

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 157**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 31/7028 (2006.01)

A61K 31/739 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2008 E 08875737 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2190475**

54 Título: **Métodos para potenciar la capacidad adyuvante de las composiciones de vacunas**

30 Prioridad:

29.08.2007 US 968731 P

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

02.02.2016

73 Titular/es:

**ABIVAX (100.0%)
5 rue de la Baume
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

SERRA, VINCENT

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 558 157 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

Métodos para potenciar la capacidad adyuvante de las composiciones de vacunas

5 **INTRODUCCIÓN**

[0001] El objetivo fundamental de una vacuna es proporcionar inmunidad permanente frente a una afección patológica. Idealmente, las vacunas proporcionan anticuerpos funcionalmente activos, inducen inmunidad mediada por células y activan a los linfocitos T y B con reactividad altamente específica así como de «memoria» para proporcionar protección frente a posteriores encuentros con un patógeno.

[0002] Los adyuvantes son aditivos de las vacunas que aumentan de forma no específica la respuesta inmunitaria. El mecanismo por el cual los adyuvantes potencian el sistema inmunitario varía mucho. Los adyuvantes pueden clasificarse como «inmunomoduladores» o «sistemas de distribución de antígenos». Los adyuvantes inmunomoduladores ceban al sistema inmunitario regulando la acción de las células inmunitarias mediante la alteración de la producción de linfoquinas. Los sistemas de distribución de antígenos, por otro lado, funcionan como distribuidores del antígeno a las células inmunológicas apropiadas. Además, los adyuvantes pueden potenciar la velocidad o duración de una respuesta inmunitaria, modular la avidéz de los anticuerpos, su especificidad, distribución de isotipo o subclase, estimular la inmunidad mediada por células, promover la inmunidad de la mucosa o potenciar las respuestas inmunitarias en individuos inmunológicamente inmaduros o senescentes. Los adyuvantes pueden afectar a la respuesta inmunitaria humoral o mediada por células, o a la combinación de ambas.

[0003] La inmunomodulación hace referencia a la capacidad de un adyuvante para alterar la respuesta de linfoquinas activando subgrupos diferenciales de células inmunitarias. Dos subgrupos principales de linfocitos T CD4+, Th1 y Th2, tienen una función principal en la determinación de la respuesta inmunitaria. Las respuestas Th1 típicamente inducen anticuerpos que se fijan al complemento y a potentes reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (HTR) y se asocian con γ -IFN, IL-2 y IL-12, mientras que las respuestas Th2 son el resultado de niveles elevados de anticuerpos en circulación y secretores, y se asocian con las citoquinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. La activación de células Th1 también regula la respuesta inmunitaria celular activando la proliferación de células T CD8+ citotóxicas y potenciando la citólisis de las células diana.

[0004] Se han investigado las propiedades adyuvantes de especies lipídicas. A diferencia de los antígenos peptídicos, los lípidos se procesan y presentan al sistema inmunitario a través de la familia CD1 de moléculas asociadas con la microglobulina β 2. Las moléculas CD1 han evolucionado para capturar y procesar tanto antígenos extraños como autolípidos para presentarlo a subgrupos particulares de células T. La ruta de presentación de CD1 desencadena tanto la respuesta inmunitaria innata como la adquirida activando dos subgrupos de células T restringidas por CD1 complementario; las células citotóxicas naturales (NKT) que realizan funciones adyuvantes y las células T no NKT capaces de realizar funciones de colaboración o citolíticas. Las células NKT expresan tanto marcadores celulares citotóxicos naturales (natural killer, NK) como un receptor de células T (TCR) semiinvariable conservado, Va24-Ja18/V β 8 en ratones y Va24-Ja18/V β 11 en humanos. Por consiguiente, las células NKT juegan un papel importante en diversas funciones inmunitarias, incluyendo las respuestas antimicrobianas, inmunidad antitumoral y regulación del equilibrio entre tolerancia y autoinmunidad.

[0005] Diversas moléculas lipídicas naturales y sintéticas son procesadas por las células presentadoras de antígenos y son presentadas por moléculas CD1 a las células NKT. El compuesto prototipo utilizado para estudiar la activación de células NKT *in vitro* e *in vivo* es KRN7000 y derivados de α -galactosiceramida (« α GalCer») obtenida de la esponja marina *Agelas mauritanus*. Entre los compuestos adicionales recientemente identificados se incluyen isoglobotrihexosilceramina («iGB3») que es un glucolípido endógeno y PBS-57, una 6"amino 6" desoxigalactosiceramida, como se describe en la solicitud de patente internacional PCT/US07/66250, cuya descripción se incorpora a este documento por referencia. Estos compuestos activan a las células NKT y regulan por incremento las respuestas de citoquinas *in vitro*. No obstante, en el contexto de las vacunaciones *in vivo*, se sabe poco con respecto a la eficacia de la capacidad adyuvante de los lípidos para estos compuestos.

[0006] En el documento WO 2007/007946 se describe en uso de alfa-GalCer como adyuvante en una vacuna nasal que comprende un antígeno vírico o antígenos asociados a tumores. Usando la vía nasal, se induce una respuesta inmunitaria IgA e IgG específica de antígeno. Silk y col. (2004 J. Clin. Invest. 114:1800-1811) describen alfa-GalCer utilizado como adyuvante para inducir inmunidad mediada por células T CD8 frente a un péptido administrado conjuntamente derivado de NY-ESO-1. Lui y col. (2006 J. Immun. Methods 312:34-39) describen la alfa-GalCer modificada PBS-57 y su efecto sobre las células NKT en comparación con el de KRN7000. En el

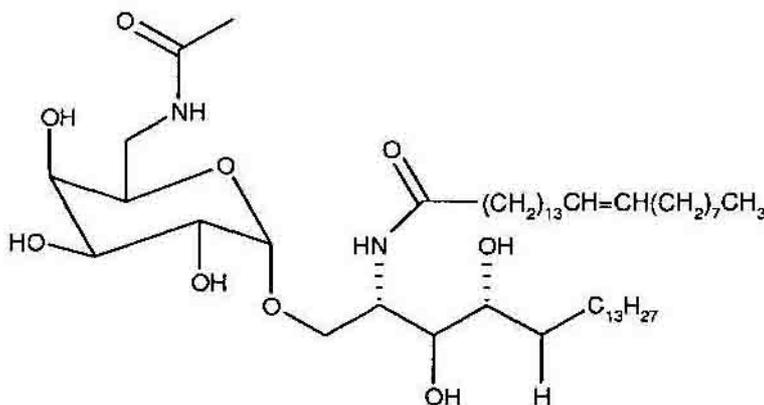
documento WO 2007/118234 se describe la administración combinada de PBS-57 con un antígeno para estimular una respuesta inmunitaria. La determinación de los niveles de IL-4 e IFN-gamma a las 48 horas muestra que PBS-57 es capaz de inducir la secreción de citoquina tanto Th1 como Th2. En el documento WO 2008/005824 se describe el uso combinado de la alfa-GalCer modificada denominada «PBS-32» y un antígeno para inducir/potenciar una respuesta inmunitaria. En el documento WO 2008/080926 se describe una composición que comprende la subunidad B de la toxina Shiga que es capaz de unirse al receptor de Gb3, el cual forma complejo con antígenos, y al menos un ligando de CD1 capaz de estimular a las células NKT. El ligando CD1 en particular puede ser PBS-57.

[0007] Se han aprobado muy pocos adyuvantes para su uso en vacunas para humanos debido a sus efectos adversos tóxicos. Los adyuvantes más frecuentes son los adyuvantes de aluminio y aceite, aunque es sabido que inducen efectos adversos como fiebre, cefalea, mialgias y molestias o exantema. Entre otras desventajas se incluyen una fuerte estimulación local del sistema inmunitario que induce dolor, enrojecimiento, hinchazón o un bulto en el sitio de inyección. Los adyuvantes también tienen procedimientos de preparación de vacunas complicados y pueden no ser capaces de aumentar la inmunogenicidad de antígenos débiles. En la actualidad, la elección de adyuvantes para la vacunación de humanos refleja un compromiso entre la necesidad de obtener una capacidad adyuvante y un nivel aceptable de efectos adversos. Existe la necesidad de nuevos adyuvantes con menos efectos adversos que sigan evocando una inmunidad protectora prolongada.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0008] Los inventores han descubierto que la adición de un glucolípidio sintético, denominado PBS-57, a una preparación de vacuna administrada a un sujeto activa tanto la respuesta inmunitaria humoral como la celular cuando se administra al sujeto. Por consiguiente, la descripción proporciona procedimientos para potenciar la inmunogenicidad de una vacuna en un sujeto, estimulando una respuesta inmunitaria humoral, estimulando una respuesta de células T CD4+ y estimulando una respuesta de células citotóxicas CC8+ en un sujeto administrando conjuntamente PBS-57 y una vacuna a dicho sujeto. La presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende:

a) un compuesto PBS-57 de fórmula:



y
b) un antígeno,

para su uso como medicamento en un procedimiento para potenciar la respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células frente al antígeno de un sujeto vacunado con dicha composición de vacuna, con respecto a un control de un sujeto vacunado con dicho antígeno solo, y en el que el antígeno está formando complejo con la subunidad B de toxina Shiga o un equivalente funcional de la misma que es capaz de unirse al receptor de Gb3.

[0009] La invención se define en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0010]

- La figura 1 es una gráfica en la que se muestra el porcentaje de células NKT a día 7 en una población de células T CD3+ de linfocitos de sangre periférica (PBL) en cultivo tratados con distintas cantidades de glucolípidos adyuvantes α GalCer, PBS-20, PBS-25 y PBS-57.
- La figura 2 es una gráfica en la que se muestra el porcentaje de células NKT a día 7 en una población de células T CD3+ de PBL en cultivos tratados con distintas cantidades de α GalCer, PBS-25, PBS-57 y PBS-83.
- La figura 3 es una gráfica en la que se muestra un aumento en las células NKT en cultivos *in vitro* de PBL aislados de voluntarios tratados con α GalCer, PBS-20, PBS-25, PBS-57 y PBS-83. Se representa el valor de la mediana sobre de la gráfica.
- La figura 4A es una gráfica en la que se muestra el porcentaje de células TCRA β dentro del bazo de ratones 24 horas después de la administración de α GalCer, PBS-57 y PBS-83. La figura 4B es una gráfica del porcentaje de células NKT dentro de la población TCRA β en el bazo de ratones 24 horas después de la administración de los glucolípidos adyuvantes. El valor de p bilateral se calculó para cada adyuvante en comparación con el control.
- La figura 5A es una gráfica del porcentaje de células CD40+ en la población de células CD11c+ CD8 α - del bazo de ratones 24 horas después de la administración intravenosa de glucolípidos adyuvantes. La figura 5B es una gráfica del porcentaje de células CD40+ en la población de células CD11c+ CD8 α + del bazo de ratones 24 horas después de la administración intravenosa de glucolípidos adyuvantes. La figura 5C es una gráfica del porcentaje de células CD80+ en la población de células CD11c+ CD8 α - del bazo de ratones 24 horas después de la administración intravenosa de glucolípidos adyuvantes. La figura 5D es una gráfica del porcentaje de células CD80+ en la población de células CD11c+ CD8 α + del bazo de ratones 24 horas después de la administración intravenosa de glucolípidos adyuvantes. La figura 5E es una gráfica del porcentaje de células CD86+ en la población de células CD11c+ CD8 α - del bazo de ratones 24 horas después de la administración intravenosa de glucolípidos adyuvantes. La figura 5F es una gráfica del porcentaje de células CD86+ en la población de células CD11c+ CD8 α + del bazo de ratones 24 horas después de la administración intravenosa de glucolípidos adyuvantes.
- La figura 6 es una gráfica de puntos y un histograma de resultados de la tinción con CFSE en citometría de flujo de un ensayo para determinar la lisis específica de las células presentadoras de antígenos de ratones inmunizados con ovoalbúminia (Ova) sola u Ova y α GalCer.
- La figura 7 es una gráfica en la que se muestra el porcentaje de lisis específica de células diana específicas de Ova en el bazo de ratones inmunizados con adyuvante, con o sin Ova.
- La figura 8 es una gráfica en la que se muestra el porcentaje de lisis específica de células diana específicas de Ova en la sangre de ratones inyectados por vía intravenosa («i.v.») con Ova en combinación con diferentes concentraciones de α GalCer.
- La figura 9 es una gráfica en la que se muestra el porcentaje de lisis específica de células diana específicas de Ova en la sangre de ratones inyectados i.v. con Ova en combinación con diferentes concentraciones de PBS-57.
- La figura 10 es una gráfica en la que se muestra el porcentaje de lisis específica de células diana específicas de Ova en la sangre de ratones inyectados i.v. con PBS-57 en combinación con diferentes concentraciones de Ova.
- La figura 11 es una gráfica en la que se muestra el porcentaje de lisis específica de células diana específicas de Ova en la sangre de ratones inyectados por vía intramuscular (i.m.) con Ova en combinación con diferentes concentraciones de α GalCer.
- La figura 12 es una gráfica en la que se muestra el porcentaje de lisis específica de células diana específicas de Ova en la sangre de ratones inyectados i.m. con Ova en combinación con diferentes concentraciones de PBS-57.
- La figura 13 es una gráfica en la que se compara el porcentaje de lisis específica de células diana específicas de Ova en la sangre de ratones inyectados i.v. o i.m. con diferentes combinaciones de Ova y adyuvante.
- La figura 14 es una gráfica de barras en la que se muestra el aumento de la producción de anticuerpo en ratones

inmunizados con una composición de vacuna de toxoide tetánico (TT) que contiene PBS-57.

La figura 15 es una gráfica de barras en la que se muestra el aumento en la capacidad de respuesta de las células T CD8+ en ratones inmunizados por vía intramuscular con ovoalbúmina (OVA) en combinación con PBS-57.

5

La figura 16 es una gráfica de barras en la que se muestra el aumento en la capacidad de respuesta de las células T CD8+ en ratones inmunizados por vía subcutánea con OVA en combinación con PBS-57.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS DIVERSAS REALIZACIONES

10

[0011] Los adyuvantes potencian la inmunogenicidad de los antígenos en preparaciones de vacunas de diversas formas. En el caso de las toxinas, se requiere una buena respuesta inmunitaria humoral. En el caso de bacterias intracelulares, es importante una respuesta mediada por células, mediada principalmente por células T citotóxicas y células Th1. En el caso de infecciones víricas, ambas respuestas humoral y celular son fundamentales para controlar la infección. La capacidad de un adyuvante para potenciar no solo la respuesta inmunitaria humoral sino también la mediada por células aumenta la probabilidad de desarrollar inmunidad prolongada. Un adyuvante eficaz también debería ser útil en combinación con una amplia variedad de antígenos. Los inventores han encontrado que un glucoesfingolípido, el PBS-57, tiene capacidad de estimular tanto la respuesta inmunitaria mediada por células como la humoral *in vivo*. Además, PBS-57 es capaz de estimular una respuesta inmunitaria frente a un antígeno nominal débil para producir anticuerpos y simultáneamente proporcionar lisis mediada por células de las células que expresan antígenos de superficie específicos.

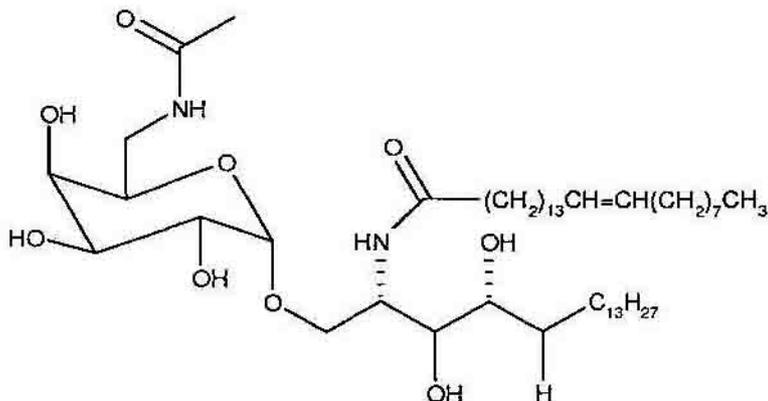
15

20

[0012] La invención proporciona una composición de vacuna que comprende:

a) un compuesto PBS-57 de fórmula:

25



y

30 b) un antígeno,

para su uso como medicamento en un procedimiento para potenciar la respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células frente al antígeno de un sujeto vacunado con dicha composición de vacuna, con respecto a un control de un sujeto vacunado con dicho antígeno solo, y en el que el antígeno está formando complejo con la subunidad B de toxina Shiga o un equivalente funcional de la misma que es capaz de unirse al receptor de Gb3.

35

[0013] La descripción también proporciona un procedimiento para aumentar la inmunogenicidad de una vacuna en un sujeto mediante la administración conjunta de PBS-57 y la vacuna. Según se usa en este documento, un «sujeto» es un mamífero, por ejemplo, un ratón, más adecuadamente, un humano. La expresión «potenciar la inmunogenicidad de una vacuna» hace referencia a la capacidad de PBS-57 para potenciar la respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células de un sujeto frente a una vacuna en relación con un control adecuado. Para los fines de determinar si aumenta la inmunogenicidad con respecto al control, puede realizarse una comparación cuantitativa de la señal en una muestra de un sujeto vacunado con el antígeno y PBS-57 con la señal en una

40

muestra de un sujeto vacunado solo con el antígeno. Según se usa en este documento, la inmunogenicidad puede medirse mediante cualquier ensayo utilizado por los expertos en la materia para determinar la respuesta inmunitaria humoral o mediada por células. Por ejemplo, la inmunogenicidad puede determinarse usando un ensayo ELISA para diversos niveles de citoquinas, cuya realización es rutinaria para los expertos en la técnica.

5

[0014] Según se describe en este documento, la respuesta inmunitaria aumente al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos en 100%, al menos en 150%, al menos el 200% o al menos el 400%, en relación con un control adecuado. Un control adecuado puede ser un sujeto tratado con una composición de vacuna que no incluye PBS-57. El porcentaje de aumento puede calcularse usando la siguiente fórmula:

10

[(valor representativo de la respuesta inmunitaria del sujeto tras el tratamiento con la composición que contiene PBS-57)-(valor representativo de la respuesta inmunitaria del control)/(valor representativo de la respuesta inmunitaria del sujeto tras el tratamiento con la composición que contiene PBS-57)]x100.

15

[0015] Según se usa en este documento los términos «administración conjunta» o «administrado conjuntamente» hacen referencia a la administración de al menos un adyuvante y la vacuna conjuntamente, es decir, simultáneamente en el tiempo, o secuencialmente, es decir, administración de un adyuvante, seguida de la administración de la vacuna. Es decir, tras la administración del adyuvante, la vacuna puede administrarse sustancialmente inmediatamente después del adyuvante o la vacuna puede administrarse tras un periodo de tiempo eficaz después del adyuvante; el periodo de tiempo eficaz es la cantidad de tiempo necesario para la obtención del beneficio máximo desde la administración del adyuvante. Alternativamente, el adyuvante y la vacuna pueden formularse conjuntamente.

20

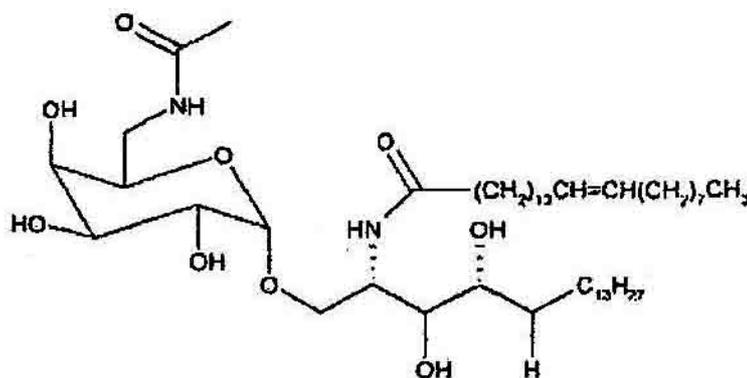
[0016] Las composiciones de vacuna están formuladas de forma adecuada para incluir PBS-57.

[0017] El término «vacuna» hace referencia a una composición que, cuando se administra a un sujeto, induce respuestas inmunitarias celulares o humorales como se describe en este documento. Las composiciones de vacuna pueden incluir un antígeno o combinaciones de antígenos; el antígeno puede ser un resto polipeptídico o de hidrato de carbono, o combinaciones de los mismos, por ejemplo, una glucoproteína. El antígeno deriva de forma adecuada de un agente infeccioso (p. ej., un microorganismo patógeno), un tumor, una molécula endógena (p. ej., una «auto» molécula) o, a fines de estudio, un antígeno nominal, como la ovoalbúmina (denominada en el documento «Ova»). Las composiciones de vacuna también pueden incluir agentes infecciosos muertos o atenuados. Las composiciones de vacunas utilizadas junto con la invención incluyen de forma adecuada PBS-57 y un antígeno. A continuación se muestra la estructura de PBS-57:

25

30

35



[0018] PBS-57 activa a las células NKT *in vitro* e *in vivo*. PBS-57 contiene un grupo amido en la posición C6 de la galactosa y un doble enlace cis en la cadena acilo de la porción ceramida. Sin querer estar ligado a la teoría, se considera que el doble enlace de la cadena lateral de ceramida facilita la unión al surco de la molécula CD1d y aumenta la solubilidad del glucoesfingolípido. También se ha demostrado que PBS-57 induce la liberación de IFN γ e IL-4 *in vitro*.

[0019] Las composiciones de vacunas que incluyen PBS-57 pueden formularse usando diversos procedimientos preparativos y compuestos inactivos conocidos por los expertos en la materia. Consultar Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., (2000). Las vacunas también pueden contener un sistema de distribución del antígeno adecuado para dirigir dicho antígeno hacia las células inmunitarias. En la materia se conocen sistemas de distribución de antígenos adecuados entre los que se incluyen, pero sin limitaciones MVA (virus de Ankara modificado), adenovirus, lentivirus, traslocación de una subunidad de toxina pertussis o shiga o liposomas con antígeno encapsulado. Los expertos en la materia pueden determinar la cantidad de dosis eficaz adecuada de PBS-57 en las composiciones de vacuna, aunque típicamente esta oscila de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 10 000 microgramos por kilogramo de peso corporal, aunque típicamente son de aproximadamente 1000 microgramos o menos por kilogramo de peso corporal. En algunas realizaciones, la cantidad de dosis eficaz oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 5000 microgramos por kilogramo de peso corporal. En otra realización, la cantidad de dosis eficaz oscila de aproximadamente 50 a aproximadamente 1000 microgramos por kilogramo de peso corporal. En otra realización, la cantidad de dosis eficaz oscila de aproximadamente 75 a aproximadamente 500 microgramos por kilogramo de peso corporal. Para los objetivos del estudio, una dosis adecuada para un ratón es 1 µg de PBS-57 por 100 µl de dosis. La composición de PBS-57 puede administrarse en una única dosis, o puede administrarse en dosis múltiples durante un periodo de semanas o meses.

[0020] Pueden incluirse uno o más antígenos en las composiciones con PBS-57, o pueden formularse independientemente. Según se usa en este documento, el término antígeno hace referencia a una molécula que estimula una respuesta inmunitaria. Se apreciará que la dosis del antígeno dependerá del antígeno específico, y de la edad y estado inmunológico del sujeto, así como de otros factores relevantes que pueden ser determinados por los expertos en la materia.

[0021] En consecuencia, los antígenos derivan de agentes infecciones atenuados o muertos. Pueden utilizarse microorganismos completos o porciones de los mismos (p. ej., fantasmas de membranas, preparaciones de membranas sin procesar, lisados y otras preparaciones de microorganismos). Entre los agentes infecciosos adecuados de los que puede derivarse un antígeno se incluyen, pero sin limitaciones, patógenos y microorganismos como bacterias, parásitos y virus. En algunos contextos, los antígenos adecuados se obtienen o derivan de un patógeno vírico que se asocia con una enfermedad humana como, sin limitaciones, VIH/SIDA (*Retroviridae*, p. ej., moléculas gp120 de aislados de VIH-1 y VIH-2, HTLV-I, HTLV-II), virus de la gripe (*Orthomyxoviridae*, p. ej., tipos A, B y C), herpes (p. ej., virus del herpes simple, glucoproteínas gB, gD y gH de HSV-1 y HSV-2), infecciones por rotavirus (*Reoviridae*), infecciones respiratorias (virus paragripal y respiratorio sincitial), poliomielitis (*Picornaviridae*, p. ej., poliovirus, rinovirus), sarampión y paperas (*Paramyxoviridae*), rubeola (*Togaviridae*, p. ej., virus de la rubeola), hepatitis (p. ej., virus de la hepatitis de tipos A, B, C, D, E y/o G), citomegalovirus (p. ej., gB y gH), gastroenteritis (*Caliciviridae*), fiebre amarilla y del Nilo occidental (*Flaviviridae*), rabia (*Rhabdoviridae*), fiebre hemorrágica coreana (*Bunyaviridae*), fiebre venezolana (*Arenaviridae*), verrugas (Papillomavirus), virus de la inmunodeficiencia en simios, virus de la encefalitis, virus de la varicela zóster, virus de Epstein-Barr y otras familias de virus, incluidas *Coronaviridae*, *Birnaviridae* y *Filoviridae*.

[0022] Los antígenos bacterianos y de parásitos adecuados también pueden obtenerse o derivarse a partir de agentes conocidos como responsables de enfermedades como, pero sin limitaciones, difteria, tos ferina, tétanos, tuberculosis, neumonía bacteriana o fúngica, otitis media, gonorrea, cólera, fiebre tifoidea, meningitis, mononucleosis, peste, sigelosis o salmonelosis, legionelosis, enfermedad de Lyme, lepra, malaria, anquilostomosis, oncocercosis, esquistosomiasis, tripanosomiasis, leishmaniasis, giardiasis, amebiasis, filariasis, borreliosis y triquinosis. Aún pueden obtenerse o derivarse de patógenos no convencionales otros antígenos como los agentes causantes del kuru, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), tembladera, encefalopatía transmisible del visón y enfermedades degenerativas crónicas, o a partir de partículas infecciosas proteináceas como los priones que se asocian con la enfermedad de las vacas locas.

[0023] Entre los patógenos específicos adicionales a partir de los cuales pueden derivarse antígenos se incluyen *M. tuberculosis*, *Chlamydia*, *N. gonorrhoeae*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Treponema pallidum*, *Pseudomonas*, *Bordetella pertussis*, *Brucella*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Leptospira interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia pestis*, *Streptococcus* (tipos A y B), neumococos, meningococos, *Haemophilus influenzae* (tipo b), *Toxoplasma gondii*, *Moraxella catarrhalis*, donovanosis y actinomycosis; patógenos fúngicos como candidiasis y aspergilosis; patógenos parásitos como tenias, lombrices, ascáridos, amebiasis, giardiasis, *Cryptosporidium*, *Schistosoma*, *Pneumocystis carinii*, tricomoniasis y triquinosis. La presente invención también puede usarse para proporcionar una respuesta inmunitaria adecuada frente a numerosas enfermedades

veterinarias, como fiebres aftosas, coronavirus, *Pasteurella multocida*, *Helicobacter*, *Strongylus vulgaris*, *Actinobacillus pleuropneumonia*, virus de la diarrea bovina viral (BVDV), *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* y *Bordetella pertussis*, *parapertussis* y *brochiseptica*.

5 **[0024]** En otras realizaciones, los antígenos para su inclusión en las composiciones de vacunas que pueden usarse en los procedimientos actuales son antígenos derivados de tumores o células tumorales autólogas o alogénicas completas. En consecuencia, el antígeno tumoral es un antígeno específico del tumor (AET) o un antígeno asociado al tumor (AAT). En la técnica se conocen varios antígenos tumorales así como sus patrones de expresión, y pueden seleccionarse en función del tipo de tumor que se va a tratar. Entre los ejemplos de antígenos tumorales no limitantes se incluyen cdk4 (melanoma), β -catenina (melanoma), caspasa-8 (carcinoma epidermoide), 10 MAGE-1 y MAGE-3 (melanoma, cáncer de mama, glioma), tirosinasa (melanoma), idiotipo de Ig de superficie (p. ej., BCR) (linfoma), Her-2/neu (mama, ovario), MUC-1 (mama, pancreático) y HPV E6 y E7 (carcinoma de cuello uterino). Entre los antígenos tumorales adecuados adicionales se incluyen antígeno específico de próstata (PSA), sialil-Tn (STn), proteínas de choque térmico y péptidos asociados a tumores (p. ej., gp96), moléculas de gangliósido 15 (p. ej., GM2, GD2 y GD3), antígeno carcinoembrionario (CEA) y MART-1.

[0025] Como aprecian los expertos en la materia, las vacunas se formulan adecuadamente para ser compatibles con la vía de administración pretendida. Entre los ejemplos de vías de administración adecuadas se incluyen la parenteral, por ejemplo, administración por vía intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (p. ej., 20 inhalación), transdérmica (tópica), intranasal, interperitoneal, transmucosa y rectal. La vacuna también puede incluir un vehículo fisiológicamente aceptable. Un vehículo «fisiológicamente aceptable» es cualquier vehículo que es adecuado para su administración *in vivo* (p. ej., administración oral, transdérmica o parenteral) o uso *in vitro*, es decir, cultivo celular. Entre los vehículos fisiológicamente aceptables adecuados para su administración *in vivo* se incluyen agua, soluciones tamponadas y soluciones de glucosa, entre otras. Entre los componentes adicionales de 25 las composiciones que pueden ser adecuados se incluyen excipientes como estabilizantes, conservantes, diluyentes, emulsionantes o lubricantes, además del vehículo fisiológicamente aceptable y el antígeno. En especial, entre los excipientes adecuados se incluyen, pero sin limitaciones, Tween 20, DMSO, sacarosa, L-histidina, polisorbato 20 y suero.

30 **[0026]** También se describe un procedimiento para estimular la respuesta inmunitaria humoral frente a un antígeno. El procedimiento incluye administrar conjuntamente PBS-57 y el antígeno a un sujeto, como se describe anteriormente. Según se usa en este documento, una «respuesta inmunitaria humoral» es la producción de anticuerpos por las células B, y el proceso accesorio que lo acompaña, incluyendo, entre otros, pero sin limitaciones, 35 la activación de Th2 y la producción de citoquinas, la formación de centros germinales y el cambio de isotipo, producción de maduración de la afinidad y generación de células de memoria. Para los fines de determinar si se activa una respuesta inmunitaria humoral, puede realizarse una comparación cuantitativa de la señal en una muestra de un sujeto vacunado con el antígeno y PBS-57 con la señal en una muestra de un sujeto vacunado solo con el antígeno. La respuesta inmunitaria humoral puede evaluarse midiendo las funciones efectoras de los anticuerpos, incluyendo la neutralización de patógenos o toxinas, la activación clásica del complemento y la promoción por la 40 opsonina de la fagocitosis y eliminación del patógeno. Los anticuerpos producidos en respuesta a la administración conjunta de PBS-57 y un antígeno pueden ser de cualquier tipo, por ejemplo, IgM, IgA o IgG. La respuesta inmunitaria humoral puede probarse mediante cualquier procedimiento cuantitativo conocido en la materia, por ejemplo, ELISA, ensayo de inmunodifusión radial simple (SRID), inmunoensayo enzimático (EIA) o ensayo de inhibición de hemaglutinación (HAI).

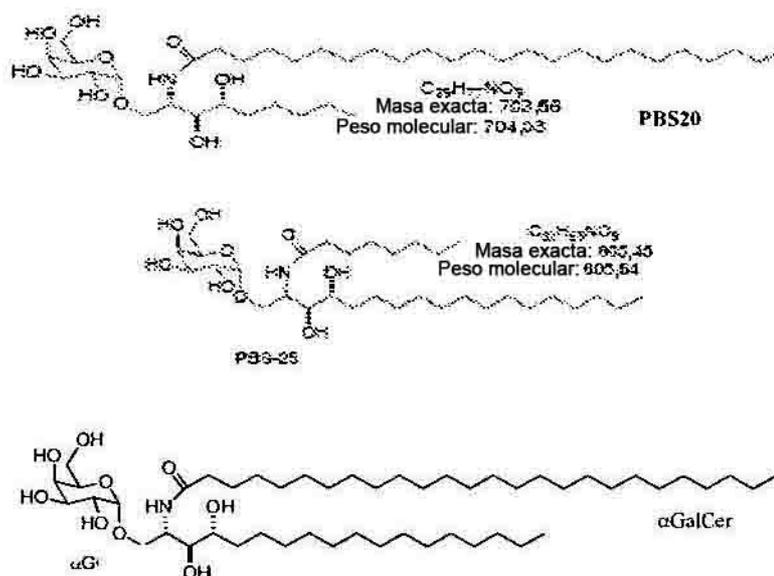
45 **[0027]** También se describe un procedimiento de activación de linfocitos T CD4+ en un sujeto. Como se entenderá en la materia, las células T CD4+ o «células T colaboradoras», son células que reconocen antígenos presentados por los marcadores principales de histocompatibilidad (MHC) de clase II de la superficie de las células presentadoras de antígeno, y secretan linfoquinas para estimular ambas ramas del sistema inmunitario, la mediada 50 por células y la mediada por anticuerpos. La activación de las células T CD4+ promueve la secreción de linfoquinas, el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas, la maduración de la afinidad de la respuesta de anticuerpos, la activación de macrófagos y potencia la actividad de las células citotóxicas naturales (NK) y de las células T citotóxicas (CTL). Las linfoquinas son proteínas secretadas por los linfocitos que afectan a su propia actividad y/o a la actividad de otras células. Entre las linfoquinas se incluyen, pero sin limitaciones, interleuquinas y citoquinas, por 55 ejemplo, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 o INF γ . Para los fines de determinar si se activan linfocitos T CD4+, puede realizarse una comparación cuantitativa de la señal en una muestra de un sujeto vacunado con el antígeno y PBS-57 con la señal en una muestra de un sujeto vacunado solo con el antígeno. Los procedimientos para estudiar la activación de las células T CD4+ son conocidos en la materia.

- [0028]** También se describe un procedimiento de activación de linfocitos T CD8+ en un sujeto. Los linfocitos T CD8+ reconocen antígenos presentados mediante moléculas del MHC de clase I (presentes en todas las células nucleadas). La formación de los complejos MHC de clase I-péptido tiene como resultado la liberación de gránulos líticos a la célula diana que causa la lisis de dicha célula diana. Los procedimientos utilizados para estudiar la activación de las células T CD8+ son conocidos en la materia, e incluyen, pero sin limitaciones, ELISPOT, ELISA y ensayos de citotoxicidad. Según se usa en este documento, se usa un modelo de ratón para controlar la activación de las células T CD8+ usando un ensayo de fluorescencia para determinar la citotoxicidad mediada por células, como se describe en Hermans y col., 2004, Journal of Immunologic Methods, 285:25-40. En este ensayo, los ratones se inmunizaron el día 0 con la vacuna con o sin PBS-57. Se crearon células diana singénicas aislando esplenocitos de un segundo grupo de ratones y marcando las células con dos colorantes fluorescentes para marcaje celular independientes o concentraciones altas y bajas de un único colorante fluorescente, por ejemplo, CFSE o CMTMR. Un grupo de células diana se carga con un péptido específico del antígeno mientras que un segundo grupo de células diana se carga con un péptido irrelevante. Las dos poblaciones de células diana se mezclan en cantidades iguales y se inyectan en ratones inmunizados. Veinticuatro horas después, los ratones se sacrifican y se obtienen los esplenocitos y muestras de sangre. El nivel de cada conjunto de células diana se analiza mediante citometría de flujo. La activación de los linfocitos CD8+ se determina comparando el número de células diana en una muestra vacunada con antígeno y PBS-57 con el número de células diana en una muestra de un sujeto vacunado solo con antígeno.
- 20 **[0029]** Otros aspectos de la invención serán aparentes considerando los siguientes ejemplos no limitantes y las figuras que los acompañan.

EJEMPLOS

25 Ejemplo 1: Activación con PBS-57 de células NKT *in vitro*

- [0030]** Para determinar si PBS-57 es capaz de estimular a las células NKT en cultivo, se midió la expansión de las células NKT en cultivos de linfocitos de sangre periférica (PBL). Los PBL se obtuvieron de dos donantes sanos y se cultivaron en medios de cultivo celular RPMI con suero AB al 5%. Las células se dispusieron en placas de 12 pocillos a 2×10^6 PBL/pocillo/2 ml. Los pocillos se trataron con controles negativos (Tween20 al 0,05% y DMSO al 1% en PBS o Tween20 al 0,05% y DMSO al 10% en PBS) o los adyuvantes de ensayo (α GalCer, PBS-20, PBS-25 o PBS-57) a una concentración final de 10 ng/ml, 100 ng/ml o 1 μ g/ml. A continuación se muestran las estructuras químicas de los compuestos control α GalCer, PBS-20 y PBS-25.

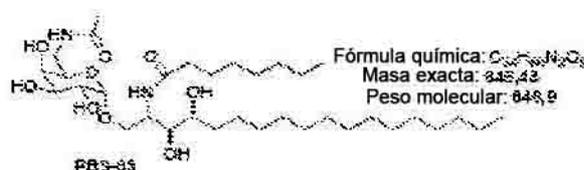


35

- [0031]** Todos los cultivos se suplementaron con IL2 humana recombinante (rhIL-2) hasta obtener una concentración final de 100 UI/ml por día. Todas las células se cultivaron durante 10 días a 37°C con CO₂ al 5%. El

día 7, se retiró la mitad del medio de cultivo (1 ml) para el análisis de las células NKT. El porcentaje de células NKT en la población CD3+ se detectó mediante citometría de flujo usando tetrámeros de CD1 marcados con fluorescencia o anticuerpos marcados con fluorescencia (anti-CD3, anti-Vβ11 y anti NKT). La población NKT se identificó mediante citometría de flujo como la población Vβ11+, Tetrámero+ y TCRαβ+. El porcentaje de células NKT se calculó en cada muestra restando la población Vβ11+ PBS-57-tetrámero+ TCRαβ+ de la población Vβ11+ tetrámero vacío+ TCRαβ+. En la figura 1 se muestra el aumento de células NKT tras el tratamiento con PBS-57, αGalCer, PBS-25 y PBS-20. Como se muestra, el tratamiento de los PBL con PBS-57 o αGalCer induce una expansión de las células NKT.

- 10 **[0032]** En un experimento independiente, se determinó la capacidad de PBS-57 en comparación con otros glucolípidos candidatos para inducir *in vitro* la expansión de las células NKT. Los linfocitos de sangre periférica se obtuvieron a partir de dos donantes sanos y se cultivaron en RPMI con suero AB al 5%. Las células se dispusieron en una placa de 12 pocillos con 2×10^6 células por pocillo y en 2 ml de medio. En un pocillo se añadió el vehículo (Tween20 al 0,05% y DMSO al 1% en PBS) como control negativo y en los pocillos de ensayo se añadieron
- 15 αGalCer, PBS-25, PBS-57 o PBS-83 a concentraciones finales de 1 ng/ml, 10 ng/ml y 100 ng/ml. A continuación se muestra la estructura de PBS-83:



- 20 **[0033]** Todos los cultivos se suplementaron con rhlL-2 hasta obtener una concentración final de 100 UI/ml el día 1, y se cultivaron durante 7 días a 37 °C en condiciones de CO₂ al 5%. A día 7, se detectó el porcentaje de células NKT mediante citometría de flujo. En la figura 2 se muestra el porcentaje de células NKT a día 7 para las diferentes condiciones de tratamiento con glucolípidos. El tratamiento con PBS-57 tiene como resultado un aumento de al menos dos veces en las células NKT con respecto a las células tratadas con αGalCer.

25

Ejemplo 2: Expansión de células NKT en cultivos tratados con PBS-57

- [0034]** La tinción de células NKT se realizó sobre un panel de catorce muestras de linfocitos de sangre periférica (PBL) o monocitos de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos. Se aislaron PBL de 12 sujetos y PBMC de 2 sujetos. Cada muestra de células aislada se dividió en dos muestras. La primera muestra de cada donante se tiñó con 10 μl de anti-Vβ11 FITC (Beckman Coulter), 10 μl de anti-TCRαβ-PC5 (Beckman Coulter) y 2 μl PBS-57-CD1d-tetrámero marcado con PE. La segunda muestra de cada donante se tiñó con 10 μl de Vβ11, 10 μl de anti-TCRαβ-FITC y 2 μl de CD1d-tetrámero vacío marcado con FE.

- 35 **[0035]** Para determinar el porcentaje de aumento de las células NKT, el número de células NKT el día 7 se dividió entre el número de células NKT el día 0. Como se muestra en la figura 3, la incubación con PBS-57 dio lugar a un aumento sustancial de células NKT en cultivos de PBL de voluntarios humanos.

Ejemplo 3: Análisis de TCRαβ, poblaciones de células NKT y maduración de células dendríticas en ratones a los que se administró PBS-57

- [0036]** Para comprobar la actividad adyuvante de PBS-57 *in vivo*, los ratones fueron inyectados con los compuestos de ensayo y se evaluó la activación y expansión celular a las 24 horas. Se administró solución salina tamponada con fosfato (PBS) por vía intravenosa a cuatro grupos de cinco ratones C57B1/6J con vehículo (solo DMSO), 0,97 μg de αGalCer, 1,3 μg de PBS-57 o 0,97 μg de PBS-83 en un total de 100 μl de PBS. Veinticuatro horas después de la administración del compuesto de ensayo, los ratones fueron sacrificados, se obtuvieron muestras de sangre y se aislaron esplenocitos por procedimientos convencionales. El porcentaje de células NKT en el bazo se evaluó mediante citometría de flujo con tinción usando anti-TCRαβ-FITC y tetrámero de CD1d marcado con FE cargado con PBS-57 (PBS-57-tetrámero) o sin lípido (tetrámero vacío). En la figura 4A se muestra el aumento en el porcentaje de células TCRαβ en ratones tratados con αGalCer o con PBS-57 en comparación con los ratones control tratados con PBS y vehículo solo. El porcentaje de células NKT se determinó restando el porcentaje de células PBS-57-tetrámero+ del porcentaje de células tetrámero vacío+ en la población TCRαβ. En la figura 4B se muestra la disminución del porcentaje de células NKT en el bazo de ratones tratados con PBS-57 o αGalCer en

relación con el control. Tomados en conjunto, el resultado mostrado en la figura 4A y en la figura 4B demuestra que PBS-57 aumentaba el número de células TCR $\alpha\beta$ en el bazo de ratones de forma tan eficaz como α GalCer. La pérdida de células NKT en los ratones inyectados con α GalCer o PBS-57 en relación con el control mostraba una disminución de la expresión de TCR en la superficie de las células NKT.

5

[0037] Las células dendríticas (CD) se detectaron en los esplenocitos mediante citometría de flujo tiñendo con anti-CD11c R-PE (BD Pharmingen) y anti-CD8 α FITC (Beckman Coulter). Se analizaron adicionalmente dos subgrupos de células dendríticas, las poblaciones CD11c+CD8 α - y CD11c+CD8 α +. Se observó una disminución del 50% en ambos subgrupos de CD en los ratones tratados con adyuvantes PBS-57 o α GalCer en comparación con el control. Para determinar si la administración de glucolípidos inducía la maduración de los dos subgrupos de células dendríticas, las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD40 Biotina/Stepta APC (BD Bioscience), anti-CD80 Biotina (BD Pharmingen) /Stepta APC (BD Bioscience) y anti-CD86 Biotina (BD Pharmingen)/Stepta APC (BD Bioscience) y se analizaron mediante citometría de flujo. En las figuras 5A y 5B se muestra el porcentaje de células CD40 positivas en ambos grupos de células CD11c+CD8 α - y CD11c+CD8 α +, respectivamente. En las figuras 5C y 5D se muestra el porcentaje de células CD80 positivas en ambos grupos de células CD11c+CD8 α - y CD11c+CD8 α +, respectivamente. En las figuras 5E y 5F se muestra el porcentaje de células CD86 positivas en ambos grupos de células CD11c+CD8 α - y CD11c+CD8 α +, respectivamente. Las líneas horizontales representan las medias. Tomados colectivamente, los datos muestran que PBS-57 y α GalCer aumentaban ambos sustancialmente el porcentaje de células que expresan CD40+, CD80+ y CD86+ en ambas poblaciones CD11c+CD8 α - y CD11c+CD8 α +

20

Ejemplo 4: Protocolo para comprobar la capacidad adyuvante de PBS-57 en un modelo de ratón

[0038] Se usó un modelo de ratón para comprobar *in vivo* la respuesta de células T citotóxicas (CD8+) específica evocada por PBS-57 en combinación con el antígeno. Ratones hembra C57/B1/6J CD45.2 se inmunizaron el día 0 con el antígeno (ovoalbúmina, Ova, grado VII, Sigma, St. Louis, MO) con o sin adyuvante, adyuvante solo o vehículo solo (control) en un total de 100 μ l de PBS. Los compuestos de ensayo fueron 1 μ g de PBS-57, 1 μ g de α GalCer, 1 μ g de PBS-83 con o sin 50 μ g de Ova. Las células diana singénicas se prepararon aislando esplenocitos a partir de un segundo grupo de ratones hembra C57/B1/6J CD45.2 y estas células se marcaron con una concentración baja (0,6 μ M durante 10 min a 37°C) o una concentración alta (6 μ M durante 10 minutos a 37°C) de CFSE (colorante fluorescente). La población marcada con concentración alta de CFSE se precargó con 5 μ M de péptido SIINFEKL (péptido específico de Ova, NeoMPS, Inc., San Diego, CA) durante 60 minutos a 37°C. La población marcada con concentración baja de CFSE se precargó con 5 μ l de péptido LCMV gp33-41 (péptido no específico de Ova, NeoMPS, Inc., San Diego, CA) durante 60 minutos a 37°C. Se mezclaron cantidades equivalentes de ambas poblaciones de células diana (1×10^7 células de concentración baja o alta de CFSE, 2×10^7 total por 100 μ l) y se inyectaron por vía intravenosa en cada uno de los ratones inmunizados el día 10. Los ratones se sacrificaron el día 11, y se recogieron los esplenocitos y se extrajeron muestras de sangre del seno orbital. Los porcentajes medios de supervivencia de las células diana pulsadas con el péptido (marcadas con CFSE) se calcularon en relación con la población control mediante análisis de citometría de flujo. En la figura 6B se presentan datos típicos de citometría de flujo en los que se muestra la pérdida de células diana cargadas con el péptido específico de Ova. La actividad citotóxica se expresa como porcentaje de lisis específica, calculado restando a100 el porcentaje medio de supervivencia de las células diana específica de Ova. En la figura 7 se muestra el porcentaje de lisis específica de las células diana en el bazo de los ratones inmunizados. Solo la combinación de Ova y PBS-57 producía lisis citotóxica de las células diana específicas de Ova en el bazo.

45 Ejemplo 5: Respuesta citotóxica tras la inmunización con Ova con diversas concentraciones de α GalCer

[0039] La citotoxicidad *in vivo* inducida por la respuesta de células T CD8+ frente a las células diana cargada con péptido Ova se evaluó como se describe en el ejemplo 4 para diversas concentraciones de α GalCer. Se inmunizó por vía intravenosa a 11 grupos de tres ratones con 100 μ l totales de PBS solo, 50 μ g de Ova sola, 1 μ g de α GalCer solo, 50 μ g de Ova con 1 μ g, 100 ng, 10 ng, 1000 pg, 100 pg, 10 pg o 0,1 pg de α GalCer. El día 10, los ratones se inyectaron por vía intravenosa con células diana marcadas con CFSE. El día 11, se extrajeron muestras de sangre del seno orbital de cada ratón. El porcentaje medio de supervivencia y la actividad citotóxica se determinaron como se describe anteriormente. En la figura 8 se muestra el porcentaje de lisis específica para cada grupo de ratones para las dosis especificadas de α GalCer. Los resultados muestran que α GalCer con antígeno es capaz de generar un efecto citotóxico específico dependiente de dosis cuando se inyecta por vía intravenosa.

55

Ejemplo 6: Respuesta citotóxica tras la inmunización con Ova con diversas concentraciones de PBS-57 por vía intravenosa

[0040] La citotoxicidad *in vivo* inducida por la respuesta de células T CD8+ estimuladas con diferentes concentraciones de PBS-57 de las células diana marcadas con CFSE y cargadas con péptido Ova se evaluó como se describe en el ejemplo 4. Se inmunizó por vía intravenosa a 11 grupos de tres ratones con 100 µl totales de PBS solo, 50 µg de Ova sola, 50 µg de Ova con 10 µg de PBS-57, 1 µg de PBS-57, 100 ng de PBS-57, 10 ng de PBS-57, 5 1 ng de PBS-57, 100 pg de PBS-57, 10 pg de PBS-57, 1 pg de PBS-57 o 0,1 pg de PBS-57. El día 10, los ratones se inyectaron por vía intravenosa con células diana y, el día 11, se extrajeron muestras de sangre del seno orbital. El porcentaje medio de supervivencia y la actividad citotóxica se determinaron como se describe anteriormente. En la figura 9 se muestra el porcentaje de lisis específico en la sangre de cada grupo de ratones inmunizados con cada dosis de PBS-57. Los resultados muestran que PBS-57 en combinación con Ova era capaz de inducir un efecto 10 citotóxico específico dependiente de dosis cuando se inyectaba por vía intravenosa.

Ejemplo 7: Respuesta citotóxica tras la inmunización con PBS-57 con diversas concentraciones de Ova por vía intravenosa

15 **[0041]** La respuesta citotóxica de células CD8+ frente a diferentes concentraciones de ovoalbúmina con concentraciones constantes de PBS-57 se evaluó como se describe en el ejemplo 4. Se inyectaron por vía intravenosa 10 grupos de tres ratones el día 0 con 100 µl totales en PBS de 50 µg de Ova sola, 1 µg de PBS-57 solo, 1 µg de PBS-57 con 50 µg de Ova, 10 µg de Ova, 1 µg de Ova, 100 ng de Ova, 10 ng de Ova, 1 ng de Ova, 20 100 pg de Ova o 10 pg de Ova. El día 10, los ratones se inyectaron por vía intravenosa con células diana y, el día 11, se sacrificaron, se extrajeron muestras de sangre del seno orbital y se aislaron los esplenocitos. El porcentaje medio de supervivencia y la actividad citotóxica se calcularon como se describió anteriormente. En la figura 10 se muestra el porcentaje de lisis específico de cada grupo de ratones inmunizados con cada dosis de Ova. Los resultados muestran que la respuesta citotóxica a la vacunación con el antígeno y PBS-57 depende de la concentración de antígeno.

25 **Ejemplo 8: Respuesta citotóxica tras la inmunización con αGalCer con diversas concentraciones de Ova por vía muscular**

[0042] La respuesta citotóxica de células CD8+ frente a diferentes concentraciones de ovoalbúmina con 30 concentraciones constantes de αGalCer inyectado por vía intramuscular se evaluó como se describe en el ejemplo 4. Se inyectaron por vía intramuscular 14 grupos de tres ratones en la pata trasera izquierda el día 0 con 100 µl totales en PBS de 400 µg de Ova sola, 1 µg de αGalCer solo o 400 µg de Ova con 1 µg de αGalCer, 0,5 µg de αGalCer, 0,1 µg de αGalCer, 50 ng de αGalCer, 10 ng de αGalCer, 5 ng de αGalCer, 1 ng de αGalCer, 500 pg de αGalCer, 100 pg de αGalCer, 50 pg de αGalCer o 10 pg de αGalCer. El día 10, los ratones se inyectaron por vía 35 intravenosa con células diana marcadas con CFSE, y el día 11 los ratones se sacrificaron y se extrajeron muestras de sangre del seno orbital. La lisis específica de las células diana cargadas con SIINFEKL se controló mediante citometría de flujo. El porcentaje medio de supervivencia y la actividad citotóxica se calcularon como se describe en el ejemplo 4. En la figura 11 se muestra el porcentaje de lisis específico en la sangre de cada grupo de ratones inmunizados con cada dosis de αGalCer. Los resultados muestran que αGalCer no es capaz de generar una 40 respuesta de células T citotóxicas específica cuando se inyecta con el antígeno Ova por vía intramuscular, según se observa por la muy baja lisis específica durante un amplio intervalo de concentraciones de αGalCer de 1 µg a 100 pg. Estas concentraciones de αGalCer evocan una respuesta citotóxica cuando se inyectan por vía intravenosa a 1 µg-10 ng, pero no inducen respuesta citotóxica tras su administración intramuscular.

45 **Ejemplo 9: Respuesta citotóxica tras la inmunización con PBS-57 con diversas concentraciones de Ova por vía intramuscular**

[0043] La respuesta citotóxica de células CD8+ frente a la inyección intramuscular de PBS-57 se analizó como se describe en el ejemplo 4. Se inyectaron por vía intramuscular 14 grupos de tres ratones en la pata trasera 50 izquierda el día 0 con 100 µl totales en PBS de PBS solo, 400 µg de Ova sola, 1 µg de PBS-57 solo o 400 µg de Ova con 1 µg de PBS-57, 0,5 µg de PBS-57, 0,1 µg de PBS-57, 50 ng de PBS-57, 10 ng de PBS-57, 5 ng de PBS-57, 1 ng de PBS-57, 500 pg de PBS-57, 100 pg de PBS-57, 50 pg de PBS-57 o 10 pg de PBS-57. El día 10, se inyectaron células diana marcadas con CFSE por vía intravenosa a los ratones y el día 11 se extrajeron muestras de sangre del seno orbital. El porcentaje medio de supervivencia y la actividad citotóxica se determinó como se describe en el 55 ejemplo 4. En la figura 12 se muestra la lisis específica de las curvas de dosis de ratones inmunizados por vía intramuscular con PBS-57 y Ova. Los resultados muestran que PBS-57 puede evocar una respuesta citotóxica específica cuando se inyecta tanto por vía intravenosa como por vía intramuscular, a diferencia de αGalCer que solo puede evocar una respuesta citotóxica cuando se inyecta por vía intravenosa.

Ejemplo 10: Comparación de la respuesta citotóxica tras la inmunización intramuscular o intravenosa con Ova y PBS-57 o α GalCer

[0044] La respuesta citotóxica a Ova con PBS-57 u Ova con α GalCer tras la administración intravenosa e intramuscular se evaluó como se describe en el ejemplo 4. Se inyectaron 8 grupos de ratones el día 0 del siguiente modo:

- 1) 3 ratones inyectados i.m. con 400 μ g de Ova en 50 μ l de PBS;
- 2) 3 ratones inyectados i.v. con 400 μ g de Ova en 50 μ l de PBS;
- 3) 6 ratones inyectados i.m. con 400 μ g de Ova y 1 μ g de α GalCer en 50 μ l de PBS;
- 4) 3 ratones inyectados i.v. con 400 μ g de Ova y 1 μ g de α GalCer en 50 μ l de PBS;
- 5) 6 ratones inyectados i.m. con 400 μ g de Ova y 1 μ g de α GalCer en 50 μ l de PBS;
- 6) 3 ratones inyectados i.v. con 400 μ g de Ova y 1 μ g de α GalCer en 50 μ l de PBS;
- 7) 6 ratones inyectados i.m. con 400 μ g de Ova y 1 μ g de PBS-57 en 50 μ l de PBS y
- 8) 3 ratones inyectados i.m. con 400 μ g de Ova y 1 μ g de PBS-57 en 50 μ l de PBS.

[0045] Los ratones se inyectaron con células diana marcadas con CFSE el día 10. Los ratones se sacrificaron el día 11 y se extrajeron muestras de sangre. El porcentaje medio de supervivencia y la actividad citotóxica se determinó como se describe en el ejemplo 4. En la figura 13 se compara el porcentaje de lisis específica usando diferentes vías de administración. Los resultados confirman que α GalCer no inducía respuesta citotóxica cuando se inyectaba por vía intramuscular, mientras que PBS-57 producía respuesta citotóxica independientemente de la vía de administración.

Ejemplo 11: PBS-57 estimula la respuesta de anticuerpos frente al toxoide tetánico *in vivo*

[0046] Para determinar si la adición de PBS-57 a la inmunización con toxoide tetánico daba lugar a un aumento de la respuesta inmunitaria, se inmunizó a un grupo de 6 ratones por vía intramuscular a día 0 y a día 15 con 10 μ g de toxoide tetánico (TT) o 10 μ g de toxoide tetánico en combinación con 1 μ g de PBS-57. Se determinaron los títulos de IgG mediante procedimientos convencionales a partir de muestras de sangre extraídas los días 0, 15 y 30. El título de anticuerpos se determinó mediante ELISA específico de toxoide tetánico. Como se muestra en la figura 14, PBS-57 potenciaba la respuesta de anticuerpos frente al TT.

Ejemplo 12: Comparación de la respuesta de células T CD8+ tras la inmunización intramuscular con Ova sola o en combinación con PBS-57

[0047] Se usó un modelo de ratón para comprobar *in vivo* la respuesta de células T (CD8+) específica evocada por PBS-57 en combinación con el antígeno. Ratones hembra C57/B1/6J CD45.2 se inmunizaron por vía intramuscular los días 0 y 14 con el antígeno (ovoalbúmina, Ova, grado VII, Sigma, St. Louis, MO) con o sin adyuvante, adyuvante solo o vehículo solo (control) en un total de 100 μ l de vehículo PBS. El adyuvante ensayado fue 1 μ g de PBS-57 con o sin 50 μ g de Ova. En cada grupo se incluyó al menos a tres ratones. Se extrajo sangre de cada ratón el día 21 y las células aisladas se sometieron a tinción del pentámero con pentámeros H2K^b-SIINFEKL tras bloquear el receptor Fc. El análisis por FACS se realizó incluyendo solo las células CD8+ en el análisis (se excluyeron del análisis las células CD19+ para excluir todas las células B). En la figura 15 se presentan datos típicos de citometría de flujo que muestran un aumento de las células T CD8+ específicas de Ova tras la inyección intramuscular con PBS-57 y Ova en comparación con Ova sola. Los resultados se presentan como la media +/- desviación estándar de células T CD8+ específicas de H2K^b-SIINFEKL en la sangre.

Ejemplo 13: Comparación de la respuesta de células T CD8+ tras la inmunización subcutánea con Ova sola o en combinación con PBS-57 o con α GalCer

[0048] Se usó un modelo de ratón para comprobar la respuesta de células T (CD8+) específica *in vivo* evocada por PBS-57 en combinación con el antígeno en comparación con la de α GalCer. Ratones hembra

C57/B1/6J CD45.2 se inmunizaron por vía subcutánea los días 0 y 14 con el antígeno (ovoalbúmina, Ova, grado VII, Sigma, St. Louis, MO) con o sin adyuvante, adyuvante solo o vehículo solo (control) en un total de 100 µl de vehículo PBS. El adyuvante ensayado fue 1 µg de PBS-57 o αGalCer con o sin 50 µg de Ova. En cada grupo se incluyó al menos a tres ratones. Se extrajo sangre de cada ratón el día 21 y las células aisladas se sometieron a tinción del
5 pentámero con pentámeros H2K^b-SIINFEKL tras bloquear el receptor Fc. El análisis por FACS se realizó incluyendo solo las células CD8⁺ en el análisis (se excluyeron del análisis las células CD19⁺ para excluir todas las células B). En la figura 16 se presentan datos típicos de citometría de flujo que muestran un aumento de las células T CD8⁺ específicas de Ova tras la inyección intramuscular con PBS-57 y Ova en comparación con Ova sola o en comparación con la inmunización con αGalCer y Ova. Los resultados se presentan como la media +/- desviación
10 estándar de células T CD8⁺ específicas de H2K^b-SIIVFEKL en la sangre.

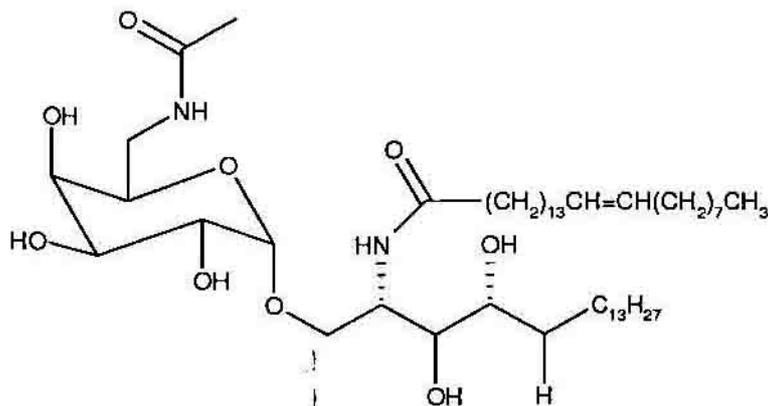
[0049] Según se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/una" y "el/la" incluyen los referentes plurales siempre que el contenido no dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene «un polinucleótido» incluye una mezcla de dos o
15 más polinucleótidos. También debería apreciarse que el término "o" generalmente se utiliza en el sentido que incluye "y/o" siempre que el contenido no dicte claramente lo contrario. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente referenciadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos a los que la invención se refiere.

[0050] También se entiende específicamente que cualquier valor numérico recogido en este documento incluye a todos los valores desde el valor inferior al valor superior, es decir, todas las posibles combinaciones de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerados se considerará expresamente establecido en esta solicitud.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna que comprende:

5 a) un compuesto PBS-57 de fórmula:



y

10

b) un antígeno

para su uso como medicamento en un procedimiento para potenciar la respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células al antígeno de un sujeto vacunado con dicha composición de vacuna, con respecto a un control de un sujeto vacunado con dicho antígeno solo, y en el que el antígeno está formando complejo con la subunidad B de la toxina Shiga o un equivalente funcional de la misma que es capaz de unirse al receptor de Gb3.

15

2. Una composición de vacuna para el uso según la reivindicación 1, en el que la respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células a la vacuna aumenta al menos el 100% en el sujeto en relación con un control de un sujeto vacunado solo con el antígeno.

20

3. Una composición de vacuna para el uso según la reivindicación 1, en el que la composición de vacuna se administra por vía intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramuscular, oral, transdérmica, intranasal, interperitoneal, transmucosa o rectal.

25

4. Una composición de vacuna para el uso según la reivindicación 1, en el que se estimula en el sujeto una respuesta inmunitaria humoral al antígeno.

5. Una composición de vacuna para el uso según la reivindicación 4 en el que la respuesta inmunitaria humoral comprende la producción de anticuerpos IgG, de anticuerpos IgA o de anticuerpos IgM.

30

6. Una composición de vacuna para el uso según la reivindicación 1, en el que se activan en el sujeto los linfocitos T CD4+.

7. Una composición de vacuna para el uso según la reivindicación 6, en el que la activación de los linfocitos T CD4+ comprende un aumento de una respuesta inmunitaria Th1.

35

8. Una composición de vacuna para el uso según la reivindicación 6, en el que la activación de los linfocitos T CD4+ comprende un aumento de una respuesta inmunitaria Th2.

40

9. Una composición de vacuna para el uso según la reivindicación 6, en el que la activación de los linfocitos T CD4+ comprende un aumento de una respuesta inmunitaria Th1 y Th2.

10. Una composición de vacuna para el uso según la reivindicación 1, en el que se activan en el sujeto los linfocitos T citotóxicos CD8+.

5 11. La composición de vacuna para el uso según la reivindicación 10, en el que la composición de vacuna se administra por vía intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramuscular, oral, transdérmica, intranasal, interperitoneal, transmucosa o rectal.

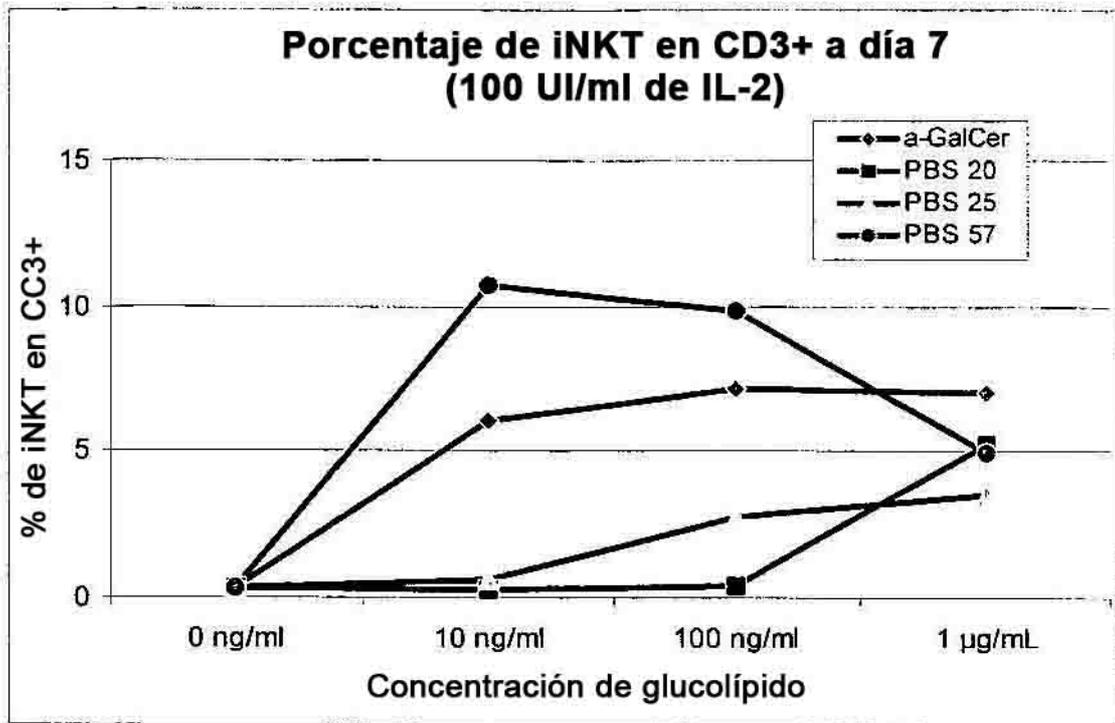


FIG. 1

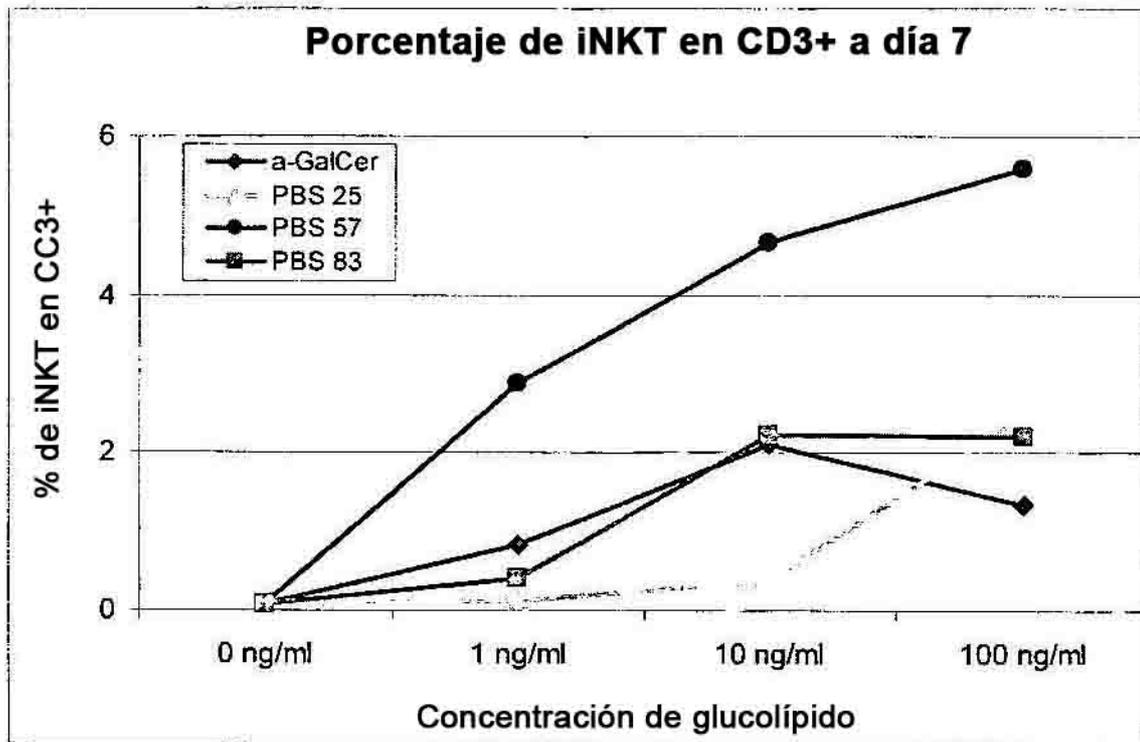


FIG. 2

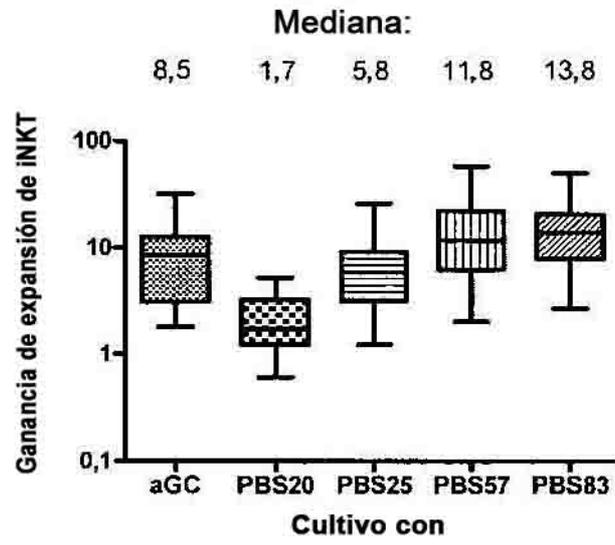


FIG. 3

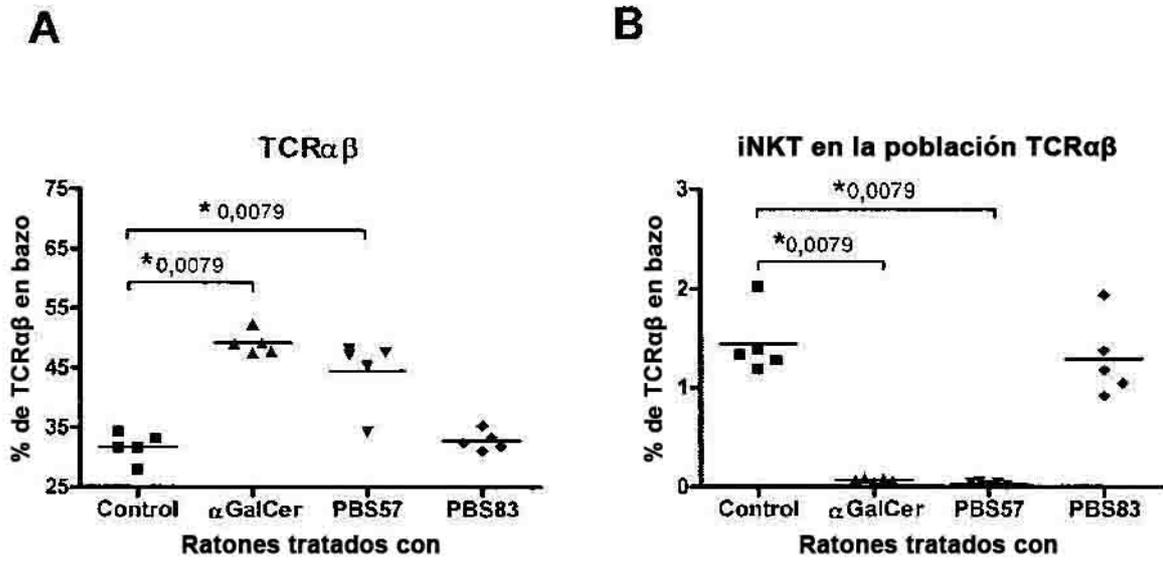


FIG. 4

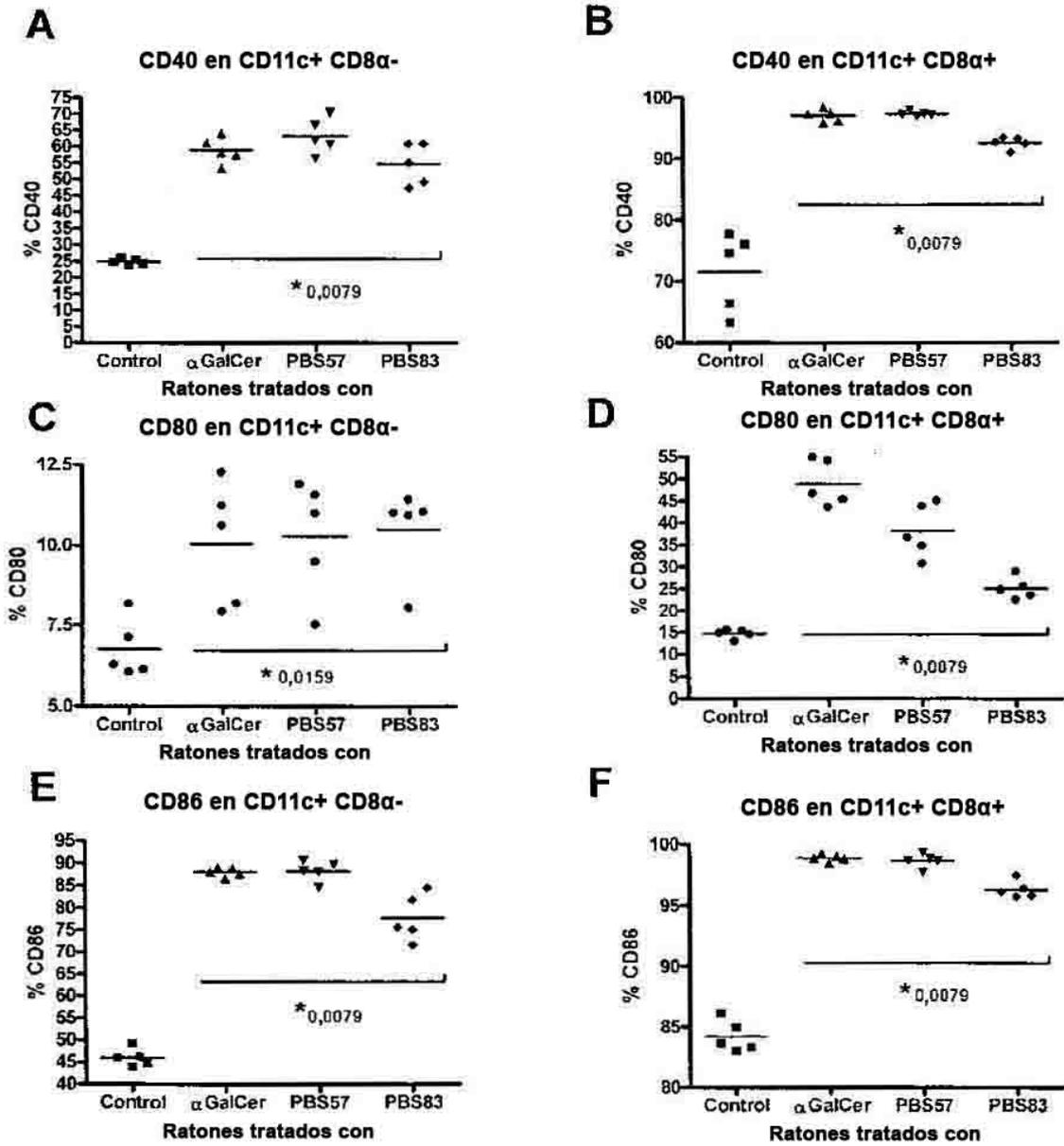


FIG. 5

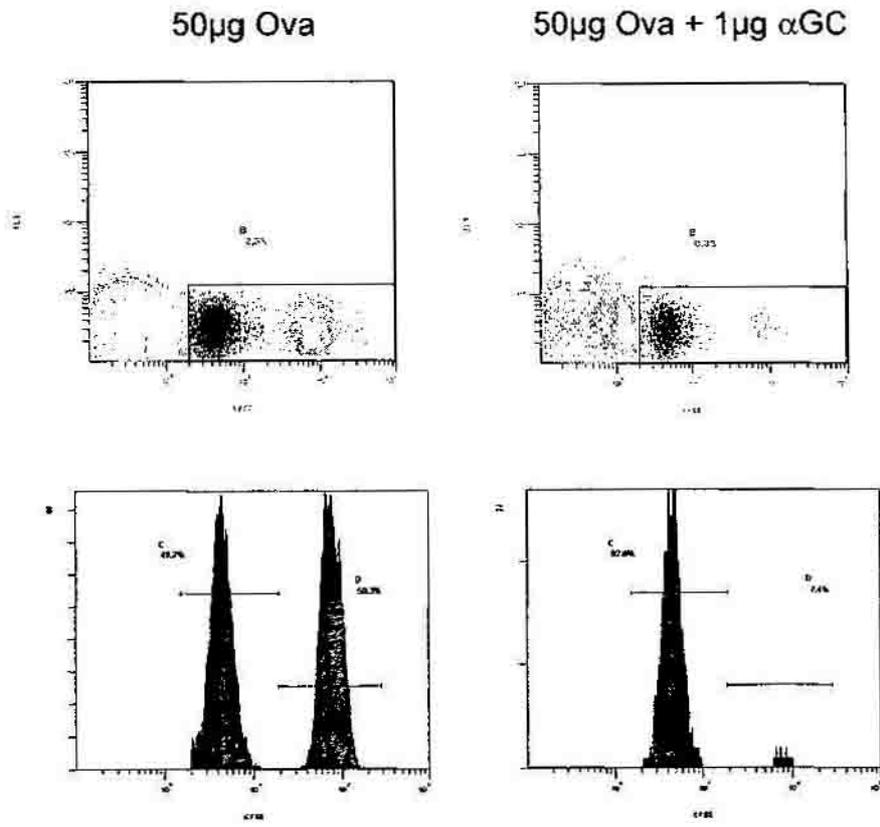


FIG. 6

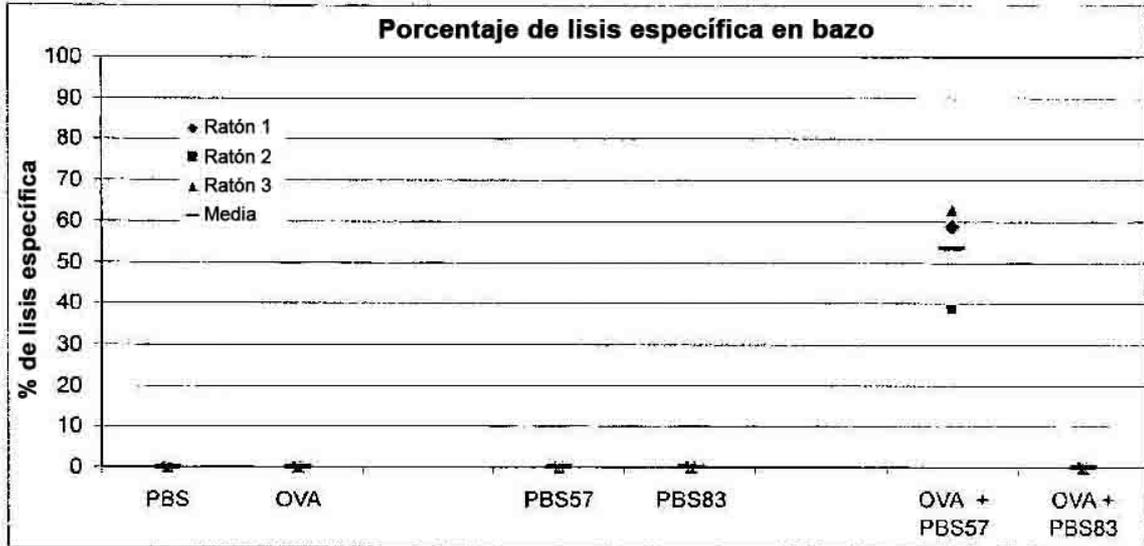


FIG. 7

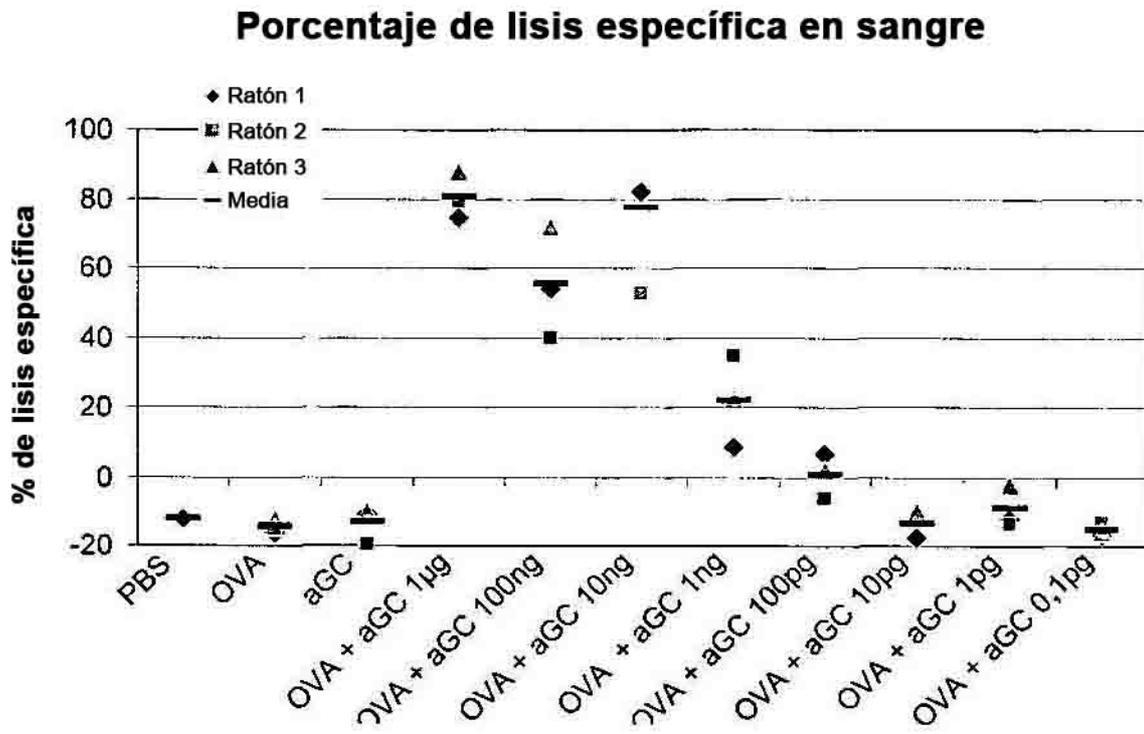


FIG. 8

Porcentaje de lisis específica en sangre

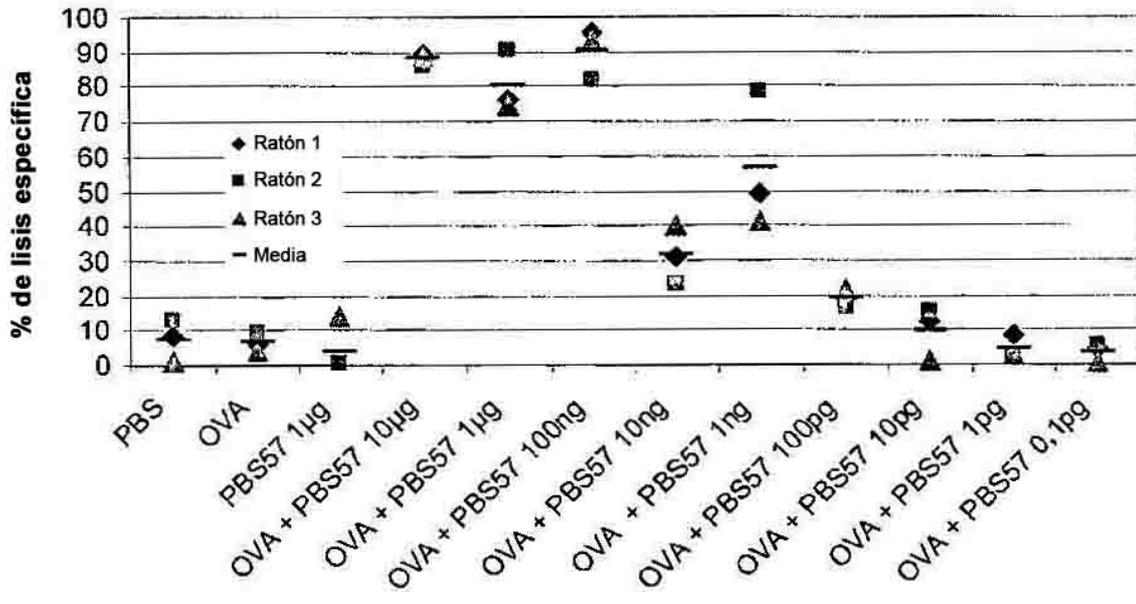


FIG. 9

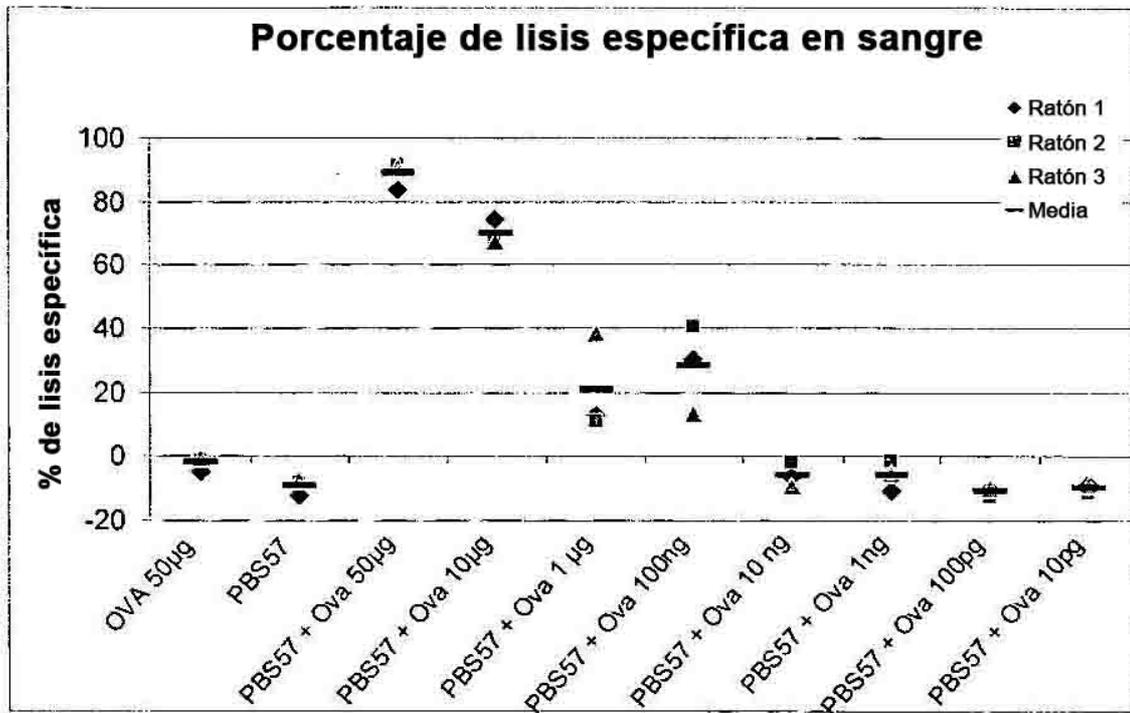


FIG. 10

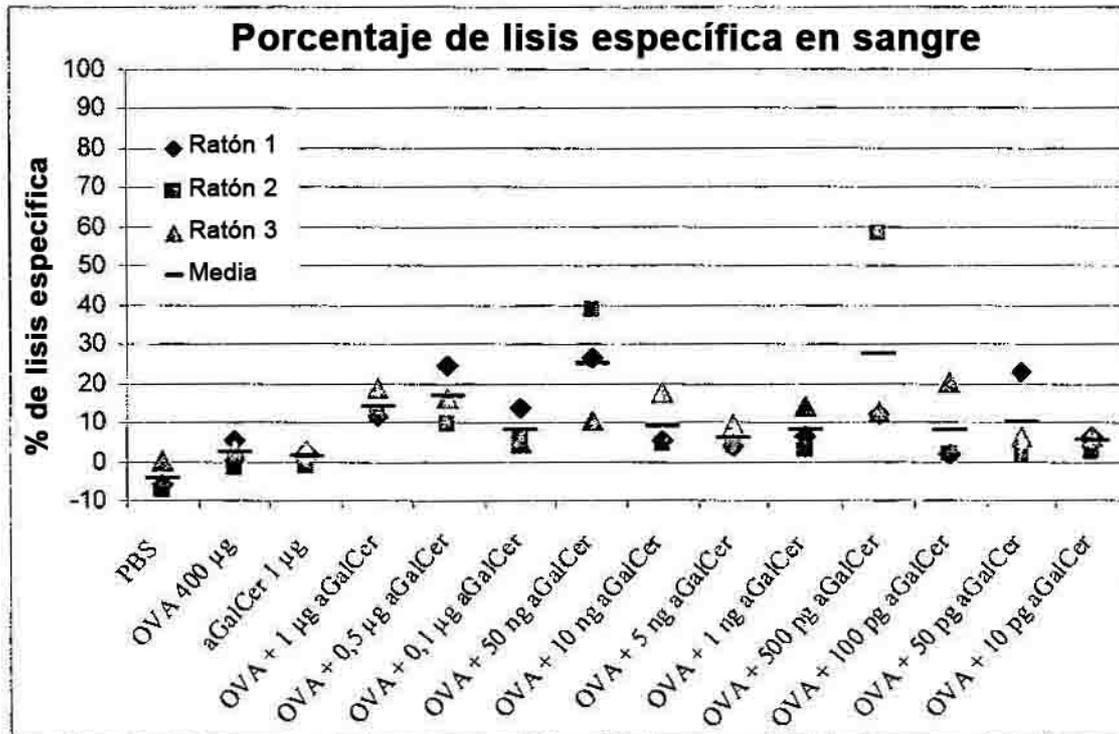


FIG. 11

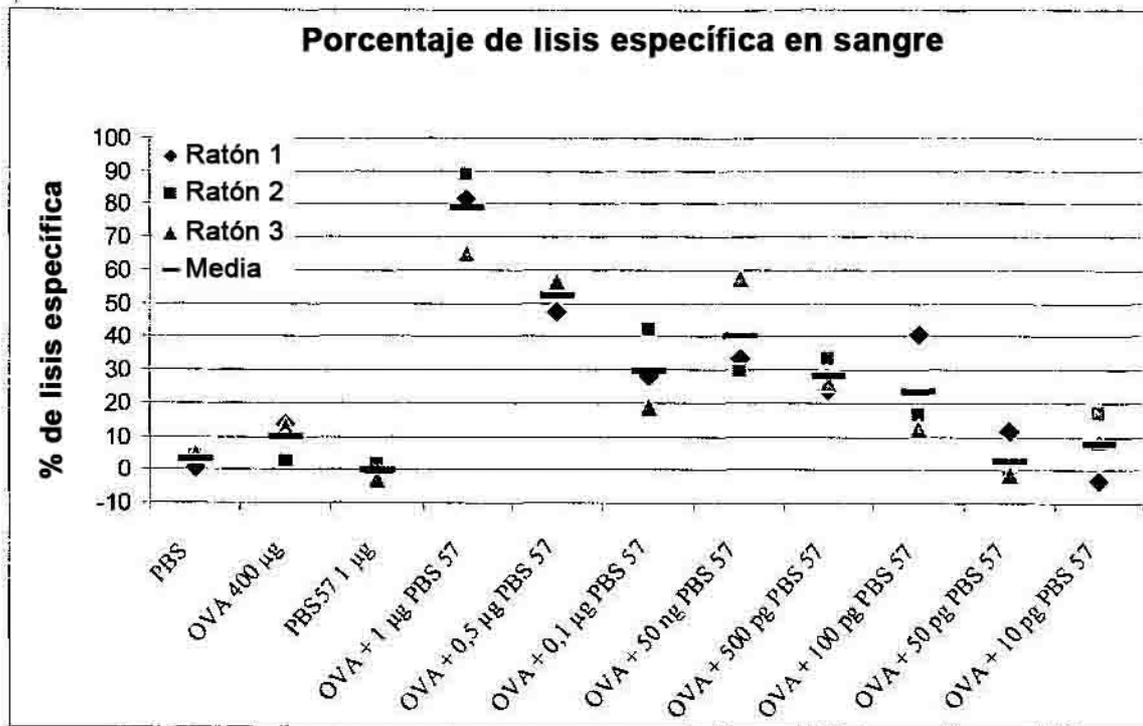


FIG. 12

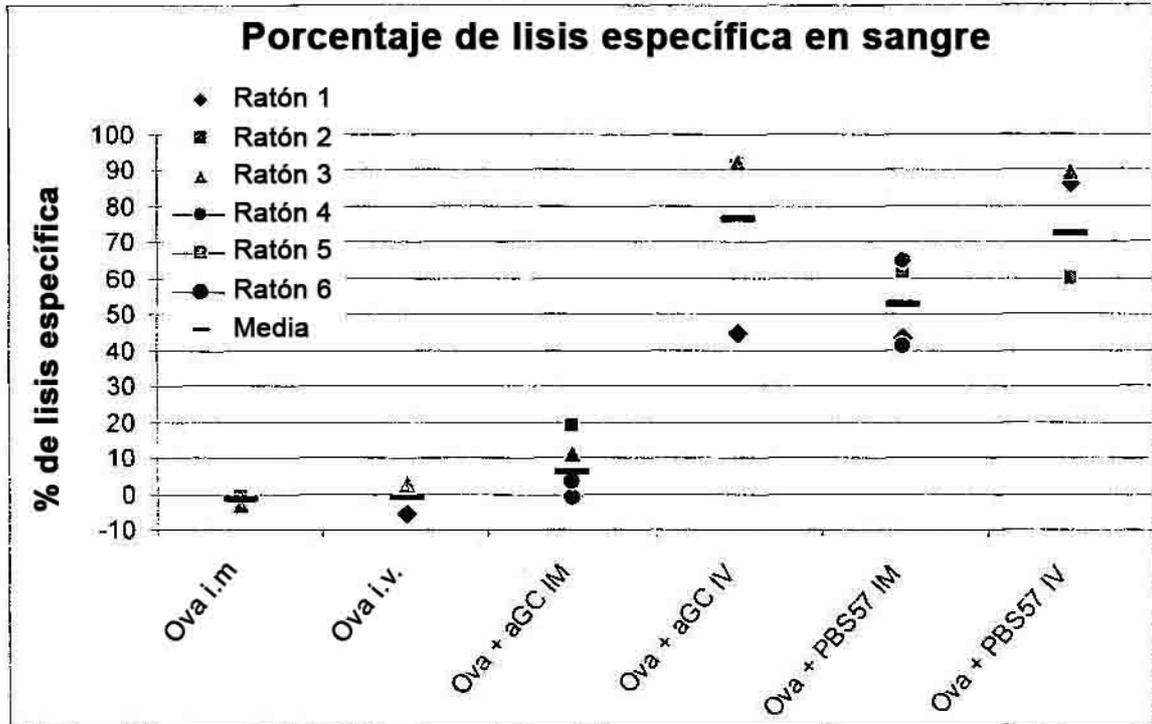


FIG. 13

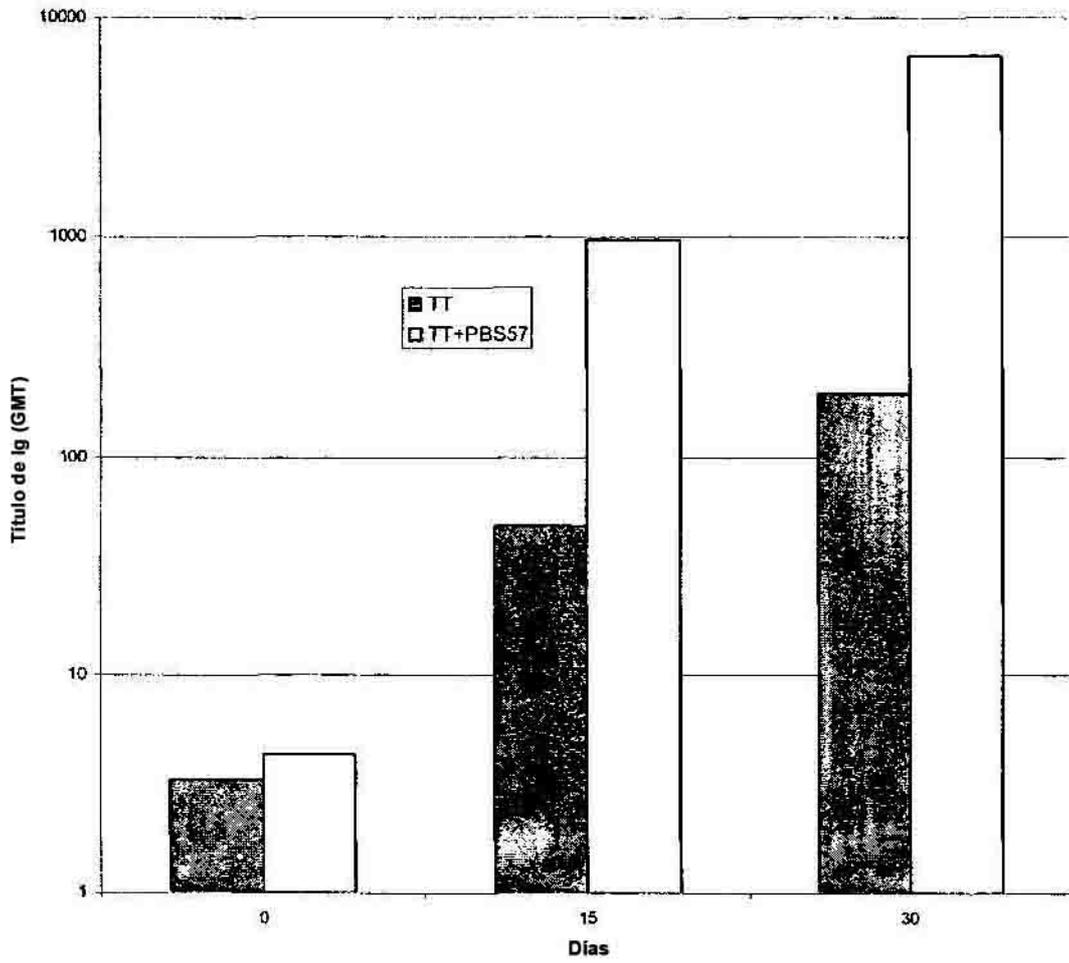


FIG. 14

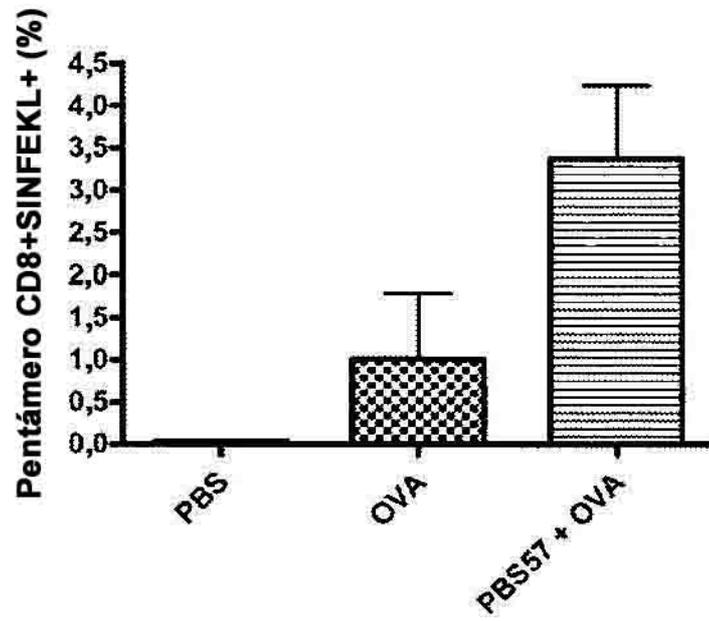


FIG. 15

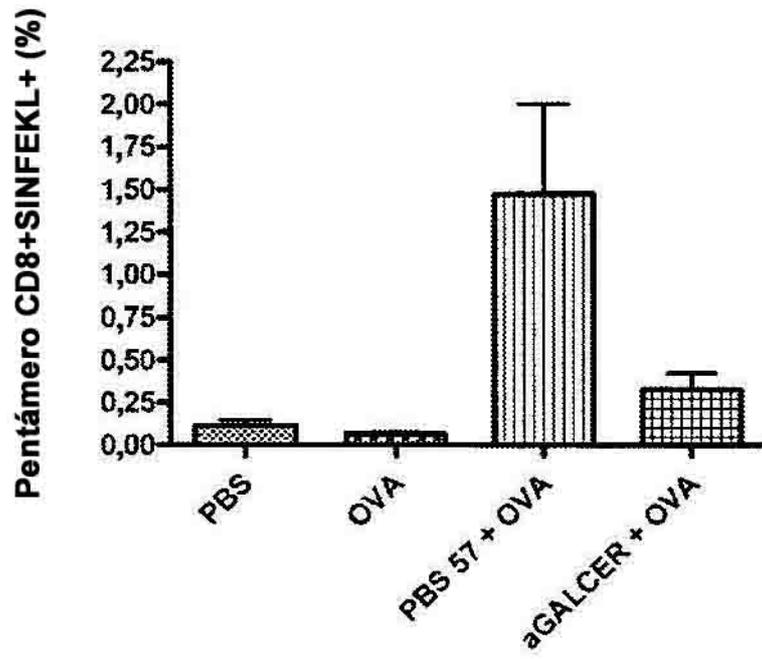


FIG. 16