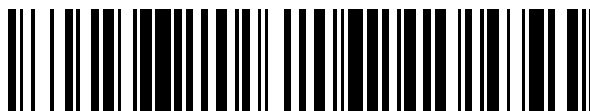


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 183**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 31/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2009 E 09815743 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2337847**

54 Título: **Adyuvantes de vacuna**

30 Prioridad:

29.09.2008 IN MU20802008

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

18.03.2016

73 Titular/es:

**CADILA PHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)
"Cadila Corporate Campus" Sarkhej-Dholka Road
Bhat, Ahmedabad 382 210 GUJ, IN**

72 Inventor/es:

**MODI, INDRAVADAN AMBALAL;
MODI, RAJIV INDRAVADAN y
KHAMAR, BAKULESH MAFATLAL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

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

ES 2 564 183 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 de vacuna

5 Campo de la invención

La invención se refiere a antagonistas del receptor farnesoide X (FXR) para su uso en vacunación, así como a composiciones de vacuna que comprenden dichos antagonistas de FXR y un antígeno.

10 Información antecedente:

La respuesta inmunitaria específica de antígeno está relacionada con el reconocimiento y eliminación definitiva del antígeno / inmunógeno de una manera muy discriminadora. Las respuestas inmunitarias específicas están mediadas a través de dos tipos de mecanismos efectores. Una respuesta está mediada por los anticuerpos producidos por linfocitos (respuesta humoral) y la otra está mediada por los propios linfocitos especialmente sensibilizados (inmunidad mediada por células). Las respuestas humorales son principalmente responsables de proporcionar profilaxis frente a la enfermedad (vacuna profiláctica). Las vacunas profilácticas se administran antes de una enfermedad. Las respuestas inmunitarias mediadas por células se caracterizan por la liberación de citoquinas desde células inmunizadas tras su exposición a un antígeno. La inmunidad mediada por células es deseable para la gestión de una enfermedad activa (vacuna terapéutica). Las vacunas terapéuticas se administran en presencia de una enfermedad activa. La vacuna incluye uno o más antígenos en un transportador farmacéuticamente aceptable.

Los antígenos incluyen inmunógenos, alérgenos. Los antígenos pueden ser patógenos o variedades de materiales derivados de patógenos como virus, bacterias, hongos, parásitos. Se pueden usar también como antígenos células tumorales, células de mamíferos y materiales derivados de los anteriores. Las células y los organismos como virus y bacterias se usan en forma intacta, por ejemplo, polio, BCG, rabia, etc. La composición química del antígeno es muy variable e incluye péptidos (de diversos tipos como los péptidos completos, polipéptidos, lipopéptidos, etc.), polisacáridos, polisacáridos conjugados, lípidos, glucolípidos, hidratos de carbono, proteínas, ácidos nucleicos o antígenos codificados en ácidos nucleicos. Los antígenos se clasifican de varias formas. Algunas de las cuales se muestran a continuación.

(I) *Inmunógeno* La sustancia que provoca la respuesta inmunitaria cuando se introduce en el cuerpo.

Un inmunógeno es siempre una macromolécula (proteína, polisacárido). Su capacidad para estimular la reacción inmunitaria depende de lo que tenga en común con el hospedador, tamaño molecular, composición química y heterogeneidad (por ejemplo, similar a los aminoácidos en una proteína).

Alérgeno un alérgeno es una sustancia que produce la reacción alérgica. Se puede ingerir, inhalar, inyectar o entrar en contacto con la piel.

(II) Los antígenos se pueden clasificar según su origen.

Antígenos exógenos- Los antígenos exógenos son antígenos que se han introducido en el cuerpo desde el exterior, por ejemplo, mediante inhalación, ingestión, o inyección.

Antígenos endógenos- Los antígenos endógenos son antígenos que se han generado en el interior de la célula, como resultado de un metabolismo celular normal, o debido a una infección vírica o bacteriana intracelular. Los fragmentos se presentan a continuación sobre la superficie celular en complejos con moléculas de histocompatibilidad de clase I.

(III) *Tipos de antígeno*

Antígenos tumorales- Los antígenos tumorales son aquellos antígenos que están presentes sobre la superficie de células tumorales. Estos antígenos se pueden presentar algunas veces solo mediante células tumorales y nunca mediante células normales. En este caso, se denominan antígenos específicos de tumor y son el resultado normalmente de una mutación específica del tumor. Son más frecuentes los antígenos presentados por células tumorales y células normales, y se denominan antígenos asociados a tumor. Los linfocitos T citotóxicos que reconocen estos antígenos pueden destruir las células tumorales antes de que proliferen o metastaticen. Los antígenos tumorales pueden estar también sobre la superficie del tumor en la forma de, por ejemplo, un receptor mutado, en cuyo caso serán reconocidos por los linfocitos B.

Antígenos asociados a patógenos- Los antígenos se derivan de patógenos de tipo virus, bacterias, hongos, parásitos, por ejemplo, rabia, hepatitis B, paperas, sarampión, tétanos, difteria, etc.

65

Producción de antígenos

5 Los antígenos se pueden producir mediante tecnologías recombinantes, métodos de extracción, síntesis química, fermentación, etc. Pueden estar en la forma de un compuesto o un organismo que es natural o está genéticamente modificado o una fracción de un organismo, que se produce naturalmente o que está modificado genéticamente. Se están desarrollando crecientemente ácidos nucleicos y se identifican como antígenos, como en vacunas de ADN. Los antígenos se pueden administrar en la forma de antígenos puros o encapsulados, formas recubiertas, conjugadas, mixtas, acopladas y/o formuladas con adyuvantes.

10 La mayoría de las vacunas, cuando se aplican solas, no producen un estímulo inmunitario adecuado. Los adyuvantes se añaden al antígeno en una composición de vacuna para potenciar la respuesta inmunitaria del cuerpo a antígenos específicos de la vacuna. Los adyuvantes no son necesariamente inmunógenos por sí mismos. Los adyuvantes pueden actuar reteniendo el antígeno localmente próximo al sitio de administración para producir un efecto depósito que facilite una liberación continua lenta del antígeno a las células del sistema inmunitario. Los adyuvantes también pueden atraer células del sistema inmunitario hasta un depósito de antígeno y estimular dichas células para desencadenar respuestas inmunitarias. El adyuvante puede actuar también activando las células presentadoras de antígenos.

20 Los adyuvantes se usan para,

- Aumentar la respuesta del anticuerpo en magnitud o función (por ejemplo, avidéz)
- Respuesta inmunitaria mediada por células
- Reducción en la dosis de antígenos
- Tiempo de respuesta desencadenada (respuesta más rápida, respuesta sostenida, etc.)
- 25 • Inducción de inmunidad mucosal
- Aumento de la seroconversión y/o de la velocidad de seroprotección.

30 Uno de los adyuvantes homologados para uso humano es el alumbre. La actividad adyuvante del alumbre se descubrió en primer lugar en 1926 por Glenny (Chemistry and Industry, 15 de junio de 1926; J. Path. Bacteriol, 34, 267). Las sales de aluminio (alumbre) han sido útiles para algunas vacunas de tipo hepatitis B, difteria, tétanos, toxoides, etc., pero no útiles para otras enfermedades del tipo de la rabia o triple vírica, fiebres tifoideas, etc. No consiguen inducir la inmunidad mediada por células. El hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio se denominan comúnmente en su conjunto como alumbre. Los informes indican que el alumbre no ha conseguido aumentar la eficacia de las vacunas de la tosferina y de las fiebres tifoideas y han proporcionado solo un ligero efecto con las vacunas de adenovirus.

Se conoce también una amplia gama de otros materiales que tienen actividad adyuvante que provoca potentes respuestas inmunitarias a antígenos. Estos incluyen, pero no se limitan a,

- 40 1. saponinas del tipo QS21, ISCOMS
2. Saponinas complejadas con antígenos de proteínas de membrana (complejos inmunoestimuladores),
3. Polímeros de Pluronic con aceite mineral,
4. Micobacterias muertas en aceite mineral, una emulsión de agua en aceite mineral que contiene micobacterias muertas / desecadas en la fase oleosa, una formulación más débil sin las micobacterias,
- 45 5. adyuvante completo de Freund,
6. adyuvante incompleto de Freund,
7. productos bacterianos, tales como dipéptido muramilo (MDP) y lipopolisacárido (LPS), MPL así como lípido A,
8. Liposomas, un glucósido activo de membrana extraído del árbol Quillia saponaria, tensioactivos de copolímeros en bloque no iónicos,
- 50 9. Moléculas sintéticas no metabolizadas que tienden a unirse a las proteínas de las superficies celulares; ISCOMS,
10. Partículas infecciosas
11. Emulsiones MF59 de aceite en agua
12. Agonistas de TLR Cpg (oligonucleótidos)
- 55 13. Otros agonistas de TLR de tipo imiquimod
14. Inmunopéptidos

60 El adyuvante completo de Freund (CFA) es un poderoso agente inmunoestimulador que se ha utilizado satisfactoriamente con muchos antígenos sobre una base experimental. El CFA incluye tres componentes: un aceite mineral, un agente emulsionante, y Mycobacterium tuberculosis muertos. Las soluciones acuosas de antígenos se mezclan con estos componentes para crear una emulsión de agua en aceite. Aunque eficaz como adyuvante, el CFA produce efectos secundarios graves, por ejemplo, dolor, formación de abscesos, fiebre, etc. El CFA, por tanto, no se usa en la preparación de vacunas comerciales.

65 El adyuvante incompleto de Freund (IFA) es similar a CFA, pero no incluye el componente bacteriano. Es una emulsión de aceite en agua. Sin embargo, la evidencia indica que el aceite y emulsionante utilizados en IFA puede

producir tumores en ratones. Se ha descubierto que el dipéptido de muramilo (MDP) es la unidad mínima del complejo de la pared celular micobacteriana que genera la actividad adyuvante observada con CFA, por ejemplo, Ellouz et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1974) 59:1317.

5 Se han generado algunos análogos sintéticos de MDP que presentan una amplia gama de potencia adyuvante y efectos secundarios (Chedid et al., Prog. Allergy (1978) 25:63). Los análogos representativos de MDP incluyen derivados de treonilo de MDP (Byars et al., Vaccine (1987) 5:223), derivados de n-butilo de MDP (Chedid et al., Infect. Immun. 35:417), y un derivado lipófilo de un tripéptido de muramilo (Gisler et al., en Immunomodulations of Microbial Products and Related Synthetic Compounds (1981) Y. Yamamura y S. Kotani, eds., Excerpta Medica, 10
 15
 1727), aunque con mala estabilidad física.

Se han evaluado polímeros sintéticos como adyuvantes. Incluyen los homopolímeros y copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico, que se han utilizado para producir microesferas que encapsulan antígenos (véase Eldridge et al., Mol. Immunol. 28:287-294 (1993)).

20 Los copolímeros en bloque no iónicos son otros adyuvantes sintéticos que se están evaluando. Se han investigado los efectos adyuvantes de copolímeros de bajo peso molecular en emulsiones de aceite y de copolímeros de alto peso molecular en formulaciones acuosas (Todd et al., Vaccine 15:564-570 (1997)).

25 Se conocen adyuvantes que utilizan células completas, como células de insecto (*S. frugiperda*), patente de EE.UU. 6.224.882. Los insectos o las células de insectos infectados con algunos de los virus de insectos / agentes infecciosos o cualquier tipo de infección, igualmente, tampoco es posible identificar qué insecto/célula de insecto está infectado y, por lo tanto, el uso de los mismos puede dar como resultado una baja producción y un posible riesgo de transmisión de la enfermedad a un ser humano (informe de la OMS, enero de 2005).

30 En un artículo publicado en Vaccine (1999) 17; 2446-2452, se utilizó el bacilo de Calmette-Guérin (BCG) como adyuvante para la vacunación de la rabia en ratones. Los resultados experimentales no muestran mejoras en los títulos de anticuerpos neutralizantes en suero en el grupo de ratones inmunizados con BCG como adyuvante en comparación con la vacuna simple.

35 La patente de Estados Unidos 6.355.414 describe el polisacárido acmanano como adyuvante. La patente de Estados Unidos 6.306.404 describe composiciones de adyuvante y vacuna de monofosforil lípido A, azúcar y opcionalmente un tensioactivo basado en amina. La patente de Estados Unidos 6.231.859 describe una combinación de saponinas como adyuvante. Los adyuvantes de saponina tienen toxicidades sistémicas altas, de tipo hemolítico. La patente de Estados Unidos 6.060.068 describe la interleuquina-2 como adyuvante de vacunas. La patente de Estados Unidos 6.355.256 describe QS-21 e IL12 como adyuvantes.

40 La solicitud PCT WO/2006/114680 describe *Mycobacterium w* como adyuvante con un transportador farmacéuticamente aceptable y sus usos. Las patentes de los Estados Unidos 6.103.697, 6.228.373 y 6.228.374 describen péptidos como adyuvantes. Los documentos JP 11106351, JP 9268130 y AU 780054 describen adyuvantes oleosos. La patente de Estados Unidos 6.383.498 describe composiciones de vacuna donde la neuraminidasa y la galactosa oxidasa juntas son un adyuvante de vacuna. La patente de Estados Unidos 7.579.009 describe una composición inmunomoduladora y/o una composición farmacéutica que comprende células completas de una bacteria. La patente de Estados Unidos 6.375.945 describe una composición adyuvante que comprende una mezcla de adyuvantes de saponina y el uso de estas composiciones en aplicaciones profilácticas y terapéuticas, particularmente en vacunas que incluyen vacunas contra el cáncer. La patente de Estados Unidos 6.306.404 describe composiciones de adyuvante y vacuna de monofosforil lípido A. La patente de Estados Unidos 7.488.490 describe un dinucleótido CpG sin metilar (CpG ODN) y un adyuvante de un ácido no nucleico. Pero todos estos adyuvantes no se han demostrado en una amplia variedad de antígenos y mamíferos.

50 Los adyuvantes anteriormente mencionados se encuentran en diversas etapas de desarrollo. Sigue existiendo necesidad de tener novedosos adyuvantes que proporcionen vacunas novedosas vacunas con una reducida concentración de antígeno, una frecuencia reducida, un potencial inmunógeno aumentado. Los adyuvantes actualmente disponibles son el resultado de una minuciosa investigación en ausencia de un método para identificar potenciales compuestos con propiedades adyuvantes. Es una necesidad deseada desde hace mucho tiempo en la industria proporcionar adyuvantes que estén exentos de los efectos secundarios anteriormente mencionados.

Referencias:

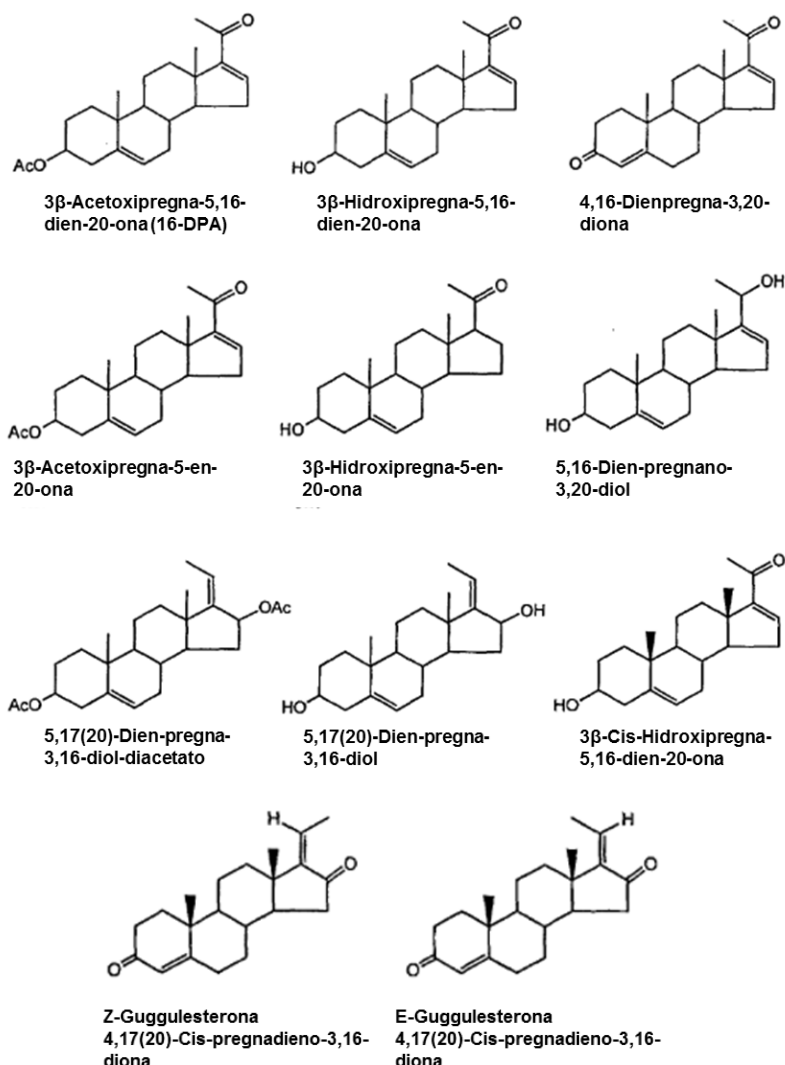
65 1. Essential Immunology, Octava Edición Ivan Roitt, Black well Scientific publication.

2. Vaccines, Tercera edición. S. Plotkein W. Orenstein, W.B. Saunder's company
3. Vaccines Prospects & perspectives Harminder sikh, rajesh Bhatia, forward publishing company, Delhi
4. Immunotherapy of cancer Mary L Disis, Humana press, Totowa, Nueva Jersey, EE.UU.
5. DNA vaccine Douglas B. Lowrie, Robert G. Whalen, Humana press, Totowa Nueva Jersey, EE.UU.
6. Handbook of cancer vaccines Micheal A. Morse, Timothy M. Clay, H.Kiva Lyerly. Humana press Totowa Nueva Jersey, EE.UU.
7. Cellular Microbiology Bian Henderson, Micheal Wilson, John Wiley & sons.

Sumario de la invención:

Las realizaciones de la invención son como se definen en las reivindicaciones.

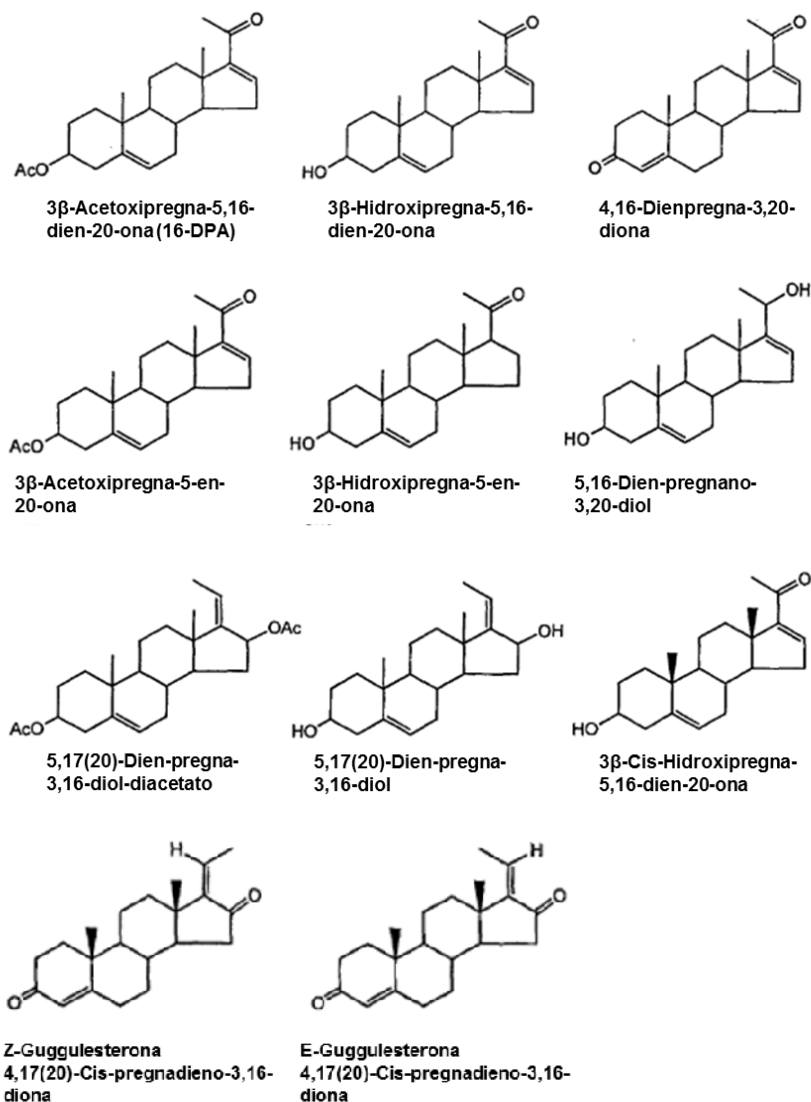
En particular, la presente invención se refiere a un antagonista del receptor farnesoide X (FXR) para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico mediante vacunación, en el que dicho antagonista de FXR actúa como adyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria específica de antígeno, y en el que dicho antagonista de FXR se selecciona entre:



- 20 Preferentemente, dicho antagonista de FXR se utiliza en combinación con un antígeno, más preferentemente el antígeno se selecciona entre un péptido, una proteína, un antígeno de hidrato de carbono, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno protozoario, un antígeno vírico, parásitos, alérgenos, polipéptidos, células, extractos celulares, polisacáridos, polisacáridos conjugados, lípidos, glucolípidos, virus, extractos víricos, partículas de tipo virus, material nuclear o antígenos codificados en ácidos nucleicos. Preferentemente, el antígeno es un
- 25 antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor. Preferentemente, la concentración del antagonista de FXR varía desde 10 nM a 1 mM, preferentemente de 1 μM a 100 μM, lo más preferente de 1 μM a 50 μM. Preferentemente, dicho antagonista de FXR induce una respuesta de anticuerpos y/o una respuesta de anticuerpos mediada por células. Preferentemente, dicho antagonista de FXR genera una respuesta inmunitaria más rápida,

mayor y/o sostenida. Preferentemente, dicho antagonista de FXR proporciona seroprotección. Preferentemente, dicho antagonista de FXR aumenta la seroconversión.

5 La presente invención se refiere también a una composición de vacuna que comprende (i) un antagonista del receptor farnesoide X (FXR) como adyuvante; y (ii) uno o más antígenos, en el que dicho antagonista de FXR se selecciona entre:



10 Preferentemente, el antígeno se selecciona entre un péptido, una proteína, un antígeno de hidrato de carbono, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno protozario, un antígeno vírico, parásitos, alérgenos, polipéptidos, células, extractos celulares, polisacáridos, polisacáridos conjugados, lípidos, glucolípidos, virus, extractos víricos, partículas de tipo virus, material nuclear o antígenos codificados en ácidos nucleicos. Preferentemente, la concentración del antagonista de FXR varía desde 10 nM a 1 mM, preferentemente de 1 μM a 15 100 μM, lo más preferente de 1 μM a 50 μM.

La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende la composición de vacuna descrita anteriormente y un transportador farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la concentración del antagonista de FXR varía desde 10 nM a 1 mM, preferentemente de 1 μM a 100 μM, lo más preferente de 1 μM a 50 20 μM.

Descripción de los dibujos:

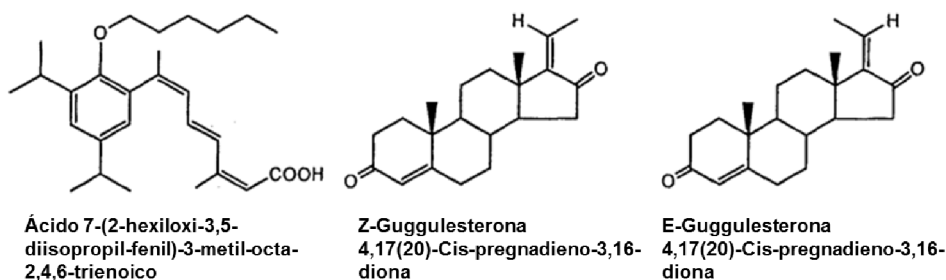
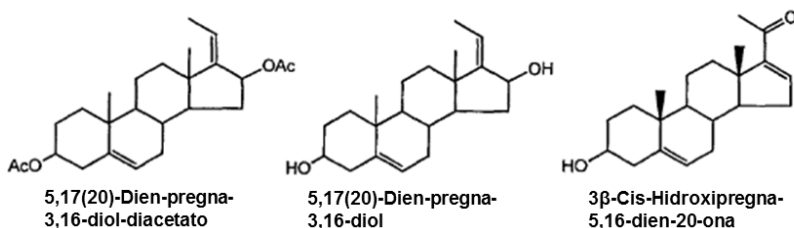
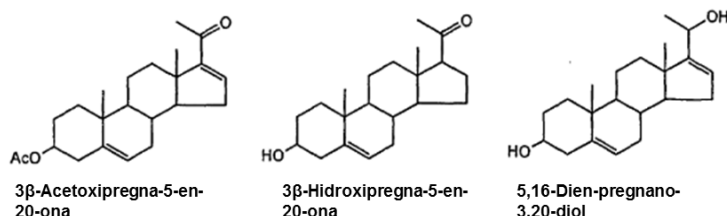
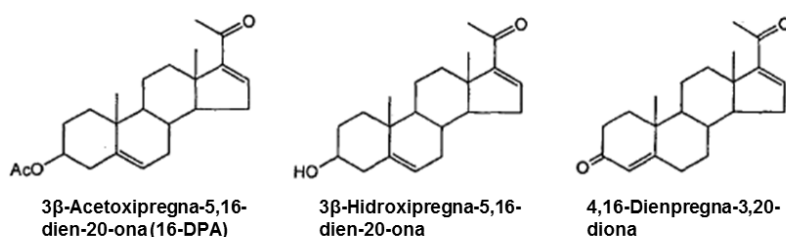
25 Fig.: 01 Títulos de anticuerpos neutralizantes tras la inmunización con vacuna de la hepatitis B según la presente invención. (El aumento inicial en el título de anticuerpos conduce a la seroprotección)

- Fig.: 02 Títulos de anticuerpos neutralizantes tras la inmunización con ADNr que codifica la vacuna de la rabia según la presente invención. (El título de anticuerpos inicial, mayor y continuo conduce a que se mantenga la seroprotección)
- Fig.: 03 Títulos de anticuerpos neutralizantes tras la inmunización con vacuna de la hepatitis B según la presente invención. (Título de anticuerpos mejor y continuo que proporciona seroprotección)
- Fig.: 04 Títulos de anticuerpos neutralizantes tras la inmunización con vacuna de la hepatitis B según la presente invención. (Respuesta de anticuerpos mayor y continua que conduce a seroprotección de larga duración)
- Fig.: 05 Títulos de anticuerpos neutralizantes tras la inmunización con la vacuna del virus de la rabia inactivado. Seroconversión con mayor respuesta de anticuerpos)
- Fig.: 06 Respuesta inmunitaria mediada por células tras inmunización con la vacuna del cáncer según la presente invención

Descripción detallada:

El receptor farnesoide X (FXR) se expresa a altos niveles en el hígado y el intestino delgado, en donde regula la homeostasia de los ácidos biliares tras su activación por estos ligandos naturales. En consecuencia, el papel de FXR es proteger el hígado del efecto perjudicial de la sobrecarga de ácidos biliares inhibiendo su biosíntesis y estimulando su excreción.

Las estructuras de los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención como se ha descrito anteriormente son las siguientes:



Se conocen en la técnica antagonistas de FXR que tienen efectos hipolipemiantes.

De forma sorprendente, según la presente invención, se observa que los antagonistas de FXR para su uso de acuerdo con la invención actúan como adyuvantes de vacuna.

La vacuna se prepara mezclando los antagonistas de FXR útiles de acuerdo con la invención y un antígeno. Los antagonistas de FXR normalmente son insolubles en agua. Para los fines de la presente invención, se pueden suspender en un líquido que contiene el antígeno. Se pueden formular en forma de emulsión para su incorporación a una vacuna. Se pueden incorporar en liposomas con o sin antígenos. Se pueden incorporar en forma de polvo. La vacuna de acuerdo con la invención contiene, por consiguiente, un antagonista de FXR útil de acuerdo con la invención como un buen adyuvante junto con un antígeno, excipientes, estabilizantes y transportadores farmacéuticos según los requisitos de la composición farmacéutica.

El antagonista de FXR útil de acuerdo con la presente invención se puede obtener de fuentes naturales o prepararse eficaz y económicamente mediante procesos utilizados para la fabricación de productos químicos sintéticos, como un adyuvante sintético que se sintetiza químicamente a partir de materiales de partida definidos para obtener un producto químicamente definido que presenta consistencia cualitativa y cuantitativa entre lotes. El antagonista de FXR útil de acuerdo con la presente invención ofrece beneficios sin precedentes incluyendo un mejor control de calidad del producto. De esta manera, la invención ofrece ventajas adicionales en términos de facilitar la síntesis y el control de calidad del producto.

De acuerdo con la presente invención, se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un adyuvante para alterar la respuesta inmunológica en un hospedador.

Para determinar las propiedades inmunoestimuladoras / adyuvantes de los compuestos se pueden emplear diferentes métodos de inmunoanálisis. La determinación de la inducción de una respuesta inmunitaria por las vacunas de la presente invención puede establecerse mediante cualquiera de numerosos ensayos inmunológicos bien conocidos con los que estarán familiarizadas aquellas personas son normalmente expertas en la materia. Dichos ensayos incluyen, pero necesariamente, no se limitan a, la determinación in vivo o in vitro de: anticuerpos solubles; mediadores solubles tales como citoquinas, linfoquinas, quimioquinas, cambios de estado debidos a activación celular según se ha determinado mediante las propiedades funcionales o estructurales alteradas de las células del sistema inmunitario, por ejemplo, proliferación celular, motilidad alterada, inducción de actividades especializadas tales como expresión génica específica o comportamiento citolítico; diferenciación celular por células del sistema inmune, incluyendo perfiles de expresión de antígenos superficiales alterados o el inicio de la apoptosis (muerte celular programada). Los procedimientos para llevar a cabo estos ensayos y otros similares son bien conocidos y se pueden encontrar, por ejemplo, en Lefkovits (Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998; véase también Current Protocols in Immunology; véase también, por ejemplo, Weir, Handbook of Experimental Immunology, 1986 Blackwell Scientific, Boston, Mass.; Mishell y Shigii (eds.) Selected Methods in Cellular Immunology, 1979 Freeman Publishing, San Francisco, Calif.; Green y Reed, 1998 Science 281:1309 y las referencias citadas en el presente documento).

Se puede llevar a cabo la detección de la respuesta inmunitaria celular mediante una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, se puede detectar la proliferación de linfocitos T midiendo la velocidad de síntesis del ADN, y se puede determinar la especificidad del antígeno controlando los estímulos (tales como, por ejemplo, un antígeno deseado específico o un control de células presentadoras de antígenos pulsadas con antígenos) a las que se exponen las células inmunitarias reactivas a antígenos candidatas. Otras formas de detectar la proliferación de células inmunitarias incluyen medir el aumento en las células productoras de interferón gamma (IFN-g), el flujo de Ca^{2+} , o captación de colorantes, tales como 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio. Como alternativa, se puede medir la síntesis de linfoquinas (tales como interferón gamma) o se puede cuantificar el número relativo de células inmunes que pueden responder a un antígeno concreto.

Se puede conseguir la detección de la producción de anticuerpos específicos de antígenos, por ejemplo, sometiendo a ensayo una muestra (por ejemplo, una muestra que contiene inmunoglobulina tal como suero, plasma o sangre) procedente de un hospedador tratado con una vacuna de acuerdo con la presente invención utilizando metodologías in vitro tales como radioinmunoensayo (RIA), enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), diálisis en equilibrio o inmunotransferencia en fase sólida incluyendo transferencia Western. En las realizaciones preferidas, los ensayos ELISA pueden incluir adicionalmente la inmovilización del antígeno diana mediante captura de antígeno con un anticuerpo monoclonal en fase sólida específico del antígeno, por ejemplo, para potenciar la sensibilidad del ensayo. La elaboración de mediadores solubles (por ejemplo, citoquinas, quimioquinas, linfoquinas, prostaglandinas, etc.) puede también determinarse fácilmente mediante enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), por ejemplo, utilizando métodos, equipos y reactivos que están fácilmente disponibles de fuentes comerciales (por ejemplo, Sigma, St. Louis, Mo.; véase también R & D Systems 2006 Catalog, R & D Systems, Minneapolis, Minn.). Se puede detectar la respuesta inmunitaria midiendo la protección in vivo de la enfermedad en un modelo animal adecuado.

Para los fines de la presente invención, se pretende que el término "antígeno" signifique cualquiera de un antígeno o composición antigénica que se pueda usar en una vacuna y sea capaz de estimular una respuesta inmunitaria contra un patógeno humano.

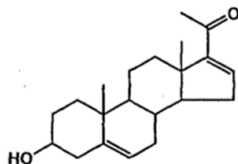
Para los fines de la presente invención, el antígeno o composición antigénica se selecciona entre un péptido, una proteína, antígenos de hidratos de carbono, antígenos bacterianos, fúngicos, protozoarios, víricos o parásitos, polipéptidos, células, extractos celulares, polisacáridos, polisacáridos conjugados, lípidos, glucolípidos, virus, extractos víricos, partículas de tipo virus, material nuclear o antígenos codificados en ácidos nucleicos.

5 El antagonista de FXR según la presente invención proporciona efecto adyuvante frente a diversos tipos de antígenos/vacunas tales como un organismo vivo completo, organismos muertos o inactivados, vacunas fraccionadas, vacunas a base de subunidades, vacunas contra el cáncer, etc.

10 De acuerdo con la presente invención, cuando a los mamíferos se les administran vacunas con una composición farmacéutica que contiene uno o más antígenos con antagonistas de FXR, el adyuvante produce un aumento más rápido en el título de anticuerpos que es mayor y más prolongado en comparación a cuando no se usan antagonistas de FXR.

15 El antagonista de FXR según la presente invención varía de 10 nm a 1 mM. Se obtienen los mejores resultados con el antagonista de FXR que varía de 1 μ M a 100 μ M.

20 Se ha descubierto que la 3 β Hidroxi-5,16-pregnadien-20-ona ($C_{21}H_{30}O_2$), es un potente antagonista de FXR (denominado aquí a partir de ahora BB), que tiene propiedades adyuvantes similares a las de otros elementos de la clase de compuestos antagonistas de FXR. La BB es insoluble. La estructura de la 3 β hidroxi-5,16-pregnadien-20-ona (BB) es la siguiente:



3 β -Hidroxi-5,16-pregnadien-20-ona

25 Vacuna

Las vacunas de la presente invención se pueden usar para la profilaxis o para el tratamiento de la enfermedad. Además, el efecto de los adyuvantes como potenciadores inmunitarios se observa para la vacuna terapéutica y la vacuna profiláctica. Las composiciones de vacuna según la presente invención contienen el mismo adyuvante y la vacuna/antígeno subclasificada tales como las vacunas de virus completos vivos, vacunas de virus completos muertos, vacunas a base de subunidades que comprenden antígenos víricos purificados o recombinantes, vacunas de virus recombinantes, y anticuerpos anti-idiotipo, vacunas de ADN y similares.

35 Los siguientes ejemplos de composiciones, según la presente invención, no tienen conservantes. Si se requiere producir unidades multidosis, se pueden añadir los conservantes. Para aumentar la estabilidad, siempre que se requiera, la composición puede estar en la forma de un polvo seco. Se puede obtener un polvo seco mediante liofilización y/o criocongelación de la composición antes o después de añadir adyuvante. Cuando la naturaleza del antígeno requiere estar en forma seca, el adyuvante puede proporcionarse en un diluyente.

40 Ejemplo I: Cada 1,0 ml de composición contiene:

Antígeno superficial de la hepatitis B recombinante	10 μ g
3 β Hidroxi-5, 16-pregnadien-20-ona ($C_{21}H_{30}O_2$)	5 μ M
Agua para inyección I. P.	c. s. hasta 1,0 ml

45 Ejemplo II: Cada 1,0 ml de composición contiene:

Antígeno superficial de la hepatitis B recombinante	10 μ g
3 β Hidroxi-5,16-pregnadien-20-ona ($C_{21}H_{30}O_2$)	20 μ M
Suero salino normal	c. s. hasta 1,0 ml

Ejemplo III: Cada 1,0 ml de composición contiene:

Antígeno superficial de la hepatitis B recombinante	10 μ g
3 β Hidroxi-5,16-pregnadien-20-ona ($C_{21}H_{30}O_2$)	50 μ M
Agua para inyección I. P.	c. s. hasta 1,0 ml

Ejemplo IV: Cada 1,0 ml de composición contiene:

ES 2 564 183 T3

	Antígeno superficial de la hepatitis B recombinante 3β-Acetoxipregna-5,16-dien-20-ona(16-DPA) Suero salino normal	20 µg 10 µM c. s. hasta 1,0 ml
5	Ejemplo V: Cada 1,0 ml de composición contiene:	
	ADNr que codifica el antígeno de la rabia 3βHidroxi-5, 16-pregnadien-20-ona (C ₂₁ H ₃ OO ₂) Agua para inyección I. P.	100 ug 5 µM c. s. hasta 1,0 ml
10	Ejemplo VI: Cada 1,0 ml de composición contiene:	
	ADNr que codifica el antígeno de la rabia 4,16-Dienpregna-3,20-diona Agua para inyección I. P.	100 ug 15 µM c. s. hasta 1,0 ml
15	Ejemplo VII: Cada 1,0 ml de composición contiene:	
	Antígeno del virus de la rabia inactivado (Rabipur) 3βHidroxi-5, 16-pregnadien-20-ona (C ₂₁ H ₃ OO ₂) Suero salino normal	2,5 1U 20 µM c. s. hasta 1,0 ml
20	Ejemplo VIII: Cada 1,0 ml de composición contiene:	
	Antígeno del virus de la rabia inactivado (Rabipur) 3βHidroxi -5, 16-pregnadien-20-ona (C ₂₁ H ₃ OO ₂) Suero salino normal	2,5 1U 10 µM c. s. hasta 1,0 ml
25	Ejemplo IX: Cada 1,0 ml de composición contiene:	
	Antígeno del virus de la rabia inactivado (Rabipur) 3β-Hidroxipregna-5,16-dien-20-ona Suero salino normal	2,5 1U 1 µM c. s. hasta 1,0 ml
30	Ejemplo X: Cada 1,0 ml de composición contiene:	
	Célula cancerosa (Mia-Pa-Ca) 3β-Hidroxipregna-5,16-dien-20-ona Suero salino normal	10 ⁶ 10 µM c. s. hasta 1,0 ml
35	Ejemplo XI: Cada 1,0 ml de composición contiene:	
	Célula cancerosa (SPO ₂) 5,17(20)-Dien-pregna-3,16-diol-diacetato Suero salino normal Suero salino normal	10 ⁵ 20 µM c. s. hasta 1,0 ml c. s. hasta 1,0 ml
40	Ejemplo XII: Cada 1,0 ml de composición contiene:	
	Célula cancerosa (Panc-1) v,16-Dienpregna-3,20-diona Suero salino normal	10 ⁷ 5 µM c. s. hasta 1,0 ml
45	Ejemplo XIII: Cada 1,0 ml de composición contiene:	
	Virus de la hepatitis A inactivado 5,17(20)-Dien-pregna-3,16-diol-diacetato Suero salino normal	10 ⁵ 20 µM c. s. hasta 1,0 ml
50	Ejemplo XIV: Cada 1,0 ml de composición contiene:	
	<i>Bordetella pertussis</i> Toxoide de la difteria Toxoide del tétanos 5,17(20)-Dien-pregna-3,16-diol Suero salino normal	4000 m org 50 Lf 10 Lf 15 µM c. s. hasta 1,0 ml
55		
60		
65		

Ejemplo XV: Cada 1,0 ml de composición contiene:

5	Sacárido de <i>H. influenzae</i>	10 µg
	[4,17(20)-Cis-pregnadieno-3,16-diona]	15 µM
	Suero salino normal	c. s. hasta 1,0 ml

Ejemplo XVI: Cada 1,0 ml de composición de la gripe estacional contiene:

10	Cepa H1N1 pandémica [Ca/04]	15 µg de HA
	Virus H1N1 [Br/59]	15 µg de HA
	Virus H3N2 [Br/10]	15 µg de HA
	Z-Guggulsterone	5 µM
	Suero salino normal	c. s. hasta 1,0 ml

15 Ejemplo XVII: Cada 1,0 ml de composición contiene:

20	Polisacárido capsular VI purificado de <i>S. Typhi</i>	2,5 µg
	4,16-Dienpregna-3,20-diona	10 µM
	Suero salino normal	c. s. hasta 1,0 ml

25 Las formulaciones que se han descrito anteriormente pueden producirse para diferentes antígenos que comprenden antagonistas de FXR como adyuvantes en los volúmenes y concentraciones de dosis requeridos. Los siguientes ejemplos proporcionan un esquema general de incorporación de adyuvantes de la presente invención a diversos antígenos.

25 Ejemplo XVII: 10 µg de antígeno superficial de la hepatitis B recombinante con un antagonista de FXR como adyuvante:

Tabla: 01

Antagonista de FXR	Concentración				
	5 µM	10 µM	-	20 µM	50 µM
3β-Hidroxi-5,16-pregnadien-20-ona	5 µM	10 µM	-	20 µM	50 µM
3β-Acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (16-DPA)	-	10 µM	-	20 µM	-
4,16-Dienpregna-3,20-diona	5 µM	-	15 µM	-	-
3β-Hidroxipregna-5,16-dien-20-ona	5 µM	-	15 µM	-	50 µM

30 Ejemplo XVIII: 20 µg de antígeno superficial de la hepatitis B recombinante con un antagonista de FXR como adyuvante:

Tabla: 02

Antagonista de FXR	Concentración				
	5 µM	10 µM	-	-	-
3β-Hidroxipregna-5-en-20-ona	5 µM	10 µM	-	-	-
5,17(20)-Dien-pregna-3,16-diol-diacetato	-	10 µM	15 µM	-	50 µM
3β-Acetoxipregna-5-en-20-ona	-	10 µM	15 µM	-	50 µM
Z-Guggulsterone	5 µM	10 µM	-	20 µM	50 µM
5,17(20)-Dien-pregna-3,16-diol	5 µM	10 µM	-	-	-
[4,17(20)-Cis-pregnadieno-3,16-diona]	-	10 µM	-	-	40 µM
[4,17(20)-Trans-pregnadieno-3,16-diona]	-	10 µM	-	20 µM	40 µM

35 Ejemplo XIX: 2,5 UI de virus de antígeno del virus de la rabia inactivado (Rabipur) con un antagonista de FXR como adyuvante:

Tabla: 03

Antagonista de FXR	Concentración				
	1 µM	-	15 µM	-	50 µM
Guggulipid	1 µM	-	15 µM	-	50 µM
3β-Acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (16-DPA)	5 µM	10 µM	-	20 µM	-

Antagonista de FXR	Concentración				
4,16-Dienpregna-3,20-diona	-	10 μ M	-	20 μ M	-
3 β -Hidroxi-5,16-pregnadien-20-ona	5 μ M	10 μ M	15 μ M	20 μ M	50 μ M
5,17(20)-Dien-pregna-3,16-diol	5 μ M	-	-	20 μ M	-
3 β -Hidroxipregna-5,16-dien-20-ona	1 μ M	10 μ M	25 μ M	-	50 μ M
[4,17(20)-Cis-pregnadieno-3,16-diona]	5 μ M	-	15 μ M	-	50 μ M
E-Guggulsterone	-	10 μ M	15 μ M	20 μ M	-
[4,17(20)-Trans-pregnadieno-3,16-diona]	1 μ M	5 μ M	10 μ M	-	50 μ M

Ejemplo XX: 10^7 células cancerosas (Mia-paca 2) antígeno con un antagonista de FXR como un adyuvante:

Tabla: 04

Antagonista de FXR	Concentración				
3 β -Hidroxi-5,16-pregnadien-20-ona	5 μ M	-	-	-	50 μ M
3 β -Acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (16-DPA)	-	10 μ M	-	20 μ M	-
4,16-Dienpregna-3,20-diona	5 μ M	10 μ M	-	20 μ M	50 μ M

5

Ejemplo XXI: Antígeno de células cancerosas (Mia-paca 2) con un antagonista de FXR como un adyuvante:

Tabla: 05

Antagonista de FXR	Concentración				
3 β -Acetoxipregna-5-en-20-ona	-	10 μ M	15 μ M	20 μ M	50 μ M
5,17(20)-Dien-pregna-3,16-diol-diacetato	-	10 μ M	-	20 μ M	-
3 β -Hidroxipregna-5,16-dien-20-ona	-	10 μ M	-	20 μ M	50 μ M

10 Ejemplo XXII: 10^5 de antígeno de células cancerosas (Mia-paca 2) con un antagonista de FXR como adyuvante:

Tabla: 06

Antagonista de FXR	Concentración				
[4,17(20)-Trans-pregnadieno-3,16-diona]	5 μ M	-	15 μ M	20 μ M	40 μ M
[4,17(20)-Cis-pregnadieno-3,16-diona]	5 μ M	-	15 μ M	20 μ M	40 μ M

15 Ejemplo XXIII: 100 ug de antígeno de ADNr (que codifica el antígeno de la rabia) con un antagonista de FXR como adyuvante:

Tabla: 07

Antagonista de FXR	Concentración				
3 β -Hidroxi-5,16-pregnadien-20-ona	5 μ M	10 μ M	-	20 μ M	50 μ M
[4,17(20)-Cis-pregnadieno-3,16-diona]	-	10 μ M	15 μ M	-	-
4,16-Dienpregna-3,20-diona	5 μ M	-	15 μ M	20 μ M	-
5,16-Dien-pregnano-3,20-diol	5 μ M	10 μ M	-	20 μ M	50 μ M
ácido 7-(2-hexiloxi-3,5-diisopropil-fenil)-3-metil-octa-2,4,6-trienoico	5 μ M	10 μ M	-	20 μ M	-

20 La propiedad del adyuvante de la presente invención se analizó evaluando la respuesta de anticuerpos al antígeno asociado, así como la respuesta celular inmunomediada. Los siguientes ejemplos describen la potencia de la respuesta inmunitaria utilizando antagonistas de FXR como un adyuvante junto como antígenos. Algunos de estos se describen en el presente documento a continuación para proporcionar una visión general de la invención, pero no son limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

5 Se inmunizaron 3 ratas Wistar por grupo con antígeno rHBsAg mezclado con 5 μ M y 20 μ M de BB. Se inyectaron a cada rata 10 μ g, en el día 0, inyección intramuscular. Se detectaron los anticuerpos dirigidos contra HBsAg en suero de ratas individuales en intervalos de 14 días. BB-50 uM, BB-5 uM son adyuvantes de ejemplo. En la figura 1 se muestran los resultados de este estudio.

Ejemplo 2

10 Se aleatorizaron 5 ratones Swiss albinos por grupo y se inmunizaron con 100 ug de ADNr que codificaba el antígeno de la rabia en el día 0 y el día 14. El ADNr con 5 μ M y 10 μ M de BB proporciona títulos de anticuerpo protectores en el día 28 después de la 1ª dosis de vacuna. Los títulos siguen siendo protectores durante aproximadamente 100 días. En la figura 2 se muestran los resultados de este estudio.

15 Ejemplo 3

20 Se aleatorizaron 3 ratas Wistar por grupo y se inmunizaron con una única inyección de 10 microgramos de HBsAg con BB 50 uM como adyuvante. Se extrajo sangre de las ratas en el 14º día después de la inmunización y se analizaron los títulos de anticuerpo mediante ELISA. En la figura 3 se muestran los resultados de este estudio.

Ejemplo 4

25 Se inmunizaron 3 ratas Wistar por grupo con antígeno rHBsAg mezclado con 20 μ M y 50 μ M de BB. Se inyectaron a cada rata 10 μ g, en el día 0, inyección intramuscular. Se detectaron los anticuerpos dirigidos contra HBsAg en suero de ratas individuales en intervalos de 14 días. BB-50 uM, BB-5 uM son adyuvantes de ejemplo. En la figura 4 se muestran los resultados de este estudio.

Ejemplo 5

30 Se inmunizaron 5 ratones en cada grupo con virus de la rabia inactivado (Rabipur) con adyuvante 1 sin BB como adyuvante, se inmunizó el tercer grupo con PBS como control. Se llevó a cabo una única inmunización en el día 1. Se extrajo sangre de los ratones en el día 0, 7, y 14 y se midieron los anticuerpos utilizando el kit ELISA de BioRAD.

35 Los ratones inmunizados con BB como adyuvante junto con la vacuna de la rabia produjeron una respuesta más rápida y más fuerte. Los títulos fueron protectores en el día 14. En la figura 5 se muestran los resultados de este estudio.

Ejemplo 6

40 Se mezcló la proteína NE recombinante (1 μ g) del virus de la hepatitis E con 5 μ M de BB y se administró por vía intramuscular. Se observó un 60 % de seroconversión en el día 14 después de la 1ª inyección y un 100 % después de la 2ª inyección proporcionada 2 semanas después.

Ejemplo 7

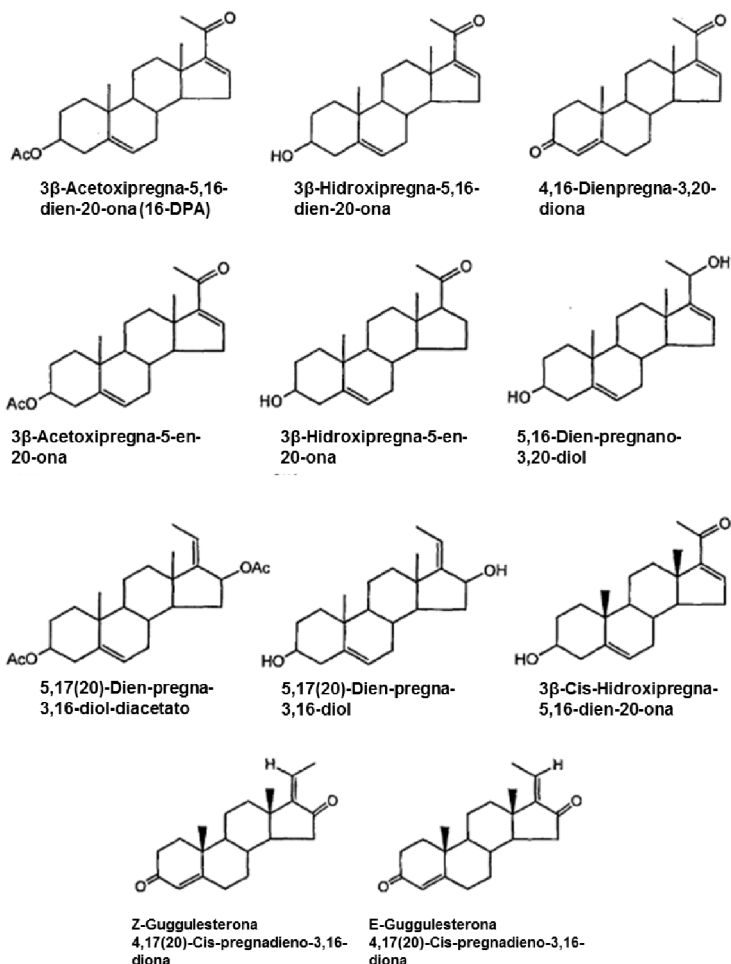
45 Se inmunizaron 5 ratones en cada grupo con células cancerosas (Mia-paca-2) con y sin BB como adyuvante, se inmunizó el tercer grupo con PBS como control. Se administraron dos dosis de inmunización en el día 1 y el día 21. Se sacrificaron los ratones en el día 28, se extrajeron los esplenocitos y se llevó a cabo ELISPOT con interferón gamma (IFN-g).

50 Los ratones inmunizados con BB como adyuvante junto con las células cancerosas produjeron más de tres veces más respuesta que el grupo con mycobacterium como adyuvante. En la figura 6 se muestran los resultados de este estudio. El tipo de respuesta inmunitaria generada es una fuente o da como resultado una reducción en el tamaño del tumor.

55 La presente invención proporciona un antagonista de FXR como adyuvante y una composición farmacéutica que contiene el mismo junto con un antígeno.

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista del receptor farnesoide X (FXR) para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico mediante vacunación, en el que dicho antagonista de FXR actúa como adyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria específica de antígeno, y en el que dicho antagonista de FXR se selecciona entre:



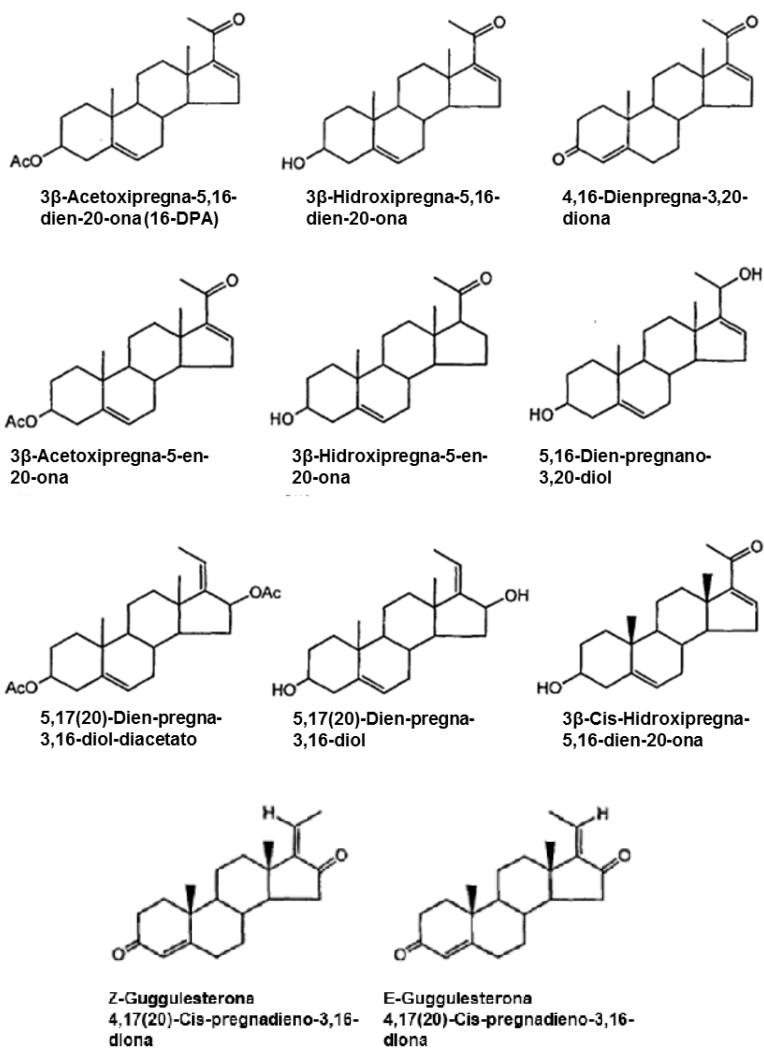
2. Un antagonista de FXR de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho antagonista de FXR se utiliza en combinación con un antígeno.
3. Un antagonista de FXR de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el antígeno se selecciona entre un péptido, una proteína, un antígeno de hidrato de carbono, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno protozario, un antígeno vírico, parásitos, alérgenos, polipéptidos, células, extractos celulares, polisacáridos, polisacáridos conjugados, lípidos, glucolípidos, virus, extractos víricos, partículas de tipo virus, material nuclear o antígenos codificados en ácidos nucleicos.
4. Un antagonista de FXR de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3 para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que el antígeno es un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor.
5. Un antagonista de FXR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la concentración del antagonista de FXR varía de 10 nM a 1 mM, preferentemente de 1 μM a 100 μM, lo más preferente de 1 μM a 50 μM.
6. Un antagonista de FXR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho antagonista de FXR induce una respuesta de anticuerpos y/o una respuesta de anticuerpos mediada por células.

7. Un antagonista de FXR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que se genera una respuesta inmunitaria más rápida, mayor y/o sostenida.

5 8. Un antagonista de FXR de acuerdo con la reivindicación 1-7 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en el que dicho antagonista de FXR proporciona seroprotección.

9. Un antagonista de FXR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en el que dicho antagonista de FXR mejora la seroconversión.

10 10. Una composición de vacuna que comprende (i) un antagonista del receptor farnesioide X (FXR) como adyuvante; y (ii) uno o más antígenos, en la que dicho antagonista de FXR se selecciona entre:



15 11. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el antígeno se selecciona entre un péptido, una proteína, un antígeno de hidrato de carbono, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno protozooario, un antígeno vírico, parásitos, alérgenos, polipéptidos, células, extractos celulares, polisacáridos, polisacáridos conjugados, lípidos, glucolípidos, virus, extractos víricos, partículas de tipo virus, material nuclear o antígenos codificados en ácidos nucleicos.

20

12. Una composición farmacéutica que comprende la composición de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11 y un transportador farmacéuticamente aceptable.

25 13. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en la que la concentración del antagonista de FXR varía de 10 nM a 1 mM, preferentemente de 1 μM a 100 μM, lo más preferente de 1 μM a 50 μM.

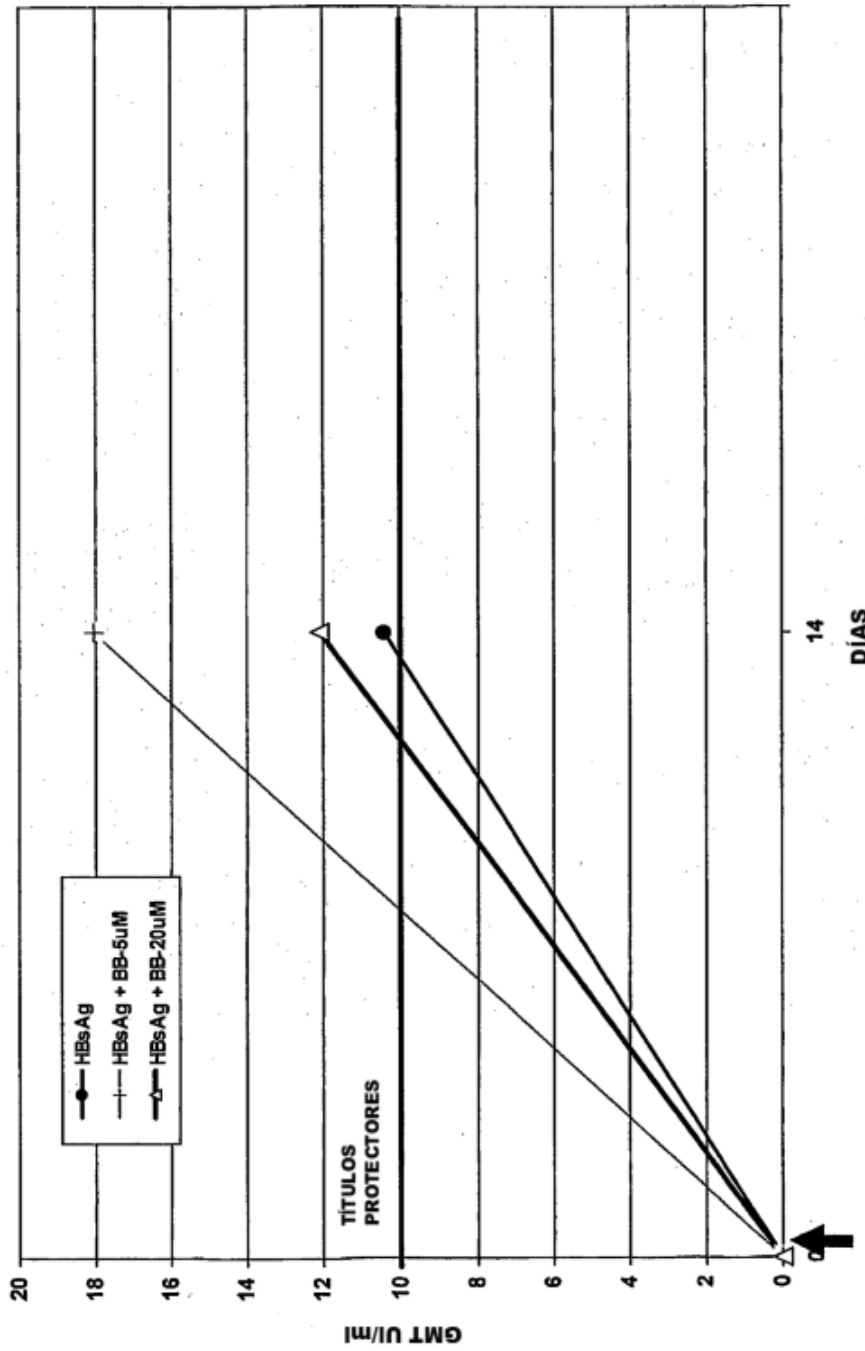


FIGURA 1

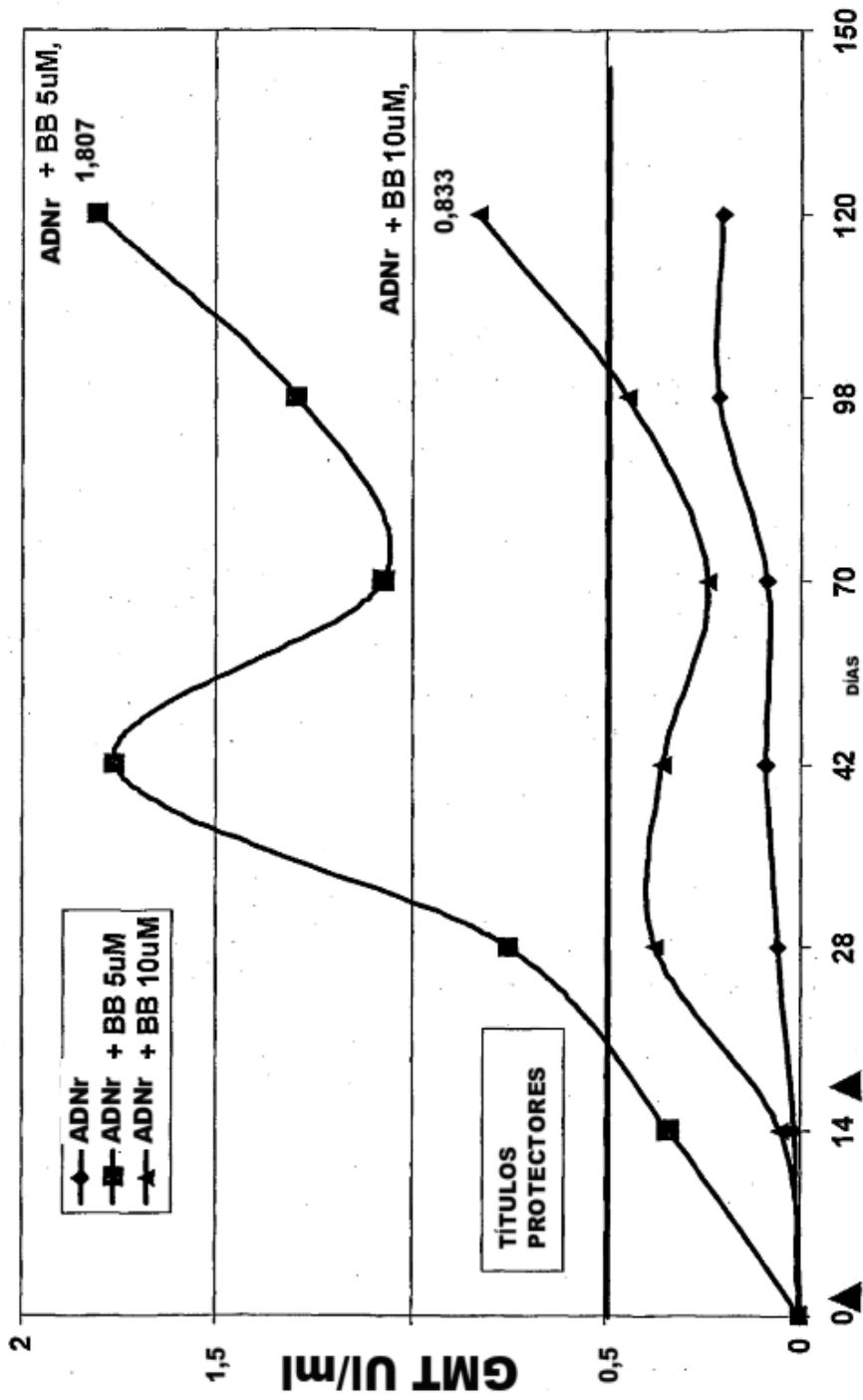


FIGURA 2

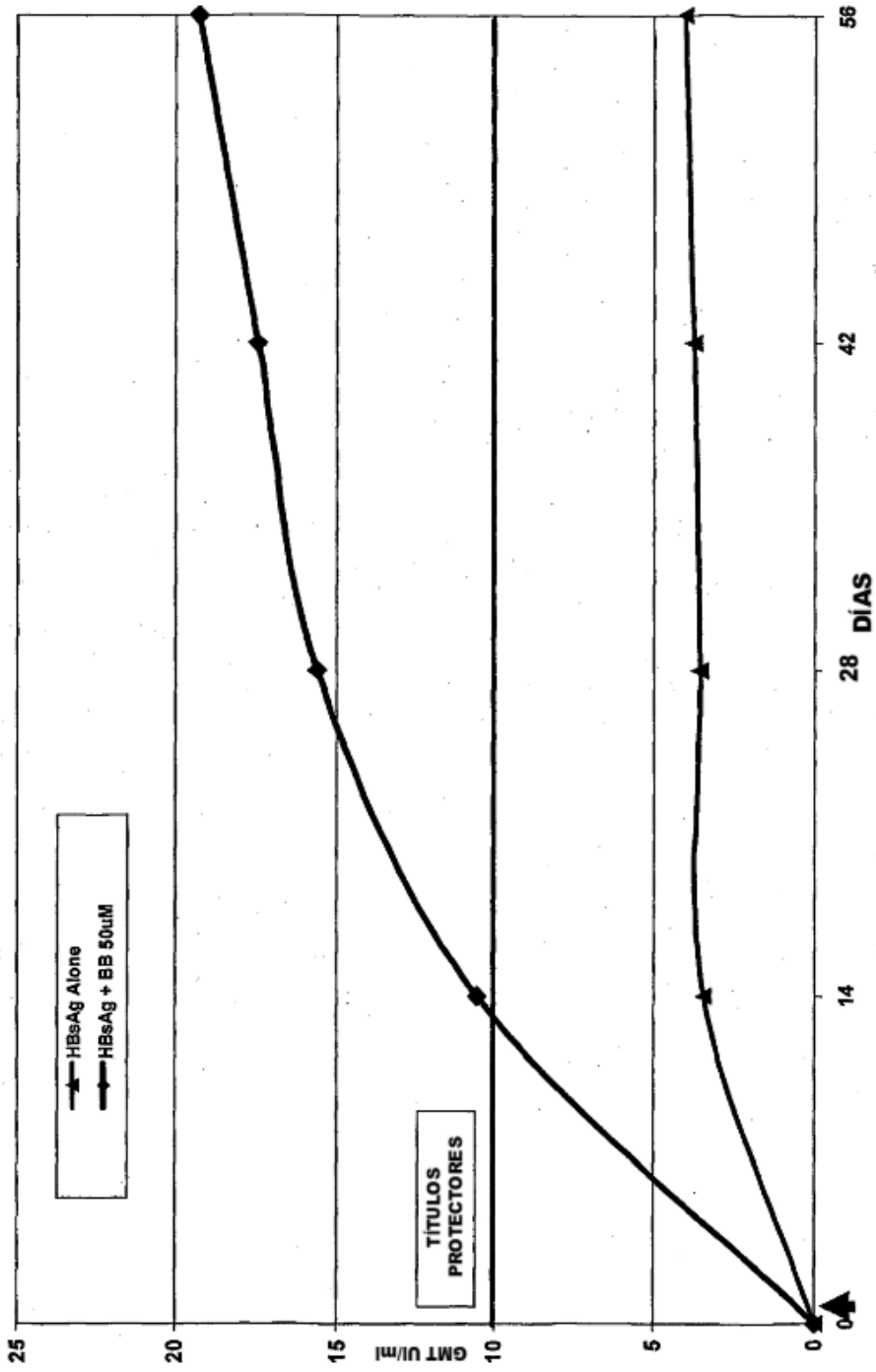


FIGURA 3

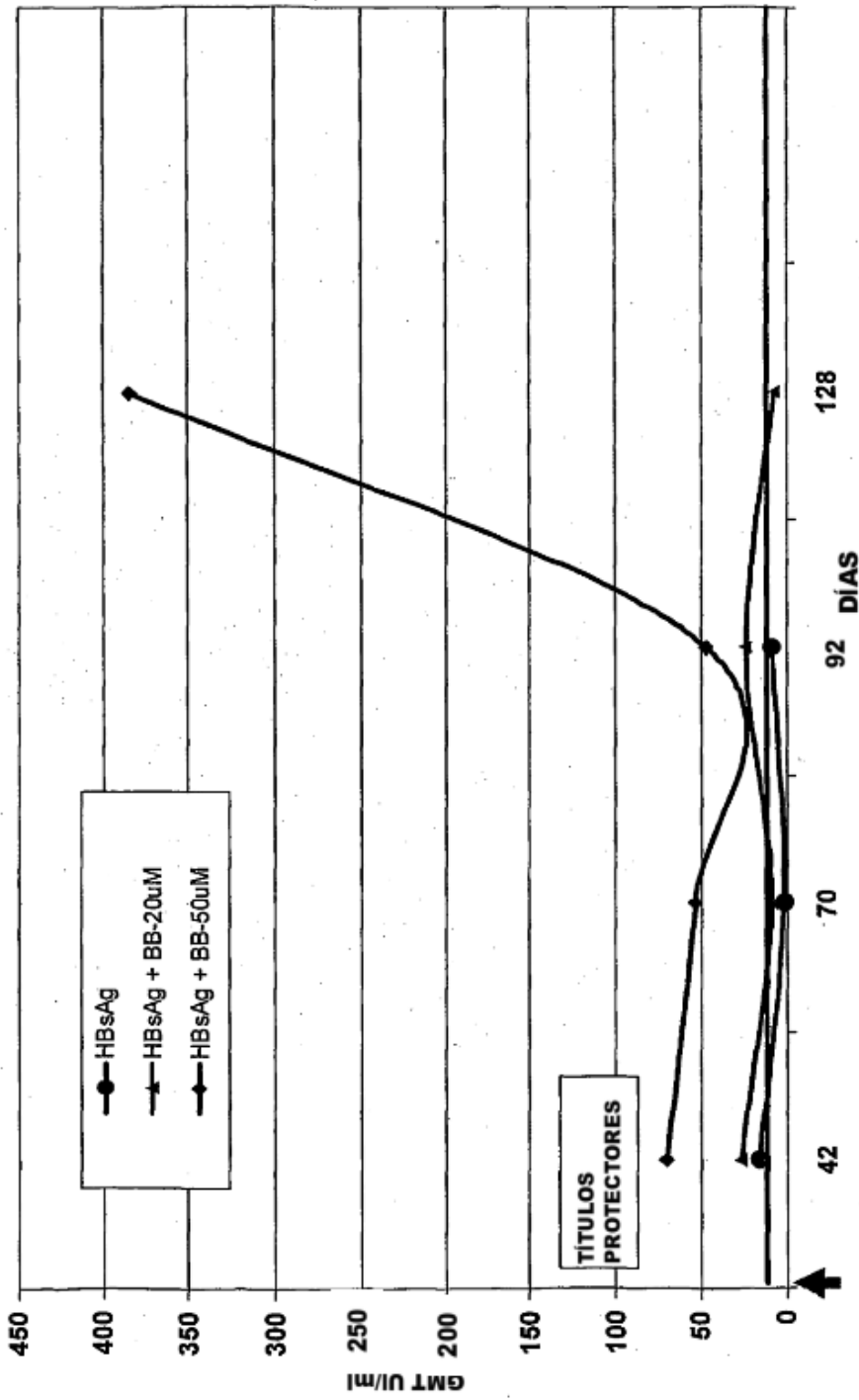


FIGURA 4

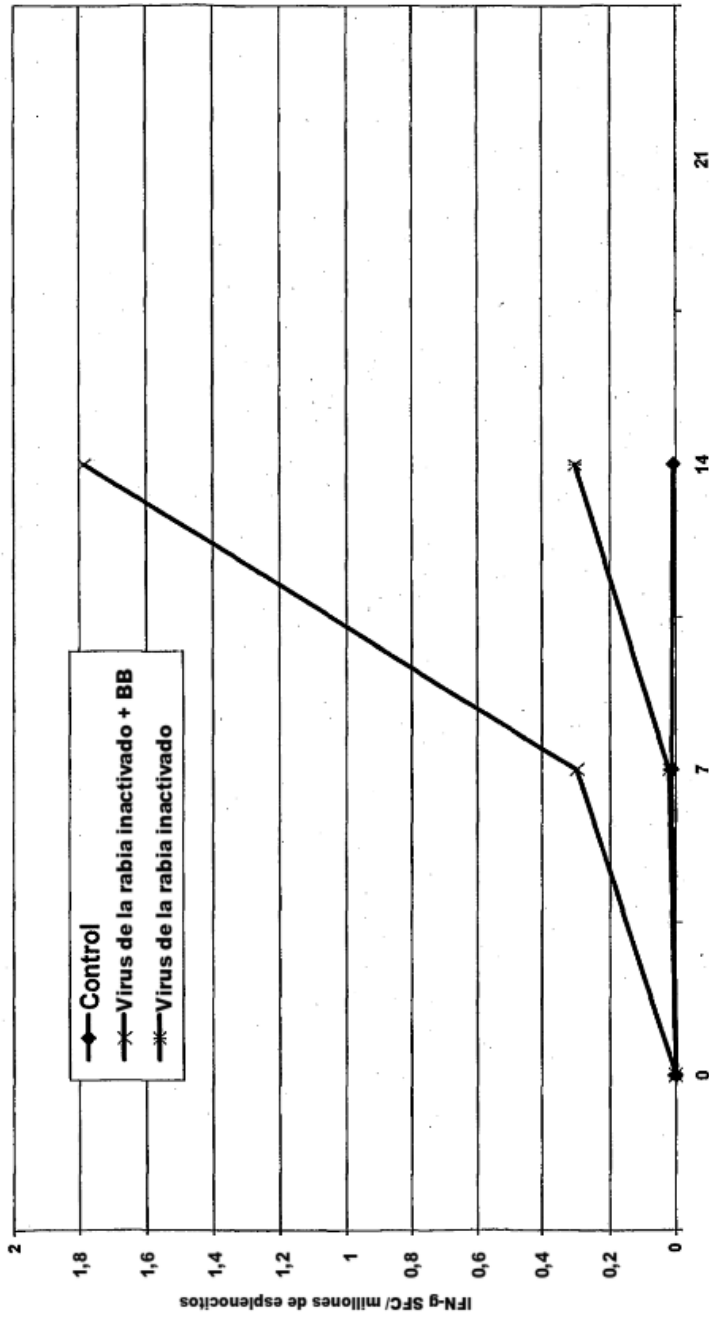


FIGURA 5

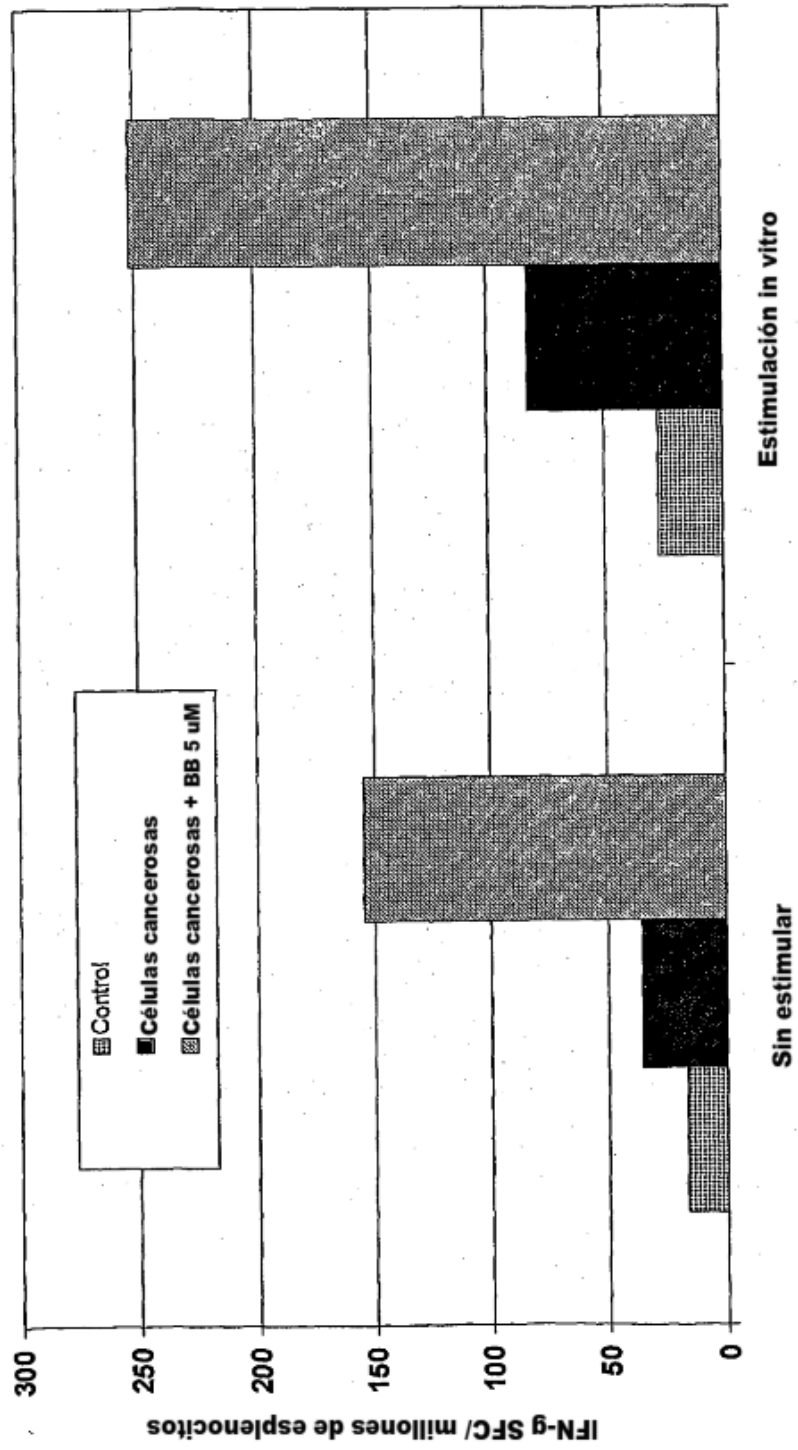


FIGURA 6