

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 443**

51 Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2009 E 09828499 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2370100**

54 Título: **Adyuvantes peptídicos**

30 Prioridad:

28.11.2008 US 118533 P

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

20.07.2015

73 Titular/es:

**HER MAJESTY THE QUEEN IN RIGHT OF
CANADA AS REPRESENTED BY THE MINISTER
OF HEALTH (100.0%)
1015 rue Arlington Piece T2420
Winnipeg, Manitoba R3E 3P6, CA**

72 Inventor/es:

**PATEL, AMI;
KOBASA, DARWYN;
KOBINGER, GARY y
BABIUK, SHAWN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 541 443 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

Adyuvantes peptídicos

5 **Información anterior a la solicitud**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de Patente de EE. UU. 61/118.533, presentada el 28 de noviembre de 2008.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a adyuvantes, composiciones inmunogénicas, y métodos útiles para la vacunación basada en polinucleótidos. La presente invención proporciona composiciones y métodos útiles para aumentar la respuesta inmunitaria, especialmente la respuesta inmunitaria humoral de vertebrados.

15

Antecedente de la invención

Las composiciones vacunales incluyen a menudo adyuvantes inmunológicos para aumentar la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, el adyuvante completo de Freund (CFA) es un potente agente inmunoestimulante que se ha utilizado satisfactoriamente con muchos antígenos sobre una base experimental. El CFA incluye tres componentes: un aceite mineral, un agente emulsionante, y micobacterias destruidas, tales como *Mycobacterium tuberculosis*. Las soluciones acuosas de antígeno se mezclan con estos componentes para crear una emulsión de agua en aceite. Aunque es eficaz como adyuvante, el CFA produce graves efectos secundarios, que incluyen dolor, formación de abscesos y fiebre, primariamente debidos a la presencia del componente de micobacteriano. El CFA, por lo tanto, no se utiliza en vacunas humanas y veterinarias.

Los adyuvantes inmunológicos ayudan a aumentar las respuestas inmunitarias inducidas por las vacunas. Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar el aumento de la respuesta inmunitaria específica al antígeno generada por la vacuna con el adyuvante. En primer lugar, el adyuvante puede proporcionar una liberación lenta del antígeno exponiéndolo al sistema inmunitario durante un periodo de tiempo más largo y en consecuencia estimulando una respuesta inmunitaria más fuerte y mejor definida. En segundo lugar, el adyuvante puede ayudar también al suministro y captación del complejo antigénico por las células presentadoras de antígeno (APC) tales como macrófagos y células dendríticas que a su vez pueden migrar a los órganos linfoides e iniciar una respuesta concertada con la interacción de células T y B. En tercer lugar, las células inmunitarias, incluyendo las APC, pueden activarse directamente por el adyuvante e iniciar entonces una respuesta inmunitaria más rápida y más fuerte por medio de la estimulación posterior de las células T y B. La emulsión de aceite en agua ingerida por un macrófago que puede migrar entonces hacia los ganglios linfáticos de drenaje, o las moléculas estimulantes de TLR tales como el ADN que contiene dinucleótido CpG no metilado son ejemplos que actúan principalmente de acuerdo con estos mecanismos. Un paradigma interesante con respecto a la reacción inmunitaria es que las respuestas inmunitarias son más robustas en general cuando se estimulan por un antígeno que se produce raramente que cuando es por un antígeno que se encuentra más frecuentemente en la naturaleza. El presente estudio explora la posibilidad de utilizar secuencias peptídicas cortas que no están presentes o se han observado solo una vez en los proteomas conocidos como inmunomoduladores para aumentar las respuestas inmunitarias inducidas por vacunas y la protección contra infecciones víricas letales.

El documento US 6.100.380 se refiere a péptidos inmunomoduladores y desvela el uso de los pentapéptidos de fórmula R' - Glx - Glx - Lys - R'' en la que Glx es Glu o Gln. En particular, esta patente proporciona los péptidos Thr-Ala-Glu-Glu-Lys y Thr-Pro-Glu-Glu-Lys.

La solicitud PCT WO 1996/19494A1 se refiere a péptidos que tienen actividad inmunomoduladora y proporcionan el tetrapéptido H-Lys-Asn-Pro-Tyr-OH y análogos del mismo como inmunomoduladores. En particular, el documento WO 1996/19494A1 enseña el uso de dichos péptidos como un adyuvante vacunal.

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para estimular una respuesta inmunitaria a un antígeno que comprende la co-administración a un individuo que necesita de tal tratamiento de una cantidad eficaz de una composición que comprende un antígeno y un péptido con la secuencia de aminoácidos KWCEC (SEC ID N° 4).

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una secuencia peptídica inmunoestimulante que consiste en un péptido como se expone en la SEC ID N° 4.

De acuerdo con un aspecto más de la invención, se proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de un adyuvante peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos KWCEC (SEC ID N° 4) y un antígeno de interés.

65

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de estimulación de una respuesta inmunitaria contra un antígeno que comprende la administración a un individuo que tiene la necesidad o el deseo de tal tratamiento de una cantidad eficaz de un adyuvante peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos KWCEC (SEC ID N° 4).

5 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un adyuvante peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos KWCEC (SEC ID N° 4) para estimular una respuesta inmunitaria o el aumento de la respuesta inmunitaria a un antígeno en un individuo que tiene la necesidad o desea tal tratamiento.

10 De acuerdo con un aspecto más de la invención, se proporciona un método para preparar un medicamento para estimular una respuesta inmunitaria o aumentar una respuesta inmunitaria contra un antígeno que comprende la mezcla de una cantidad eficaz de un adyuvante peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos KWCEC (SEC ID N° 4) con un excipiente adecuado.

15 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Ensayo de puntos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISPOT) de la respuesta de células T después de la inmunización. Se vacunaron I.M. ratones BALB/c con 50 µg de una vacuna ADN pCAG α -HA que contenía o bien: el péptido ajeno 5mero1 (CHKWD (SEC ID N°1)), 5mero2 (WHKCE (SEC ID N° 2)), 5mero3 (CKWRC (SEC ID N° 3)), 5mero4 (KWCEC (SEC ID N° 4)), 5mero5 (DCWMD (SEC ID N° 5)), 9mero1 (CWKCWCMFE (SEC ID N° 6)), 9mero3 (WNWCMHWDC (SEC ID N° 7)), 9mero4 (WHWCMMCWDC (SEC ID N° 8)), 13mero1 (HEHWCMWVHCCMI (SEC ID N° 9)), 13mero3 (HMMCHWMCWCDMH (SEC ID N° 10)), o 13mero4 (CHMMCHWVWCCMD (SEC ID N° 11)) fusionado al extremo carboxilo de HA. La pCAG α -HA (50 ug) representa la línea base de la respuesta de células T. Se agruparon los péptidos solapados que abarcaban la proteína HA 2005 Hanoi completa (10 péptidos/grupo) y se utilizaron para re-estimular los esplenocitos. Se recolectaron los esplenocitos a los 10 días de la vacunación y se re-estimularon utilizando los grupos de péptidos derivados de HA. Los datos representan la frecuencia de puntos por millón de esplenocitos. Se analizaron 4 ratones por grupo. A partir de los datos se puede ver que no todos los péptidos hidrófobos producían una respuesta inmunitaria igual.

30 Figura 2: Se hizo la respuesta de anticuerpo neutralizante después de la inmunización para detectar la presencia de anticuerpos en el suero que se esperaría para contrarrestar la infección. Se vacunaron I.M. los ratones BALB/c con 50 µg de vacuna ADN pCAG α -HA que contenía o bien: el péptido ajeno 5mero1 (SEC ID N°1), 5mero2 (SEC ID N° 2), 5mero3 (SEC ID N° 3), 5mero4 (SEC ID N° 4), 5mero5 (SEC ID N° 5), 9mero1 (SEC ID N° 6), 9mero3 (SEC ID N° 7), 9mero4 (SEC ID N° 8), 13mero1 (SEC ID N° 9), 13mero3 (SEC ID N° 10), o 13mero4 (SEC ID N° 11) y HA. Los sueros recolectados de los ratones inmunizados se evaluaron por ensayos de neutralización. Para los ensayos de neutralización, se trató el suero durante una noche a 37 °C con la enzima de destrucción del receptor (RDE) y luego se inactivó a 56 °C durante 45 minutos. Se prepararon diluciones de dos veces seriadas de cada muestra, comenzando en la dilución 1:10, en diluyente de virus y se mezclaron con un volumen igual de aislado de virus de influenza homólogo utilizado para la inmunización (100 unidades formadoras de placas [PFU] por pocillo) y se incubaron a 37 °C durante 60 minutos. La mezcla se transfirió entonces a células MDCK en subconfluencia en placas de fondo plano de 96 pocillos y se incubaron durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos de control se infectaron con una cantidad igual de vector vírico sin adición de suero o con suero no inmune de control. Se añadieron entonces 100 µl de diluyente vírico suplementado con 2,0 µg/ml de tripsina TPCK a cada pocillo y se incubaron las placas a 37 °C, un 5% de CO₂ durante 48 h. Las células se valoraron posteriormente según la presencia o ausencia de efectos citopáticos (CPE) bajo microscopía óptica. La dilución de suero más alta que no mostraba CPE se valoró como positiva al anticuerpo neutralizante y los títulos de neutralización se comunicaron como recíprocos de esta dilución. Los péptidos que generaron una alta respuesta de células T también generaban una alta respuesta de anticuerpos neutralizantes.

50 Figura 3: Respuesta inmunitaria celular y eficacia de protección después de la inmunización con la vacuna ADN recombinante péptido ajeno. Se vacunaron I.M. ratones BALB/c con 50 µg de una vacuna ADN pCAG α -HA que contenía o bien: el péptido ajeno 5mero4 (KWCEC (SEC ID N° 4)) o el 5mero7 (KYMCW (SEC ID N° 12)) fusionado al extremo carboxilo de HA. Se seleccionó el 5mero4 (SEC ID N° 4) debido a la alta respuesta de células T y de anticuerpos neutralizantes. El 5mero7 (SEC ID N° 12) se seleccionó debido a la similitud de secuencia con el 5mero4. Inhibición de la hemaglutinación. Se recolectó el suero el día 25 tras la vacunación. Se llevaron a cabo diluciones seriadas del suero obtenido de los ratones BALB/c y se añadieron cuatro dosis aglutinantes de virus a cada pocillo. Los sueros y virus se incubaron con glóbulos rojos de pavo y se informó del título de inhibición de la hemaglutinación (título HI) como el recíproco de la dilución más alta de suero que no bloqueaba la aglutinación de los eritrocitos. Los ratones de control se vacunaron con solución salina fosfato (PBS). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. A partir de los datos, era sorprendente apreciar que los péptidos similares se comportaban de manera diferente en el ensayo. Por lo tanto la secuencia del péptido es importante.

60 Figura 4: Respuesta inmunitaria celular y eficacia protectora después de la inmunización con la vacuna ADN recombinante péptido ajeno. Se vacunaron I.M. ratones BALB/c con 50 µg de una vacuna ADN pCAG α -HA que contenía o bien: el péptido ajeno 5mero4 (SEC ID N° 4) o el 5mero7 (SEC ID N° 12) fusionado al extremo

carboxilo de HA. Títulos de anticuerpo neutralizante (NAB) para los ratones vacunados con pCAG α -HA-5mero4 or pCAG α -HA-5mero7. Se repitió el experimento 3 veces. Se vacunaron grupos de 10 ratones BALB/c I.M. con una sola dosis de o bien 1 μ g de pCAG α -HA-5mero4, 1 mg pCAG α -HA-5mero7, 1 mg pCAG α -HA, 5 mg pCAG α -HA o 10 mg pCAG α -HA por ratón. Se desafiaron 28 días más tarde con 100 DL50 de H5N1 A\Hanoi\30408\2005. Los ratones de control se vacunaron con solución salina fosfato tamponada (PBS). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Esto muestra que la respuesta que aparece es eficaz para generar anticuerpos que pueden neutralizar virus con eficacia.

Figura 5: Respuesta inmunitaria celular y eficacia protectora después de la inmunización con vacuna de péptido ajeno ADN recombinante. Se vacunaron I.M. ratones BALB/c con 50 μ g de una vacuna ADN pCAG α -HA que contenía o bien: el péptido ajeno 5mero4 (SEC ID N° 4) o el 5mero7 (SEC ID N° 12) fusionado al extremo carboxilo de HA. Se desafiaron 28 días más tarde con 100 DL50 of H5N1 A\Hanoi\30408\2005 y se midió el porcentaje de supervivencia a lo largo del tiempo. Los ratones de control se vacunaron con solución salina fosfato tamponada (PBS). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Estos datos demuestran que la vacunación utilizando los péptidos como adyuvantes proporcionaban un nivel mayor de protección que el antígeno solo. También se observó una respuesta dependiente de la dosis de adyuvante y que el adyuvante daba como resultado una respuesta inmunitaria más fuerte con los niveles más bajos de antígeno.

Figura 6: Respuesta inmunitaria celular y eficacia protectora después de la inmunización con vacuna de péptido ajeno ADN recombinante. Se vacunaron I.M. ratones BALB/c con 50 μ g por ratón con una vacuna ADN pCAG α -HA que contenía o bien: el péptido ajeno 5mero4 (SEC ID N° 4) o el 5mero7 (SEC ID N° 12) fusionado al extremo carboxilo de HA. Se desafiaron 28 días más tarde con 100 DL50 of H5N1 A\Hanoi\30408\2005 y se midió el peso. Los ratones de control se vacunaron con solución salina fosfato tamponada (PBS). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Esto demuestra que la vacunación con la combinación antígeno-péptido protege a los animales contra la pérdida de peso lo que es un síntoma de la infección por influenza.

Figura 7: Eficacia protectora después de la inmunización con un péptido ajeno libre (exógeno) para el desafío homólogo. Se vacunaron grupos de 10 ratones BALB/c I.M. con una sola dosis de o bien 1 μ g pCAG α -HA + 5 μ g 5mero4 (SEC ID N° 4) como péptido libre, 1 μ g pCAG α -HA + 50 μ g 5mero4 (SEC ID N° 4) como péptido libre o 1 μ g pCAG α -HA + Dimetil sulfóxido (DMSO) por ratón. Se desafiaron 28 días más tarde con 100 DL50 of H5N1 A\Hanoi\30408\2005. Los datos representan el porcentaje de supervivencia. Los ratones de control se vacunaron con PBS. Estos datos demuestran que la vacunación con tampón solo no induce protección contra la influenza y que hay un efecto dependiente de la dosis con el aumento de cantidades de adyuvante peptídico.

Figura 8: Eficacia protectora después de la inmunización con un péptido ajeno libre (exógeno) para el desafío homólogo. Se vacunaron grupos de 10 ratones BALB/c I.M. con una sola dosis de o bien 1 μ g pCAG α -HA + 5 μ g 5mero4 (SEC ID N° 4) como péptido libre, 1 μ g pCAG α -HA + 50 μ g 5mero4 (SEC ID N° 4) como péptido libre o 1 μ g pCAG α -HA + Dimetil sulfóxido (DMSO) por ratón. Se desafiaron 28 días más tarde con 100 DL50 of H5N1 A\Hanoi\30408\2005. Los datos representan el peso corporal a lo largo del tiempo. Los ratones de control se vacunaron con PBS. Esto demuestra que la vacunación con el péptido más el antígeno protege a los animales contra la pérdida de peso que es un síntoma de infección por influenza.

Figura 9: Eficacia protectora después de la inmunización con un péptido ajeno libre (exógeno) para el desafío homólogo. Se vacunaron grupos de 10 ratones BALB/c I.M. con una sola dosis de o bien 1 μ g pCAG α -HA + 5 μ g 5mero4 (SEC ID N° 4) como péptido libre, 1 μ g pCAG α -HA + 50 μ g 5mero4 (SEC ID N° 4) como péptido libre o 1 μ g pCAG α -HA + Dimetil sulfóxido (DMSO) por ratón. Se desafiaron 28 días más tarde con 100 DL50 of H5N1 A\Hanoi\30408\2005. Los datos representan el porcentaje de supervivencia. Los ratones de control se vacunaron con PBS. Estos datos demuestran que la vacunación con el tampón solo no induce protección contra la influenza y que hay un efecto dependiente de la dosis con el aumento de las cantidades de adyuvante peptídico.

Figura 10: Eficacia protectora después de la inmunización con diferentes dosis del péptido libre 5mero4 (SEC ID N° 4). Se vacunaron I.M. grupos de 10 ratones BALB/c con una dosis única de 100 μ g de pCAG α -HA + o bien 50 μ g del 5mero4 (SEC ID N° 4) 100 μ g del 5mero4 (SEC ID N° 4) como péptido libre por ratón. Se desafiaron 28 días más tarde con 100 DL50 de virus homólogo Hanoi2005. Los datos representan el peso corporal a lo largo del tiempo. Los ratones de control se vacunaron con PBS o con 50 μ g de péptido libre. Esto demuestra que la vacunación con el péptido más el antígeno protege a los animales contra la pérdida de peso que es un síntoma de la infección por influenza.

Figura 11: Eficacia protectora después de la inmunización con diferentes dosis de péptido libre 5mero4. Se vacunaron I.M. grupos de 10 ratones BALB/c con una dosis única de 100 μ g de pCAG α -HA + o bien 50 μ g del 5mero4 (SEC ID N° 4) o 100 μ g del 5mero4 (SEC ID N° 4) como péptido libre por ratón. Se desafiaron 28 días más tarde con 100 DL50 de virus homólogo Hanoi2005. Los datos representan el porcentaje de supervivencia. Los ratones de control se vacunaron con PBS o con 50 μ g de péptido libre. Esto demuestra que el efecto necesita tanto el adyuvante como el antígeno para ser eficaz en la aparición de una respuesta inmunitaria específica.

Figura 12: Eficacia protectora después de la inmunización con un péptido ajeno para el desafío heterólogo. Se vacunaron I.M. grupos de 10 ratones BALB/c con una única dosis de 100 μ g de pCAG α -HA + 50 μ g del 5mero4 (SEC ID N° 4) como péptido libre por ratón. Se desafiaron 28 días más tarde con 100 DL50 de H5N1 A\Hong Kong\483\1997 adaptado al ratón. Los datos representan el porcentaje de pérdida de peso corporal a lo largo del tiempo. Los ratones de control se vacunaron con PBS. Esto demuestra que la vacunación con el péptido más el antígeno protege a los animales contra la pérdida de peso que es un síntoma de infección por influenza.

Figura 13: Eficacia protectora después de la inmunización con un péptido ajeno libre para el desafío heterólogo. Se vacunaron I.M. grupos de 10 ratones BALB/c con una única dosis de 100 µg de pCAG α -HA + 50 µg del 5mero4 (SEC ID N° 4) como péptido libre por ratón. Se desafiaron 28 días más tarde con 100 DL50 de H5N1 A\Hong Kong\483\1997 adaptado al ratón. Los datos representan el porcentaje de supervivencia. Los ratones de control se vacunaron con PBS. Esto demuestra la eficacia del procedimiento de vacunación contra virus heterólogos.

Figura 14: Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) después de la vacunación con la vacuna de Hepatitis B (Engerix-B). Se vacunaron I.M. ratones BALB/c con el equivalente de 1 ug de la vacuna Engerix-B con (A) 50 ug de péptido libre o (B) sin péptido como control. Se obtuvo el suero de los ratones a las 2, 4, 6, y 8 semanas después de la vacunación. Se detectó el total de anticuerpo anti-HBS utilizando un kit ELISA. Estos datos indican que se genera una respuesta inmunitaria mucho más fuerte en presencia de antígeno más péptido que con el antígeno solo. El curso de tiempo de la respuesta inmunitaria es como se esperaba.

Figura 15: Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) después de la vacunación con la vacuna de influenza estacional (Fluviral 2008-2009). Se vacunaron I.M. ratones BALB/c con el equivalente a 5 ug de vacuna Fluviral con (A) 50 ug de péptido libre o (B) sin péptido como control. Se obtuvo el suero de los ratones a las 2, 4, 6, y 8 semanas después de la vacunación. Se detectó el total de anticuerpos IgG anti-influenza utilizando un kit comercial ELISA. Estos datos demuestran que incluso en presencia de altos niveles de antígeno, el péptido reforzará la respuesta inmunitaria.

Figura 16: Ensayo de puntos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISPOT) de la respuesta de células T después de la inmunización. Se vacunaron I.M. ratones BALB/c con 50 µg de vacuna pCAG α -HA + 50 ug de 5mero4 (SEC ID N° 4), CpG-ODN (10 pg), alúmina (Alhydrogel, 450 ug), una combinación de los tres, o HA sola. Se recolectaron los esplenocitos 10 días después de la vacunación y se re-estimularon utilizando grupos de péptidos derivados de HA. Los datos representan la frecuencia de puntos por millón de esplenocitos. Se analizaron 4 ratones por grupo. Estos datos muestran que la respuesta inmunitaria que se genera cuando se utiliza el péptido es más fuerte que la que se genera con solo la alúmina y comparable a la que se genera con CpG. También, existe un aparente efecto aditivo cuando se combinan los adyuvantes.

Figura 17: Ensayo de puntos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISPOT) de la respuesta de células T después de la inmunización. Se vacunaron I.M. ratones BALB/c con 50 µg de vacuna ADN pCAG α -HA sola o combinada con grupos de 10 péptidos 5meros. Se recolectaron los esplenocitos 10 días después de la vacunación y se re-estimularon utilizando los grupos peptídicos derivados de HA. Los datos representan la frecuencia de puntos por millón de esplenocitos. Las barras representan el total de todos los grupos. Se analizaron 4 ratones por grupo. Esta estrategia hace posible la exploración rápida de péptidos estrechamente relacionados.

Figura 18: Ensayo de puntos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISPOT) de la respuesta de células T después de la inmunización. Se vacunaron I.M. ratones BALB/c con 50 µg de vacuna pCAG α -HA ADN sola o combinada con 50 ug de un 5mero de un grupo inmunodominante. Se recolectaron los esplenocitos 10 días después de la vacunación y se re-estimularon utilizando grupos peptídicos derivados de HA. Los datos representan la frecuencia de puntos por millón de esplenocitos. Las barras representan el total de todos los grupos. Se analizaron 4 ratones por grupo. Estos datos muestran que a pesar de cambios de un solo aminoácido en la secuencia peptídica, puede haber una gran diferencia en la potencia de la respuesta de células T que se genera.

Figura 19: Comparación de respuestas de células T entre péptidos seleccionados. Ensayo de puntos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISPOT) de la respuesta de células T después de la inmunización. Se vacunaron I.M. ratones BALB/c con 50 µg de vacuna pCAG α -HA ADN sola o combinada con 50 µg de un 5mero de un grupo inmunodominante. Se recolectaron los esplenocitos a los 10 días después de la vacunación y se re-estimularon utilizando grupos peptídicos derivados de HA. Los datos representan la frecuencia de puntos por millón de esplenocitos. Las barras representan el total de todos los grupos. Se analizaron 4 ratones por grupo. Los datos muestran que todos los péptidos seleccionados generaban una fuerte respuesta de células T al antígeno y que cambios relativamente pequeños en la secuencia pueden dar lugar a niveles diferentes de respuesta inmunitaria. Esto puede depender del antígeno.

Descripción de las realizaciones preferidas

A menos de que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen la misma significación que la que comprende un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque se pueden utilizar cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen ahora.

Se describen composiciones adyuvantes comprenden polipéptidos 5meros específicos en combinación con sistemas de suministro de antígenos y/o moléculas inmunoestimulantes, tales como secuencias inmunoestimulantes de ácidos nucleicos, para aumentar la respuesta inmunitaria de un antígeno que se co-administra. La presente invención está basada en parte en el sorprendente descubrimiento de que el uso de péptidos hidrófobos seleccionados en combinación con antígenos, proporciona títulos de anticuerpos contra un antígeno que se co-administra significativamente más altos, que los que se observan sin tales sistemas de suministro o utilizando

adyuvantes tradicionales. El uso de tales combinaciones proporciona una estrategia segura y eficaz para aumentar la inmunogenicidad de varios antígenos vacunales para su uso en composiciones tanto profilácticas como terapéuticas.

- 5 La práctica de la presente invención empleará, a menos de que se indique otra cosa, métodos convencionales de química, bioquímica, técnicas de ADN recombinante e inmunología, en la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, *Fundamental Virology*, 2ª Edición, vol. I & II (B. N. Fields y D. M. Knipe, eds.); *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and Company, 1993); A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Edición, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.).

- 15 Se debe señalar que, como se utiliza en la presente especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el” incluye los equivalentes plurales a menos de que el contenido dicte claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “un antígeno” incluye una mezcla de dos o más antígenos, y similar.

Se utilizan las siguientes abreviaturas de aminoácidos a lo largo del texto:

- 20 Alanina: Ala (A) Arginina: Arg (R) Asparagina: Asn (N) ácido Aspártico: Asp (D) Cisteína: Cys (C) Glutamina: Gln (Q) Ácido Glutámico: Glu (E) Glicina: Gly (G) Histidina: His (H) Isoleucina: Ile (I) Leucina: Leu (L) Lisina: Lys (K) Metionina: Met (M) Fenilalanina: Phe (F) Prolina: Pro (P) Serina: Ser (S) Treonina: Thr (T) Triptófano: Trp (W) Tirosina: Tyr (Y) Valina: Val (V)

- 25 Definiciones:

En la descripción de la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan como se indica posteriormente.

- 30 Los términos “polipéptido” y “proteína” se refieren a un polímero de restos de aminoácidos y no se limita a una longitud mínima del producto. Por lo tanto, están incluidos en la definición, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares. Además, para los fines de la presente invención, un “polipéptido” se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como eliminaciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservadora), de la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad que se desea. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como por medio de mutagénesis dirigida al sitio, o puede ser accidental, tal como por medio de mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por PCR.

- 40 Por “antígeno” se entiende una molécula que contiene uno o más epítomos que estimulan el sistema inmunitario de un huésped para producir una respuesta inmunitaria celular específica de antígeno cuando se presenta el antígeno, o una respuesta de anticuerpos humorales. El término “antígeno” como se utiliza en el presente documento denota ambas subunidades de antígeno, es decir, proteínas que se separan y distinguen de un organismo completo con el que se asocia el antígeno en la naturaleza, así como bacterias, virus, parásitos u otros microorganismos destruidos, atenuados o inactivados, Anticuerpos tales como anticuerpos anti-idiotípicos, o fragmentos de los mismos, y mimótopos peptídicos sintéticos, que imitan un antígeno o determinante antigénico, también se capturan bajo la definición de antígeno del presente documento. Además, para los fines de la presente invención, los antígenos se pueden derivar de cualquiera de los varios virus, bacterias, parásitos y hongos conocidos, así como de cualquiera de los distintos antígenos tumorales.

- 50 Una “respuesta inmunológica” contra un antígeno seleccionado o composición es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular contra moléculas presentes en la composición de interés. Para los fines de la presente invención, una “respuesta inmunitaria humoral” se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por moléculas de anticuerpo, mientras que una “respuesta inmunitaria celular” es la que está mediada por linfocitos T y otros glóbulos blancos sanguíneos. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por las células T citolíticas (“CTL”). Las CTL tienen especificidad por antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y que se expresan en las superficies de las células. Las CTL ayudan a inducir y promocionar la destrucción intracelular de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por las células T auxiliares. Las células T auxiliares actúan para ayudar a estimular la función, y el foco de actividad de, células efectoras no específicas contra las células que presentan antígenos peptídicos en asociación con moléculas del MHC en sus superficies. Una “respuesta inmunitaria celular” también se refiere a la producción de citoquinas, quimioquinas y otras de tales moléculas que se producen por las células T activadas y/o otros glóbulos blancos, incluyendo las derivadas de las células T CD4+ y CD8+. Una composición o vacuna que produce una respuesta inmunitaria celular puede servir para sensibilizar a un sujeto vertebrado por la presentación del antígeno en asociación con moléculas del MHC en la superficie celular. La respuesta inmunitaria mediada por células se dirige a, o cerca de, células que presentan antígenos en su superficie.

Además, se pueden generar linfocitos T específicos de antígeno para permitir la protección futura de un huésped inmunizado. La capacidad de un antígeno en particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células se puede determinar por varios ensayos, tales como por ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos celulares citotóxicos CTL, o por ensayo de linfocitos T específicos de antígeno en un sujeto sensibilizado. Tales ensayos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Erickson et al., J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doe et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376.

Las expresiones "cantidad eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" de una composición de adyuvante y antígeno, como se proporciona en el presente documento, se refiere a una cantidad no tóxica pero suficiente para proporcionar la respuesta deseada, tal como una respuesta inmunológica, y opcionalmente, un efecto terapéutico correspondiente, o en el caso de suministro de una proteína terapéutica, una cantidad suficiente para efectuar un tratamiento del sujeto, como se define posteriormente. Como se puntualizará posteriormente, la cantidad necesaria exacta variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad, y estado general del sujeto, la gravedad de la afección que se va a tratar, y la macromolécula de interés particular, modo de administración, y similares. Una apropiada cantidad "eficaz" en cualquier caso individual se puede determinar por un experto habituado en la técnica utilizando experimentación de rutina.

El "sistema de suministro antigénico" comprende la composición de adyuvante, y el antígeno y otros tampones y sustancias que se pueden utilizar para estabilizar o que actúan como vehículos para la combinación.

En una primera realización, los péptidos se utilizan en conjunción con antígenos para generar una respuesta humoral y celular con el fin de prevenir una enfermedad infecciosa o la co-administración de un péptido con un antígeno.

En otra realización más, la presente invención se refiere a un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto vertebrado que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno seleccionado y una composición adyuvante que comprende un péptido como se ha descrito en el presente documento. Como apreciará un experto en la técnica, el antígeno y el adyuvante peptídico se pueden administrar por varios medios y bajo varias condiciones dentro de la invención. Por ejemplo, se puede proporcionar un sistema de suministro de antígeno y/o una molécula inmunoestimulante, en que la composición adyuvante es capaz de aumentar la respuesta inmunitaria contra el antígeno seleccionado. El antígeno puede estar presente en la composición adyuvante o se puede administrar en una composición separada. Si el antígeno se suministra por separado, puede administrarse en el mismo sitio o en uno diferente, y puede administrarse antes, posteriormente o concurrente con la composición de adyuvante.

Es importante señalar que como se describe en el presente documento, la administración del adyuvante peptídico al individuo que necesita o tiene el deseo de una respuesta inmunitaria estimulada por ejemplo contra un antígeno se puede hacer por varios medios, por ejemplo, administrando el adyuvante peptídico y el antígeno juntos, por separado o incluso en diferentes localizaciones como se ha tratado en el presente documento y como se conoce en la técnica. El adyuvante peptídico se puede administrar como un péptido aislado o purificado o se puede fusionar al antígeno o bien química o genéticamente (es decir, un péptido transgénico que comprende tanto un antígeno peptídico como el adyuvante peptídico) o se puede administrar como un ácido nucleico que comprende el adyuvante peptídico que se dispone a expresarse tras la administración de forma que el adyuvante peptídico se administre al individuo.

En una realización relacionada, la presente invención se refiere a un método para prevenir una enfermedad infecciosa por la co-administración de un péptido seleccionado y una o más secuencias de ADN que pueden expresar proteína(s) del agente infeccioso. Estos agentes podrían incluir virus tales como el de la Hepatitis C, VIH, fiebres hemorrágicas y similares u otros antígenos en que se desee una fuerte respuesta de células T. Como apreciará un experto en la técnica, los agentes adecuados para la co-administración incluyen pero no se limitan por ningún medio a ADN, ARN o vacunas proteicas, extractos víricos y virus o bacterias desactivados.

En un aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de un adyuvante peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos KWCEC (SEC ID N° 4) y un antígeno de interés.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para estimular una respuesta inmunitaria o aumentar una respuesta inmunitaria contra un antígeno que comprende la administración a un individuo que necesita o desea de tal tratamiento una cantidad eficaz de un adyuvante peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos KWCEC (SEC ID N° 4). El individuo que necesita o desea tal tratamiento puede ser un individuo que ha sido inmunizado, como se trata en el presente documento.

En una realización, el adyuvante peptídico es KWCEC (SEC ID N° 4).

En una realización preferida, la 'cantidad eficaz' o 'cantidad terapéuticamente eficaz' del adyuvante peptídico es entre aproximadamente 50 µg y aproximadamente 5 mg por dosis o por administración. En una realización más preferida, la dosificación es entre aproximadamente 50 µg y aproximadamente 500 µg. Como apreciará un experto

en la técnica, la cantidad eficaz puede variar de acuerdo con la edad, peso y estado del individuo al que se le va a administrar.

Como se trata en el presente documento, el adyuvante peptídico de la invención se puede administrar como un péptido 'libre' (es decir, puede ser un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos KWCEC (SEC ID N° 4)). De manera alternativa, la secuencia de aminoácidos puede estar unida o embebida en un péptido antigénico o un vehículo peptídico utilizando medios que se conocen en la técnica. En toras realizaciones, tales construcciones se pueden codificar por una molécula de ácido nucleico que se puede administrar al individuo de forma que el adyuvante peptídico se exprese después de la administración como se trata en el presente documento.

Como apreciará un experto en la técnica, se puede utilizar cualquier antígeno adecuado en combinación con el adyuvante peptídico de la invención. En una realización particularmente preferida, el antígeno es un antígeno de una enfermedad infecciosa, por ejemplo, una bacteria o virus desactivado o atenuado, un extracto bacteriano o vírico o un péptido bacteriano o vírico.

En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso del adyuvante peptídico descrito anteriormente para inducir o estimular o aumentar una respuesta inmunitaria en un individuo que necesita tal tratamiento. Como se ha tratado anteriormente, el adyuvante peptídico se puede administrar junto con el antígeno o se puede administrar por separado o se puede administrar en diferentes sitios.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para preparar un medicamento o composición para estimular una respuesta inmunitaria en un individuo que comprende mezclar un adyuvante peptídico como se describe en el presente documento con un excipiente adecuado, por ejemplo, un excipiente, vehículo o disolvente vacunal adecuado. En otras realizaciones, el medicamento o composición o vacuna se puede preparar mezclando el adyuvante peptídico como se describe anteriormente con el antígeno que se desea.

Como se trata en el presente documento, el adyuvante peptídico se puede administrar a cualquier vertebrado, pero preferentemente se administra a seres humanos o animales por ejemplo en aplicaciones veterinarias. En consecuencia, en algunos aspectos de la invención, el 'individuo' es un animal no humano o un animal vertebrado no humano. De manera alternativa, el adyuvante peptídico se puede utilizar con fines de investigación.

Ejemplos

A continuación se encuentran los ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solamente con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el ámbito de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplo 1: Identificación de péptidos

Se exploraron bases de datos de proteomas utilizando un algoritmo de computadora para buscar péptidos cortos 5-meros de secuencias de aminoácidos que se producen como máximo una vez. Este análisis generó 417 secuencias no observadas nunca y 1288 únicas de péptidos 5-meros encontrados solo una vez en todos los proteomas conocidos. Se generaron por computadora secuencias nuevas y trece métricas a partir de las 417 secuencias de 5-meros ausentes en los proteomas conocidos. Se seleccionaron aleatoriamente seis 5-meros, tres 9-meros y tres 13-meros con varios valores previstos de hidrofobia para los análisis funcionales. Se analizó el efecto de cada péptido corto sobre la respuesta inmunitaria primero evaluando la respuesta de células T contra el antígeno hemaglutinina (HA) del virus de gripe aviar Hanoi 2005 que se expresaba a partir de una vacuna ADN basada en pCAG en ratones BALB/c. Cada secuencia de 5-, 9- y 13-meros se clonó en fase en el extremo C del antígeno HA con el fin de facilitar la expresión y minimizar la potencial desviación experimental que se origina de las preparaciones peptídicas independientes de pureza variable. Se vacunaron intramuscularmente (I.M.) grupos de 4 ratones con 50 µg por ratón de cada plásmido ADN que codifica HA en fase con cada secuencia de péptido corto y se controló la respuesta de células T a partir de los esplenocitos 10 días más tarde. El mismo plásmido ADN que codifica HA sin secuencias adicionales (pCAG-HA) se incluyó como un punto de referencia de control. Se utilizó una biblioteca de péptidos solapados que cubrían la proteína HA completa para re-estimular los esplenocitos y se evaluó la producción de IFN-g por ELISPOT como una medida de la respuesta de células T. La figura 1 muestra que la pCAG-HA-5-meros n° 4 ((SEC ID N° 4) y n° 6 (DMCKW, SEC ID N° 13) aumentaban la producción de IFN-g después de la estimulación con varios péptidos individuales de la biblioteca HA cuando se compara con otros pCAG-HA-5, 9 o 13-meros o con la pCAG-HA sin modificar de control. A partir de los datos, se puede concluir que los 5meros funcionan mejor que los 9meros o los 13meros para generar una respuesta de células T. A partir de los datos no parece que haya ningún patrón con respecto a la hidrofobia o secuencia que dan lugar a un aumento de la respuesta de células T lo que es bastante sorprendente. Las hidrofobias de los distintos péptidos se enumeran en la Tabla 1.

Además, se midieron los anticuerpos neutralizantes contra el virus HA y se identificaron 5meros y 7meros como péptidos que producían un aumento significativo de la respuesta de anticuerpos neutralizantes. Se identificaron péptidos adicionales utilizando un proceso similar (véase la Figura 17 y la Figura 18). Era sorprendente encontrar que péptidos muy similares podían tener un efecto drásticamente diferente en la respuesta observada como se

muestra en la Figura 18 (las secuencias se muestran en la Tabla 2). Los anticuerpos neutralizantes son un marcador de la eficacia y parece que la vacunación con el 5mero4 (SEC ID N° 4) y 5mer7 (SEC ID N° 12) como adyuvantes producían una respuesta de anticuerpos significativa mientras que otros 5meros (5mero1 (SEC ID N° 1), 5mero2 (SEC ID N° 2), 5mero3 (SEC ID N° 3)) y los 9 y 13meros no producían una fuerte respuesta de anticuerpos neutralizantes como se muestra en la Figura 2. Por lo tanto para buscar péptidos adicionales que puedan producir también un aumento de respuesta inmunitaria, se exploraron grupos de 10 péptidos seleccionados aleatoriamente en el ensayo de células T descrito anteriormente. Para los grupos que demostraban una respuesta de células T por encima de la línea base, se exploraban los péptidos individuales en el ensayo. A partir de los datos sorprende que secuencias relacionadas estrechamente tuvieran efectos enormemente diferentes en la generación de una respuesta de células T. Por ejemplo, la secuencia peptídica CYWWW (91, SEC ID N° 14) generaba una respuesta significativa de células T, pero el péptido CYYWC (92, SEC ID N° 22) que es diferente solo en un aminoácido generaba una respuesta de células T que estaba por debajo de la línea base de la HA sola. Se encontraron diferencias similares en otros péptidos tales como el par EHWCM (93, SEC ID N° 15)) y EMWCM (94, SEC ID N° 23)) donde el primero generaba una gran respuesta de células T, pero el último no. Se predecía que los péptidos que generaban una fuerte respuesta de células T en este ensayo serían buenos adyuvantes basándose en las respuestas generadas por el 5mero4 (KWCEC, SEC ID N° 4) y 5mero7 (KYM CW (SEC ID N° 12)) en estudios animales expandidos. También se observa a partir de los datos que los péptidos que generaban una alta respuesta de células T también generaban una alta respuesta de anticuerpos neutralizantes que predecían que darían lugar a una respuesta eficaz en los estudios de supervivencia.

La dosis anticipada del adyuvante peptídico en seres humanos se espera que sea entre 50 µg y 5 mg, dependiendo de la naturaleza del antígeno. La mayoría de los adyuvantes se utilizan entre 50 µg y 500 µg y se espera que sea verdad también para los péptidos seleccionados. Hasta la fecha, no se ha observado toxicidad grave con altas dosis de los péptidos seleccionados.

Ejemplo 2: Generación de una respuesta inmunitaria protectora tras la vacunación

Basándose en las respuestas de células T más altas que se inducían, se estudiaron más la pCAG-HA fusionado o bien con el 5mero4 (SEC ID N° 4) o el 5mero7 (SEC ID N° 12) en ratones BALB/c. Se controló la respuesta de anticuerpos por ensayos de titulación de inhibición de la hemaglutinación (HI) y neutralización (NAB) del suero 25 días después de la vacunación I.M. con cada vacuna ADN incluyendo la HA sin modificar como control. El título medio de HI en dilución recíproca era de 85 ± 40 , 55 ± 35 o 25 ± 20 mientras que el título de NAB era de 25 ± 30 , 22 ± 10 o indetectable para pCAG-HA-5-mero4, y 5mero7 o pCAG-HA respectivamente. Para evaluar si las respuestas de células T y B más altas se correlacionarían con el aumento de protección, se desafiaron los ratones BALB/c con una dosis letal de Hanoi05 28 días después de la inmunización I.M. con cada uno de los HA-5mero4 y 5mero7. La dosis de vacuna ADN seleccionada se basó en la dosis de 1 µg de pCAG-HA sin modificar que se descubrió que era la dosis mínima ensayada que inducía un 30% de supervivencia. La vacunación con 1 µg de pCAG-HA-5mero7 protegía el 80% de los animales de la muerte con una pérdida de peso del 5% mientras que pCAG-HA-5-meros n° 4 inducían un 100% de supervivencia con una pérdida de peso no significativa estadísticamente y sin signos clínicos de enfermedad. Esto demuestra que el uso del péptido unido al antígeno como adyuvante hace posible una respuesta inmunitaria eficaz para generar y proporcionar protección contra los efectos que se encuentran normalmente en la infección por influenza.

Ejemplo 3: Generación de una respuesta inmunitaria protectora tras la vacunación

Basándose en las respuestas de células T más altas que se inducían, se estudiaron más la pCAG-HA combinado con 5 o 50 µg de péptidos libres 5mero4 (SEC ID N° 4) en ratones BALB/c. La respuesta de anticuerpos se controló por ensayos de titulación de inhibición de la hemaglutinación (HI) y neutralización (NAB) del suero 25 días tras la vacunación I.M. con cada una de las vacunas ADN incluyendo la HA sin modificar como control. Para valorar si las respuestas de células T y B más altas se correlacionarían con el aumento de protección, se desafiaron los ratones BALB/c con una dosis letal de Hanoi05 28 días después de la inmunización I.M. con cada una de HA más 5 o 50 µg de 5mero4 (SEC ID N° 4). La dosis de vacuna ADN que se seleccionó se basaba en la dosis de 1 µg de pCAG-HA sin modificar que se había descubierto que era la mínima dosis ensayada que inducía una supervivencia del 30%. La vacunación con 1µg de pCAG-HA más 5 ug de 5mero4 (SEC ID N° 4) protegía al 50% de los animales de la muerte con una mínima pérdida de peso mientras que la pCAG-HA más 50 µg de 5mero4 inducía una supervivencia del 90% sin una pérdida de peso estadísticamente significativa ni signos clínicos de enfermedad. Los animales de control no vacunados que se trataron tuvieron un 100% de mortalidad. Esto demuestra que el uso del péptido libre como adyuvante en conjunción con el antígeno hace posible una respuesta inmunitaria eficaz para que se genere y se proporcione una protección contra los efectos que se encuentran normalmente en la infección por influenza. Estos datos también demuestran que hay una respuesta dependiente de la dosis con diferentes niveles de adyuvante.

Ejemplo 4: Eficacia de protección después de la inmunización con un péptido libre ajeno para el desafío heterólogo

Se vacunaron grupos de 10 ratones BALB/c I.M. con una única dosis de 100 µg de pCAG-HA + o 50 o 100 µg de

5mero4 (SEC ID N° 4) como péptido libre por ratón. Los ratones de control se inmunizaron con solo 50 µg de 5mero4 o PBS. 28 días más tarde se desafiaron con 100 DL50 de H5N1 A\Hong Kong\483\1997 adaptado al ratón. Los grupos de ratones que se habían inmunizado con pCAG α -HA + o 50 o 100 µg de 5mero4 (SEC ID N° 4) mostraban ambos una supervivencia del 100% mientras que el grupo control de PBS mostraba un 100% de mortalidad a los 18 días tras el desafío. Esto demuestra que el uso del péptido libre como adyuvante junto con un antígeno hace posible que se genere una respuesta inmunitaria eficaz y proporciona protección de los efectos que se encuentran normalmente en la infección por influenza utilizando virus relacionados lo que sugiere que se ha generado una respuesta inmunitaria protectora fuerte, entrecruzada.

10 Ejemplo 5: El adyuvante funciona con múltiples antígenos

Para demostrar que el efecto no se limita a las vacunas de gripe, se vacunaron I.M. ratones BALB/c con el equivalente a 1 µg de la vacuna de Hepatitis B (Engerix-B), vacuna Engerix-B con 50 µg de péptido libre o sin péptido como control. Se obtuvo el suero de los ratones las semanas 2, 4, 6 y 8 después de la vacunación. Se detectó el total de anticuerpo anti-HBS utilizando un kit comercial ELISA. La tasa de respuesta era bastante drástica, en que el grupo de control con Engerix B mostraba muy poca respuesta a las 8 semanas tras la inmunización, y la Engerix B más 50 µg de péptido mostraba una fuerte respuesta tanto a las 6 como a las 8 semanas tras la inmunización. La generación de una respuesta de anticuerpos a las 6-8 semanas tras la inmunización es típica del tipo de respuesta generada por las vacunaciones. Esto demuestra que el péptido libre funciona con en un amplio intervalo de tipos de antígeno.

Ejemplo 6: El adyuvante funciona con múltiples antígenos

Para demostrar que el efecto no se limita a las vacunas de gripe, se vacunaron I.M. ratones BALB/c con el equivalente a 5 µg de vacuna fluviral. Vacuna fluviral con (A) 50 µg de péptido libre o (B) sin péptido como control. Se obtuvo el suero de los ratones a las 2, 4, 6, y 8 semanas después de la vacunación. Se detectó el total de anticuerpos utilizando un kit comercial ELISA. La tasa de respuesta es bastante drástica, en que el grupo control de fluviral mostraba poca respuesta a las 8 semanas tras la inmunización, y el fluviral más 50 µg de péptido mostraba una fuerte respuesta tanto a las 6 como a las 8 semanas tras la inmunización. Como este estudio se hizo con un relativamente alto nivel de antígeno, sugiere que la cantidad de antígeno necesario puede ser menor que el que se espera normalmente para generar una fuerte respuesta inmune. Esto también demuestra que el péptido libre funciona en un amplio intervalo de tipos de antígeno.

Aunque se han descrito anteriormente las realizaciones preferidas de la invención, se reconocerá y entenderá que se pueden hacer en las mismas varias modificaciones, y las reivindicaciones adjuntas pretenden cubrir todas tales modificaciones.

Tabla 1: Secuencias seleccionadas

Secuencia de aminoácidos	Hidrofobia	Peso Molecular	Nombre	
KWCEC	0,74*	649,78	5mero4	SEC ID N° 4
KYMCW	1,00*	711,90	5mero7	SEC ID N° 12
CYWWW	1,85	824,95		SEC ID N° 14
EHWCM	0,90	686,81		SEC ID N° 15
FCCWW	1,87*	725,88		SEC ID N° 16
TCCMW	1,36*	624,80		SEC ID N° 17
TCWWH	1,29*	713,81		SEC ID N° 18
TCYWW	1,45*	739,85		SEC ID N° 19
WMICM	1,80	682,92		SEC ID N° 20
YWHMW	1,36	803,94		SEC ID N° 21

Tabla 1. Secuencias de 5meros 91-99 (de la Figura 18)

Número de Secuencia	Secuencia
91 (SEC ID N° 14)	CYWWW
92 (SEC ID N° 22)	CYYWC

ES 2 541 443 T3

93 (SEC ID N° 15)	EHWCM
94 (SEC ID N° 23)	EMWCM
95 (SEC ID N° 24)	EWCMC
96 (SEC ID N° 25)	EWNCW
97 (SEC ID N° 26)	EYCWW
98 (SEC ID N° 16)	FCCWW
99 (SEC ID N° 27)	FHMMW

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cantidad eficaz de un adyuvante peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos KWCEC (SEC ID N° 4) y un antígeno de interés.

5

2. Un método para preparar un medicamento para estimular una respuesta inmunitaria o para aumentar una respuesta inmunitaria contra un antígeno que comprende la mezcla de una cantidad eficaz de un adyuvante peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos KWCEC (SEC ID N° 4) con un excipiente adecuado.

10

Figura 1

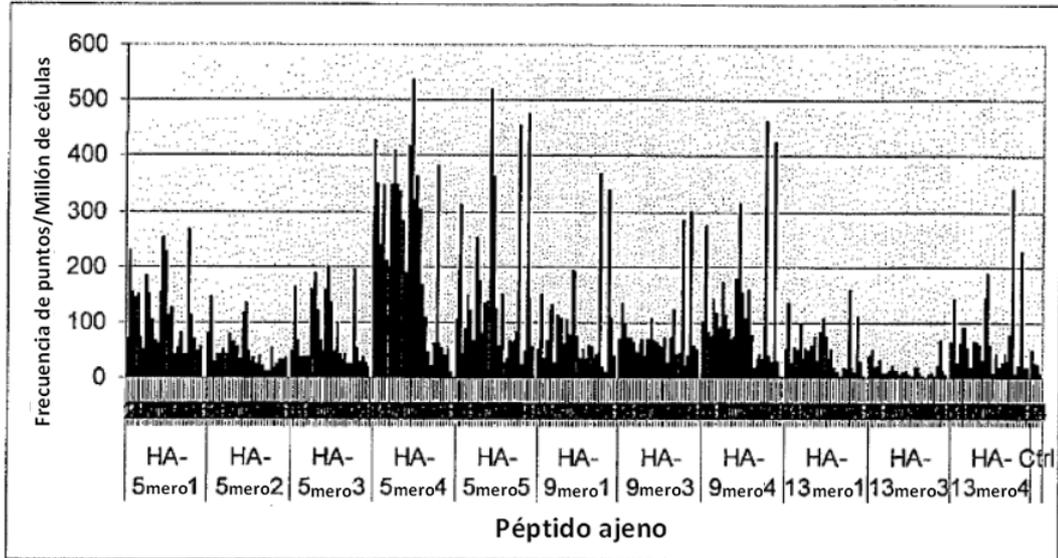


Figura 2

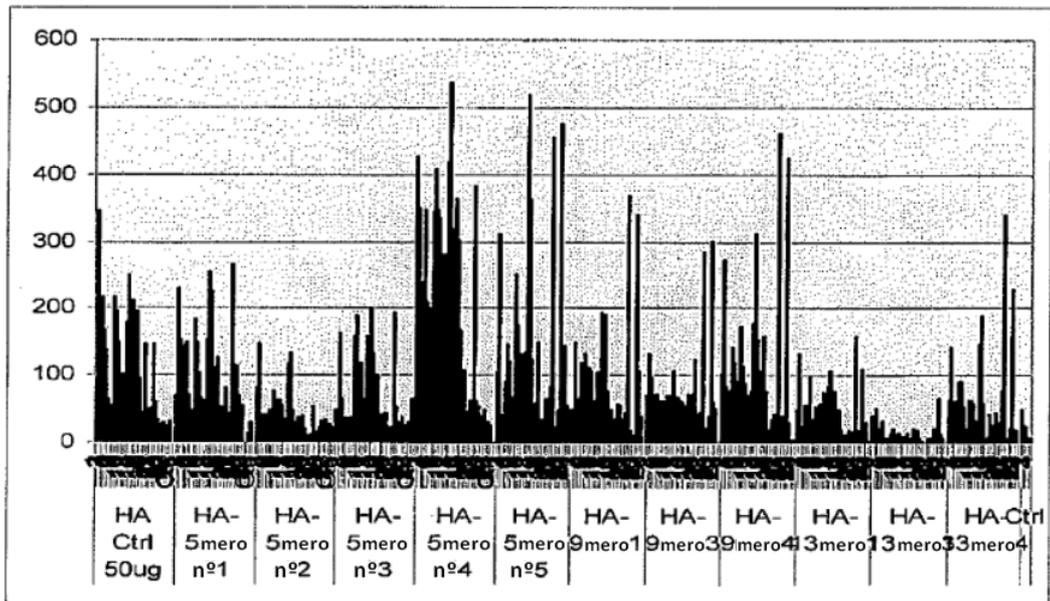


Figura 3

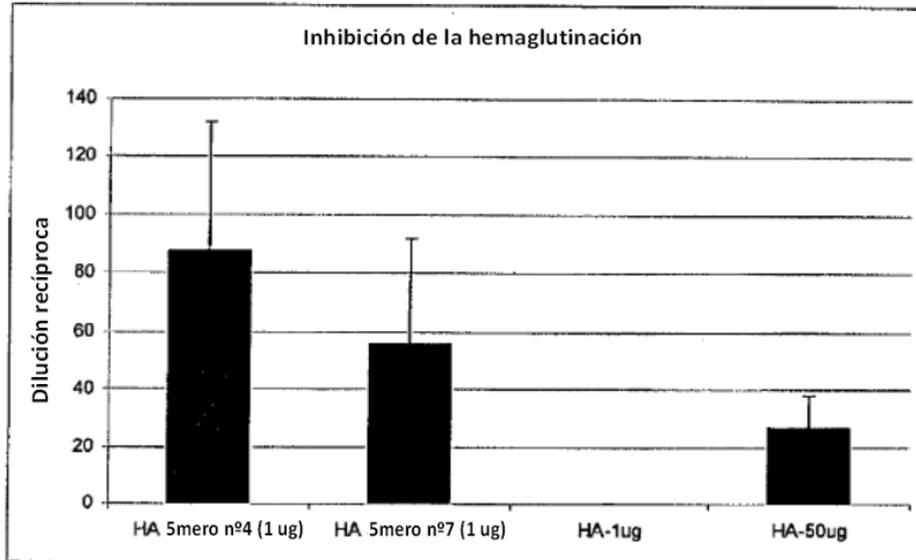


Figura 4

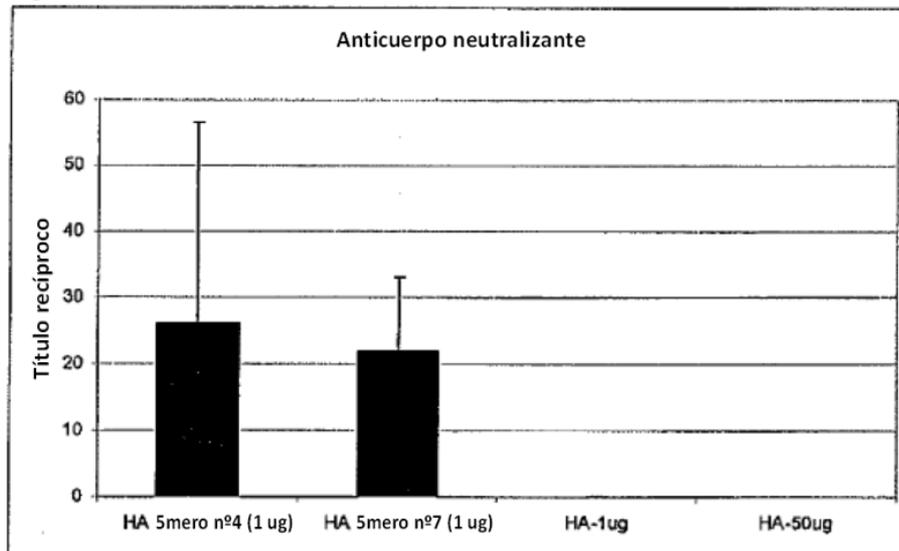


Figura 5

H05 Supervivencia: 5meros vs HA sola

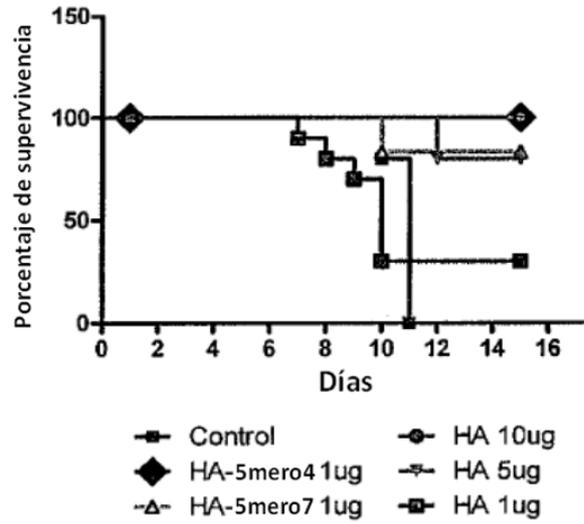


Figura 6

HA 5meros vs HA sola

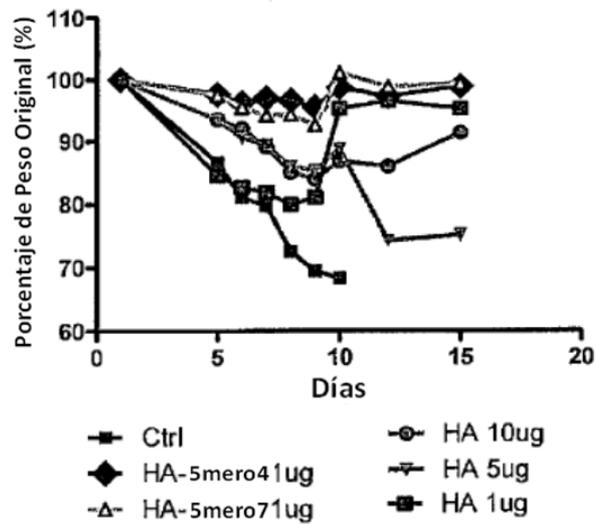


Figura 7

H05 Supervivencia: 5 ug Péptido Libre vs DMSO Ctrl

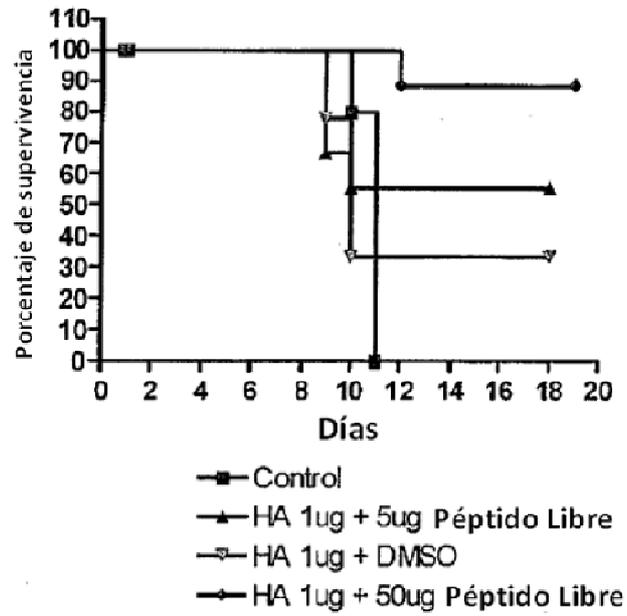


Figura 8

H05 Pérdida de peso- 5mero4 vs DMSO Control

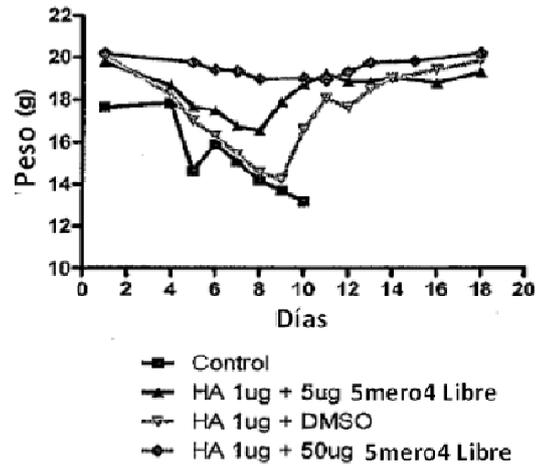


Figura 9

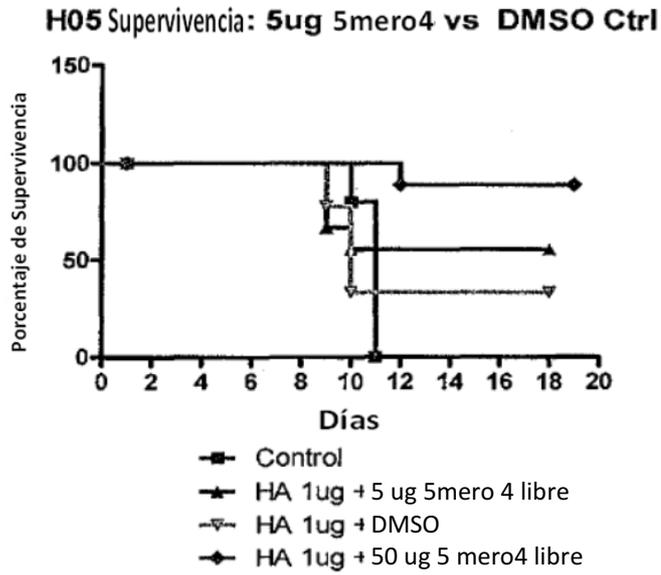


Figura 10

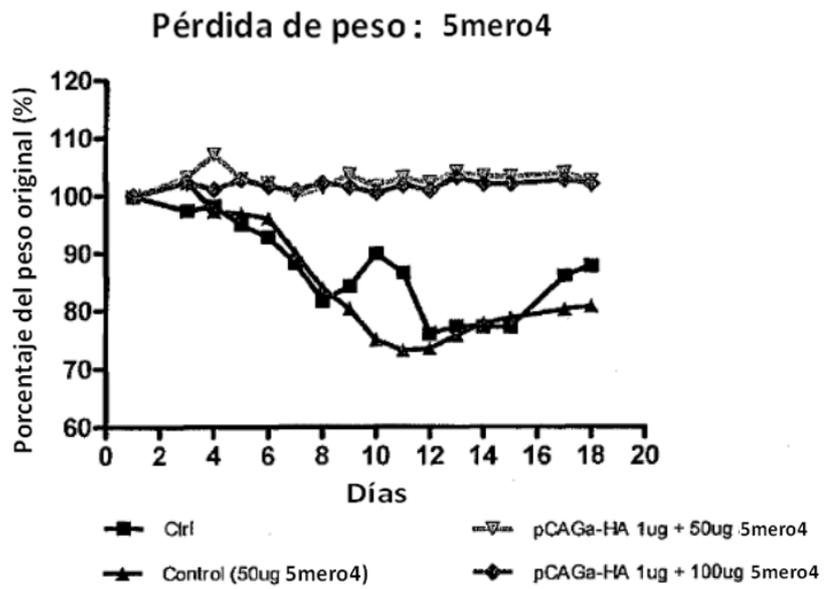


Figura 11

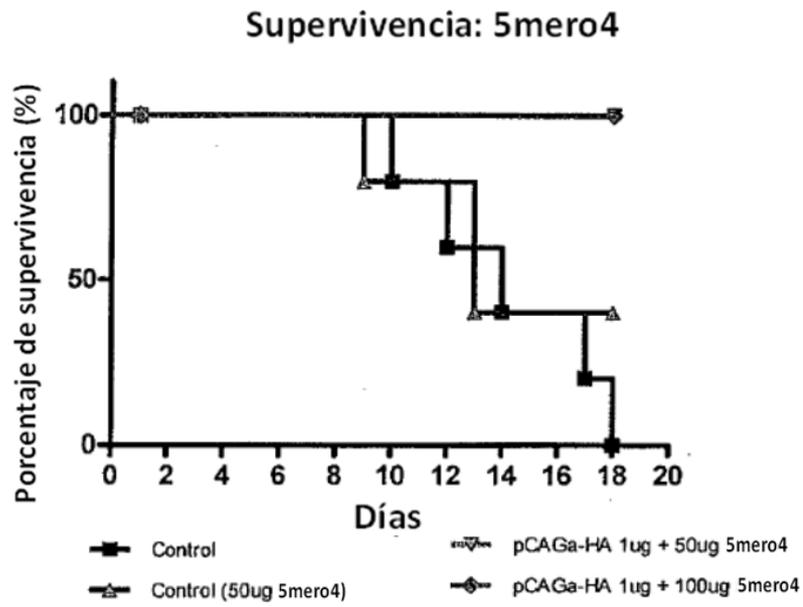


Figura 12

HK97 Pérdida de peso - HA 100ug + 50ug 5mero4 libre

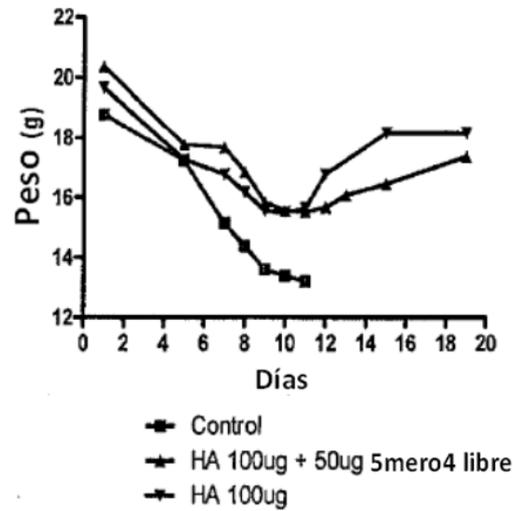


Figura 13

HK97 Supervivencia: HA 100ug + 50ug 5mero4 libre

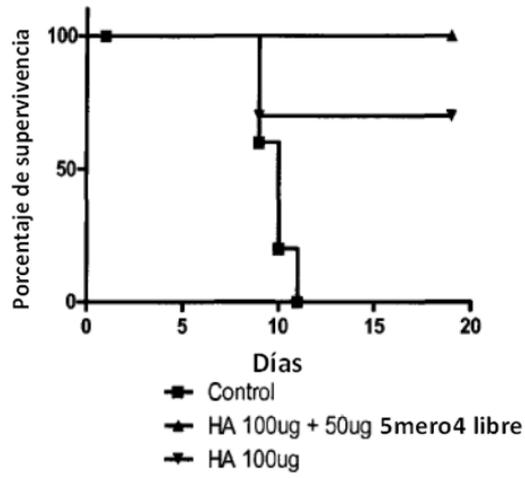
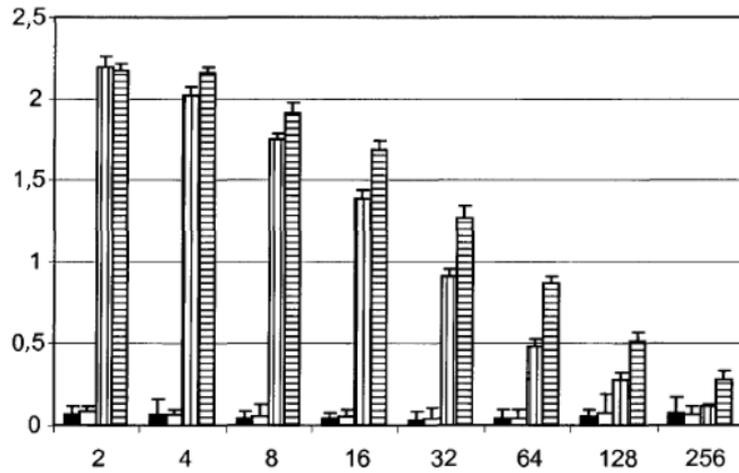
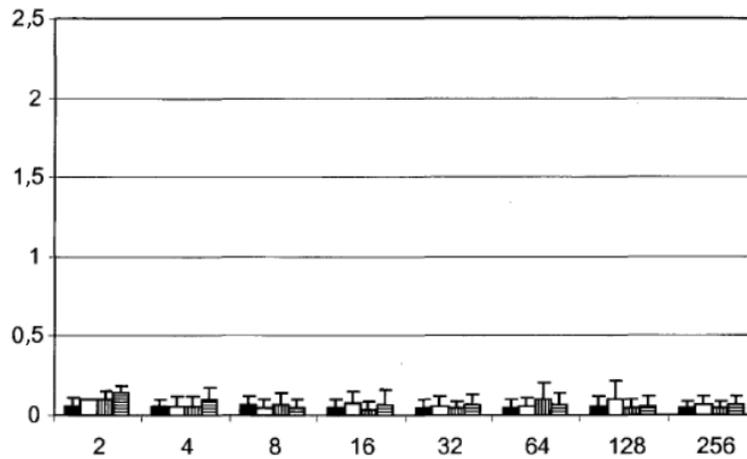


Figura 14

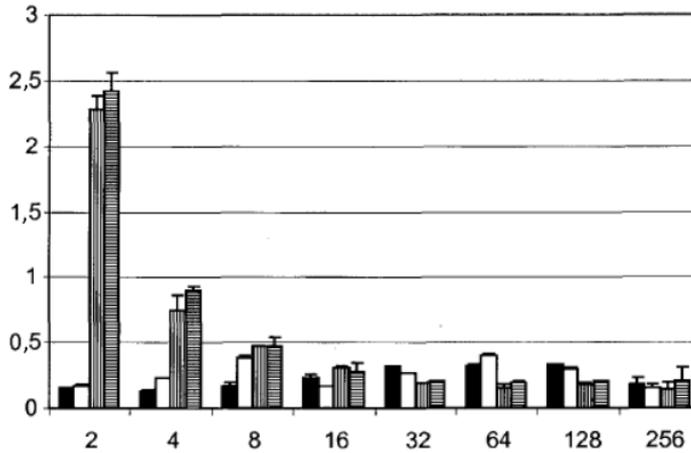


A: Engerix-B (1ug) +5mero4 libre (50ug)
 Negro=2 semanas tras inmunización
 Blanco = 4 semanas tras inmunización
 Líneas verticales = 6 semanas tras inmunización
 Líneas horizontales = 8 semanas tras inmunización



B: Engerix-B (1ug) sola
 Negro = 2 semanas tras inmunización
 Blanco = 4 semanas tras inmunización
 Líneas verticales = 6 semanas tras inmunización
 Líneas horizontales = 8 semanas tras inmunización

Figura 15



A: Fluviral (5ug) + 5mero4 libre (50ug)
 Negro = 2 semanas tras inmunización
 Blanco = 4 semanas tras inmunización
 Líneas verticales = 6 semanas tras inmunización
 Líneas horizontales = 8 semanas tras inmunización

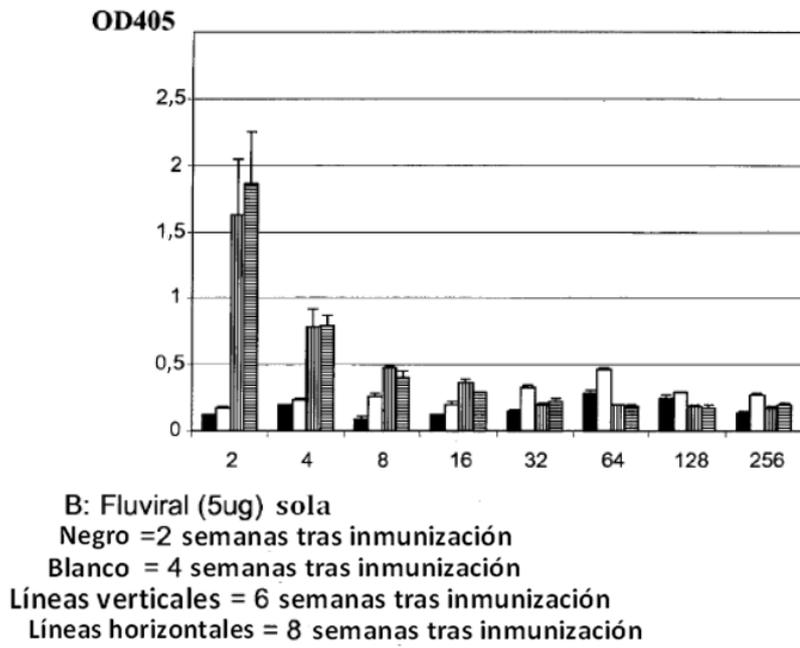


Figura 16

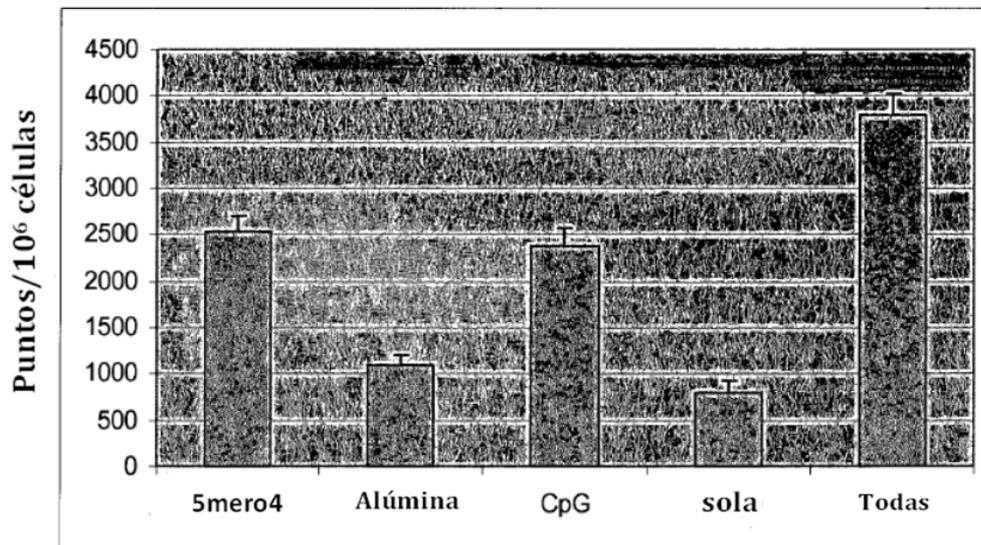


Figura 17

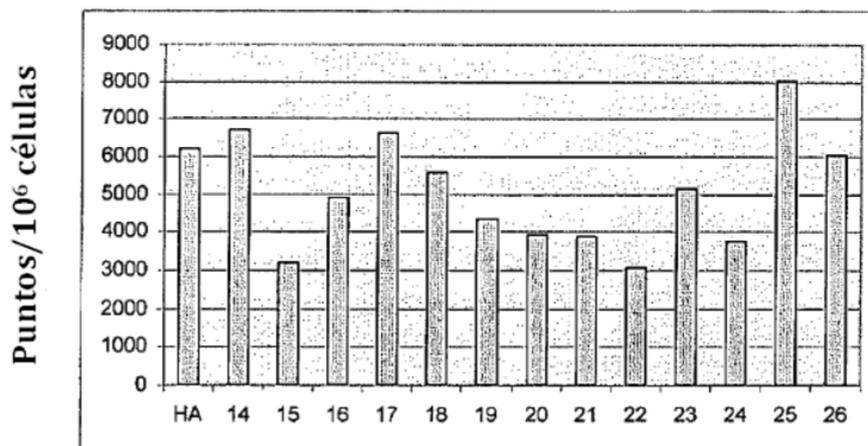
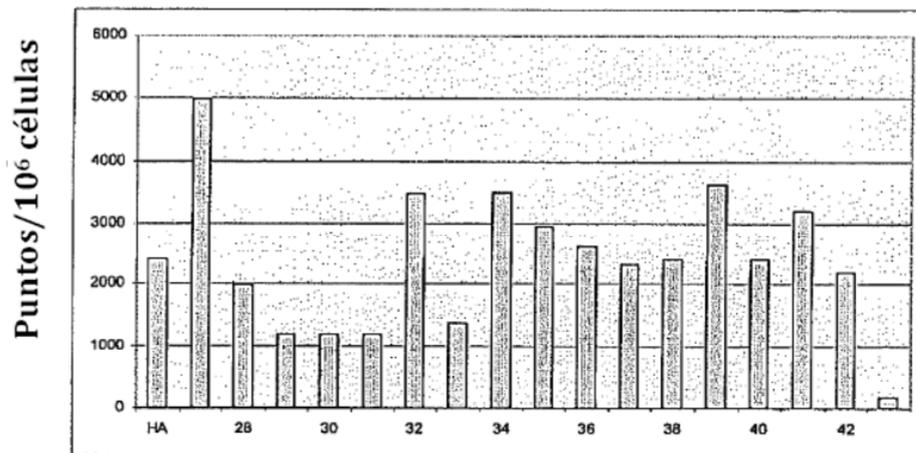
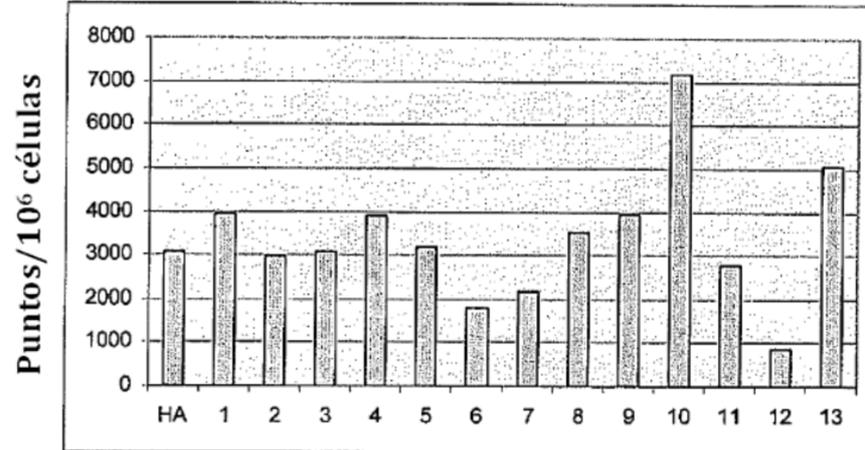


Figura 18

