

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 097**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/14 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2006 E 06701409 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 1844789**

54 Título: **Composición emulsionada para dilución y composición de vacuna contra el cáncer**

30 Prioridad:

19.01.2005 JP 2005012140

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

14.10.2014

73 Titular/es:

SUMITOMO DAINIPPON PHARMA CO., LTD.
(50.0%)
6-8, Doshomachi 2-chome, Chuo-ku, Osaka-shi
Osaka 541-8524, JP y
NOF CORPORATION (50.0%)

72 Inventor/es:

SAITO, KOICHI y
OKAWA, YUSUKE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 507 097 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

Composición emulsionada para dilución y composición de vacuna contra el cáncer

Campo Técnico

5 La presente invención pertenece al campo de la inmunoterapia del cáncer y se refiere al uso de una composición emulsionada para dilución de un péptido de antígeno tumoral o un dímero del mismo, que tiene actividad de inducción de las células T citotóxicas. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de una composición emulsionada para dilución de un péptido de antígeno tumoral o un dímero del mismo, que comprende un éster particular, un tensioactivo, un emulsificante, y una fase acuosa, y que se encuentra en la forma de una emulsión W/O estable. La presente invención se refiere también a una composición de vacuna contra el cáncer o inductor específico de las células T citotóxicas, que comprende un éster particular, un tensioactivo, un emulsificante, y una fase acuosa que comprende un péptido de antígeno tumoral constituido por una secuencia particular de aminoácidos o un dímero de la misma, y que se encuentra en la forma de una emulsión W/O estable.

Técnica anterior

15 En la eliminación de las células del cáncer, células infectadas por virus y análogas por el cuerpo vivo, la inmunidad celular, particularmente las células T citotóxicas (a las que se hace referencia en lo sucesivo como CTL) juegan un papel importante. CTL reconoce el complejo formado en las células del cáncer por un péptido antigénico derivado de una proteína antigénica del cáncer (péptido de antígeno tumoral) y el antígeno de clase I del MHC (Complejo de Histocompatibilidad Mayor) (designado en el caso de los humanos como antígeno HLA), y ataca/destruye las células del cáncer.

20 Como un ejemplo representativo de la proteína antigénica del cáncer, pueden mencionarse las descritas en la Tabla de Inmunidad, volumen 10, página 281, 1999. Específicamente, pueden mencionarse gp100 y MART-1, que son proteínas específicas del tejido de los melanocitos, y las proteínas del melanosoma tales como tirosinasa. Como la proteína antigénica del cáncer distinta del melanoma pueden mencionarse marcadores del cáncer tales como CEA, PSA, y HER2/neu. Se puede mencionar también TERT, cuya expresión aumenta en el cáncer. Adicionalmente, es conocida también WT1, que se expresa también abundantemente en muchos tipos de cáncer, como una nueva proteína antigénica del cáncer en la leucemia y cánceres sólidos.

30 El péptido de antígeno tumoral es un péptido resultante del procesamiento de una proteína antigénica del cáncer por una proteasa intracelular. Como se ha indicado arriba, un complejo de este péptido de antígeno tumoral resultante y el antígeno del MHC clase I (antígeno HLA) se presenta a la superficie de la célula y es reconocido por CTL. Sin embargo, en el desarrollo de un agente inmunoterapéutico del cáncer (vacuna contra el cáncer) utilizando la destrucción de las células del cáncer por CTL, ha resultado difícil inducir eficientemente CTL utilizando aisladamente un solo péptido de antígeno tumoral, debido a la inmunogenicidad generalmente baja. Por tanto, existe demanda del desarrollo de una preparación capaz de estimular la inducción de CTL.

35 A este fin, se han realizado muchas investigaciones concernientes a preparaciones que estimulen la inducción de CTL. Particularmente, se han llevado a cabo gran número de investigaciones concernientes a preparaciones de tipo emulsión.

Generalmente, existen diferentes tipos de preparaciones de emulsión: emulsiones O/W y emulsiones W/O.

En el caso de las emulsiones O/W, el péptido que sirve como el antígeno no puede retenerse en la fase interna, y no se exhibe actividad de inducción de CTL específica terapéuticamente eficaz.

40 En el caso de las emulsiones W/O, en las cuales la fase acuosa sirve como la fase interna, se espera una actividad de inducción de CTL excelente, debido a que el péptido que sirve como el antígeno es fácil de retener en la fase interna, pero deben resolverse muchos problemas por resolver antes que aquéllas puedan llevarse a aplicaciones prácticas.

45 Por ejemplo, como una emulsión W/O para portador del péptido de antígeno tumoral, es conocido el adyuvante incompleto de Freund, pero en algunos casos no puede obtenerse actividad eficaz debido a estabilidad insuficiente. Se han registrado otros problemas tales como dificultad en la administración debida a viscosidad alta.

50 El adyuvante incompleto de Freund es conocido desde hace mucho tiempo como un adyuvante inmunopotenciador que hace que bacterias desactivadas o virus desactivados se incluyan para inducir producción de anticuerpos, y se han investigado composiciones de vacuna de tipo emulsión W/O alternativas; por ejemplo, se propusieron las composiciones descritas en la Publicación de Patente Japonesa Kohyo No. HEI-7-509733, el panfleto para la Publicación de Patente Internacional No. 94/20071, y la Publicación de Patente Japonesa Kokai No. HEI-9-268130.

Como sustituto para el adyuvante incompleto de Freud, se propone una aplicación de emulsión compuesta W/O/W para vacuna en la Publicación de Patente Japonesa Kokai No. 2001-131087 (equivalente a EP1097721).

Sin embargo, como portador del péptido de antígeno tumoral para sustituir el adyuvante incompleto de Freund, no se conoce emulsión W/O alguna capaz de activar de manera terapéuticamente eficaz la inducción de CTL.

EP0781559 da a conocer una vacuna adyuvante de agua en aceite que comprende una fase de aceite, un tensioactivo no iónico, aducto de óxido de etileno con triglicérido de hidroxiácido graso y una fase acuosa.

- 5 WO94/20071 da a conocer una emulsión vacunal fluida de agua en aceite que contiene un aceite metabolizable (aceite vegetal o ácido graso, poliol o alcohol-éster).

EP1.550.453 da a conocer emulsiones de agua en aceite que comprenden un péptido de antígeno tumoral.

- 10 Generalmente, dado que los péptidos antigénicos del cáncer son compuestos de peso molecular bajo, no es fácil mantenerlos estables en emulsión W/O. Adicionalmente, es de temer que el péptido de antígeno tumoral sufra degradación, agregación y análogos debido a la energía durante la emulsificación. Además, los péptidos antigénicos del cáncer comprenden desde compuestos muy solubles en agua a compuestos poco solubles dependiendo de la secuencia de aminoácidos de los mismos. Por tanto, existe demanda para el desarrollo de una vacuna contra el cáncer basada en una emulsión W/O muy versátil que estimule de modo terapéuticamente eficaz la inducción de CTL, con indiferencia de las propiedades del péptido de antígeno tumoral.

- 15 Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición emulsionada para dilución para preparar una composición de vacuna contra el cáncer que exhibe actividad eficaz de inducción de CTL in vivo en diversos péptidos antigénicos del cáncer, y tiene viscosidad baja y estabilidad excelente. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de preparación de una nueva vacuna contra el cáncer que estimula específicamente la inducción de CTL in vivo de acuerdo con el péptido de antígeno tumoral contenido, utilizando la composición emulsionada arriba descrita para dilución, y la composición.
- 20

Descripción de la Invención

- 25 Los autores de la presente invención han encontrado que por dilución de diversos péptidos conocidos como antígenos tumorales con una composición emulsionada particular que comprende un éster particular y un tensioactivo particular, puede exhibirse actividad de inducción de CTL específica para cada antígeno, con indiferencia del tipo y las propiedades del péptido, realizado investigaciones diligentes ulteriores, y completado la presente invención.

De acuerdo con ello, la presente invención abarca los modos de realización siguientes:

[1] Uso de una composición emulsionada para dilución de un péptido de antígeno tumoral que tiene 8 a 12 aminoácidos o un dímero del mismo, en donde la composición emulsionada comprende:

- 30 A) un éster de un ácido graso que tiene 8 a 22 átomos de carbono y un alcohol que tiene 2 a 24 átomos de carbono, teniendo el éster un punto de solidificación no mayor que 10°C, en 50 a 90% en peso;
- B) un tensioactivo no iónico constituido por un aducto de triglicérido de hidroxiácido graso con 20 moles de óxido de etileno, en 0,5 a 20% en peso;
- 35 C) un emulsificante que es un éster parcial de un alcohol polihidroxílico y un ácido graso, siendo el éster parcial líquido a 40°C, en 0 a 20% en peso; y
- D) agua en 5 a 20% en peso.

[2] Uso de [1] en donde la composición emulsionada comprende:

- ingrediente A en 60 a 80% en peso;
- ingrediente B en 1 a 10% en peso;
- 40 ingrediente C en 5 a 15% en peso; e
- ingrediente D en 5 a 20% en peso.

[3] Uso de cualquiera de [1] a [2], en donde el diámetro medio de partícula de la fase de dispersión de la composición emulsionada para dilución es 50 a 500 nm.

- 45 [4] Uso de cualquiera de [1] a [3], en donde el ácido graso que constituye el ingrediente A es ácido oleico, ácido mirístico o ácido 2-etilhexanoico.

[5] Uso de cualquiera de [1] a [3], en donde el éster del ingrediente A es oleato de etilo, miristato de octildodecilo o 2-etilhexanoato.

[6] Uso de cualquiera de [1] a [3], en donde el triglicérido de hidroxiácido graso que constituye el tensioactivo no iónico del ingrediente B es aceite de ricino o aceite de ricino endurecido.

[7] Uso de cualquiera de [1] a [3], en donde el ingrediente B es un tensioactivo no iónico constituido por un aducto de aceite de ricino endurecido con 20 moles de óxido de etileno.

5 [8] Una composición de vacuna contra el cáncer que comprende:

A) un éster de un ácido graso que tiene 8 a 22 átomos de carbono y un alcohol que tiene 2 a 24 átomos de carbono, siendo el punto de solidificación del éster no mayor que 10°C, en 30 a 80% en peso;

B) un tensioactivo no iónico constituido por un aducto de triglicérido de hidroxiácido graso con 20 moles de óxido de etileno, en 0,5 a 20% en peso;

10 C) un emulsificante que es un éster parcial de un alcohol polihidroxílico y un ácido graso, siendo el éster parcial líquido a 40°C, en 0 a 20% en peso; y

E) una fase acuosa que comprende un péptido de antígeno tumoral que tiene 8 a 12 aminoácidos o un dímero del mismo, en 10 a 60% en peso;

en donde la composición es una emulsión W/O.

15 [9] La composición de vacuna contra el cáncer descrita en [8], que comprende

ingrediente A en 40 a 60% en peso;

ingrediente B en 1,0 a 5,0% en peso;

ingrediente C en 5,0 a 10,0% en peso; y

ingrediente E en 30 a 50% en peso.

20 [10] Un método de preparación de una composición de vacuna contra el cáncer conforme a [8], que comprende diluir 0,25 a 1,0 partes en volumen de una fase acuosa que comprende un péptido de antígeno tumoral que tiene 8 a 12 aminoácidos o un dímero del mismo con 1 parte en volumen de una composición emulsionada que comprende:

A) un éster de un ácido graso que tiene 8 a 22 átomos de carbono y un alcohol que tiene 2 a 24 átomos de carbono, teniendo el éster un punto de solidificación no mayor que 10°C, en 50 a 90% en peso;

25 B) un tensioactivo no iónico constituido por un aducto de triglicérido de hidroxiácido graso con 20 moles de óxido de etileno, en 0,5 a 20% en peso;

C) un emulsificante que es un éster parcial de un alcohol polihidroxílico y un ácido graso, siendo el éster parcial líquido a 40°C, en 0 a 20% en peso; y

D) agua en 5 a 20% en peso.

30 [11] Un kit para preparar justo antes de su uso una composición de vacuna contra el cáncer conforme a [8] que comprende una fase acuosa que comprende un péptido de antígeno tumoral que tiene 8 a 12 aminoácidos o un dímero del mismo, y una composición emulsionada para diluir la fase acuosa que comprende:

A) un éster de un ácido graso que tiene 8 a 22 átomos de carbono y un alcohol que tiene 2 a 24 átomos de carbono, teniendo el éster un punto de solidificación no mayor que 10°C, en 50 a 90% en peso;

35 B) un tensioactivo no iónico constituido por un aducto de triglicérido de hidroxiácido graso con 20 moles de óxido de etileno, en 0,5 a 20% en peso;

C) un emulsionante que es un éster parcial de un alcohol polihidroxílico y un ácido graso, siendo el éster parcial líquido a 40°C en 0 a 20% en peso; y

D) agua en 5 a 20% en peso.

40 [12] Una composición emulsionada para uso en la activación terapéutica de la inducción de CTL en un péptido de antígeno tumoral que tiene 8 a 12 aminoácidos o un dímero del mismo, que comprende:

A) un éster de un ácido graso que tiene 8 a 22 átomos de carbono y un alcohol que tiene 2 a 24 átomos de carbono, teniendo el éster un punto de solidificación no mayor que 10°C, en 50 a 90% en peso;

45 B) un tensioactivo no iónico constituido por un aducto de triglicérido de hidroxiácido graso con 20 moles de óxido de etileno, en 0,5 a 20% en peso;

C) un emulsionante que es un éster parcial de un alcohol polihidroxílico y un ácido graso, siendo el éster parcial líquido a cuenta grados Celsius, en 0 a 20% en peso; y

D) agua en 5 a 20% en peso.

5 [13] La composición emulsionada para uso conforme a [12], que comprende ingrediente A en 60 a 80% en peso; ingrediente B en 1 a 10% en peso; ingrediente C en 5 a 15% en peso; e ingrediente D en 5 a 20% en peso.

[14] La composición emulsionada para uso conforme a [12] o [13], en donde el diámetro medio de partícula de la fase de dispersión de la composición emulsionadas 50 a 500 nm.

[15] La composición emulsionada para uso conforme a uno cualquiera de [12] a [14], en donde

a) el ácido graso que constituye el ingrediente A es ácido oleico, ácido mirístico o ácido 2-etilhexanoico;

10 b) el éster del ingrediente A es oleato de etilo, miristato de octildodecilo o 2-etilhexanoato de cetilo,

c) el triglicérido de hidroxíácido graso que constituye el tensioactivo no iónico del ingrediente B es aceite de ricino o aceite de ricino endurecido, o

d) el ingrediente B es un tensioactivo no iónico constituido por un aducto de aceite de ricino endurecido con 20 moles de óxido de etileno.

15 **Breve Descripción de los Dibujos**

La Figura 1 es un gráfico que muestra los resultados de la inducción específica de CTL utilizando composiciones de vacuna contra el cáncer que comprenden el péptido TERT.

La Figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de la inducción específica de CTL utilizando composiciones de vacuna contra el cáncer que comprenden el péptido MAGE-1.

20 La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de la inducción específica de CTL utilizando composiciones de vacuna contra el cáncer que comprenden el péptido PSA.

La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de la inducción específica de CTL utilizando composiciones de vacuna contra el cáncer que comprenden el péptido PSA.

25 La Figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de la inducción específica de CTL utilizando composiciones de vacuna contra el cáncer que comprenden el péptido CEA.

La Figura 6 es un gráfico que muestra los resultados de la inducción específica de CTL utilizando composiciones de vacuna contra el cáncer que comprenden diversos péptidos antigénicos del cáncer.

La Figura 7 muestra la distribución de tamaños de partícula de la composición emulsionada para dilución 8.

La Figura 8 muestra la distribución de tamaños de partícula de la composición emulsionada para dilución 29.

30 La Figura 9 es un gráfico que muestra los resultados de la inducción específica de CTL para cada péptido utilizando composiciones de vacuna contra el cáncer que comprenden una mezcla de dos clases de péptido de antígeno tumoral.

Modo Óptimo para Realización de la Invención

La composición emulsionada para dilución utilizada en la presente invención se describe a continuación en detalle.

35 La "composición emulsionada para dilución" utilizada en la presente invención se refiere a una composición utilizada para dilución de un péptido de antígeno tumoral o un dímero del mismo. La "composición de vacuna contra el cáncer" de la presente invención se refiere a una composición obtenida por dilución de un péptido antigénico cáncer o un dímero del mismo con la composición emulsionada para dilución de la presente invención.

40 La composición emulsionada para dilución de la presente invención es una emulsión pre-emulsionada del tipo W/O. La composición emulsionada para dilución de la presente invención es una composición para dilución de una fase acuosa que comprende un péptido de antígeno tumoral que tiene 8 a 12 aminoácidos o un dímero del mismo; por dilución de este modo de la fase acuosa, se puede preparar una composición de vacuna contra el cáncer que estimula la inducción de CTL específica para cada péptido de antígeno tumoral.

45 En la composición emulsionada para dilución de la presente invención, el ingrediente A es un éster de un ácido graso y un alcohol, preferiblemente un éster de un ácido graso que tiene 8 a 22 átomos de carbono y un alcohol que tiene 2 a 24 átomos de carbono, siendo el punto de solidificación del éster no mayor que 10°C.

El éster de un ácido graso y un alcohol, utilizado como ingrediente A, puede seleccionarse de entre aquéllos que tienen un punto de solidificación no mayor que 10°C. Si el punto de solidificación del ingrediente A excede de 10°C, es de temer que la estabilidad, particularmente la estabilidad a baja temperatura, de la composición emulsionada para dilución decazca, siendo por consiguiente indeseable.

- 5 Como ejemplos del ácido graso que tiene 8 a 22 átomos de carbono, pueden mencionarse ácidos grasos saturados o insaturados que tienen 8 a 22 átomos de carbono; específicamente, ácido caprílico, ácido 2-etilhexanoico, ácido nonanoico, ácido cáprico, ácido undecanoico, ácido láurico, ácido tridecanoico, ácido mirístico, ácido miristoleico, ácido pentadecanoico, ácido palmítico, ácido isopalmítico, ácido palmitoleico, ácido isoesteárico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido nervónico y análogos. Como ejemplos del alcohol que tiene 2 a 24 átomos de carbono, se pueden mencionar alcanoles que tienen 2 to 24 átomos de carbono, y alquenoles que tienen 2 to 24 átomos de carbono; específicamente, pueden mencionarse alcoholes tales como etanol, propanol, isopropanol, etilenglicol, butanol, hexanol, octanol, 2-etilhexanol, decanol, dodecanol, alcohol mirístico, alcohol cetílico, alcohol isocetílico (2-hexildecanol), alcohol isoesteárico, alcohol oleílico, eicosenol, docosenol, tetracosenol, y 2-octildodecanol y análogos.
- 10
- 15 Como ejemplos del ingrediente A utilizado en la presente invención, se pueden mencionar específicamente 2-etilhexanoato de cetilo, laurato de hexilo, miristato de butilo, miristato de isopropilo, miristato de isocetilo, miristato de octildodecilo, palmitato de 2-metilhexilo, palmitato de isoesteárico, isoesteárate de isopropilo, isoesteárate de isocetilo, estearato de 2-etilhexilo, oleato de etilo, oleato de decilo, oleato de oleilo, oleato de octildodecilo, linoleato de etilo, linoleato de isopropilo y análogos.
- 20 El ingrediente A utilizado en la presente invención puede sintetizarse como un éster, y puede extraerse/purificarse a partir de un aceite o grasa natural. Como ejemplos del aceite éster derivado naturalmente, pueden mencionarse aceite de jojoba, aceite de "reloj anaranjado" ("orange roughy") y análogos. Estos ésteres están generalmente disponibles en el comercio, de entre los cuales puede seleccionarse uno adecuado para uso farmacéutico de acuerdo con el propósito.
- 25 El ingrediente A utilizado en la presente invención es preferiblemente un éster de ácido oleico, un éster de ácido mirístico o un éster de ácido 2-etilhexanoico, más preferiblemente oleato de etilo, miristato de octildodecilo, o 2-etilhexanoato de cetilo, todavía más preferiblemente oleato de etilo.

En la composición emulsionada para dilución de la presente invención, el contenido de ingrediente A es 50 a 90% en peso, preferiblemente 55 a 85% en peso, más preferiblemente 60 a 80% en peso. Si el contenido de ingrediente A es menor que 50% en peso, es posible que la composición de vacuna contra el cáncer acabada obtenida por dilución de un péptido de antígeno tumoral se vuelva inestable, siendo por tanto indeseable.

30

En la composición emulsionada para dilución de la presente invención, el ingrediente B es un tensioactivo no iónico constituido por un aducto de triglicérido de hidroxilácido graso con 20 moles de óxido de etileno.

El aducto de triglicérido de hidroxilácido graso con óxido de etileno es un tensioactivo ampliamente utilizado para emulsificación, solubilización y análogos, estando disponibles comercialmente aductos con 5 a 100 moles de óxido de etileno. Un tensioactivo constituido por menos de 5 moles de aducto de óxido de etileno tiene una actividad tensioactivo baja por lo que no puede formarse una composición emulsionada para dilución que exhiba un estado emulsionado satisfactorio, siendo por tanto indeseable. Dado que un tensioactivo constituido por más de 20 moles de aducto de óxido de etileno es fuertemente hidrófilo, es de temer no sólo que la estabilidad de emulsificación decazca debido a la generación de partículas de la fase acuosa y análogas en la composición de vacuna contra el cáncer obtenida por dilución de la composición emulsionada, pero también la actividad de inducción de CTL para la composición de vacuna contra el cáncer puede decrecer, siendo por tanto indeseable.

35

40

El tensioactivo no iónico utilizado como ingrediente B está constituido preferiblemente por un aducto de aceite de ricino o aceite de ricino endurecido con 20 moles de óxido de etileno. Por utilización de un tensioactivo no iónico de este tipo, puede obtenerse una composición emulsionada para dilución de estabilidad excelente, y, adicionalmente, se puede preparar una composición de vacuna contra el cáncer que exhibe estabilidad excelente y alta actividad de inducción de CTL cuando un péptido de antígeno tumoral se diluye con la composición emulsionada para dilución. Por utilización de un tensioactivo no iónico constituido por un aducto de aceite de ricino o aceite de ricino endurecido con 20 moles de óxido de etileno se puede preparar finalmente una composición de vacuna contra el cáncer de seguridad excelente para el sitio de administración.

45

50

En la composición emulsionada para dilución de la presente invención, el contenido de ingrediente B es 0,5 a 20% en peso, preferiblemente 1 a 15% en peso, más preferiblemente 1 a 10% en peso. Si el contenido de ingrediente B es menor que 0,5% en peso, la actividad del tensioactivo decrece excesivamente y, como resultado, es posible que no se obtenga una composición emulsionable para dilución, lo cual es por consiguiente indeseable.

55 Inversamente, si el contenido excede de 20% en peso, no sólo ocurre conversión de fases durante la dilución del péptido de antígeno tumoral, lo cual dificulta la obtención final de una composición satisfactoria de vacuna contra el cáncer, sino que es de temer también que la seguridad de la composición de vacuna contra el cáncer para el sitio de administración decazca, siendo por tanto asimismo indeseable.

El ingrediente C contenido opcionalmente en la composición emulsionada para dilución de la presente invención es un emulsificante que es un éster parcial de un alcohol polihidroxílico y un ácido graso, siendo el éster parcial líquido a 40°C.

5 En la presente invención, además del ingrediente B arriba descrito, por contener el ingrediente C, puede prepararse una composición de vacuna contra el cáncer que exhibe mejor estado emulsionado y tiene estabilidad excelente cuando se utiliza para diluir un péptido de antígeno tumoral y, como resultado, se puede obtener una composición de vacuna contra el cáncer que exhibe actividad excelente de inducción de CTL en clases de péptidos diversificadas.

10 Como ejemplos del alcohol polihidroxílico que constituye el ingrediente C de la presente invención, pueden mencionarse glicerina, diglicerina, sorbitán, sorbitol, manitán, manitol, sacarosa y análogos. Como ejemplos del ácido graso que constituye el ingrediente C, pueden mencionarse ácido láurico, ácido mirístico, ácido isoesteárico, ácido oleico, ácido linoleico y análogos. Como el ingrediente C de la presente invención, puede seleccionarse uno que es líquido a 40°C de entre éstos ésteres parciales de un alcohol polihidroxílico y un ácido graso.

15 Como ejemplos específicos adecuados de ingrediente C, se pueden mencionar monooleato de glicerina, dioleato de glicerina, monooleato de diglicerina, dioleato de diglicerina, monooleato de sorbitán, sesquioleato de sorbitán, dioleato de sorbitán, trioleato de sorbitán, mezclas de los mismos y análogos. Ejemplos particularmente adecuados son monooleato de glicerina, dioleato de glicerina, monooleato de sorbitán, sesquioleato de sorbitán, dioleato de sorbitán, y mezclas de los mismos. Éstos están por lo general disponibles en el comercio, pudiendo seleccionarse de entre ellos los adecuados para uso farmacéutico.

20 En la composición emulsionada para dilución de la presente invención el contenido de ingrediente C se selecciona en particular dentro del intervalo de 1 a 20% en peso, siendo más preferible el intervalo de 5 a 15% en peso. EN estas condiciones, si el contenido excede de 20% en peso, no sólo la viscosidad de la composición emulsionada para dilución aumenta de tal modo que no puede obtenerse una composición satisfactoria de vacuna contra el cáncer cuando el péptido de antígeno tumoral de la presente invención se diluye, sino que es de temer también que la seguridad de la composición de vacuna contra el cáncer para el sitio de administración decazca, siendo por tanto indeseable. Si el contenido de ingrediente C no es menor que 1% en peso, se exhibe un efecto aditivo suficiente, siendo esto por tanto preferible.

25 El ingrediente D que constituye la composición emulsionada para dilución de la presente invención es una fase acuosa para formación de una emulsión. El ingrediente D de la presente invención puede seleccionarse de entre los ingredientes acuosos de uso común en productos farmacéuticos; como ejemplos, pueden mencionarse agua purificada, agua para inyección, solución tamponada con fosfato, solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato y análogas. El contenido de ingrediente D en la composición emulsionada para dilución de la presente invención es 5 a 20% en peso, preferiblemente 8 a 16% en peso.

35 En la composición emulsionada para dilución de la presente invención, además de los ingredientes arriba descritos, pueden añadirse también un antioxidante, un estabilizador y análogos, con tal que la estabilidad de la emulsión no se vea afectada.

Como ejemplos del antioxidante, se pueden mencionar tocoferoles tales como α -tocoferol y δ -tocoferol, ésteres de ácido gálico, dibutilhidroxitolueno y análogos.

Como el estabilizador, se pueden mencionar alcoholes tales como glicerina, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, polietilenglicol y análogos.

40 La composición emulsionada para dilución de la presente invención puede producirse por un método ordinario de producción de una composición emulsionada adoptada como apropiada. Usualmente, se selecciona un método en el cual el ingrediente A, el ingrediente B y el ingrediente C se mezclan previamente, se añade poco a poco el ingrediente D mientras se agita la mezcla, y finalmente la mezcla se agita y se emulsionada utilizando un aparato de emulsificación tal como un homogeneizador.

45 La composición emulsionada para dilución de la presente invención se obtiene preferiblemente en la forma de una emulsión W/O que tiene una viscosidad muy baja y un diámetro de partícula fino.

El diámetro medio de partícula de la fase de dispersión de la composición emulsionada para dilución de la presente invención es preferiblemente no mayor que 1000 nm, más preferiblemente no mayor que 500 nm, todavía más preferiblemente 50 a 500 nm, y de modo particularmente preferible 50 a 300 nm.

50 En la presente invención, el diámetro medio de partícula de la fase de dispersión de la composición emulsionada para dilución se expresa como el valor medio de los diámetros de partícula de todas las partículas (fase de dispersión) medido por el método de dispersión dinámica de la luz. Específicamente, los diámetros de partícula pueden medirse por aplicación de una muestra obtenida por dilución en caso apropiado de una composición emulsionada como el objeto de medida con el ingrediente A en, por ejemplo, ZETASIZER NANO-S fabricado por
55 MALVERN INSTRUMENTS Company y análogos.

Si el diámetro medio de partícula de la fase de dispersión excede de 1000 nm, no sólo la estabilidad para la composición emulsionada para dilución decrece, sino que es de temer también que la homogeneidad, estabilidad, y actividad de inducción de CTL de la composición de vacuna contra el cáncer obtenida finalmente por dilución de una fase acuosa que comprende un péptido de antígeno tumoral decrezcan, siendo ello por consiguiente indeseable.

5 Con tal que el diámetro medio de partícula de la fase de dispersión sea 50 a 300 nm, la composición emulsionada puede esterilizarse también por filtración en el estado de una emulsión W/O. El filtro utilizado para la esterilización por filtración puede seleccionarse de modo que sea apropiado para la filtración de líquidos aceitosos. Específicamente, pueden mencionarse un filtro de membrana hidrófilo que tenga un diámetro de poro de 0,2 µm (hecho de poli- tetrafluoretileno) y análogos.

10 La composición emulsionada para dilución de la presente invención se utiliza para obtener una vacuna contra el cáncer o inductor específico de CTL que estimula la inducción de CTL específica para cada antígeno cuando está combinado con un péptido de antígeno tumoral que tiene 8 a 12 aminoácidos o un dímero del mismo. Cuando se prepara de este modo una composición de vacuna contra el cáncer o inductor específico de CTL, puede diluirse 0,25 a 1 parte en volumen de una fase acuosa que comprende un péptido de antígeno tumoral que tiene 8 a 12 aminoácidos o un dímero de la misma, con 1 parte en volumen de una composición emulsionada para dilución. En este caso, el péptido de antígeno tumoral o un dímero del mismo puede disolverse o suspenderse en la fase acuosa.

15 La composición emulsionada para dilución de la presente invención es una emulsión W/O que tiene partículas de agua finamente dispersadas en ella, y es de viscosidad muy baja. Por tanto, cuando una fase acuosa que contiene péptido se diluye con esta composición emulsionada para dilución, puede obtenerse fácilmente una emulsión W/O estable. La composición emulsionada de la presente invención es una emulsión W/O estable per se. La composición de vacuna contra el cáncer o inductor específico de CTL obtenida por dilución de una fase acuosa que comprende un péptido de antígeno tumoral con la composición emulsionada de la presente invención como se describe arriba es también una emulsión W/O estable.

20 Por consiguiente, como los métodos de agitación para dilución de una fase acuosa que comprende un péptido de antígeno tumoral con la composición emulsionada para dilución de la presente invención, puede utilizarse un aparato de emulsificación ordinario tal como un homogeneizador u homomezclador, y un aparato de agitación simple que no es de uso común para emulsificación, por ejemplo, un mezclador *shikenkan* y análogos. La dilución arriba descrita puede realizarse también por el método de conexión de jeringuilla, que permite una operación simple en el laboratorio. Por tanto, la dilución puede prepararse también justo antes de su uso, es decir justo antes de la administración de conforme al uso propuesto.

25 Preferiblemente, por adición de una composición emulsionada para dilución y una fase acuosa que comprende un péptido de antígeno tumoral o un dímero del mismo en una ratio en volumen de 1:0,25 a 1:1, seguida de agitación de la mezcla utilizando un mezclador *shikenkan* durante aproximadamente 30 segundos a 3 minutos de acuerdo con la velocidad de agitación, puede obtenerse una composición de vacuna contra el cáncer estable y satisfactoria o inductor específico de CTL. En este caso, es preferible que mientras se agita la composición emulsionada para dilución utilizando el mezclador *shikenkan*, la fase acuosa que comprende el péptido de antígeno tumoral se añada gradualmente, y después que se ha añadido la cantidad total a añadir se agita ulteriormente la mezcla durante no menos de 30 segundos.

30 La composición de vacuna contra el cáncer o el inductor específico de CTL en la presente invención se obtiene por dilución y mezcla de una fase acuosa que comprende un péptido de antígeno tumoral que tiene 8 a 12 aminoácidos o un dímero del mismo con la composición emulsionada para dilución de la presente invención como se ha descrito arriba, y, como se ha descrito arriba, se encuentra en la forma de una emulsión W/O estable.

35 Los péptidos son generalmente sensibles al calor, y por tanto es difícil en muchos casos mantenerlos estables en agua durante largo tiempo. Como se ha descrito arriba, en la presente invención, dado que la dilución puede prepararse antes de su utilización por un método simple, incluso cuando se utiliza un péptido de estabilidad relativamente baja al calor y en agua, la degradación y agregación del péptido durante la operación de emulsionamiento y almacenamiento se reducen. Por tanto, dado que el deterioro indeseable de un péptido de antígeno tumoral que tiene 8 a 12 aminoácidos o un dímero del mismo se limita por utilización de la composición emulsionada para dilución de la presente invención, se hace posible preparar una composición de vacuna contra el cáncer o el inductor específico de CTL que retiene de manera estable diversos péptidos (con inclusión de dímeros de los mismos), con indiferencia de la clase y propiedades de éstos.

40 En la presente invención, el péptido de antígeno tumoral es un péptido de antígeno tumoral que tiene 8 a 12 aminoácidos o un dímero del mismo, presentado al antígeno MHC clase I, y que comprende un péptido reconocido como antígeno por el CTL.

45 En la presente invención, el péptido de antígeno tumoral que tiene 8 a 12 aminoácidos puede seleccionarse de entre péptidos conocidos comúnmente. Por ejemplo, pueden mencionarse péptidos parciales derivados de gp100 y MART-1, que son proteínas específicas del tejido de los melanocitos, y proteínas del melanosoma tales como tirosinasa. Como otros péptidos antigénicos del cáncer, se pueden mencionar péptidos parciales derivados de marcadores de cáncer tales como CEA, PSA y HER2/neu; péptidos parciales derivados de antígenos tumorales de

- testículos tales como MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, y NY-ESO-1; péptidos parciales derivados de la proteína de las células epiteliales del cáncer tales como MUC-1, SART-1, y SART-3, y análogos. Adicionalmente, se pueden mencionar también péptidos parciales derivados de TERT, cuya expresión se incrementa en el cáncer, péptidos parciales derivados de WT1, péptidos parciales derivados de Survivin-2B y análogos como péptidos antigénicos del cáncer adecuados.
- 5 Estos pueden ser sustancias naturales o modificaciones de las mismas en las que algunos aminoácidos se han modificado, con tal que los mismos no interfieran con la inducción específica de CTL terapéuticamente eficaz para cada antígeno tumoral en la composición de vacuna contra el cáncer obtenida finalmente o inductor específico de CTL.
- 10 Estos péptidos antigénicos del cáncer pueden estar contenidos en la composición de vacuna contra el cáncer o inductor específico de CTL no sólo aisladamente, sino también en combinación de dos o más clases.
- Estos péptidos antigénicos del cáncer pueden obtenerse por síntesis en fase sólida basada en el método Fmoc y análogos, y otros métodos conocidos comúnmente.
- 15 Como ejemplos específicos de la secuencia de aminoácidos de cada péptido de antígeno tumoral, se pueden mencionar los siguientes. Péptidos antigénicos del cáncer que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran a continuación son comúnmente conocidos.
- (1) para péptidos derivados de gp100, KTWGQYWQV (SEQ ID NO:1), AMLGHTHTMEV (SEQ ID NO:2), MLGHTHTMEV (SEQ ID NO:3), ITDQVPFSV (SEQ ID NO:4), YLEPGPVTA (SEQ ID NO:5), LLDGTATLRL (SEQ ID NO:6), VLYRYGSFSV (SEQ ID NO:7), SLADTNSLAV (SEQ ID NO:8), RLMKQDFSV (SEQ ID NO:9), RLPRIFCSC (SEQ ID NO:10), VYFFLPDHL (SEQ ID NO:11) y análogos;
- 20 (2) para péptidos derivados de MART-1, AAGIGILTV (SEQ ID NO:12), EAAGIGILTV (SEQ ID NO:13), ILTVILGVL (SEQ ID NO:14) y análogos;
- (3) para péptidos derivados de tirosinasa, MLLAVLYCL (SEQ ID NO:15), YMDGTMSQV (SEQ ID NO:16), AFLPWHRLF (SEQ ID NO:17), AFLPWHRLFL (SEQ ID NO:18) y análogos;
- 25 (4) para péptidos derivados de CEA, YLSGANLNL (SEQ ID NO:19), IMIGVLVGV (SEQ ID NO:20), LLTFWNPPT (SEQ ID NO:21), QYSWFVNGTF (SEQ ID NO:22), TYACFVSNL (SEQ ID NO:23) y análogos;
- (5) para péptidos derivados de PSA, FLTPKKLQCV (SEQ ID NO:24), VSHSFPHPLY (SEQ ID NO:25), VISNDVCAQV (SEQ ID NO:26), CYASGWGSI (SEQ ID NO:27) y análogos;
- 30 (6) para péptidos derivados de MUC-1, STAPPVHNV (SEQ ID NO:28) y análogos;
- (7) para péptidos derivados de HER2/neu, QIISAVVGIL (SEQ ID NO:29), QLFEDNYAL (SEQ ID NO:30), KIFGSLAFL (SEQ ID NO:31), CLTSVQLV (SEQ ID NO:32), VMAGVGSPYV (SEQ ID NO:33), RLLQETELV (SEQ ID NO:34), PYVSRLLGI (SEQ ID NO:35), TYLPTNASL (SEQ ID NO:36) y análogos;
- (8) para péptidos derivados de MAGE-1, NYKHCPEI (SEQ ID NO:37) y análogos;
- 35 (9) para péptidos derivados de MAGE-3, FLWGPRALV (SEQ ID NO:38), KVAELVHFL (SEQ ID NO:39), IMPKAGLLI (SEQ ID NO:40), TFPDLESEF (SEQ ID NO:41) y análogos;
- (10) para péptidos derivados de NY-ESO-1, SLLMWITQC (SEQ ID NO:42), SLLMWITQCFL (SEQ ID NO:43), QLSLLMWIT (SEQ ID NO:44) y análogos;
- (11) para péptidos derivados de SART-1, EYRGFTQDF (SEQ ID NO:45) y análogos;
- 40 (12) para derivados de SART-3, VYDYNCHVDL (SEQ ID NO:46) y análogos;
- (13) para péptidos derivados de TERT, ILAKFLHWL (SEQ ID NO:47), VYAETKHFL (SEQ ID NO:48), VYGFVRACL (SEQ ID NO:49) y análogos;
- (14) para péptidos derivados de WT1, RMFPNAPYL (SEQ ID NO:50), CMTWNQMNL (SEQ ID NO:51), RWPSCQKKF (SEQ ID NO:52) y análogos;
- 45 (15) para péptidos derivados de Survivin-2B, AYACNTSTL (SEQ ID NO:53) y análogos;

En esta descripción, el extremo de la izquierda de cada uno de los péptidos arriba descritos indica el término N del mismo, y los símbolos de aminoácidos individuales indican los restos de aminoácidos siguientes, respectivamente.

- A: Resto alanina
- G: Resto Glycine
- M: Resto metionina
- S: Resto serina
- 5 C: Resto cisteína
- H: Resto histidina
- N: Resto asparagina
- T: Resto treonina
- D: Resto ácido aspártico
- 10 I: Resto isoleucina
- P: Resto prolina
- V: Resto valina
- E: Resto ácido glutámico
- K: Resto lisina
- 15 Q: Resto glutamina
- W: Resto triptófano
- F: Resto fenilalanina
- L: Resto leucina
- R: Resto arginina
- 20 Y: Resto tirosina

Estos péptidos antigénicos del cáncer son péptidos parciales de proteínas antigénicas del cáncer, y algunos de ellos tienen cisteína en el término N de la secuencia de aminoácidos de los mismos. Un péptido de antígeno tumoral de este tipo formará probablemente dímeros en agua, y parte o casi la totalidad de su contenido se habrá dimerizado a menudo en el momento de la administración. En la presente invención, incluso si un péptido que tiene 8 a 12 aminoácidos se dimeriza como se ha descrito arriba, el mismo exhibe actividad de inducción de CTL similar; por tanto, un péptido de antígeno tumoral puede seleccionarse de entre los péptidos antigénicos del cáncer que tienen 8 a 12 aminoácidos o un dímero de los mismos de acuerdo con el uso propuesto. Para inducir eficientemente CTL in vivo, el péptido de antígeno tumoral de la presente invención es preferiblemente una secuencia de epítipo restringida por HLA-A2402 (al que se hace referencia también simplemente como HLA-A24) o HLA-A0201 (al que se hace referencia también simplemente como HLA-2) de entre los péptidos antigénicos del cáncer que tienen 8 a 12 aminoácidos. Por utilización de un péptido de antígeno tumoral de este tipo, se puede preparar una composición de vacuna contra el cáncer eficaz que induce y activa finalmente las células T citotóxicas in vivo.

La concentración del péptido de antígeno tumoral (con inclusión de un dímero del mismo; esto se aplica igualmente más adelante) en la fase acuosa cuando se mezcla con la composición emulsionada para dilución de la presente invención puede seleccionarse de acuerdo con la clase de péptido utilizada a fin de que el contenido en la composición de vacuna contra el cáncer finalmente obtenida caiga dentro del intervalo apropiado para activación de la inducción de CTL. La composición de vacuna contra el cáncer o inductor específico de CTL de la presente invención (a la que se hace referencia también simplemente en lo sucesivo como composición de vacuna contra el cáncer) puede mantenerse estable con indiferencia de la clase y propiedades del péptido por utilización de una composición emulsionada para dilución, y la concentración del péptido contenido puede ajustarse dentro de un amplio intervalo. Específicamente, aunque ello varía dependiendo de la ruta de administración y los métodos de administración, usualmente, la concentración de péptido en la composición de vacuna contra el cáncer obtenida finalmente es 0,01 a 100 mg/mL.

Con relación a la ruta de administración de la composición de vacuna contra el cáncer de la presente invención, puede seleccionarse un método de administración de uso común, con tal que sea posible la activación de la inducción específica de CTL para el péptido de antígeno tumoral utilizado. Como ejemplos de la ruta de administración, pueden mencionarse las rutas subcutánea, intradérmica, intramuscular y análogas.

La dosis del péptido de antígeno tumoral puede ajustarse según sea apropiado conforme a la enfermedad a tratar, los síntomas del paciente, la edad, el peso corporal, el sexo y análogos, y es 0,001 a 100 mg, más preferiblemente 0,01 a 10 mg; esta dosis se administra preferentemente una sola vez durante varios días a varios meses.

5 La composición de vacuna contra el cáncer de la presente invención es una emulsión W/O. La composición de vacuna contra el cáncer de la presente invención es una emulsión W/O que comprende ingrediente A en 30 a 80% en peso, ingrediente B en 0,5 a 20% en peso, ingrediente C en 0 a 20% en peso, e ingrediente E en 10 a 60% en peso, comprendiendo preferiblemente ingrediente A en 40 a 60% en peso, ingrediente B en 1,0 a 5,0% en peso, ingrediente C en 5,0 a 10,0% en peso, e ingrediente E en 30 a 50% en peso. Considerando la conservación y administración utilizando una jeringuilla para inyección, la composición de vacuna contra el cáncer de la presente
10 invención es preferiblemente líquida a 5°C, y tiene preferiblemente una viscosidad a 25° no mayor que 300 mPa.s, más preferiblemente no mayor que 200 mPa.s.

En la fase acuosa que es el ingrediente E de la presente invención, pueden estar contenidos un estabilizador, un disolvente, un agente solubilizante, un agente de suspensión, un diluyente, un agente tampón, un agente de tonicidad, un agente acidificante, un agente alcalinizante y análogos de acuerdo con las propiedades del péptido de antígeno tumoral, con tal que los mismos no influyan en la estabilidad de la composición de vacuna contra el cáncer obtenida finalmente. Por tanto, cuando se diluye una fase acuosa que comprende un péptido antigénico con una composición emulsionada para dilución, cada uno de los excipientes arriba descritos puede seleccionarse como apropiado de acuerdo con las propiedades del péptido antigénico.
15

La composición de vacuna contra el cáncer de la presente invención estimula la inducción específica de CTL para el péptido de antígeno tumoral contenido, y ataca las células del cáncer.
20

La actividad de inducción de CTL puede confirmarse por recuento del número de CTLs por el método del tetrámero de HLA (Int. J. Cancer: 100, 565-570 (2002)) o por el método de dilución limitada (Nat. Med.: 4, 321-327 (1998)). Alternativamente, por ejemplo, la actividad de inducción de CTL restringida por HLA-A24 puede confirmarse por utilización del modelo de ratón HLA-A24 descrito en el panfleto para la Publicación de Patente Internacional No. 02/47474 e Int. J. Cancer: 100, 565-570 (2002), y análogos.
25

La composición de vacuna contra el cáncer de la presente invención tiene la capacidad de inducir específicamente CTL conforme al péptido de antígeno tumoral contenido; el CTL inducido exhibe acción citotóxica y acción anti cáncer por la vía de la producción de linfocinas. Por tanto, la composición de vacuna contra el cáncer de la presente invención puede utilizarse como preparación inmunoterapéutica del cáncer para el tratamiento o la prevención del cáncer.
30

Ejemplos

La presente invención se describe en lo sucesivo con mayor detalle por medio de los Ejemplos que siguen, que, sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

< Preparación de una composición emulsionada para dilución >

35 [Ejemplo 1]

Oleato de etilo (un suministro conforme a los Excipientes Farmacéuticos Japoneses) como Ingrediente A, aceite de ricino endurecido con polioxietileno (10) (un suministro conforme a los Excipientes Farmacéuticos Japoneses; 10 moles de aducto con óxido de etileno) como ingrediente B, y sesquioleato de sorbitán (un suministro conforme a la Farmacopea Japonesa) como ingrediente C se mezclaron en las cantidades que se indican en la Tabla 1, respectivamente. A continuación, mientras se agitaba esta mezcla, se añadió gradualmente agua para inyección (un suministro conforme a la Farmacopea Japonesa) como ingrediente D en las cantidades que se indican en la Tabla 1. La emulsificación se llevó a cabo por agitación utilizando CLEARMIX 1.5S (fabricado por M-TECHNIQUE Co., Ltd.) a 10.000 rpm durante 5 minutos a la temperatura ambiente. De este modo se obtuvo una composición emulsionada para dilución 1. Cuando esta composición emulsionada se dejó en reposo a la temperatura ambiente durante 24
40 horas después de su preparación, no se observó cambio alguno de aspecto.
45

[Ejemplos 2 a 35]

Del mismo modo que el Ejemplo 1, se mezclaron previamente los ingredientes distintos del ingrediente D. Mientras se agitaba esta mezcla, se añadió gradualmente el ingrediente D y se llevó a cabo la emulsificación. En todos los casos, la emulsificación se realizó por agitación utilizando CLEARMIX 1.5S (fabricado por M-TECHNIQUE Co., Ltd.) a 10.000 rpm durante 5 minutos a la temperatura ambiente. Como ingrediente D, se utilizaron respectivamente agua para inyección, solución tamponada con fosfato 10 mM (pH 7,4), y solución salina tamponada con fosfato 10 mM (pH 7,4), conforme a las Tablas 1 a 7. Cada uno de los ingredientes indicados en las Tablas 1 a 7 eran suministros conforme a la Farmacopea Japonesa, los Excipientes Farmacéuticos Japoneses, o los Estándares Japoneses de Ingredientes Cosméticos. De este modo, se obtuvieron las composiciones emulsionadas 2 a 35. Cuando las
50 composiciones emulsionadas para dilución 2 a 35 así obtenidas se dejaron en reposo a la temperatura ambiente
55

durante 24 horas después de su preparación, y se examinaron respecto a cambio de aspecto, no se observó cambio alguno tal como separación en ninguna de las composiciones emulsionadas.

[Experimentos Comparativos 1 a 25]

5 De igual manera que el Ejemplo 1, oleato de etilo (un suministro conforme a los Excipientes Farmacéuticos Japoneses), los diversos aceites de ricino endurecidos con polioxietileno representados en las Tablas 8 a 12 (suministros conforme a los Excipientes Farmacéuticos Japoneses), y sesquioleato de sorbitán (un suministro conforme a la Farmacopea Japonesa) se mezclaron para obtener las cantidades indicadas en las Tablas 8 a 12, respectivamente. Aceite de ricino endurecido con polioxietileno (40), aceite de ricino endurecido con polioxietileno (60) y análogos se mezclaron en estado fundido por calentamiento a 50°C. Dado que el polioxietileno (160) - polioxipropileno (30)-glicol utilizado para preparar una composición emulsionada 46 (Ejemplo Comparativo 11) no es fácil de mezclar, el mismo se disolvió previamente en una fase acuosa y se mezcló en el momento de la emulsificación. A continuación, mientras se agitaba esto, se añadieron gradualmente agua para inyección, solución tamponada con fosfato 10 mM (pH 7,4), y solución salina tamponada con fosfato 10 mM (pH 7,4) conforme a las Tablas 8 a 12, respectivamente. La emulsificación se llevó a cabo por agitación utilizando CLEARMIX 1.5S (fabricado por M-TECHNIQUE Co., Ltd.) a 10.000 rpm durante 5 minutos a la temperatura ambiente. De este modo se obtuvieron las composiciones emulsionadas para dilución 36 a 60. Cada ingrediente representado en las Tablas se suministró conforme a la Farmacopea Japonesa, los Excipientes Farmacéuticos Japoneses, o los Estándares Japoneses de Ingredientes Cosméticos. Para los ingredientes no listados en ninguno de estos compendios, se utilizaron suministros de grado farmacéutico. Cuando cada composición emulsionada obtenida se dejó en reposo durante 24 horas después de su preparación, no se observó cambio alguno tal como separación en las composiciones emulsionadas 36 a 39, 56 y 57, pero se observó separación de la fase de aceite y la fase acuosa (con inclusión de formación de nata) en las composiciones emulsionadas 40 a 55 y 58 a 60.

Tabla 1

	Ejemplo				
	1*	2*	3*	4*	5*
Composición emulsionada número	1	2	3	4	5
Oleato de etilo	70,0	70,0	-	70,0	70,0
2-Etilhexanoato de cetilo	-	-	70,0	-	-
Polioxietileno (10) -aceite de ricino endurecido	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Sesquioleato de sorbitán	12,0	-	-	12,0	-
Monooleato de sorbitán	-	12,0	12,0	-	12,0
Agua para inyección	15,0	15,0	15,0	-	-
Solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4)	-	-	-	15,0	15,0
Cambio de estado después de dejar en reposo a la temperatura ambiente durante 24 horas	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno

*Ejemplos de referencia

25

Tabla 2

	Composición emulsionada número	Ejemplo				
		6	7*	8*	9*	10*
		6	7	8	9	10
Oleato de etilo		70,0	70,0	70,0	70,0	70,0
Polioxietileno (5) -aceite de ricino endurecido		-	3,0	-	-	-
Polioxietileno (10) -aceite de ricino endurecido		3,0	-	3,0	-	-
Polioxietileno (10) -aceite de ricino		-	-	-	3,0	-
Polioxietileno (20) -aceite de ricino endurecido		-	-	-	-	3,0
Sesquioleato de sorbitán		-	6,0	6,0	6,0	6,0
Monooleato de glicerina		12,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4)		15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Cambio de estado después de dejar en reposo a la temperatura ambiente durante 24 horas		Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno

*Ejemplos de referencia

Tabla 3

	Composición emulsionada número	Ejemplo				
		11	12*	13*	14	15
		11	12	13	14	15
Oleato de etilo		70,0	-	-	-	-
2-Etilhexanoato de cetilo		-	70,0	-	-	-
Miristato de octildodecilo		-	-	70,0	-	-
Palmitato de 2-etilhexilo		-	-	-	70,0	-
Oleato de oleílo		-	-	-	-	70,0
Polioxietileno (10) -aceite de ricino endurecido		2,0	3,0	3,0	-	-
Polioxietileno (20) -aceite de ricino endurecido		1,0	-	-	3,0	3,0
Sesquioleato de sorbitán		12,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Monooleato de glicerina		-	6,0	6,0	6,0	6,0
Agua para inyección		15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Cambio de estado después de dejar en reposo a la temperatura ambiente durante 24 horas		Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno

*Ejemplos de referencia

Tabla 4

	Composición emulsionada número	Ejemplo				
		16*	17	18	19*	20*
		16	17	18	19	20
2-Etilhexanoato de cetilo		70,0	70,0	-	-	-
Oleato de etilo		-	-	70,0	70,0	
Miristato de octildodecilo		-	-	-	-	70,0
Polioxietileno (10) -aceite de ricino endurecido		3,0	-	2,0	5,0	3,0
Polioxietileno (20) -aceite de ricino endurecido		-	3,0	1,0	-	-
Sesquioleato de sorbitán		6,0	12,0	6,0	6,0	11,0
Monooleato de glicerina		5,0	-	5,0	5,0	-
Glicerina		1,0	-	1,0	1,0	1,0
Solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4)		15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Cambio de estado después de dejar en reposo a la temperatura ambiente durante 24 horas		Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno

*Ejemplos de referencia

Tabla 5

	Composición emulsionada número	Ejemplo				
		21*	22*	23*	24*	25*
		21	22	23	24	25
Oleato de etilo		70,0	-	-	70,0	70,0
2-Etilhexanoato de cetilo		-	70,0	-	-	-*
Miristato de octildodecilo		-	-	70,0	-	-
Polioxietileno (10) -aceite de ricino endurecido		15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Agua para inyección		15,0	15,0	15,0	-	-
Agua tamponada con fosfato (pH 7,4)		-	-	-	15,0	15,0
Cambio de estado después de dejar en reposo a la temperatura ambiente durante 24 horas		Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno

*Ejemplos de referencia

Tabla 6

	Composición emulsionada número	Ejemplo				
		26*	27*	28*	29*	30
		26	27	28	29	30
2-Etilhexanoato de cetilo		75,0	75,0	-	-	-
Oleato de etilo		-	-	75,0	75,0	75,0
Polioxietileno (5) -aceite de ricino endurecido		-	-	3,5	-	-
Polioxietileno (10) -aceite de ricino endurecido		14,0	3,0	-	3,0	-
Polioxietileno (20) -aceite de ricino endurecido		-	-	-	-	2,5
Sesquioleato de sorbitán		-	6,0	6,5	12,0	11,5
Monooleato de glicerina		-	6,0	5,0	-	-
Glicerina		1,0	-	-	-	1,0
Agua tamponada con fosfato (pH 7,4)		10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Cambio de estado después de dejar en reposo a la temperatura ambiente durante 24 horas		Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno

*Ejemplos de referencia

Tabla 7

	Composición emulsionada número	Ejemplo				
		31*	32*	33*	34*	35*
		31	32	33	34	35
Oleato de etilo		72,0	78,0	80,0	74,0	-
Aceite de jojoba		-	-	-	-	70,0
Polioxietileno (10) -aceite de ricino endurecido		3,0	3,5	3,0	3,0	3,0
Sesquioleato de sorbitán		15,0	7,5	5,0	15,0	12,0
Glicerina		1,0	1,0	-	1,0	-
Agua tamponada con fosfato (pH 7,4)		10,0	10,0	12,0	7,0	15,0
Cambio de estado después de dejar en reposo a la temperatura ambiente durante 24 horas		Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno

*Ejemplos de referencia

Tabla 8

	Composición emulsionada número	Ejemplo Comparativo				
		1	2	3	4	5
		36	37	38	39	40
Oleato de etilo		70,0	70,0	-	70,0	70,0
2-Etilhexanoato de cetilo		-	-	70,0	-	-
Polioxietileno (30) -aceite de ricino endurecido		-	3,0	-	-	-
Polioxietileno (40) -aceite de ricino endurecido		3,0	-	3,0	-	-
Polioxietileno (60) -aceite de ricino endurecido		-	-	-	3,0	-
Sesquioleato de sorbitán		12,0	6,0	6,0	6,0	7,5
Monooleato de glicerina		-	6,0	6,0	6,0	7,5
Agua para inyección		15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Cambio de estado después de dejar en reposo a la temperatura ambiente durante 24 horas		Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Separado

Tabla 9

	Composición emulsionada número	Ejemplo Comparativo				
		6	7	8	9	10
		41	42	43	44	45
2-Etilhexanoato de cetilo		70,0	-	-	-	-
Sebacato de dietilo		-	70,0	-	-	-
Aceite de soja purificado		-	-	70,0	-	-
Escualano		-	-	-	70,0	-
Aceite de parafina ligero		-	-	-	-	70,0
Polioxietileno (10) -aceite de ricino endurecido		-	3,0	3,0	3,0	3,0
Sesquioleato de sorbitán		7,5	6,0	6,0	6,0	6,0
Monooleato de glicerina		7,5	6,0	6,0	6,0	6,0
Agua para inyección		15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Cambio de estado después de dejar en reposo a la temperatura ambiente durante 24 horas		Separado	Separado	Separado	Separado	Ligeramente separado

Tabla 10

		Ejemplo Comparativo				
		11	12	13	14	15
	Composición emulsionada número	46	47	48	49	50
Oleato de etilo		70,0	70,0	70,0	70,0	70,0
Polioxietilen(160) polioxipropilen(30) glicol		3,0	-	-	-	-
Polioxietilen(20) polioxipropilen(20) glicol		-	3,0	-	-	-
Polioxietilen (6) monooleato de sorbitán		-	-	3,0	-	-
Polioxietilen (6) tetraoleato de sorbitol		-	-	-	3,0	-
Polioxietilen (30) tetraoleato de sorbitol		-	-	-	-	3,0
Sesquioleato de sorbitán		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Monooleato de glicerina		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Agua tamponada con fosfato (pH 7,4)		15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Cambio de estado después de dejar en reposo a la temperatura ambiente durante 24 horas		Separado	Separado	Separado	Separado	Separado

Tabla 11

		Ejemplo Comparativo				
		16	17	18	19	20
	Composición emulsionada número	51	52	53	54	55
Oleato de etilo		70,0	70,0	70,0	-	70,0
2-Etilhexanoato de cetilo		-	-	-	70,0	-
Polioxietileno (60) -aceite de ricino endurecido		-	-	15,0	15,0	-
Polysorbate 80		3,0	-	-	-	15,0
Aceite de ricino		-	3,0	-	-	-
Sesquioleato de sorbitán		6,0	6,0	-	-	-
Monooleato de glicerina		6,0	6,0	-	-	-
Agua para inyección		15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Cambio de estado después de dejar en reposo a la temperatura ambiente durante 24 horas		Separado	Separado	Separado	Separado	Separado

Tabla 12

	Composición emulsionada número	Ejemplo Comparativo				
		21	22	23	24	25
		56	57	58	59	60
2-Etilhexanoato de cetilo		75,0	-	-	-	-
Oleato de etilo		-	75,0	-	-	-
Escualano		-	-	75,0	-	-
Aceite de soja purificado		-	-	-	75,0	-
Tri(caprilato/caprato) de glicerina		-	-	-	-	75,0
Polioxietileno (10) -aceite de ricino endurecido		-	-	3,0	3,0	3,0
Polioxietileno (40) -aceite de ricino endurecido		3,0	-	-	-	-
Polioxietileno (60) -aceite de ricino endurecido		-	3,0	-	-	-
Sesquioleato de sorbitán		11,0	-	4,0	11,0	11,0
Monoleato de glicerina		-	11,0	4,0	-	-
Glicerina		1,0	1,0	-	1,0	1,0
Agua tamponada con fosfato (pH 7,4)		10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Cambio de estado después de dejar en reposo a la temperatura ambiente durante 24 horas		Ninguno	Ninguno	Separado	Separado	Separado

[Ejemplo de Ensayo 1]

< Preparación de composiciones de vacuna contra el cáncer >

- 5 De las composiciones emulsionadas para dilución obtenidas en los Ejemplos, aquellas que no exhibían separación aparente alguna cuando se dejaron en reposo durante 24 horas después de su preparación se utilizaron para preparar composiciones de vacuna contra el cáncer que comprenden diversos péptidos antigénicos del cáncer. Los péptidos antigénicos del cáncer utilizados para la preparación se muestran en la Tabla 13. Todos estos péptidos están restringidos por HLA-A24.

10

Tabla 13

Nombre del péptido antigénico	Proteína originaria	Posiciones de los aminoácidos	Secuencia de aminoácidos
TERT	Telomerasa	324-332	VYAETKHFL (SEQ ID NO:48)
MAGE-1	Antígeno de melanoma	135-143	NYKHCPEI (SEQ ID NO:37)
CEA	Antígeno carcino-embriionario	652-660	TYACFVSNL (SEQ ID NO:23)
PSA	Antígeno específico de próstata	152-160	CYASGWGSI (SEQ ID NO:27)

Para TERT, MAGE-1 y CEA, de entre los péptidos antigénicos del cáncer representados en la Tabla 13, se disolvió 1,2 mg de péptido sintético en 10,8 µL de DMSO, después de lo cual la solución se diluyó con 349,2 µL de agua para inyección, y se confirmó visualmente la ausencia de precipitado (concentración de DMSO 3%). Para PSA, se diluyeron 1,2 mg de péptido sintético con agua para inyección a fin de completar 360 µL, y se confirmó visualmente la ausencia de precipitado. Por separado, la composición emulsionada obtenida en cada ejemplo se mezcló concienzudamente utilizando un mezclador *shikenkan* (Touch Mixer MT-51, fabricado por Tamato Scientific Co., Ltd.) (agitado a fondo y homogeneizado antes de su utilización).

A continuación, se recogieron 700 µL de la composición emulsionada en un vial criogénico del tipo de tapón interno de 5 mL de capacidad (fabricado por Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) utilizando una pipeta Eppendorf de 1000 µL. A continuación, mientras se agitaba el tubo utilizando un mezclador *shikenkan*, se añadieron gota a gota 300 µL de la fase acuosa que contenía el péptido arriba descrita, y se mezclaron. La velocidad de agitación del mezclador *shikenkan* se ajustó al nivel máximo. Después de la adición gota a gota de la fase acuosa que contenía el péptido, la mezcla se agitó ulteriormente utilizando el mezclador *shikenkan* durante 2 minutos para producir una composición de vacuna contra el cáncer.

En los experimentos que siguen, se evaluó realmente la actividad de inducción de CTL utilizando las composiciones de vacuna contra el cáncer preparadas; a no ser que se indique otra cosa, las composiciones de vacuna contra el cáncer utilizadas para evaluación se prepararon conforme al método arriba descrito.

[Ejemplo de Ensayo 2]

< Inducción de CTL con la composición de vacuna contra el cáncer que comprendía el péptido TERT >

El potencial de inducción específica de CTL de la composición de vacuna contra el cáncer que comprendía el péptido TERT, preparada en el Ejemplo de Ensayo 1, se evaluó utilizando ratones transgénicos HLA-A24 (Int. J. Cancer: 100, 565, 2002).

Para preparar las composiciones de vacuna contra el cáncer, se utilizaron las composiciones emulsionadas 7, 8, 37, 38, 39, y 45. Las composiciones de vacuna contra el cáncer preparadas recibieron los mismos números que las composiciones emulsionadas. En la evaluación, por separado del Ejemplo de Ensayo 1, se establecieron grupos que recibieron una emulsión que comprendía el péptido TERT, preparada utilizando adyuvante incompleto de Freund (IFA, adquirido de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), o la fase acuosa del péptido sola, como el líquido de dosificación, y se compararon con grupos que recibieron cada composición de vacuna contra el cáncer como el líquido de dosificación (emparejados para asegurarse de que todos los grupos de dosificación recibían la misma dosis de péptido). Se administraron subcutáneamente 200 µL de cada líquido de dosificación (dosis de cada péptido 200 µg) a la raíz de la cola de cada ratón transgénico HLA-A24/K^b. Se utilizaron 3 ratones para cada grupo. Siete a ocho días después de la administración, se extirpó el bazo y se prepararon esplenocitos. Algunos de los esplenocitos se pulsaron con 100 µg/mL de péptido durante 1 hora. "Pulsación" se refiere a la adición de un péptido a los esplenocitos para fijar el péptido antigénico a HLA en la superficie de la célula. Los esplenocitos no pulsados con el péptido se sembraron en una placa de 24 pocillos a 7×10^6 células/pocillo, y los esplenocitos anteriores pulsados con el péptido se añadieron ulteriormente a razón de 7×10^5 células/pocillo y se cultivaron. El caldo de cultivo comprendía un medio RPMI 1640 enriquecido con 10% FCS, HEPES 10 mM, L-glutamina 20 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales MEM 1 mM, Vitamina MEM 1%, y 2-mercaptoetanol 55 µM, y las células se cultivaron durante 5 a 6 días. La actividad de CTL específica para el péptido administrado en los esplenocitos cultivados se midió por el ensayo de liberación de ⁵¹Cr (J. Immunol.: 159, 4753, 1997). Las células diana utilizadas eran células del linaje de células EL4-2402/K^b preparadas por transferencia de un gen a células EL-4 del linaje de células derivadas del linfoma de ratón (número de linaje ATCC TIB-39) de tal modo que la molécula HLA-A24 y la molécula química H-2K^b del MHC clase I (Int. J. Cancer: 100, 565, 2002) pudieran expresarse de manera estable. Las células diana se marcaron con ⁵¹Cr a 3,7 Mbq/10⁶ células, después de lo cual se añadió el péptido arriba mencionado para obtener una concentración de 100 µg/mL, y las células se pulsaron ulteriormente durante 1 hora. Las células diana, pero no pulsadas con el péptido (no-pulsadas), se marcaron con ⁵¹Cr durante 2 horas y se utilizaron como células diana de control. Estas células diana marcadas y los esplenocitos preparados previamente se mezclaron en una ratio de 1:80 y se cultivaron durante 4 horas, calculándose luego la actividad de CTL a partir de la ratio de células diana lesionadas. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Como se muestra en la Figura 1, en los grupos que recibieron la composición de vacuna contra el cáncer de la presente invención, las células diana pulsadas con el péptido estaban gravemente lesionadas, pero las células diana de control no pulsadas con el péptido estaban menos lesionadas; por tanto, se demostró que se había inducido CTL específica del péptido. Por el contrario, en los grupos que recibieron las vacunas del cáncer 37, 38, 39, y 45, el grupo que recibió la emulsión peptídica preparada con IFA, y el grupo que recibió el péptido solo, la citotoxicidad era baja, y la actividad de inducción de CTL era baja. Conforme a este hallazgo, es evidente que la composición emulsionada para dilución de la presente invención activa in vivo la inducción de CTL cuando está combinada con péptidos antigénicos del cáncer. Se demuestra también que la elección del ingrediente A de la presente invención y el número de moles de aducto óxido de etileno al ingrediente B influyen en la actividad de inducción de CTL.

[Ejemplo de Ensayo 3]

< Inducción de CTL con la composición de vacuna contra el cáncer que comprendía el péptido MAGE-1 >

El potencial de inducción de CTL específica de la composición de vacuna contra el cáncer que comprendía el péptido MAGE-1, preparada en el Ejemplo de Ensayo 1, se evaluó de la misma manera que el Ejemplo de Ensayo 2.

5 Para preparar composiciones de vacuna contra el cáncer, se utilizaron las composiciones emulsionadas 8, 37, 38, y 45. Las composiciones de vacuna contra el cáncer preparadas recibieron los mismos números que las composiciones emulsionadas. En la evaluación, por separado del Ejemplo de Ensayo 1, se establecieron grupos que recibieron una emulsión que comprendía el péptido MAGE-1, preparado utilizando adyuvante incompleto de Freund (IFA, adquirido de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), o la fase acuosa de péptido sola, como el líquido de dosificación, y se compararon con grupos que recibieron cada composición de vacuna contra el cáncer como el líquido de dosificación. Los resultados se muestran en la Figura 2.

10 Como se muestra en la Figura 2, en el grupo que recibió la composición de vacuna contra el cáncer de la presente invención, las células diana pulsadas con el péptido estaban severamente lesionadas, pero las células diana de control no pulsadas con el péptido estaban menos lesionadas; por tanto, se demostró que se había inducido CTL específica del péptido. Por el contrario, en los grupos que recibieron las vacunas del cáncer 37, 38, y 45, el grupo que recibió las emulsiones peptídicas preparadas con IFA, y el grupo que recibió el péptido solo, la citotoxicidad era baja, y la actividad de inducción de CTL era baja. Estos resultados son similares a los del Ejemplo de Ensayo 2, demostrando la utilidad de la composición emulsionada para dilución de la presente invención.

[Ejemplo de Ensayo 4]

20 < Inducción de CTL con la composición de vacuna contra el cáncer que comprendía el péptido PSA (1) >

El potencial de inducción específica de CTL de la composición de vacuna contra el cáncer que comprendía el péptido PSA, preparada en el Ejemplo de Ensayo 1, se evaluó de igual manera que el Ejemplo de Ensayo 2.

25 Para preparar composiciones de vacuna contra el cáncer, se utilizaron las composiciones emulsionadas 2, 7, 10, 29, y 38. Las composiciones de vacuna contra el cáncer preparadas recibieron los mismos números que las composiciones emulsionadas. Asimismo, utilizando la composición emulsionada 7, se mezclaron 700 µL de la composición emulsionada y 300 µL de agua para inyección conforme al Ejemplo de Ensayo 1, para preparar una posición exenta de péptido, y se realizó una comparación. Los resultados se muestran en la Figura 3.

30 Como se muestra en la Figura 3, en los grupos que recibieron la composición de vacuna contra el cáncer de la presente invención (2, 7, 10, 29), las células diana pulsadas con el péptido estaban severamente lesionadas, perlas de las diana de control no pulsadas con el péptido estaban menos lesionadas; por tanto, se demostró que se había inducido CTL específica del péptido. Por otra parte, en el grupo que recibió la vacuna contra el cáncer 38, la citotoxicidad era baja, y la actividad de inducción de CTL era baja. En el grupo que recibió la composición exenta de péptido, no se observó absolutamente citotoxicidad alguna, demostrando que la composición emulsionada sola no tiene la actividad de inducción de CTL. Estos resultados son similares a los del Ejemplo de Ensayo 2, demostrando la utilidad de la composición emulsionada para dilución de la presente invención.

[Ejemplo de Ensayo 5]

< Inducción de CTL con la composición de vacuna contra el cáncer que comprendía el péptido PSA (2) >

El potencial de inducción específica de CTL de la composición de vacuna contra el cáncer que comprendía el péptido PSA, preparada en el Ejemplo de Ensayo 1, se evaluó de igual manera que el Ejemplo de Ensayo 4.

40 Para preparar composiciones de vacuna contra el cáncer, se utilizaron las composiciones emulsionadas 16, 17, y 20. Las composiciones de vacuna contra el cáncer preparadas recibieron los mismos números que las composiciones emulsionadas. En la evaluación, por separado del Ejemplo de Ensayo 1, se estableció un grupo que recibió una emulsión que comprendía el péptido PSA, preparada utilizando adyuvante incompleto de Freund (IFA, adquirido de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) como el líquido de dosificación, y se comparó con grupos que recibieron cada composición de vacuna contra el cáncer como el líquido de dosificación. Los resultados se muestran en la Figura 4.

50 Como se muestra en la Figura 4, en el grupo que recibió la composición de vacuna contra el cáncer de la presente invención, las células diana pulsadas con el péptido estaban severamente lesionadas, pero las células diana de control no pulsadas con el péptido estaban menos lesionadas; por tanto, se demostró que se había inducido CTL específica del péptido. Cuando se utilizó el péptido PSA, incluso en el grupo que recibió la emulsión peptídica preparada con IFA, se inducía CTL específica del péptido. A partir de este resultado y de los resultados de los Ejemplos de Ensayo 2 y 3, se demostró que IFA, que es conocido convencionalmente, activaba la inducción de CTL en algunos péptidos antigénicos del cáncer, pero que esta activación se veía influida significativamente por la clase de péptido, y que IFA es insuficiente en versatilidad.

[Ejemplo de Ensayo 6]

El potencial de inducción de CTL específica de la composición de vacuna contra el cáncer que comprendía el péptido CEA>

5 El potencial de inducción específica de CTL de la composición de vacuna contra el cáncer que contenía CEA preparada en el Ejemplo de Ensayo 1, se evaluó de igual manera que el Ejemplo de Ensayo 2.

10 Para preparar composiciones de vacuna contra el cáncer, se utilizaron las composiciones emulsionadas 12, 13, 28, 29, 30, 37 y 38. Las composiciones de vacuna contra el cáncer preparadas recibieron los mismos números que las composiciones emulsionadas. Los resultados se muestran en la Figura 5. Como se muestra en la Figura 5, en los grupos que recibieron una composición de vacuna contra el cáncer preparada utilizando la composición emulsionada de la presente invención (12, 13, 28, 29), las células diana pulsadas con el péptido estaban severamente lesionadas, pero las células diana de control no pulsadas con el péptido estaban menos lesionadas; por tanto, se demostró que se había inducido CTL específica del péptido. Por otra parte, en los grupos que recibieron las vacunas del cáncer 37 y 38, la citotoxicidad era baja, y la actividad de inducción de CTL era también baja. Estos resultados son similares a los del Ejemplo de Ensayo 2, demostrando la utilidad de la composición emulsionada para dilución de la presente invención.

[Ejemplo de Ensayo 7]

< Inducción de CTL con composiciones de vacuna contra el cáncer que comprendían diversos péptidos antigénicos del cáncer >

20 Utilizando la composición emulsionada 21, se evaluaron los potenciales de inducción específica de CTL de las composiciones de vacuna contra el cáncer que comprendían cada uno de los péptidos TERT, MAGE-1, y CEA, preparadas conforme al Ejemplo de Ensayo 1, de la misma manera que el Ejemplo de Ensayo 2. Los resultados se muestran en la Figura 6. Conforme a la Figura 6, en el grupo que recibió una composición de vacuna contra el cáncer preparada utilizando la composición emulsionada de la presente invención, las células diana pulsadas con el péptido estaban severamente lesionadas, pero las células diana de control no pulsadas con el péptido estaban menos lesionadas; por tanto, se demostró que se había inducido CTL específica del péptido.

Estos resultados demuestran que la composición emulsionada para dilución de la presente invención activa la inducción de CTL específica para cada antígeno tumoral in vivo cuando se combina con diversos péptidos antigénicos del cáncer.

[Ejemplo de Ensayo 8]

30 < Evaluación de la estabilidad de las composiciones emulsionadas para dilución >

Las composiciones emulsionadas para dilución preparadas en los Ejemplos se ensayaron respecto a estabilidad. Para el ensayo, se utilizaron las composiciones emulsionadas 1 a 39, 56, y 57, que no exhibían separación aparente alguna cuando se dejaron en reposo durante 24 horas después de su preparación. Específicamente, se llenaron 2 mL de cada composición emulsionada en un vial de vidrio de 4 mL de capacidad, y el vial se cerró herméticamente y se guardó a 25° C durante 1 mes, 3 meses, y 6 meses, después de lo cual se examinó cada composición respecto a cambio aparente. Como resultado, no se observó cambio aparente alguno en ninguna de las composiciones emulsionadas.

[Ejemplo de Ensayo 9]

< Examen microscópico de las composiciones emulsionadas para dilución >

40 De la misma manera que el Ejemplo de Ensayo 8, se utilizaron las composiciones emulsionadas que no exhibían separación aparente alguna cuando se dejaron en reposo durante 24 horas después de su preparación (1 a 39, 56, 57) para examinar microscópicamente el estado emulsionado antes y después de la dilución. En primer lugar, se examinó el estado emulsionado de cada composición emulsionada utilizando un microscopio con contraste de fase a un aumento de 200 veces. Como resultado, todas las composiciones emulsionadas exhibían un estado emulsionado fino satisfactorio. Por tanto, se tomaron 700 µL de cada composición emulsionada y 300 µL de agua para inyección en un vial criogénico del tipo de tapón interno de 5 mL de capacidad (fabricado por Sumitomo Bakelite, Co., Ltd.), y se agitaron utilizando un mezclador *shikenkan* (Touch Mixer MT-51, fabricado por Yamato Scientific Co., Ltd) durante 2 minutos, después de lo cual se examinó cada composición en cuanto a estado emulsionado bajo el microscopio de la misma manera que anteriormente. Como resultado, las composiciones emulsionadas 1 a 35 exhibían un estado emulsionado fino satisfactorio, mientras que las composiciones emulsionadas 36 a 39, 56 y 57 exhibían agregación evidente de las partículas de la fase acuosa.

[Ejemplo de Ensayo 10]

< Evaluación de los diámetros medios de partícula de las composiciones emulsionadas para dilución >

De las composiciones emulsionadas para dilución obtenidas en los Ejemplos y Ejemplos Comparativos, se ensayaron las composiciones emulsionadas 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 21, 29, 36, y 39 para determinar los diámetros medios de partícula de las mismas. Las medidas se realizaron por el método de dispersión dinámica de la luz utilizando un analizador de distribución de tamaños de partícula (ZETA-SIZER NANO-S, fabricado por MALVERN INSTRUMENTS Company). Para garantizar medidas exactas, cada composición emulsionada se diluyó en caso apropiado con una fase continua de oleato de etilo en el momento de la medida. Los resultados se muestran en la Tabla 14. Cada diámetro medio de partícula es el valor medio de todos los diámetros de partícula calculados a partir de la intensidad de dispersión de la luz. Como Ejemplos de los resultados de las medidas, las distribuciones de tamaños de partícula de las composiciones emulsionadas 8 y 29 en el momento de su preparación (inicial) se muestran en las Figuras 7 y 8, respectivamente.

Tabla 14

Composición emulsionada	Diámetro medio de partícula (nm)	
	En el momento de la preparación (inicial)	Después de almacenamiento a 5°C durante 3 meses
1	181	179
2	195	203
4	233	252
6	266	275
7	388	420
8	192	189
10	163	171
21	78	81
29	150	132
36	208	
39	160	

Como resultado de las medidas, todas las composiciones emulsionadas tenían un diámetro medio de partícula comprendido en el intervalo de 50 a 500 nm el momento de la preparación. Por este descubrimiento, se aprecia que la simple exhibición de un estado emulsionado satisfactorio es insuficiente para utilización a fin de diluir los péptidos antigénicos del cáncer. Por tanto, estos datos demostraban que lo que es esencial para el potencial de inducción de CTL de la composición emulsionada para dilución de la presente invención no es "ser apto para preparar una composición emulsionada satisfactoria", sino que el número de moles de aducto con óxido de etileno al tensioactivo no iónico del ingrediente B esté comprendido dentro de un intervalo particular.

Para las composiciones emulsionadas 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 21, y 29 de entre las composiciones emulsionadas arriba descritas para dilución, se midieron de la misma manera los diámetros medios de partícula después de almacenamiento a 5°C durante 3 meses. Como resultado, no se observó cambio importante alguno en el diámetro medio de partícula en ninguna de las composiciones emulsionadas; por tanto, se ve que la composición emulsionada para dilución de la presente invención es excelente también en estabilidad a baja temperatura.

[Ejemplo de Ensayo 11]

< Inducción de CTL con composiciones de vacuna contra el cáncer que comprendían una mezcla de dos clases de péptido de antígeno tumoral >

Se prepararon composiciones de vacuna contra el cáncer que comprendían cada una de las mezclas de dos clases de péptidos, a saber, MAGE-1 y CEA, TERT y CEA, y CEA y PSA, de entre los péptidos antigénicos del cáncer descritos en la Tabla 13, y se evaluaron los potenciales de inducción específicos de CTL de los mismos.

Se preparó cada composición de vacuna contra el cáncer utilizando la composición emulsionada 4, como se describe específicamente a continuación.

En primer lugar, se preparó cada uno de los péptidos MAGE-1, CEA, TERT, y PSA como una solución en DMSO de 100 mg/mL. A continuación, se mezcló cada una de las combinaciones de MAGE-1 y CEA, TERT y CEA, CEA y PSA en solución de DMSO, y cada mezcla se diluyó utilizando agua para inyección a fin de obtener una concentración de 2 mg/600 μ L para cada péptido para producir soluciones de péptidos mixtas (4 mg/600 μ L como la cantidad total de péptido). Después de la preparación de cada solución, se confirmó visualmente la ausencia de precipitado. Por separado, se mezclaron concienzudamente las composiciones emulsionadas obtenidas en los Ejemplos utilizando un mezclador *shikenkan* (Touch Mixer MT-51, fabricado por Yamato Scientific Co., Ltd.) (totalmente agitado y homogeneizado antes de su utilización).

A continuación, se recogieron 700 μ L de la composición emulsionada en un vial criogénico del tipo de tapón interno de 5 mL de capacidad (fabricado por Sumitomo Bakelite, Co., Ltd.) utilizando una pipeta Eppendorf de 1000 μ L. Seguidamente, mientras se agitaba el tubo utilizando el mezclador *shikenkan*, se añadieron gota a gota 300 μ L de la solución mixta del péptido arriba descrita, y se mezcló el todo. La velocidad de agitación del mezclador *shikenkan* se ajustó al nivel máximo. Después de añadir gota a gota la solución mixta del péptido, la mezcla se agitó ulteriormente durante 2 minutos utilizando el mezclador *shikenkan* para producir tres clases de composiciones de vacuna contra el cáncer (mezcla MAGE-1/CEA, mezcla TERT/CEA, y mezcla CEA/PSA).

Los potenciales de inducción específica de CTL de las tres clases de composición de vacuna contra el cáncer preparadas se evaluaron utilizando ratones transgénicos HLA-A24 (Int. J. Cancer: 100, 565, 2002).

Se administraron por vía subcutánea 200 μ L de cada líquido de dosificación (dosis de cada péptido de 200 μ g por 2 clases) a la raíz de la cola de cada ratón transgénico HLA-A24/K^b. Se utilizó un ratón para cada grupo. Siete días después de la administración, se extirpó el bazo y se prepararon esplenocitos. Algunos de los esplenocitos se pulsaron con 50 μ g/mL de cada una de dos clases de los péptidos objetivo (100 μ g/mL en total) durante 1 hora. Los esplenocitos no pulsados con los péptidos se sembraron en una placa de 24 pocillos a 7×10^6 células/pocillo, y los esplenocitos arriba mencionados pulsados con el péptido se añadieron ulteriormente a 7×10^5 células/pocillo y se cultivaron. El caldo de cultivo comprendía un medio RPMI1640 enriquecido con 10% FCS, HEPES 10 mM, L-glutamina 20 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales MEM 1 mM, 1% de vitamina MEM, y 2-mercaptoetanol 55 μ M, y se cultivaron las células durante 5 días. La actividad de CTL específica para el péptido administrado en los esplenocitos cultivados se midió por el ensayo de liberación de ⁵¹Cr (J. Immunol.: 159, 4753, 1997). Las células diana utilizadas eran células del linaje de células EL4-A2402/K^b preparadas por transferencia de un gen a células EL-4 del linaje de células derivadas de linfoma de ratón (ATCC, linaje número TIB-39) de tal modo que la molécula HLA-A24 y la molécula quimérica H-2K^b del MHC clase I (Int. J. Cancer: 100, 565, 2002) pudieran expresarse establemente. Las células diana se marcaron con ⁵¹Cr a 3,7 Mbq/10⁶ células, después de lo cual se añadió cada péptido para obtener una concentración de 100 μ g/mL, y las células se pulsaron durante 1 hora. Las células diana no pulsadas con el péptido (no-pulsadas) se marcaron con ⁵¹Cr durante 2 horas y sirvieron como células diana de control. Estas células diana marcadas y los esplenocitos preparados previamente se mezclaron en una ratio de 1:80 y se cultivaron durante 4 horas, determinándose la actividad de CTL a partir de la ratio de células diana lesionadas. Los resultados se muestran en la Figura 9.

Como se muestra en la Figura 9, en los grupos que recibieron las composiciones de vacuna contra el cáncer preparadas utilizando la composición emulsionada para dilución de la presente invención, las células diana pulsadas con los péptidos estaban lesionadas gravemente. Por el contrario, las células diana de control no pulsadas con los péptidos estaban menos lesionadas; por tanto, se demostraba que cuando se mezclaban dos clases de péptido de antígeno tumoral, se inducía simultáneamente la CTL específica para cada péptido. Conforme a este descubrimiento, se demostraba que la composición emulsionada para dilución de la presente invención activa la inducción de CTL in vivo cuando se combina con diversos péptidos antigénicos del cáncer.

Aplicabilidad Industrial

La composición emulsionada para dilución de la presente invención es una emulsión W/O estable per se. Por dilución de un péptido de antígeno tumoral o un dímero del mismo con la composición emulsionada para dilución de la presente invención por una operación simple, se proporciona una composición de vacuna contra el cáncer que es una emulsión W/O estable que exhibe actividad de inducción específica de CTL para cada antígeno tumoral in vivo.

La presente invención proporciona también una composición emulsionada para dilución de un péptido de antígeno tumoral o un dímero del mismo, destinado a inducir CTL específica. Por esta composición emulsionada para dilución se proporciona también una composición de vacuna contra el cáncer que tiene actividad de inducción de CTL específica para diversos antígenos tumorales in vivo. Se considera que la presente invención es eficaz para mejorar las condiciones en muchos pacientes de cáncer.

Listado de secuencias

<110> Dainippon Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd. NOF Corporation
 <120> EMULSIFIED COMPOSITION FOR DILUTION AND CANCER VACCINE COMPOSITION
 <130> 09854
 5 <150> JP 2005-012140
 <151> 2005-01-19
 <160> 53
 <170> PatentIn version 3.2
 10 <210> 1
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
 1 5
 15 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Ala Met Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val
 20 1 5 10
 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 3
 Met Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val
 1 5
 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 4
 Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
 1 5
 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 5
 Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala
 1 5
 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 6
 Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu Arg Leu
 1 5 10

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 7
 Val Leu Tyr Arg Tyr Gly Ser Phe Ser Val
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 Ser Leu Ala Asp Thr Asn Ser Leu Ala Val
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Arg Leu Met Lys Gln Asp Phe Ser Val
 1 5
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Arg Leu Pro Arg Ile Phe Cys Ser Cys
 1 5
 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 Val Tyr Phe Phe Leu Pro Asp His Leu
 1 5
 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5
 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu
 1 5

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 15
 Met Leu Leu Ala Val Leu Tyr Cys Leu
 1 5
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val
 1 5
 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Ala Phe Leu Pro Trp His Arg Leu Phe
 20 1 5
 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 18
 Ala Phe Leu Pro Trp His Arg Leu Phe Leu
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu
 1 5
 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val
 1 5
 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn Gly Thr Phe
 50 1 5 10

<210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 23
 Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu
 1 5
 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val
 1 5 10
 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 Val Ser His Ser Phe Pro His Pro Leu Tyr
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val
 1 5 10
 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
 1 5
 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val
 1 5
 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 Gln Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu
 1 5 10
 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu
 1 5

<210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 31
 Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
 1 5
 <210> 32
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 Cys Leu Thr Ser Val Gln Leu Val
 1 5
 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val
 1 5 10
 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val
 1 5
 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 35
 Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile
 1 5
 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 36
 Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu
 1 5
 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 37
 Asn Tyr Lys His Cys Phe Pro Glu Ile
 1 5
 <210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 38
 Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val
 1 5
 45

<210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 39
 Lys Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu
 1 5
 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 40
 Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile
 1 5
 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 41
 Thr Phe Pro Asp Leu Glu Ser Glu Phe
 1 5
 <210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 42
 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
 1 5
 <210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu
 1 5 10
 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 44
 Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr
 1 5
 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 45
 Glu Tyr Arg Gly Phe Thr Gln Asp Phe
 1 5
 <210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu
 1 5 10

<210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 47
 Ile Leu Ala Lys Phe Leu His Trp Leu
 1 5
 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 48
 Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu
 1 5
 <210> 49
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 49
 Val Tyr Gly Phe Val Arg Ala Cys Leu
 1 5
 <210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 50
 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 1 5
 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 51
 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5
 <210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 52
 Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe
 1 5
 <210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 53
 Ala Tyr Ala Cys Asn Thr Ser Thr Leu
 1 5
 40

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición emulsionada para dilución de un péptido de antígeno tumoral que tiene 8 a 12 aminoácidos o un dímero del mismo, en donde la composición emulsionada comprende:
 - 5 A) un éster de un ácido graso que tiene 8 a 22 átomos de carbono y un alcohol que tiene 2 a 24 átomos de carbono, teniendo el éster un punto de solidificación no mayor que 10°C, en 50 a 90% en peso;
 - B) un tensioactivo no iónico constituido por un aducto de triglicérido de hidroxiácido graso con 20 moles de óxido de etileno, en 0,5 a 20% en peso;
 - C) un emulsificante que es un éster parcial de un alcohol polihidroxílico y un ácido graso, siendo el éster parcial líquido a 40°C, en 0 a 20% en peso; y
 - 10 D) agua en 5 a 20% en peso.
2. El uso de la reivindicación 1, en donde la composición emulsionada comprende ingrediente A en 60 a 80% en peso; ingrediente B en 1 a 10% en peso; ingrediente C en 5 a 15% en peso; e ingrediente D en 5 a 20% en peso.
3. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en donde el diámetro medio de partícula de la fase de dispersión de la composición emulsionada es 50 a 500 nm.
- 15 4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el ácido graso que constituye el ingrediente A es ácido oleico, ácido mirístico o ácido 2-etilhexanoico.
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el éster del ingrediente A es oleato de etilo, miristato de octildodecilo o 2-etilhexanoato de cetilo.
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el triglicérido de hidroxiácido graso que constituye el tensioactivo no iónico del ingrediente B es aceite de ricino o aceite de ricino endurecido.
- 20 7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el ingrediente B es un tensioactivo no iónico constituido por un aducto de aceite de ricino endurecido con 20 moles de óxido de etileno.
8. Una composición de vacuna contra el cáncer que comprende:
 - 25 A) un éster de un ácido graso que tiene 8 a 22 átomos de carbono y un alcohol que tiene 2 a 24 átomos de carbono, teniendo el éster un punto de solidificación no mayor que 10°C, en 50 a 90% en peso;
 - B) un tensioactivo no iónico constituido por un aducto de triglicérido de hidroxiácido graso con 20 moles de óxido de etileno, en 0,5 a 20% en peso;
 - C) un emulsificante que es un éster parcial de un alcohol polihidroxílico y un ácido graso, siendo el éster parcial líquido a 40°C, en 0 a 20% en peso; y
 - 30 E) una fase acuosa que comprende un péptido de antígeno tumoral que tiene 8 a 12 aminoácidos o un dímero del mismo, en 10 a 60% en peso; en donde la composición es una emulsión W/O.
9. La composición de vacuna contra el cáncer de la reivindicación 8, que comprende:

ingrediente A en 40 a 60% en peso; ingrediente B en 1,0 a 5,0% en peso; ingrediente C en 5,0 a 10,0% en peso; e ingrediente E en 30 a 50% en peso.
- 35 10. Un método de preparación de una composición de vacuna contra el cáncer como se define en la reivindicación 8, que comprende diluir 0,25 a 1 parte en volumen de una fase acuosa que comprende un péptido de antígeno tumoral que tiene 8 a 12 aminoácidos o un dímero del mismo con 1 parte en volumen de una composición emulsionada que comprende:
 - 40 A) un éster de un ácido graso que tiene 8 a 22 átomos de carbono y un alcohol que tiene 2 a 24 átomos de carbono, teniendo el éster un punto de solidificación no mayor que 10°C, en 50 a 90% en peso;
 - B) un tensioactivo no iónico constituido por un aducto de triglicérido de hidroxiácido graso con 20 moles de óxido de etileno, en 0,5 a 20% en peso;
 - C) un emulsificante que es un éster parcial de un alcohol polihidroxílico y un ácido graso, siendo el éster parcial líquido a 40°C, en 0 a 20% en peso; y
 - 45 D) agua en 5 a 20% en peso.

11. Un kit para preparar justo antes de su uso una composición de vacuna contra el cáncer como se define en la reivindicación 8, que comprende una fase acuosa que comprende un péptido de antígeno tumoral que tiene 8 a 12 aminoácidos o un dímero del mismo, y una composición emulsionada para dilución de la fase acuosa, que comprende:
- 5 A) un éster de un ácido graso que tiene 8 a 22 átomos de carbono y un alcohol que tiene 2 a 24 átomos de carbono, teniendo el éster un punto de solidificación no mayor que 10°C, en 50 a 90% en peso;
- B) un tensioactivo no iónico que consiste en un aducto de triglicérido de hidroxigraso con 20 moles de óxido de etileno, en 0,5 a 20% en peso;
- 10 C) un emulsificante que es un éster parcial de un alcohol polihidroxílico y un ácido graso, siendo el éster parcial líquido a 40°C, en 0 a 20% en peso; y
- D) agua en 5 a 20% en peso.
12. Una composición emulsionada para uso en la activación terapéutica de la inducción de CTL en un péptido de antígeno tumoral que tiene 8 a 12 aminoácidos o un dímero del mismo, que comprende:
- 15 A) un éster de un ácido graso que tiene 8 a 22 átomos de carbono y un alcohol que tiene 2 a 24 átomos de carbono, teniendo el éster un punto de solidificación no mayor que 10°C, en 50 a 90% en peso;
- B) un tensioactivo no iónico constituido por un aducto de triglicérido de hidroxigraso con 20 moles de óxido de etileno, en 0,5 a 20% en peso;
- C) un emulsificante que es un éster parcial de un alcohol polihidroxílico y un ácido graso, siendo el éster parcial líquido a 40°C, en 0 a 20% en peso; y
- 20 D) agua en 5 a 20% en peso.
13. La composición emulsionada para uso conforme a la reivindicación 12, que comprende ingrediente A en 60 a 80% en peso; ingrediente B en 1 a 10% en peso; ingrediente C en 5 a 15% en peso; e ingrediente D en 5 a 20% en peso.
- 25 14. La composición emulsionada para uso conforme a la reivindicación 12 ó 13, en donde el diámetro medio de partícula de la fase de dispersión de la composición emulsionada es 50 a 500 nm.
15. La composición emulsionada para uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde
- a) el ácido graso que constituye el ingrediente A es ácido oleico, ácido mirístico o ácido 2-etilhexanoico,
- b) el éster del ingrediente A es oleato de etilo, miristato de octildodecilo o 2-etilhexanoato de cetilo,
- 30 c) el triglicérido de hidroxigraso que constituye el tensioactivo no iónico del ingrediente B es aceite de ricino o aceite de ricino endurecido, o
- d) el ingrediente B es un tensioactivo no iónico constituido por un aducto de aceite de ricino endurecido con 20 moles de óxido de etileno.

FIG. 1

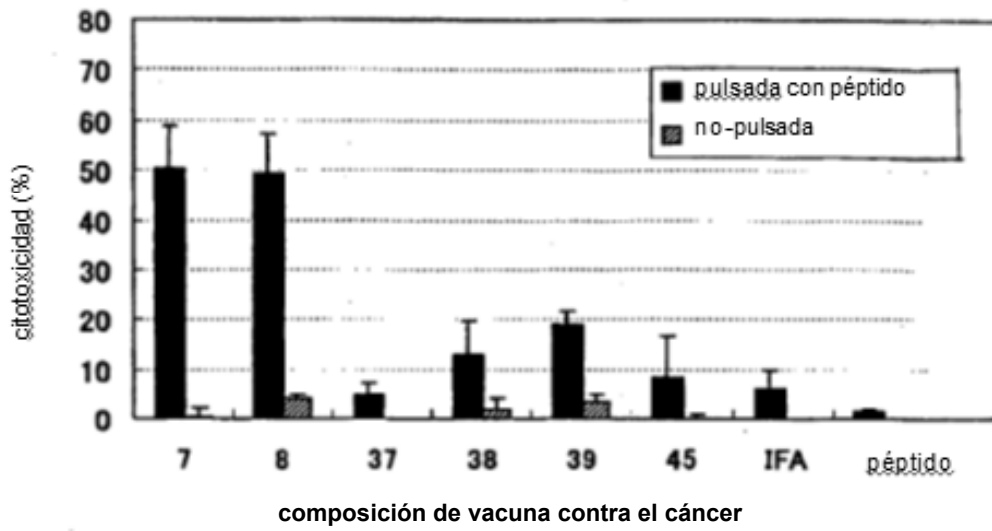


FIG. 2

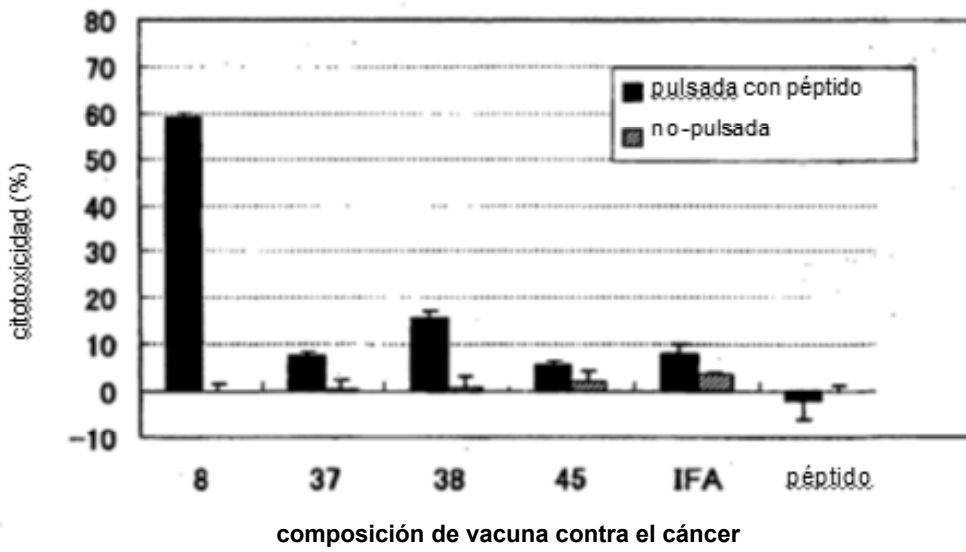


FIG. 3

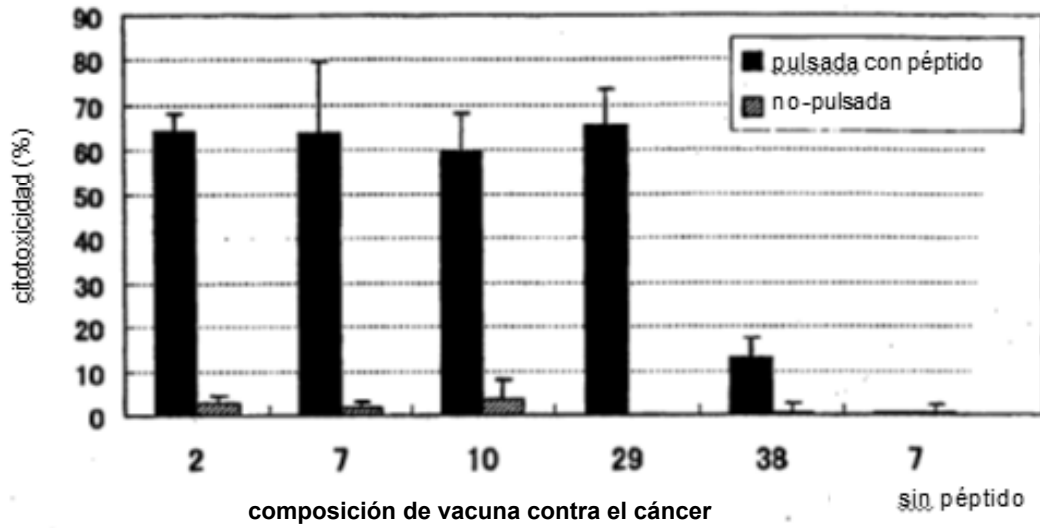


FIG. 4

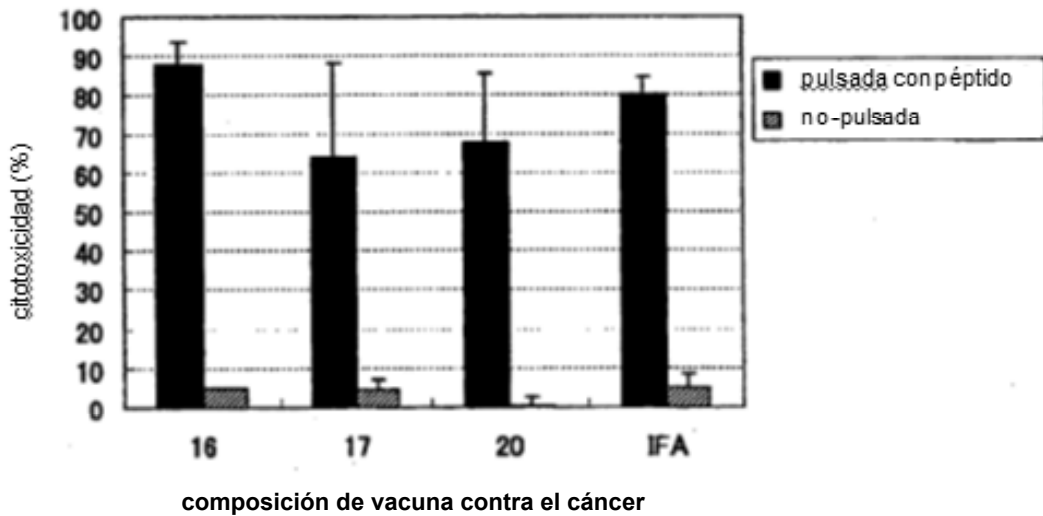
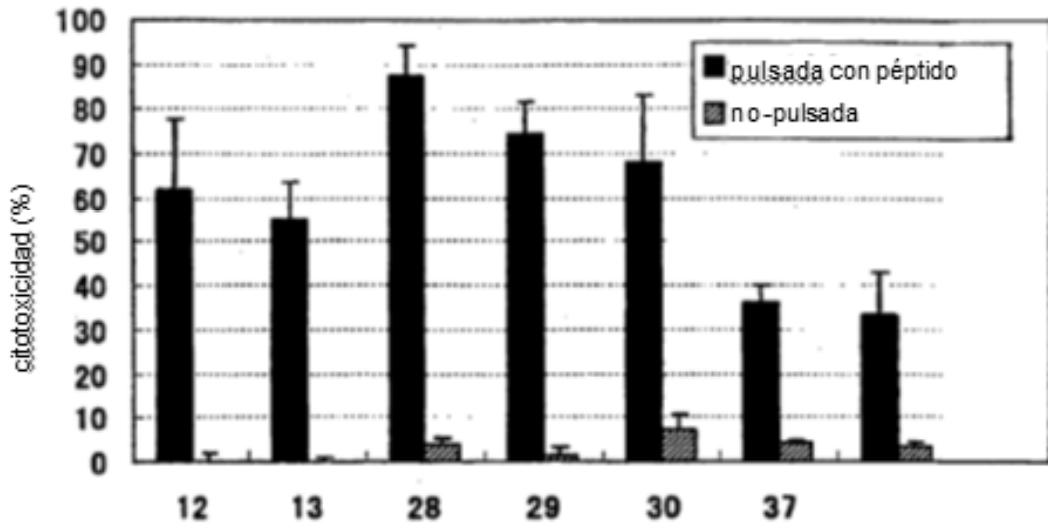
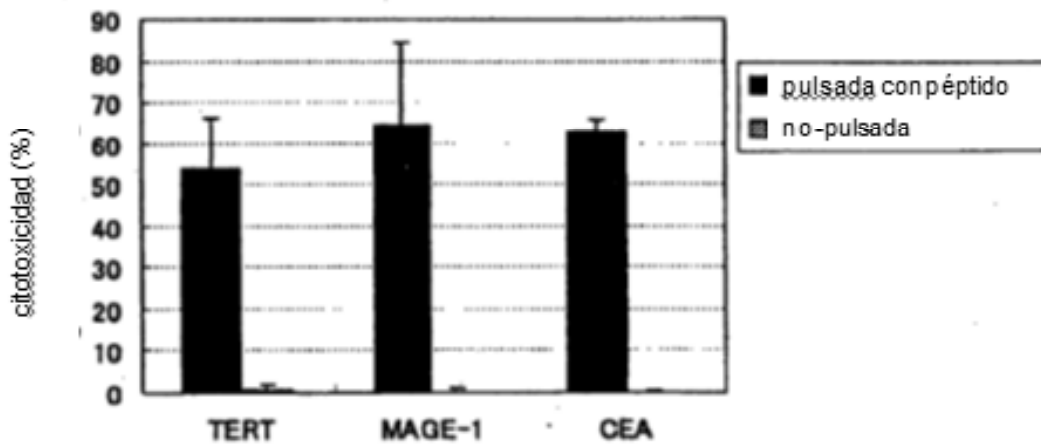


FIG. 5



composición de vacuna contra el cáncer

FIG. 6



péptido de antígeno tumoral

FIG. 7

distribución de tamaños de partícula
(composición emulsionada No. 8)/inicial

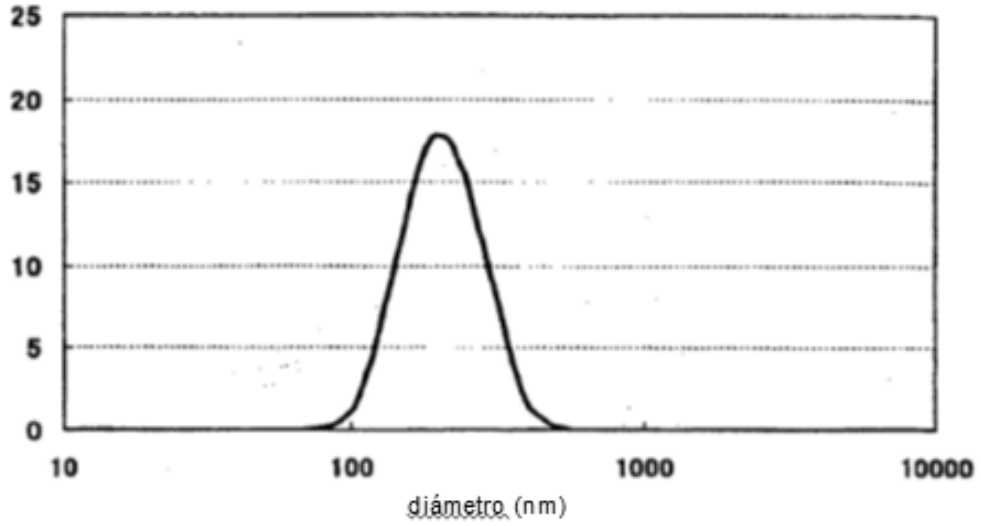


FIG. 8

distribución de tamaños de partícula
(composición emulsionada No. 29)/inicial

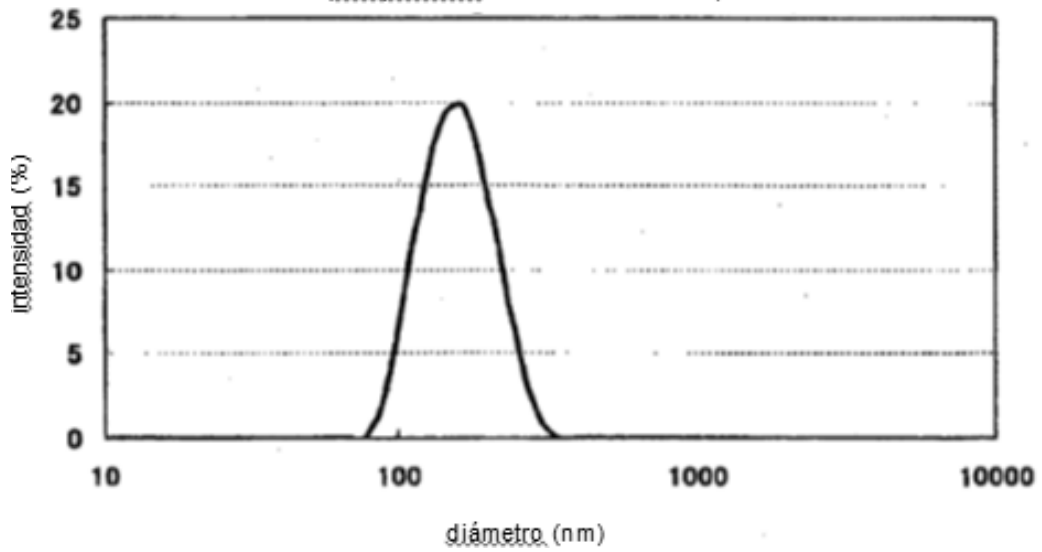
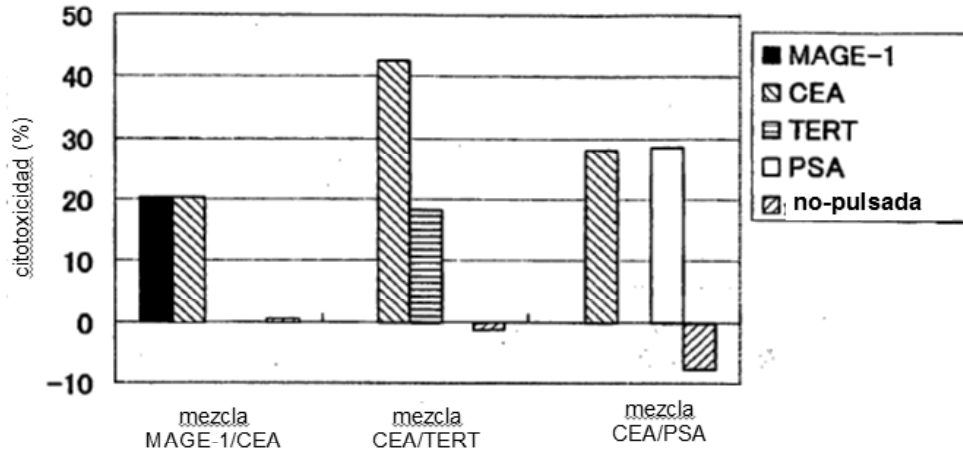


FIG. 9



composición de vacuna contra el cáncer