

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 131**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C07K 14/35 (2006.01)
C07K 14/445 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 36/19 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2002** **E 06022033 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013** **EP 1852126**

54 Título: **Vacuna para modular respuestas inmunitarias entre T1 y T2**

30 Prioridad:

27.03.2001 US 278698 P

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

27.09.2013

73 Titular/es:

ONCOTHYREON INC. (100.0%)
2601 FOURTH AVENUE, SUITE 500
SEATTLE, WA 98121, US

72 Inventor/es:

KOGANTY, RAO;
KRANTZ, MARK J.;
LONGENECKER, MICHAEL B. y
BUDZYNSKI, WLADYSLAW A.

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 424 131 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

Vacuna para modular respuestas inmunitarias entre T1 y T2.

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona vacunas liposómicas capaces de modular la respuesta inmunitaria *in vivo*, particularmente las respuestas inmunitarias humores y celulares.

10 **Antecedentes de la invención**

Para combatir eficazmente las enfermedades, lo ideal sería que una vacuna estimulase varias reacciones inmunológicas, tales como la producción de anticuerpos (inmunidad humoral) y la movilización de los inmunocitos (inmunidad celular).

15 Una respuesta inmunitaria celular provoca una proliferación y la estimulación de linfocitos T, tales como los citotóxicos (LTC) y los linfocitos T con hipersensibilidad de tipo retardado (HTR), que van a activar los macrófagos e impedir la propagación de agentes patógenos. La provocación de una respuesta humoral hace que los linfocitos B del cuerpo produzcan anticuerpos contra el patógeno causal. Sin embargo, algunos patógenos intracelulares y retrovirus sobreviven y son extremadamente resistentes a las respuestas inmunitarias humores y requieren la estimulación de linfocitos T citotóxicas para destruir dichos invasores biológicos.

Los péptidos sintéticos se utilizan a menudo como epítopos antigénicos y pueden ser hechos a la medida utilizando tecnologías de síntesis de péptidos convencionales, de manera que provocan efectos secundarios mínimos. Sin embargo, dichos péptidos suelen invocar a una respuesta inmunógena relativamente débil .

25 No obstante, la inmunogenicidad puede reforzarse acoplando un lípido al péptido sintético. Se ha demostrado, por ejemplo, que la lipidación de antígenos peptídicos sintéticos conduce a la provocación de una fuerte proliferación de linfocitos T, LTC, y las respuestas de anticuerpos en ratones, chimpancés o seres humanos inmunizados (BenMohamed *et al.*, *Vaccine*, 18, 2843 - 2855 (2000); Gahery-Segard *et al.*, *J. Virology*, 74, 1694-1703 (2000); Seth *et al.*, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 16, 337-343 (2000); Tsunoda *et al.*, *Vaccine*, 17, 675-685 (1999); BenMohamed *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 27, 1242-1253 (1997); Vitiello *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 95, 341-349 (1995)).

35 Una preparación de dichos antígenos se puede administrar *in vivo* utilizando un "portador" de la vacuna, pero el propio portador puede convertirse en el objetivo de la respuesta inmunitaria humoral del anfitrión. Por lo tanto, los anticuerpos del anfitrión actúan contra el portador de la vacuna y no del epítipo antigénico, lo que puede producir la rápida eliminación de la vacuna por los anticuerpos anti-portadores, negando la utilidad de la vacuna real.

40 La incorporación de la fracción lipídica de un lipopéptido en un liposoma, sin embargo, demuestra ser una manera sumamente útil en la que administrar un antígeno *in vivo* sin provocar una respuesta inmunitaria contra el portador. Sin embargo, ninguno de estos avances ayudar en la modulación de una respuesta inmunitaria a otro: Es decir, no se ha demostrado previamente que un lipopéptido unido con liposomas puede provocar respuestas inmunitarias celulares y humores alterando el número de lípidos unidos a un solo péptido.

45 La presente invención, sin embargo, proporciona una nueva manera de invocación y modulación entre las respuestas inmunitarias celulares y humores utilizando un solo péptido antigénico y un portador que no estimula respuestas humores contra sí mismo.

Sumario de la invención

50 La invención se refiere a una formulación de liposomas que contienen lipopéptidos inmunógenos. La presente invención se refiere además a la administración de dichos liposomas en formulaciones que son capaces tanto de invocar como de modular una respuesta inmunitaria en un paciente.

55 En una forma de realización, la invención proporciona un liposoma para su utilización como vacuna para tratar el cáncer, la tuberculosis, el paludismo o la hepatitis B, que comprende un dilipopéptido inmunógeno en el que un lípido está unido a uno de cada dos aminoácidos en el dilipopéptido.

60 En otra forma de realización, la invención proporciona una composición liposómica para su utilización como vacuna para tratar el cáncer, la tuberculosis, el paludismo o la hepatitis B, que comprende por lo menos un liposoma de la invención, en la que el liposoma comprende además un monolipopéptido.

65 En la presente memoria se describe un procedimiento para producir liposomas inmunógenos formados por lípidos autoensambladores, incluyendo derivados lipídicos de péptidos inmunógenos. La formulación liposómica puede contener y administrar ya sea monolipopéptidos, dilipopéptidos o mezclas de cada uno para invocar y, de este modo, modular respuestas inmunitarias celulares, humores, o celulares y humores, respectivamente. El péptido es una

secuencia inmunógena de aminoácidos, que representa un epítipo o una propiedad similar que es de naturaleza antigénica.

En una forma de realización la invención proporciona una composición que puede estimular y modular una respuesta inmunitaria. Dicha composición comprende una vesícula liposómica, en el que la bicapa lipídica de la vesícula liposómica comprende al menos un monolipopéptido inmunógeno y por lo menos un dilipopéptido, en el que el porcentaje del monolipopéptido oscila entre más de aproximadamente 0 y menos de aproximadamente 100% y en el que el porcentaje del dilipopéptido oscila entre más de aproximadamente 0 y menos de aproximadamente 100%.

También se describe en la presente memoria un procedimiento de estimulación de una respuesta inmunitaria celular que comprende administrar a un paciente una cantidad eficaz de por lo menos un monolipopéptido y por lo menos un dilipopéptido, en el que el monolipopéptido y el dilipopéptido están asociados a la misma o diferente vesícula liposómica. En un caso, el porcentaje del monolipopéptido administrado es más de aproximadamente 50%. El porcentaje del monolipopéptido también puede ser más de aproximadamente 70% o más de aproximadamente 90%.

También se describe un procedimiento para estimular una respuesta inmunitaria humoral que comprende administrar a un paciente una cantidad eficaz de por lo menos un monolipopéptido y por lo menos un dilipopéptido, en el que el monolipopéptido y el dilipopéptido están asociados a la misma o diferente vesícula liposómica. En un caso, el porcentaje del monolipopéptido administrado es más de aproximadamente 50%. El porcentaje del monolipopéptido también puede ser más de aproximadamente 70% o más de aproximadamente 90%.

La presente invención también abarca composiciones en las que la fracción peptídica del monolipopéptido o del dilipopéptido procede de una proteína asociada a una enfermedad seleccionada del grupo formado por la tuberculosis, la hepatitis B, el paludismo y el cáncer. En una forma de realización preferida, el péptido comprende al menos 5 aminoácidos contiguos de una región inmunógena de la proteína. En una forma de realización más preferida, el monolipopéptido o el dilipopéptido está diseñado a partir de una secuencia de proteína MUC I. En una forma de realización aún más preferida, el lipopéptido MUC I comprende la secuencia GVTSPDTRPAGSTA. En otra forma de realización preferida, el monolipopéptido o el dilipopéptido está diseñado a partir de un lipopéptido de la tuberculosis comprende la secuencia DQVHFQPLPPAVVKLSDALIK. En otra forma de realización preferida, un péptido antigénico MUC I de la presente invención se puede seleccionar de cualquier parte de la secuencia SGVTSPDTRPAGSTAPPAHGVTSAPDTRPAGSTAPPAHGVSSL (SEC. ID. nº 1).

En otra forma de realización, el monolipopéptido o el dilipopéptido está diseñado a partir de un péptido de la tuberculosis. En una forma de realización más preferida, el péptido de la tuberculosis tiene la secuencia, DQVHFQPLPPAVVKLSDALIK (SEC. ID. nº 2).

Aún en otra realización, la presente invención utiliza un péptido antigénico lipidado de la hepatitis B. En una realización preferida, el péptido de la hepatitis B tiene la secuencia, IRTPPAYRPPNAPILK (SEC. ID. nº 3). En otra forma de realización preferida, un péptido del paludismo puede ser modificado para que contenga lípidos. En una forma de realización preferida, el péptido tiene la secuencia, VTHESYQELVKLEALEDVAVK (SEC ID N °. 4).

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención proporciona una composición liposómica que comprende por lo menos un liposoma que comprende por lo menos un monolipopéptido y por lo menos un dilipopéptido.

En una forma de realización preferida, el monolipopéptido y el dilipopéptido se seleccionan del grupo formado por los péptidos MUC I, de la tuberculosis, del paludismo y de la hepatitis B. En una forma de realización más preferida, el monolipopéptido y el péptido dilipopéptido son cualquier secuencia, en su totalidad o en parte, seleccionada de entre las SEC. ID. nº 1 a nº 4. En otra forma de realización preferida, el monolipopéptido y el dilipopéptido tienen diferentes secuencias de aminoácidos.

Aún en otra forma de realización preferida, el porcentaje del monolipopéptido en el liposoma oscila entre más de 0 y menos de aproximadamente 100% y el porcentaje del dilipopéptido oscila entre más de 0 y menos de aproximadamente 100%, sobre la base de los lipopéptidos totales incorporados en el liposoma.

En una forma de realización, el porcentaje del monolipopéptido y el porcentaje del dilipopéptido incorporados en el liposoma son cada uno de aproximadamente 50%.

En otra forma de realización, el porcentaje del monolipopéptido incorporado en el liposoma es de aproximadamente 50 a aproximadamente 99%.

Aún en una forma de realización más, el porcentaje del dilipopéptido incorporado en el liposoma es de aproximadamente 50 a aproximadamente 99%.

En otra forma de realización preferida, el monolipopéptido y el dilipopéptido son diferentes epítopos antigénicos.

Además en la presente memoria se describe una formulación liposómica que comprende una primera composición

liposómica y una segunda composición liposómica, en el que la primera composición liposómica comprende un monolipopéptido y en el que la segunda composición liposómica comprende un dilipopéptido.

La formulación liposómica puede contener por lo menos un monolipopéptido y por lo menos un dilipopéptido que se seleccionan de entre el grupo formado por péptidos MUC I, de la tuberculosis, del paludismo y de la hepatitis B. El péptido monolipopéptido y el dilipopéptido pueden ser cualquier secuencia, en su totalidad o en parte, seleccionada de uno cualquiera de las SEC. ID. nº 1 a nº 4. El monolipopéptido y el dilipopéptido en las formulaciones de liposomas pueden tener diferentes secuencias de aminoácidos. El monolipopéptido y el dilipopéptido pueden tener la misma secuencia de aminoácidos.

Se describe además en la presente memoria un procedimiento para modular una respuesta inmunitaria que comprende administrar a un paciente una cantidad eficaz de por lo menos un monolipopéptido y por lo menos un dilipopéptido. Se proporcionan procedimientos de tratamiento de un paciente para modular la respuesta inmunitaria del paciente a un péptido inmunógeno, pueden comprender administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de por lo menos un monolipopéptido y por lo menos un dilipopéptido. El monolipopéptido y el dilipopéptido se seleccionan de entre el grupo formado por los péptidos MUC I, de la tuberculosis, del paludismo y de la hepatitis B. El péptido monolipopéptido y el dilipopéptido pueden ser cualquier secuencia, en su totalidad o en parte, seleccionadas de entre las SEC. ID. nº 1 a nº 4.

El monolipopéptido y el dilipopéptido se pueden incorporar en un liposoma, en el que el porcentaje del monolipopéptido oscila entre más de 0 y menos de aproximadamente 100%, y en el que el porcentaje del dilipopéptido oscila entre más de 0 y menos de aproximadamente 100%, referidos a los lipopéptidos totales incorporados en el liposoma. El porcentaje del monolipopéptido y el porcentaje del dilipopéptido incorporados en el liposoma puede ser cada uno de aproximadamente 50%. El porcentaje del monolipopéptido puede ser de aproximadamente 50 a aproximadamente 99%. En una forma de realización, el porcentaje del dilipopéptido es de aproximadamente 50 a aproximadamente 99%.

El procedimiento para modular una respuesta inmunitaria puede dar lugar a la estimulación de una respuesta humoral. La modulación puede dar lugar a la estimulación de una respuesta celular. La modulación puede dar lugar a un aumento en la intensidad de por lo menos uno de entre una respuesta humoral o una respuesta celular.

El procedimiento para modular una respuesta inmunitaria puede comprender además la administración conjunta de un adyuvante con el monolipopéptido y el dilipopéptido. El adyuvante puede ser el lípido A.

En la presente memoria se describe un procedimiento de modulación entre una respuesta inmunitaria celular y humoral, que comprende en primer lugar la administración de una formulación que comprende un monolipopéptido unido por liposomas y posteriormente la administración de una formulación que comprende un dilipopéptido unido por liposomas. Alternativamente, otro ejemplo, implica administrar en primer lugar una formulación que comprende un dilipopéptido unido por liposomas y posteriormente la administración de una formulación que comprende un monolipopéptido unido por liposomas.

El monolipopéptido y el dilipopéptido se pueden seleccionar de entre el grupo formado por péptidos MUC I, de la tuberculosis, del paludismo y de la hepatitis B. El péptido monolipopéptido y el dilipopéptido pueden ser cualquier secuencia, en su totalidad o en parte, seleccionada de entre las SEC. ID. nº 1 a nº 4.

Además en la presente memoria se describe un procedimiento para modular una respuesta inmunitaria que comprende administrar a un paciente por lo menos un liposoma que consiste esencialmente en un dilipopéptido. Otro ejemplo consiste en un procedimiento para modular una respuesta inmunitaria que comprende administrar a un paciente por lo menos un liposoma que consiste en un dilipopéptido. El procedimiento para modular una respuesta inmunitaria puede comprender administrar a un paciente por lo menos un liposoma que comprende un dilipopéptido. Los procedimientos para modular una respuesta inmunitaria pueden comprender además la administración conjunta de un adyuvante. El adyuvante puede ser el lípido A.

El dilipopéptido se puede seleccionar del grupo formado por péptidos MUC I, de la tuberculosis, del paludismo y de la hepatitis B. El péptido dilipopéptido puede ser cualquier secuencia, en su totalidad o en parte, seleccionada de entre las SEC. ID. nº 1 a nº 4.

La presente invención también proporciona péptidos antigénicos lipidados. En una forma de realización, la presente invención proporciona una composición de péptido MUC I que comprende un lípido unido a un aminoácido del péptido MUC I. En una forma de realización preferida, el péptido MUC I comprende, en su totalidad o en parte, la secuencia de SEC. ID. nº 1. Aún en otra forma de realización preferida, el péptido MUC I comprende la secuencia SGVTSAPDTRPAGSTA o STAPPAHGVTSAPDTRPAGSTAPP.

En otra forma de realización, la composición de péptido MUC I comprende además un segundo lípido que está también unido a un aminoácido del péptido MUC I. En una forma de realización, cada lípido está unido a diferentes aminoácidos. En otra forma de realización, los lípidos se colocan en el terminal en N o en el terminal en C del

péptido MUC I.

La presente invención también proporciona una composición del péptido de la tuberculosis que comprende un lípido unido a un aminoácido del péptido de la tuberculosis. En una realización preferida, el péptido de la tuberculosis comprende la secuencia DQVHFQPLPPAVVKLSDALIK. En otra forma de realización, la composición de péptido tuberculosis comprenden dos lípidos unidos a por lo menos un aminoácido del péptido de la tuberculosis. En otra forma de realización, cada lípido se une a diferentes aminoácidos. En otra forma de realización, los lípidos se colocan en el terminal en N o el terminal en C del péptido de la tuberculosis.

La presente invención también proporciona una composición de péptido de la hepatitis B que comprende un lípido unido a un aminoácido del péptido de la hepatitis B. En una realización preferida, el péptido de la hepatitis B comprende la secuencia IRTPPAYRPPNAPILK. En otra forma de realización, la composición del péptido de la hepatitis B comprende dos lípidos unidos a por lo menos un aminoácido del péptido de la hepatitis B. En otra forma de realización, cada lípido se une a diferentes aminoácidos. En otra forma de realización, los lípidos se colocan en el terminal en N o el terminal en C del péptido de la hepatitis B.

La presente invención también proporciona una composición de péptido del paludismo que comprende un lípido unido a un aminoácido del péptido del paludismo. En una forma de realización preferida, el péptido del paludismo comprende la secuencia VTHESYQELVKKLEALEDAVK. En otra forma de realización, la composición del péptido del paludismo comprende dos lípidos unidos a por lo menos un aminoácido del péptido del paludismo. En otra forma de realización, cada lípido se une a diferentes aminoácidos. En otra forma de realización, los lípidos se colocan en el terminal en N o el terminal en C del péptido del paludismo.

La presente invención también proporciona un péptido seleccionado de entre el grupo formado por la SEC. ID. nº 1 a nº 4, que comprende más de dos lípidos.

En una forma de realización preferida, un lípido puede seleccionarse del grupo formado por miristilo, palmitoilo y laurilo.

Además en la presente memoria se describe la utilización de una composición que comprende por lo menos un liposoma en el que se incorpora una o ambos monolipopéptido o dilipopéptido de un péptido antigénico, como una vacuna para modular la respuesta inmunitaria a dicho péptido, en el que las cantidades relativas de monolipopéptido y dilipopéptido modulan las intensidades relativas de proliferación de linfocitos T y la producción de anticuerpos.

En otra realización, la invención proporciona una vacuna liposómica para su utilización en la estimulación de una respuesta inmunitaria en un paciente que comprende un dilipopéptido inmunógeno, comprendiendo dicho dilipopéptido por lo menos un epítipo peptídico, en el que un lípido está unido a uno de cada dos aminoácidos en el dilipopéptido.

Tanto la descripción general anterior como la breve descripción siguiente de los dibujos y la descripción detallada son ilustrativas y explicativas y están destinadas a proporcionar una explicación adicional de la invención que se reivindica. Otros objetos, ventajas y nuevas características serán obvias para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 presenta los niveles de proliferación de linfocitos T y de IFN- γ en ratones C57B1/6 ratones inmunizados 2 veces con dilipo- o monolipopéptidos MUC1 en liposomas.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Un descubrimiento inesperado y sorprendente de la presente invención es que la provocación de respuestas inmunitarias *in vivo* puede ser modulada mediante la administración en serie, o en combinación, de péptidos unidos por liposomas que comprende una cadena de lípidos y péptidos unidos por liposomas que comprenden por lo menos dos cadenas lipídicas.

El término "modular" significa algún cambio, ajuste o adaptación en una determinada proporción. Por lo tanto, una respuesta inmunitaria puede modularse estimulando factores que ponen en juego un cambio en la actividad inmunológica. La intensidad de una respuesta inmunitaria también puede modularse. Por ejemplo, la intensidad o nivel de proliferación de linfocitos T se puede hacer mayor o menor después de la administración de factores que efectúan la modulación. En la presente invención, dichos factores pueden ser lipopéptidos unidos por liposomas.

Se descubrió sorprendentemente que un péptido que tiene una cadena lipídica puede invocar una gran respuesta inmunitaria celular (es decir, una respuesta inmunitaria "T1") cuando se incorpora a una formulación liposómica, pero sólo una mínima o ninguna respuesta humoral. Sin embargo, ese mismo péptido, cuando se incorpora en un liposoma, se puede hacer que provoque una gran respuesta humoral (es decir, una respuesta "T2"), acompañado ya

sea por una respuesta celular mínima o masiva, cuando se unen dos lípidos a su superficie. La gama de la respuesta celular observada con un lipopéptido varía dependiendo de la identidad del lipopéptido. La presencia de uno, dos, o más de dos lípidos en un péptido antigénico también puede aumentar o reducir la intensidad por la que se activa una respuesta inmunitaria. La intensidad de una respuesta inmunitaria y el tipo de respuesta inmunitaria que se estimula también pueden modularse variando el número de restos de aminoácidos entre dos lípidos en un péptido antigénico.

La presente invención demuestra que la unión de más de una cadena lipídica a un péptido unido a una bicapa liposómica estimula en gran medida una respuesta inmunitaria humoral, junto con la actividad celular variable que va desde un mínimo a masiva. La presente invención también demuestra que la unión de un segundo lípido a un péptido antigénico aumenta el nivel de proliferación de linfocitos T, así como provoca la producción de anticuerpos en comparación con el derivado monolipídico. El término "derivado" significa un compuesto procedente u obtenido de otro que contiene los elementos esenciales de la sustancia original. Por lo tanto, el derivado lipídico de un antígeno se refiere a un péptido que tiene al menos un lípido unido. Por lo tanto es posible administrar una cantidad eficaz de una formulación liposómica que comprende sólo dilipopéptidos para invocar la producción de anticuerpos y la actividad celular. Una "cantidad eficaz" de formulación de lipopéptidos unidos por liposomas, se refiere a una cantidad empíricamente derivada de ese lipopéptido que modula una respuesta inmunitaria.

También se descubrió que para algunos antígenos una formulación liposómica de dilipopéptidos activará una respuesta celular masiva, además de una gran respuesta humoral.

Específicamente, los ejemplos demuestran que las formulaciones liposómicas que tienen un monolipopéptido provocaron respuestas humorales en gran medida y respuestas celulares mínimas, y las formulaciones liposómicas que tienen un dilipopéptido provocaron respuestas humorales en gran medida y respuestas celulares mínimas, para péptidos MUC-1, de la tuberculosis y de la hepatitis B. La administración de una combinación de un di- y de un monolipopéptido dio lugar a respuestas celulares y humorales superiores.

Otra ventaja de la presente invención es que se pueden incorporar diferentes lipopéptidos en un liposoma y por lo tanto ser transportados y presentados al sistema inmunitario simultáneamente y en las mismas condiciones. Por lo tanto, es posible provocar en un paciente múltiples respuestas inmunitarias mediante el tratamiento de ese paciente con un liposoma que contiene un monolipopéptido productor de T1 y un dilipopéptido productor de T2. Alternativamente, se puede utilizar también una mezcla de monolipopéptidos unidos por liposomas y dilipopéptidos unidos por liposomas para provocar simultáneamente múltiples respuestas inmunitarias.

Por lo tanto, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos para modular una respuesta inmunitaria variando el número de lípidos que se unen a un péptido antigénico. Una respuesta inmunitaria se puede modular añadiendo dos o más lípidos a un péptido antigénico, al igual que la intensidad de la respuesta inmunitaria. Por otra parte, la intensidad de una respuesta inmunitaria se puede modular variando la separación de los aminoácidos entre los lípidos.

También se puede invocar una respuesta inmunitaria inyectando células presentadoras de antígeno estimuladas previamente o linfocitos T en un paciente. Conocida como "inmunoterapia adoptiva", esta técnica crea *in vitro* una población expandida de células específicas del antígeno que están cebadas para combatir el agente causante una vez reintroducidas en el cuerpo. En esencia, las células se retiran del paciente, se estimulan *in vitro* y se reinyectan de nuevo en el torrente sanguíneo del paciente. Específicamente, los linfocitos de la sangre periférica, tales como las células presentadoras de antígeno, se aíslan y a continuación, "se cargan" exponiendo las células a los antígenos *in vitro*. El antígeno es endocitosado por una célula presentadora de antígeno, tras lo cual se asocia a un complejo mayor de histocompatibilidad y posteriormente se presenta en la superficie externa de la célula. Esta población de células cebadas puede reinyectarse a continuación en el paciente. También se puede realizar el fraccionamiento de los linfocitos de la sangre periférica en dendrocitos y/o macrófagos antes de la carga.

Por lo tanto, una formulación liposómica de la presente invención, que comprende lipopéptidos antigénicos unidos a la membrana se puede añadir a las células presentadoras de antígenos aisladas *in vitro* para "cargarlas". Por ejemplo, una formulación liposómica que comprende un péptido monolipo-MUC I, un péptido dilipo-MUC I, o una combinación de ambos péptidos, puede utilizarse para cargar los linfocitos de la sangre periférica que luego se vuelven a inyectar en el paciente como una vacuna celular.

Alternativamente, se puede realizar la "terapia de transferencia adoptiva de linfocitos T". Esto implica la incubación de linfocitos T de un paciente con las células presentadoras de antígenos precargados *in vitro*. Los linfocitos T se activan y se vuelven a administrar a un paciente que padece, por ejemplo, un adenocarcinoma. Para una descripción de las técnicas reconocidas en la técnica para la terapia de transferencia adoptiva de linfocitos T, véase Bartels *et al.*, *Annals of Surgical Oncology*, 3(1):67 (1996). Por lo tanto, según la presente invención, se selecciona un péptido antigénico lipidado, se incorpora en un liposoma, y se utiliza para estimular a los linfocitos de sangre periférica, que puede volver a inyectarse en el paciente o utilizarse para activar las linfocitos T aislados. Un procedimiento de activación de linfocitos T también es útil para la generación de respuestas de linfocitos T citotóxicos y colaboradores a antígenos implicados en varias enfermedades, tales como el cáncer, tumores, infecciones víricas e infecciones

bacterianas.

Liposomas

Los liposomas son vesículas microscópicas que constan de una o más bicapas lipídicas que rodean compartimentos acuosos. Véase, por ejemplo, Bakker-Woudenberg *et al.*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 12 (Supl. 1): S61 (1993) y Kim, *Drugs*, 46: 618 (1993). Debido a que los liposomas se pueden formular con moléculas lipídicas voluminosas que se encuentran también en las membranas celulares naturales, en general los liposomas se pueden administrar de forma segura y son biodegradables.

Dependiendo del procedimiento de preparación, los liposomas pueden ser unilaminares o multilaminares, y pueden variar de tamaño con diámetros que van de aproximadamente 0,02 µm hasta más de aproximadamente 10 µm. Pueden encapsularse en liposomas una variedad de agentes. El reparto de agentes hidrófobos en las bicapas y el reparto de agentes hidrófilos en el/los espacio(s) acuoso(s) interno(s). Véase, por ejemplo, Machy *et al.*, *LIPOSOMES-IN CELL BIOLOGY AND PHARMACOLOGY* (John Libbey, 1987), y Ostro *et al.*, *American J. Hosp. Pharm.* 46: 1576 (1989).

Los liposomas pueden adsorber a prácticamente cualquier tipo de célula y a continuación liberar un agente incorporado. Alternativamente, el liposoma puede fusionarse con la célula diana, por lo que el contenido del liposoma se vacía en la célula diana. Alternativamente, un liposoma puede ser endocitosado por células que son fagocíticas. La endocitosis es seguida de la degradación intralisosómica de lípidos liposómicos y la liberación de los agentes encapsulados. Scherphof *et al.*, *Ann.N.Y. Acad. Sci.*, 446: 368 (1985).

Otros liposomas adecuados que se utilizan en los procedimientos de la invención incluyen vesículas multilaminares (VML), vesículas oligolaminares (VOL), vesículas unilaminares (VU), vesículas unilaminares pequeñas (VUP), vesículas unilaminares de tamaño medio (VUM), vesículas unilaminares grandes (VUG), gigantes vesículas unilaminares (VUGI), vesículas multivesiculares (VMV), vesículas individuales u oligolaminares preparadas por el procedimiento de evaporación en fase inversa (REV), vesículas multilaminares preparadas por el procedimiento de evaporación en fase inversa (VML-REV), vesículas multilaminares estable (VMLE), VML congeladas y descongeladas (VMLCD), vesículas preparadas por métodos de extrusión (VET), vesículas preparadas por la prensa francesa (VPF), vesículas preparadas por fusión (VFU), vesículas de deshidratación-rehidratación (VDR) y bubblesomes (BSV). El especialista experto reconocerá que las técnicas para preparar estos liposomas son bien conocidas en la técnica. Véase, *COLLOIDAL DRUG DELIVERY SYSTEMS*, vol. 66 (J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., 1994).

Lípidos

Un "lípidio" puede ser una molécula con un miristilo, palmitoilo o un laurilo, que se puede unir a los aminoácidos que posee grupos funcionales de oxígeno, nitrógeno o azufre. Dichos aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, los aminoácidos treonina, serina, lisina, arginina y cisteína. Un "monolipopéptido" es un péptido al que está unido sólo una cadena de lípidio. Del mismo modo, un "dilipopéptido" es un péptido que tiene dos cadenas lipídicas unidas a uno o dos aminoácidos. Si las dos cadenas lipídicas están unidas a dos restos de aminoácidos, esos restos pueden estar espaciados cualquier número de aminoácidos aparte.

Un "formulación liposómica" describe en vesículas de lípidos creadas *in vitro* en la que se pueden incorporar mono- y/o dilipopéptidos. Por lo tanto, "unido con liposoma" se refiere a un péptido que está parcialmente incorporado o unido a un liposoma. Una formulación liposómica también puede denominarse "vacuna liposómica". Una formulación liposómica puede comprender dos tipos de liposomas; uno que contiene en su mayoría, si no en toda, monolipopéptidos incorporados en su estructura, y un segundo que contiene en su mayoría, si no en toda, dilipopéptidos en su estructura. Las preparaciones individuales de "mono" y "di-" liposomas se puede administrar juntas para modular una respuesta inmunitaria, aún cuando el monolipopéptido y dilipopéptido no existen en un liposoma.

Cuando se incorpora en un liposoma, el monolipopéptido y el dilipopéptido pueden ser péptidos que son el mismo epítipo antigénico. Alternativamente, las secuencias de péptidos para cada lipopéptido pueden comprender diferentes epítipos. Los lipopéptidos pueden ser antígenos que están asociados a las mismas o diferentes proteínas.

Un lipopéptido puede estar incorporado en liposomas debido a que la porción lipídica de la molécula peptídica se integrará espontáneamente en la bicapa lipídica. Por lo tanto, un lipopéptido puede presentarse en la "superficie" de un liposoma. Alternativamente, un péptido puede estar encapsulado dentro de un liposoma. Las técnicas para preparar liposomas y formularlos con moléculas tales como péptidos son bien conocidos para los especialistas expertos.

Ejemplos de adyuvantes

Las presentes vacunas liposómicas se pueden formular también ventajosamente con un adyuvante. Como se conoce convencionalmente en la técnica, los adyuvantes son sustancias que actúan junto con estímulos antigénicos específicos para aumentar la respuesta específica al antígeno. El monofosforil lípido A (MPLA), por ejemplo, es un adyuvante eficaz que produce un aumento de la presentación de antígenos liposómicos a linfocitos T específicos. Alving, C.R., *Immunobiol.*, 187:430-446 (1993). Los expertos en la materia reconocerán que los adyuvantes lipídicos, tales como lípido A y derivados del mismo, también son adecuados. Un dipéptido de muramilo (MDP), cuando se incorpora en liposomas, se ha demostrado también que aumenta la capacidad adyuvante (Gupta RK *et al.*, *Adjuvants - A balance between toxicity and adjuvancity*, *Vaccine*, 11, 293-306 (1993)).

Otra clase de adyuvantes incluye citocinas estimulantes, tales como IL-2. Por lo tanto, las presentes vacunas liposómicas se pueden formular con IL-2 o IL-2 se puede administrar por separado para la respuesta antigénica óptima. IL-2 se formula provechosamente con liposomas.

Ejemplos de formulaciones de vacuna

Las vacunas también pueden formularse con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos excipientes son bien conocidos en la técnica, pero por lo general deben ser fisiológicamente tolerables e inertes o mejorar con respecto a las propiedades de la vacuna de las composiciones de la invención. Los ejemplos incluyen vehículos líquidos tales como solución salina fisiológica estéril. Puede añadirse un excipiente en cualquier punto en la formulación de una vacuna liposómica o puede mezclarse con la composición de vacuna completada.

Las vacunas pueden formularse para varias vías de administración. Las vías específicamente preferidas incluyen la administración intramuscular, subcutánea o inyección intradérmica, aerosol o administración oral, o por una combinación de estas vías, administrados de una sola vez o en numerosas dosis unitarias. La administración de vacunas es bien conocida y en última instancia dependerá de la formulación específica y del criterio del médico. Las formulaciones de vacuna se pueden mantener en forma de suspensión o pueden liofilizarse e hidratarse después para generar una vacuna utilizable.

Para proporcionar mayor especificidad, reduciendo de este modo el riesgo de efectos tóxicos u otros no deseados durante la administración *in vivo*, presenta ventajas orientar las composiciones de la invención a las células mediante las cuales están concebidas para actuar, a saber, células presentadoras de antígeno. Esto puede llevarse a cabo convenientemente usando tecnología de orientación convencional para dirigir un liposoma que contiene un péptido inmunógeno a un lugar determinado dentro del cuerpo. Para dirigir las células presentadoras de antígenos, por ejemplo, la manosa y la fracción Fc de los anticuerpos pueden conjugarse químicamente a un péptido antigénico, o de forma recombinante fusionando el péptido de de orientación al lipopéptido inmunógeno. Otras estrategias similares serán conocidas por el especialista.

Cantidades ejemplares de lipopéptidos y formulaciones liposómicas

La relación de monolipopéptidos y dilipopéptidos antigénicos dentro de un liposoma puede variarse a fin de modular una respuesta inmunitaria a diferentes grados de intensidad. Por ejemplo, aumentando la cantidad de dilipopéptido incorporado en un liposoma con relación a la cantidad de monolipopéptido puede hacer a la formulación resultante más inductora humoral. Por supuesto, debido a las diferentes magnitudes de respuesta a diferentes antígenos, pueden ser necesario conseguir el equilibrio deseado de la respuesta humoral y celular.

Por ejemplo, el experto en la materia puede crear liposomas constituidos por una proporción de monolipopéptidos y dilipopéptidos inmunógenos, unidos por enlaces covalentes, en los que el porcentaje del monolipopéptido oscila entre más de aproximadamente 0 y menos de aproximadamente 100% del liposoma. Del mismo modo, el dilipopéptido puede estar presente en la membrana liposómica en porcentaje de más de aproximadamente 0 a menos de aproximadamente 100%. Por ejemplo, un liposoma que comprende 75% de monolipopéptidos y 25% de dilipopéptidos puede generar una respuesta inmunitaria a T1 en gran medida con alguna actividad de T2. La presente invención describe procedimientos para la creación de un liposoma que comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 30% de monolipopéptidos, aproximadamente 30 a aproximadamente 50% de monolipopéptidos, o aproximadamente 50 a aproximadamente 99% de monolipopéptidos. Del mismo modo, también puede crearse un liposoma que comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 30% de dilipopéptidos, aproximadamente 30 a aproximadamente 50% de dilipopéptidos, o aproximadamente 50 a aproximadamente 99% de dilipopéptidos. Por lo tanto, la presente invención permite la creación de liposomas que contienen, por ejemplo, monolipopéptido:dilipopéptido en proporciones tales como aproximadamente 10%:aproximadamente 90%, aproximadamente 30%:aproximadamente 70%, aproximadamente 50%:aproximadamente 50%, aproximadamente 70%:aproximadamente 30%, aproximadamente 90%:aproximadamente 10% y aproximadamente 99%:aproximadamente 1%. La determinación de la antigenicidad relativa está dentro del ámbito de cualquier experto en inmunología.

Una cantidad eficaz de una formulación liposómica que contiene por lo menos un monolipopéptido y por lo menos un

dilipopéptido se puede administrar a un paciente, en la que el monolipopéptido y el dilipopéptido están asociados con o bien la mismo o diferente vesícula liposómica. Por lo tanto una sola formulación liposómica que comprende una proporción o proporciones de un monolipopéptido y un dilipopéptido se puede administrar a un paciente para invocar una respuesta inmunitaria deseada; o alternatively, las combinaciones de por lo menos dos formulaciones liposómicas que comprende diferentes proporciones de un monolipopéptido y un dilipopéptido puede administrarse a un paciente para invocar una respuesta inmunitaria similar o diferente.

"Tratamiento" en sus varias formas gramaticales se refiere a la prevención, curación, reversión, atenuación, alivio, minimización, supresión o detención de los efectos perjudiciales de una enfermedad, evolución de la enfermedad, agente causal de la enfermedad u otro proceso anormal.

Ejemplos de péptidos inmunógenos útiles en la invención

Cualquier antígeno o epítipo peptídico pueden lipidarse e incorporarse en un liposoma para provocar o modular respuestas inmunitarias *in vivo*. Uno, dos, o más de dos lípidos se puede añadir a cualquier parte de un péptido. El especialista experto reconocerá que el péptido antigénico se selecciona basándose en el tipo de enfermedad que afecta al paciente. Por ejemplo, un antígeno "MUC-1" es útil para preparar linfocitos T específicas de antígenos que pueden utilizarse en el tratamiento de adenocarcinomas. Del mismo modo, un péptido de la tuberculosis, un péptido de la hepatitis B, o un péptido del paludismo pueden ser todos lipidados según la presente invención y se utilizan para invocar inmunidad celular y humoral según se desee para el tratamiento de las enfermedades específicas a las que los péptidos están asociados. La presente invención no se limita a la utilización de MUC-1, péptidos de la tuberculosis, péptidos de la hepatitis B, o péptidos del paludismo como vacunas lipopeptídicas unidas por liposomas.

Una variedad de péptidos inmunógenos pueden lipidarse e incorporarse en membranas liposómicas para crear un número de diferentes vacunas inmunógeno-específicas. Se describe aquí, por ejemplo, el efecto inmunógeno de lipidación a un péptido derivado de mucina. Las mucinas MUC I son glucoproteínas macromoleculares expresadas en todas las células epiteliales de individuos sanos. La secuencia peptídica del núcleo de MUC I comprende 20 restos de aminoácidos que se repiten a lo largo de la proteína en cualquier parte de 60 a 120 veces. La secuencia repetida, GVTSAPDTRPAPGSTAPPAH tiene cinco sitios potenciales para la glucosilación (en negrita S, serina y T, treonina) y un epítipo "DTR" inmunógeno (subrayado).

En general, los hidratos de carbono están unidos a uno o más de los restos de serina o treonina como estructuras unidas por O y cuando los cinco sitios están glucosilados, el epítipo se oculta. En las células cancerosas, sin embargo, la etapa de glucosilación se termina prematuramente de tal manera que los hidratos de carbono resultantes se truncan. Por consiguiente, el epítipo DTR se expone y la secuencia de núcleo peptídico y los hidratos de carbono se vuelven inmunógenos. Por lo tanto, esta secuencia peptídica es un ejemplo de un epítipo que puede utilizarse en el contexto de la presente invención para provocar y modular una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, un péptido antigénico MUC I de la presente invención se puede seleccionar de cualquier parte de la secuencia SGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVSSL (SEC. ID. nº 1) y lipidarse para que contenga uno, dos, o más de dos lípidos.

El tamaño de un péptido inmunógeno también está sujeto a variación. Las moléculas peptídicas MUC-I lipidadas que van desde 16 aminoácidos (1882 Daltons) a 40 (5050 Daltons) de tamaño, por ejemplo, invocan respuestas inmunitarias como se describe en la presente invención. Sin embargo, dichos péptidos inmunógenos no están limitados por el tamaño y pueden ser una parte o incluso la totalidad del inmunógeno deseado. Por lo general, se prefieren pequeños antígenos peptídicos, debido a la facilidad de preparación y una mayor especificidad. Por lo tanto, SGVTSAPDTRPAPGSTA y STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP son péptidos MUC I más pequeños que pueden lipidarse según la presente invención. Por consiguiente, a menos que sean poliméricos (es decir, múltiples copias del mismo epítipo), la mayoría de los antígenos comprenderán de aproximadamente 9 a aproximadamente 100 aminoácidos. Más específicamente, los antígenos que son aproximadamente 9 a aproximadamente 20, aproximadamente 20 a aproximadamente 40, aproximadamente 40 a aproximadamente 60, aproximadamente 60 a aproximadamente 80, y aproximadamente 80 a aproximadamente 100 aminoácidos de tamaño pueden lipidarse e incorporarse en liposomas como se describe. Los fragmentos de antígenos proteicos pueden producirse por técnicas de ADN recombinante y analizarse para identificar epítipos específicos. Preferentemente, los péptidos pequeños se producen por procedimientos de síntesis *in vitro* y se analizan. Por lo tanto, cualquier secuencia antigénica en su totalidad, o en parte, puede utilizarse en una forma lipidada según la presente invención. Por "todo, o en parte" se entiende que o bien todo el péptido antigénico entero o algún péptido más pequeño procedente del mayor puede lipidarse. Un "péptido más pequeño" puede ser un fragmento de un antígeno peptídico mayor o puede sintetizarse de manera recombinante o química.

Otros ejemplos ilustrativos de péptidos que pueden sintetizarse, lipidarse y utilizarse en las vacunas preparadas en liposomas incluyen, pero no se limitan a, péptidos involucrados en las enfermedades de la tuberculosis, la hepatitis B, el paludismo y el cáncer.

El péptido DQVHFQPLPPAVVKLSDALIK de la tuberculosis (SEC. ID. nº 2), que se origina a partir de una proteína secretora de 38 kDa de *Mycobacterium tuberculosis*, se puede preparar con uno o dos lípidos y formularse en

formulaciones liposómicas descritas anteriormente.

Del mismo modo, un péptido antigénico de la hepatitis B está representado por la secuencia de aminoácidos IRTPPAYRPPNAPILK (SEC. ID. nº 3). Del mismo modo, el péptido del paludismo VTHESYQELVKKLEALEDVK (SEC. ID. nº 4) también se puede formular en una vacuna liposómica.

Un aminoácido, tal como treonina, serina, lisina, arginina o cisteína, que se produce dentro de la secuencia natural de un péptido antigénico, puede ser un sitio conveniente al que pueda unirse un lípido. Alternativamente, cualquiera de estos aminoácidos puede añadirse al extremo o dentro de una secuencia peptídica a fin de facilitar el enlace de un resto lipídico. Por lo tanto, puede prepararse un péptido antigénico para que tenga dos restos de lisina en su terminal carboxilo a fin de facilitar el enlace de dos lípidos. Por "preparar" la presente invención contempla la utilización de procedimientos convencionales de síntesis de péptidos para introducir uno o más aminoácidos adicionales a una secuencia peptídica. Sin embargo, los procedimientos recombinantes también se pueden emplear para diseñar polinucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos deseada. Por lo tanto, la presente invención prevé la síntesis química y recombinante de péptidos antigénicos que son susceptibles de lipidación.

Los ejemplos siguientes están destinados a ilustrar, pero no limitar la invención. Aunque son típicos de los que podrían utilizarse, pueden utilizarse otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplo 1

El propósito de este ejemplo fue determinar la respuesta a la proliferación de linfocitos T y los niveles de anticuerpos anti-MUC-1 en respuesta a la administración de una vacuna liposómica de antígeno MUC-1.

Sumario de los procedimientos utilizados

(i) Inmunización

Vacunas liposomas a base de MUC1 ("vacunas liposómicas BLP25") a una dosis de 100 µg (250 µl) se inyectaron por vía subcutánea, dos, tres, o cuatro veces, a intervalos quincenales, en regiones inguinal derecha e izquierda (125 µl por cada sitio).

(ii) Ensayo de proliferación de linfocitos T

Nueve días después de la última inmunización con la vacuna liposómica BLP25 todos los ratones se sacrificaron y se extirparon quirúrgicamente los ganglios linfáticos. Los linfocitos T de ganglios linfáticos purificados en lana de nilón se cultivaron a continuación con las células presentadoras de antígenos (CPA), que se obtuvieron a partir de los bazo de ratones no tratados previamente de la misma cepa y tratados con mitomicina C. Estos cultivos mixtos se pulsaron con lipopéptido sintético procedente de MUC1 (BP1- 148) y péptido de referencia (BP1-72) durante cuatro días. Después del cuarto día, se recogieron algunos sobrenadantes para análisis de IFN-γ, y los cultivos se pulsaron entonces con un medio reciente que contenía una timidina tritiada. Después de unas 18-20 horas más se hizo recuento de la incorporación de tritio incorporado en ADN en un contador de centelleo líquido.

(iii) Ensayo de IFN-gamma

Se determinaron concentraciones de IFN-γ en sobrenadantes recogidos mediante un ELISA específico empleando una técnica de sándwich. En resumen, se recubrieron placas de 96 pocillos de fondo plano Maxisorp (Nunc, Dinamarca) con 50 µl de anticuerpo monoclonal receptor R4.6A2 (Biomira, lote nº IM98A20A) durante 35 minutos a 37°C, 5% de CO₂. Se lavaron a continuación las placas y se incubaron 45 minutos con muestras de ensayo y con la muestra de citocinas patrón positiva (Pharmingen lote nº M031554).

Después de dos lavados se añadió el segundo anticuerpo biotinilado: XMG1.2 (Biomira lote nº BG98G02B). Después del lavado, se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch lote nº 42350) y de nuevo la incubación fue de 30 minutos. Después de 5 lavados, 100 µl de solución de sustrato HRPO: 1 µl de H₂O₂ diluido al 30% en 10 ml de 1 mg/ml de ABTS (Aldrich lote nº 01328ES) tamponado con ácido cítrico y Na₂HPO₄ · 7H₂O se preparó inmediatamente antes de su uso y se añadió a cada pocillo. La densidad óptima se midió con el lector de ELISA Thermomax a una longitud de onda de 405 nm en modo cinético durante 10 minutos. Las concentraciones de citocinas en la muestra de ensayo se determinaron por comparación con patrones de referencia.

(iv) Concentraciones de anticuerpos anti-MUC1

Placas de microvaloración de 96 pocillos se recubrieron con conjugado BP1-151HSA (péptidoMUC1 DE 24 aminoácidos conjugado a HSA), o con Mezcla C (Mezcla C es una mucina MUC1 humana natural purificada a partir de ascitis de cáncer de ovario). Diluciones en serie de sueros se incubaron en placas recubiertas de antígenos a temperatura ambiente durante 1 h, después de lo cual los pocillos se lavaron a fondo. Se añadió anticuerpo específico anti-IgG de ratón en cabra marcado con peroxidasa y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h.

Cada placa se lavó a continuación y se añadió sustrato ABTS. Después de 15 min se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA.

Ejemplo 2

Péptidos antigénicos MUC I mono y dilipidados

El propósito de este ejemplo era demostrar que un péptido MUC I unido a liposomas con dos cadenas lipídicas aumenta drásticamente la producción de anticuerpos anti-MUC I en ratones inmunizados en comparación con un péptido MUC I con un lípido.

Se sintetizaron químicamente péptidos MUC I que contenían uno o dos lípidos. "BP1-217" tiene dos restos de liposerina unidos en el terminal carboxilo de la secuencia peptídica del núcleo y "BP1-228" tiene sólo una liposerina unido al terminal carboxilo. El monolipopéptido y el dilipopéptido se incorporaron por separado en los liposomas y las formulaciones liposómicas resultantes se evaluaron como vacunas.

BP1-217: GVTSAPDTRPAPGSTAS(miristil)S(miristil)L

BP1-228: GVTSAPDTRPAPGSTAS(miristil)L

Después de al menos dos inmunizaciones subcutáneas de ratones C57BL/6 con la vacuna liposómica de dilipopéptido, BP1-217, provocó la respuesta humoral de T2, produciendo concentraciones muy altas de anti-MUC I inmunoglobulina G (IgG). Por el contrario, una respuesta celular con concentraciones muy bajas de IgG producida se invocó en ratones inmunizados dos veces con el monolipopéptido, BP1-228. Por ejemplo, BP1-217 produjo valores de anti-MUC I IgG en el intervalo de 1/72.000 a 1/218.700 en fase sólida de BP1-151 HSA y valores 1/100-1/2700 en fase sólida de Mezcla C, mientras que BP1-228 produjo solamente valores bajos de anticuerpos IgG en fase sólida de BP1-151 HSA, y no se detectaron anticuerpos en la fase sólida mezcla C. Véase la Tabla 1, más adelante.

BP1-228 o BLP-25, como monolipopéptidos, produjeron concentraciones muy bajas de anticuerpos o ninguno en comparación con cualquier péptido MUC1 con 2 cadenas lipídicas. Todas las formulaciones probadas son liposómicas y contienen adyuvante lípido A.

En cualquier lugar desde 40 hasta 100 µg de lipopéptido MUC1 puede utilizarse por inmunización, aunque la presente invención no se limita a estas cantidades, que también pueden variar según el péptido específico utilizado. 5 µg de péptido MUC1 en liposomas provocaron una fuerte respuesta inmunitaria a T1, pero no la producción de anticuerpos. En ensayos clínicos, se observó que una dosis de 1000 µg de BLP25 inyectada en los pacientes era muy eficaz en la producción de una proliferación de linfocitos T específica.

También se demuestra que las diferencias cuantitativas en lugar de cualitativas entre las cadenas de lípidos son importantes en la provocación de respuestas a T1 o T2. Es decir, una respuesta inmunitaria humoral puede provocarse independientemente del tipo de cadena lipídica unida al péptido. Por ejemplo, un péptido MUC I, "BP1-132", que tiene dos restos de aminoácido lipófilo palmitoil lisina unidos a dos restos de lisina adyacentes se demostró también que provoca inmunidad humoral. Véase Tabla 2.

BP1-132: TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPK(palmitato)K(palmitato)G

Los ratones inmunizados dos veces con formulaciones liposómicas que contienen BP1-132 invocaron la producción de anticuerpos anti-MUC I con valores (IgG de 1/218.700 e IgM de 1/8.100 a 1/72.900) similares a los registrados para BP1-217.

Tabla 1: Protocolo I346 Resumen de datos de valor de anticuerpos de IgG

Material inyectado	Ratón nº	BP1-151-HSA		Mezcla C	
		Valor log ₂	Valor de anticuerpo	Valor log ₂	Valor de anticuerpo
Grupo nº 1 BLP16 Dilipo 400 µg/ml BP1-217 200 µg/ml de lípido A	1	17,7	1/218.700	11,4	1/2700
	2	17,7	1/218.700	< 6,6	< 1/100
	3	16,2	1/72.900	9,8	1/900
	4	16,2	1/72.900	9,8	1/900
	5	16,2	1/72.900	11,4	1/2700
Grupo nº 2 BLP16 Monolipo 400 mg/ml BP1-228 200 mg/ml de lípido A	1	11,4	1/2700	< 6,6	< 1/100
	2	9,8	1/900	< 6,6	< 1/100
	3	9,8	1/900	< 6,6	< 1/100
	4	9,8	1/900	< 6,6	< 1/100
	5	< 6,6	< 1/100	< 6,6	< 1/100

Grupo nº 3	1	6,6	1/100	< 6,6	< 1/100
	2	< 6,6	< 1/100	< 6,6	< 1/100
	3	6,6	1/100	< 6,6	< 1/100
	4	< 6,6	< 1/100	8,2	1/300
	5	< 6,6	< 1/100	< 6,6	< 1/100
Grupo nº 4	1	< 6,6	< 1/100	< 6,6	< 1/100
	2	< 6,6	< 1/100	< 6,6	< 1/100
	3	< 6,6	< 1/100	< 6,6	< 1/100
	4	6,6	1/100	< 6,6	< 1/100
	5	< 6,6	< 1/100	< 6,6	< 1/100

Ratones C57Bl/6 se inmunizaron dos veces con la formulación liposómica: BLP16 Dilipo que contiene lipopéptido a base de MUC1 (BP1-217) y lípido A, o BLP16 Monolipo que contiene lipopéptido a base de MUC1 (BP1-228) y lípido A, o BLP25 que contiene lipopéptido a base de MUC1 (BP1-148) y lípido A

BP1-217 GVTSAPDTRPAPGSTAS(miristil)S(miristil)L
 BP1-228 GVTSAPDTRPAPGSTAS (miristil)L
 BP1-148 STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP-Lys (palmitoil)G

Dos inmunizaciones de liposomas de péptido dilipo-MUC I estimulan principalmente la respuesta inmunitaria humoral a T2, aunque queda algo de actividad del sistema inmunitario celular, como se observa por la proliferación de linfocitos T y la producción de IFN- γ . No obstante, la invención demuestra que la administración liposómica de un péptido MUC I con dos cadenas lipídicas (p. ej., ya sea cadenas lipídicas de palmitoil lisina o miristil serina) unidas proporciona un aumento drástico en la producción de anticuerpos y la estimulación del sistema inmunitario humoral.

Este logro no se ha observado previamente en ningún modelo de mamífero.

Tabla 2: Protocolo I350B (2x inmunización) Datos de valores de anticuerpos IgM e IgG

Material inyectado	Ratón nº	BP1-151 HSA		Mezcla C	
		IgM	IgG	IgM	IgG
		Valor	Valor	Valor	Valor
BLP24 Dilipo	1	1/72.900	1/218.700	1/100	1/300
400 μ g/ml BP1-132	2	1/24.300	1/218.700	1/100	1/300
200 μ g/ml de lípido A	3	1/8100	1/218.700	1/100	1/900
X 2 inmunización	4	1/24.300	1/218.700	1/100	1/300
BLP25 Dilipo	1	< 6,6	< 1/100	1/100	< 1/100
400 μ g/ml BP1-148	2	6,6	1/100	< 1/100	< 1/100
200 μ g/ml de lípido A	3	8,2	1/300	1/100	< 1/100
X 2 inmunización	4	< 6,6	< 1/100	1/100	< 1/100
Solución salina	1	< 6,6	< 1/100	< 1/100	< 1/100
	2	< 6,6	< 1/100	< 1/100	< 1/100
X 2 inmunización	3	< 6,6	< 1/100	< 1/100	< 1/100
	4	< 6,6	< 1/100	< 1/100	< 1/100

Se inmunizaron dos veces ratones C57Bl/6 con la formulación liposómica:

BLP24Dilipo, que contiene lipopéptido a base de MUC1 (BP1-132B) y lípido A
 BLP25 que contiene lipopéptido a base de MUC1 (BP1-148) y lípido A
 BP1-182 TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPK(palmitoil)K(palmitoil)L

Para caracterizar mejor el fenómeno observado, ratones transgénicos MUC I se inmunizaron con formulaciones liposómicas a base de MUC I que contienen mono- o dilipopéptidos. Como se muestra en la Tabla 3, una fuerte respuesta a anticuerpos IgG se observó de nuevo tras la inmunización con el dilipopéptido (BP1-217), pero sólo después de cuatro inmunizaciones. Esto demuestra que los ratones transgénicos C57Bl/6 MUC I que son tolerogénicos para el antígeno MUC I necesitan más inmunizaciones que los ratones normales C57Bl/6 para romper esta tolerancia y provocar altos niveles de anti-MUC I IgG. Los ratones inmunizados sólo con el monolipopéptido (p. ej., BP1-228), sin embargo, mostraron valores muy bajos de IgG.

Por lo tanto, la administración de una formulación liposómica que comprende péptido monolipo-MUC-I estimula una respuesta celular. La inmunización con una formulación liposómica de péptido dilipo-MUC I provoca una respuesta

humoral. La creación de un liposoma que comprende monolipo-MUC I y dilipo-MUC I invoca respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales después de la inmunización. Por lo tanto, la modulación de la respuesta inmunitaria se puede conseguir administrando selectivamente una formulación liposómica específica en un orden determinado.

5 **Tabla 3: Protocolo I347C – Datos del valor de anticuerpos IgG de ratones transgénicos MUC1 (4 Vacunas)**

Material inyectado	Ratón nº	BP1-151-HSA		Mezcla C	
		Valor log ₂	Valor de anticuerpo	Valor log ₂	Valor de anticuerpo
Grupo nº 1	1	16,2	1/72.900	< 6,6	< 1/100
BLP16 Dilipo	2	16,2	1/72.900	6,6	1/100
400 µg/ml BP1-217	3	14,6	1/24.300	< 6,6	< 1/100
200 µg/ml de lípido A	4	16,2	1/72.900	< 6,6	< 1/100
Grupo nº 2	1	8,2	1/300	8,2	1/300
BLP16 Monolipo	2	9,8	1/900	< 6,6	< 1/100
400 mg/ml de BP1-228	3	9,8	1/900	8,2	1/300
200 mg/ml de lípido A	4	< 6,6	< 1/100	< 6,6	< 1/100
Grupo nº 3	1	11,4	1/2700	< 6,6	< 1/100
BLP25	2	< 6,6	< 1/100	< 6,6	< 1/100
400 mg/ml BP1-148	3	9,8	1/900	< 6,6	< 1/100
200 mg/ml de lípido A	4	< 6,6	< 1/100	< 6,6	< 1/100
Grupo nº 4	1	< 6,6	< 1/100	< 6,6	< 1/100
Solución salina	2	< 6,6	< 1/100	< 6,6	< 1/100
	3	< 6,6	< 1/100	< 6,6	< 1/100
	4	< 6,6	< 1/100	< 6,6	< 1/100
	5	< 6,6	< 1/100	< 6,6	< 1/100

Se inmunizaron cuatro veces ratones transgénicos C57Bl/6 MUC1 con la formulación liposómica:

- 10 Dilipo BLP16 que contiene lipopéptido a base de MUC1 (BP1-217) y lípido A, o monolipo BLP16 que contiene lipopéptido a base de MUC1 (BP1-228) y lípido A, o BLP25 que contiene lipopéptido a base de MUC1 (BP1-148) y lípido A

- 15 BP1-217 GVTSAPDTRPAPGSTAS (miristil)S(miristil)L
BP1-228 GVTSAPDTRPAPGSTAS(miristil)L
BP1-148 STAPPAHGVTAPDTRPAPGSTAPP-Lys(palmitoil)G

Ejemplo 3

20 Péptidos mono- y dilipidados de la tuberculosis

Como se observó para los monolipo- y dilipopéptidos MUC I, la inmunización con el péptido dilipo de la tuberculosis aumentó drásticamente la producción de anticuerpos. Véase la Tabla 4.

25 **Tabla 4 Respuestas inmunitarias en ratones C57Bl/6 inmunizados dos veces con vacunas liposómicas a base de lipopéptido de la tuberculosis**

Vacuna	Proliferación de linfocitos T (CPM)	SI	IFN-g (pg/ml)	IgG dilipo pep. de TB*	IgM dilipo pep. de TB*
Dilipo TB	35064	13,2	9769	1/218.700	1/900
Monolipo TB	19501	16,2	2276	1/24.000	<1/100
Solución salina	633	0,6	495	<1/100	<1/100

* El dilipopéptido de TB DQVHFQPLPPAVVKLS DALIK se utilizó como una fase sólida en el ensayo ELISA.

- 30 Dos inmunizaciones con dilipopéptido de la tuberculosis aumentaron el nivel de los valores de IgG drásticamente en comparación con los valores que fueron provocados después de las inmunizaciones con monolipopéptidos de la tuberculosis. Los resultados indican que la presencia de dos lípidos aumenta el valor lo que se correlaciona con una respuesta humoral en casi 10 veces.

Ejemplo 4**Péptidos mono- y dilipidados de la hepatitis B**

5 Tabla 5: Protocolo I368B Respuestas inmunitarias en ratones inmunizados dos veces con la vacuna liposómica de mono-o dilipopéptido de la hepatitis B

Vacuna	Proliferación de linfocitos T (CPM)	IFN-g (pg/ml)	IgG dilipopep. de TB*	IgM dilipopep. de TB*
Dilipo de la hepatitis B	3243	0	1/48.600	1/2700
Monolipo de la hepatitis B	5242	1034	1/100	<1/300
Solución salina	158	361	<1/100	<1/100

* El dilipopéptido de la hepatitis B IRTPPAYRPPNAPILK(palmitato)K(palmitato)G se utilizó como una fase sólida en el ensayo ELISA.

10 Dos inmunizaciones con dilipopéptido de la hepatitis B aumentaron drásticamente el nivel de valores de IgG, en comparación con los valores que fueron provocados después de las inmunizaciones con monolipopéptido de la hepatitis B. Asimismo, el nivel de anticuerpos IgM es mayor una vez que la formulación de liposomas de dilipopéptido se utiliza para el procedimiento de inmunización.

Ejemplo 5**Péptidos mono y dilipidados del paludismo**

20 Tabla 6: Protocolo I368B Respuestas inmunitarias en ratones inmunizados dos veces con la vacuna liposómica con mono- o dilipopéptido contra el paludismo

Vacuna	Proliferación de linfocitos T (CPM)	IFN-g (pg/ml)	IgG dilipopep. contra el paludismo*	IgM dilipopep. contra el paludismo *
Dilipo contra el paludismo	15075	1989	1/2700	1/2700
Monolipo contra el paludismo	1280	1036	1/100	<1/100
Solución salina	74	361	<1/100	<1/100

* El dilipopéptido contra la malaria VTHESYQELVKKLEALEDVAVK(palmitato)K(palmitato)G se utilizó como una fase sólida en el ensayo ELISA

25 Dos inmunizaciones con dilipopéptido contra el paludismo aumentaron el nivel de los valores tanto de IgG como de IgM, en comparación con los valores que fueron provocados después de las inmunizaciones con monolipopéptido contra el paludismo. En este caso, la vacuna con dilipopéptido contra el paludismo provocó la proliferación celular más fuerte y las concentraciones de IFN- γ en comparación con la vacuna con monolipo. Esto demuestra que la intensidad de una respuesta inmunitaria, es decir, la respuesta inmunitaria celular, puede modularse variando el número de lípidos unidos al antígeno.

Ejemplo 6**Variando la relación de mono- y dilipopéptidos en un liposoma**

35 Al incorporar varias proporciones de mono- y dilipopéptidos en liposomas, es posible modular el nivel y la intensidad de las respuestas humores. La Tabla 7 resume los valores de IgM en ratones C57B1/6 después de dos inmunizaciones con varios montajes liposómicos. Como era de esperar, los ratones inmunizados con monolipopéptido BLP25 o solución salina (grupo 5 y 6) no produjeron valores de IgM detectables. Sin embargo, todas las formulaciones liposómicas generaron una respuesta inmunitaria celular comparable (datos no mostrados).

40 La mezcla de monolipo- y dilipopéptidos en la proporción 3:1, respectivamente, no mejoró significativamente los valores de los anticuerpos (grupo 1); sin embargo, hay un aumento en el valor de los anticuerpos, en comparación con el grupo 1 cuando se incorporaron mono-y dilipopéptidos a liposomas en una proporción 1:1. La respuesta más intensa del anticuerpo se observó en los ratones inmunizados con una formulación liposómica que contiene monolipo- y dilipopéptidos de MUC1 en la proporción 1:3 (grupo 3).

50 Por lo tanto, al incorporar mono- y dilipopéptidos en varias proporciones en liposomas es posible modular el nivel de las respuestas humores.

Tabla 7: Protocolo 1399B Datos del valor de anticuerpos IgM (2 x inmunización)

Material inyectado x 2 inmunizaciones i.d.	C57BL/6 Ratón nº	IgM	
		BP1-151-HSA	
		Valor de log ₂	Valor de anticuerpos
Gr. 1	1	6,6	1/100
BLP125	2	< 6,6	< 1/100
	3	6,6	1/100
300 µg/ml de monolipo	4	-8,2	1/300
100 µg/ml de dilipo, 200 µg/ml de lípido A	5	< 6,6	< 1/100
Gr. 2	1	6,6	1/100
BLP25	2	6,6	1/100
	3	8,2	1/300
200 µg/ml de monolipo	4	6,6	1/100
200 µg/ml de dilipo, 200 µg/ml de lípido A	5	8,2	1/300
Gr. 3	1	9,8	1/900
BLP25	2	14,6	1/24.300
	3	11,4	1/2700
100 µg/ml de monolipo	4	9,8	1/900
300 µg/ml de dilipo, 200 µg/ml de lípido A	5	13	1/8100
Gr. 4	1	9,8	1/900
BLP25	2	9,8	1/900
	3	11,4	1/2700
400 µg/ml de dilipo	4	11,4	1/2700
200 µg/ml de lípido A	5	9,8	1/900
Gr. 5	1	< 6,6	< 1/100
BLP25	2	< 6,6	< 1/100
	3	< 6,6	< 1/100
400 µg/ml de monolipo	4	6,6	1/100
200 µg/ml de lípido A	5	< 6,6	< 1/100
Gr. 6	1	< 6,6	< 1/100
	2	< 6,6	< 1/100
Solución salina	3	< 6,6	< 1/100
	4	< 6,6	< 1/100
	5	< 6,6	< 1/100
Monolipo [BP1-148: STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP-Lys(Pal)G] Dilipo [BP1-236: STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPK (lipo)K(lipo)G]			

Ejemplo 7

5

Efecto de la posición de la cadena lipídica en el lipopéptido MUC1 en la respuesta inmunitaria humoral

La demostración de una potente respuesta de los anticuerpos después de la inmunización de ratones con lipopéptido MUC1 con dos restos de liposerina unidos al terminal carboxilo plantea una pregunta si esta potente respuesta de los anticuerpos podría mantenerse, si se cambian la posición o el número de restos de liposerina.

10

Para responder a esta pregunta se sintetizaron varios montajes con el lipopéptido MUC1 con diferentes colocaciones del resto de liposerina. Los datos presentados en la Tabla 8 demuestran que sólo la formulación nº 5, con tres restos de liposerina en el terminal carboxilo, fue capaz de generar una potente respuesta anti-MUC1 IgG. La inserción de un separador de tres serinas entre las dos cadenas lipídicas (formulación nº 4) condujo a la disminución del nivel de respuestas de anticuerpos.

15

Del mismo modo, la formulación nº 2 en el que sólo se insertó una cadena lipídica en la mitad del péptido MUC1 presentó algunos valores bajos de anticuerpos, pero esos valores eran mucho más altos cuando se insertaron dos

restos de liposerina en la posición central de la molécula de MUC1 (formulación nº 1). Se observaron algunos valores bajos de anticuerpos cuando los restos de liposerina se colocaron en posiciones extremas: uno en el terminal carboxilo y otro en el terminal amino (formulación nº 2).

- 5 Las respuestas de anticuerpos más potentes podrían generarse cuando dos o tres restos de liposerina se colocan en el terminal carboxilo. Cambiando la posición de los restos de liposerina todavía se mantienen algunos valores de anticuerpos, mayores que BLP25 o solución salina (grupo 6 y 7), pero significativamente menores en comparación con la posición del terminal carboxilo.

10

Tabla 8 Protocolo I405 de Datos de valor de anticuerpos IgG

Material inyectado nº de inmunizaciones	Ratón nº	BP1-265	
		Valor de log ₂	Valor de anticuerpos
Gr. 1 Formulación nº 1 (400 µg/ml de BP1-271; 200 µg/ml de lípido A) x 2 inmunizaciones – i.d.	1 2 3 4 5	11,40 11,40 9,80 13,00 14,80	1/2700 1/2700 1/900 1/8100 1/24.300
Gr. 2 Formulación nº 2 (400 µg/ml de BP1-273; 200 µg/ml de lípido A) x 2 inmunizaciones – i.d.	1 2 3 4 5	< 6,6 < 6,6 8,20 8,20 9,80	< 1/100 < 1/100 1/300 1/300 1/900
Gr. 3 Formulación nº 3 (400 µg/ml de BP1-272; 200 µg/ml de lípido A) x 2 inmunizaciones – i.d.	1 2 3 4 5	9,80 < 6,6 8,20 8,20 < 6,6	1/900 < 1/100 1/300 1/300 < 1/100
Gr. 4 Formulación nº 4 (400 µg/ml de BP1-274; 200 µg/ml de lípido A) x 2 inmunizaciones – i.d.	1 2 3 4 5	9,80 8,20 13,00 6,60 11,40	1/900 1/300 1/8100 1/100 1/2700
Gr. 5 Formulación nº 5 (400 µg/ml de BP1-275; 200 µg/ml de lípido A) x 2 inmunizaciones – i.d.	1 2 3 4 5	14,60 16,20 16,20 16,20 16,20	1/24.300 1/72.900 1/72.900 1/72.900 1/72.900
Gr. 6 Formulación nº 6 (400 µg/ml de BP1-148; 200 µg/ml de lípido A) x 2 inmunizaciones – i.d.	1 2 3 4 5	< 6,6 < 6,6 < 6,6 11,40 < 6,6	< 1/100 < 1/100 < 1/100 1/2700 < 1/100
Gr. 7 Solución salina x 2 inmunizaciones – i.d.	1 2 3 4 5	< 6,6 < 6,6 < 6,6 < 6,6 < 6,6	< 1/100 < 1/100 < 1/100 < 1/100 < 1/100

[BP1-265: TSAPDTRPAGSTAPPAHGVTSAPDTRPAGSTAPPAHGVS(lipo)S(lipo)L]

- 15 [BP1-271: TSAPDTRPAGSS(lipo)S(lipo)STAPDTRPAPGS]

[BP1-272: TSAPDTRPAGSS(lipo)STAPDTRPAPGS]

[BP1-273: S(lipo)GVTSAPDTRPAPGSAS(lipo)L]

20

[BP1-274: GVTSAPDTRPAPGSTAS(lipo)SSSS(lipo)L]

[BP1-275: GVTSAPDTRPAPGSTAS(lipo)S(lipo)S(lipo) L]

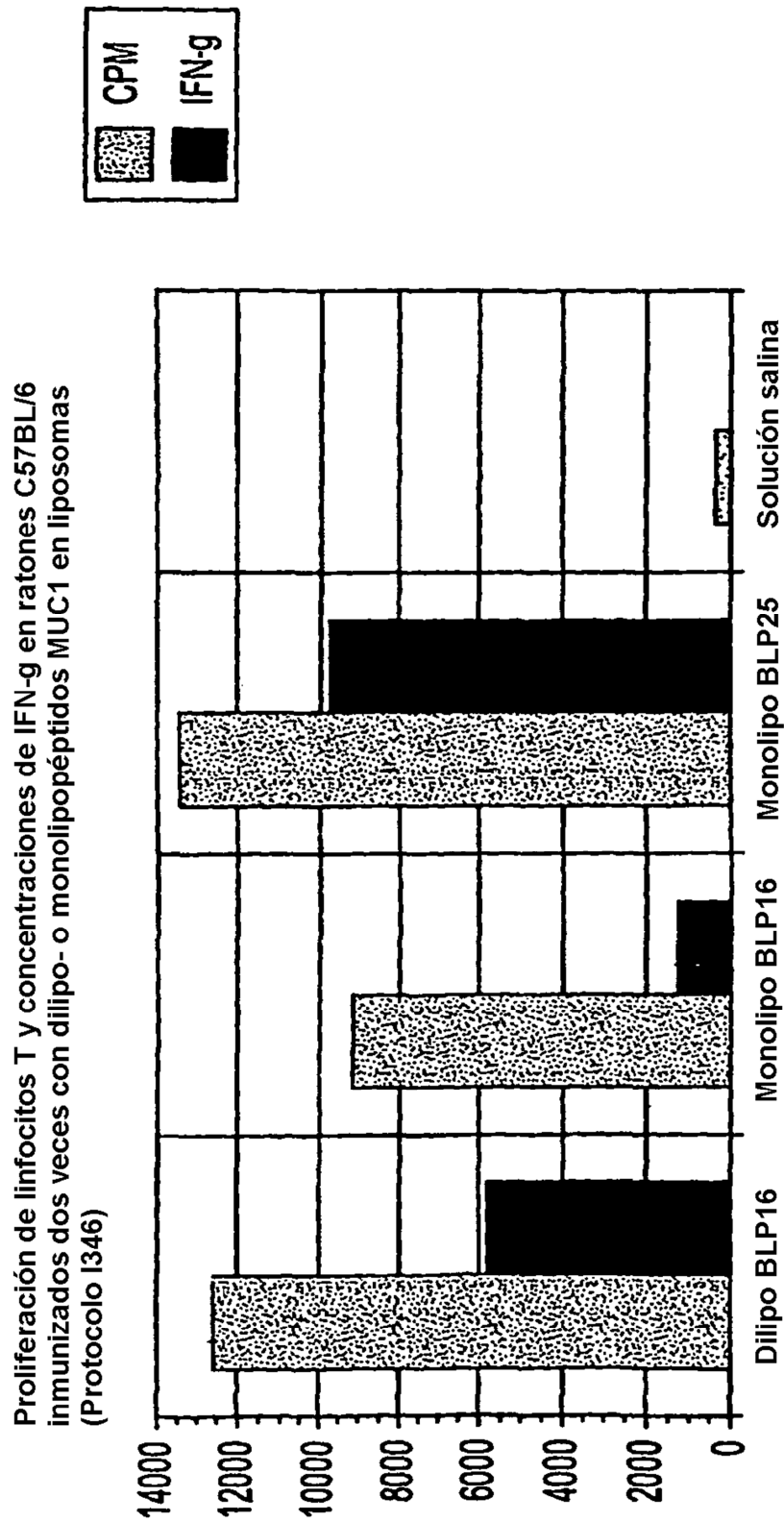
5 [BP1-148: STAPDAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP-Lys(palmitoil)]G

Se pretende que la presente invención comprenda las modificaciones y variaciones de esta invención siempre que estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Liposoma para su utilización como vacuna para tratar el cáncer, la tuberculosis, el paludismo o la hepatitis B, que comprende un dilipopéptido inmunógeno en el que un lípido está unido cada uno de dos aminoácidos en el dilipopéptido.
2. Liposoma para su utilización según la reivindicación 1, en el que una fracción peptídica de dicho dilipopéptido procede de una proteína de cáncer, tuberculosis, paludismo o hepatitis B.
- 10 3. Liposoma para su utilización según la reivindicación 2, en el que la fracción peptídica de dicho dilipopéptido se deriva de una proteína de cáncer.
- 15 4. Liposoma para su utilización según la reivindicación 2 ó 3, en el que la fracción peptídica comprende por lo menos 5 aminoácidos contiguos que comprende un epítipo de una fracción inmunógena de la proteína.
5. Liposoma para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la fracción peptídica de dicho dilipopéptido comprende una secuencia, en su totalidad o en parte, seleccionada de entre las SEC. ID. nº 1 a 4.
- 20 6. Liposoma para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que consiste esencialmente en un dilipopéptido.
7. Liposoma para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que la fracción peptídica de dicho dilipopéptido procede de MUC-1.
- 25 8. Liposoma para su utilización según la reivindicación 7, en el que la fracción peptídica de dicho dilipopéptido comprende en su totalidad o en parte la secuencia SEC. ID. nº 1.
- 30 9. Liposoma para su utilización según la reivindicación 7, en el que la fracción peptídica de dicho dilipopéptido comprende la secuencia SGVTSAPDTRPAPGSTA o STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP.
10. Liposoma para su utilización según la reivindicación 7, en el que los lípidos están colocados en el terminal N o el terminal C del péptido MUC 1.
- 35 11. Liposoma para su utilización según la reivindicación 7, en el que el dilipopéptido es GVTSAPDTRPAPGSTAS (miristil)S(miristil)L.
12. Liposoma para su utilización según la reivindicación 7, en el que el dilipopéptido es TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPK(palmitoil)K(palmitoil)L.
- 40 13. Liposoma para su utilización según la reivindicación 7, en el que el dilipopéptido es TSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVSLipoS(lipo)L.
14. Liposoma para su utilización según la reivindicación 7, en el que el dilipopéptido es TSAPDTRPAPGSSLipoS(lipo) STAPDTRPAPGS.
- 45 15. Liposoma para su utilización según la reivindicación 7, en el que el dilipopéptido es S(lipo)GVTSAPDTRPAPGSAS (lipo)L.
- 50 16. Liposoma para su utilización según la reivindicación 7, en el que el dilipopéptido es GVISAPDTRPAPGSTAS(lipo) SSSS(lipo)L.
17. Liposoma para su utilización según la reivindicación 7, en el que el dilipopéptido es TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPK(palmitoil)K(palmitoil)G.
- 55 18. Liposoma para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 6, en el que la fracción peptídica de dicho dilipopéptido se deriva de una proteína de la tuberculosis.
19. Liposoma para su utilización según la reivindicación 18, en el que la fracción peptídica de dicho dilipopéptido comprende la secuencia DQVHFQPLPPAVVKLSDALIK.
- 60 20. Liposoma para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 6, en el que la fracción peptídica de dicho dilipopéptido se deriva de una proteína de la hepatitis B.
- 65 21. Liposoma para su utilización según la reivindicación 20, en el que la fracción peptídica de dicho dilipopéptido comprende la secuencia IRTTPAYRPPNAPILK.

22. Liposoma para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 4 a 6, en el que la fracción peptídica de dicho dilipopéptido se deriva de una proteína del paludismo.
- 5 23. Liposoma para su utilización según la reivindicación 22, en el que la fracción peptídica de dicho dilipopéptido comprende la secuencia VTHESYQELVKKLEALEDAVK.
24. Liposoma para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada aminoácido lipidado es una treonina, serina, lisina, arginina o cisteína.
- 10 25. Liposoma para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada aminoácido lipidado se lipida independientemente con un resto de miristilo, palmitoilo o laurilo.
- 15 26. Liposoma para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los lípidos están colocados en tres aminoácidos del terminal C del dilipopéptido.
27. Liposoma para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su utilización en el tratamiento del paciente estimulando una respuesta inmunitaria humoral a dicho dilipopéptido en el paciente.
- 20 28. Liposoma para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, destinado a ser utilizado en el tratamiento del paciente estimulando una respuesta inmunitaria celular a dicho dilipopéptido en el paciente.
29. Composición liposómica para su utilización como vacuna para el tratamiento del cáncer, la tuberculosis, el paludismo o la hepatitis B, que comprende por lo menos un liposoma como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el liposoma comprende además un monolipopéptido.
- 25 30. Composición liposómica para su utilización según la reivindicación 29, en la que el porcentaje de dicho dilipopéptido oscila entre más de 0 y menos de 100%, sobre la base de los lipopéptidos totales incorporados en dicho liposoma.
- 30 31. Composición liposómica para su utilización según la reivindicación 29, en la que el porcentaje de dicho dilipopéptido incorporado en dicho liposoma es del 50%.
32. Composición liposómica para su utilización según la reivindicación 29, en la que el porcentaje de dicho dilipopéptido está comprendido entre el 50% y el 99%.
- 35 33. Composición liposómica para su utilización según la reivindicación 29, en la que el monolipopéptido es STAPPAHGVTAPDTRPAPGSTAPP-Lys(palmitoil)G.
- 40 34. Composición liposómica para su utilización según la reivindicación 29, en la que el monolipopéptido es GVTAPDTRPAPGSTAS(miristil)L.
35. Composición liposómica para su utilización según la reivindicación 29, en la que el monolipopéptido es TSAPDTRPAPGSS(lipo)STSAPDTRPAPGS.
- 45 36. Composición liposómica para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 35, en la que el monolipopéptido y el dilipopéptido comprenden diferentes epítomos peptídicos.
37. Composición liposómica para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 35, en la que el monolipopéptido y el dilipopéptido comprenden el mismo epítopo peptídico.
- 50 38. Composición liposómica para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 37, que comprende además un adyuvante.
- 55 39. Vacuna liposómica para su utilización en la estimulación de una respuesta inmunitaria en un paciente, que comprende un dilipopéptido inmunógeno, comprendiendo dicho dilipopéptido por lo menos un epítopo peptídico, en el que un lípido está unido a uno de cada dos aminoácidos en el dilipopéptido.



Ratones C57BL/6 se inmunizaron dos veces por vía subcutánea con una vacuna liposómica BLP25 convencional, o con vacunas liposómicas con dilipo- o monolipo péptidos a base de MUC1 de 16 aa. Nueve días después de un segundo procedimiento de inmunización se ensayaron una proliferación de linfocitos T y las concentraciones de IFN-g en ensayos normalizados.

FIGURA 1