

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 699**

51 Int. Cl.:

A61K 47/06 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2009 E 09756985 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 2296696**

54 Título: **Composiciones que comprenden liposomas, un antígeno, un polinucleótido y un vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba**

30 Prioridad:

05.06.2008 US 59043 P

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

11.12.2014

73 Titular/es:

**IMMUNOVACCINE TECHNOLOGIES INC. (100.0%)
1344 Summer Street, Suite 412
Halifax, Nova Scotia B3H 0A8 , CA**

72 Inventor/es:

**MANSOUR, MARC;
SAMMATUR, LEELADHAR;
MACDONALD, LISA DIANA;
KARKADA, MOHAN;
WEIR, GENEVIEVE MARY y
FUENTES-ORTEGA, ANTAR**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 524 699 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

Composiciones que comprenden liposomas, un antígeno, un polinucleótido y un vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba

5

Campo de la invención

La presente solicitud se refiere a composiciones que comprenden liposomas, un antígeno, un polinucleótido polil:C y un vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba y a su uso.

10

Antecedentes de la invención

Las vacunas convencionales pueden comprender un antígeno, un adyuvante y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se sabe que un polinucleótido polil:C puede ser útil como un adyuvante. También se sabe que los liposomas pueden ser útiles en composiciones de vacuna (véase la patente de EE.UU. 6.793.923 concedida de los solicitantes). Sin embargo, según creen los solicitantes, la técnica no enseña o sugiere la combinación de un antígeno, un polinucleótido polil:C, liposomas y un vehículo hidrófobo en una composición de vacuna.

15

Una composición para dirigir y modular la actividad de las células tumorales mediante la inhibición de la isoclase que cambia de IgM a IgA se divulga en el documento WO 2006/050155. Las composiciones divulgadas en el mismo comprenden como compuestos activos el mitógeno de hierba carmín y polil:C, estando el polil:C incluido en un liposoma catiónico en algunas realizaciones. Se describen otras realizaciones, tales como formulaciones farmacéuticas para administración parenteral, como que incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble y suspensiones de los compuestos activos preparadas como suspensiones inyectables oleosas.

20

25

Sumario de la invención

Los solicitantes han descubierto ahora que una composición según se define en la reivindicación 1 puede proporcionar sorprendentemente títulos de anticuerpos más altos y un mayor porcentaje de células T de memoria CD8+ o activadas que cualquiera de las composiciones de vacunas convencionales que contienen polinucleótidos polil:C en un vehículo acuoso, o composiciones que comprenden liposomas, un vehículo hidrófobo y un adyuvante de alumbre.

30

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona una composición según se define en la reivindicación 1.

35

En otro aspecto, la invención proporciona un método para preparar una composición, según se define en la reivindicación 6. En una realización, el antígeno está encapsulado en los liposomas. En una realización, el Polinucleótido polil:C está encapsulado en los liposomas.

40

La composición de la invención se puede usar como medicamento. En una realización, el medicamento es para inducir una respuesta de anticuerpos o una respuesta inmunitaria mediada por células al antígeno en el sujeto.

Otros aspectos y características de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras la revisión de la siguiente descripción de realizaciones específicas de la invención junto con las figuras adjuntas.

45

Breve descripción de las figuras

En las figuras, que ilustran realizaciones de la invención a modo de ejemplo solamente:

50

La figura 1 es un gráfico que muestra los resultados de la vacunación de tres grupos de ratones (n = 9 o 10) del siguiente modo: los ratones del grupo 1 se vacunaron con 1 microgramo de rHA y 4 microgramos de polil:C en una dosis de 30 microlitros formulada como una vacuna de liposomas/Polil:C/vehículo hidrófobo (vacuna B, la invención). Los ratones del grupo 2 se trataron con la vacuna A que comprende 1 microgramo de rHA y 60 microgramos de alumbre en una dosis de 30 microlitros de la formulación de liposoma/alumbre/vehículo hidrófobo. Los ratones del grupo 3 se vacunaron con 1 microgramo de rHA y 60 microgramos de alumbre por dosis de 30 microlitros de la vacuna de alumbre control. Las respuestas inmunitarias humorales se midieron mediante ELISA como se describe en el presente documento. Para cada grupo de tratamiento, los valores log₁₀ de los títulos de anticuerpos de punto final se promediaron y se calcularon las desviaciones estándar para cada punto de tiempo. Los valores p se calcularon utilizando la prueba t de Student.

55

60

La figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de la vacunación de dos grupos de ratones (n = 9 o 10) del siguiente modo: los ratones del grupo 1 se vacunaron con 1 microgramo de rHA y 4 microgramos de polil:C en una dosis de 30 microlitros formulada como una vacuna de liposomas/Polil:C/vehículo hidrófobo (vacuna B, la invención). Los ratones del grupo 2 se vacunaron con 1 microgramo de rHA y 4 microgramos de polil:C por dosis de 30 microlitros de la vacuna polil:C control. Las respuestas inmunitarias humorales se midieron mediante ELISA como se describe en el presente documento. Para cada grupo de tratamiento, los valores log₁₀ de los títulos de anticuerpos

65

de punto final se promediaron y se calcularon las desviaciones estándar para cada punto de tiempo. Los valores p se calcularon utilizando la prueba t de Student.

5 La figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de la vacunación de dos grupos de ratones (n = 8 o 9) del siguiente modo: Los ratones del grupo 1 se vacunaron con una única dosis de 1 microgramo de rHA y 10 microgramos de Polil:C en una dosis de 50 microlitros formulada como una vacuna de liposomas liofilizados/Polil:C/vehículo hidrófobo (vacuna C, la invención). Los ratones del grupo 2 se trataron con 1 microgramo de rHA y 100 microgramos de alumbre por dosis de 50 microlitros de la vacuna de alumbre control; se administró un refuerzo a los ratones 21 días después de la vacunación. Las respuestas inmunitarias humorales se midieron mediante ELISA como se describe en el presente documento. Para cada grupo de tratamiento, los valores log₁₀ de los títulos de anticuerpos de punto final se promediaron y se calcularon las desviaciones estándar para cada punto de tiempo.

15 Figura 4. Respuestas de anticuerpos anti-rHA potenciadas después de la vacunación con el antígeno rHA formulado en una vacuna de liposomas/polil:c/vehículo oleoso. Dos grupos de ratones (n = 9 o 10) se vacunaron del siguiente modo: los ratones del grupo 1 se vacunaron con 1 microgramo de rHA y 4 microgramos de Polil:C en una dosis de 30 microlitros formulada como una vacuna de liposomas/Polil:C/vehículo hidrófobo (vacuna B, la invención). Los ratones del grupo 2 se trataron con la vacuna A, 1 microgramo de rHA y 60 microgramos de alumbre en una dosis de 30 microlitros de la formulación de liposoma/alumbre/vehículo hidrófobo. Las respuestas inmunitarias humorales se midieron mediante ELISA como se describe en el presente documento. Para cada grupo de tratamiento, los valores log₁₀ de los títulos de anticuerpos de punto final se promediaron y se calcularon las desviaciones estándar para cada punto de tiempo. Los valores p se calcularon utilizando la prueba t de Student.

25 Figura 5. Respuestas de anticuerpos anti-rHA potenciadas después de la vacunación con el antígeno rHA formulado en una vacuna de liposoma/polil:c/vehículo oleoso. Dos grupos de ratones (n = 9 o 10) se vacunaron del siguiente modo: los ratones del grupo 1 se vacunaron con 1 microgramo de rHA y 4 microgramos de Polil:C en una dosis de 30 microlitros formulada como una vacuna de liposomas/Polil:C/vehículo hidrófobo (vacuna B, la invención). Los ratones del grupo 2 se vacunaron con 1 microgramo de rHA y 4 microgramos de polil:C por dosis de 30 microlitros de la vacuna polil:C control. Las respuestas inmunitarias humorales se midieron mediante ELISA como se describe en el presente documento. Para cada grupo de tratamiento, los valores log₁₀ de los títulos de anticuerpos de punto final se promediaron y se calcularon las desviaciones estándar para cada punto de tiempo. Los valores p se calcularon utilizando la prueba t de Student.

35 Figura 6. Respuestas de anticuerpos anti-rHA potenciadas después de la vacunación con el antígeno rHA formulado en una vacuna de liposomas liofilizados/Polil:C/vehículo oleoso. Dos grupos de ratones (n = 9 o 10) se inmunizaron del siguiente modo: los ratones del grupo 1 se vacunaron con una única dosis de 1,5 microgramos de rHA y 12,5 microgramos de Polil:C en una dosis de 50 microlitros formulada como una vacuna de liposomas liofilizados/Polil:C/vehículo hidrófobo (vacuna C, la invención). Los ratones del grupo 2 se trataron con 1,5 microgramos de rHA y 100 microgramos de alumbre por dosis de 50 microlitros de la vacuna de alumbre control; se administró un refuerzo a los ratones 28 días (semana 4) después de la vacunación. Las respuestas inmunitarias humorales se midieron mediante ELISA como se describe en el presente documento. Para cada grupo de tratamiento, los valores log₁₀ de los títulos de anticuerpos de punto final se promediaron y se calcularon las desviaciones estándar para cada punto de tiempo. Los valores p se calcularon utilizando la prueba t de Student.

45 Figura 7. Número de células CD8 específicas de antígeno dentro de una población de células T CD8 positivas después de la vacunación. Tres grupos de ratones BALB/c (n = 4) se vacunaron del siguiente modo: los ratones del grupo 1 se vacunaron con una única dosis de 1,5 microgramos de rHA y 12,5 microgramos de adyuvante polil:C a base de ARN en una dosis de 50 microlitros formulada como una vacuna de liposomas liofilizados/Polil:C/vehículo hidrófobo (vacuna D, la invención) por vía intramuscular. Los ratones del grupo 2 se vacunaron con 50 microlitros de la vacuna D por vía subcutánea. Los ratones del grupo 3 se vacunaron con 1,5 microgramos de rHA y 100 microgramos del adyuvante de alumbre inyectable en 50 microlitros de tampón de fosfato 50 milimolar (pH 7,0) por vía intramuscular. Todas las vacunas se administraron una vez sin refuerzo. Las células T CD8+ específicas de antígeno se detectaron veintidós días después de la vacunación en los esplenocitos de animales utilizando análisis de citometría de flujo de tres colores. Las células se tiñeron con anti-CD8β-APC, anti-CD19-FITC y un pentámero específico de PE específico de H2-Dd portadores del epítipo inmunodominante de rHA, I9L. Los resultados se expresan como porcentaje medio de las células positivas al pentámero en una población de células positivas a CD8β/negativas a CD19, +/- desviación estándar. Se restó la tinción de fondo detectada en los esplenocitos aislados de células no expuestas previamente. *p<0,025, **p<0,005, en comparación con el Grupo 3.

60 Figura 8. Títulos de inhibición de la hemaglutinación (IHA) después de una sola vacunación contra rHA formulada en la invención. Un grupo de ratones y un grupo de conejos (n = 5) se vacunaron del siguiente modo: el grupo de los ratones se vacunaron con 0,5 microgramos de rHA y 12 microgramos de Polil:C en una dosis de 50 microlitros formulada como una vacuna de liposomas liofilizados/Polil:C/vehículo hidrófobo (vacuna E, la invención). El grupo de conejos se trataron con la vacuna F (la invención), 2 microgramos de rHA y 50 microgramos de polil:C en una dosis de 200 microlitros de la formulación de liposomas liofilizados/Polil:C/vehículo hidrófobo. Las respuestas inmunitarias humorales se midieron mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación, tal como se describe en el presente

documento; antes de la vacunación (antes de la vacunación) y a 4 (conejos) o 5 (ratones) semanas después. Para cada grupo de animales, los valores del log10 de los títulos de IHA se promediaron y se calculó la desviación estándar.

5 Figura 9. Respuestas de anticuerpos anti- β -amiloide potenciadas después de la vacunación con una mezcla de β -amiloide y los péptidos F21 E formulados en una vacuna de liposoma/polil:c/vehículo oleoso. Dos grupos de ratones (n = 9) se vacunaron del siguiente modo: los ratones del grupo 1 se vacunaron con 10 microgramos de β -amiloide, 20 microgramos de F21 E y 200 microgramos de alumbre en una dosis de 100 microlitros formulada como vacuna de liposoma/alumbre/vehículo hidrófobo (Vacuna G). Los ratones del grupo 2 se trataron con 10 microgramos de β -amiloide, 20 microgramos de F21 E y 10 microgramos de polil:C por dosis de 100 microlitros formulada como vacuna de liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo (Vacuna H, la invención). Las respuestas inmunitarias humorales se midieron mediante ELISA como se describe en el presente documento. Para cada grupo de tratamiento, los valores log10 de los títulos de anticuerpos de punto final se promediaron y se calculó la desviación estándar para cada punto de tiempo. Los valores p se calcularon utilizando la prueba t de Student.

10 Figura 10. Vacunas formuladas en una formulación de liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo son capaces de producir respuestas inmunitarias celulares y humorales. Dos grupos de ratones (n = 5) se vacunaron del siguiente modo: los ratones del grupo 1 se vacunaron con 0,5 microgramos de rHA y 12 microgramos de Polil:C en una dosis de 50 microlitros formulada como una vacuna de liposomas liofilizados/Polil:C (alto)/vehículo hidrófobo (vacuna E, la invención). Los ratones del grupo 2 se trataron con 0,5 microgramos de rHA y 2,5 microgramos de Polil:C por dosis de 50 microlitros formulada como una vacuna de liposomas liofilizados/Polil:C (bajo)/vehículo hidrófobo (vacuna E, la invención). Los indicadores de respuestas humorales (IgG1) y celulares (IgG2A) se midieron mediante ELISA como se describe en el presente documento. Para cada grupo de tratamiento, los valores log10 de los títulos de anticuerpos de punto final se promediaron y se calcularon las desviaciones estándar para cada punto de tiempo.

15 La figura 11 es un gráfico que muestra el volumen tumoral promedio de ratones C57BL/6 a los que se han implantado células C3 que expresan HPV16 E7 y vacunados ocho días después del siguiente modo: los ratones del grupo 1 se vacunaron con 100 microlitros que contienen 15 microgramos del antígeno FP y 150 microgramos de polil:C basado en ARN formulado en una emulsión con vehículo hidrófobo (vacuna en emulsión control). Los ratones del grupo 2 se vacunaron con 100 microlitros que contienen 15 microgramos del antígeno FP y 150 microgramos de polil:C formulado en liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo (vacuna K, la invención). Los ratones del grupo 3 recibieron 100 microlitros de PBS solamente. Todos los grupos contenían ocho ratones. El tamaño del tumor se midió una vez a la semana durante cinco semanas después de la implantación. La figura 11 muestra el volumen tumoral promedio calculado para cada grupo +/- SEM. Los valores p se calcularon para el Grupo 1 y el Grupo 2 utilizando la prueba T de Student, p = <0,1, p = <0,05.

20 La figura 12 es un gráfico que muestra el volumen tumoral promedio de ratones C57BU6 a los que se han implantado células C3 que expresan HPV16 E7 y vacunados cinco días después del siguiente modo: los ratones del grupo 1 recibieron 100 microlitros que contienen 10 microgramos del antígeno FP y 20 microgramos de polil:C basado en ADN formulado en liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo (vacuna L, la invención). Los ratones del grupo 2 recibieron 50 microlitros que contienen 10 microgramos del antígeno FP y 20 microgramos de polil:C basado en ADN formulado en liposomas liofilizados/polil:C/vehículo hidrófobo (vacuna M, la invención). Los ratones del grupo 3 recibieron 50 microlitros que contienen 10 microgramos de antígeno FP formulados en liposomas liofilizados/vehículo hidrófobo (control adyuvante). Los ratones del grupo 4 recibieron 100 microlitros de PBS solamente. Todos los grupos contenían diez (10) ratones. El tamaño del tumor se midió una vez a la semana durante cinco semanas después de la implantación. La figura 12 muestra el volumen tumoral promedio calculado para cada grupo se +/- SEM. Los valores p se calcularon para el Grupo 2 y el Grupo 3 utilizando la prueba T de Student, p = <0,05.

25 30 35 40 45 50 55 60 Figura 13. Respuestas celulares anti-rHA potenciadas después de la vacunación con el antígeno rHA formulado en una vacuna de liposomas liofilizados/Polil:C/vehículo oleoso. Dos grupos de ratones (n = 9 o 10) se inmunizaron del siguiente modo: los ratones del grupo 1 se vacunaron con una única dosis de 1,5 microgramos de rHA y 12,5 microgramos de Polil:C en una dosis de 50 microlitros formulada como una vacuna de liposomas liofilizados/Polil:C/vehículo hidrófobo (vacuna C, la invención). Los ratones del grupo 2 se trataron con 1,5 microgramos de rHA y 100 microgramos de alumbre por dosis de 50 microlitros de la vacuna de alumbre control; se administró un refuerzo a los ratones 28 días (semana 4) después de la vacunación. Las respuestas celulares específicas de antígeno se midieron mediante tinción pentamérica de las células T CD8 + específicas para el epítipo H2-Kd IYSTVASSL y citometría de flujo. Los ratones vacunados con la invención como se ha descrito generaron una respuesta celular de larga duración específica de antígeno. Los valores p se calcularon utilizando la prueba t de Student.

Descripción detallada

65 La presente solicitud se refiere a composiciones según se definen en la reivindicación 1 y a su uso.

Las composiciones de la invención, mediante la combinación de un antígeno, un polinucleótido polil:C, liposomas y

un vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba proporcionaron sorprendentemente títulos más altos de anticuerpos que las composiciones de vacunas convencionales que contienen polinucleótidos polil:C en un vehículo acuoso, o que las composiciones que comprenden liposomas, un vehículo hidrófobo y un adyuvante de alumbre.

5

Los datos descritos en los ejemplos 1 y 2 en el presente documento se resumen en la tabla 1:

Tabla 1.

	Composición	Título de anticuerpos (log10)	Título de anticuerpos (sin log)
(1)	Antígeno rHA Adyuvante de alumbre Liposomas Vehículo hidrófobo	5,41	256.000
(2)	Antígeno rHA Polil:C Vehículo PBS	6,01	1.024.000
(3)	Antígeno rHA Polil:C Liposomas Vehículo hidrófobo	6,91	8.192.000

rHA = glucoproteína hemaglutinina recombinante H5N1 de la gripe

PBS = vehículo solución salina tamponada con fosfato

10

A partir de la tabla anterior (tabla 1) se verá que las composiciones de la invención (3) proporcionaron títulos de anticuerpos que fueron más que el efecto aditivo de cualquiera de la combinación de liposomas más vehículo hidrófobo (1), o el uso de Polil:C (2). El efecto aditivo de (1) y (2) sería un título anticuerpo sin log de $256.000 + 1.024.000 = 1.280.000$. En su lugar, la sustitución de la adyuvante de alumbre en (3) con Polil:C dio un título de anticuerpos sin log inesperadamente alto de 8.192.000, 6,4 veces el efecto aditivo esperado. Además, la respuesta de anticuerpos generada con la composición (3) fue de larga duración y el efecto observado en el punto de tiempo más temprano (4 semanas después de la vacunación) descrito anteriormente se mantuvo en la semana 16 después de la vacunación (ejemplos 4 y 5). Los datos descritos en los ejemplos 4 y 5 en el presente documento se resumen en la tabla 2:

15

20

Tabla 2.

	Composición	Título promedio de anticuerpos (log10)	Título promedio de anticuerpos (sin log)
(1)	Antígeno rHA Adyuvante de alumbre Liposomas Vehículo hidrófobo	5,11	128.824
(2)	Antígeno rHA Polil:C Vehículo PBS	5,23	169.824
(3)	Antígeno rHA Polil:C Liposomas Vehículo hidrófobo	6,21	1.621.810

El efecto aditivo de (1) y (2) sería un título anticuerpo promedio sin log de $128.824 + 169.824 = 298.648$. En su lugar, la sustitución de la adyuvante de alumbre en (3) con Polil:C dio un título de anticuerpos sin log inesperadamente alto de 1.621.810, 5,4 veces el efecto aditivo esperado.

25

Los resultados observados con la composición (3) descrita anteriormente se duplicaron en un estudio separado que utilizó una composición que consiste en antígeno (rHA), Polil:C, liposomas liofilizados y un vehículo hidrófobo y se describen en el ejemplo 3. El título promedio de anticuerpos observado con esta composición en la semana 8 después de la vacunación fue 2.884.031 (sin log) en comparación con los 147.910 (sin log) del título promedio observado con una vacuna con adyuvante de alumbre estándar administrada dos veces para mejorar su actividad. Este incremento promedio de 19,4 veces en el título se observó con una inmunización de la composición descrita.

30

35

Las composiciones de vacuna que contienen polil:C, liposomas y un vehículo hidrófobo tienen el potencial de generar respuestas de anticuerpos y/o respuestas celulares contra una amplia gama de antígenos. Los ejemplos 1 a

6 y los ejemplos 8 y 9 demuestran la capacidad de producir una respuesta de anticuerpos significativamente mayor cuando se combinan todos los componentes de la composición contra una proteína recombinante (rHA) o un péptido corto (β -amiloides). Estos títulos de anticuerpos sorprendentemente altos no se observaron sin el uso de un Polinucleótido polil:C específicamente en la composición de vacuna (ejemplos 1, 4 y 9), ni se observaron en ausencia de liposomas y un vehículo hidrófobo a pesar del uso de polil:C solo con un antígeno (ejemplos 2 y 5). Del mismo modo, la combinación de todos los componentes de la composición generó una respuesta inmunitaria celular significativamente más eficaz y más duradera como se ilustra en el ejemplo 7 y los ejemplos 11 a 13 contra una proteína recombinante o un péptido corto que contiene un epítipo CTL conocido. Se detectaron respuestas inmunitarias significativas específicas de antígeno al inmunizar con la composición por al menos dos rutas de inmunización (ejemplo 7). La eficacia inusual en el control del crecimiento del tumor con la invención descrita no se observó sin el uso de un polinucleótido polil:C específicamente en la composición (ejemplo 12) y no se observaron sin el uso de liposomas y a pesar del uso de un polinucleótido polil:C y un vehículo hidrófobo con el antígeno (ejemplo 11). La capacidad para producir respuestas humorales y celulares duraderas y sólidas simultáneamente con al menos una inmunización usando todos los componentes de la composición descrita (ejemplos 6, 7, 10 y 13) ilustra la utilidad particular de la composición en una amplia gama de aplicaciones médicas, incluyendo enfermedades infecciosas y cánceres.

Está claro a partir de la colección de ejemplos descritos en el presente documento que las composiciones de vacunas que consisten en un antígeno, liposomas, un vehículo hidrófobo y polinucleótidos ribo o desoxirribonucleótidos que contienen residuos de inosina y citosina en más de una configuración química son capaces de inducir respuestas inmunitarias inusualmente fuertes. Los ejemplos también describen más de un método para preparar la composición deseada.

Antígeno

Las composiciones de la invención comprenden uno o más antígenos según se definen en las reivindicaciones. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a una sustancia que puede unirse específicamente a un anticuerpo o a un receptor de células T.

Antígenos útiles en las composiciones de la invención incluyen, sin limitación, polipéptidos, un microorganismo o una parte del mismo, tales como bacterias, virus o protozoos, o parte de los mismos, vivos, atenuados, inactivados o muertos.

Los polipéptidos o fragmentos de los mismos que pueden ser útiles como antígenos en la invención incluyen, sin limitación, los derivados del toxoide del cólera, toxoide tetánico, toxoide de la difteria, antígeno de superficie de la hepatitis B, la hemaglutinina, neuraminidasa, proteína M de la gripe, PflHRP2, pLDH, aldolasa, MSP1, MSP2, AMA1, Der-p-1, Der-f-1, adipofilina, AFP, AIM-2, ART-4, BAGE, α -fetoproteína, BCL-2, Bcr-Abl, BING-4, CEA, CPSF, CT, ciclina DI Ep-CAM, EphA2, EphA3, ELF-2, FGF-5, G250, hormona liberadora de gonadotropina, HER-2, carboxilesterasa intestinal (ICE), IL13R α 2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE 3, MART-1, MART-2, M-CSF, MDM-2, MMP-2, MUC-1, Nueva York-EOS-1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, p53, PBF, PRAME, PSA, PSMA, RAGE-1, RNF43, RU1, RU2AS, SART-1, SART-2, SART-3, SAGE-1, SCRIN 1, Sox2, SOX10, STEAP1, survivina, telomerasa, TGF β R11, TRAG-3, PRT -1, TRP-2, TERT y WT1.

Los virus, o partes de los mismos, útiles como antígenos en la invención incluyen, sin limitación, Cowpoxvirus, virus vacunal, virus pseudoviruela, herpesvirus humano 1, herpesvirus humano 2, citomegalovirus, adenovirus humano A-F, poliomavirus, virus del papiloma humano, parvovirus, virus de Hepatitis A, Virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana, ortoreovirus, rotavirus, virus Ébola, virus de la parainfluenza, virus de la gripe A, virus de la gripe B, virus de la gripe C, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la rubéola, pneumovirus, virus sincitial respiratorio humano, virus de la rabia, virus de la encefalitis de California, virus de la encefalitis japonesa, virus Hantaan, virus de la coriomeningitis linfocítica, coronavirus, enterovirus, rinovirus, virus de la polio, norovirus, flavivirus, virus del dengue, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre amarilla y varicela.

Las bacterias o partes de los mismos útiles como antígenos en la invención incluyen, sin limitación, Ántrax, Brucella, Candida, Chlamydia pneumoniae, Chlamydia psittaci, cólera, Clostridium botulinum, Coccidioides immitis, Cryptococcus, Difteria, Escherichia coli 0157: H7, Escherichia coli enterohemorrágica, Escherichia coli enterotoxigénica, Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, Legionella, Leptospira, Listeria, Meningococcus, Mycoplasma pneumoniae, Mycobacterium, Pertussis, Pneumonia, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Streptococcus pneumoniae y Yersinia enterocolitica.

El antígeno puede ser alternativamente de origen protozoario, por ejemplo, Plasmodium falciparum, que causa malaria.

El término "polipéptido" abarca cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud (por ejemplo, al menos 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ácidos, o 20 aminoácidos) o modificación postraduccional (por ejemplo, glicosilación o fosforilación) e incluye, por ejemplo, proteínas naturales, polipéptidos sintéticos o recombinantes y péptidos, polipéptidos y péptidos desnaturalizados, epítopos, moléculas híbridas, variantes, homólogos, análogos, peptoides,

peptidomiméticos, etc. Una variante o derivados, por lo tanto, incluye deleciones, incluyendo truncamientos y fragmentos; inserciones y adiciones, por ejemplo sustituciones conservadoras, mutantes dirigidos al sitio y variantes alélicas; y modificaciones, incluyendo peptoides que tienen uno o más grupos acilo no-amino (por ejemplo, azúcar, lípido, etc.) unidos covalentemente al péptido y modificaciones postraduccionales. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "conserva sustituciones de aminoácidos" o "sustituciones conservadoras" se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro en una ubicación dada en el péptido, en el que la sustitución puede realizarse sin pérdida sustancial de la función correspondiente. Al hacer tales cambios, las sustituciones de residuos de aminoácidos similares puede realizarse en base a la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral, por ejemplo, su tamaño, carga, hidrofobicidad, hidrofiliidad y similares y tales sustituciones pueden analizarse para determinar su efecto sobre la función del péptido mediante pruebas de rutina. Ejemplos específicos no limitantes de una sustitución conservadora incluyen los siguientes ejemplos:

Residuo original	Sustituciones conservadoras
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

Se pueden usar polipéptidos o péptidos que tengan una identidad sustancial con una secuencia de antígeno preferida. Dos secuencias se considera que tienen una identidad sustancial si, cuando se alinean óptimamente (con huecos permitidos), comparten al menos aproximadamente un 50% de identidad de secuencia, o si las secuencias comparten motivos funcionales definidos. En realizaciones alternativas, secuencias óptimamente alineadas pueden considerarse sustancialmente idénticas (es decir, que tienen una identidad sustancial) si comparten al menos 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad sobre una región determinada. El término "identidad" se refiere a la similitud de secuencia entre dos moléculas de polipéptidos. La identidad puede determinarse comparando cada posición en las secuencias alineadas. Un grado de identidad entre las secuencias de aminoácidos es una función del número de aminoácidos idénticos o coincidentes en las posiciones compartidas por las secuencias, por ejemplo, sobre una región especificada. El alineamiento óptimo de secuencias para las comparaciones de identidad puede llevarse a cabo utilizando varios algoritmos, como son conocidos en la técnica, incluyendo el programa ClustalW, disponible en <http://clustalw.genome.ad.jp>, el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math 2: 482, el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443, el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: 2444 y las implementaciones computarizadas de estos algoritmos (tales como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Madison, WI, EE.UU.). La identidad de secuencia también puede determinarse utilizando el algoritmo BLAST, descrito en Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-10 (utilizando la configuración por defecto publicada). Por ejemplo, se puede usar la herramienta "Secuencias BLAST 2", disponible en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (a través de Internet en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/bl2sea/wblast2.cgi>) se puede utilizar, seleccionando el programa "blastp" en los siguientes parámetros por defecto: umbral previsto 10, tamaño de la palabra 3; matriz BLOSUM 62; existencia de costes por hueco 11, extensión 1. En otra realización, la persona experta en la técnica puede alinear fácil y

adecuadamente cualquier secuencia dada y deducir la identidad de secuencia y/o la homología mediante mera inspección visual.

5 Los polipéptidos y péptidos utilizados para practicar la invención se pueden aislar de fuentes naturales, ser sintéticos, o ser polipéptidos recombinantes generados. Los péptidos y proteínas se pueden expresar de forma recombinante in vitro o in vivo. Los péptidos y polipéptidos utilizados para practicar la invención se pueden fabricar y aislar usando cualquier método conocido en la técnica. Los polipéptidos y péptidos utilizados para practicar la invención también se pueden sintetizar, todos o en parte, utilizando métodos químicos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Caruthers (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215-223; Hom (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225-232; Banga, A. K, Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, Pa. Por ejemplo, la síntesis de péptidos puede realizarse utilizando diversas técnicas en fase sólida (véase, por ejemplo, Roberge (1995) Science 269: 202; Merrifield (1997) Methods Enzymol 289: 2893 [-13]) y la síntesis automática se puede conseguir, por ejemplo, usando el Sintetizador Peptídico ABI 431A (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

15 En algunas realizaciones, el antígeno puede ser un antígeno purificado, por ejemplo, de aproximadamente 25% a 50% de pureza, de aproximadamente 50% a aproximadamente 75% de pureza, de aproximadamente 75% a aproximadamente 85% de pureza, de aproximadamente 85% a aproximadamente 90 % de pureza, de aproximadamente 90% a aproximadamente 95% de pureza, de aproximadamente 95% a aproximadamente 98% de pureza, de aproximadamente 98% a aproximadamente 99% de pureza, o más del 99% de pureza.

25 Como se señaló anteriormente, el término "antígeno" también incluye un polinucleótido que codifica el polipéptido que funciona como un antígeno. Se conocen las estrategias de vacunación basadas en ácidos nucleicos, en las que una composición de vacuna que contiene un polinucleótido se administra a un sujeto. El polipéptido antigénico codificado por el polinucleótido se expresa en el sujeto, de tal manera que el polipéptido antigénico está en última instancia presente en el sujeto, tal como si la propia composición de la vacuna contuviera el polipéptido. Para los fines de la presente invención, el término "antígeno", donde dicta el contexto, abarca los polinucleótidos que codifican el polipéptido que funciona como el antígeno.

30 Tal como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones, el término "polinucleótido" abarca una cadena de nucleótidos de cualquier longitud (por ejemplo, 9, 12, 18, 24, 30, 60, 150, 300, 600, 1500 o más nucleótidos) o el número de hebras (por ejemplo, de una sola hebra o de doble hebra). Los polinucleótidos pueden ser ADN (por ejemplo, ADN genómico o ADNc) o ARN (por ejemplo ARNm) o combinaciones de los mismos. Pueden ser de origen natural o sintético (por ejemplo, sintetizados químicamente). Se contempla que el polinucleótido puede contener modificaciones de una o más bases nitrogenadas, azúcares de pentosa o grupos fosfato en la cadena de nucleótidos. Tales modificaciones son bien conocidas en la técnica y pueden ser con el propósito de, por ejemplo, mejorar la estabilidad del polinucleótido.

40 El polinucleótido puede administrarse de diversas formas. En algunas realizaciones, se puede usar un polinucleótido desnudo, ya sea en forma lineal, o insertado en un plásmido, tal como un plásmido de expresión. En otras realizaciones, se puede usar un vector vivo tal como un vector viral o bacteriano.

45 Puede haber una o más secuencias reguladoras que ayudan en la transcripción del ADN en ARN y/o la traducción del ARN en un polipéptido. En algunos casos, como en el caso de un polinucleótido que es una molécula de ARN mensajero (ARNm), no se necesitan secuencias reguladoras en relación con el proceso de transcripción (por ejemplo, un promotor) y la expresión de proteínas se puede efectuar en ausencia de un promotor. El experto en la materia puede incluir secuencias reguladoras adecuadas según lo requieran las circunstancias.

50 En algunas realizaciones, el polinucleótido está presente en un casete de expresión, en el que está unido operativamente a secuencias reguladoras que permitan la expresión del polinucleótido en el sujeto al que se administra la composición de la invención. La elección del casete de expresión depende del sujeto al que se administra la composición, así como las características deseadas para el polipéptido expresado.

55 Típicamente, un casete de expresión incluye un promotor que es funcional en el sujeto y puede ser constitutivo o inducible; un sitio de unión a ribosoma; un codón de inicio (ATG) si es necesario; el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés; un codón de terminación; y opcionalmente una región 3 'terminal (terminador de la traducción y/o de la transcripción). Se pueden incluir secuencias adicionales, tales como una región que codifica un péptido señal. El polinucleótido que codifica el polipéptido de interés puede ser homóloga o heteróloga con respecto a cualquiera de las otras secuencias reguladoras en el casete de expresión. Las secuencias que se van a expresar junto con el polipéptido de interés, tal como una región de codificación de péptido señal, se encuentran normalmente adyacentes al polinucleótido que codifica la proteína que se va a expresar y colocadas en el marco de lectura apropiado. El marco de lectura abierto constituido por el polinucleótido que codifica la proteína que se va a expresar exclusivamente o junto con cualquier otra secuencia que se va a expresar (por ejemplo, el péptido señal), se coloca sometido al control del promotor de modo que se producen la transcripción y la traducción en el sujeto al que se administra la composición.

En una realización relacionada, el antígeno puede ser un alérgeno y puede derivar de, sin limitación, células, extractos celulares, proteínas, polipéptidos, péptidos, polisacáridos, conjugados de polisacáridos, miméticos peptídicos y no peptídicos de polisacáridos y otras moléculas, moléculas pequeñas, lípidos, glucolípidos e hidratos de carbono de las plantas, animales, hongos, insectos, alimentos, medicamentos, polvo y ácaros. Los alérgenos incluyen, entre otros, aeroalérgenos ambientales; pólenes de plantas (por ejemplo, ambrosía/fiebre del heno); alérgenos de polen de malezas; alérgenos de polen de pasto; hierba Johnson; alérgenos de polen de árboles; centeno; alérgenos de arácnidos (por ejemplo, alérgenos de ácaros del polvo doméstico); alérgenos de ácaros de almacenamiento; polen de cedro japonés/ fiebre del heno; alérgenos de esporas de mohos/hongos; alérgenos de animales (por ejemplo, perro, cobaya, hámster, jerbo, rata, ratón, etc., alérgenos); alérgenos alimentarios (por ejemplo, crustáceos, nueces, frutas cítricas; harina, café); alérgenos de insectos (por ejemplo, pulgas, cucarachas); venenos: (himenópteros, chaqueta amarilla, miel de abeja, avispa, avispón, hormiga de fuego); alérgenos bacterianos (por ejemplo, antígenos de estreptococos; alérgenos de parásitos tales como antígeno de Ascaris); antígenos virales; alérgenos de fármacos (por ejemplo, penicilina); hormonas (por ejemplo, insulina); enzimas (por ejemplo, estreptocinasa); y fármacos o sustancias químicas capaces de actuar como antígenos incompletos o haptenos (por ejemplo, anhídridos de ácidos e isocianatos).

Polinucleótidos Polil:C

Los polinucleótidos polil:C son moléculas polinucleotídicas de doble cadena (ARN o ADN o una combinación de ADN y ARN) que contienen residuos de ácido inosínico (I) y residuos de ácido citidílico (C) y que inducen la producción de citocinas inflamatorias, tales como interferón. Por lo general se componen de una hebra que consiste en su totalidad en nucleótidos que contienen citosina y una hebra que consiste en su totalidad en nucleótidos que contienen inosina, aunque son posibles otras configuraciones. Por ejemplo, cada hebra puede contener nucleótidos que contienen citosina y nucleótidos que contienen inosina. En algunos casos, una o ambas hebras pueden contener adicionalmente uno o más nucleótidos no-citosina o no inosina.

Se ha informado de que Polil:C puede segmentarse cada 16 residuos sin un efecto sobre su potencial de activación de interferón (Bobst, 1981). Además, el potencial de inducción de interferón de una molécula de Polil:C emparejada erróneamente introduciendo un residuo de uridina cada 12 residuos repetidos de ácido citidílico (Hendrix, 1993) sugiere que una molécula de polil:C bicatenaria mínima de 12 residuos es suficiente para estimular la producción de interferón. Otros también han sugerido que regiones tan pequeñas como de 6-12 residuos, que corresponden a 0,5-1 vueltas helicoidales del polinucleótido de cadena doble, son capaces de desencadenar el proceso de inducción (Greene, 1978). Si están fabricados de forma sintética, los polinucleótidos polil:C tienen típicamente alrededor de 20 o más residuos de longitud (habitualmente 22, 24, 26, 28 o 30 residuos de longitud). Si están fabricados de forma semisintética (por ejemplo, utilizando una enzima), la longitud de la cadena puede ser 500, 1000 o más residuos.

Polil:C actúan como miméticos de los genomas virales y son particularmente útiles para la modulación del sistema inmunológico in vivo. Se ha notificado que los homopolímeros de poli I:poli C, sintéticos, por ejemplo, potencian la inmunidad innata mediante la inducción de interferón gamma de forma no específica cuando se administra sistémicamente in vivo mediante inyección intravenosa o intramuscular (Krown 1985, Zhu 2007). Varias variantes de polímeros de ácido poli inosínico y citidílico se han descrito en los últimos años (de Clercq 1978, Bobst 1981, De Clercq 1975, Guschlbauer 1977, Fukui 1977, Johnston 1975, US3906092 1971, Kamath 2008, Ichinohe 2007), algunas de las que incluyeron el uso de residuos modificados covalentemente, el uso de residuos ribo y desoxiribo inosínico y citidílico, el uso de homopolímeros y copolímeros alternantes que contienen residuos de ácido inosínico y citidílico y la introducción de residuos específicos para crear polímeros no coincidentes.

Se ha comunicado el uso de polinucleótidos de doble cadena que contienen ácidos inosínico y citidílico para el tratamiento de una serie de enfermedades virales (Kende 1987, Poast 2002, 2002 6468558, Sarma 1969, Stephen 1977, Levy 1978), cáncer (Durie 1985, Salazar 1996, Theriault 1986, Nakamura 1982, Talmadge 1985, Droller 1987), enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (Bever 1986) y otras enfermedades infecciosas, como la malaria (Awasthi 1997, Puri 1996). La eficacia de las moléculas de polil:C ha mejorado aún más en algunos casos mediante la formación de complejos de la molécula poli-lisina y carboximetil-celulosa con carga positiva, de modo que protege eficazmente el polinucleótido de la degradación de nucleasa in vivo (Stephen 1977, Levy 1985), o por la formación de complejos de Polil:C con péptidos sintéticos de carga positiva (Schellack 2006).

Además de sus usos como un potenciador no específico de la inmunidad innata, Polil:C también es útil como adyuvante en composiciones de vacuna. La mejora de la inmunidad innata puede llevar a una inmunidad adaptativa específica de antígeno mejorada, posiblemente a través de un mecanismo que implica, al menos en parte, células NK, macrófagos y/o células dendríticas (Chirigos 1985, Salem 2006, Alexopoulou 2001, Trumpfheller 2008). La evidencia del uso de moléculas de polil:C en este contexto se origina en varios estudios de vacunas para el control de enfermedades infecciosas (Houston 1976, Stephen 1977, Ichinohe 2007, Sloat 2008, 2006 Agger, Padalko 2004) y la prevención o tratamiento del cáncer por una variedad de modalidades de vacunas (Zhu 2007, Cui 2006, Salem 2005, Fujimura 2006, Llopiz 2008). Estos estudios demuestran que Polil:C aumenta las respuestas humorales como se desprende de las respuestas de anticuerpos mejoradas contra antígenos específicos de enfermedades infecciosas. Polil:C es también un potenciador de respuestas celulares específicas de antígeno (Zhu 2007, Zaks 2006, Cui 2006, Riedl 2008). Se cree que los efectos adyuvantes de las moléculas de polil:C se producen, al menos

parcialmente, mediante la inducción de interferón-gamma a través de su interacción con los receptores tipo Toll (TLR), tales como TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 y TLR9 (Alexopoulou 2001, Trumfheller 2008, 2006 Schellack , Riedl 2008), siendo TLR3 particularmente relevante para la mayoría de las moléculas de polil:C. Las evidencias también sugieren que las moléculas de polil:C pueden ejercer su efecto, al menos en parte, mediante la interacción con otros
 5 receptores distintos de TLR, tales como la proteína I inducida por la ARN helicasa de ácido retinoico inducida I (RIG-I)/gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma (MDA5) (Alexopoulou 2001, Yoneyama 2004, Gowen 2007, Dong 2008). El mecanismo de acción de las moléculas de polil:C todavía no se conocen del todo.

Por consiguiente, como se utiliza en el presente documento, un "Polil:C" o "Polinucleótido polil:C" es una molécula
 10 de polinucleótido de doble cadena (ARN o ADN o una combinación de ADN y ARN), cada hebra de las cuales contiene al menos 6 residuos de ácido inosínico o citidílico contiguos, o 6 restos contiguos seleccionados de ácido inosínico y ácido citidílico en cualquier orden (por ejemplo IICIIC o ICICIC) y que es capaz de inducir o potenciar la producción de al menos una citocina inflamatoria, tal como interferón, en un sujeto mamífero. Los polinucleótidos polil:C tendrán típicamente una longitud de aproximadamente 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 25, 28, 30, 35, 40, 45,
 15 50, 55, 60, 65, 70 , 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 1000 o más residuos. No se cree que el límite superior sea esencial. Los polinucleótidos polil:C pueden tener una longitud mínima de alrededor de 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, o 30 nucleótidos y una longitud máxima de aproximadamente 1000, 500, 300 , 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45 o 40 nucleótidos.

Cada hebra de un polinucleótido polil:C puede ser un homopolímero de residuos de ácido inosínico o citidílico, o
 20 cada hebra puede ser un heteropolímero que contiene ambos residuos de ácido inosínico y citidílico. En cualquier caso, el polímero puede estar interrumpido por uno o más residuos de ácido no-inosínico o no citidílico (por ejemplo, uridina), siempre que haya al menos una región contigua de residuos 6 I, 6 C o 6 I/C como se ha descrito anteriormente. Típicamente, cada cadena de un Polinucleótido polil:C contendrá no más de 1 residuo no I/C por 6
 25 residuos I/C, más preferiblemente, no más de 1 residuo no I/C cada 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 o 30 residuos I/C.

Los residuos del ácido inosínico o ácido citidílico (u otros) en el polinucleótido polil:C pueden derivarse o modificarse
 30 tal como se conoce en la técnica, siempre que la capacidad de la Polinucleótido polil:C para promover la producción de una citocina inflamatoria, como el interferón, se retenga. Ejemplos no limitantes de derivados o modificaciones no incluyen, por ejemplo, modificaciones azido, modificaciones flúor, o el uso de enlaces tioéster (o similar) en lugar de enlaces fosfodiéster naturales para aumentar la estabilidad in vivo. El Polinucleótido polil:C también puede modificarse para, por ejemplo, mejorar su resistencia a la degradación in vivo, por ejemplo, mediante formación de
 35 complejos de la molécula con poli-lisina y carboximetilcelulosa carga positiva o con un péptido sintético cargado positivamente.

El Polinucleótido polil:C típicamente se incluirá en las composiciones de la invención en una cantidad de
 aproximadamente 0,001 mg a 1 mg por dosis unitaria de la composición.

40 Liposomas

Los liposomas son membranas de bicapa lipídica completamente cerradas que contienen un volumen acuoso
 45 atrapado. Los liposomas pueden ser vesículas unilamelares (que poseen una única membrana bicapa) o vesículas multilamelares caracterizadas por bicapas multimembrana, cada bicapa puede o no estar separada de la siguiente por una capa acuosa. Una discusión general de los liposomas se puede encontrar en G. Gregoriadis Immunol. Hoy en día, 11: 89-97, 1990; y Frézard, F., Braz. J. Med. Bio. Res., 32: 181-189, 1999. Como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones, el término "liposomas" pretende abarcar todas estas estructuras vesiculares como se ha descrito anteriormente, incluyendo, sin limitación, los descritos en la técnica como "niosomas" ,
 50 "transfersomas" y "virosomas".

Aunque en la presente invención se puede usar cualquier liposoma, incluyendo los liposomas preparados a partir de
 lípidos de arqueobacterias, liposomas particularmente útiles utilizan fosfolípidos y colesterol no esterificado en la formulación de liposomas. El colesterol se usa para estabilizar los liposomas y cualquier otro compuesto que
 55 estabiliza los liposomas puede sustituir al colesterol. Otros compuestos estabilizantes de liposomas son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, fosfolípidos saturados producen liposomas con temperaturas de transición más altas, lo que indica una mayor estabilidad.

Los fosfolípidos que se utilizan preferiblemente en la preparación de liposomas son los que tienen al menos un grupo
 60 de cabeza seleccionado de entre el grupo que consiste en fosfoglicerol, fosfoetanolamina, fosfoserina, fosfocolina y fosfoinositol. Más preferidos son los liposomas que comprenden lípidos que son en un 94-100% fosfatidilcolina. Tales lípidos están disponibles comercialmente en la lecitina Phospholipon® 90 G. Cuando también se utiliza colesterol no esterificado en la formulación de liposoma, el colesterol se utiliza en una cantidad equivalente a aproximadamente el 10% de la cantidad de fosfolípido. Si un compuesto distinto que el colesterol se utiliza para estabilizar los liposomas, un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad necesaria en la composición.

Las composiciones de liposomas se pueden obtener, por ejemplo, mediante el uso de lípidos naturales, lípidos

sintéticos, esfingolípidos, lípidos, esteroides, éter cardiolipina, lípidos catiónicos y lípidos modificados con poli (etilen glicol) y otros polímeros. Los lípidos sintéticos pueden incluir los siguientes componentes de ácido graso; lauroilo, miristoilo, palmitoilo, estearoilo, araquidoilo, oleoilo, linoleoilo, erucoilo, o combinaciones de estos ácidos grasos.

5 Vehículos

El vehículo de la composición comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba, preferiblemente una sustancia hidrófoba líquida. La fase continua puede ser una sustancia hidrófoba esencialmente puro o una mezcla de sustancias hidrófobas. Además, el vehículo puede ser una emulsión de agua en una sustancia hidrófoba o una emulsión de agua en una mezcla de sustancias hidrófobas, siempre que la sustancia hidrófoba constituye la fase continua. Además, en otra realización, el vehículo puede funcionar como un adyuvante.

Las sustancias hidrófobas que son útiles en las composiciones como se describe en el presente documento son aquellas que son farmacéuticamente y/o inmunológicamente aceptables. El vehículo es preferiblemente un líquido pero ciertas sustancias hidrófobas que no son líquidos a temperatura atmosférica se puede licuar, por ejemplo por calentamiento y también son útiles en esta invención. En una realización, el vehículo hidrófobo puede ser una emulsión de solución salina tamponada con fosfato/adyuvante incompleto de Freund (PBS/FIA).

El aceite o las emulsiones de agua en aceite son vehículos particularmente adecuados para uso en la presente invención. Los aceites deben ser farmacéuticamente y/o inmunológicamente aceptables- Aceites adecuados incluyen, por ejemplo, aceites minerales (especialmente aceite mineral de viscosidad ligera o baja tal como Drakeol® 6VR), aceites vegetales (por ejemplo, aceite de soja), aceites de frutos secos (por ejemplo, aceite de cacahuete), o mezclas de los mismos. En una realización, el aceite es un oleato de manida en solución de aceite mineral, disponible comercialmente como Montanide® ISA 51. También se pueden usar grasas animales y materiales poliméricos hidrófobos artificiales, en particular los que son líquidos a temperatura atmosférica o que se pueden licuar de manera relativamente fácil.

Otros componentes

La composición puede comprender además uno o más adyuvantes, excipientes, farmacéuticamente aceptables etc., como se conocen en la técnica: Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1985) y La Farmacopea de Estados Unidos: Formulario Nacional (USP 24 NF19) publicado en 1999.

El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que potencia la respuesta inmunitaria a un antígeno. Un adyuvante puede servir como depósito tisular que libera lentamente el antígeno y también, como activador del sistema linfóide que potencia inespecíficamente la respuesta inmunitaria (Hood y col., Immunology, Segunda Ed. Benjamin/Cummings: Menlo Park, C.A., 1984; véase Wood y Williams, En: Nicholson, Webster and May (eds.), Textbook of Influenza, Capítulo 23, pág. 317-323). A menudo, una exposición primaria con un antígeno solo, en ausencia de un adyuvante, no producirá una respuesta inmunitaria humoral.

Adyuvantes adecuados incluyen, entre otros, alumbre, otros compuestos de aluminio, bacilo de Calmette y Guerin (BCG), TiterMax®, Ribic®, adyuvante incompleto de Freund (IFA), saponina, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, Corynebacterium parvum, QS-21, adyuvante completo de Freund (FCA), adyuvantes de la familia agonista de TLR tales como CpG, flagelina, lipopéptidos, peptidoglicanos, imidazoquinolinas, ARN monocatenario, lipopolisacáridos (LPS), proteínas de choque térmico (HSP) y ceramidas y derivados tales como alfa Gal-Cer. Adyuvantes adecuados también incluyen citocinas o quimiocinas en sus formas de codificación de polipéptido o de ADN tales como, entre otros, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-15, IL-21. Un adyuvante de alumbre adecuado se comercializa con el nombre comercial Imject Alum® (Pierce, Rockford, IL), que consiste en una solución acuosa de hidróxido de aluminio (45 mg/ml) e hidróxido de magnesio (40 mg/ml) más estabilizadores inactivos.

La cantidad de adyuvante utilizado depende de la cantidad de antígeno y del tipo de adyuvante. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de adyuvante necesaria en una aplicación particular.

Una respuesta inmunitaria provocada en los sujetos a los que se ha administrado una composición de la invención puede formularse para desviar la respuesta inmunitaria hacia un anticuerpo o una respuesta inmunitaria mediada por células. Esto se puede lograr mediante el uso de agentes, tales como adyuvantes, que inducen predominantemente una respuesta Th1 o Th2. Por ejemplo, puede usarse un oligonucleótido que contiene CpG-(en los que el dinucleótido CpG está no metilado) para inducir una respuesta predominantemente Th1, favoreciendo así una respuesta mediada por células.

Composiciones

Los métodos para preparar liposomas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo Gregoriadis (1990) y Frézard (1999), ambos citados anteriormente. Cualquier método adecuado para la fabricación de liposomas se

puede utilizar en la práctica de la invención, o los liposomas se pueden obtener de una fuente comercial. Los liposomas se preparan típicamente mediante la hidratación de los componentes de liposomas que formarán la bicapa lipídica (por ejemplo, fosfolípidos y colesterol) con una solución acuosa, que puede ser agua pura o una solución de uno o más componentes disueltos en agua, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina sin fosfato, o cualquier otra solución acuosa fisiológicamente compatible.

En una realización, un componente de liposoma o de la mezcla de los componentes de liposomas, tales como un fosfolípido (por ejemplo Phospholipon® 90G) y el colesterol, se puede solubilizar en un disolvente orgánico, tal como una mezcla de cloroformo y metanol, seguido de filtración (por ejemplo, un filtro de PTFE 0,2 micrómetros) y secado, por ejemplo, por evaporación rotatoria, para eliminar los disolventes.

La hidratación de la mezcla de lípidos resultante se puede efectuar mediante, por ejemplo, la inyección de la mezcla de lípidos en una solución acuosa o sonicación de la mezcla de lípidos y una solución acuosa. Durante la formación de los liposomas, los componentes de los liposomas forman bicapas individuales (unilamelares) o múltiples bicapas (multilamelares) que rodean un volumen de la solución acuosa con la que se hidratan los componentes de liposomas.

En algunas realizaciones, los liposomas se deshidrataron después, tal como mediante secado por congelación o liofilización.

Los liposomas se combinan con el vehículo que comprende una fase hidrófoba continua. Esto se puede realizar de varios modos:

Si el vehículo se compone únicamente de una sustancia hidrófoba o una mezcla de sustancias hidrófobas (por ejemplo, uso de un vehículo de aceite mineral al 100%), los liposomas pueden simplemente mezclarse con la sustancia hidrófoba, o si hay múltiples sustancias hidrófobas, mezclarse con una cualquiera o una combinación de ellas.

Si por el contrario el vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba contiene una fase acuosa discontinua, el vehículo adoptará típicamente la forma de una emulsión de la fase acuosa en la fase hidrófoba, tal como una emulsión de agua en aceite. Tales composiciones pueden contener un emulsionante para estabilizar la emulsión y para promover una distribución uniforme de los liposomas. En este sentido, los emulsionantes pueden ser útiles incluso si se usa un vehículo exento de agua, con el fin de promover una distribución uniforme de los liposomas en el vehículo. Los emulsionantes típicos incluyen oleato de manida (Arlacel™ A), lecitina, Tween™ 80 y Spans™ 20, 80, 83 y 85. Típicamente, la relación en volumen (v/v) de la sustancia hidrófoba y el emulsionante está en el intervalo de aproximadamente 5 : 1 a aproximadamente 15: 1, prefiriéndose la proporción de aproximadamente 10: 1.

Los liposomas pueden ser añadidos a la emulsión acabada, o pueden estar presentes ya sea en la fase acuosa o en la fase hidrófoba antes de la emulsión.

El antígeno se puede introducir en varias etapas diferentes del proceso de formulación. Más de un tipo de antígeno se puede incorporar en la composición (por ejemplo, un virus inactivado, un virus vivo atenuado, proteína o polipéptido).

En algunas realizaciones, el antígeno está presente en la solución acuosa utilizada para hidratar los componentes que se utilizan para formar las bicapas lipídicas de los liposomas (por ejemplo fosfolípido (s) y colesterol). En este caso, el antígeno será encapsulado en el liposoma, presente en su interior acuoso. Si los liposomas resultantes no se lavan o se secan, tal que hay una solución acuosa residual presente que, en última instancia, se mezcla con el vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba, es posible que el antígeno adicional puede estar presente fuera de los liposomas en el producto final. En una técnica relacionada, el antígeno se puede mezclar con los componentes usados para formar las bicapas lipídicas de los liposomas, antes de la hidratación con la solución acuosa.

En un enfoque alternativo, en su lugar, el antígeno puede mezclarse con el vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba, antes, durante, o después de que el vehículo se combina con los liposomas. Si el vehículo es una emulsión, el antígeno se puede mezclar con cualquiera o ambas de la fase acuosa o fase hidrófoba antes de la emulsión. Alternativamente, el antígeno puede mezclarse con el vehículo después de la emulsificación.

La técnica de combinar el antígeno con el vehículo puede usarse junto con la encapsulación del antígeno en los liposomas como se ha descrito anteriormente, de tal manera que el antígeno está presente tanto dentro de los liposomas como en el vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba.

Los procedimientos descritos anteriormente para la introducción del antígeno en la composición se aplican también a polil:C. Es decir, el polil:C puede introducirse en, por ejemplo, uno cualquiera o más de: (1) la solución acuosa

utilizada para hidratar los componentes que se utilizan para formar las bicapas lipídicas de los liposomas; (2) los componentes usados para formar las bicapas lipídicas de los liposomas; o (3) el vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba, antes, durante, o después de que el vehículo se combine con los liposomas. Si el vehículo es una emulsión, el polil:C se puede mezclar con cualquiera o ambas de la fase acuosa o fase hidrófoba antes de la emulsión. Alternativamente, el polil:C puede mezclarse con el vehículo después de la emulsificación.

La técnica de combinar el polil:C con el vehículo puede usarse junto con la encapsulación del polil:C en los liposomas, de tal manera que el polil:C está presente tanto dentro de los liposomas como en el vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba.

El Polil:C se puede incorporar en la composición junto con el antígeno en la misma etapa de procesamiento, o por separado, en una etapa de procesamiento diferente. Por ejemplo, el antígeno y el polil:C pueden estar presentes ambos en la solución acuosa utilizada para hidratar los componentes de liposomas de lípidos formadores de bicapa, de manera que tanto el antígeno como Polil:C quedan encapsulados en los liposomas. Alternativamente, el antígeno puede estar encapsulado en los liposomas y los Polil:C mezclados con el vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba. Se apreciará que muchas de tales combinaciones son posibles.

Si la composición contiene uno o más adyuvantes, el adyuvante se puede incorporar en la composición junto con el antígeno en la misma etapa de procesamiento, o por separado, en una etapa de procesamiento diferente. Por ejemplo, el antígeno y el adyuvante pueden estar presentes ambos en la solución acuosa utilizada para hidratar los componentes de liposomas de lípidos formadores de bicapa, de manera que tanto el antígeno como el adyuvante quedan encapsulados en los liposomas. Alternativamente, el antígeno puede estar encapsulado en los liposomas y el adyuvante mezclado con el vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba. Se

Los estabilizantes tales como azúcares, antioxidantes, conservantes que mantienen la actividad biológica o mejoran la estabilidad química para prolongar la vida útil del antígeno, el adyuvante, los liposomas o el vehículo hidrófobo continuo, se pueden añadir a estas composiciones.

En algunas realizaciones, se puede usar una mezcla de antígeno/polil:C, en cuyo caso el antígeno y el polinucleótido polil:C se incorporan en la composición al mismo tiempo. Una "mezcla de antígeno/polil:C" se refiere a una forma de realización en la que el antígeno y el polinucleótido polil:C están en el mismo diluyente al menos antes de la incorporación en la composición. El antígeno y el polinucleótido polil:C en una mezcla de antígeno/Polil:C pueden, aunque no necesariamente, estar químicamente unidos, tal como mediante unión covalente.

De un modo similar, en algunas realizaciones, se puede usar una mezcla de antígeno/adyuvante, en cuyo caso el antígeno y el adyuvante se incorporan en la composición al mismo tiempo. Una "mezcla de antígeno/adyuvante" se refiere a una forma de realización en la que el antígeno y el adyuvante están en el mismo diluyente al menos antes de la incorporación en la composición. El antígeno y el adyuvante en una mezcla de antígeno/adyuvante pueden, aunque no necesariamente, estar químicamente unidos, tal como mediante unión covalente.

En algunas realizaciones, el vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba puede por sí mismo tener actividad adyuvante. El adyuvante incompleto de Freund, es un ejemplo de un vehículo hidrófobo con efecto adyuvante. Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, cuando se utiliza el término "adyuvante", se pretende indicar la presencia de un adyuvante además de cualquier actividad adyuvante proporcionada por el vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba.

Las composiciones como se describen en el presente documento se pueden formular en una forma tal que es adecuada para administración oral, nasal, rectal o parenteral. La administración parenteral incluye los modos de administración intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intramuscular, transepitelial, intrapulmonar, intratecal y tópica. Las vías preferidas incluyen la administración intramuscular, subcutánea e intradérmica para lograr un efecto de depósito. En realizaciones en las que la composición de la invención es para el tratamiento de los tumores cancerosos, la composición se puede formular para la administración mediante inyección directamente en el tumor, o adyacente al tumor. En algunas realizaciones, la composición puede administrarse de manera uniforme sobre o a través del tumor o para mejorar la biodistribución y por lo tanto, mejorar el beneficio terapéutico.

En otras realizaciones, una composición de la invención puede formularse con Polil:C basado en ADN: C, polil:C basado en ARN o polil:C basado en una mezcla de ARN y ADN. En este contexto, una mezcla de ARN y ADN puede referirse a nucleótidos, de tal manera que cada hebra puede comprender nucleótidos de ADN y ARN; a las hebras, de tal manera que cada polinucleótido de doble cadena tiene una hebra de ADN y una hebra de ARN; al polinucleótido, tal que una composición contiene polinucleótidos polil:C, cada uno de los cuales está totalmente compuesto por ARN o totalmente compuesto por ADN; o sus combinaciones.

En otras realizaciones, las composiciones de la invención pueden formularse para su uso en combinación con un epítipo de célula T o un epítipo de células B. El epítipo de célula T puede ser un epítipo de células T universal y el epítipo de células B puede ser un epítipo de células B universal. Tal como se utiliza en el presente documento, un "epítipo universal" puede ser cualquier epítipo que es ampliamente reconocido, por ejemplo, por las células T o

células B de múltiples cepas de un animal. En una realización, el epítipo de la célula T puede ser un péptido toxoide tetánico tal como F21 E. En otra realización, el epítipo de células T puede ser PADRE, un epítipo universal de células T colaboradoras. Otros epítipos universales que pueden ser adecuados para su uso en el contexto de la invención son conocidos para el experto o se pueden determinar fácilmente utilizando técnicas de rutina.

5 En realizaciones relacionadas, una composición de la invención comprende un polinucleótido polil:C y un antígeno, en el que la presencia de la polinucleótido polil:C y el antígeno en términos de peso o número de moléculas se encuentra en una relación de menos de 1 a 1.000, de menos de 1 a 900, de menos de 1 a 800, de menos de 1 a 700, de menos de 1 a 500, de menos de 1 a 400, de menos de 1 a 300, de menos de 1 a 200, de menos de 1 a 100, de menos de 1 a 50, de menos de 1 a 10, de menos de 1 a 5, de menos de 1 a 2, de aproximadamente 1 a 1, de mayor que 2 a 1, de mayor que 5 a 1, mayor de 10 a 1, mayor de 50 a 1, de mayor que 100 a 1, mayor de 200 a 1, de mayor que 300 a 1, mayor que 400 a 1, de mayor de 500 a 1, de mayor de 600 a 1, de mayor de 700 a 1, de mayor que 800 a 1, de superior a 900 a 1, de más de 1.000 a 1.

15 La cantidad óptima de polinucleótido polil:C al antígeno para provocar una respuesta inmunitaria óptima puede depender de un número de factores que incluyen, sin limitación, la composición, la enfermedad, el sujeto y puede determinarla fácilmente la persona experta usando estudios estándar que incluyen, por ejemplo, las observaciones de los títulos de anticuerpos y otras respuestas inmunogénicas en el huésped.

20 Kits y reactivos

La presente invención se proporciona opcionalmente a un usuario como un kit. Por ejemplo, un kit de la invención contiene una o más de las composiciones de la invención. El kit puede comprender además uno o más reactivos adicionales, material de envasado, recipientes para contener los componentes del kit y un manual de instrucciones o de usuario detallando los métodos preferidos de la utilización de los componentes del kit.

Métodos de uso

30 La invención encuentra aplicación en cualquier caso en el que se desea administrar un antígeno a un sujeto. El sujeto puede ser un vertebrado, tal como un pez, ave o mamífero, preferiblemente un ser humano.

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse a un sujeto con el fin de obtener y/o mejorar una respuesta de anticuerpos al antígeno.

35 Como se usa en este documento, "provocar" una respuesta inmunitaria es inducir y/o potenciar una respuesta inmunitaria. Como se usa en el presente documento, "mejorar" una respuesta inmunitaria es elevar, mejorar o reforzar la respuesta inmunitaria para beneficio del huésped en relación con el estado de la respuesta inmunitaria anterior, por ejemplo, antes de la administración de una composición de la invención.

40 Un "anticuerpo" es una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancialmente o parcialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante κ , A, α , γ , δ , ϵ y μ , así como una miríada de regiones variables de inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican como κ o λ . Las cadenas pesadas se clasifican como γ , μ , α , δ o ϵ , que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

45 Cada unidad estructural de una inmunoglobulina típica (anticuerpo) comprende una proteína que contiene cuatro polipéptidos. Cada unidad estructural del anticuerpo está compuesta por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada una cadena "ligera" u una "pesada". El extremo N de cada cadena define una región variable principalmente responsable del reconocimiento del antígeno. Las unidades estructurales de los anticuerpos (por ejemplo, de las clases IgA e IgM) también pueden ensamblarse en formas oligoméricas entre sí y otras cadenas de polipéptidos

50 adicionales, por ejemplo como pentámeros de IgM en asociación con el polipéptido de cadena J.

Los anticuerpos son los productos de glucoproteína específicas de antígenos de una subpoblación de glóbulos blancos llamados linfocitos B (células B). La unión del antígeno al anticuerpo expresada en la superficie de las células B puede inducir una respuesta de anticuerpo que comprende la estimulación de las células B para su

55 activación, para sufrir mitosis y para diferenciarse terminalmente en células plasmáticas, que están especializadas en la síntesis y secreción del anticuerpo específico del antígeno.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "respuesta de anticuerpo" se refiere a un aumento en la cantidad de anticuerpos específicos de antígeno en el cuerpo de un sujeto en respuesta a la introducción del

60 antígeno en el cuerpo del sujeto.

Un método de evaluación de una respuesta de anticuerpos es medir los títulos de anticuerpos reactivos con un antígeno particular. Esto se puede realizar usando diversos métodos conocidos en la técnica tales como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de sustancias que contienen anticuerpos obtenidos de animales. Por

65 ejemplo, los títulos de anticuerpos en suero que se unen a un antígeno particular se pueden determinar en un sujeto tanto antes como después de la exposición al antígeno. Un aumento estadísticamente significativo del título de

anticuerpos específicos de antígeno después de la exposición al antígeno indicaría que el sujeto había montado una respuesta de anticuerpos al antígeno.

5 Otros ensayos que pueden utilizarse para detectar la presencia de un anticuerpo específico de antígeno incluyen, sin limitación, ensayos inmunológicos (por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA)), ensayos de inmunoprecipitación y transferencia de proteínas (por ejemplo, ensayos de transferencia de tipo Western); y ensayos de neutralización (por ejemplo, neutralización de la infectividad viral en un ensayo in vitro o in vivo).

10 En algunas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse a un sujeto con el fin de obtener y/o mejorar una respuesta inmunitaria al antígeno mediada por células. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "respuesta inmunitaria mediada por células" se refiere a un aumento en la cantidad de linfocitos T citotóxicos, macrófagos, células asesinas naturales o citocinas específicas de antígeno en el cuerpo de un sujeto en respuesta a la introducción del antígeno en el cuerpo del sujeto.

15 Históricamente, el sistema inmune se separó en dos ramas: inmunidad humoral, para los que la función protectora de la inmunización se pudo encontrar en el humor (fluido corporal libre de células o suero que contiene anticuerpos) e inmunidad celular, para los que la función protectora de la inmunización se asoció con las células. La inmunidad mediada por células es una respuesta inmunitaria que implica la activación de macrófagos, células asesinas naturales (NK), linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno y la liberación de varias citocinas en respuesta a un antígeno "no propio. La inmunidad celular es un componente importante de la respuesta inmunitaria adaptativa y tras el reconocimiento del antígeno por las células a través de su interacción con las células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas, linfocitos B y en menor medida, macrófagos, protege al cuerpo mediante diversos mecanismos, tales como:

25 1. la activación de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno que son capaces de inducir la apoptosis en las células del cuerpo que muestran epítomos de antígeno extraño en su superficie, tales como células infectadas por virus, células con bacterias intracelulares y células cancerosas que presentan antígenos tumorales;

30 2. activación de macrófagos y células asesinas naturales, que les permite destruir patógenos intracelulares; y

3. estimulación de las células para que secreten diversas citocinas que influyen en la función de otras células involucradas en la respuesta inmunitaria adaptativa y la respuesta inmunitaria innata.

35 La inmunidad celular es más eficaz en la eliminación de las células infectadas por virus, pero también participa en la defensa contra los hongos, protozoos, cánceres y bacterias intracelulares. También desempeña un papel importante en el rechazo del trasplante.

Detección de la respuesta inmunitaria mediada por células después de la vacunación

40 Dado que inmunidad mediada por células implica la participación de diversos tipos de células y está mediada por diferentes mecanismos, varios métodos podrían utilizarse para demostrar la inducción de la inmunidad después de la vacunación. Estos podrían clasificar en la detección de: i) células presentadoras de antígenos específicos; ii) células efectoras específicas y sus funciones y iii) liberación de mediadores solubles como citocinas.

45 i) Células presentadoras de antígeno: las células dendríticas y las células B (y en menor medida los macrófagos) están equipadas con receptores de inmunoestimuladoras especiales que permiten una mayor activación de las células T y se denominan células presentadoras de antígeno profesionales (APC). Estas moléculas inmunoestimulantes (también denominadas moléculas coestimuladoras) están reguladas por incremento en estas células después de la infección o la vacunación, durante el proceso de la presentación de antígenos a células efectoras, tales como células CD4 y CD8 T citotóxicos. Tales moléculas coestimuladoras (tales como CD80, CD86, MHC de clase I o MHC de clase II) se pueden detectar mediante el uso de citometría de flujo con anticuerpos conjugados con fluorocromo dirigidos contra estas moléculas, junto con anticuerpos que identificar específicamente las APC (tales como CD11c para células dendríticas).

55 ii) Células T citotóxicas: (también conocidos como Tc, células T asesinas, o linfocitos T citotóxicos (CTL)) son un subgrupo de las células T que inducen la muerte de las células que están infectadas con virus (y otros patógenos), o que expresan antígenos tumorales. Estos CTL atacan directamente a otras células que transportan determinadas moléculas extrañas o anormales en su superficie. La capacidad de tale citotoxicidad celular puede detectarse utilizando en ensayos citolíticos in vitro (ensayo de liberación de cromo). Por lo tanto, la inducción de la inmunidad celular adaptativa se puede demostrar por la presencia de tales células T citotóxicas, en la que, cuando el las células diana cargadas con antígeno son lisadas por CTL específicos que se generan in vivo después de la vacunación o infección.

65 Las células T citotóxicas no sensibilizadas se activan cuando su receptor de células T (TCR) interacciona fuertemente con una molécula de MHC de clase I unida al péptido. Esta afinidad depende del tipo y orientación del complejo antígeno/MHC y es lo que mantiene al CTL y la célula infectada unidos. Una vez activado, el CTL se sufre

un proceso llamado expansión clonal en el que se gana funcionalidad y se divide rápidamente, para producir un ejército de células efectoras "armadas". Después, los CTL activados viajarán por todo el cuerpo en busca de células que lleven ese único MHC de clase I + péptido. Esto podría ser utilizado para identificar tales CT in vitro mediante el uso de tetrámeros de péptido-MHC de clase I en ensayos de citometría de flujo.

5 Cuando se expone a estas células somáticas infectadas o disfuncionales, el CTL efector libera perforina y granulinsina: citotoxinas que forman poros en la membrana plasmática de la célula diana, lo que permite la entrada de iones y agua fluya en la célula infectada y hace que se rompa o se lise. Los CTL liberan granzima, una serina proteasa que entra en las células a través de los poros para inducir la apoptosis (muerte celular). La liberación de 10 estas moléculas de los CTL se puede utilizar como una medida del éxito de la inducción de la respuesta inmunitaria celular después de la vacunación. Esto se puede hacer mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o ensayo de inmunotransferencia ligado a enzimas (ELISPOT), en los que los CTL se pueden medir cuantitativamente. Dado que los CTL también son capaces de producir citocinas importantes, tales como IFN- γ , la medición cuantitativa de células CD8 productoras de IFN- γ se puede conseguir mediante ELISPOT y por medición 15 de citometría de flujo de IFN- γ intracelular en estas células.

Células T CD4 + "colaboradoras": linfocitos CD4 + o células T colaboradoras, son mediadores de la respuesta inmunitaria y desempeñan un papel importante en el establecimiento y maximización de las capacidades de la respuesta inmunitaria adaptativa. Estas células no tienen actividad citotóxica o fagocítica; y no pueden matar las 20 células infectadas o patógenos claros, pero, en esencia, "gestionan" la respuesta inmunitaria, dirigiendo otras células para que lleven a cabo estas tareas. Dos tipos de respuestas de células T colaboradoras CD4 + efectoras pueden inducirse por una APC profesional, denominada Th1 y Th2, cada una diseñada para eliminar diferentes tipos de patógenos.

25 Las células T colaboradoras expresan receptores de células T (TCR) que reconocen el antígeno unido a moléculas de MHC Clase II. La activación de las células T colaboradoras no sensibilizadas hace que segregue citocinas, que influyen en la actividad de muchos tipos de células, incluyendo las APC que la han activado. Las células T colaboradoras requieren un estímulo de activación mucho más suave que las células T citotóxicas. Las células T colaboradoras pueden proporcionar señales adicionales que "ayudan" a activar las células citotóxicas. Dos tipos de 30 respuestas de células T colaboradoras CD4 + efectoras pueden inducirse por una APC profesional, denominada Th1 y Th2, cada una diseñada para eliminar diferentes tipos de patógenos. Las dos poblaciones de células Th difieren en el patrón de las proteínas efectoras (citocinas) producidas. En general, las células Th1 ayudan en la respuesta inmunitaria celular mediante la activación de los macrófagos y las células T citotóxicas; mientras que las células Th2 estimulan la respuesta inmunitaria humoral mediante la estimulación de las células B para la conversión en células plasmáticas y la formación de anticuerpos. Por ejemplo, una respuesta regulada por las células Th1 puede inducir 35 IgG2a e IgG2b en ratón (IgG1 e IgG3 en seres humanos) y favorecer una respuesta inmunitaria mediada por células frente a un antígeno. Si la respuesta de IgG + un antígeno está regulada por una célula de tipo Th2, puede mejorar predominantemente la producción de IgG1 en ratón (IgG2 en los seres humanos). La determinación de las citocinas asociadas con respuestas Th1 o Th2 dará una medida del éxito de la vacunación. Esto se puede lograr mediante 40 ELISA específico diseñado para citocinas de Th1 tales como IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α y otros, o citocinas de Th2, tales como IL-4, IL-5, IL-10 entre otras.

iii) Medición de citocinas: liberadas por los ganglios linfáticos regionales, dan una buena indicación del éxito de la 45 inmunización. Como resultado de la presentación de antígenos y la maduración de las APC y las células efectoras inmunitarias, tales como células T CD4 y CD8, varias citocinas son liberadas por las células de los ganglios linfáticos. Mediante el cultivo de estas LNC in vitro en presencia de antígeno, la respuesta inmunitaria específica de antígeno se puede detectar midiendo la liberación si ciertas citocinas importantes, tales como IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α y GM-CSF. Esto podría hacerse mediante ELISA utilizando sobrenadantes de cultivo y citocinas recombinantes como patrones.

50 El éxito de la inmunización se puede determinar mediante diversas formas conocidas para el experto, incluyendo, entre otros, ensayos de inhibición de la hemaglutinación (IHA) y de inhibición de seroneutralización para detectar anticuerpos funcionales; estudios de exposición, en la que los sujetos vacunados son expuestos al patógeno asociado a determinar la eficacia de la vacunación; y el uso de clasificación de células activadas por fluorescencia 55 (FACS) para determinar la población de células que expresan un marcador de superficie celular específico, por ejemplo, en la identificación de los linfocitos activados o de memoria. Un experto en la materia podrá también determinar si la inmunización con una composición de la invención provocó un anticuerpo y/o respuesta inmunitaria mediada por células usando otros métodos conocidos. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Immunology Coligan et al., ed. (Wiley Interscience, 2007).

60 En otras realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse a un sujeto con el fin de obtener y/o mejorar una respuesta inmunitaria de anticuerpos o mediada por células al antígeno.

65 La invención encuentra una amplia aplicación en la prevención y el tratamiento de cualquier enfermedad susceptible a la prevención y/o tratamiento por medio de la administración de un antígeno. Aplicaciones representativas de la

invencción incluyen el tratamiento y la prevención del cáncer, la terapia génica, la terapia adyuvante, el tratamiento y la prevención de enfermedades infecciosas, tratamiento y prevención de la alergia, tratamiento y prevención de la enfermedad autoinmune, tratamiento de la enfermedad degenerativa de las neuronas y tratamiento de la aterosclerosis, tratamiento y prevención de la dependencia de drogas, control hormonal para el tratamiento y
5 prevención de enfermedades, control de un proceso biológico para el propósito de la anticoncepción.

Prevencción o tratamiento de la enfermedad incluye la obtención de resultados beneficiosos o deseados, incluyendo los resultados clínicos. Resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, entre otros, alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones, disminución de la extensión de la enfermedad, estabilización del estado de
10 enfermedad, prevención del desarrollo de la enfermedad, prevención de la propagación de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, retraso o ralentización de la aparición de la enfermedad, conferir inmunidad protectora frente a un agente causante de la enfermedad y mejora o paliación del estado de enfermedad. Prevencción o tratamiento también puede significar prolongar la supervivencia de un paciente más allá de lo esperado en ausencia de tratamiento y también puede significar la inhibición de la progresión de la enfermedad
15 temporalmente, aunque más preferiblemente, implica la prevención de la aparición de la enfermedad tales como mediante la prevención de la infección en un sujeto.

El experto en la materia puede determinar los regímenes de tratamiento adecuados, las vías de administración, las dosis, etc., para cualquier aplicación particular con el fin de lograr el resultado deseado. Los factores que pueden tenerse en cuenta incluyen, por ejemplo: La naturaleza del antígeno; el estado de enfermedad que debe prevenirse o tratarse; la edad, el estado físico, el peso corporal, el sexo y la dieta del sujeto; y otros factores clínicos. Véase, por ejemplo, "Vaccine Handbook", editado por Researcher's Associates (Gaku-yuu-kai) of The National Institute of Health (1994); "Manual of Prophylactic Inoculation, 8ª edición", editado por Mikio Kimura, Munehiro Hirayama y Harumi Sakai, Kindai Shuppan (2000); "Minimum Requirements for Biological Products", editado por la Association of
20 Biologicals Manufacturers of Japan (1993).

Respuestas inmunitarias

Una composición de la invencción puede usarse para inducir una respuesta de anticuerpos y/o respuesta inmunitaria mediada por células al antígeno que se formula en la composición en un sujeto en necesidad del mismo. Una respuesta inmunitaria puede producirse y/o mejorado en un sujeto en necesidad de la misma frente a cualquier antígeno y/o a la célula que lo expresa. Por lo tanto, en realizaciones de la invencción, una composición puede comprender un antígeno derivado de una bacteria, un virus, un hongo, un parásito, un alérgeno o una célula tumoral y puede formularse para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por una bacteria, un
30 virus, un hongo, un parásito, un alérgeno o una célula tumoral, respectivamente.

Una composición de la invencción puede ser adecuada para su uso en el tratamiento y/o prevención de cáncer en un sujeto en necesidad de la misma. El sujeto puede tener cáncer o puede estar en riesgo de desarrollar cáncer. Los cánceres que pueden tratarse y/o prevenirse mediante el uso o administración de una composición de la invencción incluyen, sin limitaciones, carcinoma, adenocarcinoma, linfoma, leucemia, sarcoma, blastoma, mieloma y tumores de células germinales. En una realización, el cáncer puede deberse a un patógeno, tal como un virus. Los virus relacionados con el desarrollo de cáncer son conocidos por el experto en la materia e incluyen, entre otros, virus del papiloma humano (VPH), virus John Cunningham (JCV), virus del herpes humano 8, virus de Epstein Barr (EBV), poliomavirus de células de Merkel, virus de la hepatitis C Virus y virus 1 de la leucemia de células T humanas. Una
40 composición de la invencción puede usarse, ya sea para el tratamiento o la profilaxis del cáncer, por ejemplo, en la reducción de la severidad del cáncer o la prevención de la reincidencia del cáncer. Los cánceres que pueden beneficiarse de las composiciones de la invencción incluyen cualquier célula maligna que expresa uno o más antígenos específicos del tumor.

Una composición de la invencción puede ser adecuada para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección viral en un sujeto en necesidad de la misma. El sujeto puede estar infectado con un virus o puede estar en riesgo de desarrollar una infección viral. Las infecciones virales que se pueden tratar y/o prevenir mediante el uso o administración de la invencción incluyen, sin limitación, Cowpoxvirus, virus vaccinal, virus pseudoviruela, herpesvirus humano 1, herpesvirus humano 2, citomegalovirus, adenovirus humano A-F, poliomavirus, virus del papiloma humano, parvovirus, virus de Hepatitis A, Virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana, ortoreovirus, rotavirus, virus Ébola, virus de la parainfluenza, virus de la gripe A, virus de la gripe B, virus de la gripe C, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la rubéola, pneumovirus, virus sincitial respiratorio humano, virus de la rabia, virus de la encefalitis de California, virus de la encefalitis japonesa, virus Hantaan, virus de la coriomeningitis linfocítica, coronavirus, enterovirus, rinovirus, virus de la polio, norovirus, flavivirus, virus del dengue, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre amarilla y varicela.
50
55
60

En una realización, una composición de la invencción puede usarse para tratar y/o prevenir una infección por el virus de la gripe en un sujeto en necesidad del mismo. La gripe es un virus de ARN de cadena sencilla de la familia Orthomyxoviridae y se caracteriza a menudo por dos grandes glucoproteínas en el exterior de la partícula viral, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Se han identificado numerosos subtipos de HA de la gripe A (Kawaoka y col., Virology (1990) 179:759-767; Webster y col., "Antigenic variation among type A influenza viruses," p. 127-168.
65

En: P. Palese and D.W. Kingsbury (ed.), Genetics of influenza viruses. Springer-Verlag, Nueva York).

Una composición de la invención puede ser adecuada para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto en necesidad de la misma, en la que la enfermedad neurodegenerativa está asociada con la expresión de un antígeno. El sujeto puede tener una enfermedad neurodegenerativa o puede estar en riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa. Las enfermedades neurodegenerativas que pueden tratarse y/o prevenirse mediante el uso o administración de una composición de la invención incluyen, entre otras, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

En una realización, una composición de la invención puede usarse para tratar y/o prevenir LA ENFERMEDAD DE Alzheimer en un sujeto en necesidad del mismo. La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la asociación de placas de β -amiloide y/o proteínas tau en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer (véase, por ejemplo, Goedert y Spillantini, Science, 314: 777-781, 2006). El virus del herpes simple de tipo 1 también se ha propuesto que desempeña un papel causal en las personas portadoras de las versiones susceptibles del gen apoE (Itzhaki y Wozniak, J Alzheimer Dis 13: 393-405, 2008).

Un sujeto al que se le ha administrado o tratado con una composición de la invención puede resultar en el aumento de una respuesta inmunitaria de anticuerpo y/o mediada por células frente al antígeno en relación con un sujeto tratado con una composición control. Tal como se utiliza en el presente documento, una "composición control" puede referirse a cualquier composición que no contiene al menos un componente de la composición reivindicada. Por tanto, una composición control no contiene al menos uno de 1) un antígeno, 2) liposoma, 3) Polil:C o 4) un vehículo hidrófobo. En una realización, una composición control no contiene Polil:C. En otras realizaciones, una composición control puede contener alumbre en lugar de Polil:C.

Un sujeto al que se ha administrado o tratado con una composición de la invención puede producir una respuesta inmunitaria de anticuerpo que es al menos 1,50x, al menos 1,75x, al menos 2x, al menos 2,5 veces, al menos 3x, al menos 3,5x, al menos 4x, al menos 4,5x, o al menos 5x mayor en relación con un sujeto tratado con una composición control. En una realización, el título de anticuerpos (expresado en término del valor log₁₀) del suero de un sujeto tratado con una composición de la invención es de al menos 0,05, al menos 0,10, al menos el 0,15, al menos 0,20, al menos 0,25 o al 0,30 mayor que la de un sujeto tratado con una composición control.

Un sujeto al que se ha administrado o tratado con una composición de la invención puede producir una respuesta inmunitaria mediada por células que es al menos 1,50x, al menos 1,75x, al menos 2x, al menos 2,5 veces, al menos 3x, al menos 3,5x, al menos 4x, al menos 4,5x, o al menos 5x mayor en relación con un sujeto tratado con una composición control.

Un sujeto al que se ha administrado o tratado con una composición de la invención puede producir una población de células T de memoria que es al menos 1,50x, al menos 1,75x, al menos 2x, al menos 2,5 veces, al menos 3x, al menos 3,5x, al menos 4x, al menos 4,5x, o al menos 5x mayor en relación con un sujeto tratado con una composición control.

Un sujeto administrado o tratado con una composición de la invención puede prevenir el desarrollo y/o retrasar la aparición de un tumor en un sujeto, respecto a un sujeto tratado con una composición control.

La invención se ilustra de forma adicional mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Ratones CD1 hembras sin patógenos, de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canadá) y se alojaron de acuerdo con las directrices institucionales con agua y comida *ad libitum*, con circulación del aire controlada con filtro.

La proteína recombinante hemaglutinina H5N1 se adquirió en Protein Sciences (Meridien, CT, EE.UU.). Esta proteína recombinante tiene un peso molecular aproximado de 72.000 daltons y corresponde a la glucoproteína hemaglutinina, una proteína antigénica presente en la superficie del virus de la gripe H5N1. Esta proteína recombinante, en lo sucesivo denominada rHA, se utilizó como antígeno modelo para probar la eficacia de las formulaciones de vacuna. La rHA se utilizó a 1 microgramo por dosis de 30 microlitros.

La eficacia de la vacuna se evaluó mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un método que permite la detección de los niveles de anticuerpos específicos de antígeno en el suero de los animales inmunizados. La realización de la prueba ELISA en los sueros recogidos de ratones inmunizados en un intervalo regular (cada cuatro semanas, por ejemplo), es útil para el seguimiento de las respuestas de anticuerpos a una formulación de vacuna dada. En pocas palabras, una placa de microtitulación de 96 pocillos se reviste con antígeno (rHA, 1 microgramo/mililitro) durante la noche a 4 grados centígrados, se bloquea con 3% de gelatina durante 30 minutos, a continuación se incuba durante la noche a 4 grados centígrados con diluciones en serie de los sueros, comenzando

típicamente a una dilución de 1/2000. Después se añaden un reactivo secundario (proteína G conjugada con fosfatasa alcalina, EMD chemicals, Gibbstown, NJ, EE.UU.) a cada pocillo a una dilución 1/500 durante una hora a 37 grados centígrados. Tras una incubación de 60 minutos con una solución que contiene 1 miligramo/mililitro de 4-nitrofenilfosfato sal disódica hexahidrato (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Suiza), la absorbancia a 405 nanómetros de cada pocillo se midió usando un lector de placas de microtitulación (ASYS Hitech GmbH, Austria). Los títulos de punto final se calculan como se describe en Frey A. et al (Journal of Immunological Methods, 1998, 221:35-41). Los títulos calculados representan la dilución más alta a la que se observó un aumento estadísticamente significativo de la absorbancia en muestras de suero de ratones inmunizados frente a muestras de suero de ratones control no inmunizados no sensibilizados. Los títulos se presentan como valores log₁₀ de la dilución de punto final.

Para formular la vacuna descrita en el presente documento, una mezcla de 10: 1 peso: peso homogénea de S100 lecitina y colesterol (Lipoid GmbH, Alemania) se hidrató en presencia de una solución de rHA en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) para formar liposomas con rHA encapsulado. En resumen, 33 microgramos de rHA se suspendieron primero en 300 microlitros de solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) después se añadió a 132 miligramos de la mezcla de lecitina S100/colesterol para formar aproximadamente 450 microlitros de una suspensión de liposomas que encapsula el antígeno rHA. La preparación de liposomas se extruyó haciendo pasar el material a través de una mini-extrusora manual (Avanti, Alabaster, AL, EE.UU.) equipada con una membrana de policarbonato de 200 nanómetros. Por cada 450 microlitros de suspensión de liposomas que contienen rHA se añadieron dos miligramos de adyuvante para inyecciones de alumbre (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). Por cada 500 microlitros de una suspensión de liposoma/antígeno/adyuvante, se añadió un volumen igual de un vehículo de aceite mineral equivalente al adyuvante incompleto de Freund (conocido como Montanide (TM) ISA 51, suministrado por Seppic, Francia) para formar una emulsión agua en aceite emulsión para formar la suspensión de liposomas contenida dentro de la fase acuosa de la emulsión y el aceite formando una fase hidrófoba continua. Cada dosis de vacuna consistió en 30 microlitros de la emulsión descrita anteriormente que contiene liposomas, el antígeno rHA, adyuvante de alumbre y el vehículo de aceite mineral. Esta formulación de la vacuna se denominará liposoma/alumbre/vehículo hidrófobo.

Para formular la vacuna correspondiente a la invención, se usaron los mismos procedimientos descritos anteriormente con la siguiente excepción: : después de la formación de liposomas que encapsulan rHA y después de la extrusión de la suspensión de liposomas a través de una membrana de policarbonato de 200 nanómetros, se añadieron 133 microgramos de adyuvante polil:C (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) a cada 450 microlitros de liposomas. Por cada 500 microlitros de una suspensión de liposoma/antígeno/adyuvante, se añadió un volumen igual de un vehículo de aceite mineral (Montanide (TM) ISA 51, suministrado por Seppic, Francia) para formar una emulsión agua en aceite emulsión con la suspensión de liposomas contenida dentro de la fase acuosa de la emulsión y el aceite formando una fase hidrófoba continua. Cada dosis de vacuna consistió en 30 microlitros de la emulsión descrita anteriormente que contiene liposomas, el antígeno rHA, adyuvante polil:C y el vehículo de aceite mineral. Esta formulación concreta se denominará liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo.

La eficacia de las dos formulaciones de emulsión descritas anteriormente se comparó con la eficacia de una vacuna control que consiste en 1 microgramo de rHA y 60 microgramos de adyuvante de alumbre en 30 microlitros de solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). Dos grupos de ratones (9 o 10 ratones por grupo) fueron inyectados una vez (sin refuerzo) con formulaciones de vacuna de liposomas, por vía intramuscular, del siguiente modo: Los ratones del grupo 1 se vacunaron con la vacuna B que comprende de 1 microgramo de antígeno rHA formulado en 30 microlitros de liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo como se ha descrito anteriormente. Cada dosis de vacuna contenía efectivamente 4 microgramos de Polil:C. Los ratones del grupo 2 se vacunaron con la vacuna A que comprende 1 microgramo de rHA formulado en 30 microlitros de liposoma/alumbre/vehículo hidrófobo como se ha descrito anteriormente. Cada dosis de vacuna contenía efectivamente 60 microgramos de alumbre. En el grupo de ratones control (Grupo 3, n = 10) se inyectó por vía intramuscular la vacuna de alumbre de control que consiste en 1 microgramo de rHA y 60 microgramos de alumbre en suspensión en solución salina tamponada con fosfato. Las muestras de suero se obtuvieron de todos los ratones a los 18 días y a los 28 días de la inmunización. Los títulos de anticuerpos en estos sueros se analizaron mediante ELISA como se ha descrito anteriormente.

Los ratones del grupo 3 generaron una respuesta detectable de anticuerpos específica de antígeno como cabría esperar después de la administración de una vacuna control con adyuvante de alumbre. No sorprendente, los ratones del grupo 3 vacunados con una formulación de liposoma/alumbre/vehículo hidrófobo generaron una respuesta de anticuerpos considerablemente mayor. Si estos resultados eran esperables, el uso de adyuvante polil:C en lugar de adyuvante de alumbre en una formulación de liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo (ratones del grupo 1), dio algún resultado inesperado; los títulos de anticuerpos fueron significativamente mayores que los generados por la formulación liposoma/alumbre/vehículo hidrófobo (Grupo 2).

Los ratones del grupo 3, vacunados con la formulación de control acuosa descrita anteriormente, generaron títulos de punto final de hasta 1/32.000 y 1/64.000 a los 18 y 28 días de la vacunación (valores log₁₀ de 4,51 y 4,81 respectivamente). Los títulos de punto final a los 18 y 28 días de la vacunación en el grupo 2 fueron de hasta 1/256.000 (valor de log 10 de 5,41). La presencia de tales respuestas de anticuerpos a los 18 y 28 días (4 semanas) de la vacunación confirma que se generaba una verdadera respuesta inmunitaria como resultado de la vacunación. Los ratones del grupo 1 a los que se inyectó la formulación correspondiente a la invención fueron capaces de

generar una respuesta inmunitaria mejorada con títulos de punto final que alcanzan hasta 1/1.024.000 (valor log 10 de 6,01) a los 18 días de la vacunación y 1/8.192.000 (valor log 10 de 6,91) a las cuatro semanas de la inmunización. Estos resultados indican que las formulaciones de liposomas/vehículo hidrófobo que contiene un adyuvante polil:C son capaces de generar una respuesta inmunitaria in vivo significativamente mejorada en comparación con las vacunaciones control con liposomas/alumbre/vehículo hidrófobo y acuosas/alumbre.

Ejemplo 2

Ratones CD1 hembras sin patógenos, de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canadá) y se alojaron de acuerdo con las directrices institucionales con agua y comida *ad libitum*, con circulación del aire controlada con filtro.

Como en el ejemplo 1, la proteína hemaglutinina recombinante de H5N1, correspondiente a la glucoproteína hemaglutinina en la superficie del virus de la gripe H5N1, se adquirió de Protein Sciences (Meridien, CT, EE.UU.). Esta proteína recombinante, en lo sucesivo denominada rHA, se utilizó como antígeno modelo para probar la eficacia de las formulaciones de vacuna. La rHA se utilizó a 1 microgramo por dosis de 30 microlitros.

Para formular la vacuna correspondiente a la invención, se utilizaron los mismos procedimientos descritos en el ejemplo uno. En resumen, 33 microgramos de rHA se suspendieron primero en 300 microlitros de solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) después se añadió a 132 miligramos de una mezcla de lecitina S100/colesterol (Lipoid GmbH, Alemania) para formar aproximadamente 450 microlitros de una suspensión de liposomas que encapsula el antígeno rHA. La preparación de liposomas se extruyó haciendo pasar el material a través de una mini-extrusora manual (Avanti, Alabaster, AL, EE.UU.) equipada con una membrana de policarbonato de 200 nanómetros. Por cada 450 microlitros de suspensión de liposomas que contienen rHA se añadieron 133 microgramos de adyuvante Polil:C (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). Por cada 500 microlitros de una suspensión de liposoma/antígeno/adyuvante, se añadió un volumen igual de un vehículo de aceite mineral (Montanide (TM) ISA 51, suministrado por Seppic, Francia) para formar una emulsión agua en aceite emulsión con la suspensión de liposomas contenida dentro de la fase acuosa de la emulsión y el aceite formando una fase hidrófoba continua. Cada dosis de vacuna consistió en 30 microlitros de la emulsión descrita anteriormente que contiene liposomas, el antígeno rHA, adyuvante polil:C y el vehículo de aceite mineral. Esta formulación concreta se denominará liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo.

La eficacia de la vacuna liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo descrita anteriormente se comparó con la eficacia de una vacuna control acuosa que contiene adyuvante polil:C. En dos grupos de ratones (9 o 10 ratones por grupo) se inyectó una vez, por vía intramuscular, 30 microlitros por dosis. Los ratones del grupo 1 se vacunaron con la vacuna B que comprende de 1 microgramo de rHA y 4 microgramos de polil:C formulada en 30 microlitros de liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo como se ha descrito anteriormente. En los ratones del grupo 2 se inyectaron 30 microlitros de la vacuna control con polil:C que comprende 1 microgramo rHA y 4 microgramos Polil:C formulados en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). Se obtuvieron muestras de suero de todos los ratones a los 18 y 28 días de la inmunización. Los títulos de anticuerpos frente a rHA de las muestras de suero se examinaron mediante ELISA como se describe en el ejemplo 1.

Los ratones del grupo 2 generaron una respuesta detectable de anticuerpos específica de antígeno después de la administración de una vacuna control adyuvada con polil:C. Los ratones del grupo 1, vacunados con la formulación liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo produjeron títulos de punto final significativamente mejores en comparación con los del Grupo 2. Los ratones del grupo 2 generaron títulos de hasta 1/128.000 (valor log₁₀ de 5,1 1) a los 18 días de la vacunación y de hasta 1/1.024.000 (valor log₁₀ de 6,01) a los 28 días (4 semanas) de la vacunación. Como se ha indicado en el ejemplo 1, la presencia de tales respuestas de anticuerpos confirma una verdadera respuesta inmunitaria generada como resultado de la vacunación. Los ratones del grupo 1, vacunados con la vacuna correspondiente a la invención, fueron capaces de generar títulos de punto final que alcanzan hasta 1/1.024.000 (valor log 10 de 6,01) a los 18 días de la vacunación y 1/8.192.000 (valor log 10 de 6,91) a las cuatro semanas de la inmunización. Estos resultados indican que las formulaciones de liposomas/vehículo hidrófobo que contiene un adyuvante polil:C son capaces de generar una respuesta inmunitaria in vivo significativamente mejorada en comparación con una vacunación control acuosa/polil:C.

Ejemplo 3

Ratones CD1 hembras sin patógenos, de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canadá) y se alojaron de acuerdo con las directrices institucionales con agua y comida *ad libitum*, con circulación del aire controlada con filtro.

Como en los ejemplos 1 y 2, la proteína hemaglutinina recombinante de H5N1, correspondiente a la glucoproteína hemaglutinina en la superficie del virus de la gripe H5N1, se adquirió de Protein Sciences (Meridien, CT, EE.UU.). Esta proteína recombinante, en lo sucesivo denominada rHA, se utilizó como antígeno modelo para probar la eficacia de las formulaciones de vacuna. La rHA se utilizó a 1 microgramo por dosis de 50 microlitros.

Para formular la vacuna correspondiente a la invención, una mezcla homogénea de 10: 1 p: p de lecitina S100 y colesterol (lipoide GmbH, Alemania) se hidrató en presencia de una solución adyuvante rHA y polil:C (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) en tampón de fosfato para formar liposomas con rHA y adyuvante encapsulados. En resumen, 20 microgramos de rHA y 200 microgramos de polil:C se suspendieron primero en 250 microlitros de tampón fosfato 50 milimolar (pH 7,4), después se añadió a 132 miligramos de la mezcla de lecitina S100/colesterol para formar aproximadamente 400 microlitros de una suspensión de liposomas que encapsula el antígeno rHA y el adyuvante polil:C. La preparación de liposomas se diluyó a la mitad usando tampón fosfato 50 milimolar (pH 7,4) y después extrudió haciendo pasar el material a través de una mini-extrusora manual (Avanti, Alabaster, AL, EE.UU.) equipada con una membrana de policarbonato de 200 nanómetros. Liposomas del tamaño se liofilizaron utilizando el secador por congelación Virtis Advantage (SP Industries, Warminster, PA, EE.UU.). Por cada 800 microlitros de la suspensión de liposomas original que contiene rHA y Polil:C, se usó un mililitro de un vehículo de aceite mineral equivalente al adyuvante incompleto de Freund (conocido como Montanide (TM) ISA 51, suministrado por Seppic, Francia) para reconstituir los liposomas liofilizados. Cada dosis de vacuna consistió en 50 microlitros de la emulsión descrita anteriormente combinando liposomas, el antígeno rHA, adyuvante polil:C y el vehículo de aceite mineral. Esta formulación de vacuna se denominará liposomas liofilizados/polil:C/vehículo hidrófobo.

La eficacia de la formulación de liposomas liofilizados descritas anteriormente se comparó con la eficacia de una vacuna control que consiste en 1 microgramo de rHA y 100 microgramos de adyuvante de alumbre (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) en 50 microlitros de tampón fosfato 50 milimolar (pH 7,4). En los ratones del grupo 1 (N = 8) se inyectó una vez la vacuna C (sin refuerzo) que comprende de 1 microgramo de antígeno rHA y 10 microgramos de adyuvante polil:C formulado en 50 microlitros de liposomas liofilizados/polil:C/vehículo hidrófobo como se ha descrito anteriormente. Los ratones del grupo 2 (N = 9) se vacunaron dos veces (día 0 y día 21) con la vacuna control de alumbre que comprende 1 microgramo de rHA y 100 microgramos de adyuvante de alumbre suspendidos en tampón de fosfato milimolar. Se obtuvieron muestras de suero de todos los ratones a los 3, 4 y 8 semanas tras la inmunización. Los títulos de anticuerpos frente a rHA en estos sueros de se examinaron mediante ELISA como se describe en el ejemplo 1.

Los ratones del grupo 2 generaron una respuesta detectable de anticuerpos específica de antígeno después de la administración de una vacuna control adyuvada con alumbre. Los ratones del grupo 1, vacunados con una sola dosis de la formulación de liposomas liofilizados/Polil:C/vehículo hidrófobo, produjeron títulos de punto final significativamente mejores en comparación con los del Grupo 2, a pesar de que los animales del Grupo 2 se vacunaron dos veces (inmunización primaria más refuerzo). Los ratones del grupo generaron títulos de hasta 1/128.000 (valor log 10 de 5,11) a las tres semanas de la vacunación (antes de refuerzo) y hasta 1/1.024.000 (valor log 10 igual a 6,01) y 1/512.000 (valor log 10 igual a 5,71) a cuatro y ocho semanas, respectivamente (después del refuerzo). Como se ha indicado en el ejemplo 1, la presencia de tales respuestas de anticuerpos confirma una verdadera respuesta inmunitaria generada como resultado de la vacunación. Los ratones del grupo 1, vacunados con la vacuna correspondiente a la invención, fueron capaces de generar títulos de punto final que alcanzan hasta 1/2.048.000 (valor log 10 de 6,31) a los 18 días de la vacunación y 1/8.192.000 (valor log 10 de 6,91) a las cuatro semanas y a las ocho de la inmunización. Estos resultados indican que las formulaciones de liposomas liofilizados/vehículo hidrófobo que contiene un adyuvante polil:C son capaces de generar una respuesta inmunitaria in vivo significativamente mejorada en comparación con una vacunación control acuosa de alumbre. Las respuestas inmunitarias generadas en este ejemplo son equivalentes a las respuestas inmunitarias generadas por una vacuna de la invención que se presenta en los ejemplos 1 y 2.

45 **Ejemplo 4**

Ratones CD1 hembras sin patógenos, de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canadá) y se alojaron de acuerdo con las directrices institucionales con agua y comida *ad libitum*, con circulación del aire controlada con filtro.

Como en los ejemplos anteriores, la proteína hemaglutinina recombinante de H5N1 (Protein Sciences, Meridien, CT, EE.UU.) correspondiente a la glucoproteína hemaglutinina presente en la superficie del virus de la gripe H5N1, en lo sucesivo designado rHA, se utilizó como un antígeno modelo para probar la eficacia de LAS formulaciones de vacunas. Se usó rHA a 1 microgramo por dosis de 30 microlitros.

Las vacunas descritas en el presente documento se formularon como se describe en el ejemplo 1. En pocas palabras, 33 microgramos de rHA se suspendieron primero en 300 microlitros de solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) después se añadió a 132 miligramos de una mezcla de lecitina S100/colesterol (Lipoid GmbH, Alemania) para formar aproximadamente 450 microlitros de una suspensión de liposomas que encapsula el antígeno rHA. La preparación de liposomas se extrudió haciendo pasar el material a través de una mini-extrusora manual (Avanti, Alabaster, AL, EE.UU.) equipada con una membrana de policarbonato de 200 nanómetros. Por cada 450 microlitros de suspensión de liposomas que contienen rHA se añadieron dos miligramos de adyuvante para inyecciones de alumbre (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). Por cada 500 microlitros de una suspensión de liposoma/antígeno/adyuvante, se añadió un volumen igual de un vehículo de aceite mineral (Montanide (TM) ISA 51, suministrado por Seppic, Francia) para formar una emulsión agua en aceite emulsión con la suspensión de liposomas contenida dentro de la fase acuosa de la emulsión y el aceite formando una fase hidrófoba continua. Cada

dosis de vacuna consistió en 30 microlitros de la emulsión descrita anteriormente que contiene liposomas, el antígeno rHA, adyuvante de alumbre y el vehículo de aceite mineral. Esta formulación de la vacuna se denominará liposoma/alumbre/vehículo hidrófobo.

5 Para formular la vacuna correspondiente a la invención, se usaron los mismos procedimientos descritos anteriormente con la siguiente excepción: : después de la formación de liposomas que encapsulan rHA y después de la extrusión de la suspensión de liposomas a través de una membrana de policarbonato de 200 nanómetros, se añadieron 133 microgramos de adyuvante polil:C basado en ARN (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) a cada 450 microlitros de liposomas. Por cada 500 microlitros de una suspensión de liposoma/antígeno/adyuvante, se añadió un volumen igual de un vehículo de aceite mineral (Montanide (TM) ISA 51, suministrado por Seppic, Francia) para formar una emulsión agua en aceite emulsión con la suspensión de liposomas contenida dentro de la fase acuosa de la emulsión y el aceite formando una fase hidrófoba continua. Cada dosis de vacuna consistió en 30 microlitros de la emulsión descrita anteriormente que contiene liposomas, el antígeno rHA, adyuvante polil:C y el vehículo de aceite mineral. Esta formulación concreta se denominará liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo.

15 La eficacia de las dos formulaciones de emulsión descritas anteriormente se comparó tal como se describe en el ejemplo 1. En dos grupos de ratones (9 o 10 ratones por grupo) se inyectaron una vez (sin refuerzo) formulaciones de vacuna de liposomas, por vía intramuscular, del siguiente modo: Los ratones del grupo 1 se vacunaron con la vacuna B que comprende de 1 microgramo del antígeno rHA y 4 microgramos de adyuvante polil:C formulada en 30 microlitros de liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo (la invención). Los ratones del grupo 2 se vacunaron con 1 microgramo de rHA y 60 microgramos de adyuvante de alumbre formulados en 30 microlitros de liposoma/alumbre/vehículo hidrófobo. La vacuna del grupo 2 fue una formulación de control (vacuna A) que contiene el adyuvante de alumbre genérico. Las muestras de suero se obtuvieron de todos los ratones a los 18 y 28 días de la inmunización y después, cada cuatro semanas para un total de 16 semanas. Los títulos de anticuerpos en estos sueros se analizaron mediante ELISA como se ha descrito en el ejemplo 1.

20 Los títulos de punto final en el Grupo 2 fueron de hasta 1/256.000 a las 8 y 12 semanas y de 1/512.000 a las 16 semanas de la inmunización (valores log₁₀ de 5,41 y 5,71 respectivamente). En los ratones del grupo 1 a los que se inyectó la formulación correspondiente a la invención fueron capaces de generar una respuesta inmunitaria mejorada con títulos de punto final que alcanzaron hasta 1/4.096.000 (valor log₁₀ de 6,61) a las 8, 12 y 16 semanas de la vacunación. Estos resultados confirman que las formulaciones de liposoma/vehículo hidrófobo que contienen un Adyuvante polil:C son capaces de generar una respuesta inmunitaria in vivo significativamente mayor que es, d media, 10 veces mayor que lo que se consigue con una vacuna control que carece polil:C (valores de p <a 0,01 en todos los puntos de tiempo entre las semanas 4 y 16 después de la vacunación). La notable mejora en la respuesta inmunitaria generada fue un resultado del uso del adyuvante polil:C específicamente en lugar de alumbre en la composición de antígeno/liposoma/adyuvante/vehículo de aceite mineral. La respuesta inmunitaria más fuerte generada con la vacuna de la presente invención fue sólida, ya que persistió en niveles significativamente superiores en comparación con la vacuna que contiene alumbre durante un mínimo de 16 semanas.

40 **Ejemplo 5**

Ratones CD1 hembras sin patógenos, de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canadá) y se alojaron de acuerdo con las directrices institucionales con agua y comida *ad libitum*, con circulación del aire controlada con filtro.

45 Como en los ejemplos anteriores, la proteína hemaglutinina recombinante de H5N1, correspondiente a la glucoproteína hemaglutinina en la superficie del virus de la gripe H5N1, se adquirió de Protein Sciences (Meridien, CT, EE.UU.). Esta proteína recombinante, en lo sucesivo denominada rHA, se utilizó como antígeno modelo para probar la eficacia de las formulaciones de vacuna. La rHA se utilizó a 1 microgramo por dosis de 30 microlitros.

50 Para formular la vacuna correspondiente a la invención, se utilizaron los mismos procedimientos descritos en el ejemplo 2. En resumen, 33 microgramos de rHA se suspendieron primero en 300 microlitros de solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) después se añadió a 132 miligramos de una mezcla de lecitina S100/colesterol (Lipoid GmbH, Alemania) para formar aproximadamente 450 microlitros de una suspensión de liposomas que encapsula el antígeno rHA. La preparación de liposomas se extruyó haciendo pasar el material a través de una membrana de policarbonato de 200 nanómetros. Por cada 450 microlitros de suspensión de liposomas que contienen rHA se añadieron 133 microgramos de adyuvante Polil:C basado en ARN (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). Por cada 500 microlitros de una suspensión de liposoma/antígeno/adyuvante, se añadió un volumen igual de un vehículo de aceite mineral (Montanide (TM) ISA 51, suministrado por Seppic, Francia) para formar una emulsión agua en aceite emulsión con la suspensión de liposomas contenida dentro de la fase acuosa de la emulsión y el aceite formando una fase hidrófoba continua. Cada dosis de vacuna consistió en 30 microlitros de la emulsión descrita anteriormente que contiene liposomas, el antígeno rHA, adyuvante polil:C y el vehículo de aceite mineral. Esta formulación concreta se denominará liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo.

65 La eficacia de la vacuna liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo descrita anteriormente se comparó con la eficacia de una vacuna control acuosa que contiene antígeno rHA y un adyuvante polil:C basado en ARN. En dos grupos de

ratones (9 o 10 ratones por grupo) se inyectó una vez, por vía intramuscular, 30 microlitros por dosis. Los ratones del grupo 1 se vacunaron con la vacuna B que comprende de 1 microgramo de rHA y 4 microgramos de polil:C formulada como liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo como se ha descrito anteriormente.

5 En los ratones del grupo 2 se inyectó la vacuna control con polil:C que comprende 1 microgramo rHA y 4 microgramos Polil:C formulados en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). Se obtuvieron muestras de suero de todos los ratones a los 18 y 28 días de la inmunización y después cada cuatro semanas durante un total de 16 semanas. Los títulos de anticuerpos frente a rHA de las muestras de suero se examinaron mediante ELISA como se describe en el ejemplo 1.

10 Los ratones del grupo 2 generaron una respuesta detectable de anticuerpos específica de antígeno después de la administración de una vacuna control adyuvada con polil:C. Los ratones del grupo 1, vacunados con la formulación liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo produjeron títulos de punto final significativamente mejores en comparación con los del Grupo 2. Los ratones del grupo 2 generaron títulos de hasta 1/512.000 (valor log10 de 5,71 1) a los 8 días de la vacunación y de hasta 1/2.048.000 (valor log10 de 6,31) a los 12 días (16 semanas) de la vacunación. Como se ha indicado anteriormente, la presencia de tales respuestas de anticuerpos confirma una verdadera respuesta inmunitaria generada como resultado de la vacunación. Los ratones del grupo 1, vacunados con la vacuna correspondiente a la invención, fueron capaces de generar títulos de punto final alcanzaron hasta 1/4.096.000 (valor log10 de 6,61) a las 8, 12 y 16 semanas de la vacunación. Estos resultados confirman que las formulaciones de liposoma/vehículo hidrófobo que contienen un Adyuvante polil:C son capaces de generar una respuesta inmunitaria in vivo duradera y sustancialmente mayor en comparación con una solución control acuosa/polil:C vacunación (valor p <0,02 en la semana 4 y la semana 16 después de la vacunación). Los títulos de anticuerpos que eran 7 veces mayor que la media a puntos de tiempo tempranos (semana 4 tras la vacunación) y 9 veces mayor de media a puntos de tiempo tardíos (16 semanas después de la vacunación) se lograron en la presencia de liposomas y un vehículo hidrófobo en la vacuna. Esto sugiere que los componentes de liposoma y vehículo hidrófobo son importantes para la generación de las fuertes respuestas inmunitarias observadas.

Ejemplo 6

30 Ratones BALB/c hembras sin patógenos, de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canadá) y se alojaron de acuerdo con las directrices institucionales con agua y comida *ad libitum*, con circulación del aire controlada con filtro.

35 Como en los ejemplos 1 a 5, la proteína hemaglutinina recombinante de H5N1, correspondiente a la glucoproteína hemaglutinina en la superficie del virus de la gripe H5N1, se adquirió de Protein Sciences (Meridien, CT, EE.UU.). Esta proteína recombinante, en lo sucesivo denominada rHA, se utilizó como antígeno modelo para probar la eficacia de las formulaciones de vacuna. La rHA se utilizó a 1,5 microgramo por dosis de 50 microlitros.

40 Para formular la vacuna correspondiente a la invención, una mezcla homogénea de 10: 1 p: p de lecitina S100 y colesterol (lipoide GmbH, Alemania) se hidrató en presencia de una solución adyuvante rHA y polil:C (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) en tampón de fosfato para formar liposomas con rHA encapsulado y seguido de la adición de polil:C (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). En resumen, 30 microgramos de rHA se suspendieron en 750 microlitros de tampón fosfato milimolar (pH 7,0) después se añadieron a 132 miligramos de la mezcla de lecitina S100/colesterol para formar aproximadamente 900 microlitros de una suspensión de liposomas que encapsula el antígeno rHA. La preparación de liposomas se extruyó haciendo pasar el material a través de una extrusora semi-automática (Avestin, Ottawa, ON, Canadá) equipada con una membrana de policarbonato de 200 nanómetros a una velocidad de flujo de 100 mililitros por minuto. A los liposomas de tamaño se añadieron 250 microgramos de adyuvante de polil:C basado en ARN en tampón fosfato 50 milimolar (pH 7,0) para diluir la preparación a 1 mililitro. Después, los liposomas se liofilizaron utilizando el secador por congelación Virtis Advantage (SP Industries, Warminster, PA, EE.UU.). Por cada 1 mililitro de suspensión de liposomas original que contiene rHA y polil:C, se utilizaron 800 microlitros de un vehículo de aceite mineral (Montanide (TM) de la ISA 51, Seppic, Francia) para reconstituir los liposomas liofilizados. Cada dosis de vacuna consistió en 50 microlitros de la emulsión descrita anteriormente que contiene liposomas, el antígeno rHA, adyuvante polil:C y el vehículo de aceite mineral. Esta formulación de vacuna se denominará liposomas liofilizados/polil:C/vehículo hidrófobo.

55 La eficacia de la formulación de liposomas liofilizados descrita anteriormente se comparó con la eficacia de una vacuna control que consiste en 1,5 microgramos de rHA y 100 microgramos de adyuvante de alumbre (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) en 50 microlitros de tampón fosfato 50 milimolar (pH 7,0). En los ratones del grupo 1 (N = 10) se inyectó una vez por vía intramuscular (sin refuerzo) la vacuna D que comprende de 1,5 microgramos de antígeno rHA y 12,5 microgramos de adyuvante polil:C basado en ARN formulado en 50 microlitros de liposomas liofilizados/polil:C/vehículo hidrófobo como se ha descrito anteriormente. Los ratones del grupo 2 (N = 10, las semanas 3 y 4 se redujeron a N = 9 las semanas 6 y 9 debido a una eliminación no relacionada con la vacuna no programada de un animal) se vacunaron dos veces (día 0 y día 28) con una vacuna control de alumbre que comprende 1,5 microgramos de rHA y 100 microgramos de adyuvante de alumbre en suspensión en tampón fosfato 50 milimolar. Se obtuvieron muestras de suero de todos los ratones a los 3, 4 y 9 semanas tras la inmunización. Los títulos de anticuerpos frente a rHA en estos sueros de se examinaron mediante ELISA como se describe en el

ejemplo 1.

Los ratones del grupo 2 generaron una respuesta de anticuerpos específica de antígeno únicamente después de la administración de 2 dosis (inmunización primaria y refuerzo) de una vacuna control con adyuvante de alumbre. Los ratones del grupo 1, vacunados con una sola dosis de la formulación de liposomas liofilizados/polil:C/vehículo hidrófobo, produjeron títulos de punto final significativamente mejores en comparación con los del Grupo 2 a los puntos de tiempo analizados, a pesar de que los animales del Grupo 2 se vacunaron dos veces. Los ratones del grupo 2 registraron los títulos de fondo 3 semanas después de la vacunación primaria y de un individuo generó un título máximo de 1/8.000 (log₁₀ igual a 3,39) a las 4 semanas. Después del refuerzo, los ratones del grupo 2 generaron títulos de hasta 1/64.000 (valor log₁₀ de 4,81) a las 6 y 9 semanas de la inmunización. Los ratones del grupo 1, vacunados con la vacuna correspondiente a la invención, fueron capaces de generar títulos de punto final que alcanzan hasta 1/128.000 (valor log₁₀ de 5,11) a las 3 y 4 semanas de la vacunación y 1/512.000 (valor log₁₀ de 5,71) a las 6 y 9 semanas de la inmunización. Estos resultados confirman, utilizando una especie diferente de ratón que la usada en el ejemplo 3, que una sola dosis de las formulaciones de liposomas liofilizados/vehículo hidrófobo que contiene un adyuvante polil:C es capaz de generar una respuesta inmunitaria humoral significativamente mejor en comparación con una vacunación control acuosa/alumbre reforzada. Los niveles de anticuerpos fueron 24 veces más altas que una sola dosis de la vacuna control en la semana 4 después de la vacunación (valor P <0,001) y 9 veces mayor que dos dosis de la vacuna control en el punto de tiempo tardío de 9 semanas después de la vacunación (P valor <0,01). Además, los resultados de los ejemplos 3 y 6 indican que el adyuvante polil:C se puede incorporar en la formulación de liposomas liofilizados vehículo hidrófobo antes o después de la extrusión de los liposomas.

Ejemplo 7

Ratones BALB/c hembras sin patógenos, de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canadá) y se alojaron de acuerdo con las directrices institucionales con agua y comida *ad libitum*, con circulación del aire controlada con filtro.

Como en los ejemplos 1 a 6, la proteína hemaglutinina recombinante de H5N1, correspondiente a la glucoproteína hemaglutinina en la superficie del virus de la gripe H5N1, se adquirió de Protein Sciences (Meridien, CT, EE.UU.). Esta proteína recombinante, en lo sucesivo denominada rHA, se utilizó como antígeno modelo para probar la eficacia de las formulaciones de vacuna. La rHA se utilizó a 1,5 microgramo por dosis de 50 microlitros.

En este ejemplo, liposomas liofilizados/polil:C/vehículo hidrófobo se administró por vía intramuscular una vez (sin refuerzo) o por vía subcutánea una vez (sin refuerzo) para evaluar la generación de una respuesta de linfocitos citotóxicos específicos de antígeno.

Para formular la vacuna correspondiente a la invención, se utilizaron los mismos procedimientos descritos en el ejemplo 6. En resumen, los liposomas se formularon hidratando una mezcla homogénea de 10: 1 p: p de lecitina S100 y colesterol (lipoide GmbH, Alemania) en presencia de rHA en tampón fosfato, seguido de la adición de polil:C basado en ARN (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). La suspensión de liposomas se liofilizó y se resuspendió en un vehículo de aceite mineral (Montanide ISA 51 (TM), SEPPIC, Francia). Cada dosis de vacuna (Vacuna D) consistió en 50 microlitros de la emulsión descrita anteriormente que contiene liposomas (6,6 mg de S100/lípidos de colesterol), el antígeno rHA (1,5 microgramos), adyuvante polil:C (12,5 microgramos) y el vehículo de aceite mineral. Esta formulación de vacuna se denominará liposomas liofilizados/polil:C/vehículo hidrófobo. Los ratones del Grupo 1 (n = 4) recibieron esta formulación por vía intramuscular como en el ejemplo 6. Los ratones del Grupo 2 (n = 4) recibieron esta vacuna por vía subcutánea.

Los ratones del Grupo 3 (n = 4) se vacunaron con la vacuna de alumbre de control que consiste en 1,5 microgramos de rHA y 100 microgramos de adyuvante de alumbre inyectable (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) en 50 microlitros de tampón de fosfato 50 milimolar (pH 7,0) . Los ratones fueron inyectados por vía intramuscular una vez (sin refuerzo). Los ratones del grupo 4 ratones (n = 2) no estaban sensibilizados y no recibieron ninguna inmunización.

Veintidós días después de la vacunación, se sacrificó a los animales por asfixia inducida con dióxido de carbono. Se obtuvieron los bazos y las suspensiones de células individuales se prepararon usando procedimientos estándar. Los glóbulos rojos se lisaron usando tampón de lisis ACK (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 0,1 mM, Na₂EDTA 10 mM en H₂O destilada). Para aumentar las células T específicas de antígeno, los esplenocitos se cultivaron a 1 x 10⁶ células por mililitro en medio completo RPMI 1640 (Invitrogen, Burlington, ON, Canadá) que contiene 1% de penicilina/estreptomina/glutamina, 0,1% de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich , St. Louis, MO, EE.UU.) y 10% de suero bovino fetal (Hyclone, Logan, UT, EE.UU.) suplementado con 20 unidades por mililitro de IL-2 humana recombinante (Sigma-Aldrich) y 10 microgramos por mililitro de rHA durante 4 días a 37 ° C, dióxido de carbono al 5%. El análisis de citometría de flujo de tres colores se realizó en esplenocitos para detectar células T CD8 + específicas de antígeno. Las células se bloquearon con un tratamiento de 10 minutos a temperatura ambiente del bloque FC (eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.). Las células se tiñeron después con pentámero (I9L)/H2-Kd/IYSTVASSL (I9L) marcado con ficoeritrina obtenido de ProlImmune (Bradenton, FL, EE.UU.) durante 20 minutos a 4 ° C. I9L es el epítipo inmunodominante H2-Kd de rHA (518-528) y el reactivo pentámero detecta la presentación al

- MHC I de este epítipo por el ratón. A continuación, las células se tiñeron con anti-CD19-isotiocianato de fluoresceína (FITC) (eBioscience) y anti-CD8 β - Aloficocianina (APC) (eBioscience) durante 30 minutos a 4 ° C protegido de la luz, se lavaron y se fijaron en tampón fosfato 50 milimolar (pH 7,0) con 0,1% de paraformaldehído. 5 \times 10⁵ células se adquirieron en un citómetro de flujo (FACSCalibur(TM) (BD Bioscience, Missisauga, ON, Canadá) y se analizaron usando el software WinList 6,0 (Verity Inc, Topsham, ME, EE.UU.). Los resultados se acotaron en base a la dispersión frontal y lateral y las células T CD8 específicas de antígeno se definieron como positivas para el pentámero, positivas para CD8 β y negativas para CD19. Se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba t de Student de dos colas.
- Los ratones vacunados con la formulación control a base de alumbre generaron una pequeña población de células T CD8 específicas de antígeno (0,045%). Los ratones vacunados con la formulación de liposomas liofilizados/polil:C/vehículo hidrófobo de la presente invención administrada por vía intramuscular o subcutánea, generaron una población significativamente mayor de células CD8 T específicas de antígeno (0,23% y 0,17%, respectivamente; p = < 0,025 para ambos en comparación con el control alumbre). Estos resultados demuestran que el rHA formulado en la invención se puede administrar por vía intramuscular o por vía subcutánea y generar una población significativamente mayor de células T CD8 + específicas de antígeno representativas de una respuesta inmunitaria celular en comparación con una formulación de vacuna convencional usando alumbre.

Ejemplo 8

- Ratones CD1 hembras sin patógenos, de 6-8 semanas de edad y conejos hembra New Zealand White de 2-3 kilogramos de peso se obtuvieron de Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canadá) y se alojaron de acuerdo con las directrices institucionales con agua y comida *ad libitum*, con circulación del aire controlada filtrado.
- Como en los ejemplos 1 a 7, la proteína hemaglutinina recombinante de H5N1, correspondiente a la glucoproteína hemaglutinina en la superficie del virus de la gripe H5N1, se adquirió de Protein Sciences (Meridien, CT, EE.UU.). Esta proteína recombinante, en lo sucesivo denominada rHA, se utilizó como antígeno modelo para probar la eficacia de las formulaciones de vacuna. La rHA se utilizó a 0,5 microgramo por dosis de 50 microlitros en ratones y 2 microgramos por dosis de 200 microlitros en los conejos.
- La eficacia de la vacuna se evaluó mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación (IHA) llevadas a cabo por Benchmark Biolabs (Lincoln, NE, EE.UU.). En resumen, las muestras de suero se pretrataron con una enzima de destrucción del receptor y se preabsorbieron en glóbulos rojos de pollo para evitar cualquier reacción no específica de inhibición de la hemaglutinación. Después, las diluciones en serie de los sueros se incubaron después con 0,7% de glóbulos rojos equinos, 0,5% de seroalbúmina bovina y 8 unidades del virus de la gripe A/Vietnam/1203/2004[H5N1]. Los títulos calculados representan la dilución más alta a la que la muestra de suero puede inhibir completamente la hemaglutinación de los glóbulos rojos de la sangre.
- Para formular la primera vacuna correspondiente a la invención, una mezcla homogénea de 10: 1 p: p de lecitina S100 y colesterol (lipoide GmbH, Alemania) se hidrató en presencia de una solución adyuvante rHA y polil:C (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) en tampón de fosfato para formar liposomas con rHA encapsulado y seguido de la adición de polil:C basado en ARN (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). En resumen, 10 microgramos de rHA se suspendieron primero en 650 microlitros de tampón fosfato milimolar (pH 7,0) después se añadieron a 132 miligramos de la mezcla de lecitina S100/colesterol para formar aproximadamente 800 microlitros de una suspensión de liposomas que encapsula el antígeno rHA. La preparación de liposomas se extrudió después haciendo pasar el material a través de una mini-extrusora manual (Avanti, Alabaster, AL, EE.UU.) equipada con una membrana de policarbonato de 200 nanómetros. Se añadieron 240 microgramos de Adyuvante polil:C en tampón fosfato 50 milimolar (pH 7,0) a los liposomas de tamaño. Después, los liposomas se liofilizaron utilizando el secador por congelación Virtis Advantage (SP Industries, Warminster, PA, EE.UU.). El material liofilizado se reconstituyó con un vehículo de aceite mineral (Montanide (TM) ISA 51, suministrado por Seppic, Francia) hasta el volumen original de 1 mililitro liposomas solubilizados. Cada dosis de vacuna administrada a los ratones consistió en 50 microlitros de la emulsión descrita anteriormente combinando liposomas, el antígeno rHA, adyuvante polil:C y el vehículo de aceite mineral. Estas formulaciones de vacuna se denominará liposomas liofilizados/polil:C/vehículo hidrófobo.
- Para formular la segunda vacuna también correspondiente a la invención, se usaron los mismos procedimientos descritos anteriormente con la siguiente excepción: después de la formación de liposomas que encapsulan el antígeno rHA, la preparación de liposomas se extrudió haciendo pasar el material a través de una mini-extrusora manual equipada con dos membranas de policarbonato de 400 nanómetros- A los liposomas de tamaño se añadieron 250 microgramos de adyuvante de polil:C basado en ARN en tampón fosfato 50 milimolar (pH 7,0) para diluir la preparación a 1 mililitro. Los liposomas se liofilizaron a continuación, utilizando el secador por congelación Virtis Advantage y el material liofilizado se reconstituyó al 1 mililitro original usando un vehículo de aceite mineral (Montanide (TM) ISA 51, Seppic, Francia). Cada dosis de vacuna administrada a los conejos consistió en 200 microlitros de la emulsión descrita anteriormente que contiene liposomas, el antígeno rHA, adyuvante polil:C y el vehículo de aceite mineral. Esta formulación de vacuna también se denominará liposomas liofilizados/polil:C/vehículo hidrófobo.

La eficacia de las formulaciones de liposomas liofilizados descritos anteriormente se ensayó usando dos modelos animales diferentes. Los animales se vacunaron con formulaciones comparables; el volumen de inyección se ajustó según sea apropiado para el tamaño de los animales. A un grupo de ratones (N = 5) se inyectó por vía intramuscular la vacuna F que comprende 0,5 microgramos del antígeno rHA y 12 microgramos de adyuvante polil:C formulado en 50 microlitros de liposomas liofilizados/polil:C/vehículo hidrófobo como se ha descrito anteriormente. A un grupo de conejos (N = 5) se inyectó por vía subcutánea la vacuna E que comprende 2 microgramos del antígeno rHA y 50 microgramos de adyuvante polil:C formulado en 200 microlitros de liposomas liofilizados/polil:C/vehículo hidrófobo como se ha descrito anteriormente. Se extrajo sangre a todos los animales antes de la inyección y después de nuevo en 4 o 5 semanas después de la inmunización. Los títulos de IHA en estos sueros fueron examinados mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación H5N1 descrito anteriormente.

A los 4 o 5 semanas de la vacunación con las formulaciones de liposomas liofilizados/polil:C/vehículo hidrófobo tanto los ratones como los conejos generaron títulos de IHA que indican protección contra la gripe H5N1. A título de i.e. en suero de 40 (log 10 igual a 1,60) está normalmente aceptado que significa que un individuo tiene un nivel protector de anticuerpos dirigidos a una cepa específica de la gripe. A las 5 semanas de la vacunación, los ratones generaron títulos que van desde 128 (log 10 de 2,11) a 512 (log 10 de la 2,71). A las 4 semanas después de la inmunización, los conejos generaron títulos de IHA que van desde 64 (log 10 igual a 1,81) hasta 1024 (log 10 de la 3,01). En general se acepta que una sola vacunación de rHA utilizada a las dosis descritas anteriormente es incapaz de inducir altos títulos de IHA que los obtenidos en todos sujeto vacunados. Los títulos de esta magnitud, generados en dos modelos animales diferentes, muestran que las formulaciones de liposomas liofilizados/PoLil:C/vehículo hidrófobo es particularmente eficaz en la generación de niveles de anticuerpos fuertes en el intervalo de protección (IHA > 20 o el valor de > 1,3 log) en todos los sujetos vacunados en tan solo 4 semanas después de la vacunación.

Ejemplo 9

Ratones CD1 hembras sin patógenos, de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canadá) y se alojaron de acuerdo con las directrices institucionales con agua y comida *ad libitum*, con circulación del aire controlada con filtro.

El fragmento de la proteína β -amiloide (1-43) se adquirió en Anaspec (San Jose, CA, EE.UU.) y se usó como un antígeno modelo para probar la eficacia de las formulaciones de vacuna. Este péptido, denominado en lo sucesivo β -amiloide, tiene un peso molecular de aproximadamente 4.600 daltons y está asociado a la formación de placas en los cerebros de los pacientes de Alzheimer. Se utilizó β -amiloide a 10 microgramos por dosis de 100 microlitros.

El péptido de 21 aminoácidos FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE, en lo sucesivo, F21 E, se adquirió en NeoMPS (San Diego, CA, EE.UU.). Este péptido toxoide del tétanos (aminoácidos 947-967) se identifica como un epítipo de células T colaboradoras. F21 E se usó como un modelo de epítipo T colaborador para probar la eficacia de las formulaciones de vacuna; se usó a 20 microgramos por dosis de 100 microlitros.

Como en los ejemplos 1 a 6, la eficacia de la vacuna se evaluó mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los mismos procedimientos descritos en el ejemplo 1 se utilizaron con los cambios para permitir la detección de anticuerpos específicos β -amiloide. En pocas palabras, una placa de microtitulación de 96 pocillos se reviste con antígeno (β -amiloide, 1 microgramo/mililitro) durante la noche a 4 grados centígrados, se bloquea con 3% de gelatina durante 30 minutos, a continuación se incuba durante la noche a 4 grados centígrados con diluciones en serie de los sueros, comenzando típicamente a una dilución de 1/1000. Después se añaden un reactivo secundario (proteína G conjugada con fosfatasa alcalina, EMD chemicals, Gibbstown, NJ, EE.UU.) cada pocillo a una dilución 1/500 durante una hora a 37 grados centígrados. Tras una incubación de 60 minutos con una solución que contiene 1 miligramo/mililitro de 4-nitrofenilfosfato sal disódica hexahidrato (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Suiza), la absorbancia a 405 nanómetros de cada pocillo se midió usando un lector de placas de microtitulación (ASYS Hitech GmbH, Austria). Los títulos de punto final se calculan como se describe en Frey A. et al (Journal of Immunological Methods, 1998, 221:35-41). Los títulos calculados representan la dilución más alta a la que se observó un aumento estadísticamente significativo de la absorbancia en muestras de suero de ratones inmunizados frente a muestras de suero de ratones control no inmunizados no sensibilizados. Los títulos se presentan como valores log₁₀ de la dilución de punto final.

Para formular la vacuna descrita en el presente documento, una mezcla de 10: 1 peso: peso homogénea de S100 lecitina y colesterol (Lipoid GmbH, Alemania) se hidrató en presencia de una solución de β -amiloide y F21 E en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) para formar liposomas con antígeno y células T colaboradoras encapsulados. En resumen, 100 microgramos de β -amiloide y 200 microgramos de F21 se suspendieron primero en 300 microlitros de solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) después se añadió a 132 miligramos de la mezcla de lecitina S100/colesterol para formar aproximadamente 450 microlitros de una suspensión de liposomas que encapsula el antígeno β -amiloide Y F21E colaborador T. La preparación de liposomas se extruyó haciendo pasar el material a través de una mini-extrusora manual (Avanti, Alabaster, AL, EE.UU.) equipada con una membrana de policarbonato de 400 nanómetros. Por cada 450 microlitros de suspensión de liposomas que contienen β -amiloide y F21 E, se añadieron dos miligramos de adyuvante para inyecciones de alumbre (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). Por

cada 500 microlitros de una suspensión de liposoma/antígeno/colaborador T/adyuvante, se añadió un volumen igual de un vehículo de aceite mineral (conocida como Montanide (TM) ISA 51, suministrado por Seppic, Francia) para formar una emulsión agua en aceite emulsión con la suspensión de liposomas contenida dentro de la fase acuosa de la emulsión y el aceite formando una fase hidrófoba continua. Cada dosis de vacuna consistió en 100 microlitros de la emulsión descrita anteriormente que contiene liposomas, antígeno β -amiloide, T colaborador F21 E, adyuvante de alumbre y el vehículo de aceite mineral. Esta formulación de la vacuna se denominará liposoma/alumbre/vehículo hidrófobo.

Para formular la vacuna correspondiente a la invención, se usaron los mismos procedimientos descritos anteriormente con la siguiente excepción: : después de la formación de liposomas que encapsulan β -amiloide y F21 E, después de la extrusión de la suspensión de liposomas a través de una membrana de policarbonato de 400 nanómetros, se añadieron 100 microgramos de adyuvante polil:C basado en ARN (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) a cada 450 microlitros de liposomas. Por cada 500 microlitros de una suspensión de liposoma/antígeno/T colaborador/adyuvante, se añadió un volumen igual de un vehículo de aceite mineral (Montanide (TM) ISA 51, suministrado por Seppic, Francia) para formar una emulsión agua en aceite emulsión con la suspensión de liposomas contenida dentro de la fase acuosa de la emulsión y el aceite formando una fase hidrófoba continua. Cada dosis de vacuna consistió en 100 microlitros de la emulsión descrita anteriormente que contiene liposomas, antígeno β -amiloide, T colaborador F21 E, adyuvante de polil:C y el vehículo de aceite mineral. Esta formulación concreta se denominará liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo.

La eficacia de las dos formulaciones de emulsión descritas anteriormente se comparó. En dos grupos de ratones (9 ratones por grupo) se inyectó por vía intraperitoneal las formulaciones de vacuna de liposomas, del siguiente modo: Los ratones del grupo 2 se vacunaron con la vacuna G que comprende de 10 microgramos de β -amiloide y 20 microgramos de F21E formulada en 100 microlitros de liposoma/alumbre/vehículo hidrófobo como se ha descrito anteriormente. Cada dosis de vacuna contenía efectivamente 200 microgramos de alumbre. Los ratones del grupo 1 se vacunaron con la vacuna H que comprende de 10 microgramos de antígeno β -amiloide y 20 microgramos de F21E formulada en 100 microlitros de liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo como se ha descrito anteriormente. Cada dosis de vacuna contenía eficazmente 10 microgramos de polil:C. Las muestras de suero se recogieron de todos los ratones a las 4, 8 y 12 semanas de la inmunización. Los títulos de anticuerpos en estos sueros se analizaron mediante ELISA como se ha descrito anteriormente.

Los ratones del grupo 2, vacunados con una dosis única de una formulación de liposoma/alumbre/vehículo hidrófobo, generaron una respuesta de anticuerpos específica de antígeno detectable como se esperaba. Los títulos de punto final a las 4 y 8 semanas de la vacunación fueron de hasta 1/32.000 (valor \log_{10} de 4,51) ya las 12 semanas fueron hasta 1/64.000 (\log_{10} de 4,81). La presencia de tales respuestas de anticuerpos confirma que se había generado una verdadera respuesta inmunitaria como resultado de la vacunación. Los ratones del grupo 1 a los que se inyectó una vez la formulación correspondiente a la invención fueron capaces de generar una respuesta inmunitaria mejorada con títulos de punto final que alcanzaron hasta 1/256.000 (valor \log_{10} de 5,41) a las 4, 8 y 12 semanas de la vacunación. Los títulos generados con la invención fueron 7 veces mayores de media en cada punto de tiempo con respecto a los títulos generados por la formulación de control que contiene el adyuvante genérico alumbre. El aumento de los títulos logrado con la invención fue estadísticamente significativo (valor de $p < 0,01$ en las semanas 8 y 12 de la vacunación). Estos resultados confirman mediante el uso de un modelo de antígeno diferente que las formulaciones de liposomas liofilizados/vehículo hidrófobo que contiene un adyuvante polil:C son capaces de generar una respuesta inmunitaria in vivo significativamente mejorada en comparación con una vacunación de liposoma/alumbre/hidrófobo.

Ejemplo 10

Ratones CD1 hembras sin patógenos, de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canadá) y se alojaron de acuerdo con las directrices institucionales con agua y comida *ad libitum*, con circulación del aire controlada con filtro.

La proteína recombinante hemaglutinina H5N1 se adquirió en Protein Sciences (Meridien, CT, EE.UU.). Esta proteína recombinante tiene un peso molecular aproximado de 72.000 daltons y corresponde a la glucoproteína hemaglutinina, una proteína antigénica presente en la superficie del virus de la gripe H5N1. Esta proteína recombinante, en lo sucesivo denominada rHA, se utilizó como antígeno modelo para probar la eficacia de las formulaciones de vacuna. La rHA se utilizó a 0,5 microgramo por dosis de 50 microlitros.

Se evaluaron las respuestas inmunitarias tanto humoral (TH1) como celular (TH2) mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un método que permite la detección de los niveles de anticuerpos específicos de antígeno en el suero de los animales inmunizados. En pocas palabras, una placa de microtitulación de 96 pocillos se reviste con antígeno (rHA, 1 microgramo/mililitro) durante la noche a 4 grados centígrados, se bloquea con 3% de gelatina durante 30 minutos, a continuación se incuba durante la noche a 4 grados centígrados con diluciones en serie de los sueros, comenzando típicamente a una dilución de 1/2000. Después se añaden un anticuerpo secundario, anti-IgG a cada pocillo a una dilución 1/2000 durante una hora a 37 grados centígrados. Para

la detección de anticuerpos IgG2a, indicativo de una respuesta celular TH 1, se usó anticuerpo de cabra anti-ratón IgG2a (SouthernBiotech, Birmingham, AL, EE.UU.). Para la detección de una respuesta humoral TH2 IgG1 de cabra anti-ratón (SouthernBiotech, Birmingham, AL, EE.UU.) se utilizó el reactivo secundario. Tras una incubación de 60 minutos con una solución que contiene 1 miligramo/mililitro de 4-nitrofenilfosfato sal disódica hexahidrato (Sigma-
 5 Aldrich Chemie GmbH, Suiza), la absorbancia a 405 nanómetros de cada pocillo se midió usando un lector de placas de microtitulación (ASYS Hitech GmbH, Austria). Los títulos de punto final se calculan como se describe en Frey A. et al (Journal of Immunological Methods, 1998, 221:35-41). Los títulos calculados representan la dilución más alta a la que se observó un aumento estadísticamente significativo de la absorbancia en muestras de suero de ratones inmunizados frente a muestras de suero de ratones control no inmunizados no sensibilizados. Los títulos se
 10 presentan como valores log₁₀ de la dilución de punto final.

Para formular vacunas correspondientes a la invención, una mezcla homogénea de 10: 1 peso: peso de lecitina S100 y colesterol (lipoide GmbH, Alemania) se hidrató en presencia de una solución de rHA en tampón fosfato para formar liposomas con rHA encapsulado y seguido de la adición de polil:C basado en ARN (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) como se describe en el ejemplo 8. En resumen, 10 microgramos de rHA se suspendieron primero en 650 microlitros de tampón fosfato 50 milimolar (pH 7,0) después se añadió a 132 miligramos de la mezcla de lecitina S100/colesterol para formar aproximadamente 800 microlitros de una suspensión de liposomas con el antígeno rHA encapsulado. La preparación de liposomas se extruyó después haciendo pasar el material a través de una mini-extrusora manual (Avanti, Alabaster, AL, EE.UU.) equipada con una membrana de policarbonato de 200 nanómetros. A los liposomas de tamaño se añadió adyuvante Polil:C en tampón fosfato 50 milimolar (pH 7,0) para diluir la preparación a 1 mililitro. Para la formulación de "dosis altas" de polil:C se añadieron 240 microgramos de polil:C en tampón fosfato y para la formulación de "dosis bajas" de polil:C se añadieron 50 microgramos de polil:C. Después, los liposomas se liofilizaron utilizando el secador por congelación Virtis Advantage (SP Industries, Warminster, PA, EE.UU.). El material liofilizado se reconstituyó con un vehículo de aceite mineral (Montanide (TM) ISA 51, suministrado por Seppic, Francia) hasta el volumen original de -1 mililitro liposomas solubilizados. Cada dosis de vacuna consistió en 50 microlitros de la emulsión descrita anteriormente combinando liposomas, el antígeno rHA, adyuvante polil:C y el vehículo de aceite mineral. Estas formulaciones de vacunas se conocen como liposomas liofilizados/Polil:C (alto)/vehículo hidrófobo y liposomas liofilizados/Polil:C (bajo)/vehículo hidrófobo.

Las respuestas TH1 y TH2 generadas como resultado de la vacunación con las formulaciones de liposomas liofilizados que contienen Adyuvante polil:C se compararon. Dos grupos de ratones (N = 5 por grupo) se inyectó por vía intramuscular 50 microlitros de la vacuna E que comprenden 0,5 microgramos de rHA y 12 microgramos de Polil:C formulados como liposomas liofilizados/polil:C (alto)/vehículo hidrófobo (Grupo 1) o la vacuna I que comprende 0,5 microgramos de rHA y 2,5 microgramos de polil:C formulados como liposomas liofilizados/polil:C (bajo)/vehículo hidrófobo (Grupo 2). Las muestras de suero se recogieron a las 5 semanas de la inmunización y los títulos de anticuerpos IgG2a se analizaron como se ha descrito anteriormente.

Los ratones del Grupo 1 generaron títulos de IgG1 títulos de hasta 2.048.000 (valor log₁₀ de 6,31) a las 5 semanas de la inmunización que es comparable a los resultados de la respuesta humoral de la formulación de liposomas liofilizados/polil:C/vehículo hidrófobo usada en los títulos del ejemplo 3. Los títulos de IgG2a, indicativos de una respuesta celular, fueron de hasta 4.096.000 (log₁₀ igual a 6,61) a las 5 semanas de la vacunación. Los ratones del Grupo 2, vacunados con una dosis menor de Polil:C, generaron a la 5 semanas de la vacunación títulos de IgG1 de hasta 4.096.000 (log₁₀ de 6,61) y títulos de IgG2a también hasta 4.096.000. Los resultados muestran que Adyuvante polil:C formulado en diferentes concentraciones en una formulación de liposomas liofilizados/vehículo hidrófobo es capaz de generar respuestas inmunitarias tanto humorales (TH2) como celulares (TH1). Estos resultados sugieren que las formulaciones descritas anteriormente son capaces de generar respuestas inmunitarias celulares y humorales en sujetos vacunados.

Ejemplo 11

Ratones C57BL6 hembras sin patógenos, de 4-6 semanas de edad se obtuvieron de Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canadá) y se alojaron de acuerdo con las directrices institucionales con agua y comida *ad libitum*, con circulación del aire controlada con filtro.

El antígeno usado en las formulaciones de vacunas fue una proteína de fusión que consiste en el epítipo inmunodominante H2-Db de HPV16 E7 (49-57; RAHYNIVTF) fusionado con el epítipo universal de colaboradores T PADRE. Este antígeno, en lo sucesivo denominado FP, fue sintetizado por Anaspec Inc. (San Jose, CA). El adyuvante era una molécula de ARN poli-inosina citosina basada en ARN proporcionada por Sigma-Genosys (St. Louis, MO).

La eficacia de la invención que comprende liposomas, una molécula poli IC basada en ARN y un vehículo hidrófobo se analizó in vivo usando un modelo de exposición al tumor C3. Células C3 contienen el genoma virus del papiloma humano 16 (HPV16) genoma y como resultado, presente en su superficie el epítipo HPV16 E7 (aminoácidos 49-57; RAHYNIVTF), que puede ser objetivo de la vacunación. Células C3 crecen en tumores sólidos medibles cuando se inyecta por vía subcutánea. En tres grupos de ratones (n = 8 por grupo) se implantaron por vía subcutánea en el flanco la línea de células C3 tumorales que expresan el HPV16 (5x10⁵ células/ratón) el día 0. El día 8, los ratones de

los grupos 1 y 2 se vacunaron por vía subcutánea en el flanco opuesto con 100 microlitros de vacuna. Los ratones del Grupo 3 recibieron PBS solo y sirvió como el control del crecimiento del tumor. El volumen del tumor se midió una vez a la semana utilizando calibradores para registrar el diámetro menor y el diámetro más largo durante 5 semanas después de la implantación. El volumen del tumor se calculó usando la siguiente fórmula: Medición más larga x (medición más corta)² dividido por 2.

La vacuna de control (emulsión convencional) usada para inmunizar al Grupo 1 se formuló mediante la mezcla de 300 microgramos de antígeno FP y 3 miligramos de adyuvante polil:C en 1 mililitro de PBS. Por cada 500 microlitros de suspensión antígeno/adyuvante se añadió un volumen igual de un vehículo de aceite mineral (Montanide (TM) ISA 51, suministrado por Seppic, Francia) para formar una emulsión de agua en aceite. Cada dosis de vacuna consistió en 100 microlitros de la emulsión descrita que contiene el antígeno FP (15 microgramos) y adyuvante polil:C (150 microgramos) y el vehículo de aceite mineral. Esta formulación de vacuna se denominará polil:C/vehículo hidrófobo.

Para formular la vacuna (vacuna K) correspondiente a la invención para el grupo 2 se utilizaron los mismos procedimientos descritos en el ejemplo 1. Brevemente, 150 microgramos de antígeno FP se mezclaron con una mezcla de lecitina de DOPC/colesterol (10: 1, p: p; Lipoid GmbH, , Alemania) disuelto en terc-butanol y se liofilizó. Los liposomas se formularon añadiendo 1 mililitro del tampón fosfato 50 milimolar (pH 7,0) que contiene 1,5 miligramos de polil:C. La preparación de liposomas se extruyó haciendo pasar el material a través de una mini-extrusora manual (Avanti, Alabaster, AL, EE.UU.) equipada con una membrana de policarbonato de 200 nanómetros. El tamaño de los liposomas se confirmó en 200 nanómetros utilizando un Malvern Particle Size Analyzer (Worcestershire, Reino Unido). Por cada 500 microlitros de una suspensión de liposoma/antígeno/adyuvante, se añadió un volumen igual de un vehículo de aceite mineral (Montanide (TM) ISA 51, suministrado por Seppic, Francia) para formar una emulsión agua en aceite emulsión con la suspensión de liposomas contenida dentro de la fase acuosa de la emulsión y el aceite formando una fase hidrófoba continua. Cada dosis de vacuna consistió en 100 microlitros de la emulsión descrita que contiene liposomas (13,2 miligramos de DOPC/colesterol), antígeno FP (15 microgramos) y adyuvante polil:C (150 microgramos) y el vehículo de aceite mineral. Esta formulación de vacuna se denominará liposoma/polil:C/vehículo hidrófobo.

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 11. Los ratones del grupo 1 tenían una protección parcial frente al crecimiento tumoral y comenzaron a desarrollar tumores medibles a la cuarta semana de la implantación. Los ratones del Grupo 2, vacunados con la invención, desarrollaron tumores significativamente más pequeños que los que se podían detectar a la semana 5 ($p < 0,1$). Los ratones en el grupo control desarrollaron tumores con una cinética esperada, a partir de las 3 semanas después de la implantación.

Estos resultados indican que los antígenos específicos del tumor formulados en la formulación de liposoma/Polil:C/vehículo hidrófobo fue más eficaz para el tratamiento terapéutico de un tumor establecido en ratones que cuando se formula con Polil:C vehículo/vehículo hidrófobo El efecto terapéutico óptimo solo pudo alcanzarse cuando los liposomas estaban presentes en la formulación, lo que indica claramente que los liposomas son un componente crucial de la invención.

Ejemplo 12

Ratones C57BL6 hembras sin patógenos, de 4-6 semanas de edad se obtuvieron de Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canadá) y se alojaron de acuerdo con las directrices institucionales con agua y comida *ad libitum*, con circulación del aire controlada con filtro.

Como en el ejemplo 11, el antígeno usado en las formulaciones de vacunas fue una proteína de fusión que consiste en el epítipo inmunodominante H2-Db de HPV16 E7 (49-57; RAHYNIVTF) fusionado con el epítipo universal de colaboradores T PADRE. Este antígeno, en lo sucesivo denominado FP, fue sintetizado por Anaspec Inc. (San Jose, CA). El adyuvante era un poli molécula de ADN-inosina citosina basada en ADN que consiste en 13 repeticiones (IC) y sintetizada por Operon MWG (Huntsville, AL, EE.UU).

La eficacia de la invención que comprende liposomas, una molécula poli I:C basada en ADN y un vehículo hidrófobo se analizó in vivo usando un modelo de exposición descrito anteriormente. En cuatro grupos de ratones ($n = 5$ por grupo) se implantaron por vía subcutánea en el flanco la línea de células C3 tumorales que expresan el HPV16 (5×10^5 células/ratón) el día 0. El día 8, los ratones de los grupos 1 y 3 se vacunaron por vía subcutánea en el flanco opuesto con vacuna. Los ratones del Grupo 4 recibieron PBS solo y sirvió como el control del crecimiento del tumor. El volumen del tumor se midió una vez a la semana utilizando calibradores para registrar el diámetro menor y el diámetro más largo durante 5 semanas después de la implantación. El volumen del tumor se calculó usando la siguiente fórmula: Medición más larga x (medición más corta)² dividido por 2.

Los ratones en el grupo 1 se vacunaron con la vacuna de L que comprende un liposoma/antígeno/poli IC vehículo hidrófobo. La vacuna se formuló como en el ejemplo 11. Cada volumen de dosis fue de 100 microlitros y contenía liposomas, FP (10 microgramos), poli IC (20 microgramos) y se emulsionó con el vehículo de aceite mineral. Los ratones en el grupo 2 se vacunaron con la vacuna de M que comprende liposomas liofilizados/antígeno/poli IC

vehículo hidrófobo. Brevemente, una mezcla homogénea de 10: 1 (p: p) de lecitina DOPC y colesterol (Lipoid GmbH, Alemania) se hidrató en presencia de 200 microgramos de FP y 400 microgramos de poli IC en 0,5% de PEG/agua para formar 1 mililitro de liposomas con antígeno y adyuvante encapsulados. La preparación de liposomas se extruyó haciendo pasar el material 20 veces a través de una mini-extrusora manual (Avanti, Alabaster, AL, EE.UU.)
 5 equipada con dos membranas de policarbonato de 400 nanómetros. El tamaño de los liposomas se confirmó en 200 nanómetros utilizando un Malvern Particle Size Analyzer (Worcestershire, Reino Unido). Los liposomas que contenían antígeno y adyuvante se liofilizaron utilizando el secador por congelación Virtis Advantage (SP Industries, Warminster, PA, EE.UU.). El material liofilizado se reconstituyó en aceite hasta el volumen original de los liposomas solubilizados con un vehículo de aceite mineral (Montanide (TM) ISA 51, Seppic, Francia). Cada volumen de la dosis
 10 fue de 50 microlitros y liposomas contenidos (6,6 mg de DOPC/colesterol), FP (10 microgramos), Polil:C (20 microgramos) y el vehículo de aceite mineral. Los ratones en el Grupo 3 se vacunaron con una liposomas liofilizados/antígeno/vehículo hidrófobo formulada como para el Grupo 2, salvo sin el poli IC adyuvante (control adyuvante).

15 Los resultados de este experimento se muestran en la figura 12. Los ratones del grupo 1 y el grupo 2 no desarrollaron tumores mensurables en toda la duración del estudio. Los ratones del grupo 3, que se vacunaron con la formulación de liposomas liofilizados con FP pero sin adyuvante, comenzaron a desarrollar tumores la semana 3 después de la implantación. Los ratones del grupo control con PBS desarrollaron tumores con una cinética esperada, a partir de las 3 semanas después de la implantación.

20 Estos resultados indican que las formulaciones de vacuna de la presente invención requieren un adyuvante poli IC para ser eficaces en un modelo de exposición al tumor. En este ejemplo, un adyuvante polil:C basado en ADN formulado en una formulación de liposomas/vehículo hidrófobo o en una formulación de liposomas liofilizados/vehículo hidrófobo generó una respuesta inmunitaria eficaz con efecto terapéutico tan pequeño como una
 25 inmunización.

Ejemplo 13

30 Ratones BALB/c hembras sin patógenos, de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canadá) y se alojaron de acuerdo con las directrices institucionales con agua y comida *ad libitum*, con circulación del aire controlada con filtro.

35 Como en los ejemplos anteriores, la proteína hemaglutinina recombinante de H5N1, correspondiente a la glucoproteína hemaglutinina en la superficie del virus de la gripe H5N1, se adquirió de Protein Sciences (Meriden, CT, EE.UU.). Esta proteína recombinante, en lo sucesivo denominada rHA, se utilizó como antígeno modelo para probar la eficacia de las formulaciones de vacuna. La rHA se utilizó a 1,5 microgramo por dosis de 50 microlitros.

40 La eficacia de la vacuna se evaluó por tinción de inmunofluorescencia de las células CD8 de memoria, similar al método descrito en el ejemplo 7. Los esplenocitos singénicos de ratones BALB/c se activaron durante 48 horas a 37 grados centígrados con 10 microgramos/mililitro de lipopolisacárido y los blastos resultantes se trataron con 50 microgramos/mililitro de mitomicina C durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de lavados repetidos, los blastos activados se utilizaron como células presentadoras de antígeno estimulador para la expansión de las células de memoria CD8 específicas de la gripe de los ratones vacunados. Las células de bazo de ratones no sensibilizados o inmunizados se cultivaron con blastos en una proporción de 5: 1 y los cultivos se estimularon con
 45 rHA a 0,1 microgramos/mililitro durante 6 días a 37 grados centígrado, dióxido de carbono al 5 por ciento. Las células recogidas se usaron para la tinción de inmunofluorescencia con isotiocianato de anti-CD8-fluoresceína (FITC) (eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.) anticuerpos y el reactivo pentámero Pro5 de gripe conjugado con ficoeritrina (PE) (H2-Kd, IYSTVASSL, Prolimmune, Oxford, Reino Unido). También se usó anti-CD19-alofocianina (APC) (eBioscience) para excluir cualquier unión no específica de pentámero a las células B. Las células teñidas se recogieron en un citómetro de flujo (FACSCalibur(TM) (BD Bioscience, Missisauga, ON, Canadá) y el análisis de datos se realizó usando el software WinList 6,0 (Verity Inc, Topsham, ME, EE.UU.). Los resultados se acotaron en base a la dispersión frontal y lateral y las células T CD8 específicas de antígeno se definieron como positivas para el pentámero, positivas para CD8β y negativas para CD19. Se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba t de Student.
 50

55 Para formular la vacuna correspondiente a la invención, se utilizaron los mismos procedimientos descritos en los ejemplo 6 y 7. En resumen, una mezcla homogénea de 10: 1 p: p de lecitina S100 y colesterol (lipoid GmbH, Alemania) se hidrató en presencia de una solución adyuvante rHA y polil:C (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) en tampón de fosfato (pH 7,0) para formar liposomas con rHA encapsulado y seguido de la adición de polil:C basado en ARN (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). La suspensión de liposomas se extruyó a través de una extrusora semi-automática (Avestin, Ottawa, ON, Canadá) y los liposomas de tamaño liofilizados (Virtis Advantage freeze dryer, SP Industries, Warminster, PA, EE.UU.) y se reconstituyeron en un vehículo de aceite mineral (Montanide ISA 51 (TM), Seppic, Francia). Cada dosis de vacuna consistió en 50 microlitros de la emulsión descrita anteriormente que contiene liposomas, el antígeno rHA, adyuvante polil:C y el vehículo de aceite mineral. Esta formulación de vacuna se
 60 denominará liposomas liofilizados/polil:C/vehículo hidrófobo.
 65

La eficacia de la formulación de liposomas liofilizados descrita anteriormente se comparó con la eficacia de una vacuna control que consiste en 1,5 microgramos de rHA y 100 microgramos de adyuvante de alumbre(Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) en 50 microlitros de tampón fosfato 50 milimolar (pH 7,0). En los ratones del grupo 1 (N = 5) se inyectó una vez por vía intramuscular (sin refuerzo) con 1,5 microgramos de antígeno rHA y 12,5 microgramos de adyuvante poliI:C formulado en 50 microlitros de liposomas liofilizados/poliI:C/vehículo hidrófobo como se ha descrito anteriormente. Esta vacuna se corresponde con la misma vacuna usada en los ejemplos 6 y 7 (vacuna D, la invención). Los ratones del grupo 2 (N = 5) se vacunaron dos veces (día 0 y día 28) con una vacuna control que consiste en 1,5 microgramo de rHA y 100 microgramos de adyuvante de alumbre suspendidos en tampón de fosfato 50 milimolar. Veintiún semanas después de la vacunación, se sacrificó a los animales por asfixia inducida por dióxido de carbono, se recogieron los bazo y se prepararon suspensiones de células individuales usando procedimientos estándar. La presencia de células T de memoria CD8 específica de la gripe se evaluó después mediante la tinción de inmunofluorescencia del pentámero de la gripe descrita anteriormente.

Los ratones vacunados con la formulación control a base de alumbre generaron una pequeña población de células T de memoria CD8 específicas de antígeno, tamaño medio de la población de 0,02 por ciento y se consideró el fondo (desviación estándar 0,02 por ciento). Los ratones vacunados con la formulación de liposomas liofilizados/poliI:C/vehículo hidrófobo correspondiente a la invención generaron una población significativamente mayor (P <0,02) de las células T de memoria CD8 específicas de antígeno, tamaño medio de la población de 0,51 por ciento (desviación estándar 0,10 por ciento). Estos resultados son significativos, ya que demuestran que las formulaciones de dosis única de liposomas liofilizados/vehículo hidrófobo que contienen Adyuvante poliI:C generan una gran población de células T CD8 de memoria, de larga duración y específica de antígeno CD8, mientras que una vacuna de control acuosa/alumbre no pudo generar ninguna respuesta celular significativa y duradera, incluso después de dos inmunizaciones.

25 Referencias

- Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5(7):730-7.
- Dong LW, Kong XN, Yan HX, Yu LX, Chen L, Yang W, Liu Q, Huang DD, Wu MC, Wang HY. 2008. Signal regulatory protein alpha negatively regulates both TLR3 and cytoplasmic pathways in type I interferon induction. *Mol Immunol* 45(11):3025-35. Epub 2008 May 8.
- Trumpfheller C, Caskey M, Nchinda G, Longhi MP, Mizenina O-, Huang Y, Schlesinger SJ, Colonna M, Steinman RM. 2008. The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Feb 19;105(7):2574-9.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413(6857):732-8.
- Chirigos MA, Schlick E, Ruffmann R, Budzynski W, Sinibaldi P, Gruys E. 1985. *J Biol Response Mod* 4(6):621-7. Pharmacokinetic and therapeutic activity of polyinosinic-polycytidylic acid stabilized with poly-L-lysine in carboxymethylcellulose [poly(IC)-LC].
- Gowen BB, Wong MH, Jung KH, Sanders AB, Mitchell WM, Alexopoulou L, Flavell RA, Sidwell RW. 2007. TLR3 is essential for the induction of protective immunity against Punta Toro Virus infection by the double-stranded RNA (dsRNA), poly(I:C12U), but not Poly(I:C): differential recognition of synthetic dsRNA molecules. *J Immunol* 178(8):5200-8.
- Padalko E, Nuyens D, De Palma A, Verbeken E, Aerts JL, De Clercq E, Carmeliet P, Neyts J. 2004. The interferon inducer amplitigen [poly(I)-poly(C12U)] markedly protects mice against coxsackie B3 virus-induced myocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 48(1):267-74.
- Nordlund JJ, Wolff SM, Levy HB. 1970. Inhibition of biologic activity of poly I: poly C by human plasma. *Proc Soc Exp Biol Med* 133(2):439-44.
- Agger EM, Rosenkrands I, Olsen AW, Hatch G, Williams A, Kritsch C, Lingnau K, von Gabain A, Andersen CS, Korsholm KS, Andersen P. 2006. Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine* 24(26):5452-60.
- Schellack C, Prinz K, Egyed A, Fritz JH, Wittmann B, Ginzler M, Swatosch G, Zauner W, Kast C, Akira S, von Gabain A, Buschle M, Lingnau K. 2006. IC31, a novel adjuvant signaling via TLR9, induces potent cellular and humoral immune responses. *Vaccine* 24(26):5461-72.
- Llopiz D, Dotor J, Zabaleta A, Lasarte JJ, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Sarobe P. 2008. Combined immunization with

- adjuvant molecules poly(I:C) and anti-CD40 plus a tumor antigen has potent prophylactic and therapeutic antitumor effects. *Cancer Immunol Immunother* 57(1):19-29.
- 5 Riedl K, Riedl R, von Gabain A, Nagy E, Lingnau K. 2008. The novel adjuvant IC31 ((R)) strongly improves influenza vaccine-specific cellular and humoral immune responses in young adult and aged mice. *Vaccine* 2008 May 5 epub.
- Levy HB. 1985. *J Biol Response Mod* 4(5):475-80. Historical overview of the use of polynucleotides in cancer.
- 10 Ichinohe T, Tamura S, Kawaguchi A, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Mitchell WM, Strayer DR, Carter WA, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. 2007. Cross-protection against H5N1 influenza virus infection is afforded by intranasal inoculation with seasonal trivalent inactivated influenza vaccine. *J Infect Dis.* 196(9):1313-20.
- 15 Sloat BR, Shaker DS, Le UM, Cui Z. 2008. Nasal immunization with the mixture of PA63, LF, and a PGA conjugate induced strong antibody responses against all three antigens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52(2):169-79.
- Salem ML, El-Naggar SA, Kadima A, Gillanders WE, Cole DJ. 2006. The adjuvant effects of the toll-like receptor 3 ligand polyinosinic-cytidylic acid poly (I:C) on antigen-specific CD8+ T cell responses are partially dependent on NK cells with the induction of a beneficial cytokine milieu. *Vaccine* 24(24):5119-32.
- 20 Kamath AT, Valenti MP, Rochat AF, Agger EM, Lingnau K, von Gabain A, Andersen P, Lambert PH, Siegrist CA. 2008. Protective anti-mycobacterial T cell responses through exquisite in vivo activation of vaccine-targeted dendritic cells. *Eur J Immunol.* 38(5):1247-56.
- 25 Cui Z, Qiu F. 2006. Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) as a potent peptide vaccine adjuvant: therapeutic activity against human cervical cancer in a rodent model. *Cancer Immunol Immunother* 55(10):1267-79.
- Salem ML, Kadima AN, Cole DJ, Gillanders WE. 2005. Defining the antigen-specific T-cell response to vaccination and poly(I:C)/TLR3 signaling: evidence of enhanced primary and memory CD8 T-cell responses and antitumor immunity. *J Immunother.* 28(3):220-8.
- 30 Fujimura T, Nakagawa S, Ohtani T, Ito Y, Aiba S. 2006. Inhibitory effect of the polyinosinic-polycytidylic acid/cationic liposome on the progression of murine B16F10 melanoma. *Eur J Immunol* 36(12):3371-80.
- 35 Krown SE, Kerr D, Stewart WE 2nd, Field AK, Oettgen HF. 1985. Phase I trials of poly(I,C) complexes in advanced cancer. *J Biol Response Mod* 1985 Dec;4(6):640-9.
- Zhu X, Nishimura F, Sasaki K, Fujita M, Dusak JE, Eguchi J, Fellows-Mayle W, Storkus WJ, Walker PR, Salazar AM, Okada H. 2007. Toll like receptor-3 ligand poly-ICLC promotes the efficacy of peripheral vaccinations with tumor antigen-derived peptide epitopes in murine CNS tumor models. *J Transl Med.* 12:10.
- 40 de Clercq E, Torrence PF, Stollar BD, Hobbs J, Fukui T, Kakiuchi N, Ikehara M. 1978. Interferon induction by a 2'-modified double-helical RNA, poly(2'-azido-2'-deoxyinosinic acid). polycytidylic acid. *Eur J Biochem.* 88(2):341-9.
- 45 Bobst AM, Langemeier PW, Torrence PF, De Clercq E. 1981. Interferon induction by poly(inosinic acid).poly(cytidylic acid) segmented by spin-labels. *Biochemistry* 20(16):4798-803.
- De Clercq E, Hattori M, Ikehara M. 1975. Antiviral activity of polynucleotides: copolymers of inosinic acid and N2-dimethylguanylic of 2-methylthioinosinic acid. *Nucleic Acids Res* 19752(1):121-9.
- 50 Guschlbauer W, Blandin M, Drocourt JL, Thang MN. 1977. Poly-2'-deoxy-2'-fluoro-cytidylic acid: enzymatic synthesis, spectroscopic characterization and interaction with poly-inosinic acid. *Nucleic Acids Res* 4(6):1933-43.
- Fukui T, Kakiuchi N, Ikehara M. Polynucleotides. 1977. XLV Synthesis and properties of poly(2'-azido-2'-deoxyinosinic acid). *Nucleic Acids Res.* 4(8):2629-39.
- 55 Johnston MI, Stollar BD, Torrence PF, Witkop B. 1975. Structural features of double-stranded polyribonucleotides required for immunological specificity and interferon induction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 72(11):4564-8.
- 60 Kende M, Lupton HW, Rill WL, Gibbs P, Levy HB, Canonico PG. 1987. Ranking of prophylactic efficacy of poly(ICLC) against Rift Valley fever virus infection in mice by incremental relative risk of death. *Antimicrob Agents Chemother.* 31(8):1194-8.
- Poast J, Seidel HM, Hendricks MD, Haslam JA, Levy HB, Baron S. 2002. Poly I:CLC induction of the interferon system in mice: an initial study of four detection methods. *J Interferon Cytokine Res* 22(10):1035-40.
- 65

- Sarma PS, Shiu G, Neubauer RH, Baron S, Huebner RJ. 1969. Proc Natl Acad Sci U S A 62(4):1046-51. Virus-induced sarcoma of mice: inhibition by a synthetic polyribonucleotide complex.
- 5 Stephen EL, Sammons ML, Pannier WL, Baron S, Spertzel RO, Levy HB. 1977. Effect of a nuclease-resistant derivative of polyriboinosinic-polyribocytidylic acid complex on yellow fever in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). J Infect Dis 136(1):122-6.
- 10 Levy HB, Lvovsky E. 1978. Topical treatment of vaccinia virus infection with an interferon inducer in rabbits. J Infect Dis. 137(1):78-81.
- Durie BG, Levy HB, Voakes J, Jett JR, Levine AS. 1985. Poly(I,C)-LC as an interferon inducer in refractory multiple myeloma. J Biol Response Mod. 4(5):518-24.
- 15 Salazar AM, Levy HB, Ondra S, Kende M, Scherokman B, Brown D, Mena H, Martin N, Schwab K, Donovan D, Dougherty D, Pulliam M, Ippolito M, Graves M, Brown H, Ommaya A. 1996. Long-term treatment of malignant gliomas with intramuscularly administered polyinosinic-polycytidylic acid stabilized with polylysine and carboxymethylcellulose: an open pilot study. Neurosurgery 38(6):1096-103; discussion 1103-4.
- 20 Theriault RL, Hortobagyi GN, Buzdar AU, Levy HB, Hersh EM. 1986. Evaluation of polyinosinic-polycytidylic and poly-L-lysine in metastatic breast cancer. Cancer Treat Rep. 70(11):1341-2.
- Nakamura O, Shitara N, Matsutani M, Takakura K, Machida H. 1982. Phase I-II trials of poly(ICLC) in malignant brain tumor patients. J Interferon Res 2(1):1-4.
- 25 Bever CT Jr, Salazar AM, Neely E, Ferraraccio BE, Rose JW, McFarland HF, Levy HB, McFarlin DE. 1986. Preliminary trial of poly ICLC in chronic progressive multiple sclerosis. Neurology 36(4):494-8.
- Talmadge JE, Adams J, Phillips H, Collins M, Lenz B, Schneider M, Chirigos M. 1985. Immunotherapeutic potential in murine tumor models of polyinosinic-polycytidylic acid and poly-L-lysine solubilized by carboxymethylcellulose. Cancer Res 45(3):1066-72.
- 30 Droller MJ. 1987. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with polyinosinic-polycytidylic acid. J Urol. 137(2):202-6.
- 35 Awasthi A, Mehrotra S, Bhakuni V, Dutta GP, Levy HB, Maheshwari RK. 1997. Poly ICLC enhances the antimalarial activity of chloroquine against multidrug-resistant *Plasmodium yoelii nigeriensis* in mice. J Interferon Cytokine Res. 17(7):419-23.
- 40 Puri SK, Dutta GP, Levy HB, Maheshwari RK. 1996. Poly ICLC inhibits *Plasmodium cynomolgi* B malaria infection in rhesus monkeys. J Interferon Cytokine Res. 16(1):49-52.
- Houston WE, Crabbs CL, Stephen EL, Levy HB: 1976. Modified polyriboinosinic-polyribocytidylic acid, an immunological adjuvant. Infect Immun 14(1):318-9.
- 45 Stephen EL, Hilmas DE, Mangiafico JA, Levy HB. 1977. Swine influenza virus vaccine: potentiation of antibody responses in rhesus monkeys. Science 197(4310):1289-90.
- Zaks K, Jordan M, Guth A, Sellins K, Kedl R, Izzo A, Bosio C, Dow S. 2006. Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes. J Immunol 176(12):7335-45.
- 50 Hendrix CW, Margolick JB, Petty BG, Markham RB, Nerhood L, Farzadegan H, Ts'o PO, Lietman PS. 1993. Biologic effects after a single dose of poly(I):poly(C12U) in healthy volunteers. Antimicrob Agents Chemother. 37(3):429-35.
- 55 Greene JJ, Alderfer JL, Tazawa I, Tazawa S, Ts'o PO, O'Malley JA, Carter WA. 1978. Interferon induction and its dependence on the primary and secondary structure of poly(inosinic acid).poly(cytidylic acid). Biochemistry 17(20):4214-20.
- 60 La mención de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como admisión de que la presente invención no tiene derecho anteceder a dicha publicación en virtud de invención anterior.
- 65 Como se usan en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "uno", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. A menos que se defina otra cosa todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que la presente invención pertenece entiende habitualmente.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de vacuna inyectable, que comprende:

5 (a) un antígeno frente al que se va a inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto en necesidad de la misma, en el que el antígeno se selecciona entre el grupo que consiste en un antígeno derivado de una bacteria, un virus, un hongo, un parásito o una célula tumoral; un antígeno de enfermedades infecciosas; un antígeno derivado de un alérgeno animal, un alérgeno alimentario, un alérgeno de insectos, un alérgeno bacteriano, un alérgeno de fármacos, una hormona o una enzima; y un polipéptido derivado de hormona liberadora de gonadotropina, survivina
10 o péptido beta-amiloide;

(b) liposomas;

15 (c) un polinucleótido polil:C; y

(d) un vehículo que consiste esencialmente en aceite o que es una emulsión de agua en aceite.

20 2. La formulación de vacuna inyectable de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el polinucleótido polil:C comprende ARN y/o ADN.

3. La formulación de vacuna inyectable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el polinucleótido polil:C es un homopolímero o un heteropolímero.

25 4. La formulación de vacuna inyectable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el polinucleótido polil:C comprende un polinucleótido polil:C homopolimérico y un polinucleótido polil:C heteropolimérico.

30 5. La formulación de vacuna inyectable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el antígeno está encapsulado en los liposomas, o el polinucleótido polil:C está encapsulado en los liposomas, o tanto el antígeno como el polinucleótido polil:C están encapsulados en los liposomas.

6. Un método para preparar una formulación de vacuna inyectable, comprendiendo dicho método, combinar, en cualquier orden:

35 (a) un antígeno frente al que se va a inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto en necesidad de la misma, en el que el antígeno se selecciona entre el grupo que consiste en un antígeno derivado de una bacteria, un virus, un hongo, un parásito o una célula tumoral; un antígeno de enfermedades infecciosas; un antígeno derivado de un alérgeno animal, un alérgeno alimentario, un alérgeno de insectos, un alérgeno bacteriano, un alérgeno de fármacos, una hormona o una enzima; y un polipéptido derivado de hormona liberadora de gonadotropina, survivina
40 o péptido beta-amiloide;

(b) liposomas;

45 (c) un polinucleótido polil:C; y

(d) un vehículo que consiste esencialmente en aceite o que es una emulsión de agua en aceite.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho antígeno está encapsulado en dichos liposomas.

50 8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que dicho polinucleótido polil:C está encapsulado en dichos liposomas.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que dicho polinucleótido polil:C se añade en el exterior de dichos liposomas.

55 10. Una formulación de la vacuna inyectable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso como un medicamento.

60 11. La formulación de vacuna inyectable de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en la inducción de una respuesta de anticuerpos a dicho antígeno en un sujeto en necesidad de la misma.

12. La formulación de vacuna inyectable de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en la inducción de una respuesta mediada por células a dicho antígeno en un sujeto en necesidad de la misma.

65 13. La formulación de vacuna inyectable de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por una bacteria, un virus, un hongo, o un parásito, en la que el antígeno en

la formulación de vacuna deriva de las bacterias, los virus, los hongos, o el parásito.

5 14. La formulación de vacuna inyectable de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por un alérgeno animal, un alérgeno alimentario, un alérgeno de insectos o un alérgeno de fármacos, en la que el antígeno en la formulación de vacuna deriva del alérgeno.

10 15. La formulación de vacuna inyectable de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por una célula tumoral que expresa el antígeno en la formulación de vacuna.

16. La formulación de vacuna inyectable según la reivindicación 13, en la que el tratamiento y/o prevención comprende la inducción de un anticuerpo y/o una respuesta inmunitaria mediada por células al antígeno en un sujeto, en la que el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una infección viral.

15 17. La formulación de vacuna inyectable de acuerdo con la reivindicación 16, en la que la infección viral es una infección por virus de la gripe.

20 18. La formulación de vacuna inyectable según la reivindicación 15, en la que el tratamiento y/o prevención comprende la inducción de un anticuerpo y/o una respuesta inmunitaria mediada por células al antígeno en un sujeto, en la que el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar cáncer.

25 19. La formulación de vacuna inyectable de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa, en la que la enfermedad neurodegenerativa está asociada con la expresión del antígeno en la formulación de vacuna.

20. La formulación de vacuna inyectable de acuerdo con la reivindicación 19, en la que la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.

30 21. La formulación de vacuna inyectable de acuerdo con la reivindicación 1 o el método para la fabricación de una formulación de vacuna inyectable de acuerdo con la reivindicación 6, en los que el antígeno es un antígeno específico de tumor.

35 22. El método de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende la formación de los liposomas en presencia del antígeno, o en presencia del polinucleótido polil:C, o en presencia de tanto el antígeno como el polinucleótido polil:C y después la combinación de los liposomas con el vehículo para producir la formulación de vacuna inyectable.

40 23. El método de acuerdo con la reivindicación 6 que comprende (i) formar los liposomas, (ii) combinar los liposomas con el antígeno, o con el polinucleótido polil:C, o con tanto con el antígeno como con el polinucleótido polil:C para formar una mezcla de liposomas y (iii) combinar la mezcla de liposomas con el vehículo para producir la formulación de vacuna inyectable.

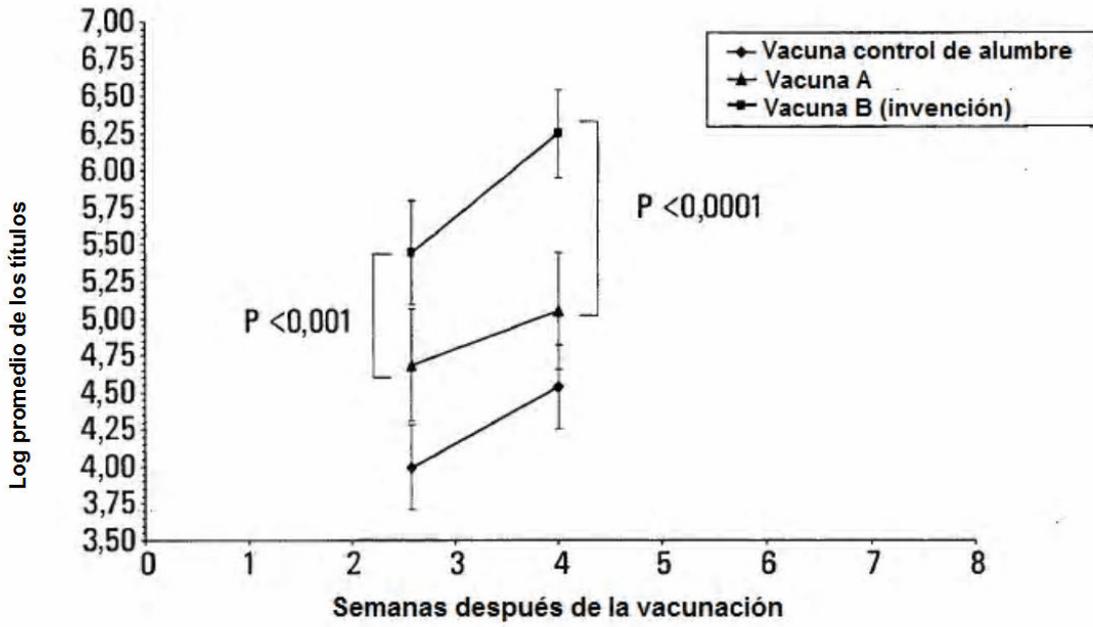


FIG. 1

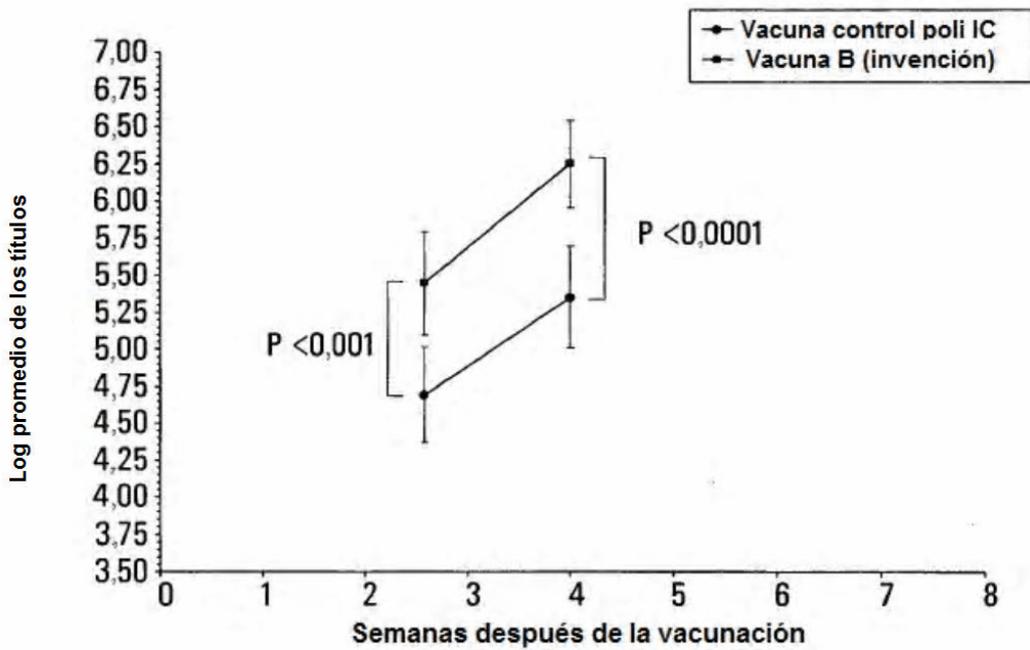


FIG. 2

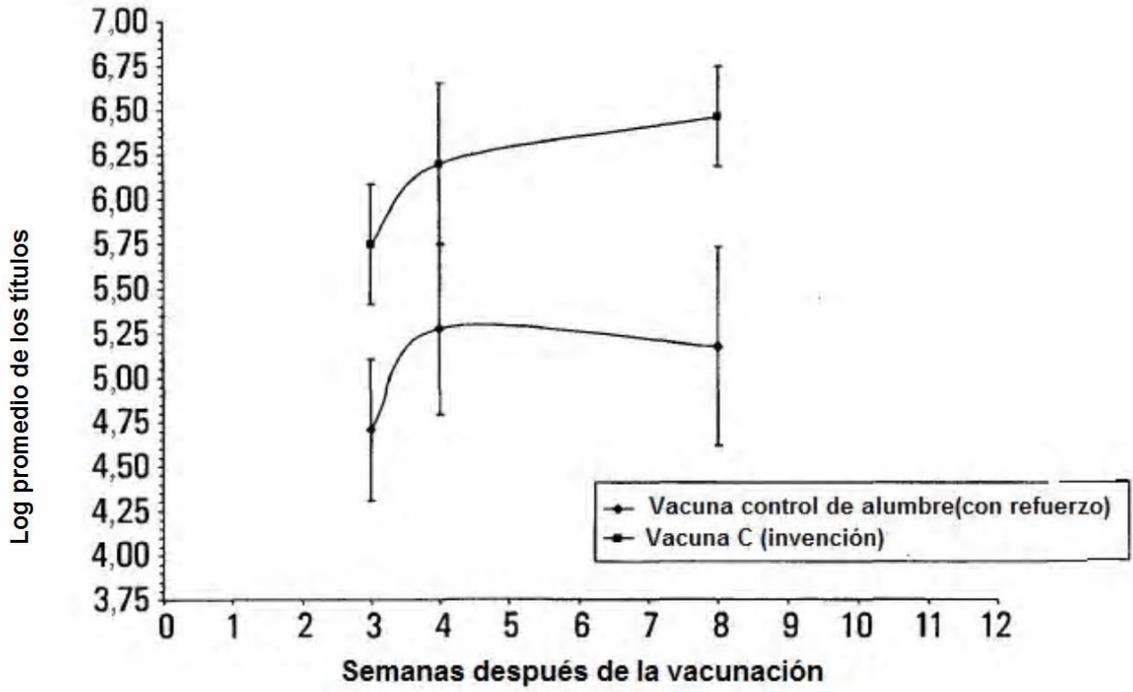


FIG. 3

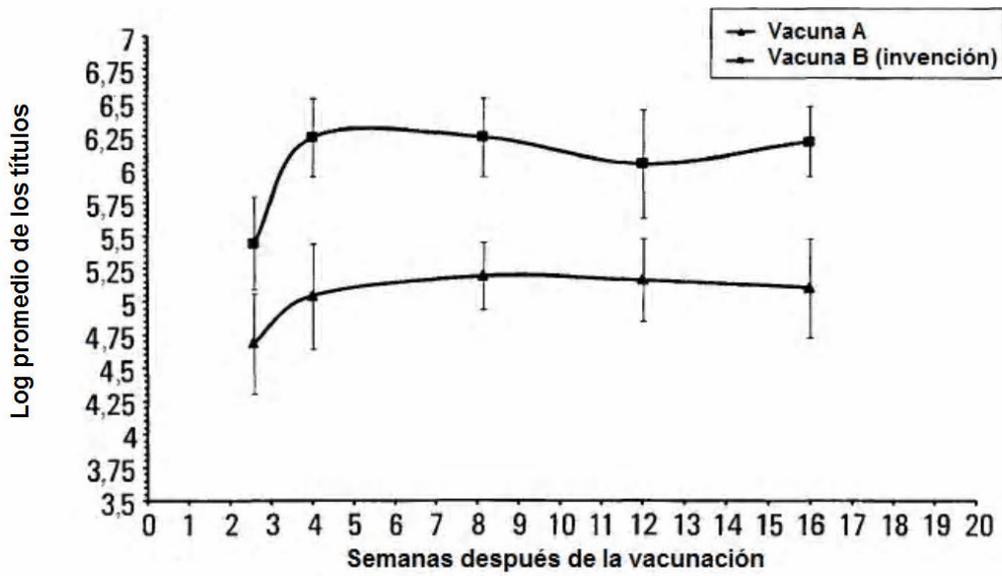


FIG. 4

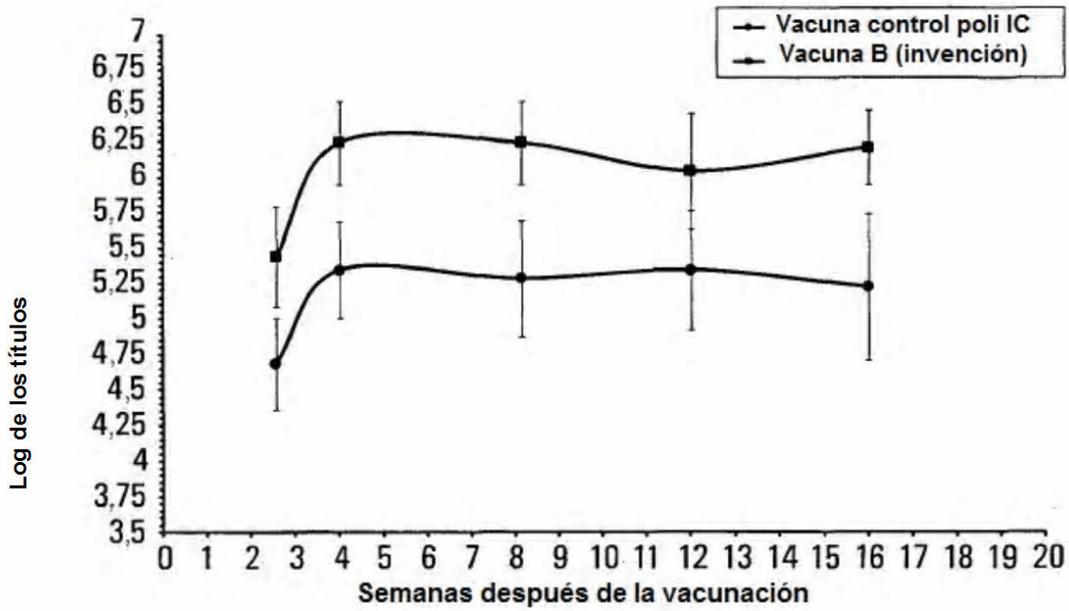


FIG. 5

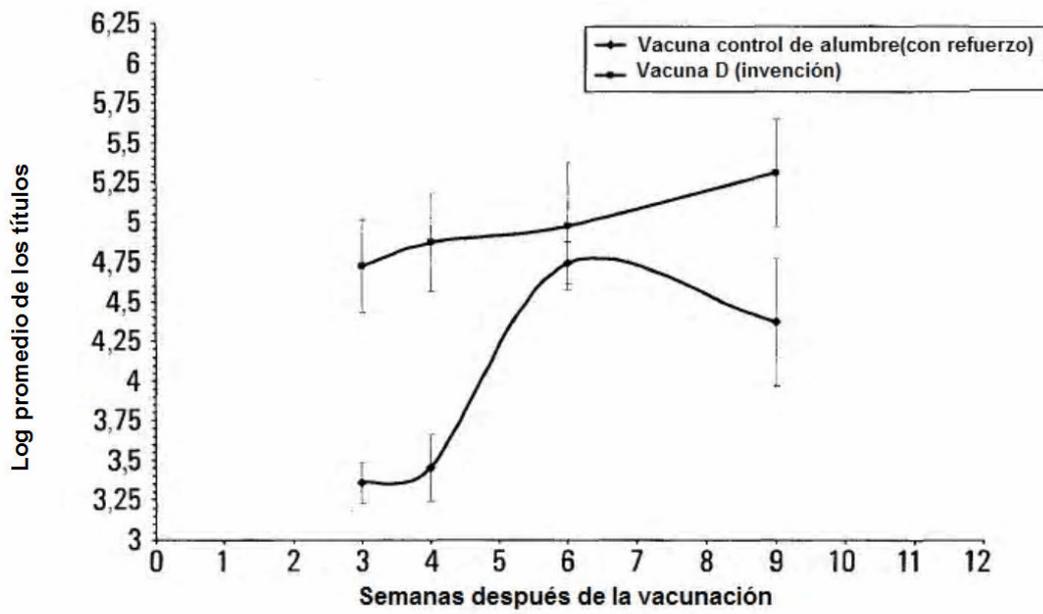


FIG. 6

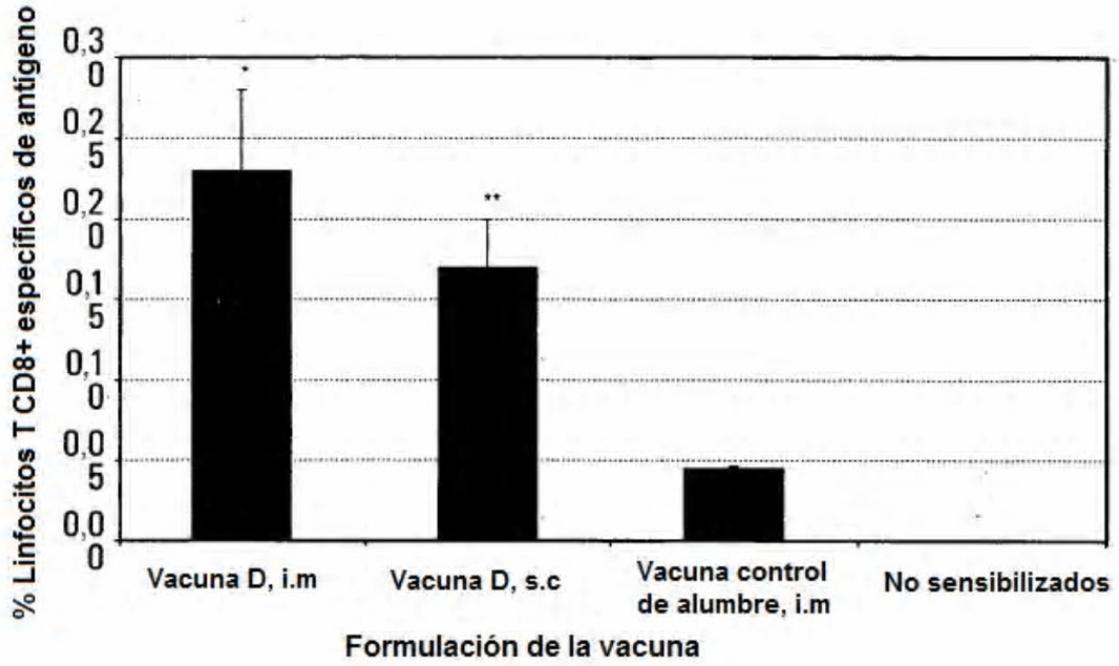


FIG. 7

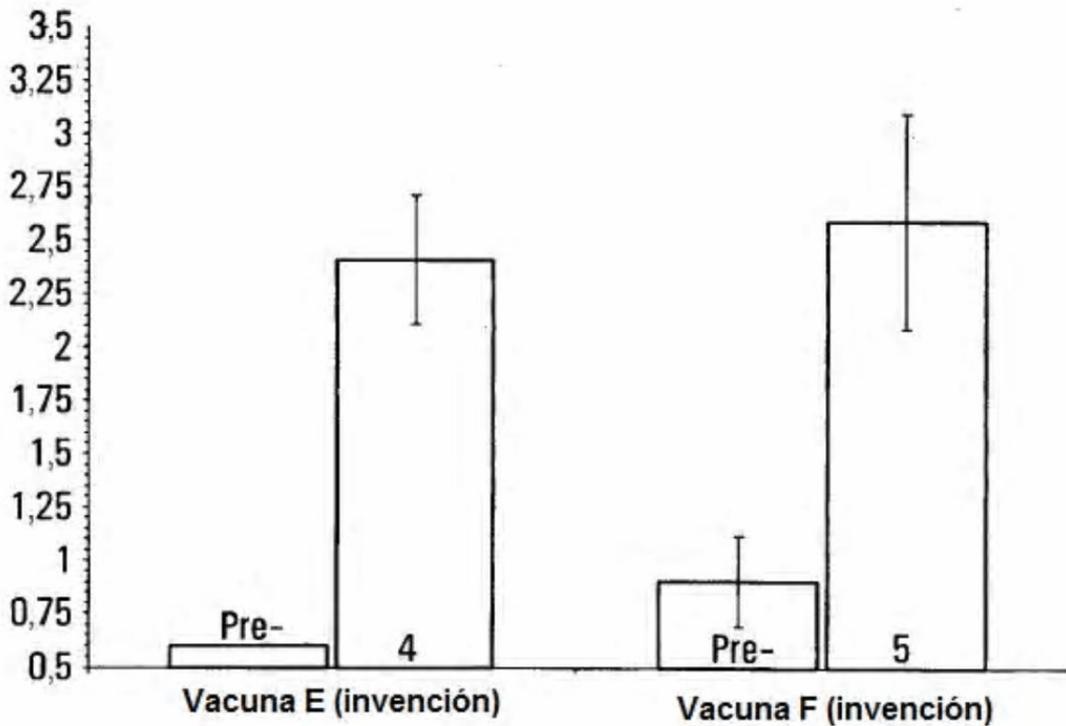


FIG. 8

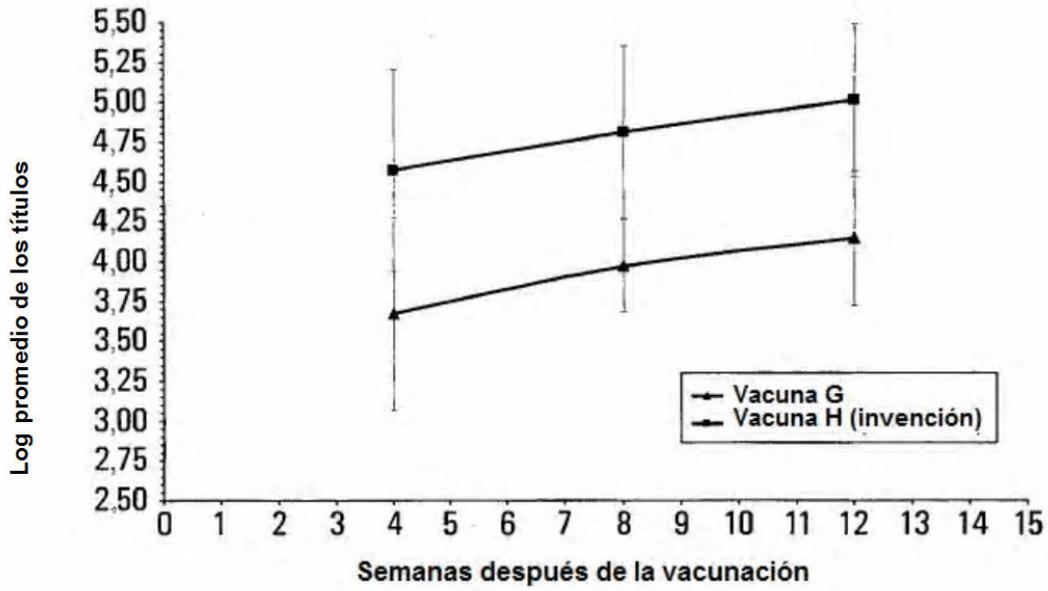


FIG. 9

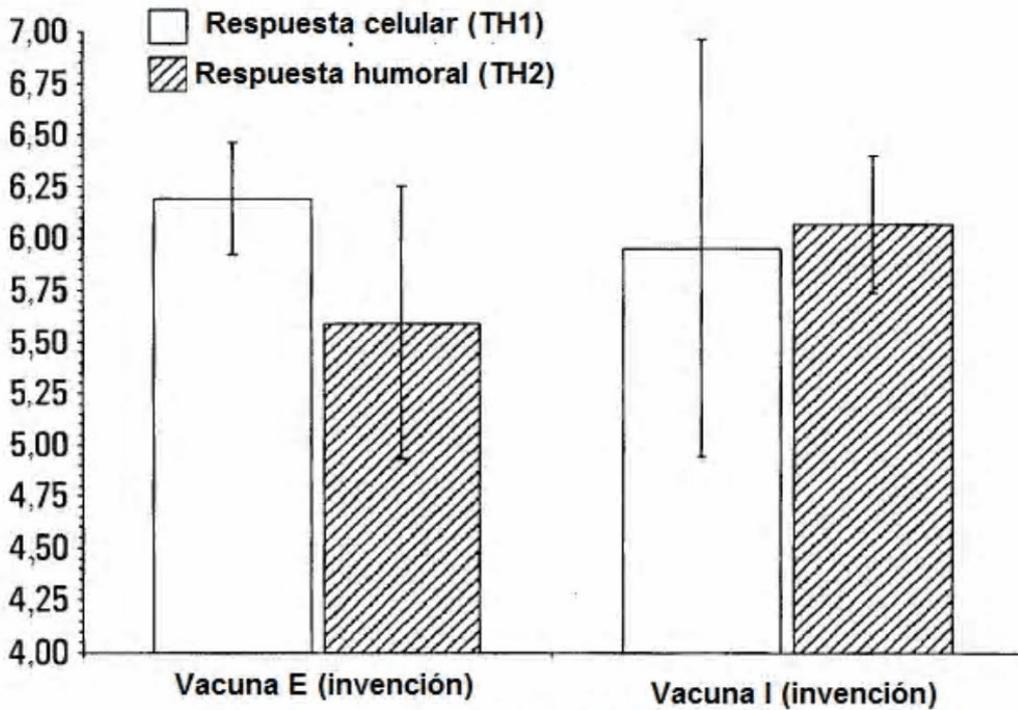


FIG. 10

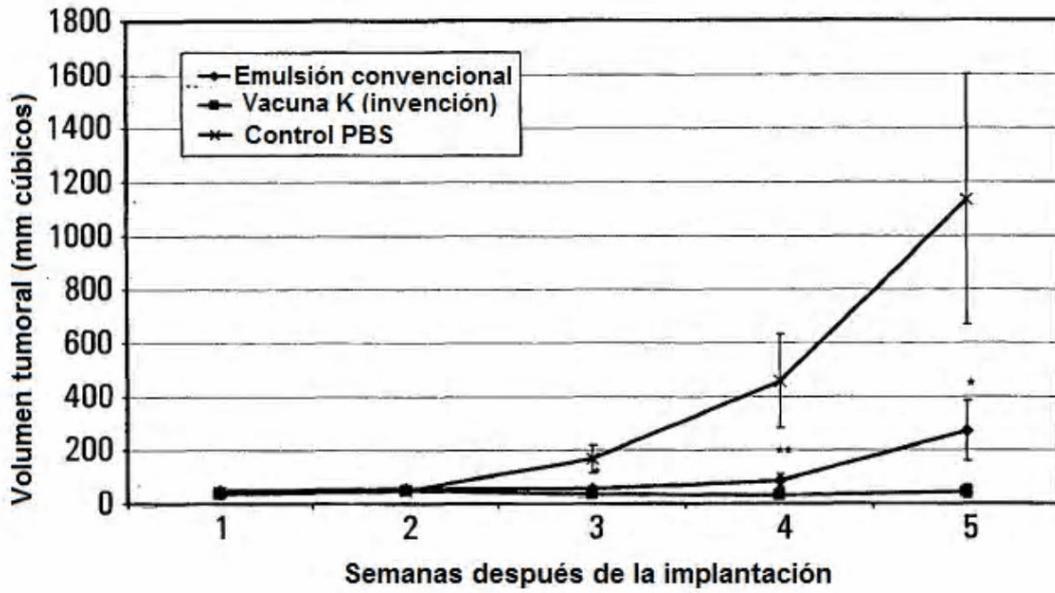


FIG. 11

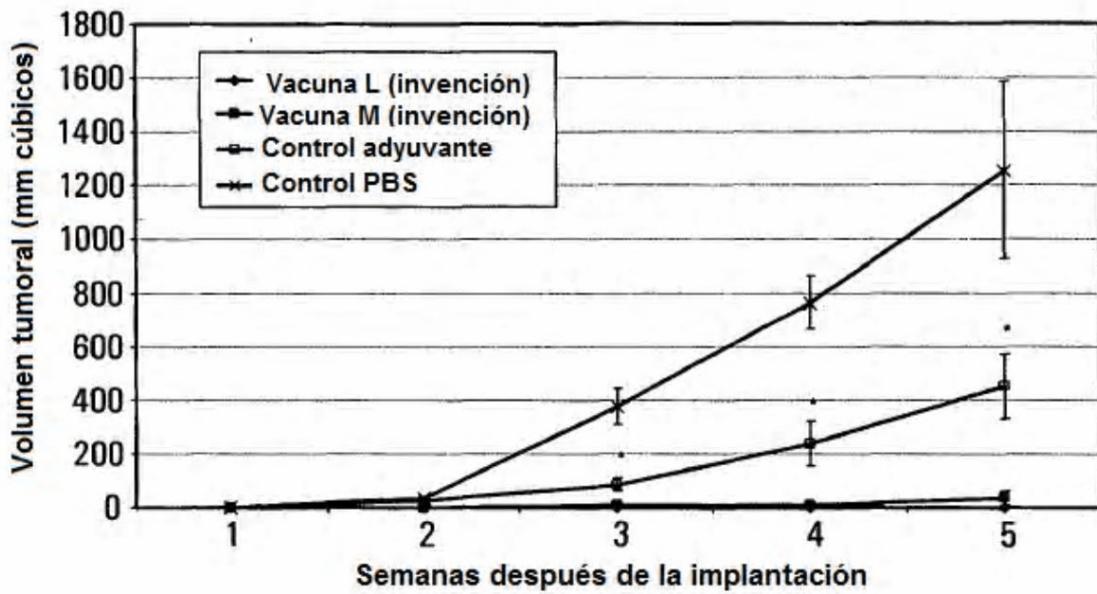


FIG. 12

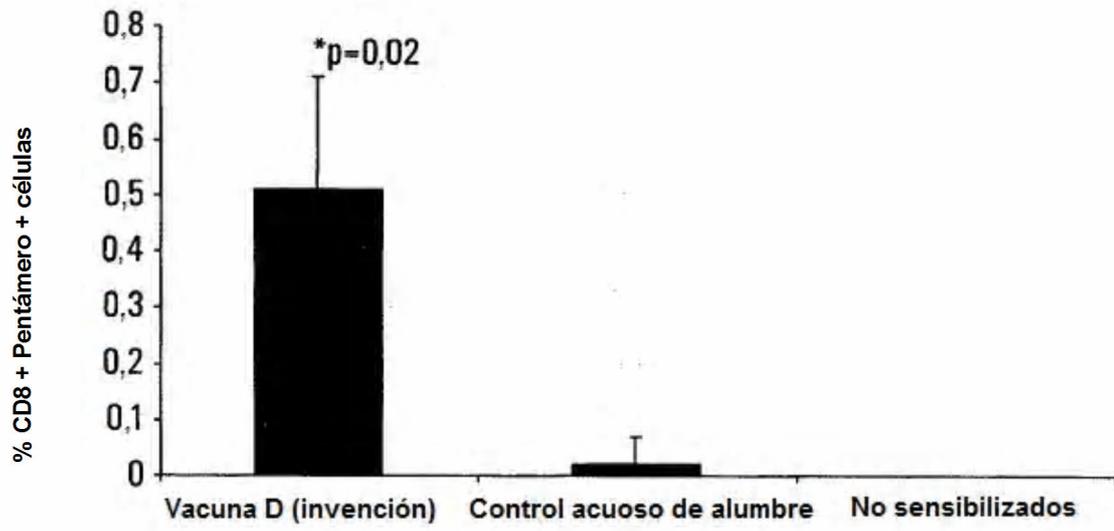


FIG. 13