemplo, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, leucemia de células T humana, infección por retrovirus, influenza, hepatitis C, infección por virus West Nile, infección por rotavirus, infección por norovirus y SARS así como diversos tumores. El método, vía, número de veces o similares de la administración de la vacuna de la presente invención se puede seleccionar apropiadamente dependiendo de diversos factores tales como las condiciones del sujeto, el tipo de enfermedad o tipo de antígeno viral.
- 15 La presente invención se refiere además al uso de la nanopartícula biodegradable en la que se inmoviliza un antígeno viral para la fabricación de la vacuna para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad. Seleccionando apropiadamente el antígeno viral inmovilizado en la nanopartícula biodegradable, es posible fabricar las vacunas para el tratamiento y/o prevención de diversas enfermedades tales como las descritas anteriormente.
- 20 La presente invención se refiere además al uso de la nanopartícula biodegradable en la que se inmoviliza un antígeno viral para la fabricación de la vacuna para la inmunización de un sujeto. Seleccionando apropiadamente el antígeno viral inmovilizado en la nanopartícula biodegradable, es posible fabricar la vacuna que induce una inmunorreacción específica para el antígeno viral en el sujeto.
- 25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una nanopartícula biodegradable en la que se inmoviliza un antígeno. Se pueden usar diversos materiales para la nanopartícula biodegradable usada en la presente invención. Tales materiales se conocen bien en la técnica, y se pueden seleccionar y usar apropiadamente. La nanopartícula de la presente invención se administra a un organismo vivo. Así, es preferible que la nanopartícula misma, o un producto de descomposición o metabolito suyo, sea segura o no tóxica o menos tóxica. Los ejemplos de tales materiales preferibles incluyen polipéptidos, polisacáridos, poliácidos orgánicos y sus mezclas.
- 30 Una nanopartícula biodegradable cuyo material principal es un polipéptido (denominada "nanopartícula polipeptídica biodegradable") tiene como cadena principal poli(ácido γ -glutámico). Sin embargo, la nanopartícula polipeptídica biodegradable consiste en dos o más tipos de aminoácidos. En la nanopartícula polipeptídica biodegradable, los enlaces entre todos los aminoácidos constituyentes pueden ser idénticos o diferentes unos a otros. Por ejemplo, todos los aminoácidos constituyentes se pueden unir por medio de enlaces peptídicos, o los aminoácidos se pueden unir parcial o totalmente por medio de otros enlaces distintos de enlaces peptídicos. Los aminoácidos pueden estar unidos por medio de eslabones. Por ejemplo, es posible conseguir un equilibrio deseado entre hidrofiliidad e hidrofobicidad introduciendo un aminoácido hidrofóbico en una cadena lateral de un poliaminoácido hidrofílico. De acuerdo con la presente invención, el polipéptido es un polímero de injerto que consiste en ácido γ -glutámico y éster etílico de fenilalanina.
- 35 Aunque la forma de la nanopartícula biodegradable usada en la presente invención no está limitada específicamente, en general la nanopartícula biodegradable es esférica. Su tamaño es 100 nm – 500 nm. Tal tamaño causa un efecto tal como un aumento de la cantidad de un antígeno inmovilizado resultante de un aumento del área superficial de una partícula por unidad de peso, promover la incorporación de un antígeno en una célula presentadora de antígeno que da por resultado la activación de un CTL, o la inducción de producción de anticuerpos. Para una nanopartícula en una forma distinta de una forma esférica, el tamaño preferible sigue al de una nanopartícula esférica.
- 40 La nanopartícula biodegradable usada en la presente invención se puede preparar aplicando un método conocido. Para la preparación de la nanopartícula polipeptídica biodegradable se puede usar, por ejemplo, el método de secado en líquido, método de secado por pulverización, método de cristalización esférica, método de sustitución de disolvente (precipitación o diálisis) o el método directo de dispersión por ultrasonidos. Por ejemplo, una nanopartícula biodegradable que consiste en poli(ácido γ -glutámico) se puede preparar por el método de sustitución de disolvente. Seleccionando o combinando apropiadamente tal(es) método(s), el material, componente, peso molecular, tamaño, carga u otros parámetros para la nanopartícula biodegradable se pueden hacer adecuados para el objetivo. Además, opcionalmente, se pueden reticular las matrices que unen las nanopartículas.
- 45 Como antígeno que se inmoviliza en la nanopartícula biodegradable se pueden usar diversos antígenos. El antígeno puede ser, por ejemplo, una proteína o un péptido, o un ácido nucleico, o puede ser un patógeno tal como un virus, una bacteria o un hongo, o una parte suya. Por ejemplo, un antígeno tumoral se puede inmovilizar en la nanopartícula biodegradable. Dependiendo de la condición del sujeto a ser administrado tal como la especie animal, edad, peso, estado de salud, o el tipo de enfermedad a prevenir o tratar (por ejemplo, la enfermedad que padece el sujeto o la predisposición del sujeto), un antígeno se puede seleccionar apropiadamente e inmovilizar en la

nanopartícula biodegradable. Se puede inmovilizar en la nanopartícula biodegradable un tipo de antígeno o dos o más tipos de antígenos.

La inmovilización del antígeno en la nanopartícula biodegradable se puede realizar por diversos métodos conocidos. Por ejemplo, son conocidos el método de unión por medio de un enlace covalente o un enlace iónico, o por fuerza intermolecular, el método de adsorción, el método de atrapamiento y similares. Por ejemplo, el antígeno se puede inmovilizar por medio de un enlace covalente entre un grupo funcional en la nanopartícula biodegradable y un grupo funcional en el antígeno. Alternativamente, el antígeno se puede inmovilizar por medio de un enlace iónico si la carga de la nanopartícula biodegradable es opuesta a la carga del antígeno. De acuerdo con el método de atrapamiento, un antígeno proteico por ejemplo se puede inmovilizar en la nanopartícula biodegradable de poli(ácido γ -glutámico) introduciendo un aminoácido hidrofóbico en poli(ácido γ -glutámico) por medio de un enlace covalente, disolviendo el producto en un disolvente orgánico, y después goteando la disolución en una disolución acuosa del antígeno. Además, el método de enlace, el método de adsorción y/o el método de atrapamiento se pueden combinar apropiadamente para inmovilizar el antígeno en la nanopartícula biodegradable. Por tanto el antígeno se puede incorporar a la nanopartícula biodegradable, o puede estar presente en la superficie de la nanopartícula biodegradable. Tal modo de inmovilización se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con el fin de uso de la vacuna (por ejemplo, el sujeto o tipo de enfermedad). En la nanopartícula biodegradable de la presente invención en la que el antígeno se inmoviliza, la conformación del antígeno no está influida por la unión con la nanopartícula biodegradable o por la incorporación a la nanopartícula biodegradable. Es ventajoso en que, por ejemplo, la cantidad o calidad de la proteína inmovilizada no cambia incluso después de la liofilización, y se puede almacenar durante un largo periodo.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una nanopartícula biodegradable en la que se inmoviliza un antígeno para la fabricación de una vacuna.

También se describe en la presente memoria un método para la inmunización de un sujeto, que comprende administrar al sujeto la vacuna que comprende una nanopartícula biodegradable en la que se inmoviliza un antígeno. El material para la nanopartícula biodegradable y similares están descritos anteriormente. Seleccionando apropiadamente el antígeno inmovilizado en la nanopartícula biodegradable que está comprendida en la vacuna de la presente invención, se puede inducir en el sujeto una inmunorreacción tal como la inducción de un CTL o un anticuerpo específico para el antígeno. Por ejemplo, se puede usar un patógeno tal como un virus o una parte del mismo como un antígeno para generar inmunidad a diversas infecciones en el sujeto. Además, por ejemplo cuando se usa la vacuna que comprende la nanopartícula biodegradable en la que se inmoviliza un antígeno tumoral, se induce en el sujeto una inmunorreacción específica para el tumor. El método, vía, número de veces o similares de la administración de la vacuna de la presente invención se pueden seleccionar apropiadamente dependiendo de diversos factores tales como la enfermedad del sujeto o el tipo de antígeno.

En la presente memoria se describe también un método para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la vacuna que comprende la nanopartícula biodegradable en la que se inmoviliza un antígeno. El material para la nanopartícula biodegradable y similares están descritos anteriormente. Seleccionando apropiadamente el antígeno inmovilizado en la nanopartícula biodegradable que está comprendida en la vacuna de la presente invención, se puede prevenir y/o tratar una amplia serie de enfermedades. Por ejemplo, se puede usar un patógeno tal como un virus o parte del mismo como un antígeno para tratar y/o prevenir diversas infecciones en el sujeto. Por ejemplo, usando la vacuna que comprende la nanopartícula biodegradable en la que se inmoviliza un antígeno tumoral, también se puede tratar y/o prevenir el tumor en el sujeto. El método, vía, número de veces y similares de la administración de la vacuna de la presente invención se pueden seleccionar apropiadamente dependiendo de diversos factores tales como las condiciones del sujeto, el tipo de enfermedad o el tipo de antígeno.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una nanopartícula biodegradable en la que se inmoviliza un antígeno para la fabricación de una vacuna para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad. El material para la nanopartícula biodegradable y similares están descritos anteriormente. Seleccionando apropiadamente el antígeno inmovilizado en la nanopartícula biodegradable, es posible fabricar la vacuna que induce una inmunorreacción específica para el antígeno en el sujeto.

La presente invención proporciona además el uso de una nanopartícula biodegradable como un vehículo. Cuando se usa en la presente memoria, vehículo significa un material que puede transportar una sustancia tal como un antígeno a un sitio deseado. Seleccionando apropiadamente el tamaño de la nanopartícula biodegradable dependiendo de, por ejemplo, un tejido o célula de interés, se puede aumentar un efecto de la nanopartícula biodegradable como vehículo. Se sabe que una célula presentadora de antígeno tiene una propiedad para absorber eficazmente una sustancia en partículas con 50 nm – 3 μ m de diámetro. Por tanto, el tamaño por ejemplo de la nanopartícula biodegradable de la presente invención se puede ajustar a tal tamaño. Puesto que la nanopartícula de la presente invención es biodegradable, es ventajoso que es no tóxica o menos tóxica para un organismo vivo. El material para la nanopartícula biodegradable, el poliaminoácido preferible y similares están descritos anteriormente.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende la nanopartícula biodegradable como vehículo. La composición farmacéutica de la presente invención puede ser cualquiera siempre

que comprenda la nanopartícula biodegradable. El material para la nanopartícula biodegradable, el poliaminoácido preferible y similares están descritos anteriormente.

La presente invención proporciona además el uso de la nanopartícula biodegradable como vehículo para la fabricación de la composición farmacéutica. Cualquier sustancia puede estar comprendida en la composición farmacéutica. Por ejemplo, puede estar comprendido un antígeno tal como un antígeno tumoral o un antígeno viral, o puede estar comprendida una sustancia para la que se conoce un efecto de activación de una célula presentadora de antígeno. El material para la nanopartícula biodegradable, el poliaminoácido preferible y similares están descritos anteriormente.

Los ejemplos siguientes ilustran la presente invención con más detalle, pero no se han de interpretar para limitar el alcance de la misma. En los ejemplos, poli(ácido γ -glutámico) se abrevia como γ -PGA.

Ejemplo 1

Acción adyuvante de γ -PGA

Se aislaron células de médula ósea de un miembro inferior de ratón y se cultivaron en presencia de GM-CSF para obtener células dendríticas inmaduras (iDCs). Las iDCs se cultivaron después en el medio que contenía 100 μ g/ml de γ -PGA o 100 μ g/ml de nanopartículas de γ -PGA (tamaño, 177 nm) durante 2 días. Las células resultantes se co-cultivaron con linfocitos T de un ratón alogénico durante 3 días. Tras el cultivo, los linfocitos T se incubaron con 3 H-timidina durante 16 horas. Midiendo las cantidades incorporadas, se examinó si el γ -PGA y la nanopartícula de γ -PGA inducían o no la diferenciación de iDCs en células dendríticas maduras (mDCs) y estas mDCs activaban los linfocitos T. Como un control negativo se usaron las iDCs que habían sido cultivadas en el medio sin γ -PGA. Los resultados se representan como valores que definen la cantidad de incorporación de 3 H-timidina en el control negativo como 100 (%) (Fig. 1). Se descubrió que: el γ -PGA aumenta la cantidad de incorporación de 3 H-timidina en linfocitos T, es decir, permite a las iDCs diferenciarse y madurar en mDCs; las mDCs activan los linfocitos T; y esta acción (es decir, acción adyuvante) es mejorada preparando γ -PGA como una nanopartícula.

Ejemplo 2

Desarrollo de la diferenciación y maduración de célula dendrítica (DC) por nanopartícula de γ -PGA.

A. Aumento de la expresión de molécula superficial en DC por nanopartícula de γ -PGA.

Las iDCs obtenidas de acuerdo con el método del Ejemplo 1 se cultivaron en el medio que contenía 75, 150 ó 300 μ g/ml de nanopartículas de γ -PGA durante 2 días. Tras el cultivo, las moléculas de la superficie celular cuya expresión se aumenta a medida que las DCs se diferencian y maduran (CD40, CD80, CD86, MHC de clase I y MHC de clase II) se midieron usando un citómetro de flujo. Las iDCs que se habían cultivado en el medio sin una nanopartícula de γ -PGA se usaron como un control negativo, y las mDCs obtenidas cultivando iDCs en el medio que contenía LPS (lipopolisacárido), que se conoce como un agente inductor de diferenciación para las DCs, se usaron como un control positivo. Se descubrió que la nanopartícula de γ -PGA puede aumentar la expresión de CD40, CD86 y MHC de clase I de una manera dependiente de la concentración, es decir, puede inducir la diferenciación de iDCs en mDCs y activarlas (ver Fig. 2).

B. Aumento de la cantidad de producción de citoquinas en DC por nanopartícula de γ -PGA

Las iDCs obtenidas de acuerdo con el método del Ejemplo 1 se incubaron con nanopartículas de γ -PGA (75, 150 ó 300 μ g/ml). Tras la incubación durante 2, 6, 24 ó 48 horas, se recogieron los sobrenadantes de cultivo. Las citoquinas (IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α) producidas y segregadas de las DCs se cuantificaron por ELISA. Las iDCs que se habían incubado en el medio sin una nanopartícula de γ -PGA durante el mismo periodo de tiempo se usaron como un control negativo, y las mDCs obtenidas incubando las iDCs con LPS durante el mismo periodo de tiempo se usaron como un control positivo. Se descubrió que la nanopartícula de γ -PGA aumenta las cantidades de producción de IL-1 β , IL-12 y TNF- α (ver Fig. 3). Además, se descubrió que los aumentos de las cantidades de producción de IL-12 y TNF- α son mejorados de una manera dependiente de la concentración de la nanopartícula de γ -PGA. Se confirmó que la nanopartícula de γ -PGA induce la diferenciación de iDCs en mDCs y las activa, porque las cantidades de producción de estas citoquinas se elevan a medida que las DCs se diferencian y maduran.

Ejemplo 3

Acción activadora de linfocitos T por nanopartícula de γ -PGA inducida por diferenciación de iDCs

Según el método del Ejemplo 1, las iDCs se diferenciaron cultivando en el medio que contenía nanopartículas de γ -PGA (75, 150 ó 300 μ g/ml) durante 2 días. Las células resultantes se co-cultivaron después con linfocitos T de un ratón alogénico durante 4 días. Tras el cultivo se incubaron linfocitos T con 3 H-timidina durante 16 horas. Midiendo las cantidades de su incorporación, se examinó la acción activadora de linfocitos T de las iDCs diferenciadas. Las iDCs que se habían cultivado en el medio sin una nanopartícula de γ -PGA se usaron como un control negativo, y las

mDCs obtenidas por diferenciación y maduración con LPS se usaron como un control positivo. Se confirmó que las cantidades de incorporación de ^3H -timidina en linfocitos T se elevan de una manera dependiente de la concentración de nanopartícula de γ -PGA usada para la diferenciación de las iDCs, es decir, la acción activadora de linfocitos T por nanopartícula de γ -PGA se eleva de una manera dependiente de la concentración (ver Fig. 4).

5 Ejemplo 4

Inducción de célula productora de γ -interferón por nanopartícula de γ -PGA que tiene antígeno VIH (p24) incorporado

Se inmunizaron ratones hembra BALB/c(H-2d) de 6 a 8 semanas de edad con el γ -PGA que tenía un antígeno p24 (p24-NP) incorporado, tres veces en intervalos de 7 días. Como controles se usaron PBS (control negativo), la nanopartícula de γ -PGA (NP) sola, el antígeno p24 (p24) solo, y la mezcla del antígeno p24 y la nanopartícula de γ -PGA (p24+NP). Las cantidades de la nanopartícula de γ -PGA y antígeno p24 usadas fueron 1 mg y 25 μg por inmunización, respectivamente. El día 10 después de la inmunización final, se recogieron células de los bazo y se incubaron con 10 mg/ml de péptido p24 (AMQMLKETI) (No ID SEC: 1)) ó 10 mg/ml de proteína p24 recombinante durante 24 horas. Los números de células productoras de IFN- γ específico de p24 se determinaron por ensayo ELISPOT (BD Bioscience). Todos los datos están representados usando los promedios de manchas formadas por 1×10^6 células (SFU) \pm SE. Los significados estadísticos se analizaron utilizando la prueba-t. Los resultados se muestran en la Fig. 5. Se descubrió que se inducen más células productoras de IFN- γ en el grupo de la inmunización con p24-NP que en los grupos de la inmunización con p24 solo y p24+NP.

Ejemplo 5

20 Inducción de anticuerpo específico de antígeno por nanopartícula de γ -PGA que tiene antígeno VIH-1 (p24) incorporado

Se inmunizaron ratones hembra BALB/c(H-2d) de 6 a 8 semanas de edad con las nanopartículas de γ -PGA que tenían un antígeno p24 (p24-NP) incorporado, dos veces en intervalos de dos semanas (n=4). Como controles se usaron PBS (control negativo), la nanopartícula de γ -PGA sola, el antígeno p24 (p24) solo, y la mezcla del antígeno p24 y adyuvante de Freund completo (p24+CFA). Las cantidades de la nanopartícula de γ -PGA y antígeno p24 usados fueron 1 mg y 25 μg por inmunización, respectivamente. El día 10 después de la inmunización final, se recogió sangre, y se midieron los niveles del anticuerpo específico del antígeno contenido en los sueros. El título final de anticuerpo se representa como un inverso de la proporción de dilución final que da por resultado una absorbancia mayor (450 nm) en 2SDs (aproximadamente 0,1) que la de para un ratón no inmunizado. Los significados estadísticos se analizaron usando la prueba-t. Los resultados se muestran en la Fig. 6. Se descubrió que los títulos de anticuerpo en los sueros del grupo de la inmunización con p24-NP son mucho mayores en comparación con los del grupo de la inmunización con p24 solo. Además, estos valores son compatibles con los del grupo de la inmunización con CFA que es un adyuvante conocido (p24+CFA).

35 Los resultados de los Ejemplos 4 y 5 revelan la eficacia de la vacuna que comprende la nanopartícula biodegradable en la que se inmoviliza un antígeno, de la presente invención, en particular la vacuna anti-VIH. Se confirmó además que la nanopartícula de γ -PGA tiene un efecto como adyuvante.

Ejemplo 6

Experimento para prevenir injerto de crecimiento tumoral por nanopartícula de γ -PGA (poli(ácido γ -glutámico)) con OVA inmovilizada

A. Materiales

40 Se compraron ratones C57/BL6 (hembra, de 6 semanas de edad) de Japan SLC, Inc., y se compró de Wako Pure Chemical Industries, Ltd., adyuvante de Freund completo. Se compraron de American Type Culture Collection células EG7 que expresan OVA y se cultivaron usando medio RPMI 1640 completo (SIGMA) que contenía 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G418 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

B. Métodos

45 607 mg (4,7 mmoles unitarios) de γ -PGA (peso molecular 300.000) se disolvieron en 100 ml de disolución acuosa de NaHCO_3 54 mM (pH 8,5). Se añadieron después 901 mg (4,7 mmoles) de hidrócloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (WSC) y 1080 mg (4,7 mmoles) de éster etílico de L-fenilalanina (L-PAE), y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante una noche con agitación. Tras la reacción, la disolución resultante se dializó frente a agua durante 3 días usando una membrana de diálisis (peso molecular de fraccionamiento 50.000) y se liofilizó. El liofilizado resultante se añadió a 100 ml de etanol y se agitó durante una noche. La disolución resultante se centrifugó (1.500xg, 20 minutos). El precipitado se secó bajo una presión reducida para obtener γ -PGA-g-L-PAE. Se disolvieron 100 mg de γ -PGA-g-L-PAE en 10 ml de DMSO a una concentración de 10 mg/ml. Se mezclaron e hicieron reaccionar volúmenes iguales (1 ml) de 10 mg/ml de γ -PGA-g-L-PAE y 2 mg/ml de OVA (SIGMA). Tras reacción, la mezcla se centrifugó a 14.000xg durante 15 minutos. Se separó el

sobrenadante, y el precipitado se volvió a dispersar en PBS. Este procedimiento se repitió para eliminar la OVA sin reaccionar. Finalmente se prepararon 10 mg/ml de nanopartícula de γ -PGA con OVA incorporada. Se descubrió que el γ -PGA en la forma anfipática puede incorporar eficaz, homogénea y convenientemente la proteína de interés solamente dispersándolo en una disolución de la proteína.

5 100 μ l de muestras que comprendían 100 μ g y 10 μ g de OVA se inyectaron subcutáneamente para inmunizar ratones. Se mezcló bien adyuvante de Freund completo (CFA) con un volumen igual de disolución de proteína OVA de 2 mg/ml para obtener una emulsión. La emulsión se utilizó como control. Una semana después de la inmunización, se inocularon células EG7 a 1×10^6 células/50 μ l por ratón mediante inyección intradérmica en el abdomen. Tras la inoculación de células EG7, se midieron a lo largo del tiempo los diámetros de los tumores, y se
10 calcularon los volúmenes tumorales de acuerdo con la siguiente ecuación;

$$(\text{volumen tumoral: mm}^3) = (\text{diámetro más largo del tumor: mm}) \times (\text{diámetro más corto del tumor: mm})^2 \times 0,5236$$

C. Resultados

Como se muestra en la Fig. 7, se confirmó un retraso notable en el crecimiento tumoral en los grupos de la
15 inmunización con nanopartículas de γ -PGA con OVA incorporada (nanopartícula de γ -PGA/OVA (100) y (10)) en comparación con el grupo de la inmunización con PBS. Se observó un ligero retraso en el injerto tumoral en los grupos de la inmunización con nanopartículas de γ -PGA sin OVA y la inmunización con OVA (nanopartícula de γ -PGA vacía/OVA (100) y (10)). Se considera que esto está causado por la incorporación de OVA, absorbida en la superficie de la nanopartícula de γ -PGA, a las células presentadoras de antígeno. Estos resultados muestran que la nanopartícula de γ -PGA tiene una propiedad de ser fácilmente incorporada a la célula presentadora de antígeno.
20 Además, las nanopartículas de γ -PGA con OVA incorporada obtenidas en este ejemplo muestran un efecto antitumoral más fuerte que el del grupo de la inmunización con adyuvante de Freund completo (CFA/OVA (100)) que actualmente se sabe que tiene la capacidad más fuerte para inducir CTLs a nivel experimental animal. Se confirmó que las nanopartículas de γ -PGA con OVA incorporada obtenidas en este ejemplo se pueden almacenar en un estado liofilizado y no tienen citotoxicidad. Por tanto, se reveló que la nanopartícula de γ -PGA con OVA incorporada
25 satisface completamente los requisitos como vehículo y adyuvante para una vacuna.

Ejemplo 7

Experimento para inducir CTL usando nanopartícula de γ -PGA con OVA inmovilizada

A. Materiales

30 Se proporcionaron células EL4 que expresan OVA por Cancer Cell Repository, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, y se cultivaron usando medio RPMI 1640 completo (SIGMA) que contenía 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M (Invitrogen), 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 10% de suero bovino fetal (FBS). Se compró mitomicina C de Wako Pure Chemical Industries, Ltd., se compró IL-2 recombinante de ratón de Peprotech, y se compró $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ de Amersham Bioscience. En el Ejemplo 6 se describen ratones C57/BL6, adyuvante de Freund completo y células EG7.

B. Métodos

Se prepararon nanopartículas de γ -PGA con OVA incorporada como se describe en el Ejemplo 6. La inmunización de ratones se realizó inyectando subcutáneamente 100 μ l de muestra que comprendía 100 μ g ó 25 μ g de OVA. El día 10 después de la inmunización, se pasaron esplenocitos a través de mallas de nailon para desunirlas en células sencillas, y se recogieron células mononucleares. Las células mononucleares (4×10^6 células/ml) recogidas de cada
40 ratón inmunizado se co-cultivaron con EG7 (4×10^5 células/ml) que se habían tratado con 30 μ g/ml de mitomicina C durante 30 minutos en medio RPMI 1640 completo que contenía 10 U/ml de IL-2 de ratón, durante 5 días (37°C, CO_2 al 5%) para preparar células efectoras. Como células diana se usaron células EL4 y células EG7 marcadas con $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (0,56 MBq/ 10^5 células 37°C, 1 hora). Las células diana se añadieron a una placa de 96 pocillos a la concentración de 10^4 células/pocillo, y después se añadieron células efectoras a la concentración de 12,5, 25, 50 ó
45 100×10^4 células/pocillo. Se incubaron a 37°C durante 4 horas, y se midieron las actividades de ^{51}Cr en los sobrenadantes. Las actividades de los CTLs se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Lisis (\%)} = 100 \times \{(\text{liberación de } ^{51}\text{Cr con células efectoras}) - (\text{Liberación espontánea de } ^{51}\text{Cr})\} / \{(\text{Liberación máxima de } ^{51}\text{Cr}) - (\text{Liberación espontánea de } ^{51}\text{Cr})\}$$

C. Resultados

50 Se observó inducción de CTLs específicos de OVA en bazos de ratones inmunizados con nanopartículas de γ -PGA (Fig. 8(a) y (b)). Mostraron efectos antitumorales más intensos que los del grupo de la inmunización con CFA/OVA (Fig. 8(d)). No se observó actividad de CTLs en el grupo de la inmunización con OVA sola (Fig. 8(e)). En el grupo de nanopartícula de γ -PGA vacía/OVA (Fig. 8(c)), se encontró una ligera actividad de CTLs. Se considera que esto está causado por la incorporación de OVA, absorbida en la superficie de la nanopartícula de γ -PGA, a las células

presentadoras de antígeno. Estos resultados muestran que una nanopartícula de γ -PGA que es biodegradable tiene una propiedad de ser fácilmente incorporada a una célula presentadora de antígeno y una muy excelente capacidad como vehículo y adyuvante para un antígeno inductor de CTLs.

Ejemplo 8

5 Experimento para inducir CTL usando nanopartícula de γ -PGA con Tax₃₈₋₄₆ inmovilizado

A. Materiales

10 Se compraron ratones C3H/HeJ (hembra, de 6 semanas de edad) de Japan SLC, Inc. Se compraron fibroblastos de ratón (L929) de ATCC, y se cultivaron usando medio MEM completo (SIGMA) que contenía 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina (Wako Pure Chemical Industries Ltd.) y suero de bovino fetal (FBS) al 10%. Se compró péptido Tax₃₈₋₄₆ de SIGMA Genosys. El adyuvante de Freund completo y Na₂⁵¹CrO₄ están descritos anteriormente.

B. Métodos

15 Como se describe en el Ejemplo 6, se prepararon nanopartículas de γ -PGA que tenían incorporado péptido Tax₃₈₋₄₆ que es un epítipo de virus de leucemia de células T humana (HTLV-1) restringido al H-2K^K de ratón. Las inmunizaciones de ratones se realizaron inyectando subcutáneamente 100 μ l de muestra que contenía 100 pmoles ó 10 pmoles de péptido Tax₃₈₋₄₆ tres veces en intervalos de una semana. El día 10 después de la inmunización final, se recogieron células mononucleares como se describe en el Ejemplo 7. Se trataron células mononucleares (1x10⁷ células/ml) con 30 μ g/ml de mitomicina C durante 30 minutos, y se mezclaron con células L929 puestas en acción con péptido Tax₃₈₋₄₆ 1 μ M (2,5x10⁶ células/ml) en la relación de 4:1. Se co-cultivaron en medio RPMI 1640 completo que contenía 10 U/ml de IL-2 de ratón durante 5 días (37°C, CO₂ al 5%) para preparar células efectoras. Como 20 células diana se usaron células L929 que se habían hecho reaccionar con péptido Tax₃₈₋₄₆ 1 μ M y se marcaron con Na₂⁵¹CrO₄ (0,56 MBq/10⁶ células, 37°C, 1 hora). Se añadieron células diana a una placa de 96 pocillos a la concentración de 10⁴ células/pocillo, y se añadieron después células efectoras a las concentraciones de 12,5, 25, 50 ó 100x10⁴ células/pocillo. Se incubaron a 37°C durante 4 horas, y se midieron las actividades de ⁵¹Cr en los sobrenadantes. Las actividades de CTLs se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación:

25
$$\text{Lisis (\%)} = 100 \times \frac{\{(\text{liberación de } ^{51}\text{Cr con células efectoras}) - (\text{Liberación espontánea de } ^{51}\text{Cr})\}}{\{(\text{Liberación máxima de } ^{51}\text{Cr}) - (\text{Liberación espontánea de } ^{51}\text{Cr})\}}$$

C. Resultados

30 Como se muestra en la Fig. 9(a), se observó inducción de CTLs específicos de Tax₃₈₋₄₆ en bazos de ratones inmunizados con nanopartículas de γ -PGA en comparación con la del grupo de la inmunización con PBS (Fig. 9(d)). Estos fueron efectos antitumorales más intensos que los del grupo de la inmunización con CFA/Tax₃₈₋₄₆ (Fig. 9(b)). En el grupo de la inmunización con Tax₃₈₋₄₆ solo, no se observó actividad de CTLs (Fig. 9(c)). Las nanopartículas con Tax₃₈₋₄₆ inmovilizado obtenidas en este ejemplo tienen una propiedad o característica similar a las obtenidas en los Ejemplos 6 y 7.

Ejemplo 9

35 Prueba para eliminar metástasis pulmonar tumoral usando nanopartícula de γ -PGA con OVA inmovilizada

A. Materiales

40 Se proporcionaron células B16-OVA, que se habían preparado introduciendo cDNA de OVA junto con gen de resistencia a higromicina B en células de melanoma B16, por el Dr. Yasuharu NISHIMURA del Departamento de Inmunogenética, Facultad de Ciencias Médicas y Farmacéuticas, Kumamoto University. Se cultivaron usando DMEM que contenía FBS al 10%, 2-ME 50 μ M y 200 μ g/ml de higromicina B. Se compraron ratones C57/BL6 (H-2^b; de 7 a 10 semanas de edad, hembras) de Japan SLC, Inc. Otros materiales están descritos anteriormente.

B. Métodos

45 Se administraron células B16-OVA (1x10⁶ células) en venas de la cola de ratones C57BL/6. El día 0, 3 y 7 después de la inoculación, se inmunizaron ratones administrando subcutáneamente a sus lomos nanopartículas de γ -PGA con OVA incorporada (nanopartícula de γ -PGA/OVA), OVA emulsionada con CFA (CFA/OVA) o disolución de OVA (OVA sola) (n=9) preparada como se ha descrito anteriormente. Se usaron 100 μ g de OVA. Se administró PBS como control negativo. El día 25 se separaron los pulmones y se fijaron con disolución de Bouin (una disolución saturada de ácido pícrico: formaldehído: ácido acético glacial = 15:3:1). El número de colonias metastatizadas en la superficie pulmonar se contó bajo el microscopio estereoscópico. Los significados estadísticos se analizaron usando la prueba de Mann-Whitney. Los resultados se presentan como porcentaje (%) respecto al número de las colonias metastatizadas del grupo de la administración de PBS (Fig. 10).

C. Resultados

5 Se confirmó que el grupo de la inmunización con nanopartícula de γ -PGA/OVA ($p < 0,01$) tiene efectos de eliminación de metástasis pulmonar que previenen el injerto pulmonar de células B16-OVA al pulmón que tienen alta capacidad para metastatizarse al pulmón. Además, los efectos fueron más intensos que los de CFA/OVA ($p < 0,01$). Se confirmó que la nanopartícula de γ -PGA/OVA es útil también para el tratamiento.

Ejemplo 10

Evaluación de la seguridad de la nanopartícula de γ -PGA por análisis histopatológico del sitio administrado con nanopartícula de γ -PGA.

A. Métodos

10 10 mg/ml de nanopartícula de γ -PGA, CFA e IFA emulsionados con igual volumen de PBS, o PBS (20 μ l/ratón) se administraron subcutáneamente a las almohadillas plantares de ratones. El día 7 después de la administración se amputaron las almohadillas plantares. Se fijaron con formalina tamponada neutra al 10% y se incrustaron en bloques de parafina. Se prepararon secciones tisulares de 5 μ m, y se tiñeron muestras con hemetoxilina-eosina para realizar observación histopatológica.

15 C. Resultados

En tejidos subcutáneos de ratones administrados con CFA e IFA, se indujeron reacciones inflamatorias. En cambio, las nanopartículas de γ -PGA dañaron solo ligeramente el sitio administrado, y se observó poca infiltración de células inflamatorias (datos no mostrados). Se confirmó que la nanopartícula de γ -PGA tiene alta seguridad.

Aplicabilidad Industrial

20 La presente invención proporciona un adyuvante seguro y eficaz y una vacuna que usa el mismo. Por tanto, la presente invención se puede usar en los campos de la medicina y similares (por ejemplo, el campo de la preparación de la medicina para la prevención, tratamiento o diagnóstico de enfermedades).

LISTADO DE SECUENCIA

<110> OSAKA UNIVERSITY
KAGOSHIMA UNIVERSITY

<120> **Poliaminoácido como adyuvante**

<130> 666687

<150> JP 2005-122650
<151> 2005-04-20

<150> JP 2005-224519
<151> 2005-08-02

<150> JP 2005-270146
<151> 2005-09-16

<160> 1

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de inmunodeficiencia humana

<400> 1

Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un copolímero de injerto de poli(ácido γ -glutámico) y éster etílico de L-fenilalanina para usar como adyuvante para una vacuna, donde el poli(ácido γ -glutámico) se prepara como una nanopartícula y donde la nanopartícula tiene un tamaño de 100 nm – 500 nm.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende un copolímero de injerto de poli(ácido γ -glutámico) y éster etílico de L-fenilalanina para usar como adyuvante para una vacuna, donde el poli(ácido γ -glutámico) se prepara como una nanopartícula y donde la nanopartícula tiene un tamaño de 100 nm – 500 nm.
3. Un copolímero de injerto según la reivindicación 1 o una composición según la reivindicación 2 donde un antígeno viral se inmoviliza en la nanopartícula.
- 10 4. Un copolímero de injerto o una composición según la reivindicación 3, donde el antígeno viral se selecciona del grupo consistente en un antígeno retroviral, un antígeno de virus influenza, un antígeno de flavivirus, un antígeno del virus de la diarrea y un antígeno de coronavirus.
5. Un copolímero de injerto o una composición según la reivindicación 4, donde el antígeno viral es un antígeno retroviral.
- 15 6. Un copolímero de injerto o una composición según la reivindicación 5, donde el antígeno retroviral es un antígeno VIH.
7. Un copolímero de injerto o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, donde el antígeno se incorpora a la nanopartícula.
- 20 8. Un copolímero de injerto o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, donde el antígeno está presente en la superficie de la nanopartícula.
9. Un copolímero de injerto o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 para la inmunización de un sujeto o para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un sujeto.
10. Un copolímero de injerto o una composición según la reivindicación 9, donde la enfermedad es el VIH.

Fig. 1

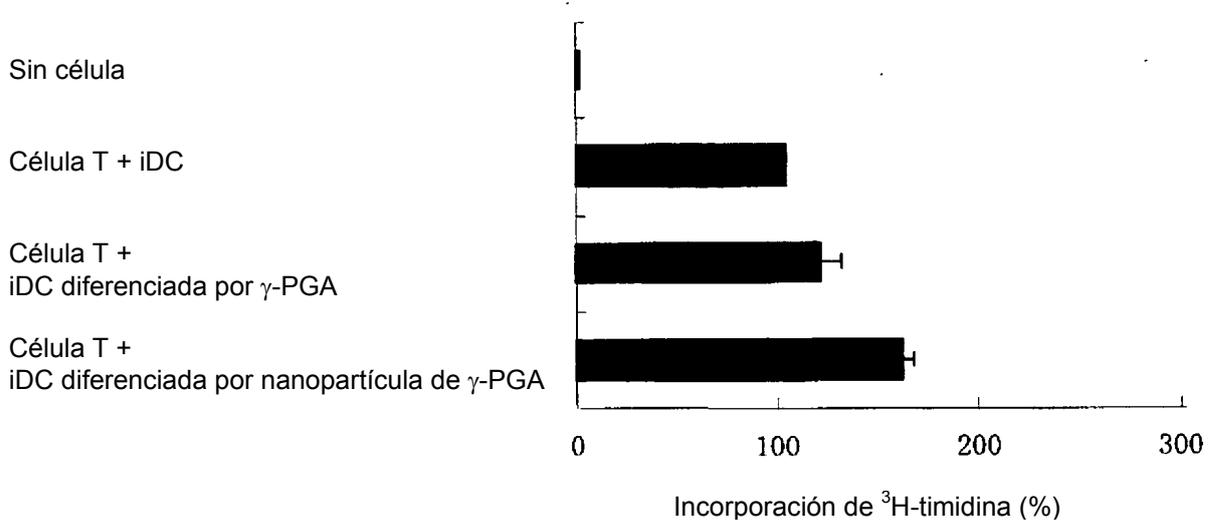


Fig. 2

Célula	CD40	CD80	CD86	MHC de clase I	MHC de clase II
iDC	100	100	100	100	100
mDC	460	226	227	268	275
iDC + nanopartícula de γ -PGA (75 μ g/ml)	173	97	91	180	140
iDC + nanopartícula de γ -PGA (150 μ g/ml)	233	83	157	213	160
iDC + nanopartícula de γ -PGA (300 μ g/ml)	353	86	227	235	148

La medida es el valor que define la expresión (intensidad fluorescente media) en iDC como 100.

Fig. 3

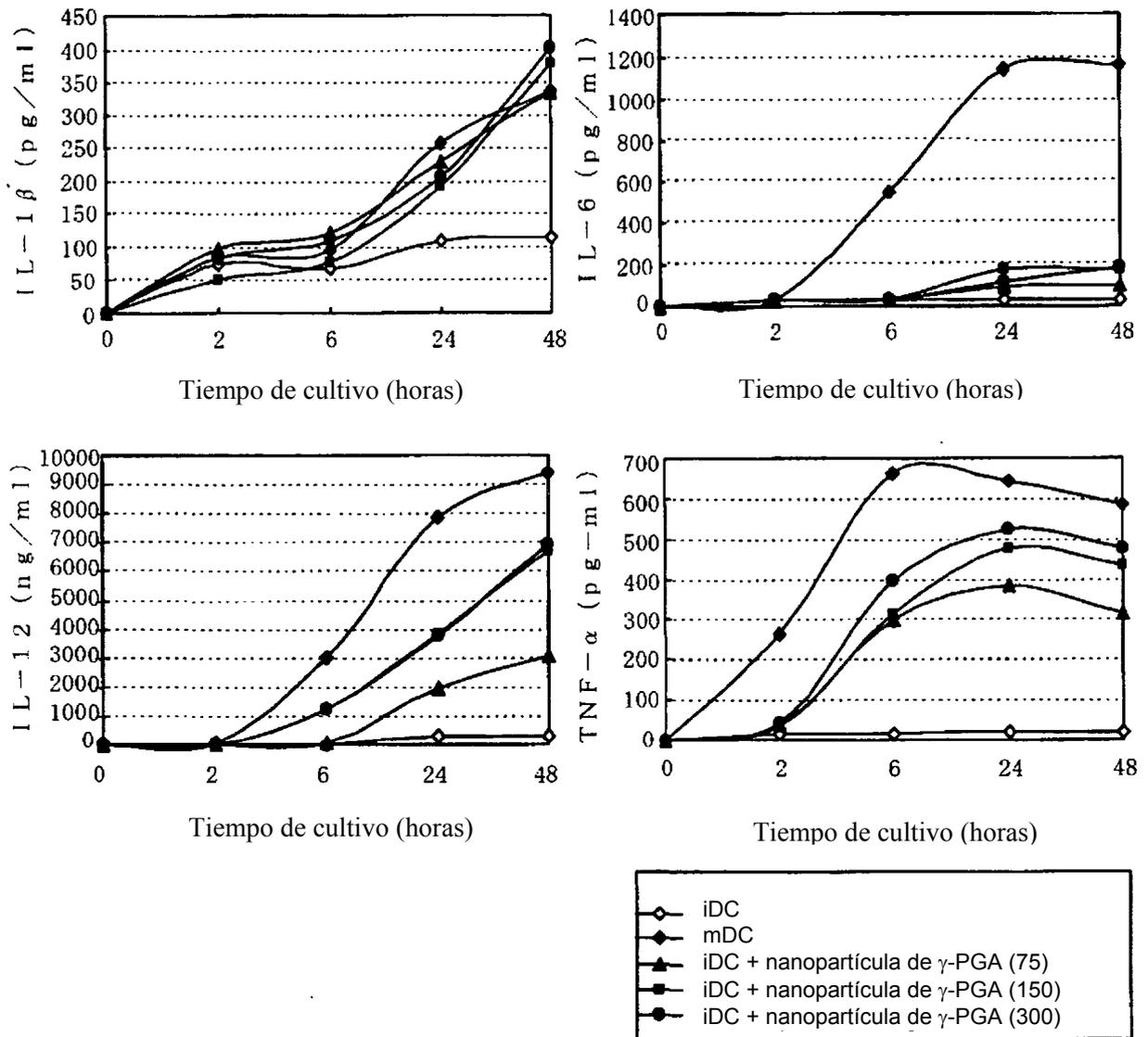


Fig. 4

Célula	Cantidad de ^3H -timidina incorporada
Célula T sola	9±4
mDC sola	15±6
Célula T + iDC	100
Célula T + mDC	338±126
Célula T + iDC diferenciada por 75 $\mu\text{g/ml}$ de nanopartícula de γ -PGA	255±13
Célula T + iDC diferenciada por 150 $\mu\text{g/ml}$ de nanopartícula de γ -PGA	545±87
Célula T + iDC diferenciada por 300 $\mu\text{g/ml}$ de nanopartícula de γ -PGA	1427±440

Valor que define la cantidad de incorporación de ^3H -timidina en el caso de célula T + iDC como 100

Fig. 5

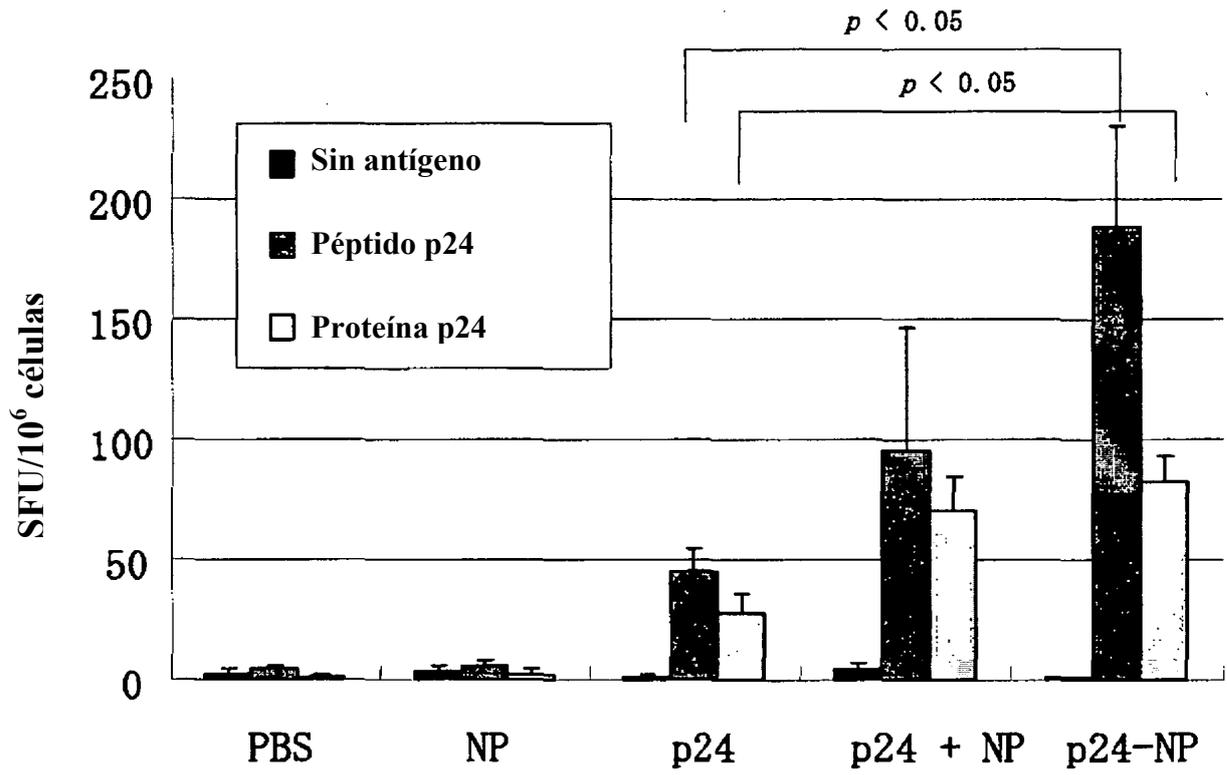


Fig. 6

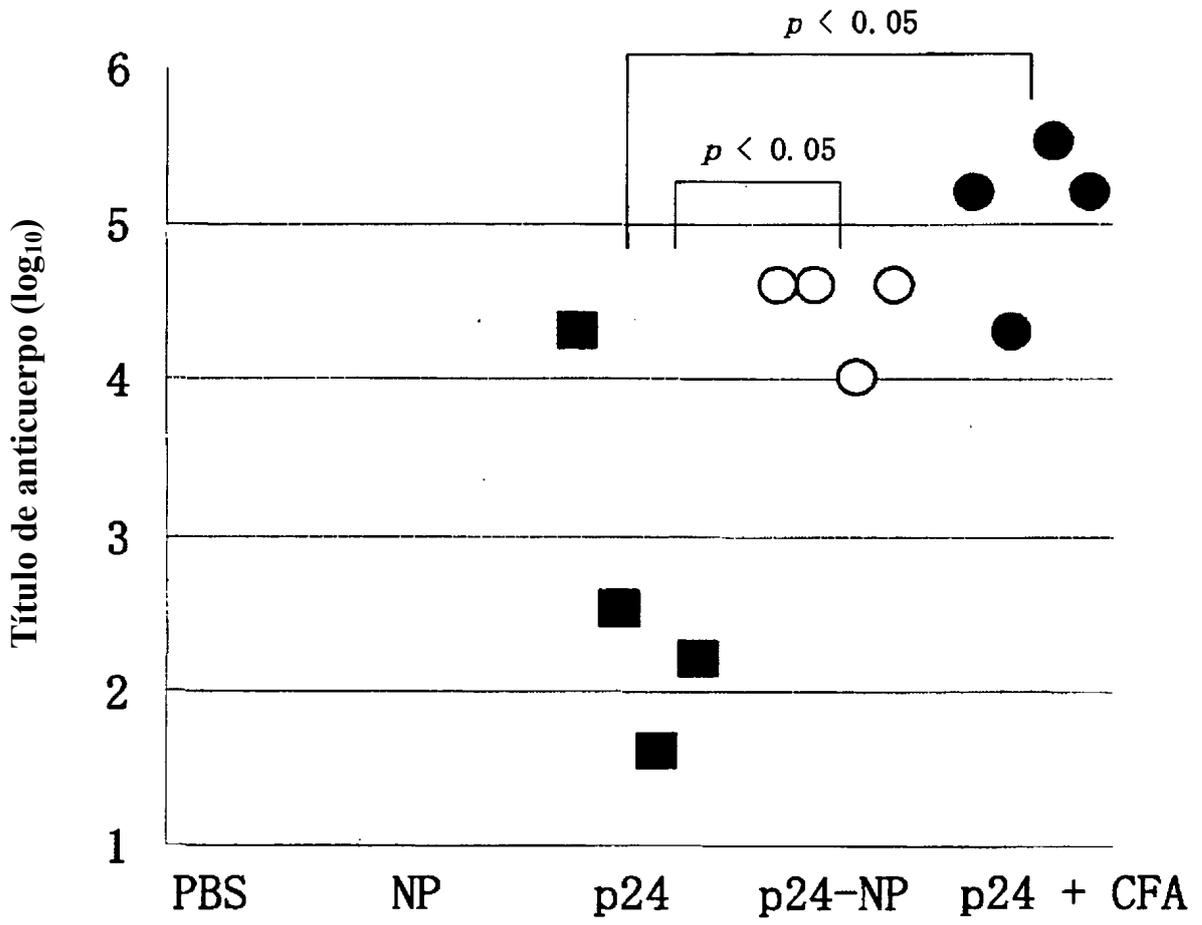


Fig. 7

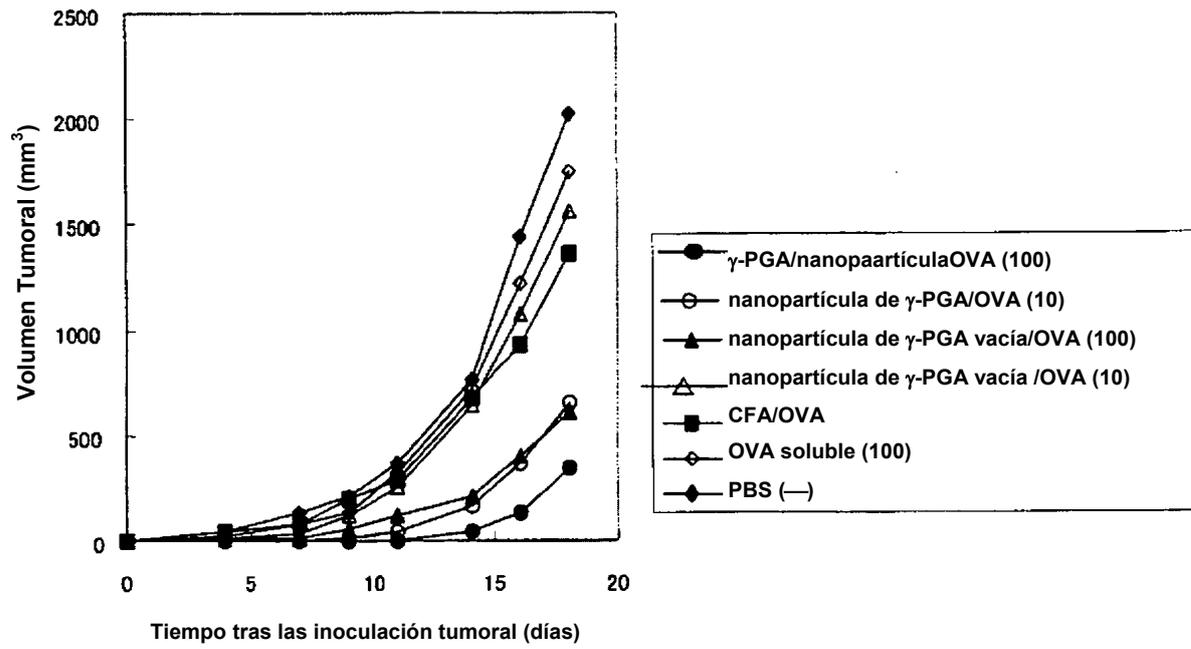


Fig. 8

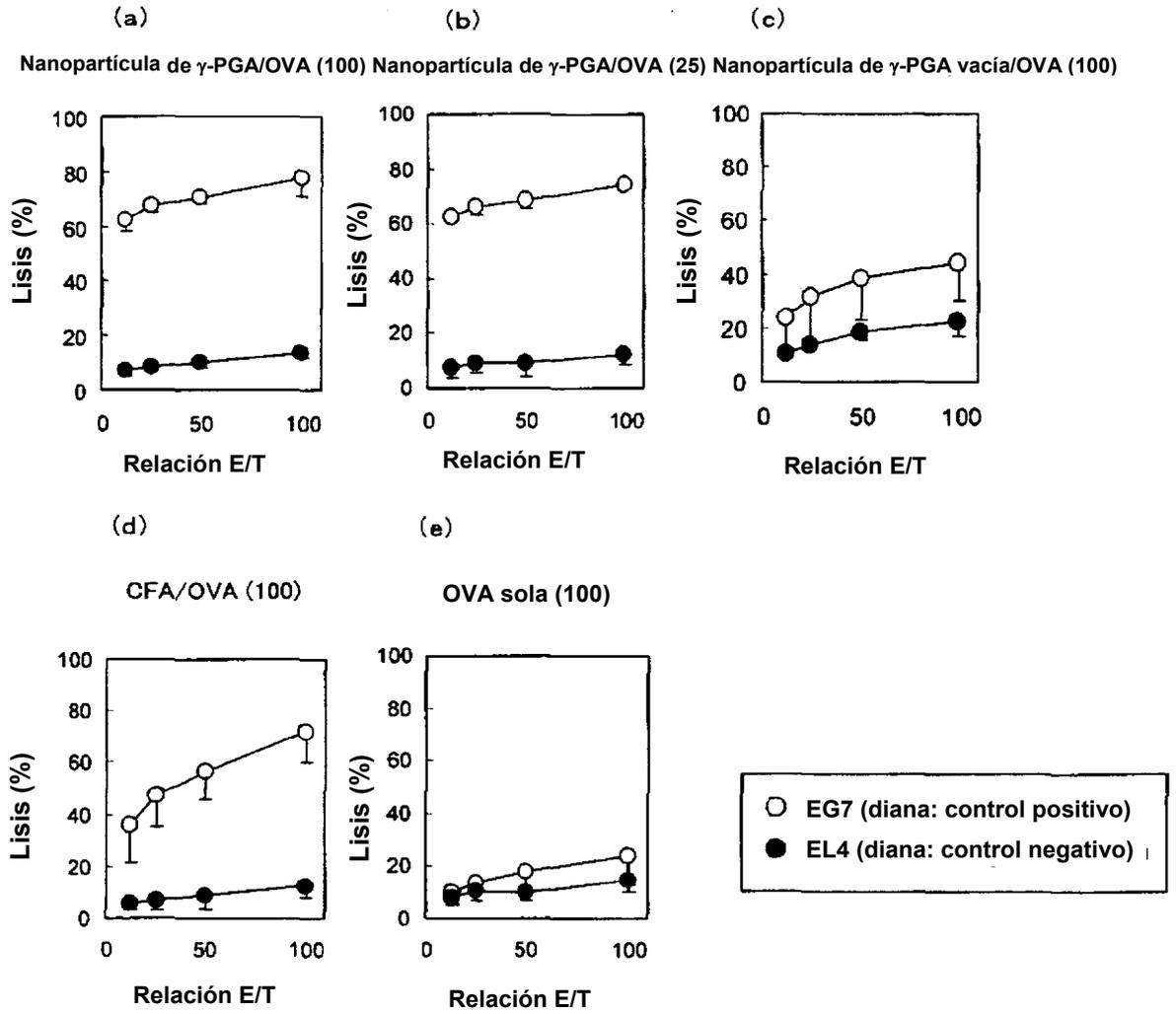


Fig. 9

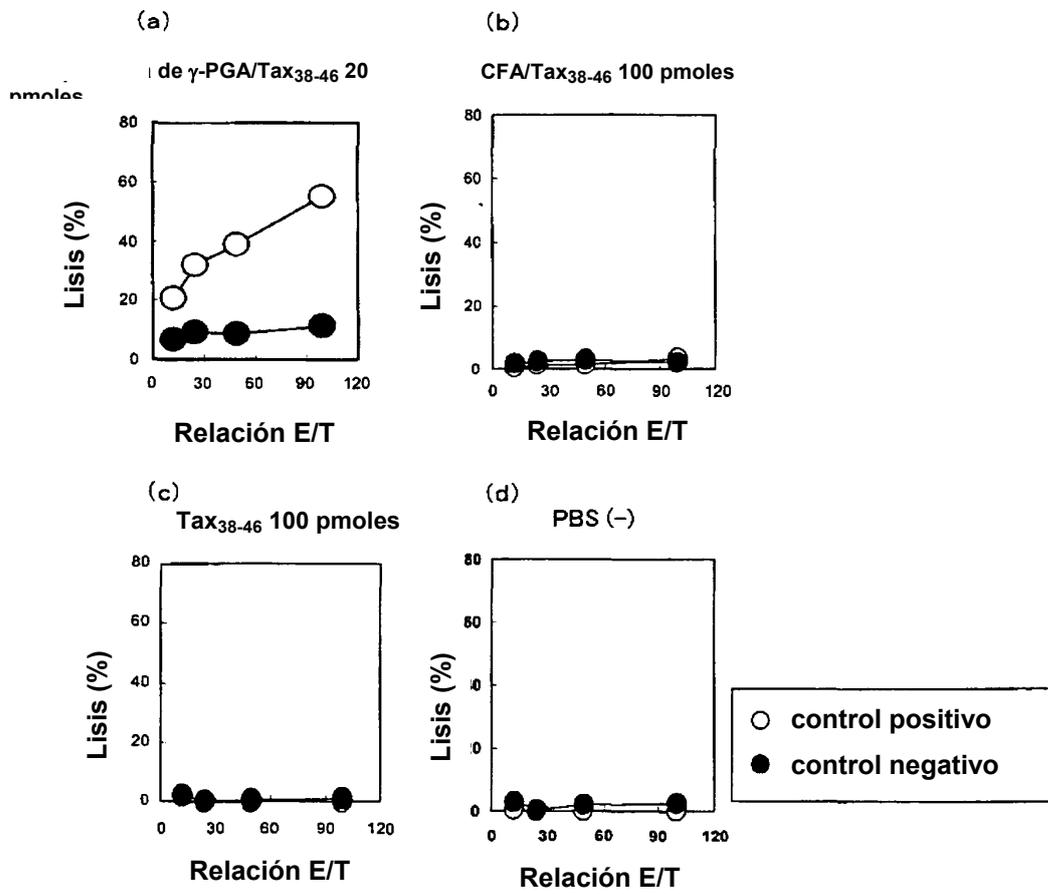


Fig. 10

