(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 572 834**

(51) Int. CI.:

A61K 39/08 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2000 E 10003539 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2204186**

(54) Título: **Complejos inmunogénicos y métodos relacionados con los mismos**

(30) Prioridad:

17.02.1999 AU PP873599
27.07.1999 AU PQ186199

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.06.2016

(73) Titular/es:

CSL LIMITED (100.0%)
45 POPLAR ROAD
PARKVILLE, VICTORIA 3052, AU

(72) Inventor/es:

COX, JOHN COOPER;
DRANE, DEBBIE PAULINE y
SUHRBIER, ANDREAS

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

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

Complejos inmunogénicos y métodos relacionados con los mismos

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a un complejo inmunogénico que comprende un vehículo orgánico cargado y un antígeno cargado y, más particularmente, un vehículo orgánico cargado negativamente y un antígeno cargado positivamente. Los complejos de la presente invención son útiles, entre otras cosas, como agentes terapéuticos y/o profilácticos para facilitar la inducción de una respuesta de linfocitos T citotóxicos a un antígeno.

Antecedentes de la invención

Los detalles bibliográficos de las publicaciones a las que el autor hace referencia en la presente memoria descriptiva se recogen al final de la descripción.

Existe una creencia creciente de que la liberación conjunta de antígeno y adyuvante a la misma célula presentadora de antígeno (CPA) es preferible y, en ocasiones, esencial para la inducción de respuestas inmunológicas adecuadas. Por ejemplo, la capacidad de los adyuvantes basados en saponina para inducir respuestas CTL CD_8^+ se atribuye a su capacidad para producir escape endosómico de antígeno, un mecanismo que requiere liberación conjunta. La formación de partículas que comprenden un complejo estable de adyuvante y antígeno es la forma más sencilla para conseguir la liberación conjunta. La utilidad de la tecnología ISCOM™ deriva en parte de la actividad inmunomoduladora de las saponinas y en parte de su capacidad para formar complejos con inmunógenos hidrofóbicos y anfipáticos. No obstante, muchas moléculas carecen de regiones hidrófobas y, de hecho, tales moléculas se prefieren como proteínas recombinantes, debido a su expresión y purificación más fáciles.

De acuerdo con lo anterior, existe la necesidad de desarrollar complejos inmunogénicos que faciliten la liberación conjunta de antígenos y vehículos que, de otro modo, no suelen forman complejos suficientemente estables. Por ejemplo, los complejos que comprenden antígenos que carecen de regiones hidrófobas junto con adyuvante.

En el trabajo que condujo a la presente invención, los inventores han desarrollado un complejo inmunógeno basado en la asociación electrostática de un antígeno y un vehículo orgánico, tal como un adyuvante. Esta asociación electrostática permite la liberación conjunta del antígeno y el vehículo orgánico al sistema inmunológico. De acuerdo con lo anterior, mediante el establecimiento de una asociación electrostática, los antígenos de interés (con independencia de su hidrofobicidad) pueden liberarse de forma conjunta con un vehículo orgánico, con el propósito de, por ejemplo, inducir una citotóxico respuesta de linfocitos T al antígeno.

Sumario de la invención

A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones siguientes, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entiende que la palabra "comprenden" y variaciones tales como “comprende” y “que comprende” implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

La especificación sujeto contiene información sobre secuencias de aminoácidos preparadas usando el programa PatentIn Versión 2,0, presentadas en el presente documento después de la bibliografía. Cada secuencia de aminoácidos se identifica en el listado de secuencias por el indicador numérico <210> seguido del identificador de secuencias (por ejemplo, <210> 1, <210>2, etc.). La longitud, el tipo de secuencia (proteína (PRT), etc.) y el organismo fuente para cada secuencia de aminoácidos se indican en la información proporcionada en los campos del indicador numérico <211>, <212> y <213>, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en la memoria descriptiva están definidas por la información proporcionara en el campo de indicador numérico <400> seguido del identificador de secuencias (por ejemplo, <400>1, <400>2, etc).

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método de fabricar un complejo inmunogénico asociado electrostáticamente que comprende un complejo orgánico cargado negativamente y un antígeno cargado positivamente, que consiste esencialmente en mezclar:

(A) un complejo orgánico cargado negativamente preformado que comprende una saponina y
(B) un antígeno cargado positivamente aislado,

formando de este modo un complejo inmunogénico donde dicho complejo orgánico y el antígeno están asociados por interacción electrostática.

Todavía otro aspecto de la presente invención proporciona un método de fabricar un complejo inmunogénico asociado electrostáticamente que comprende un complejo orgánico cargado negativamente y una proteína cargada positivamente.

Otro aspecto más de la presente invención proporciona un método de construcción de un complejo inmunogénico asociado electrostáticamente que comprende un complejo orgánico cargado negativamente y una proteína cargada positivamente, donde dicho complejo orgánico cargado negativamente se modifica para aumentar el grado de su carga negativa.

Otro aspecto más de la presente invención proporciona un método de construcción de un complejo inmunogénico asociado electrostáticamente que comprende un complejo orgánico cargado negativamente y una proteína cargada positivamente, donde dicha proteína cargada positivamente para aumentar el grado de su carga positiva.

Todavía otro aspecto más de la presente invención proporciona un método de construcción de un complejo inmunogénico asociado electrostáticamente que comprende un complejo orgánico cargado negativamente y una proteína cargada positivamente, donde dicho complejo orgánico cargado negativamente se modifica para aumentar el grado de su carga negativa y dicha proteína cargada positivamente se modifica para aumentar el grado de su carga positiva.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición de vacuna que comprende como componente activo un vehículo cargado negativamente que comprende saponina y un antígeno cargado positivamente, donde el vehículo y el antígeno están asociados electrostáticamente, junto con uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método de formar un complejo inmunogénico que comprende un complejo orgánico cargado negativamente y un antígeno cargado positivamente, comprendiendo el método la selección de un complejo orgánico, la modificación del complejo orgánico para aumentar su carga negativa y haciendo reaccionar el antígeno con un complejo orgánico, que comprende además una saponina.

Las abreviaturas de una y de tres letras usadas a lo largo de la memoria descriptiva se definen en la Tabla 1.

TABLA 1

Abreviaturas de aminoácidos de una y tres letras

Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Símbolo de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	F
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	D
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V
Cualquier resto	Xaa	X

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación gráfica del análisis de gradiente de sacarosa de ISCOMATRIX™ formulado con DPPC (Figura 1A), CDL (Figura 1B), DPL (Figura 1C), MPL (Figura 1D), DPA (Figura 1E) y DPPG (Figura 1F). En cada caso se puede ver que los lípidos y ^{3}H se solapan, lo que indica la incorporación de cada lípido en la estructura de ISCOMATRIX™.

La Figura 2 es una representación gráfica del análisis de gradiente de sacarosa de cuatro de las formulaciones ISCOMATRIX™ del Ejemplo 1 después de la mezcla con HpE. Se puede observar que la mayoría de HpE es con CDL y DPL ISCOMATRIX™, pero solo parte está asociado con DPPC y DPPG ISCOMATRIX™.

La **Figura 3** es una representación gráfica del análisis de gradiente de sacarosa de dos de las formulaciones ISCOMATRIX™ del Ejemplo 1 después de la mezcla con ESO. Se puede observar que la mayoría de ESO está

asociado con DPL ISCOMATRIX™, pero solo parte está asociado con DPPC ISCOMATRIX™.

La Figura 4 es una representación gráfica de las respuestas de anticuerpos a las formulaciones de ESO. Se puede observar que ISCOMATRIX™ asociado con ESO incluye respuestas de anticuerpos más altas que ESO solo, especialmente en la IgG2a subtipo Th1.

La Figura 5 es una representación gráfica del análisis de CTL de ratones inmunizados con ESO (figuras 5A, 5C) e ISCOMATRIX™ asociado con ESO (Figuras 5B, 5D) utilizando los péptidos SLLMWITQCFL (<400> 1) (Figura 5A, 5B) y SLLMWITQC (<400> 2) (Figura 5C, 5D) péptidos para estimulación y los objetivos. Se puede observar que ISCOMATRIX™ asociado con ESO induce una respuesta CTL pero ESO por sí solo no lo hace.

La **Figura 6** es una representación gráfica del análisis de gradiente de sacarosa de seis de las formulaciones ISCOMATRIX™ del Ejemplo 1 después de la mezcla con E6E7. Se puede ver que la mayoría de E6E7 está asociado con CDL, DPL y DPA ISCOMATRIX™, menos asociado con el MPL y DPPG ISCOMATRIX™ y menos aún, de nuevo, con el DPPC ISCOMATRIX™.

Figura 7 es una representación gráfica del análisis de CTL en ratones inmunizados con E6E7 DPL ISCOMATRIX™ (Figura 7A) y E6E7 DPPC ISCOMATRIX™ (Figura 7B). Se puede observar que E6E7 DPL ISCOMATRIX™ induce respuestas de CTL pero E6E7 DPPC ISCOMATRIX™ no.

La **Figura 8** es una representación gráfica del análisis de gradiente de sacarosa de dos de las formulaciones ISCOMATRIX™ del Ejemplo 1 después de la mezcla con HpC. Se puede observar que más HPC está asociado con DPL ISCOMATRIX™ que con DPPC ISCOMATRIX™ donde hay muy poca asociación.

La Figura 9 es una representación gráfica del análisis de gradiente de sacarosa de dos formulaciones DPPC ISCOMATRIX™ después de mezclar con E6E7 a pH 6 (Figura 6A) y a pH 7,2 (Figura 6B). Se puede ver que más E6E7 se asocia con DPPC ISCOMATRIX™ a pH 6 que a pH 7,2.

La Figura 10 es una representación gráfica del análisis de gradiente de sacarosa de formulaciones ISCOMATRIX™ después de mezclar con HpC modificado del Ejemplo 11. Se puede ver que la adición de 6K a HpC aumenta la asociación con DPPC ISCOMATRIX™ a un nivel comparable al de la formulación 6H y CHL ISCOMATRIX™.

La Figura 11 es una representación gráfica del análisis de gradiente de sacarosa de cuatro formulaciones de politopo ISCOM™ e ISCOMATRIX ™ del Ejemplo 13. Se puede ver que existe alguna asociación del politopo 6K con ISCOMATRIX™, pero no existe asociación si no hay 6K presente. La asociación del politopo 6K con ISCOMATRIX™ fue comparable a la incorporación hidrofóbica del politopo PAL en ISCOM™ pero menos que la asociación entre politopo 6H y CHL ISCOMATRIX™.

La **Figura 12** es una representación gráfica del análisis de CTL de cuatro formulaciones sintéticas de politopo ISCOMATRIX™ del Ejemplo 13. Se puede ver que politopo 6K ISCOMATRIX™ indujo respuestas de CTL frente a los 4 epítopos en el politopo (Figura 12C), pero la formulación del politopo ISCOMATRIX™ sin un marcador solo indujo una respuesta CTL baja a uno de los epítopos (Figura 12D). Las respuestas de CTL para el politopo 6K ISCOMATRIX™ fueron comparables a las inducidas con el politopo PAL ISCOM™ (Figura 12A) y el politopo 6H CHL ISCOMATRIX™ (Figura 12B).

La Figura 13 es una representación gráfica del análisis de gradiente de sacarosa de diez formulaciones ISCOMATRIX™ recombinantes a del Ejemplo 16. Se puede ver que la combinación de la adición de un marcador 6K con CDL o DPL ISCOMATRIX™ da una asociación mayor sobre 6K con DPPC ISCOMATRIX™ y, a continuación, la combinación a pH bajo aumentan la capacidad de asociación todavía más. La asociación alcanzada con la combinación de 6K, CDL ISCOMATRIX™ y pH bajo dio una asociación casi completa del politopo con ISCOMATRIX™ y la asociación fue mayor de la que podría lograrse con politopo 6H CHL ISCOMATRIX™.

La Figura 14 es una representación gráfica del análisis de CTL del politopo 6K CDL ISCOMATRIX™ pH 4,3 (Figura 14A) y las formulaciones del politopo 6H CHL ISCOMATRIX™ (Figura 14B). Se puede ver que las respuestas de CTL se indujeron en los 4 epítopos en el politopo, para ambas formulaciones, pero las respuestas fueron muy bajas para el epítopo TYQ.

La Figura 15 es una representación gráfica de los liposomas mezclados con E6E7 del Ejemplo 18. Se puede ver que la mayor parte del E6E7 estaba asociada con los liposomas DPL pero muy poco E6E7 estaba asociado con los liposomas DPPC.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente invención se basa, en parte, en el desarrollo de una formulación de complejo inmunogénico que utiliza interacciones electrostáticas para asociar un antígeno y un vehículo, facilitando de ese modo, entre otras cosas, la liberación conjunta de estas moléculas al sistema inmunológico. Los complejos inmunógenos son particularmente adecuados para su uso en la facilitación de la estimulación de las respuestas de linfocitos T citotóxicos a inmunógenos que no comprenden regiones hidrófobas.

La referencia a un "complejo" debe entenderse como la descripción de una entidad de dos o más componentes químicos diferentes que interaccionan.

La referencia a un vehículo o antígeno orgánico "cargado" debe entenderse como una referencia a un vehículo orgánico o antígeno que exhibe una carga eléctrica positiva global o una carga eléctrica negativa global. Por "global" se entiende la suma de las cargas positivas y negativas individuales que comprende una molécula dada. Cuando la suma de las cargas positivas y negativas individuales da lugar a una neutralidad eléctrica global, la molécula no se considera "cargada" en el contexto de la presente invención. Preferentemente, el antígeno comprende una carga positiva global y el vehículo orgánico comprende una carga negativa global.

La referencia a "asociado electrostáticamente" es una referencia a que el complejo orgánico y el antígeno están ligados, unidos o asociados de otro modo por medios que incluyen interacción electrostática. De acuerdo con lo anterior, se debe entender que en algunos casos la interacción electrostática será la única fuerza de atracción que da lugar a la formación del complejo del antígeno y el vehículo orgánico. Sin embargo, en otros casos, la formación de la interacción electrostática también puede conducir a, o estar asociada con, la formación de otras fuerzas interactivas.

La referencia a "antígeno" se debe entender como una referencia a cualquier molécula contra la que se pretende inducir una respuesta inmune y, en particular, una respuesta de linfocitos T citotóxicos. El antígeno puede ser una molécula proteinácea o no proteinácea, de modo que la molécula puede o no ser inmunogénica si se administra de forma aislada. El antígeno puede ser de origen natural o puede producirse de forma recombinante o sintéticamente. Después de su aislamiento o síntesis, el antígeno puede requerir modificación adicional (por ejemplo, modificación estructural o de secuencia para mejorar su antigenicidad) antes de su uso en la presente invención. Los antígenos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, proteínas del núcleo o nucleoproteínas aisladas de virus, proteínas virales que no son del núcleo, tales como partículas similares a virus (VLP), antígenos de las células malignas y no malignas, antígenos bacterianos, antígenos de parásitos y politopos sintéticos y recombinantes.

Preferentemente, el antígeno es una proteína. El término "proteína" debe entenderse que abarca la referencia a proteínas, polipéptidos y péptidos y derivados y equivalentes de los mismos. La proteína puede ser glicosilada o no glicosilada, fosforilada o desfosforilada en varios grados y/o puede contener una serie de otras moléculas fusionadas, ligadas, unidas o, de otra forma, asociadas a la proteína, tales como aminoácidos, lípidos, carbohidratos u otros péptidos, polipéptidos o proteínas. En lo sucesivo en el presente documento, la referencia a una "proteína" incluye una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos así como una proteína asociada con otras moléculas tales como aminoácidos, lípidos, carbohidratos u otros péptidos, polipéptidos o proteínas.

Como se ha definido anteriormente en el presente documento, el antígeno también puede ser un politopo. El politopo objeto puede producirse por medios sintéticos o recombinantes (por ejemplo, consúltese la publicación de patente internacional n.º WO 96/03144).

A este respecto, el antígeno puede estar, en su forma inicial o natural, cargado positivamente, cargado negativamente o con carga neutra. No obstante, cuando un antígeno está cargado positivamente, puede tener una carga positiva débil y, por lo tanto, puede requerir modificaciones para aumentar su grado de carga positiva de tal manera que la formación de complejos con el vehículo orgánico con carga negativa se facilita mejor. Por ejemplo, donde un antígeno está cargado positivamente débilmente, aumentar el grado de su carga positiva se puede lograr por cualquiera de una serie de métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitaciones, la adición química de carga positiva adicional al antígeno o la adición recombinante de carga positiva tal como mediante la adición de polilisina al antígeno. Esto es de particular uso cuando el antígeno es una proteína. Otros métodos que se pueden utilizar para aumentar el grado de carga positiva de un antígeno incluyen, pero no se limitan a, modificación del pH, modificaciones químicas o neutralización de las cargas negativas de un antígeno con moléculas cargadas positivamente, tal como arginina. De un modo similar, cuando un antígeno es neutro o está cargado negativamente, su carga global se puede convertir en una carga positiva global mediante la utilización de dicha metodología. La conversión de un antígeno cargado negativamente para expresar una carga positiva global puede ser particularmente importante cuando el antígeno es una proteína, ya que la mayoría de las proteínas pueden estar cargadas negativamente de forma natural.

Una vez que la carga del antígeno de interés es suficientemente positiva, se hace necesario asegurar que la precipitación del antígeno cargado positivamente no se produce antes de la formación del complejo con el vehículo

orgánico. En este sentido, se puede usar cualquier método adecuado para evitar la precipitación del antígeno. Por ejemplo, la solubilidad del antígeno se puede mantener mediante la interrupción de las fuerzas que causan la agregación de antígeno. La alteración de estas fuerzas se puede lograr, por ejemplo, mediante la incorporación en la solución del antígeno de agentes caotrópicos tales como urea y guanidina, disolventes tales como DMSO (dimetilsulfóxido) y acetonitrilo, productos intermedios tales como zwitteriones, detergentes tales como Triton X-100 y CHAPS (3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato), agentes reductores tales como DTT (ditiotreitol) y cisteína y agentes quelantes tales como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). La solubilidad también se puede mantener mediante la alteración del pH de la solución antigénica o por modificación química del antígeno para introducir moléculas polares o iónicas, tal como mediante alquilación o acetilación. Una eliminación gradual o por etapas de estos agentes solubilizantes cuando el antígeno se ha puesto en contacto con el "vehículo orgánico" o una desnaturalización suave del antígeno puede conducir a una precipitación controlada del antígeno con mayor asociación concomitante con el vehículo orgánico.

La referencia a "vehículo orgánico" debe entenderse como una referencia a cualquier molécula, agregado o complejo de moléculas, compuesto u otra entidad que, cuando un antígeno se asocia con él, facilita la inducción de una respuesta inmune, y en particular una respuesta de linfocitos T citotóxicos al antígeno. El vehículo sujeto es "orgánico" y, en este sentido, "orgánico" debe entenderse como un compuesto de carbono obtenido o derivado de forma natural, recombinante o sintética. En una realización particularmente preferida, el vehículo orgánico es un adyuvante. Por "adyuvante" se entiende cualquier molécula orgánica, agregado o complejo de moléculas orgánicas, compuesto u otra entidad que funciona para estimular, mejorar o, de otra manera, regular por aumento uno cualquiera o más aspectos de la respuesta inmune. Por ejemplo, el adyuvante puede inducir inflamación, atrayendo así las células de la respuesta inmune al sitio de la localización del antígeno. Como alternativa, el adyuvante puede liberar lentamente el antígeno, proporcionando de ese modo una estimulación constante del sistema inmunológico. Los ejemplos de adyuvantes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, saponina, complejos de saponina, uno cualquiera o más componentes del complejo inmunoestimulante de saponina, colesterol y lípidos conocido como ISCOMATRIX™ (por ejemplo, el componente de saponina y/o el componente de fosfolípido), liposomas o emulsiones de aceite en agua. [La composición y la preparación de ISCOMATRIX™ se describe con detalle en las patentes australianas n.º 558258 y 632067 y la publicación de patente europea n.º. 0 180 564.]

Otros ejemplos de adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, los que se detallan en la publicación de Cox y Coulter, 1992, 1997 y 1999. Debe entenderse que el vehículo orgánico sujeto puede ser de origen natural o puede derivarse de forma sintética o recombinante.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona, todavía más preferentemente, un método de fabricar un complejo inmunogénico asociado electrostáticamente que comprende un complejo orgánico cargado negativamente y una proteína cargada positivamente.

Preferentemente, dicho complejo orgánico comprende saponina o un complejo de saponina. Más preferentemente, dicho complejo de saponina es I ISCOMATRIX™.

El complejo orgánico del método de la presente invención también puede estar, en su forma inicial o natural, cargado negativamente, cargado positivamente o ser neutro. El aumento del grado de la carga negativa (por ejemplo, cuando el complejo orgánico está solo débilmente cargado negativamente) o convertir un vehículo orgánico neutro o cargado positivamente en un complejo orgánico con carga negativa también se puede lograr por cualquier método adecuado conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, cuando el vehículo orgánico es una emulsión de aceite en agua, la incorporación de cualquier tensioactivo aniónico con una cola no polar impartirá una carga negativa global a la emulsión debido a la inserción de la cola del agente tensioactivo en la gota de aceite que, de ese modo, deja expuesto al grupo de cabeza cargado negativamente. La carga negativa de un complejo de saponina adyuvante se puede aumentar, por ejemplo, mediante la adición de lípido cargado negativamente durante la formación del complejo.

Los ejemplos de detergentes que pueden aumentar la carga negativa de un vehículo incluyen, pero no se limitan a, ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido taurocólico y ácido taurodesoxicólico. Los ejemplos de lípidos que pueden aumentar la carga negativa de un vehículo incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos (preferentemente fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico, y, lo más preferentemente, cardiolipina) y los lípidos bacterianos (preferentemente monofosforil lípido A (MPL) y, lo más preferentemente difosforil lípido A, tal como OM174, como se describe en la publicación de patente Internacional n.º WO 95/14026).

Sin limitar la presente invención de ninguna manera, los inventores han determinado que cuando el vehículo orgánico cargado objeto y el antígeno cargad están cargados negativamente y positivamente, respectivamente, de forma natural, se puede lograr el objeto de la invención. Sin embargo, se consigue un complejo inmunogénico aún más eficaz si el vehículo orgánico objeto cargado negativamente de forma natural se vuelve cargado más negativamente (preferentemente mediante la adición de cardiolipina o lípido difosforil A) y/o el antígeno cargado positivamente de forma natural se vuelve cargado más positivamente (preferentemente mediante la adición de una cola de polilisina). Preferentemente, el vehículo orgánico cargado negativamente de forma natural se vuelve cargado

más negativamente y el antígeno cargado positivamente de forma natural se vuelve cargado más positivamente.

La referencia a un adyuvante o proteína que está cargado negativa o positivamente, respectivamente, "de forma natural", debe entenderse como una referencia a la carga que lleva la molécula sobre su creación, ya sea por medios naturales, recombinantes o sintéticos. La modificación para aumentar el grado de carga se puede lograr mediante cualquier técnica adecuada como se ha discutido anteriormente en el presente documento. Preferentemente, la proteína sujeto se vuelve más cargada positivamente a través de la adición de una cola de polilisina y el adyuvante sujeto se vuelve más negativo a través de la adición de cardiolipina o lípido difosforil A.

La referencia a "derivado y equivalentes" debe entenderse como una referencia a fragmentos, partes, porciones, equivalentes químicos, mutantes, registros de homo y análogos de fuentes naturales, sintéticas o recombinantes. Cuando el antígeno o vehículo sujeto es una proteína, los derivados se pueden derivar de la inserción, deleción o sustitución de aminoácidos. Los derivados por inserción de aminoácidos incluyen fusiones en el extremo amino y/o carboxilo, así como inserciones intrasecuencia de uno o varios aminoácidos. Las variantes de la secuencia por inserción de aminoácidos son aquellas donde uno o más restos de aminoácidos se introducen en un sitio predeterminado en la proteína, aunque la inserción aleatoria también es posible con el cribado adecuado del producto resultante. Las variantes por deleción se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia. Las variantes por sustitución de aminoácidos son aquellas donde un resto en la secuencia ha sido eliminado y se ha insertado un resto diferente en su lugar. Las adiciones a las secuencias de aminoácidos incluyen fusiones con otros péptidos, polipéptidos o proteínas. Los “equivalentes" pueden actuar como un análogo funcional del vehículo o antígeno sujeto. Equivalentes químicos pueden no necesariamente derivar del vehículo sujeto del antígeno, pero pueden compartir ciertas similitudes conformacionales. Como alternativa, los equivalentes químicos pueden diseñarse para imitar ciertas propiedades fisicoquímicas del vehículo o antígeno sujeto. Los equivalentes se pueden sintetizar químicamente o se pueden detectar siguiendo, por ejemplo, el cribado de productos naturales. Los homólogos contemplan en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, moléculas derivadas de diferentes especies.

La presente invención se basa, en parte, en la formación de complejos inmunogénicos a través de la asociación electrostática, preferentemente, de un complejo orgánico con carga negativa con un antígeno cargado positivamente. La administración de un complejo de este tipo a un sujeto facilita la inducción de una respuesta inmune significativamente mejor que la que se lograría si el complejo orgánico y el antígeno se administraran simultáneamente, pero en una forma no asociada. En particular, la administración de un antígeno asociado con un complejo orgánico, de acuerdo con el método de la presente invención, facilita la inducción de una respuesta de linfocitos T citotóxicos al antígeno. Sin embargo, también se pueden mejorar las respuestas humorales y otras celulares.

Sin limitar el método de la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, se piensa que la formación del complejo del complejo orgánico con el antígeno facilita la liberación conjunta del adyuvante y el antígeno a la misma célula presentadora de antígeno, facilitando de ese modo la inducción de respuestas inmunes que no se producirían o no se producirían de un modo tan eficaz si estas moléculas no se liberaran de forma conjunta. Por ejemplo, se cree que la inducción de algunas respuestas de linfocitos T citotóxicos $CD8^+$ se produce cuando el adyuvante induce escape endosómico del antígeno en la célula presentadora de antígeno. Esto requiere necesariamente la liberación conjunta del antígeno y el adyuvante a la célula presentadora de antígeno.

De acuerdo con lo anterior, otro aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición de vacuna que comprende como componente activo un complejo inmunogénico que comprende un vehículo orgánico cargado negativamente que comprende saponina y un antígeno cargado positivamente y antígeno, donde el vehículo y el antígeno están asociados electrostáticamente, junto con uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Preferentemente, dicho antígeno es una proteína.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles o pueden estar en la forma de una crema u otra forma adecuada para aplicación tópica. Debe ser estable en las condiciones de la fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo orgánico puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede conseguir mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede efectuar mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan soluciones inyectables estériles mediante la incorporación de los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados en lo que antecede, según se requiera, seguido por esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados en lo que antecede. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización, que dan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución del mismo previamente filtrada para esterilizar.

Sin limitar la operación de la presente invención de ninguna manera, la liberación conjunta del complejo inmunogénico del método de la presente invención es particularmente útil para inducir una respuesta inmune y, en particular, una respuesta de linfocitos T citotóxicos a un antígeno, dicha respuesta inmune puede ser una respuesta inmune específica (células T y/o células B) y/o no específica.

De acuerdo con lo anterior, otro aspecto más de la presente divulgación se refiere a un método para provocar, inducir o, de otra manera, facilitar, en un mamífero, una respuesta inmune a un antígeno, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un complejo inmunogénico o una composición de vacuna como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Preferentemente, dicha respuesta inmune es una respuesta de linfocitos T citotóxicos.

Se debe entender que la respuesta de linfocitos citotóxicos sujeto puede producirse de forma aislada o junto con una respuesta de células T colaboradores, una respuesta humoral u otra respuesta inmune específica o no específica.

Un aspecto adicional de la presente divulgación se refiere al uso del complejo inmunogénico en relación con el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de estados de enfermedad. Ejemplos de estados de enfermedad incluyen, pero no se limitan a, cualquier estado de enfermedad que es el resultado de una infección microbiana o un cáncer. Los ejemplos incluyen el VIH, la hepatitis B, la hepatitis C, el melanoma, el cáncer de próstata, el cáncer de mama, la tuberculosis y afecciones parasitarias.

De acuerdo con lo anterior, otro aspecto más de la presente divulgación se refiere a un método para tratar un estado de enfermedad en un mamífero, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un complejo inmunogénico o una composición de vacuna como se ha descrito anteriormente en el presente documento, donde la administración de dicha composición provoca, induce o, de otro modo, facilita una respuesta inmune que inhibe, detiene, retrasa o previene el inicio o la progresión del estado de enfermedad.

Una "cantidad eficaz" significa una cantidad necesaria, al menos parcialmente, para alcanzar la respuesta inmune deseada, o para retrasar el inicio o inhibir la progresión o detener por completo, el inicio o la progresión de una afección particular que se está tratando. Esta cantidad varía en función de la salud y el estado físico del individuo que se va a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo que se va a tratar, la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico encargado del tratamiento de la situación médica y otros factores relevantes. Cabe esperar que la cantidad entre dentro de un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos de rutina.

El término “mamífero”, como se usa en el presente documento, incluye seres humanos, primates, animales granja (por ejemplo, caballos, ganado vacuno, ovejas, cerdos, burros), animales de ensayo en laboratorio (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, cobayas), animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos) y animales salvajes cautivos (por ejemplo, canguros, ciervos, zorros). Preferentemente, el mamífero es un ser humano o un animal de ensayo de laboratorio. Incluso más preferentemente, el mamífero es un ser humano.

El mamífero en tratamiento puede ser un ser humano o un animal en necesidad de tratamiento terapéutico o profiláctico de un estado de enfermedad o de un potencial estado de enfermedad.

En aún otro aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de una composición inmunogénico o composición de vacuna como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en la fabricación de un medicamento para inhibir, detener, retrasar o prevenir el inicio o progresión de un estado de enfermedad.

Otro aspecto más de la presente divulgación se refiere a un agente para su uso para inhibir, detener, retrasar o prevenir el inicio o la progresión de un estado de enfermedad. Comprendiendo dicho agente un complejo inmunogénico o composición de vacuna como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Otras características del método de la presente invención se describen más detalladamente en los siguientes ejemplos no limitantes.

La referencia a "ISCOPREP™ 703" debe entenderse como una referencia a una preparación de saponina que comprende 50-90 % en peso de la fracción A de Quil A y 50 % a 10 % en peso de la fracción C de Quil A. Las

fracciones A y C se preparan a partir de la fracción lipófila de Quil A. las fracciones que "A" y "C", su método de preparación y el método de preparación 703 se detallan en la publicación de patente internacional n.º WO96/11711.

Ejemplo 1

Preparación de Iscomatrix™ estándar y modificado

ISCOMATRIX™ (complejo inmunoestimulador sin antígeno) se preparó esencialmente mediante el método de Morein *et al.* (1989). En pocas palabras, a 1,76 ml de PBS a pH 7,2 se añadieron 0,16 ml de una solución que contiene 10 mg/ml de colesterol tritiado (^{3}H) y 10 mg/ml de lípido en 20 % de detergente MEGA–10 (p/v), después 0,08 ml de una solución que contiene 100 mg/ml de ISCOPREP™ 703 en PBS. La solución se mantuvo a 25 ºC durante 1 hora con mezclado suave. Durante la diálisis posterior contra PBS/azida, se formó ISCOMATRIX™ que contiene colesterol, DPPC e ISCOPREP ™. Todas las formulaciones ISCOMATRIX™ tenían un aspecto típico mediante microscopia electrónica.

Lípidos:

DPPC estándar	Dipalmitoilfosfatidilcolina
CDL modificado	cardiolipina
DPL modificado	Difosforil lípido A
MPL modificado	Monofosforil lípido A
DPA modificado	Ácido fosfatídico
DPPG modificado	Dipalmitoilfosfatidilglicerol

Después de la formulación, las preparaciones se purificaron en un gradiente de sacarosa (de 10 a 50 % p/v) y se analizaron las fracciones con respecto a los lípidos y el colesterol. El colesterol se detectó mediante cpm de ^{3}H de 100 µl de la muestra en 1 ml de líquido de centelleo y los lípidos se detectaron utilizando difenilhexatrieno (DPH), que emite fluorescencia cuando se asocia con lípidos. Brevemente, el DPH se disolvió a 1 mg/ml en acetona, después se diluyó a 1 en 50 en PBS a pH 7,2. Después 50 µl se mezclaron con 50 µl de cada fracción en una placa de microtitulación. Después de la incubación durante 150 minutos a 20-25 ºC, la placa se leyó en un fluorómetro utilizando 355 nm de excitación y 460 nm de emisión. Los picos de DPH y ^{3}H coincidieron para todas las formulaciones y los perfiles de gradiente de las formulaciones modificadas fueron similares a la formulación estándar, lo que indica la incorporación del lípido en el ISCOMATRIX™ (Figura 1).

Ejemplo 2

Preparación de Iscomatrix™ asociado con antígeno con una proteína cargada positivamente de forma natural: proteína de la familia E de *H. pylori* (HpE)

La proteína HpE tiene un pI de 9,24, por lo que es una proteína cargada positivamente a pH 8. Solubilidad de la HpE se mantuvo usando Tris 0,5 M, NaCl 0,5 M, 0,1 % de 1,2-Diheptanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DHPC) a pH 8. Las formulaciones de ISCOMATRIX™ asociada con HpE se prepararon mezclando en una proporción de 1:5 de la proteína e ISCOPREP™ como ISCOMATRIX™ durante 60 minutos a 20-25 ºC. Las formulaciones ISCOMATRIX™ utilizadas fueron DPPC, CDL, DPL y DPPG.

Después de la formulación, las preparaciones se purificaron en un gradiente de sacarosa (10 a 50 % de sacarosa p/v) y las fracciones se analizaron para determinar HpE, la asociación entre HpE e ISCOMATRIX™ e ISCOMATRIX™ (Figura 2). La HpE se detectó mediante adsorción de las fracciones diluidas a 1 en 10 en PBS a los pocillos de una placa de EIA y después mediante la detección con un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) frente a HpE. La asociación se determinó mediante EIA usando un anticuerpo monoclonal frente a HpE para capturar y un anticuerpo monoclonal conjugado con HRP a ISCOPREP ™ para detectar. ISCOMATRIX™ se determinó mediante la detección de colesterol ^{3}H.

La proteína HpE, cuando no está mezclada con ISCOMATRIX™, se encontró en las fracciones 3-10 mediante EIA. (Figura 2E). Cuando se mezclaron con DPPC ISCOMATRIX™, se encontró HpE predominantemente en las fracciones 2-8, pero algo se encontró en las fracciones 12-20 coincidiendo con los picos de ISCOMATRIX™ y de asociación, que indica que se produjo asociación (Figura 2A). Cuando se mezcló con CDL o DPL ISCOMATRIX™, la HpE se encontró predominantemente en las fracciones 7–16 coincidentes con los picos de ISCOMATRIX™ y de asociación, que indica que se había producido una asociación casi completa (Figura 2B y C). Se encontró muy poco, si algo, de HpE libre en las fracciones 2–8. Cuando se mezcló con DPPG ISCOMATRIX™, los resultados fueron muy similares al DPPC ISCOMATRIX™ (Figura 2D).

Estos resultados indican que DPPG y DPPC ISCOMATRIX™ estándar pueden asociarse débilmente con antígenos que están cargados positivamente y la capacidad de asociarse se puede aumentar considerablemente mediante el uso de CDL o DPL ISCOMATRIX™.

Ejemplo 3

Preparación de Iscomatrix™ asociado con antígeno con una proteína cargada positivamente de forma natural: ny–eso–1 (eso)

La proteína ESO tiene un pI de 9,1, por lo que es una proteína cargada positivamente a pH 7. La solubilidad de la ESO se mantuvo utilizando urea 8M, Tris 50 mM, $NaH_2PO_4,2H_2O$ 50 mM, NaCl 0,15 M a pH 7. Las formulaciones de ISCOMATRIX™ asociada con ESO se prepararon mezclando en una proporción de 1:5 de la proteína e ISCOPREP™ como ISCOMATRIX™ durante 60 minutos a 20-25 ºC. Las formulaciones ISCOMATRIX™ utilizadas fueron DPPC y DPL.

Después de la formulación, las preparaciones se purificaron en un gradiente de sacarosa (10 a 50 % de sacarosa p/v) y las fracciones se analizaron para determinar ESO, la asociación entre ESO e ISCOMATRIX™ e ISCOMATRIX™ (Figura 3). La ESO se detectó mediante adsorción de las fracciones diluidas a 1 en 10 en PBS a los pocillos de una placa de EIA y después mediante la detección con un anticuerpo monoclonal conjugado con HRP frente a ESO. La asociación se determinó mediante EIA usando un anticuerpo monoclonal frente a ESO para capturar y un anticuerpo monoclonal conjugado con HRP a ISCOPREP ™ para detectar. ISCOMATRIX™ se determinó mediante la detección de colesterol ^3H.

La proteína ESO, cuando no está mezclada con ISCOMATRIX™, se encontró en las fracciones 1-6 mediante EIA. (Figura 3C). Cuando se mezcló con DPPC ISCOMATRIX™ estándar, la ESO se encontró en las fracciones 1–6 y 12–16 (Figura 3A). La presencia en las fracciones 12-16 coincidió con los picos del SCOMATRIX ™ y de asociación, que indica que había asociación pero una gran proporción de la ESO no estaba asociada como se indica por la presencia en las fracciones 1-6. Cuando se mezcla con DPL ISCOMATRIX™, la ESO se encontró predominantemente en las fracciones 12 a 16 coincidiendo con los picos de ISCOMATRIX ™ y de asociación que indica que se había producido asociación (Figura 3B).

Estos resultados muestran que había alguna asociación de una proteína cargada positivamente con el DPPC ISCOMATRIX™ estándar, pero la capacidad de asociarse se incrementó sustancialmente mediante el uso de DPL ISCOMATRIX™.

Ejemplo 4

Inmunización de ratones con Iscomatrix™ estándar asociada con ESO

Respuestas de anticuerpos:

Los días 0 y 28, se inmunizó a diez ratones BALB/c por vía subcutánea en la base del cuello con 0,1 ml de ESO que contiene 5 μg de ISCOMATRIX™ asociada con proteína o ESO que contiene 5 μg de proteína y 5 μg de ISCOPREP™. Se extrajo sangre de los ratones el día 35 y los sueros se analizaron para detectar anticuerpos frente a ESO mediante EIA indirecto. Brevemente, la ESO se adsorbió en una placa de microtitulación en PBS a pH 7,2 y, después, la placa se bloqueó con una solución de caseína al 0,1 % y se secó. Las diluciones de los sueros se incubaron durante 1 hora a 20-25 ºC y luego se lavaron las placas. Se añadió IgG, IgG, o IgG_{2a} de cabra anti-ratón conjugada con HRP y las placas se incubaron durante 1 hora a 20-25 ºC, después se lavaron. Se añadió sustrato TMB y se incubó durante 10 minutos a 20-25 ºC, seguido de la adición de H_2SO_4 0,5 M para detener la reacción. Las placas se leyeron a DO450nm y se calcularon los títulos finales.

Se produjo un aumento mayor de 20 veces de las respuestas de IgG e IgG_1 a ESO cuando se asocia con ISCOMATRIX™ y un aumento de mil veces en el título de IgG_{2a} (Figura 4).

Respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL):

Se inmunizó a cinco ratones HHD transgénicos HLA A2 por vía subcutánea en la base de la cola con 0,1 ml de ESO que contiene 5 μg de ISCOMATRIX™ asociada con proteína o ESO que contiene 5 μg de proteína y 5 μg de ISCOPREP™. Después de 14 días se recogieron los esplenocitos y 5 X 10^6 células se volvieron a estimular en placas de 24 pocillos con células EL4HHD sensibilizadas con el péptido ESO (10 μg/ml durante 1 hora a 37 ºC), se irradiaron y se lavaron dos veces. Las células se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10 % de suero bovino fetal, glutamina 2 mM, β-mercaptoetanol 5 X 10^{-5} M, 100 μg/ml de estreptomicina y 100 UI/ml de penicilina, y se incubaron a 37º C durante 6 días en 5% de CO_2. El día 4 se añadió 1 ml de medio que contiene 5 U/ml de IL-2 humana recombinante. El día 6 se utilizaron los cultivos como efectores en los ensayos de liberación de ^{51}Cr de 6 horas contra células EL4HHD sensibilizadas como para la reestimulación.

No se detectaron CTL en ratones inmunizados con ESO sola, pero cuando se asoció con ISCOMATRIX™, se detectaron CTL en todos los ratones (Figura 5).

Estos resultados indican que se requiere la asociación para la inducción óptima de las respuestas inmunes celulares.

Ejemplos

Preparación de Iscomatrix™ asociado con antígeno con una proteína cargada negativamente de forma natural: E6E7 de HPV (E6E7)

La proteína E6E7 tiene un pI de 5,9, lo que la convierte en una proteína cargada negativamente a pH 6,9. La solubilidad de la E6E7 se mantuvo utilizando urea 8 M, Tris 50 mM, $NaH_2PO_4,2H_2O$ 50 mM, NaCl 150 mM a pH 6,9. Las formulaciones de ISCOMATRIX™ asociada con E6E7 se prepararon mezclando en una proporción de 1:5 de la proteína e ISCOPREP™ como ISCOMATRIX™ durante 60 minutos a 20-25 ºC. Las formulaciones de ISCOMATRIX™ utilizados fueron DPPC, CDL, DPL, MPL, DPA y DPPG.

Después de la formulación, las preparaciones se purificaron en un gradiente de sacarosa (10 a 50 % de sacarosa p/v) y las fracciones se analizaron para determinar E6E7, la asociación entre E6E7 e ISCOMATRIX™ e ISCOMATRIX™ (Figura 8). E6E7 se detectó mediante EIA usando dos anticuerpos monoclonales no competitivos frente a E7. La asociación se determinó mediante EIA usando un anticuerpo monoclonal frente a E7 para capturar y un anticuerpo monoclonal conjugado con HRP a ISCOPREP™ 703 para detectar. ISCOMATRIX™ se determinó mediante la detección de colesterol ^3H.

La proteína E6E7 sola se encontró en las fracciones 10-22 mediante EIA (Figura 6G). Cuando se mezcló con DPPC ISCOMATRIX™ estándar, la mayor parte de la E6E7 hallada estaba en las fracciones 14–20 detectándose poca asociación (Figura 6A). Cuando se mezcló con CDL, DPL y DPA ISCOMATRIX™, la E6E7 se encontró predominantemente en las fracciones que coincidieron con la asociación y los picos de ISCOMATRIX™, que indicó que se había producido una asociación casi completa (Figura 6B, C, E). Cuando se mezcló con MPL y DPPG ISCOMATRIX™, la proteína se encontró en las fracciones 9–14 coincidente con los picos de asociación y de ISCOMATRIX™, lo que indica asociación pero se encontró una cantidad significativa no asociada en las fracciones 17–22 (Figura 6D, F).

Estos resultados indican que una proteína cargada negativamente se une mal a la DPPC ISCOMATRIX™ estándar y la capacidad para asociarse aumenta mediante el uso de CDL, DPL, MPL, DPA o DPPG en diversos grados.

Ejemplo 6

Inmunización de ratones con Iscomatrix™ estándar asociada E6E7 y modificada

El día 0 y el día 21 se inmunizó a tres ratones C57BL/6 por vía subcutánea con 0,1 ml de ISCOMATRIX™ asociada con E6E7 que contiene 10 μg de proteína y 6 μg de ISCOPREP™. Después de 7 días se recogieron los esplenocitos y se volvieron a estimular 20 X 10^6 células en 8 ml en un matraz de cultivo tisular T25 con células EL4 transfectadas con E7 tratadas con mitomicina (C2) tratada y se lavaron tres veces. Las células se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10 % de suero bovino fetal, glutamina 2 mM, β-mercaptoetanol 5,5 X 10^{-5}M, 50 μg/ml de gentamicina y se incubaron a 37 ºC durante 5 días en 5 % de CO_2. El día 6 se utilizaron los cultivos como efectores en ensayos estándar de liberación de ^{5l}Cr de 4 horas contra las células C2.

La DPL ISCOMATRIX ™ asociada con E6E7 indujo una respuesta CTL en 2 de 3 ratones (Figura 7A). La E6E7 asociada con DPPC ISCOMATRIX™ estándar no indujo una respuesta CTL en ningún ratón (Figura 7B). El ratón negativa en el grupo DPL ISCOMATRIX™ tenía células insuficientes para la lectura óptima y no cumpliría los criterios para una respuesta válida. Todos los demás ratones cumplieron los criterios de respuestas válidas.

Estos resultados muestran que cuanto mayor es la asociación mejor será la respuesta CTL.

Ejemplo 7

Preparación de Iscomatrix™ asociado con antígeno con una proteína cargada negativamente de forma natural: proteína C de la familia de *H. pylori* (HpC)

La proteína HpC tiene un pI de 5,05, lo que la convierte en cargada negativamente al pH 7,2. La proteína era soluble en PBS a pH 7,2. Las formulaciones de ISCOMATRIX™ asociada con HpC se prepararon mezclando en una proporción de 1:5 de la proteína e ISCOPREP™ como ISCOMATRIX™ durante 60 minutos a 20-25 ºC. Las formulaciones ISCOMATRIX™ utilizadas fueron DPPC y DPL.

Después de la formulación, las preparaciones se purificaron en un gradiente de sacarosa (10 a 50 % de sacarosa p/v) y las fracciones se analizaron para determinar HpC, la asociación entre HpC e ISCOMATRIX™ e ISCOMATRIX™ (Figura 8). La HpC se detectó mediante adsorción de las fracciones diluidas a 1 en 10 en PBS a los pocillos de una placa de EIA y después mediante la detección con un anticuerpo monoclonal conjugado con HRP

frente a HpC. La asociación se determinó mediante EIA usando un anticuerpo monoclonal frente a HpC para capturar y un anticuerpo monoclonal conjugado con HRP a ISCOPREP ™ para detectar.

ISCOMATRIX™ se determinó mediante detección de ^{3}H-colesterol o DPH como se describe en el ejemplo 1.

La HpC sola se encontró en las fracciones 1-5 y cuando se mezcló con DPPC ISCOMATRIX™ El HPC estándar, la HpC se encontró predominantemente en las fracciones 1-5 y no asociada. Cuando se mezcló con DPL ISCOMATRIX™, una proporción significativa de la HpC se encontró en las fracciones 11-17 coincidiendo con los picos de ISCOMATRIX ™ y de asociación que indican asociación.

Estos resultados indican que una proteína cargada negativamente se une mal a DPPC ISCOMATRIX™ estándar y la capacidad para asociarse aumenta mediante el uso de DPL ISCOMATRIX™.

Ejemplo 8

Preparación de Iscomatrix™ asociada con antígeno con una proteína cargada positivamente de forma natural usando el pH para dar una carga positiva: E6E7.

La proteína E6E7 tiene un pI de 5,9, que la convierte en una proteína cargada negativamente a pH 7,2. Contiene una secuencia de seis histidinas en el extremo N, que estará cargada positivamente a pH 6. La solubilidad de la E6E7 se mantuvo utilizando urea 8M, Bis Tris 50 mM, NaCl 0,15 M a pH 6. La formulación de ISCOMATRIX™ asociada con E6E7 se preparó mezclando igual masa de E6E7 con ISCOPREP™ como ISCOMATRIX™ durante 60 minutos a 20-25 ºC, dializando contra Bis Tris 50 mM, NaCl 0,15 M a pH 6 para eliminar la urea, después centrifugación a 10.000 g durante 5 minutos para eliminar cualquier precipitado.

Después de la formulación, las preparaciones se purificaron en un gradiente de sacarosa (50 a 10 % de sacarosa p/v) y las fracciones se analizaron para determinar la proteína, la asociación entre E6E7 e ISCOMATRIX™ e ISCOMATRIX™ (Figura 9). La proteína se detectó mediante un EIA de tipo sándwich para E7. La asociación se determinó mediante EIA usando un anticuerpo monoclonal frente a E7 para capturar y un anticuerpo monoclonal conjugado con HRP a ISCOPREP ™ para detectar. ISCOMATRIX™ se determinó mediante detección de ^{3}H-colesterol o DPH como se describe en el ejemplo 1.

La E6E7 se encontró en las fracciones 10-22 cuando se ejecutó sola (Figura 9C). Cuando se mezcló con DPPC ISCOMATRIX™ a pH 7,2, la E6E7 se encontró predominantemente en las fracciones 16-22 con pocos indicios de asociación (Figura 9B). Cuando se mezcló con la DPPC ISCOMATRIX™ estándar a pH 6, la E6E7 se encontró predominantemente en las fracciones 12-16 coincidiendo con los picos de ISCOMATRIX™ y de asociación, que indica asociación (Figura 9A).

Estos resultados muestran que el pH se puede utilizar para aumentar la capacidad de DPPC ISCOMATRIX™ estándar para asociarse con proteínas cargadas negativamente de forma natural.

Ejemplo 9

Inmunización de ratones con DPPC Iscomatrix™ asociada con E6E7 modificada por pH

Los días 0 y 21 se inmunizó a seis ratones C57BL/6 por vía subcutánea en la base del cuello con 0,1 ml de ISCOMATRIX™ asociada con E6E7 que contiene 6 μg de ISCOPREP™ y 6 μg de E6E7.

Respuestas de anticuerpos:

Se extrajo sangre de los ratones el día 26 y los sueros se analizaron para detectar anticuerpos frente a E7 mediante EIA indirecto. La GSTE7 purificada se adsorbió en una placa de microtitulación en carbonato 0,1M a pH 9,6 y, después, la placa se bloqueó con una solución de caseína al 0,1 % y se secó. Las diluciones de los sueros se incubaron durante 1 hora a 20-25 ºC y luego se lavaron las placas. Se añadió IgG de cabra anti-ratón conjugada con HRP y las placas se incubaron durante 1 hora a 20-25 ºC, después se lavaron. Se añadió sustrato TMB y se incubó durante 10 minutos a 20-25 ºC, seguido de la adición de H_2SO_4 0,5 M para detener la reacción. Las placas se leyeron a DO450nm y se calcularon los títulos finales.

El grupo de ISCOMATRIX™ asociada con E6E7 tenía un GMT de 949. Normalmente, la E6E7 con $Al(OH)_3$ da un GMT de aproximadamente 100.

Respuestas de citocinas:

El día 27 se recogieron los esplenocitos de cada uno de 3 ratones y se combinaron y se volvieron a estimular 2,5 X 10^6 células en placas de 48 pocillos con GSTE7 en 1 y 5 μg con ConA y RPMI como controles. Las células se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10 % de suero bovino fetal, glutamina 2 mM, β-mercaptoetanol 5 X 10^{-5}

M, 100 μg/ml de estreptomicina y 100 UI/ml de penicilina, y se incubaron a 37 ºC durante 2 días en 5% de CO_2. El sobrenadante se recogió y el γIFN y la IL5 se detectó mediante EIA utilizando reactivos de Endogen.

La ISCOMATRIX™ asociada con E6E7 indujo hasta 7,4 ng/ml de γIFN y 140 pg/ml de IL5 (Tabla 2). Típicamente, la E6E7 con Al $(OH)_3$ no induce γIFN detectable (<30 pg/ml) ni IL5 (<4 pg/ml).

Estos resultados muestran que la ISCOMATRIX™ asociada con E6E7 modificada por pH eran inmunogénicos en ratones e indujeron una respuesta de tipo Th1.

Ejemplo 10

Preparación de Iscomatrix™ quelante (CHL)

La CHL ISCOMATRIX™ se preparó mediante el método de Macfarlan y Malliaros, (1998) publicación de patente internacional n.º WO 98/36772). En pocas palabras, a 1,6 ml de Tris 50 mM, NaCl 150 mM, $CuCl_2$ 0,6 mM a pH 7,2 (Tampón A) se añadieron 0,2 ml de una solución que contiene 10 mg/ml de colesterol, 9 mg/ml de DPPC, 1,074 mg/ml de dipalmitoil-rac-glicerol-3 (8-(3,6-dioxi)octil-1-amino-N,N-diacético) (DPIDA) en 20 % de detergente MEGA-10 (p/v), después 0,2 ml de una solución que contiene 50 mg/ml de ISCOPREP™ 703 en tampón A. La solución se mantuvo a 25 ºC durante 90 minutos con mezclado suave. Después la diálisis se realizó primero contra el tampón A durante la noche, con 2 cambios de tampón, después contra Tris 50 mM, $NaH_2PO_4,2H_2O$ 50 mM, NaCl 150 mM a pH 6,9 durante 2 días con dos cambios de tampón. Durante la diálisis, la CHL ISCOMATRIX™ que contiene colesterol se formó DPPC, DPIDA y ISCOPREP™. La formulación CHL ISCOMATRIX™ tenía un aspecto típico mediante microscopia electrónica.

Ejemplo 11

Generación, expresión y purificación de hexahistidina (6H) ± heralisina (6K) HpC.

La proteína HpC tiene un pI de 5,05, lo que la convierte en cargada negativamente a pH 7,2. La adición de 6K cambiaría el pI de 7,68 y le daría una cola con carga positiva. Se construyeron dos clones para dar HpC más 6H, para la purificación, y con y sin 6K. Se usó ADN de CSL 694 (HpC13 con 6H en C-terminal en el vector pGexStop como se describe en Edwards *et al.* 1998) como molde para la amplificación por PCR para generar un 6K en C–terminal. El producto de la PCR se clonó en los sitios de EcoRI–BglII del vector de expresión pGexStopIV, creando un 6K en C-terminal en tándem, seguido por marcadores de 6H. Esto se generó en la cepa de E.*coli* ER1793 y se designó CSL 1424.

Se indujeron cultivos de 1 litro a A_{600}=2 con IPTG 0,5 mM y se recogieron 5 horas después de la inducción. La proteína recombinante soluble se purificó utilizando el marcador de 6H en C-terminal para la cromatografía de afinidad con metal (níquel). La proteína eluida se dializó frente a PBS.

Ejemplo 12

Preparación de Iscomatrix™ asociada con antígeno con marcadores 6H y 6K: HpC.

La proteína HpC con 6H tiene un pI de 5,85, lo que la convierte en cargada negativamente a pH 7,2. La adición de un 6K a esta proteína da un pI de 7,68, lo que la convierte en cargada positivamente a pH 7,2. Ambas formas de la proteína eran solubles en PBS a pH 7,2. Las formulaciones de ISCOMATRIX™ asociada con HpC se prepararon mezclando en una proporción de 1:5 de la proteína e ISCOPREP™ como ISCOMATRIX™ durante 60 minutos a 20-25 ºC. Las formulaciones de ISCOMATRIX™ usadas fueron DPPC y CHL. La tecnología de CHL ISCOMATRIX™ se utilizó como método estándar para la asociación de proteínas 6H con ISCOMATRIX™.

Después de la formulación, las preparaciones se purificaron en un gradiente de sacarosa (10 a 50 % de sacarosa p/v) y las fracciones se analizaron para determinar HpC, la asociación entre HpC e ISCOMATRIX™ e ISCOMATRIX™ (Figura 10). La HpC se detectó mediante adsorción de las fracciones diluidas a 1 en 10 en PBS a los pocillos de una placa de EIA y después mediante la detección con un anticuerpo monoclonal conjugado con HRP frente a HpC. La asociación se determinó mediante EIA usando un anticuerpo monoclonal frente a HpC para capturar y un anticuerpo monoclonal conjugado con HRP a ISCOPREP ™ para detectar. ISCOMATRIX™ se determinó mediante detección de DPH como se describe en el ejemplo 1.

Cuando se mezcló con DPPC ISCOMATRIX™ estándar, la H–HpC se encontró en las fracciones 1-6 con pocos indicios de asociación (Figura 10C). Cuando se mezcló 6K6H–HpC con DPPC ISCOMATRIX™ una cantidad significativa de HpC estaba en las fracciones 7-11 coincidiendo con los picos de asociación y de ISCOMATRIX™ que indican asociación (Figura 10A). Cuando se mezcló 6H–HpC con CHL ISCOMATRIX™, la mayoría de la HpC estaba en las fracciones 7-14 coincidiendo con los picos de asociación y de ISCOMATRIX™ que indican asociación (Figura 10B).

Estos resultados muestran que la adición de un 6K a una proteína cargada negativamente aumentó su capacidad para asociarse la DPPC ISCOMATRIX™ estándar y la asociación lograda fue comparable a la que se obtuvo mediante el uso de 6H con CHL ISCOMATRIX ™.

Ejemplo 13

Preparación de politopo sintético Iscom™ e Iscomatrix™ asociado con ácido palmítico (PAL), 6H, 6K y sin marcadores de formulación.

Los politopos se sintetizaron y se purificaron mediante Chiron Technologies on Multipin (TM) crowns, como se describe en Valerio *et al.,* utilizando el esquema de protección de alfa-amino con Fmoc para los aminoácidos. Después de la desprotección de la cadena lateral y la escisión en una solución de ácido trifluoroacético/secuestrante, los péptidos se precipitaron con éter y se secaron. El péptido redisuelto se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa usando elución con un gradiente de acetonitrilo. Las fracciones que contienen material de la masa molecular correcta, como se determina mediante espectrometría de masas por pulverización iónica se combinaron y se secaron.

El politopo era la siguiente:

Marcador–YPHFMPTNLRPQASGVYMTYQRTRALVSYIPSAEKI–OH (<400>3) que contiene cuatro epítopos restringidos de BALB/c conocidos, YPHFMPTNL (<400>4), RPQASGVYM (<400> 5), TYQRTRALV (< 400 > 6) y SYIPSAEKI (< 400 > 7). Los marcadores usados fueron PAL, 6H, 6K o H (sin marcador).

Para el politopo PAL, la asociación se logró mediante la incorporación en ISCOM™ (complejo inmunoestimulante) de acuerdo con el método de Morein *et al.* (1989). En pocas palabras, a 4 mg de politopo solubilizado en 1,76 ml de 10 % de detergente MEGA-10 (p/v), 50 % de acetonitrilo en PBS se añadieron 0,16 ml de una solución que contiene 10 mg/ml de colesterol y 10 mg/ml de DPPC en 20 % de detergente MEGA-10 (p/v) después 0,08 ml de una solución que contiene 100 mg/ml de ISCOPREP ™ 703 en PBS. La solución se mantuvo a 25 ºC durante 1 hora con mezclado suave. Durante la diálisis posterior contra PBS/azida, se formaron ISCOM™ que contienen politopo palmitificado, colesterol, DPPC e ISCOPREP ™. Estos ISCOM™ tenían el aspecto típico mediante microscopia electrónica.

El politopo 6H se solubilizó en urea 8M y después se mezcló con CHL ISCOMATRIX™ y los politopos 6K y sin marcador se solubilizaron en PBS, después se mezcla con DPPC ISCOMATRIX™ estándar. Todas las formulaciones se prepararon en una proporción de 1:8 de proteína e ISCOPREP ™ como ISCOMATRIX™ y se incubaron durante 60 minutos a 20-25 ºC.

Las preparaciones se purificaron en un gradiente de sacarosa (de 10 a 50 % de sacarosa p/v) y se analizaron las fracciones con respecto a la proteína e ISCOMATRIX™. La proteína se detectó utilizando CBQCA (<400> 8) de Molecular Probes de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes o mediante Coomassie de acuerdo con el método de Bradford (1976). En pocas palabras, 100 µl de cada fracción se añadieron a una microplaca, seguido de la adición de 100 µl de reactivo de Coomassie, después la placa se leyó a 595 nm. ISCOMATRIX™ se detectó mediante DPH como se describe en el ejemplo 1.

El politopo solo se encontró en las fracciones 1-5 (Figura 11E). La proteína, detectada mediante CBQCA (<400> 8), en el politopo PAL ISCOM™ se encontró predominantemente en las fracciones 11-13 coincidiendo con el pico de ISCOMATRIX™ que indica incorporación (Figura 11A). La proteína, detectada mediante Coomassie, en la ISCOMATRIX™ asociada con el politopo 6K se encontró predominantemente en las fracciones 1-5 y probablemente no se asociado con ISCOMATRIX™ (Figura 11C). Una proporción significativa del politopo se encontró en las fracciones 12-14, coincidiendo con el pico de ISCOMATRIX™ que indica asociación. La proteína, detectada mediante Coomassie, en el CHL ISCOMATRIX™ asociado con el politopo 6H se encontró predominantemente en las fracciones 4-10 coincidiendo con el pico de ISCOMATRIX™ que indica incorporación (Figura 11B). Se encontró una proporción significativa de politopo 6H en las fracciones 1-3, que probablemente no estaba asociado. La proteína, detectada mediante Coomassie, en la ISCOMATRIX™ asociada con marcador se encontró casi toda en las fracciones 1-5 y probablemente no asociada con ISCOMATRIX™.

Estos resultados muestran que se requirió un marcador para la asociación del politopo abalizado con ISCOMATRIX™ y que la asociación del politopo 6K con DPPC ISCOMATRIX™ estándar era comparable a la incorporación de politopo PAL hidrófobo en ISCOM™, pero no tan buena como la asociación del politopo 6H con CHL ISCOMATRIX™.

Ejemplo 14

Inmunización de ratones con formulaciones de Iscom™ politopo sintético e Iscomatrix™ asociada

Se inmunizó a tres ratones BALB/c por vía subcutánea en la base de la cola con 0,1 ml del politopo ISCOM™ o ISCOMATRIX™ asociada que contiene 6 μg de ISCOPREP™ y entre 3,5 μg y 5 μg de proteína.

Los ensayos de CTL se realizaron de acuerdo con el método de Elliott *et al*. (1999). Brevemente, los esplenocitos de cada bazo se retiraron el día 14 y se cultivaron en 1 ml de medio a 5 X1 0^6 células/ml, en una placa de 24 pocillos, junto con 1 μg/ml de los péptidos individuales (4 péptidos/bazo) en un incubador humidificado a 37 ºC. El día 3, se añadió 1 ml de medio fresco y después adicionalmente se realizó reestimulación in vitro el día 7 mediante la adición de células P815 irradiadas (800 rad) sensibilizadas con péptido (10 μg/ml, 1 h a 37 1C, 2 lavados) en una relación entre el respondedor y el estimulador de 20: 1 a 2 X 10^6 efectores/pocillo. El procedimiento se repitió dos veces más a intervalos de 7 días y se utilizaron cultivos a granel como efectores 6 días después en un ensayo estándar de liberación de cromo de 6 horas. El medio contenía RPMI 1640 suplementado con 10 % de FCS (QIMR), 2-mercaptoetanol 5 X 10^{-5} M, glutamina 2 mM y los antibióticos penicilina/estreptomicina. Las células diana eran células P815 sensibilizadas con el péptido marcado con ^{51}Cr y no sensibilizadas (control). La relación de efector: diana fue 50, 10 y 2 a 1. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo redondo por duplicado.

El ISCOM ™ con politopo PAL indujo respuestas CTL contra los 4 epítopos con 3/3 ratones para TYQ, 1/3 para SYI, 2/3 para YPH y 2/3 para RPQ (Figura 12A). La CHL ISCOMATRIX™ asociada con politopo 6H indujo respuestas CTL contra 3/3 ratones para los 4 epítopos (Figura 12B). La DPPC ISCOMATRIX™ asociada con el politopo 6K indujo respuestas CTL contra los 4 epítopos con 3/3 para TYQ, YPH y RPQ y 2/3 `para SYI (Figura 12C). lA DPPC ISCOMATRIX™ asociada con politopo sin marcador indujo una respuesta CTL débil en 2/3 ratones para RPQ pero no se detectó respuesta CTL a ninguno de los otros epítopos (Figura 12D). Se sabe que la secuencia SYI es un epítopo débil y este fue el caso para todas las formulaciones.

Estos resultados muestran que se requería la asociación del politopo con ISCOM™ o ISCOMATRIX™ para la inducción óptima de CTL y que la asociación utilizando 6K era tan eficaz como 6H con CHL ISCOMATRIX™ o la incorporación clásica de proteínas hidrófobas (ISCOM™ con politopo PAL).

Ejemplo 15

Generación, expresión y purificación de politopo 6H ± 6K recombinante (r)

Se usó ADN de Pstmpdv (suministrado mediante QIMR) como molde para la amplificación por PCR del politopo murino, YPHFMPTNLTSSGPSNTPPEIFAPGNYPALSYIPSAEKIEEGAIVGEI RPQASGVYM (<400 > 9), para permitir la generación con y sin 6K en C-terminal (CSL 1430 y 1426 respectivamente). Los productos de PCR se clonaron en los sitios BamHI-XhoI del vector de expresión pET24b (Novagen), generando un marcador de T7 en N-terminal (para identificación) y 6K en tándem en C-terminal, seguido de 6H (para la purificación).

Los clones se generan en la cepa de *E. coli* ER1793 después se transformaron en la cepa de expresión BL21 (DE3). Se indujeron cultivos de 1 litro a A_{600}=2 con IPTG 0,5 mM y se recogieron 4 horas después de la inducción. La proteína recombinante soluble se purificó utilizando el marcador de 6H en C-terminal para la cromatografía de afinidad con metal (níquel). La proteína eluida se dializó frente a PBS.

Ejemplo 16

Preparación de Iscomatrix™ asociada con 6H y 6K politopo$_r$.

El politopo murino con 6H tiene un pI de 5,85, lo que la convierte en cargada negativamente a pH 7,2. La adición de un 6K a esta proteína da un pI de 7,68, lo que la convierte en cargada positivamente a pH 7,2. Ambas formas de la proteína eran solubles en PBS a pH 7,2. Las formulaciones de ISCOMATRIX™ asociada con politopo se prepararon mezclando en una proporción de 1:5 de la proteína e ISCOPREP™ como ISCOMATRIX™ durante 60 minutos a 20-25 ºC. Las formulaciones de ISCOMATRIX™ usadas fueron DPPC, CDL, DPL y CHL. Se investigó la formulación a pH 4,3 por debajo del pI del ácido glutámico (E), ya que había un número de E en la secuencia, que podría interferir potencialmente con la asociación.

Después de la formulación, las preparaciones se purificaron en un gradiente de sacarosa (de 10 a 50 % de sacarosa p/v) y se analizaron las fracciones con respecto a la proteína e ISCOMATRIX™ (Figura 13). La HpC se detectó mediante adsorción de las fracciones diluidas a 1 en 10 en PBS a los pocillos de una placa de EIA y después mediante la detección con un anticuerpo monoclonal conjugado con HRP frente a 6H. ISCOMATRIX™ se determinó mediante detección de ^{3}H-colesterol o DPH como se describe en el ejemplo 1.

La proteína en el politopo r6H6K sola se encontró en las fracciones 1–6 (Figura 13K). La proteína en el politopo r6K6H mezclada con DPPC ISCOMATRIX™ estándar a pH 7 se encontró predominantemente en las fracciones 1-9 con pocos indicios de asociación (Figura 13 A). La proteína en el politopo r6K6H mezclado con CDL y DPL ISCOMATRIX™ a pH 7 se encontró predominantemente en las fracciones que coinciden con ISCOMATRIX™ que indica asociación (Figura 13 C, E). Se encontró una proporción significativa de proteína en las fracciones 1-3 y 1-6, para CDL y DPL respectivamente, y probablemente no asociada. La proteína en el politopo r6K6H mezclada con

DPPC ISCOMATRIX™ estándar a pH 4,3 se encontró predominantemente en las fracciones 1-9 con algunos indicios de asociación en el pico de ISCOMATRIX™ coincidente en las fracciones 10–12 (Figura 13 B). La proteína en el politopo r6K6H mezclado con CDL y DPL ISCOMATRIX™ a pH 4,3 se encontró CASI TODA en las fracciones que coinciden con ISCOMATRIX™ que indica una asociación casi completa (Figura 13 D, F). El politopo r6K6H mezclado con DPPC ISCOMATRIX™ se encontró predominantemente en las fracciones 1-7 con pocos indicios de de asociación. El politopo r6K6H mezclado con CHL ISCOMATRIX™ mostró patrones de asociación similares para DPPC y CDL ISCOMATRIX™ estándar tanto a pH 7 como a pH 4,3. La proteína se encontró en cantidades aproximadamente iguales en las fracciones 1–4 no asociada y 5–10 coincidente con el pico de ISCOMATRIX™ que indica asociación (Figura 13 H, I, J).

Estos resultados muestran que el politopo$_r$ utilizado aquí no se asociaría con la ISCOMATRIX™ estándar, incluso con la adición de 6K. La asociación podría lograrse usando ISCOMATRIX™ modificado y la capacidad para asociarse con estas formulaciones se incrementó mediante la utilización de un pH bajo. La combinación de ISCOMATRIX™ modificad y pH bajo dio como resultado una asociación tan buena, o mejor, como la de CHL ISCOMATRIX™ 6H, que no se incrementó por el uso de ISCOMATRIX™ modificado o pH bajo.

Ejemplo 17

Inmunización de ratones con formulaciones de Iscomatrix™ asociado con politopo$_r$

Se inmunizó a tres ratones BALB/c por vía subcutánea en la base de la cola con 0,1 ml DE ISCOMATRIX™ asociado que contiene 6 μg de ISCOPREP™ 703 y entre 3,5 μg y 5 μg de proteína.

Los ensayos de CTL se realizaron de acuerdo con el método de Elliott *et al.* (1999). Brevemente, los esplenocitos de cada bazo se retiraron el día 14 y se cultivaron en 1 ml de medio a 5 X1 0^6 células/ml, en una placa de 24 pocillos, junto con 1 μg/ml de los péptidos individuales (4 péptidos/bazo) en un incubador humidificado a 37 ºC. El día 3, se añadió 1 ml de medio fresco y después adicionalmente se realizó reestimulación in vitro el día 7 mediante la adición de células P815 irradiadas (800 rad) sensibilizadas con péptido (10 μg/ml, 1 h a 37 1C, 2 lavados) en una relación entre el respondedor y el estimulador de 20: 1 a 2 X 10^6 efectores/pocillo. El procedimiento se repitió dos veces más a intervalos de 7 días y se utilizaron cultivos a granel como efectores 6 días después en un ensayo estándar de liberación de cromo de 6 horas. El medio contenía RPMI 1640 suplementado con 10 % de FCS (QIMR), 2-mercaptoetanol 5 X 10^{-5} M, glutamina 2 mM y los antibióticos penicilina/estreptomicina. Las células diana eran células P815 sensibilizadas con el péptido marcado con ^{51}Cr y no sensibilizadas (control). La relación de efector: diana fue 50, 10 y 2 a 1. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo redondo por duplicado.

El CDL ISCOMATRIX™ asociado con el politopo r6K6H a pH 4,3 indujo respuestas de CTL en 3/3 ratones para los epítopos SYI, YPH y RPQ y en 1/3 para el epítopo TYQ (Figura 14A). El CHL ISCOMATRIX™ asociado con r6H indujo respuestas de CTL en 3/3 ratones para los epítopos SYI, YPH y RPQ y en 2/3 para el epítopo TYQ (Figura 14B). Ambas formulaciones indujeron respuestas muy bajas al epítopo TYQ.

Estos resultados muestran que las respuestas de CTL pueden inducirse usando CDL ISCOMATRIX™ asociado con el politopo r6K6H a pH 4,3 y son comparables a las respuestas con CHL ISCOMATRIX™ asociado con r6H a pH 7.

Ejemplo 18

Preparación liposomas de DPPC y DPL con proteína cargada negativamente de forma natural: E6E7

Los liposomas se prepararon de acuerdo con el método de Talsma y Crommelin (1992). Brevemente, el ^{3}H colesterol se disolvió en metanol, cloroformo y, después, se añadieron lípidos y se dejó que se formaran los liposomas mediante evaporación del disolvente en un matraz rotatorio con agitación suave. Los lípidos utilizados fueron DPPC estándar y el DPL cargado negativamente. Después se añadió E6E7 a los liposomas y la mezcla se sometió a ultrasonidos y después se extruyó a través de una aguja 26G. Los liposomas tenían el aspecto típico mediante microscopia electrónica.

Después de la formulación, las preparaciones se purificaron en un gradiente de sacarosa (de 10 a 50 % de sacarosa p/v) y se analizaron las fracciones con respecto a la proteína e ISCOMATRIX™ (Figura 15). La proteína se detectó mediante un EIA de tipo sándwich usando anticuerpos monoclonales. ISCOMATRIX™ se determinó mediante la detección de colesterol ^{3}H.

La E6E7 en los liposomas de DPPC se encontró predominantemente en las fracciones 1-3 pero había muy poco en el gradiente que indicaba que la proteína había precipitado (Figura 15A). La proteína que estaba presente probablemente no estaba asociada con el liposoma que se encontró en las fracciones 2-4. La E6E7 en el liposoma DPL se encontró a lo largo del gradiente coincidiendo con el liposoma, que también se encontró a lo largo del gradiente (Figura 15B). La difusión de la formulación a lo largo del gradiente era, probablemente, indicativa de una gama de tamaños de los liposomas pero casi la totalidad de la proteína parece estar asociada con los liposomas.

Estos resultados muestran que los lípidos cargados negativamente se pueden utilizar en los liposomas para permitir la asociación con una proteína cargada negativamente que no se asociaría con liposomas estándar.

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Debe entenderse que la invención incluye todas estas variaciones y modificaciones. La invención incluye también todas las etapas, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y cualquier y todas las combinaciones de dos cualesquiera dos o más de dichas etapas o características.

Tabla 2 Análisis de citocinas de Iscomatrix™ asociado con E6E7

Estimulado con	Concentración μg	Citocina pg/ml	
		αIFN	IL5
GSTE7	5	7400	140
GSTE7	1	1050	85
ConA	0,4	2130	74
RPMI	–	<30	4

Referencias

Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 36:207–212.

Cox, J.C. y Coulter, A.R. Advances in Adjuvant Technology and Application in Animal Parasite Control Utilising Biotechnology. Chapter 4. Editor Yong, W.K. CRC Press, 1992.

Cox, J.C. y Coulter, A.R. (1997) Vaccine 15(3):248–256.

Cox, J.C. y Coulter, A.R. (1999) BioDrugs 12(6):439–453.

Edwards, S.J., Margetts, M.B., Hocking, D.M., Moloney, M.B.H., Rothel, L.J. y Webb, E.A. (1998). Design of a candidate recombinant therapeutic vaccine or cervical cancer. En: Recent Research Developmens in Biotechnology & Bioengineering. Editor S.G. Pandalai, Research Signpost, India, 343–356.

Elliot, S.L., Pye, S., Le, T., Mateo, L., Cox, J., Macdonald, L., Scalzo, A.A., Forbes, C.A. y Suhrbier, A. (1999) Vaccine 17:2009–2019.

Morein, B., Lövgren, K. y Hoglund, S., (1989), Immunostimulating Complex (ISCOM). In "Vaccines: Recent Trends and Progress." G. Gregoriadis, A.C. Allison y G. Poster (Eds), Plenium Press, New York, p153.

Talsma, H. y Crommelin, D.J.A. (1992) BioPharm, October, 36–47.

Valerio, R.M., Bray, A.M. y Maeji, N.J., Int. J. Pept. Prof. Res. 44:158–165 (1994).

Listado de secuencias

<110> CSL LIMITED

<120> Complejos inmunogénicos y métodos relacionados con los mismos

<130> 2257451/TDO

<140> Internacional

<141> 2000–02–17

<150> PP8735/99
<151> 1999–02–17

<150> PQ1861/99
<151> 1999–02–17

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2,0

<210> 1
<211> 11 –
<212> PRT
<213> mamífero

<400> 1

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu
1 5 10

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> mamífero

<400> 2

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Construcción sintética

<400> 3

Tyr Pro His Phe Met Pro Thr Asn Leu
1 5

<210> 4
<211> 36
<212> PRT
<213> Construcción sintética

<400> 4

Tyr Pro His Phe Met Pro Thr Asn Leu Arg Pro Gln Ala Ser Gly Val
1 5 10 15

Tyr Met Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Ser Tyr Ile Pro Ser
20 25 30

Ala Glu Lys Ile
35

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Construcción sintética

<400> 5

Arg Pro Gln Ala Ser Gly Val Tyr Met
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Construcción sintética

<400> 6

Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Construcción sintética

<400> 7

Ser Tyr Ile Pro Ser Ala Glu Lys Ile
1 5

<210> 8
<211> 5

<212> PRT
<213> Construcción sintética

<400> 8

Cys Asx Gln Cys Ala
1 5

<210> 9
<211> 57
<212> PRT
<213> Construcción sintética

<400> 9

Tyr Pro His Phe Met Pro Thr Asn Leu Thr Ser Ser Gly Pro Ser Asn
1 5 10 15

Thr Pro Pro Glu Ile Phe Ala Pro Gly Asn Tyr Pro Ala Leu Ser Tyr
20 25 30

Ile Pro Ser Ala Glu Lys Ile Glu Glu Gly Ala Ile Val Gly Glu Ile
35 40 45

Arg Pro Gln Ala Ser Gly Val Tyr Met
50 55

REIVINDICACIONES

1. Un método de fabricar un complejo inmunogénico asociado electrostáticamente que comprende un complejo orgánico cargado negativamente y un antígeno cargado positivamente, que consiste esencialmente en mezclar:

(A) un complejo orgánico cargado negativamente preformado que comprende una saponina y
(B) un antígeno cargado positivamente aislado,

formando de este modo un complejo inmunogénico donde dicho complejo orgánico y el antígeno están asociados por interacción electrostática.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho antígeno es una proteína o comprende una región peptídica.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el complejo orgánico preformado comprende además un fosfolípido.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicho fosfolípido es un fosfoglicérido, seleccionado opcionalmente del grupo que consiste en fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico y cardiolipina.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicho fosfolípido es lípido A, seleccionado opcionalmente del grupo que consiste en difosforil lípido A y monofosforil lípido A.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde:

(a) dicho complejo inmunogénico induce una respuesta de linfocitos T citotóxicos cuando se administra a un mamífero;
(b) dicho antígeno se modifica para aumentar el grado de su carga positiva; y/o
(c) dicho complejo orgánico preformado se modifica para aumentar el grado de su carga negativa.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicho antígeno se modifica mediante la adición de polilisina y/o arginina.

8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dicho complejo orgánico preformado es un complejo cargado negativamente que se modifica para aumentar el grado de su carga negativa.

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho antígeno no comprende una región hidrófoba.

10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el complejo orgánico preformado comprende además colesterol.

11. Una composición de vacuna que comprende como componente activo un vehículo cargado negativamente que comprende saponina y un antígeno cargado positivamente, donde el vehículo y el antígeno están asociados electrostáticamente, junto con uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

12. Un método de formar un complejo inmunogénico que comprende un complejo orgánico cargado negativamente y un antígeno cargado positivamente, comprendiendo el método la selección de un complejo orgánico, la modificación del complejo orgánico para aumentar su carga negativa y haciendo reaccionar el antígeno con un complejo orgánico, que comprende una saponina.

13. Un método según la reivindicación 12, que comprende además la etapa de aumentar la carga positiva del antígeno antes de la reacción del antígeno con el complejo orgánico.

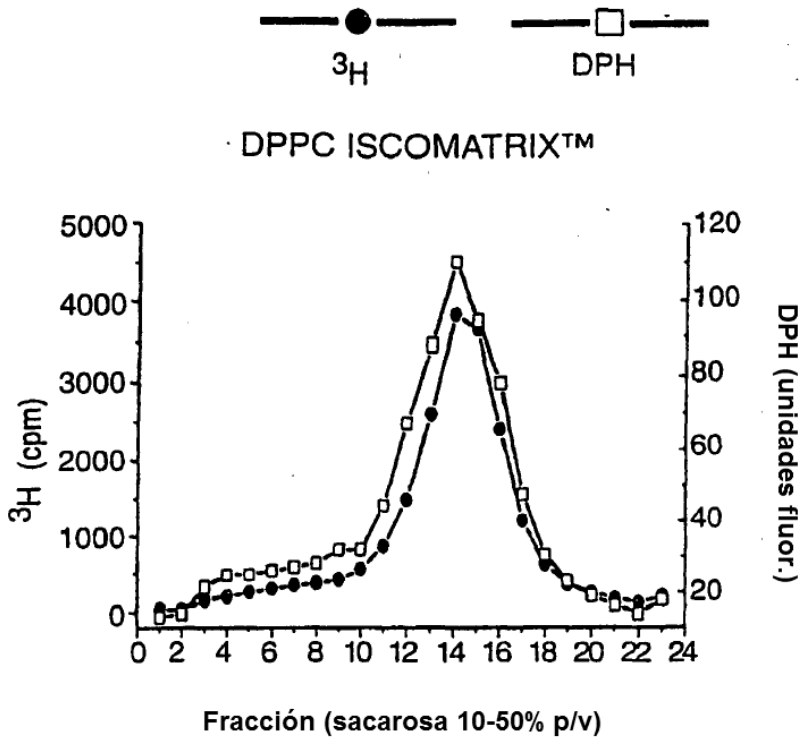


Figura 1a

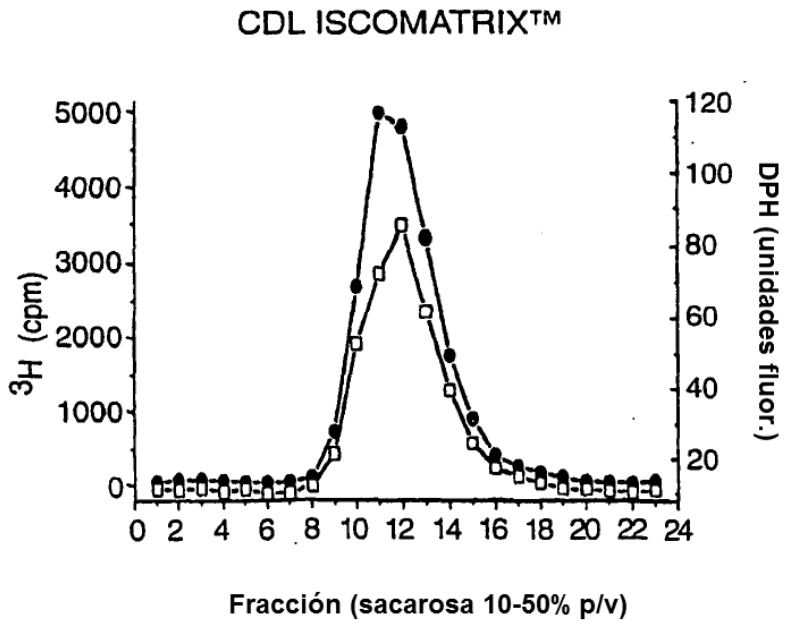


Figura 1b

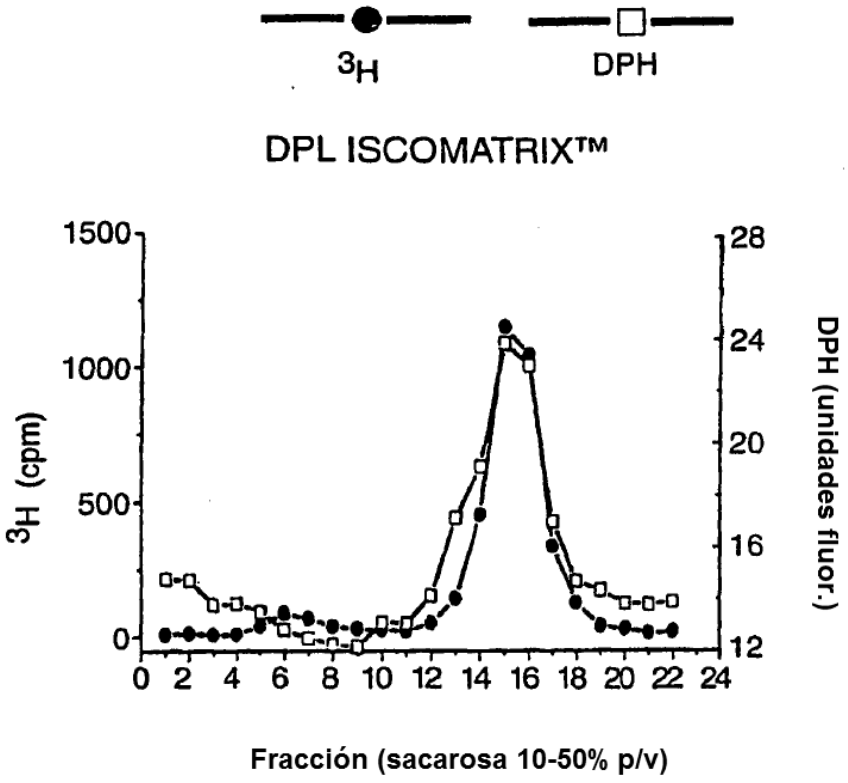


Figura 1c

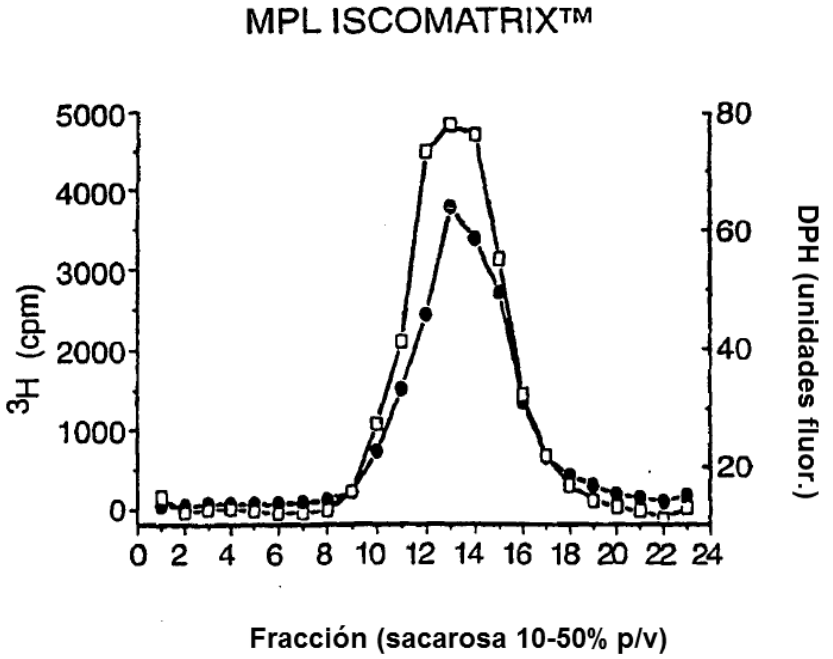


Figura 1d

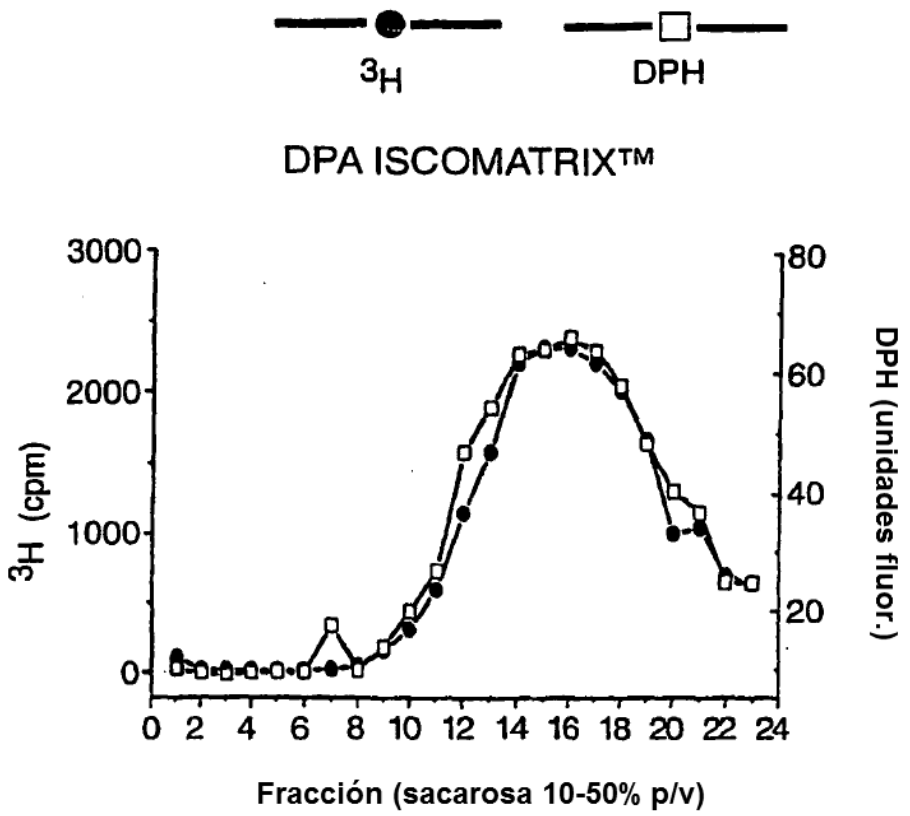


Figura 1e

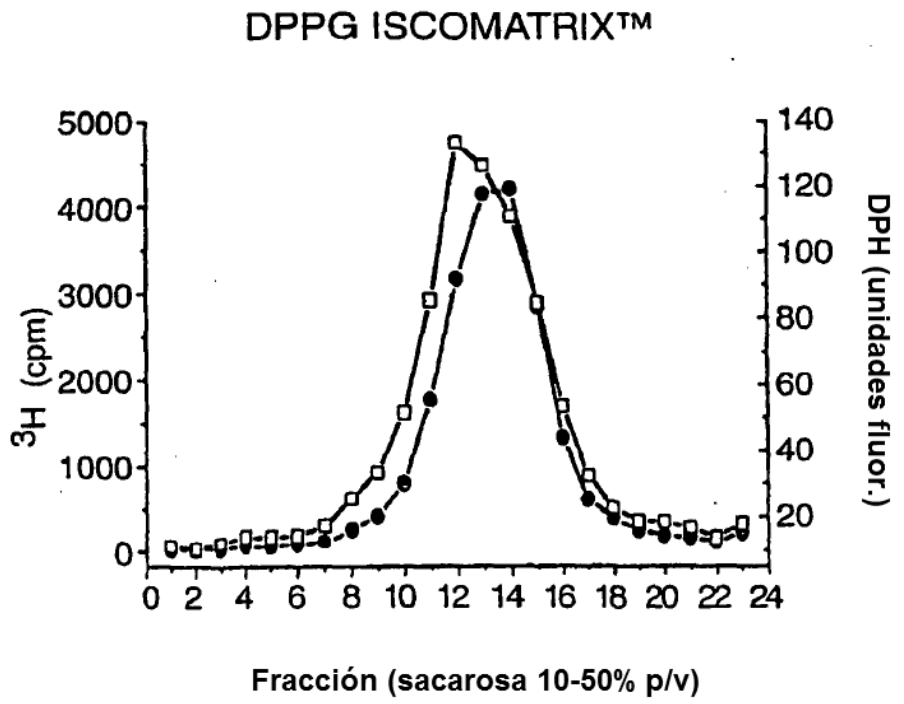
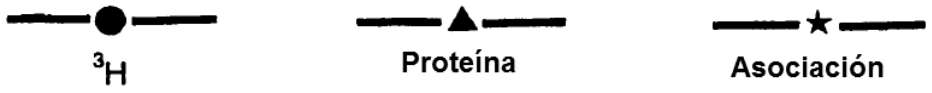


Figura 1f



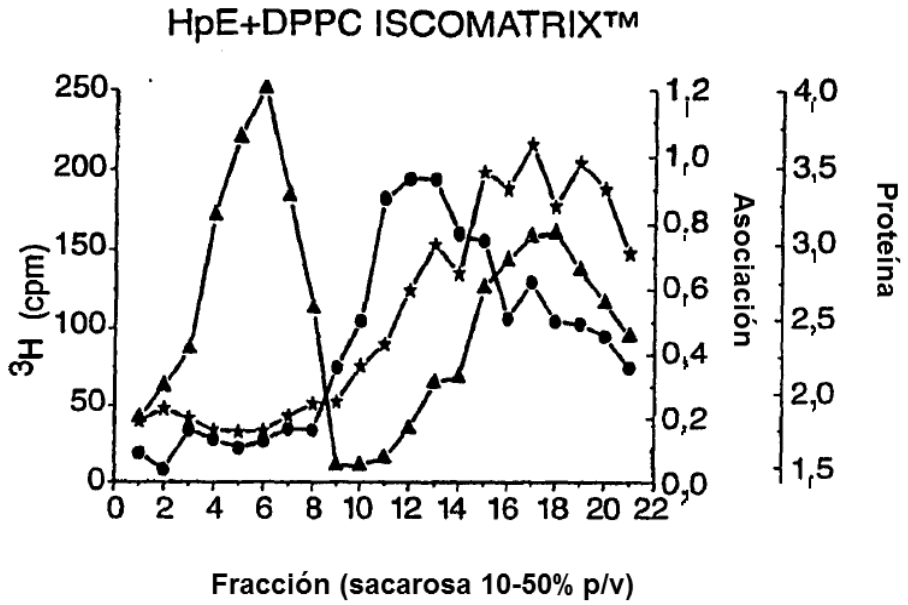


Figura 2a

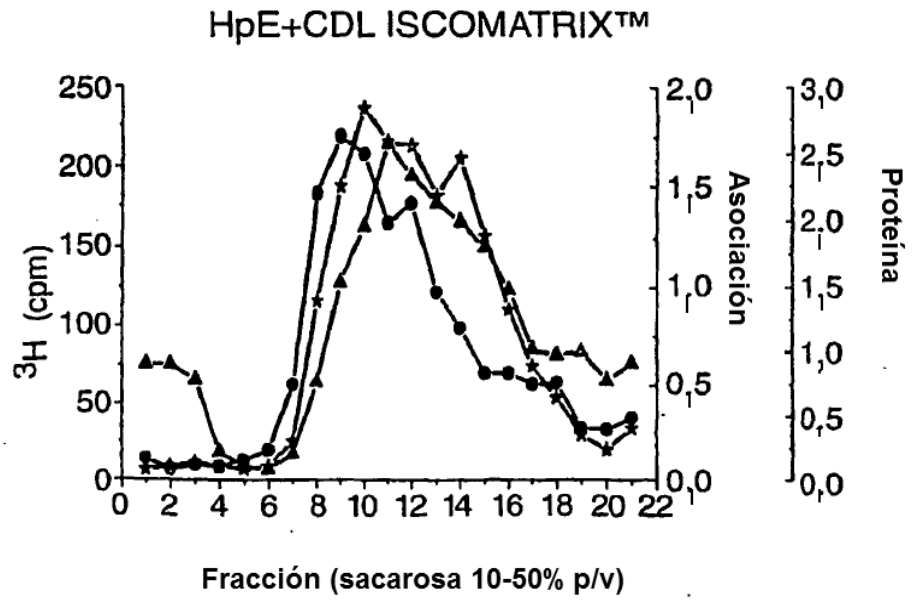
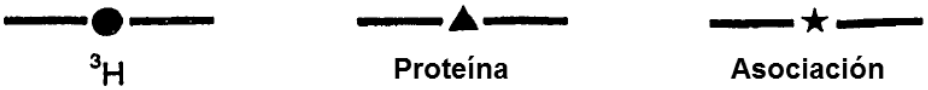


Figura 2b



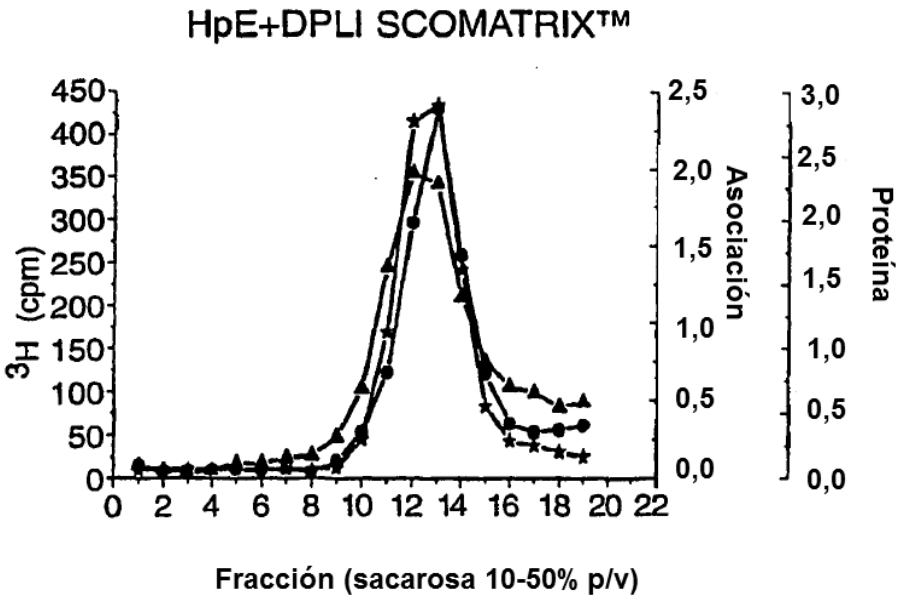


Figura 2c

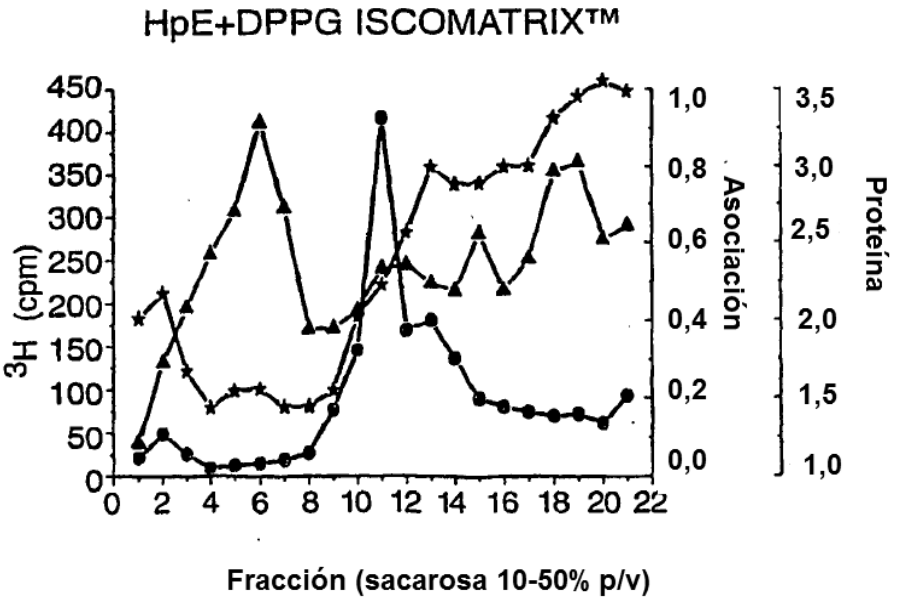


Figura 2d

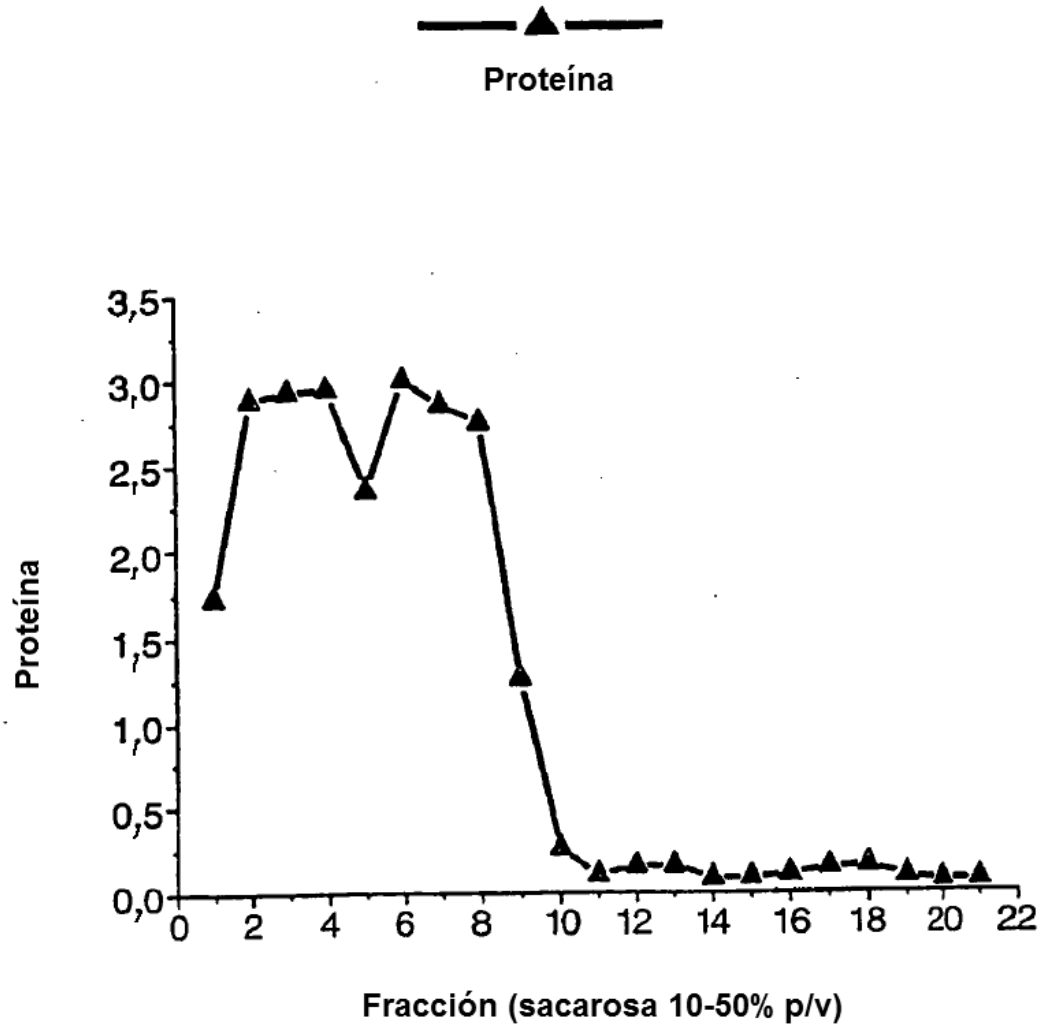

Proteína
Proteína
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
Fracción (sacarosa 10-50% p/v)

Figura 2e

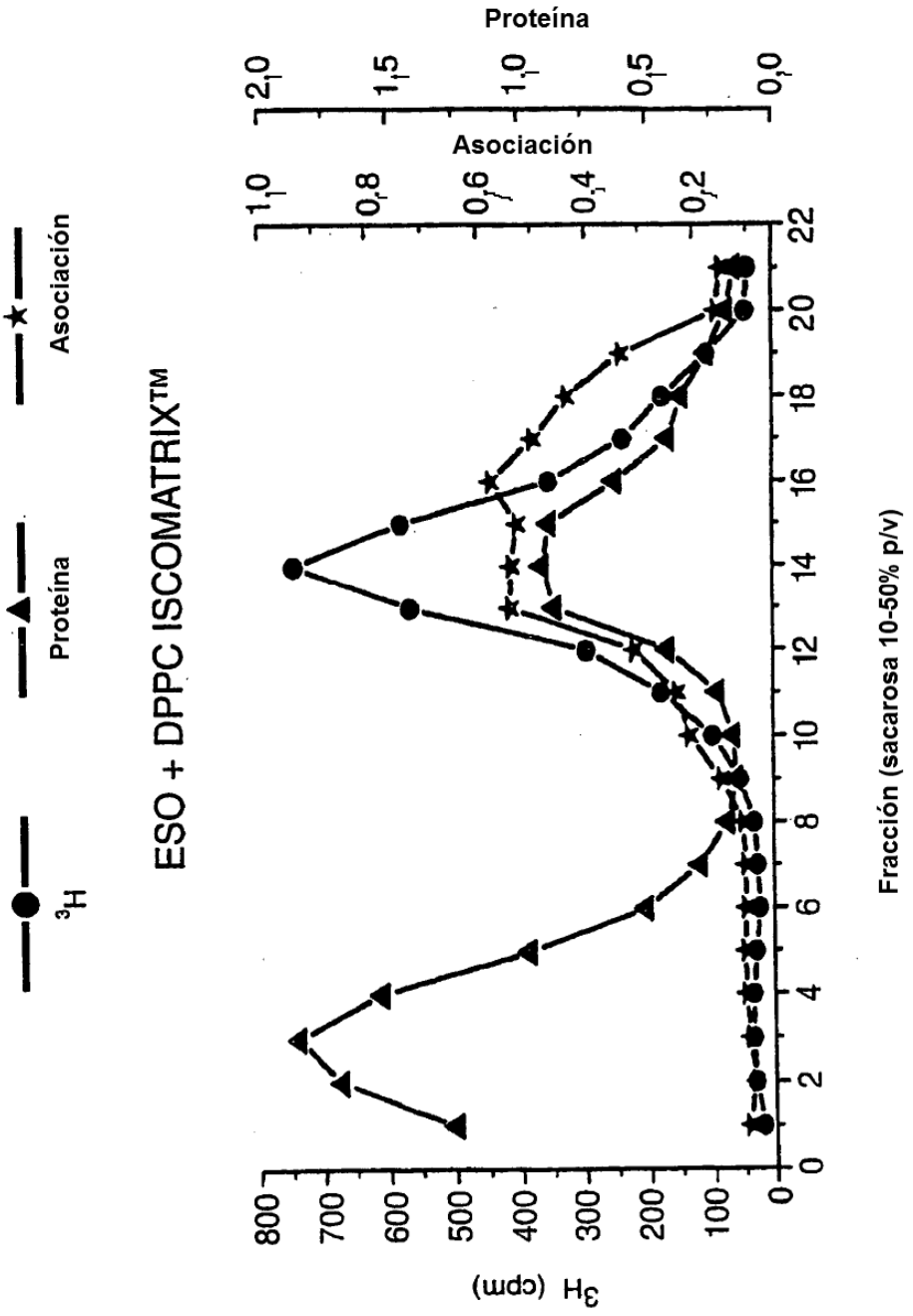

ESO + DPPC ISCOMATRIX™
^{3}H
Proteína
Asociación
Proteína
Asociación
^{3}H (cpm)
Fracción (sacarosa 10-50% p/v)

Figura 3a

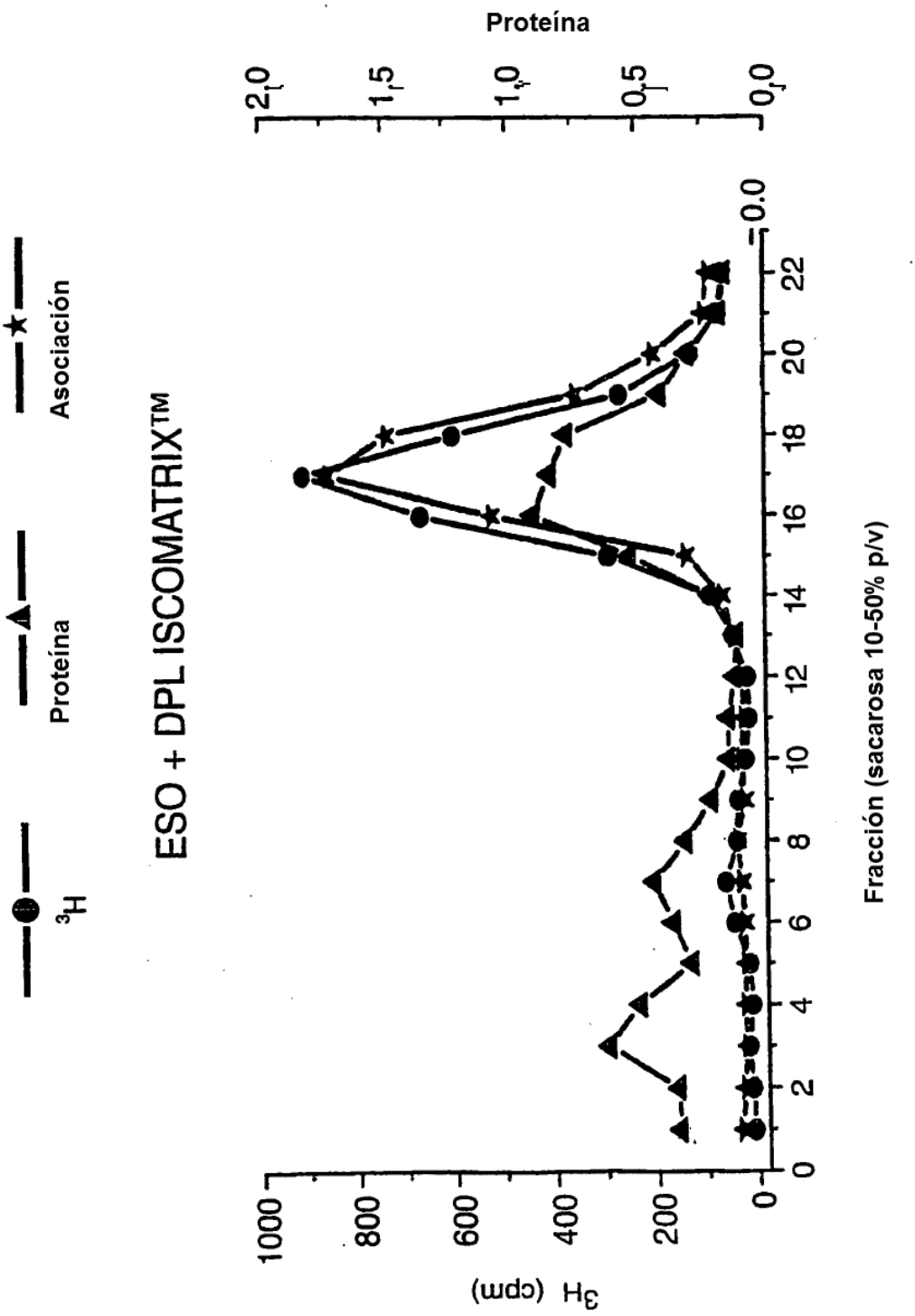

ESO + DPL ISCOMATRIX™
^{3}H
Proteína
Asociación
Proteína
^{3}H (cpm)
Fracción (sacarosa 10-50% p/v)

Figura 3b

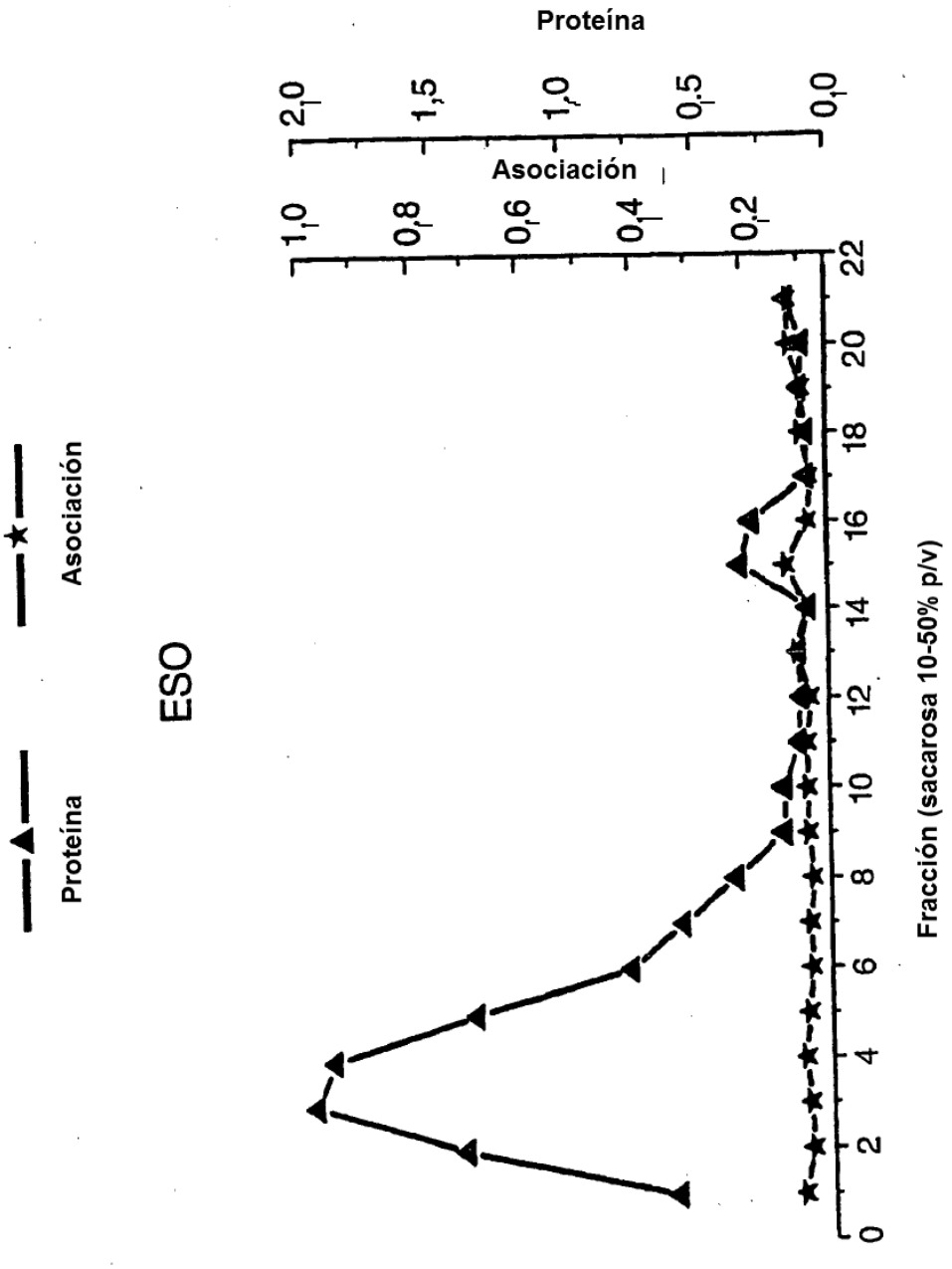

Proteína
Asociación
ESO
Proteína
Asociación
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
Fracción (sacarosa 10-50% p/v)

Figura 3c

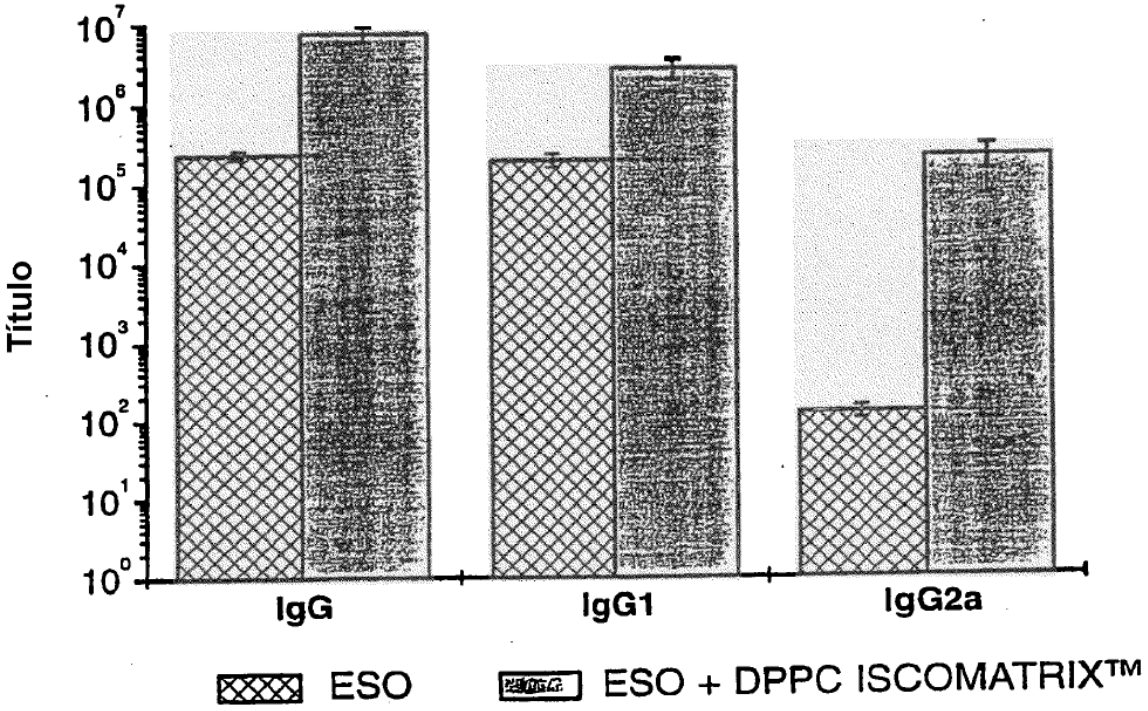

Título
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
IgG
IgG1
IgG2a
ESO
ESO + DPPC ISCOMATRIX™

Figura 4

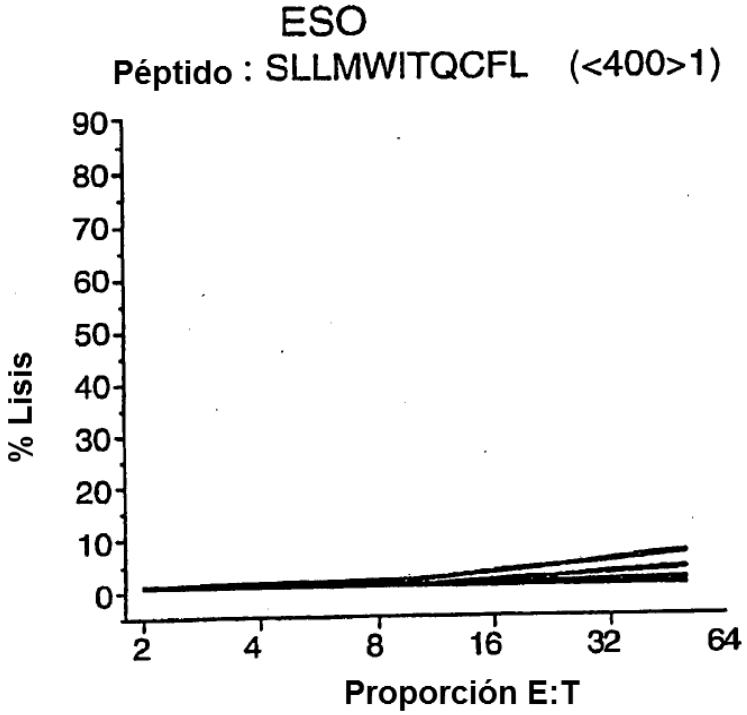


Figura 5a

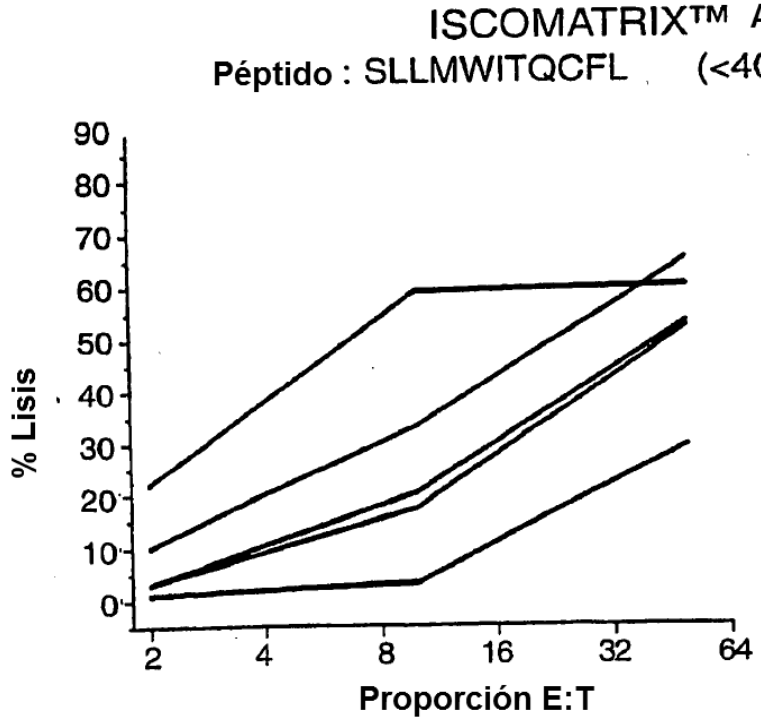


Figura 5b

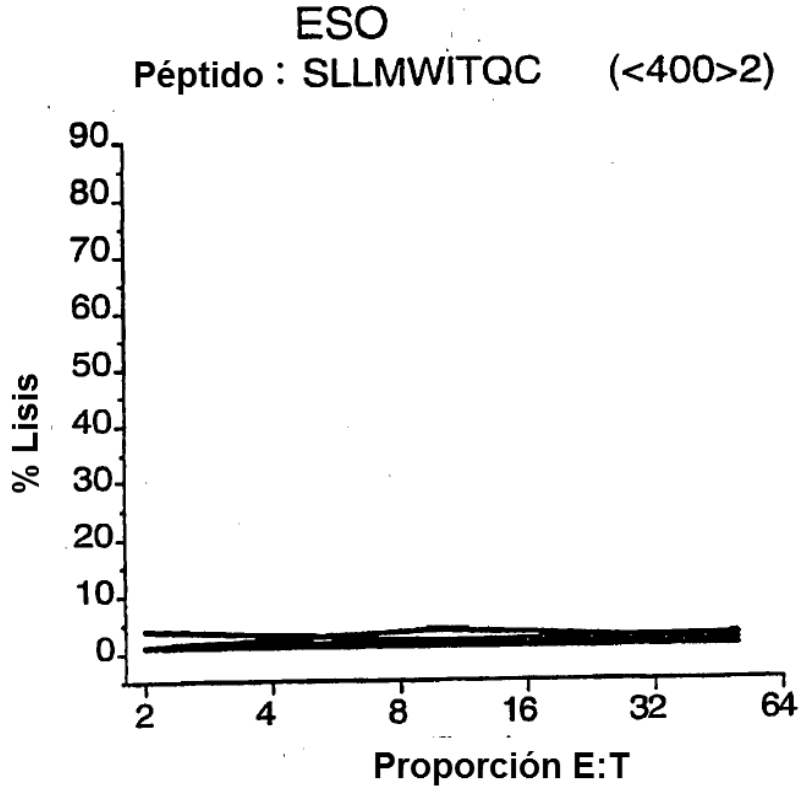


Figura 5c

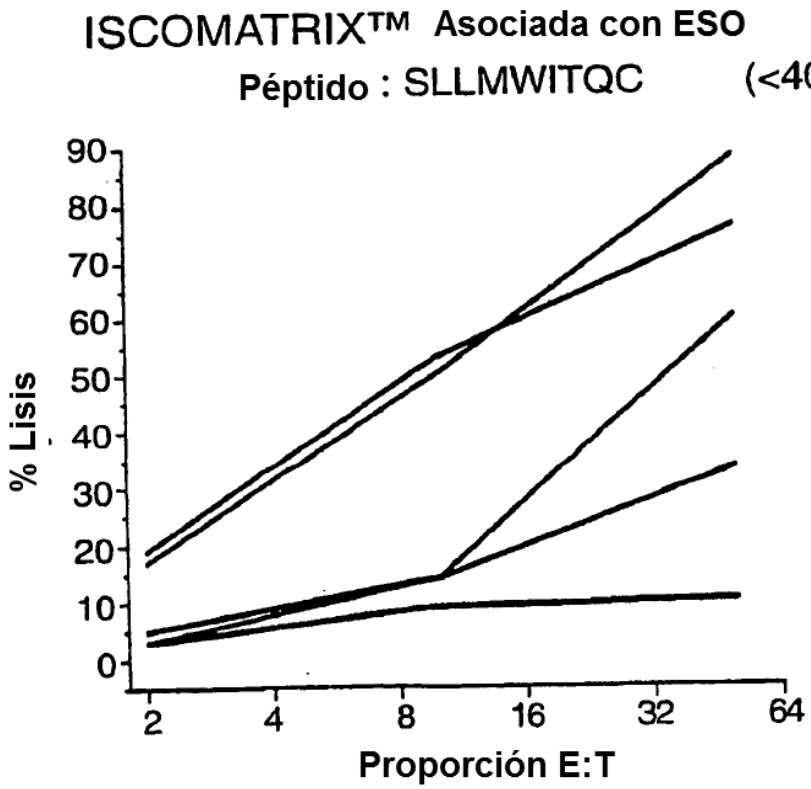
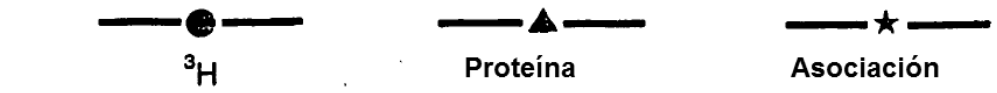


Figura 5d



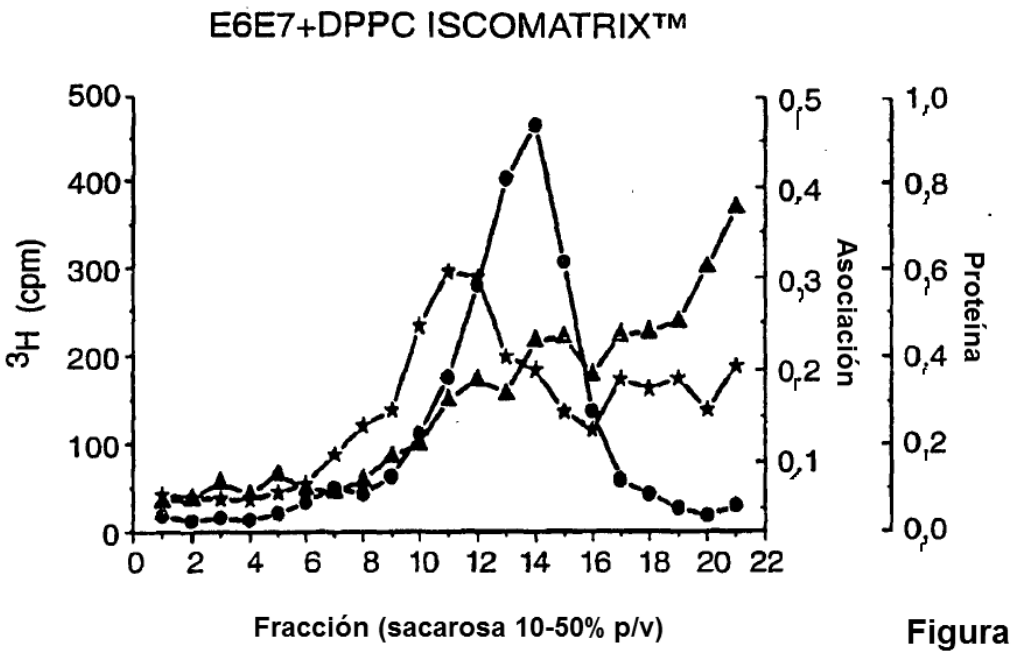


Figura 6a

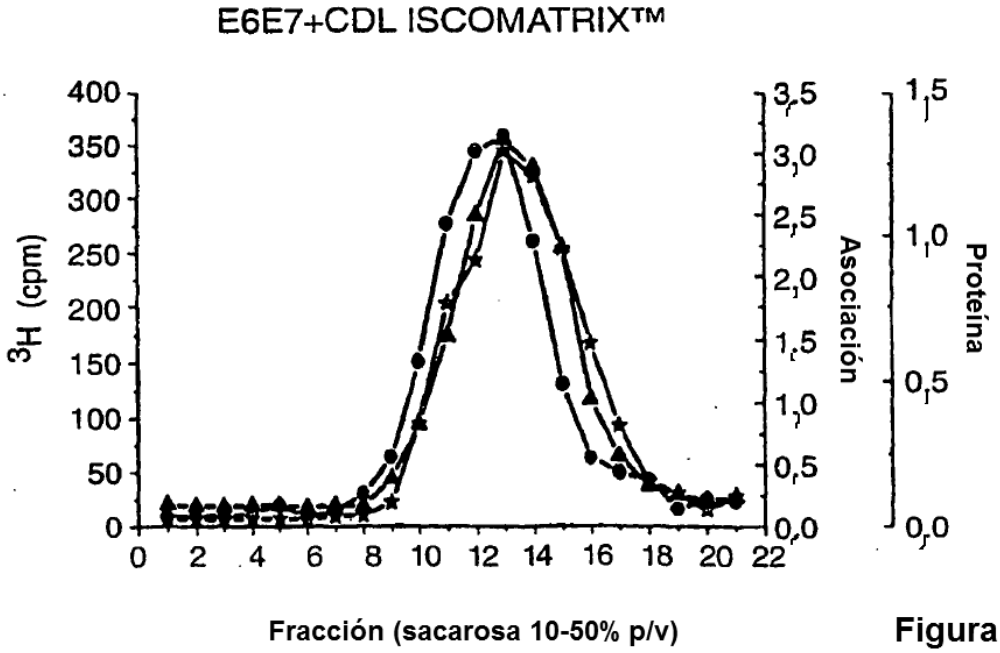


Figura 6b

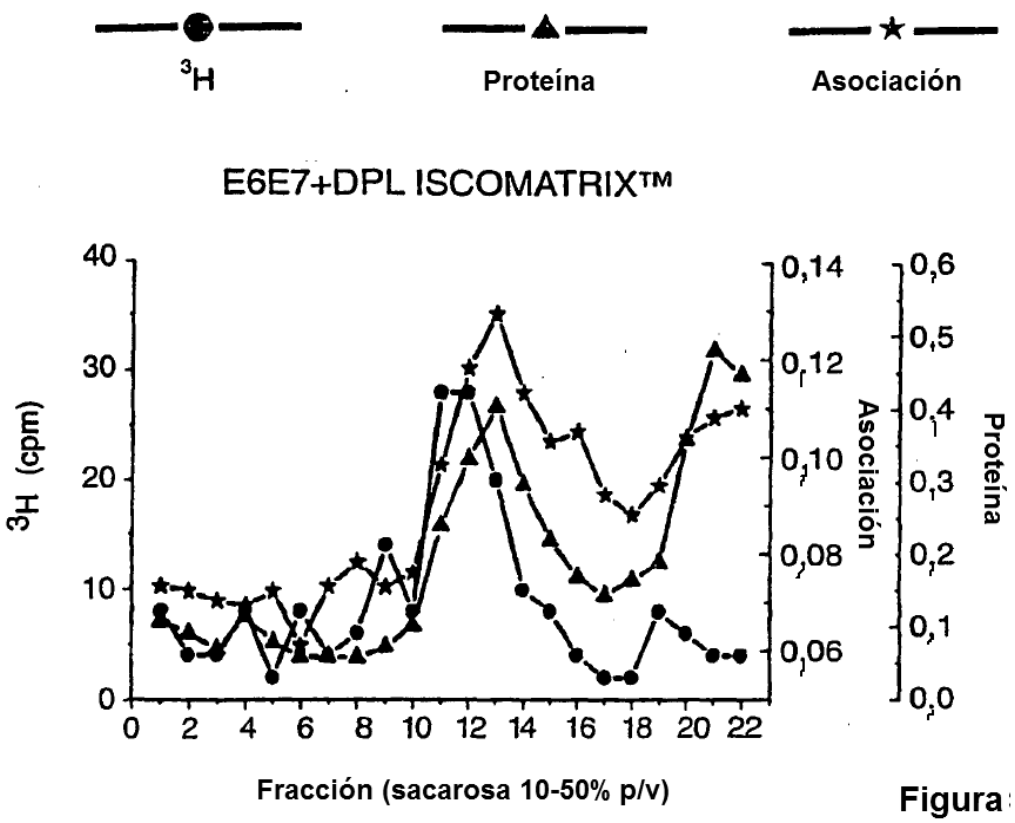


Figura 6c

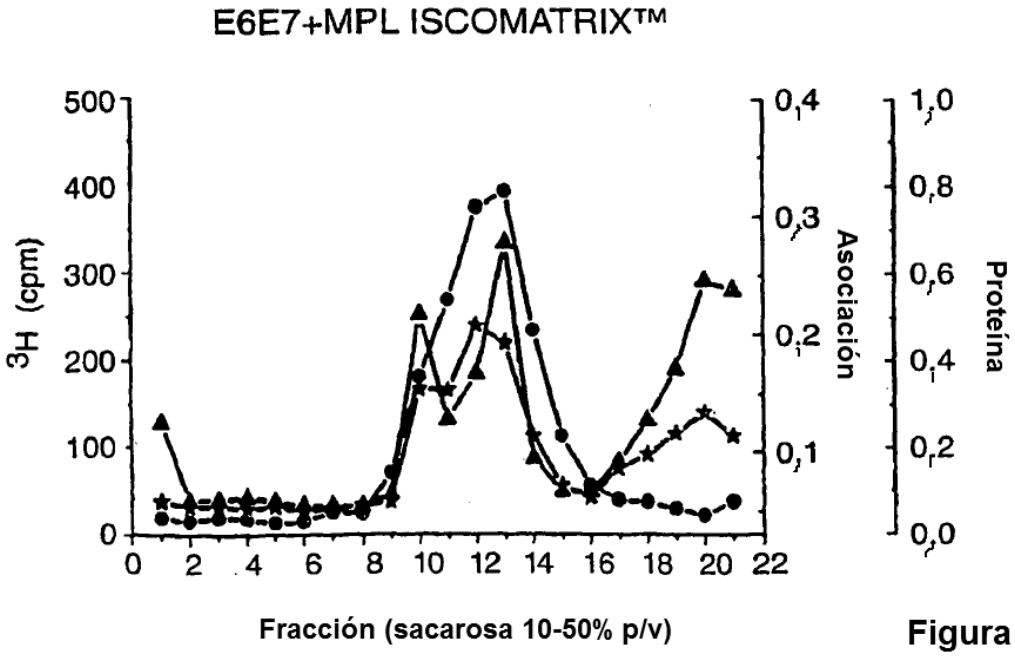


Figura 6d

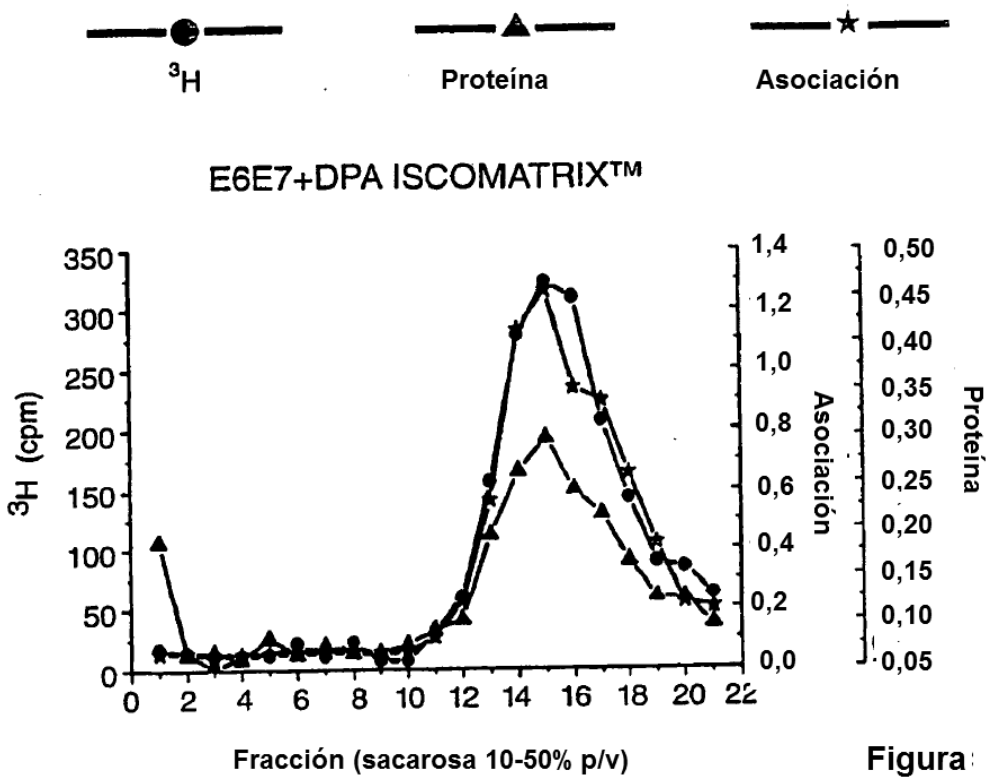


Figura 6e

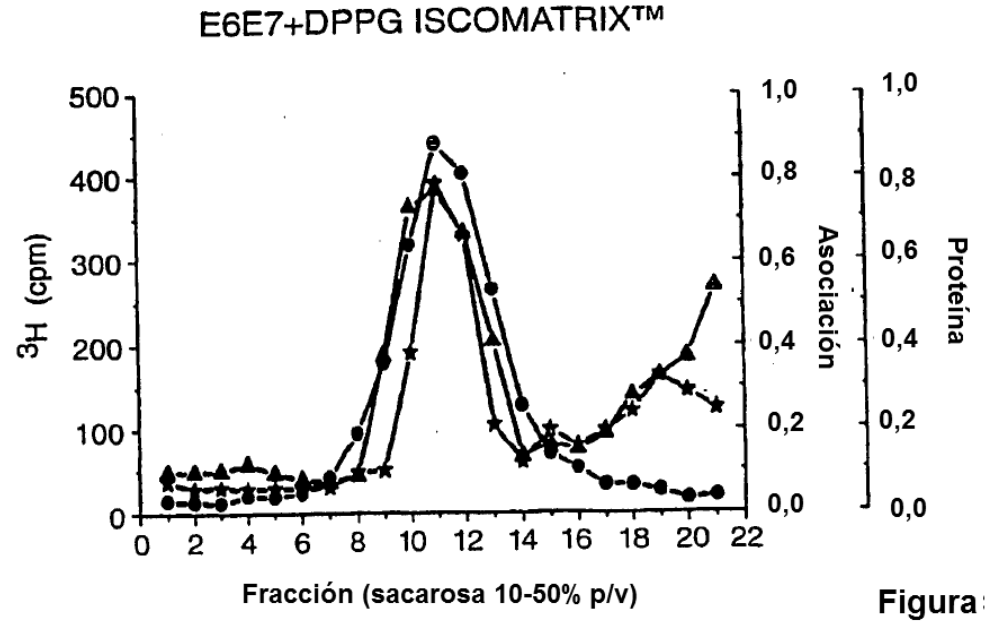


Figura 6f

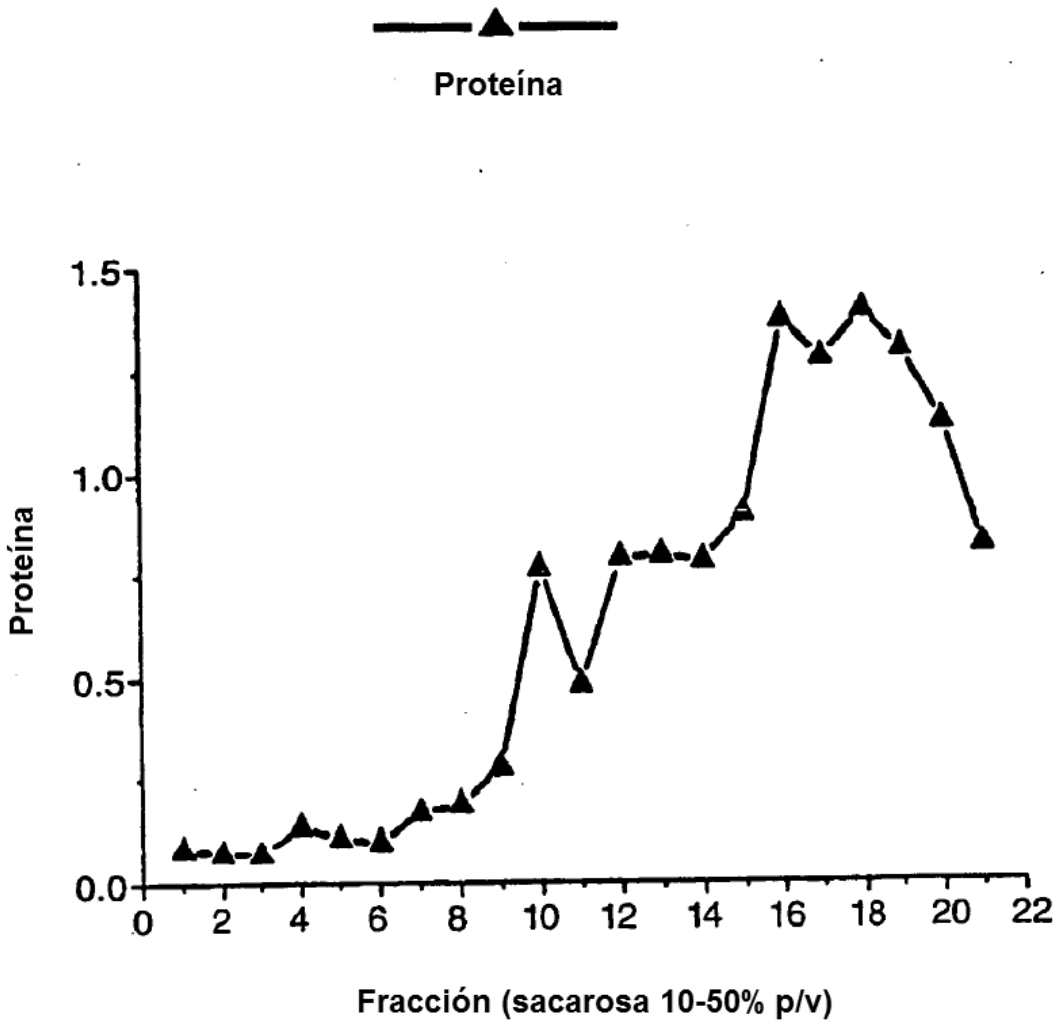

Proteína
1.5
1.0
0.5
0.0
Proteína
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
Fracción (sacarosa 10-50% p/v)

Figura 6g

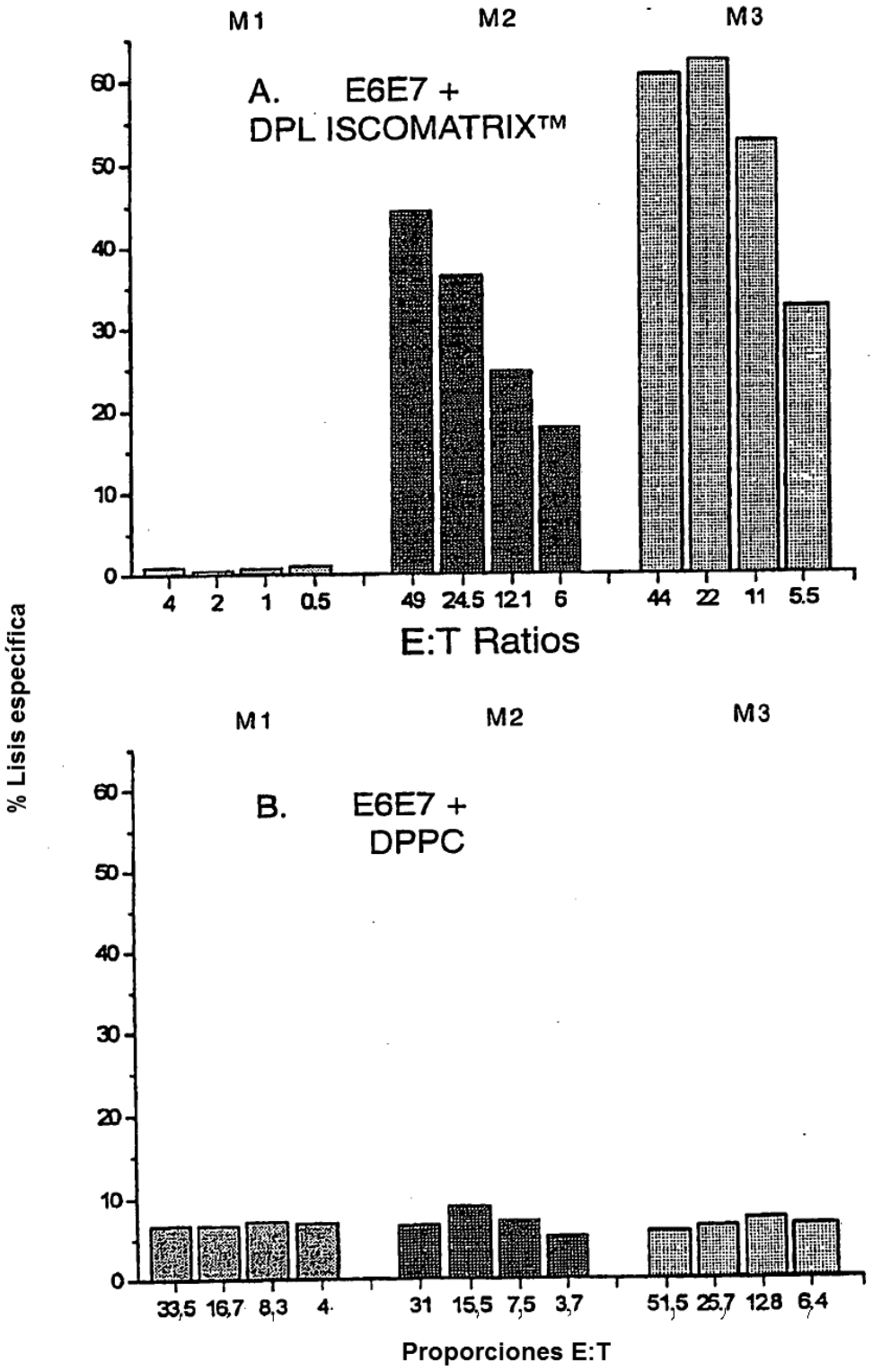

M1
M2
M3
A. E6E7 + DPL ISCOMATRIX™
60
50
40
30
20
10
0
4 2 1 0.5
49 24.5 12.1 6
44 22 11 5.5
E:T Ratios
% Lisis específica
M1
M2
M3
B. E6E7 + DPPC
60
50
40
30
20
10
0
33,5 16,7 8,3 4
31 15,5 7,5 3,7
51,5 25,7 12.8 6,4
Proporciones E:T

Figura 7

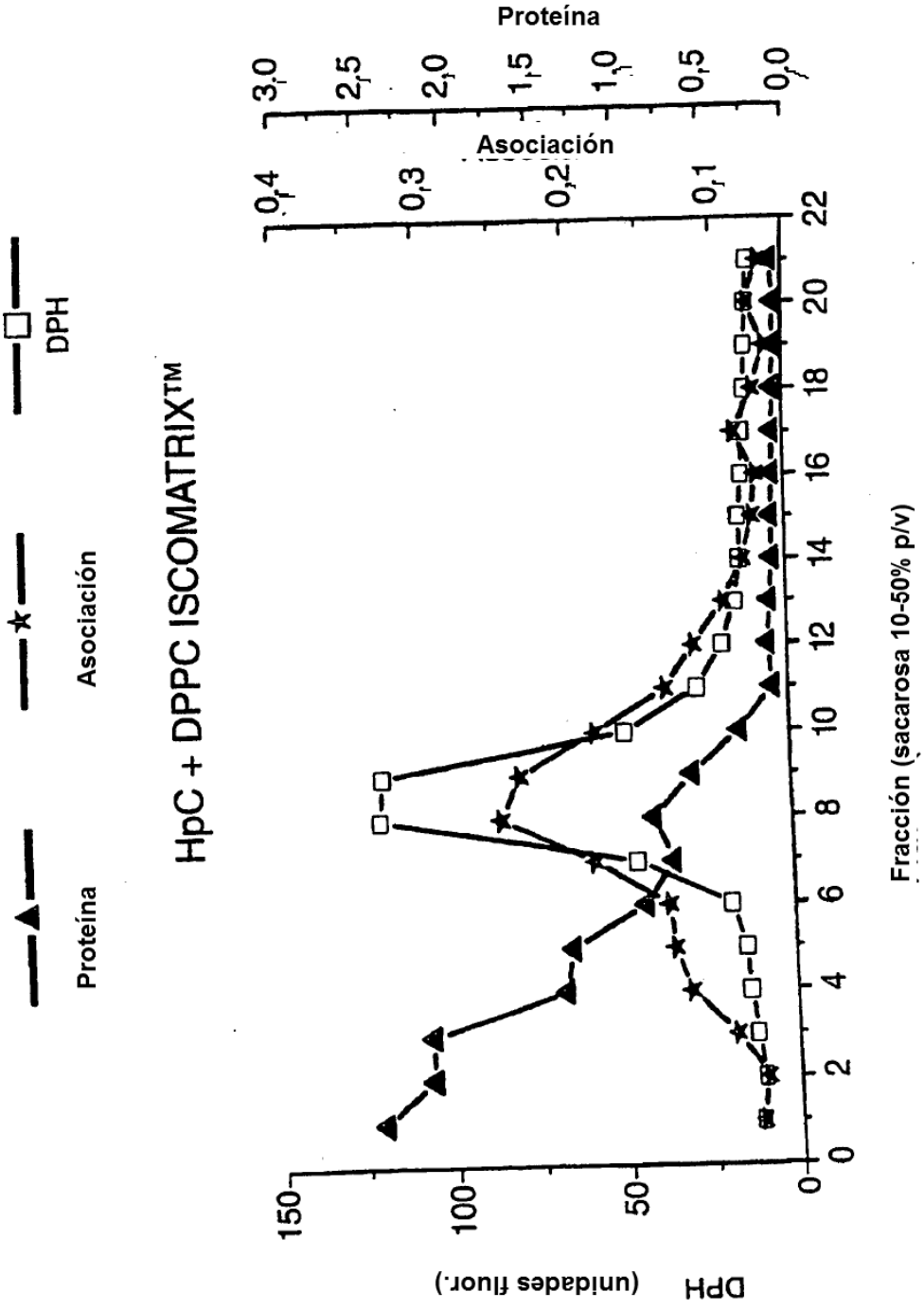

HpC + DPPC ISCOMATRIX™
Proteína
Asociación
DPH
Proteína
Asociación
DPH (unidades fluor.)
Fracción (sacarosa 10-50% p/v)

Figura 8a

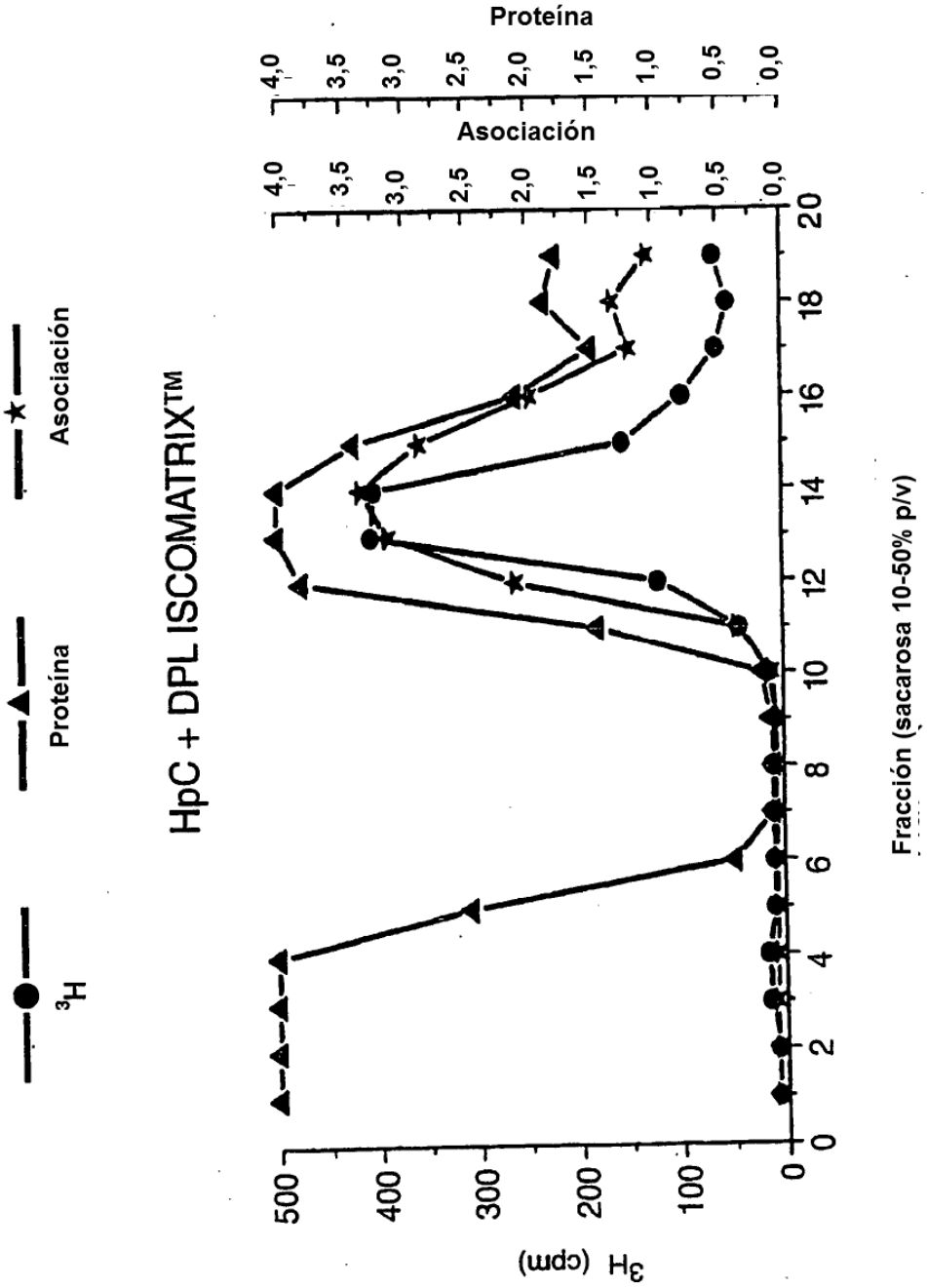

HpC + DPL ISCOMATRIX™
^{3}H
Proteína
Asociación
Proteína
Asociación
^{3}H (cpm)
Fracción (sacarosa 10-50% p/v)

Figura 8b

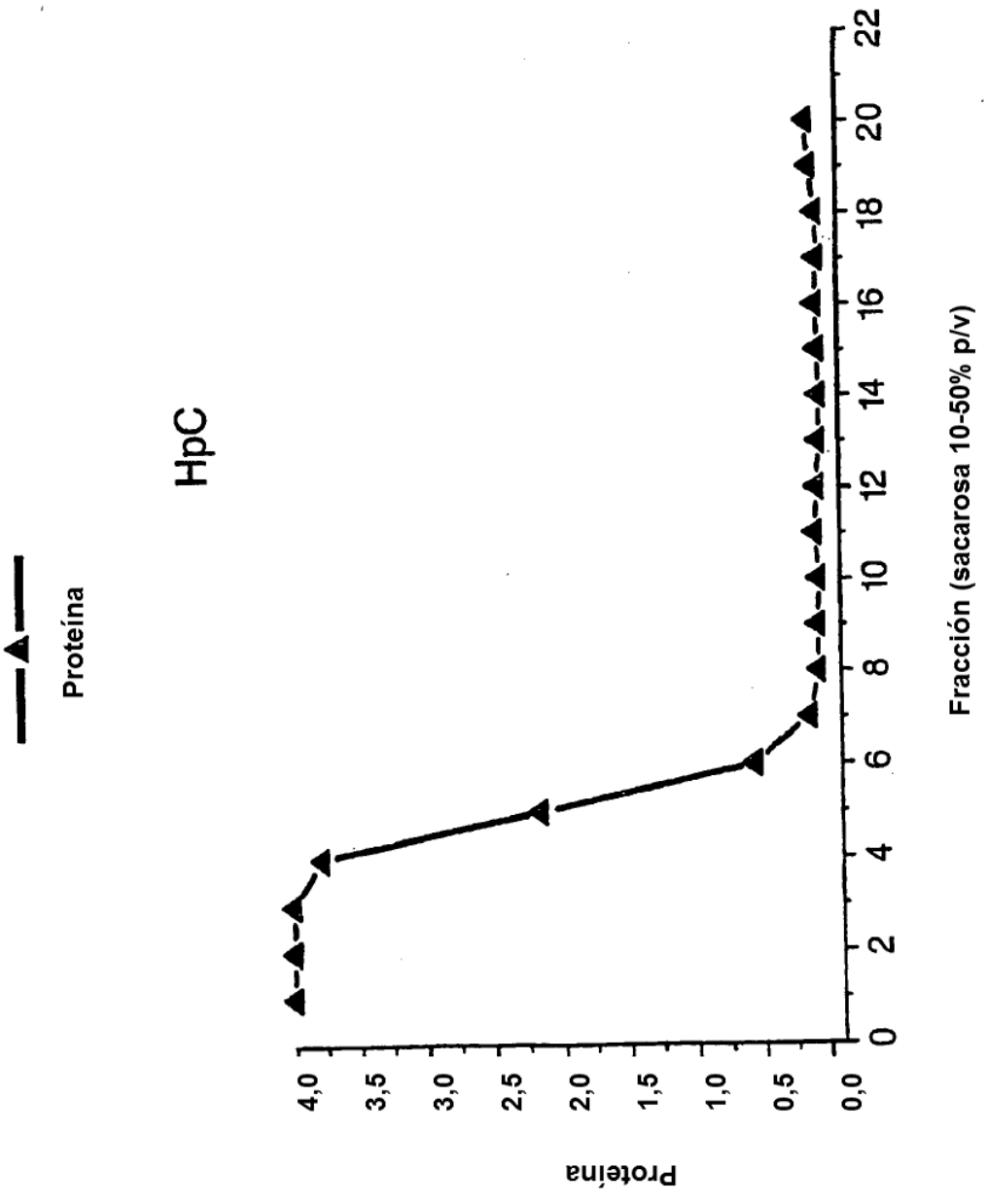

HpC
Proteína
Proteína
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
Fracción (sacarosa 10-50% p/v)

Figura 8c

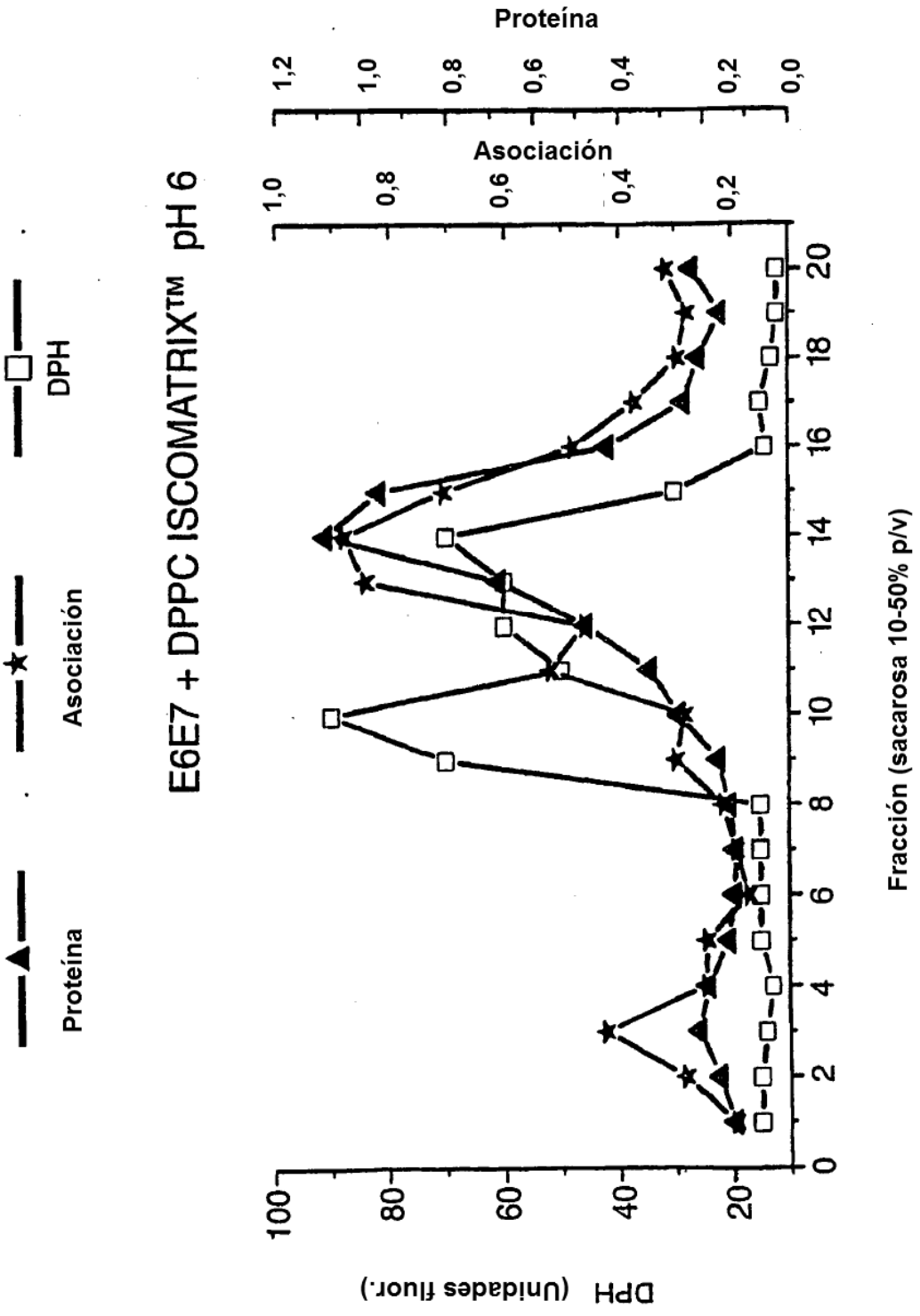

E6E7 + DPPC ISCOMATRIX™ pH 6
Proteína
Asociación
DPH
Proteína
Asociación
DPH (Unidades fluor.)
Fracción (sacarosa 10-50% p/v)

Figura 9a

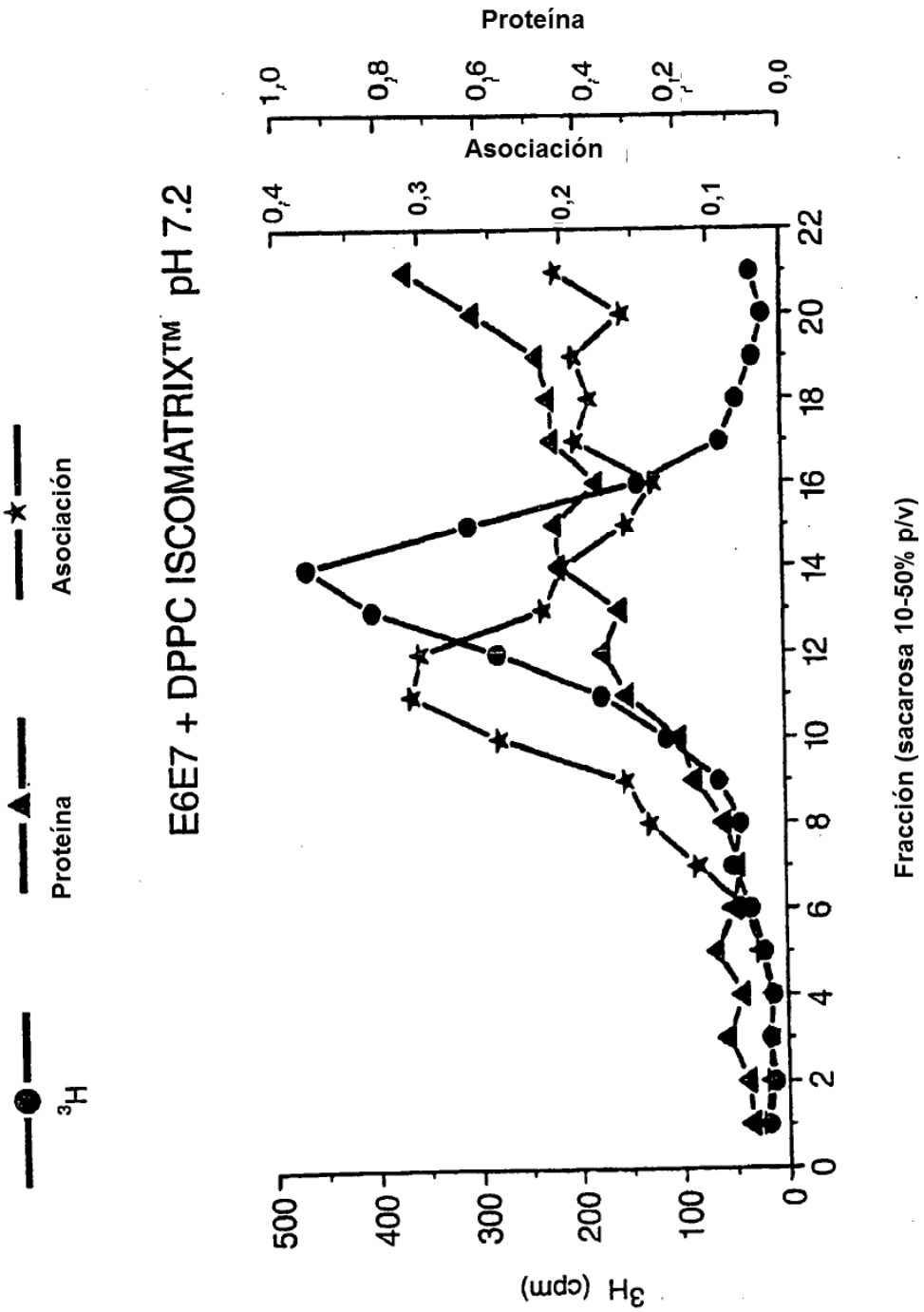

E6E7 + DPPC ISCOMATRIX™ pH 7.2
^{3}H
Proteína
Asociación
^{3}H (cpm)
Proteína
Asociación
Fracción (sacarosa 10-50% p/v)

Figura 9b

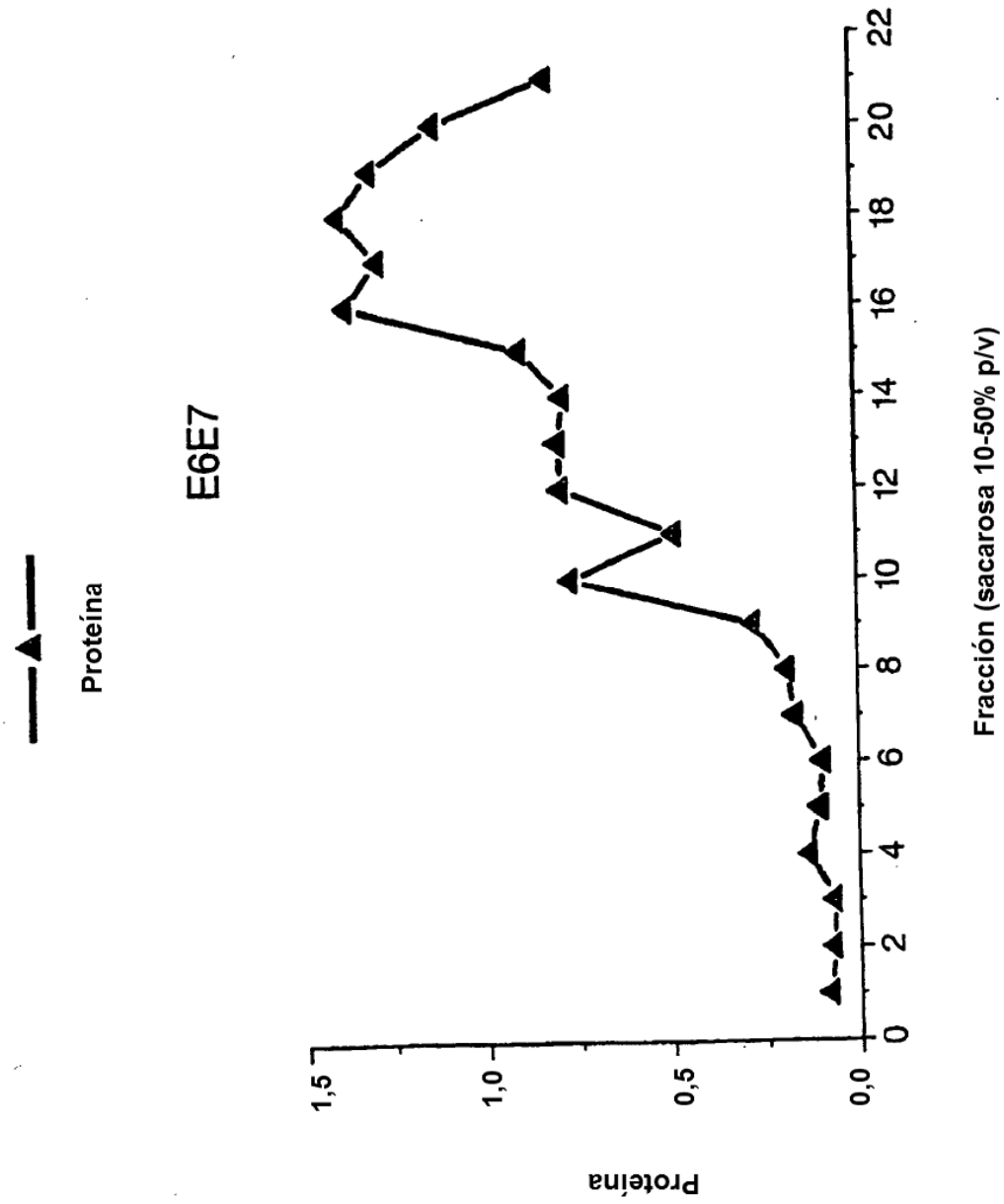

Proteína
E6E7
Proteína
1,5
1,0
0,5
0,0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
Fracción (sacarosa 10-50% p/v)

Figura 9c

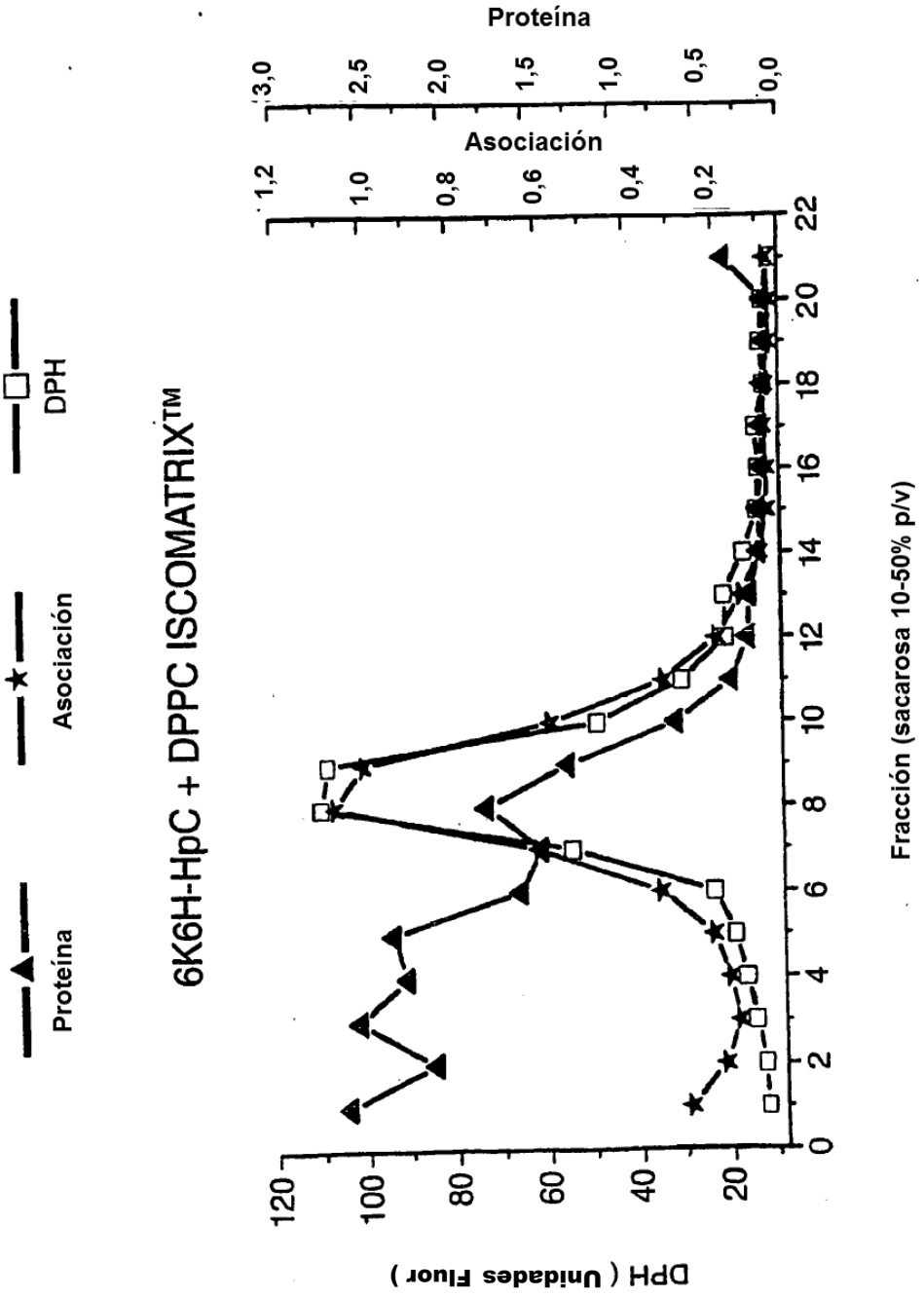

6K6H-HpC + DPPC ISCOMATRIX™
Proteína
Asociación
DPH
Proteína
Asociación
DPH (Unidades Fluor)
Fracción (sacarosa 10-50% p/v)

Figura 10a

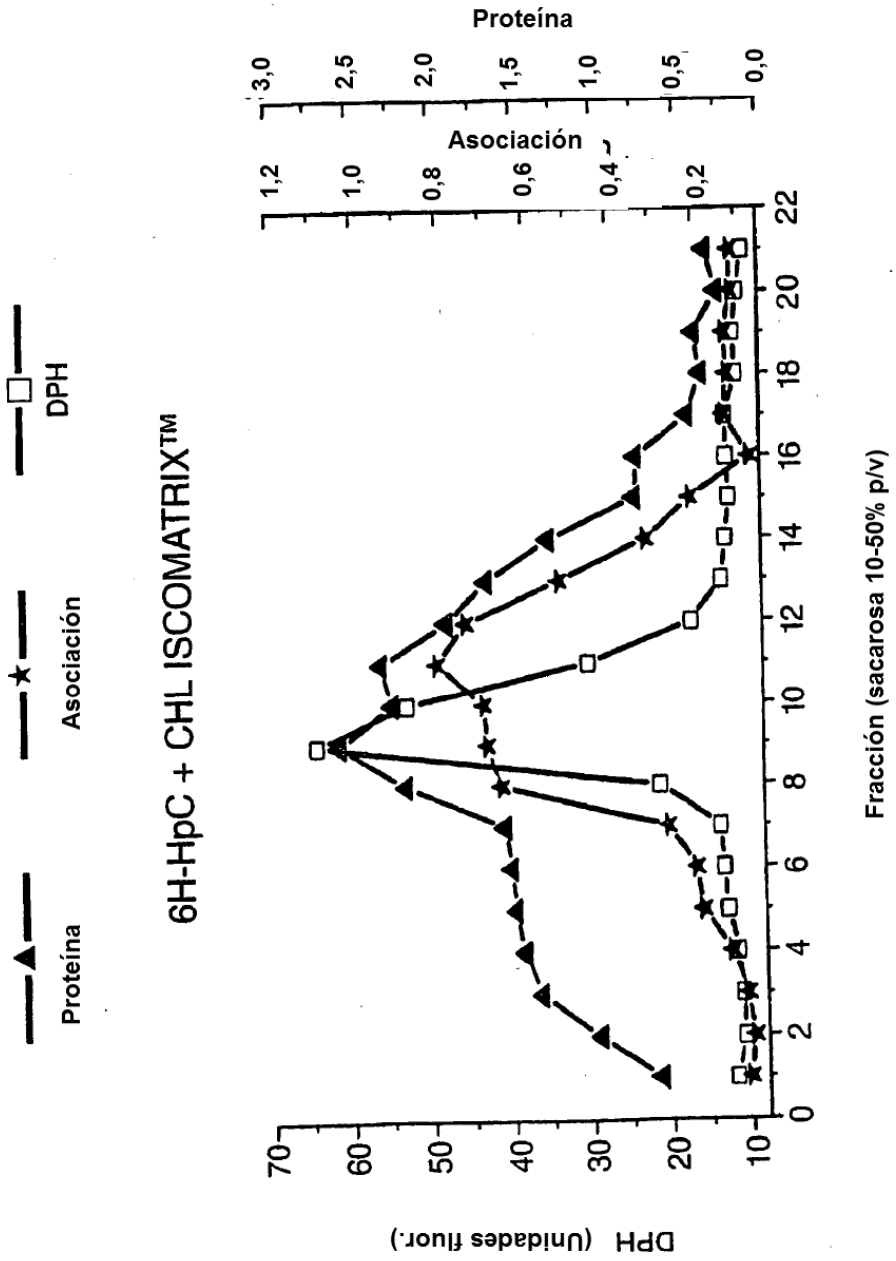

Proteína
Asociación
DPH
6H-HpC + CHL ISCOMATRIX™
Proteína
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Asociación
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
70
60
50
40
30
20
10
DPH (Unidades fluor.)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
Fracción (sacarosa 10-50% p/v)

Figura 10b

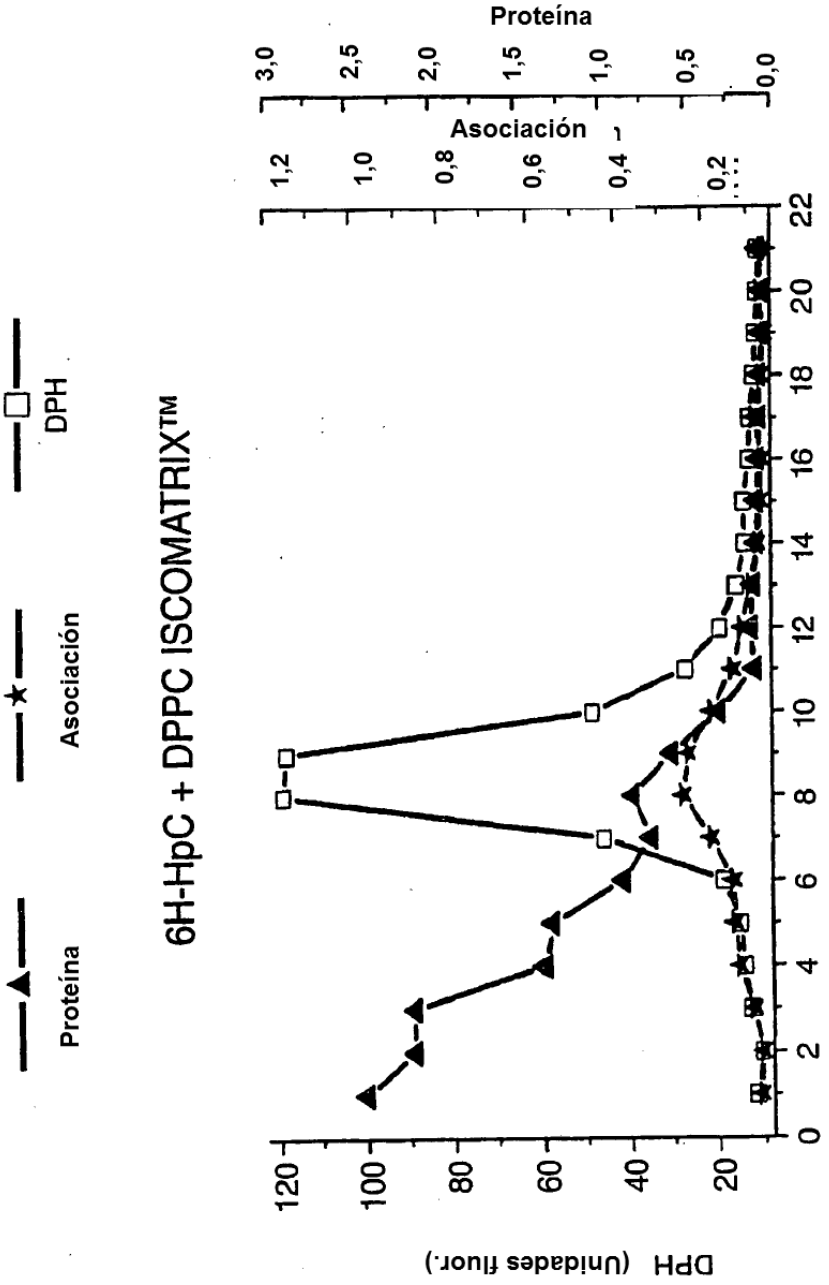

6H-HpC + DPPC ISCOMATRIX™
Proteína
Asociación
DPH
Proteína
Asociación
DPH (Unidades fluor.)
Fracción (sacarosa 10-50% p/v)

Figura 10c

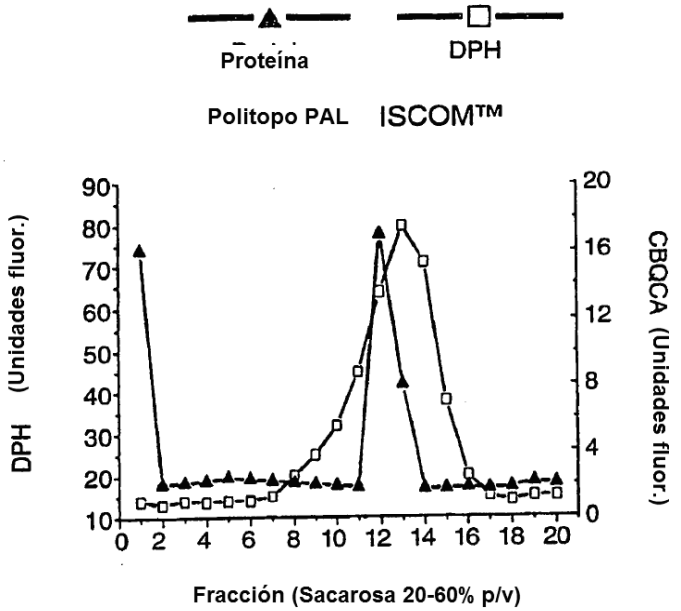


Figura 11a

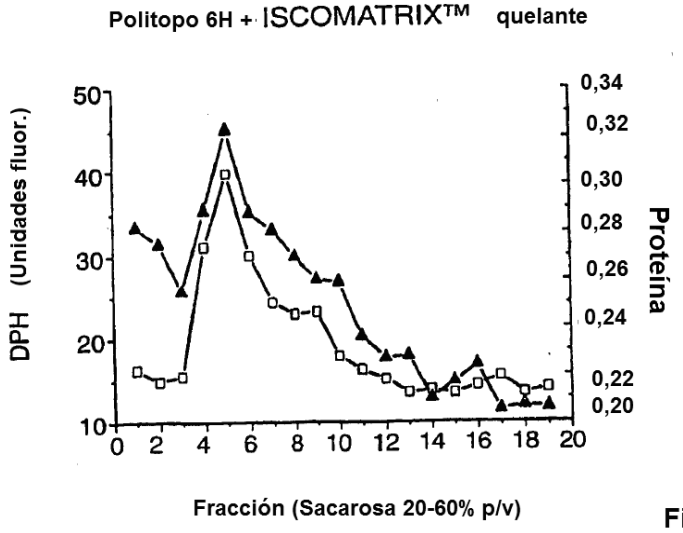


Figura 11b

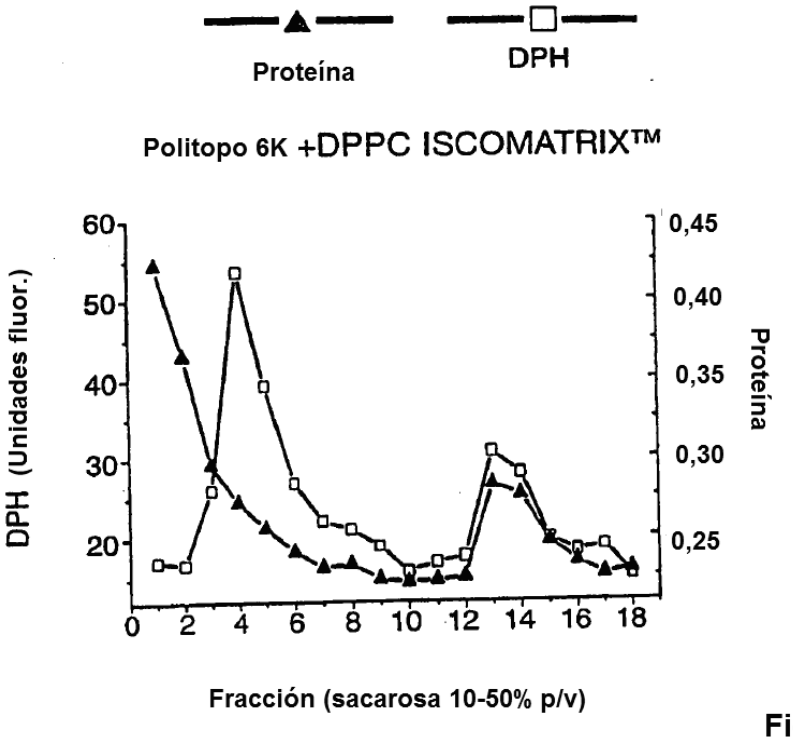


Figura 11c

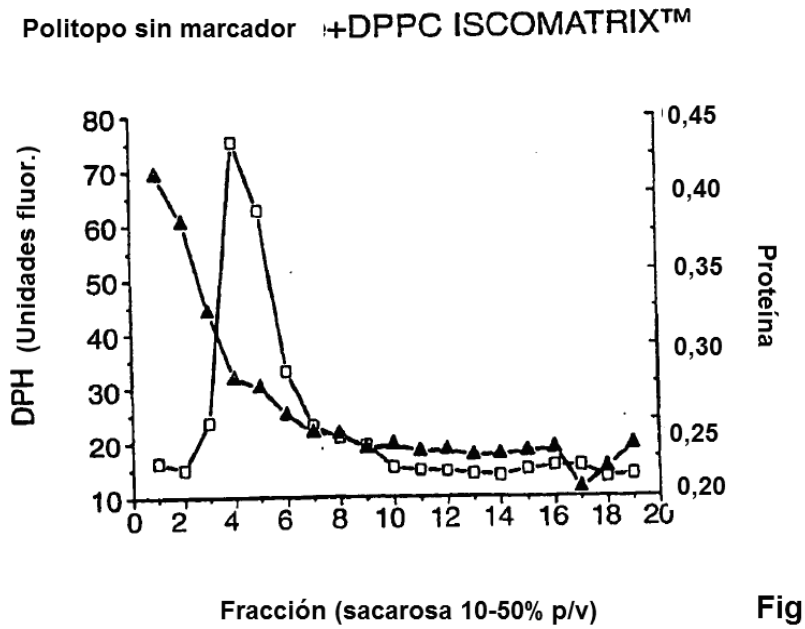


Figura 11d

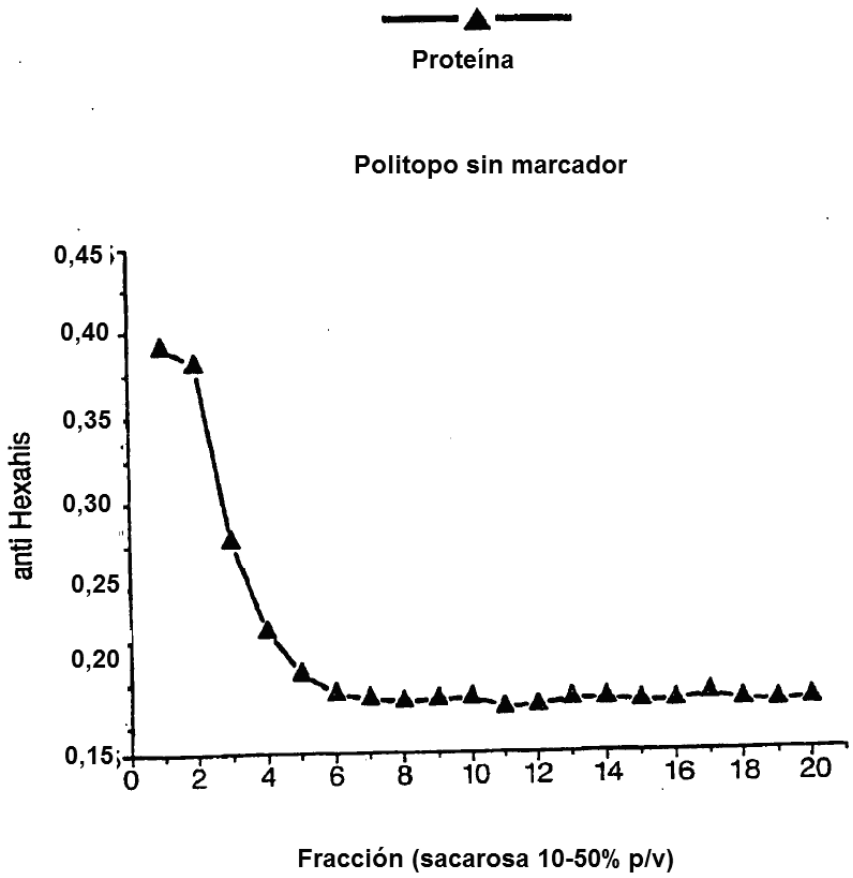

Proteína
Politopo sin marcador
anti Hexahis
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Fracción (sacarosa 10-50% p/v)

Figura 11e

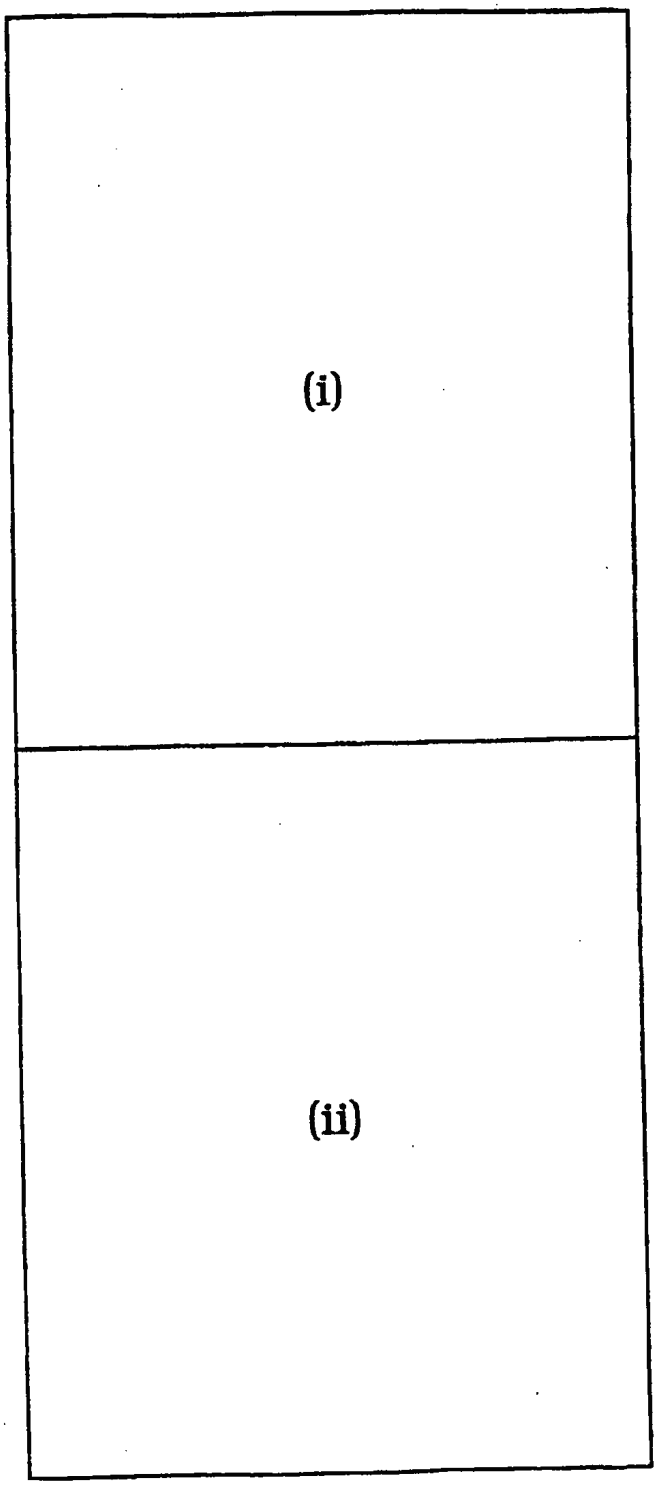
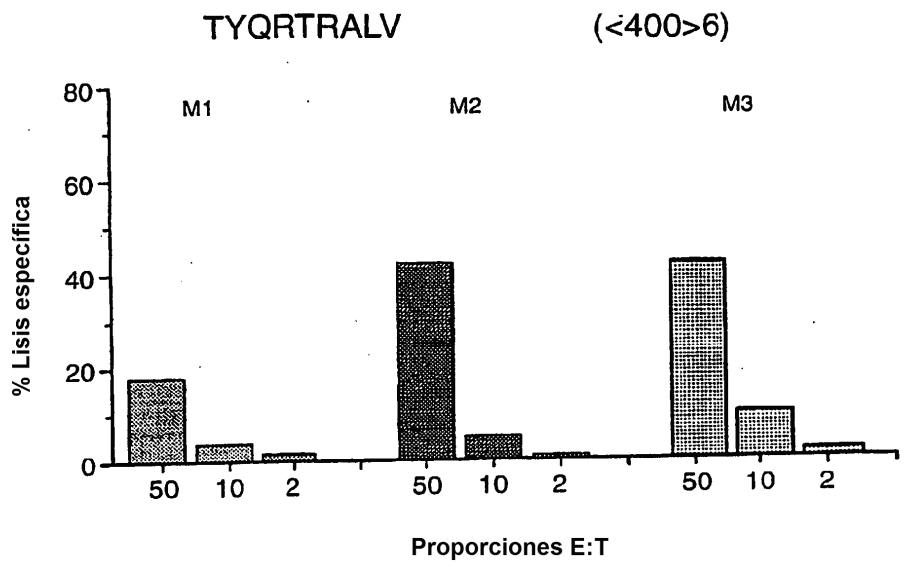


Figura 12a


TYQRTRALV
(<400>6)
M1
M2
M3
% Lisis específica
80
60
40
20
0
50
10
2
Proporciones E:T

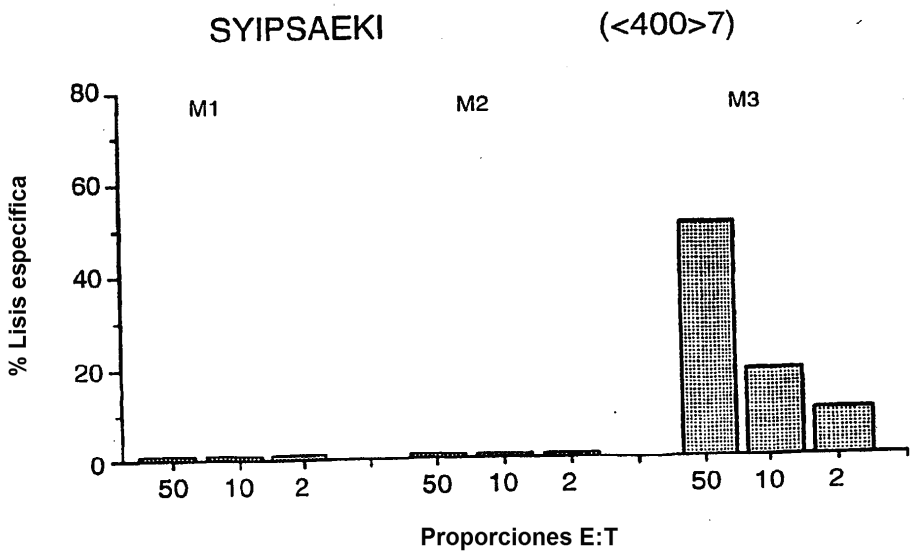
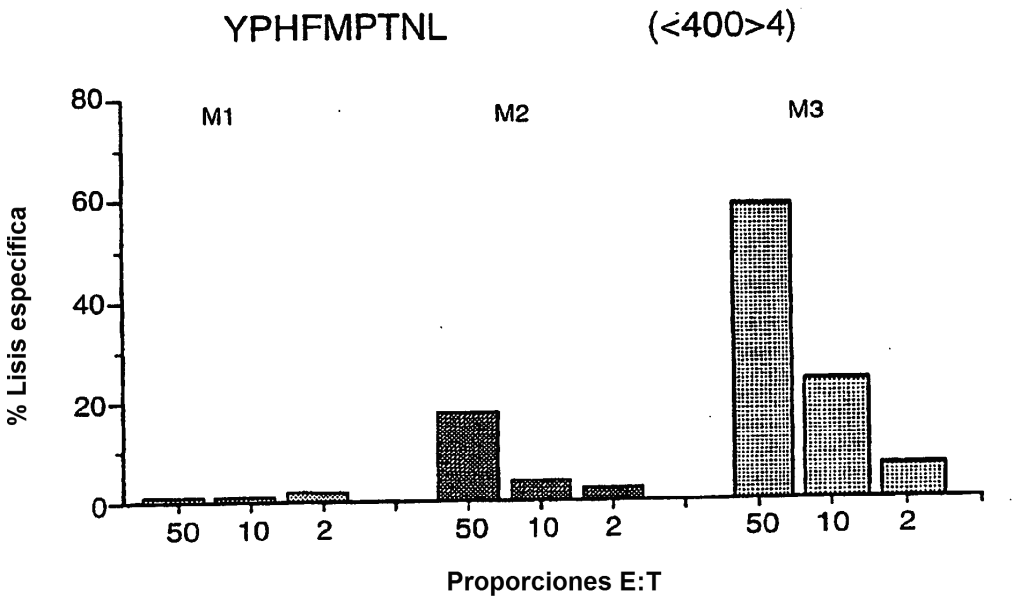

SYIPSAEKI
(<400>7)
M1
M2
M3
% Lisis específica
80
60
40
20
0
50
10
2
Proporciones E:T

Figura 12a (i)



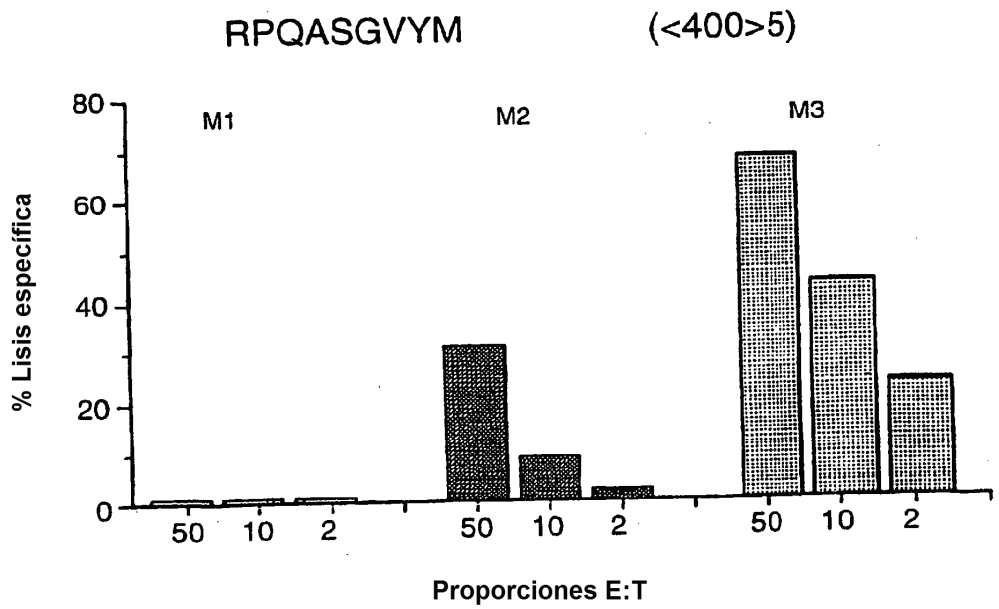


Figura 12a (ii)

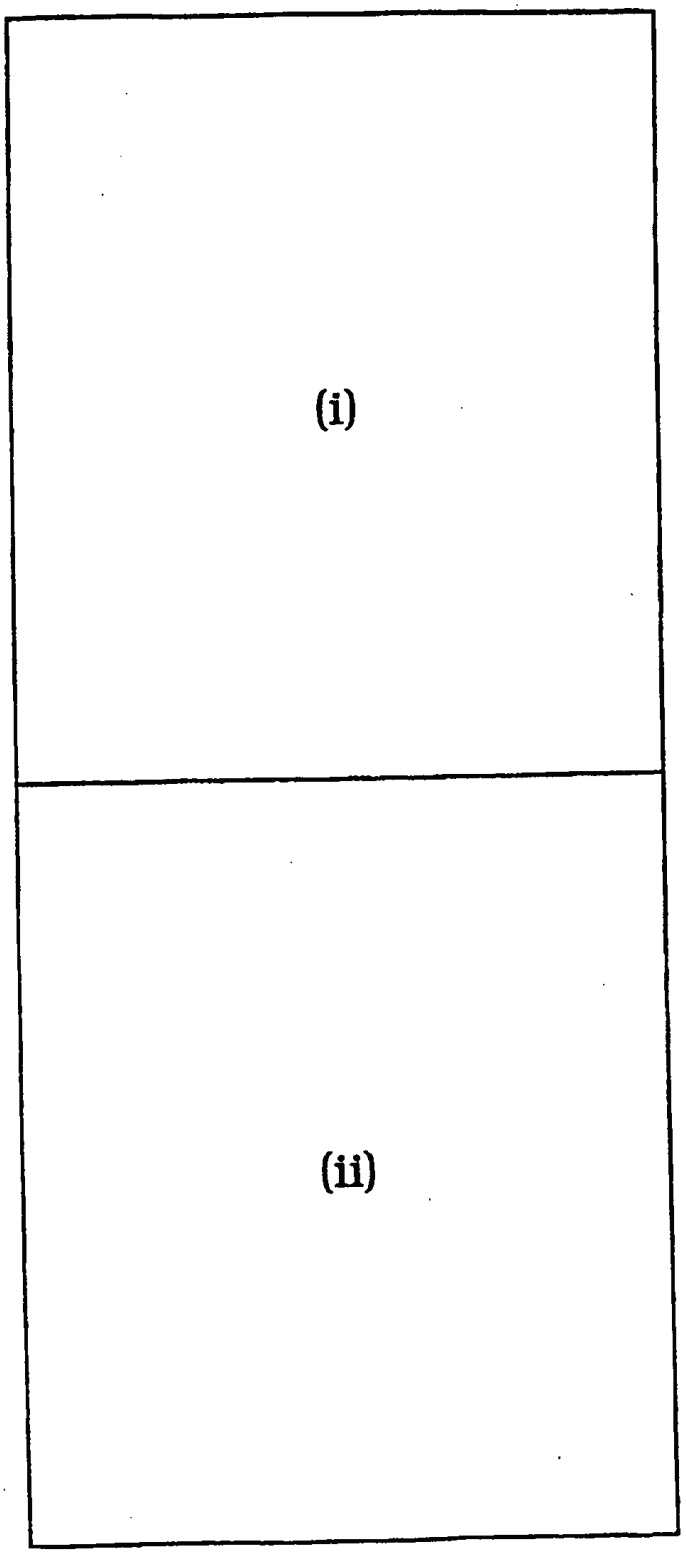


Figura 12b

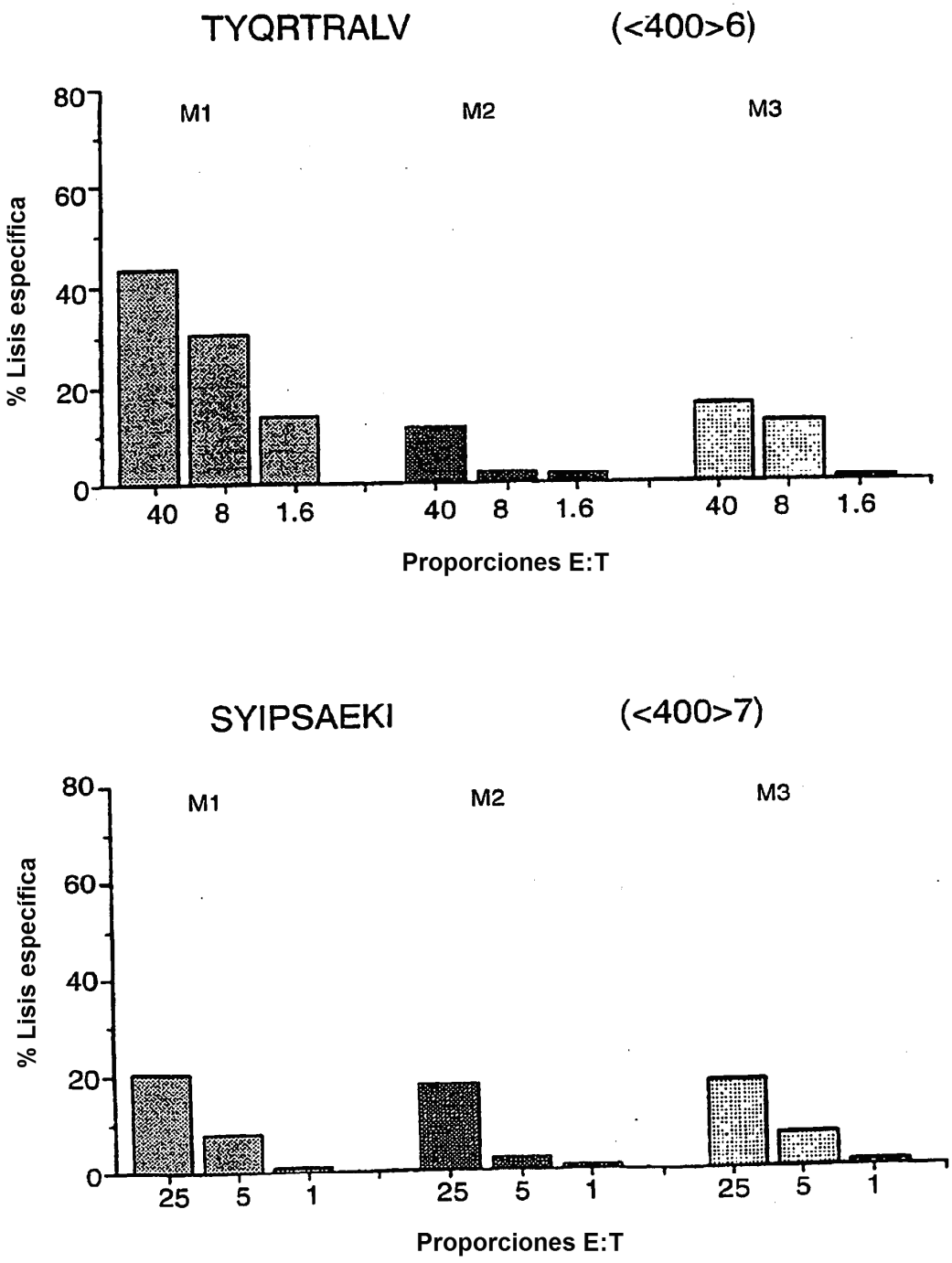

TYQRTRALV (<400>6)
M1
M2
M3
% Lisis específica
80
60
40
20
0
40 8 1.6
40 8 1.6
40 8 1.6
Proporciones E:T
SYIPSAEKI (<400>7)
M1
M2
M3
% Lisis específica
80
60
40
20
0
25 5 1
25 5 1
25 5 1
Proporciones E:T

Figura 12b (i)

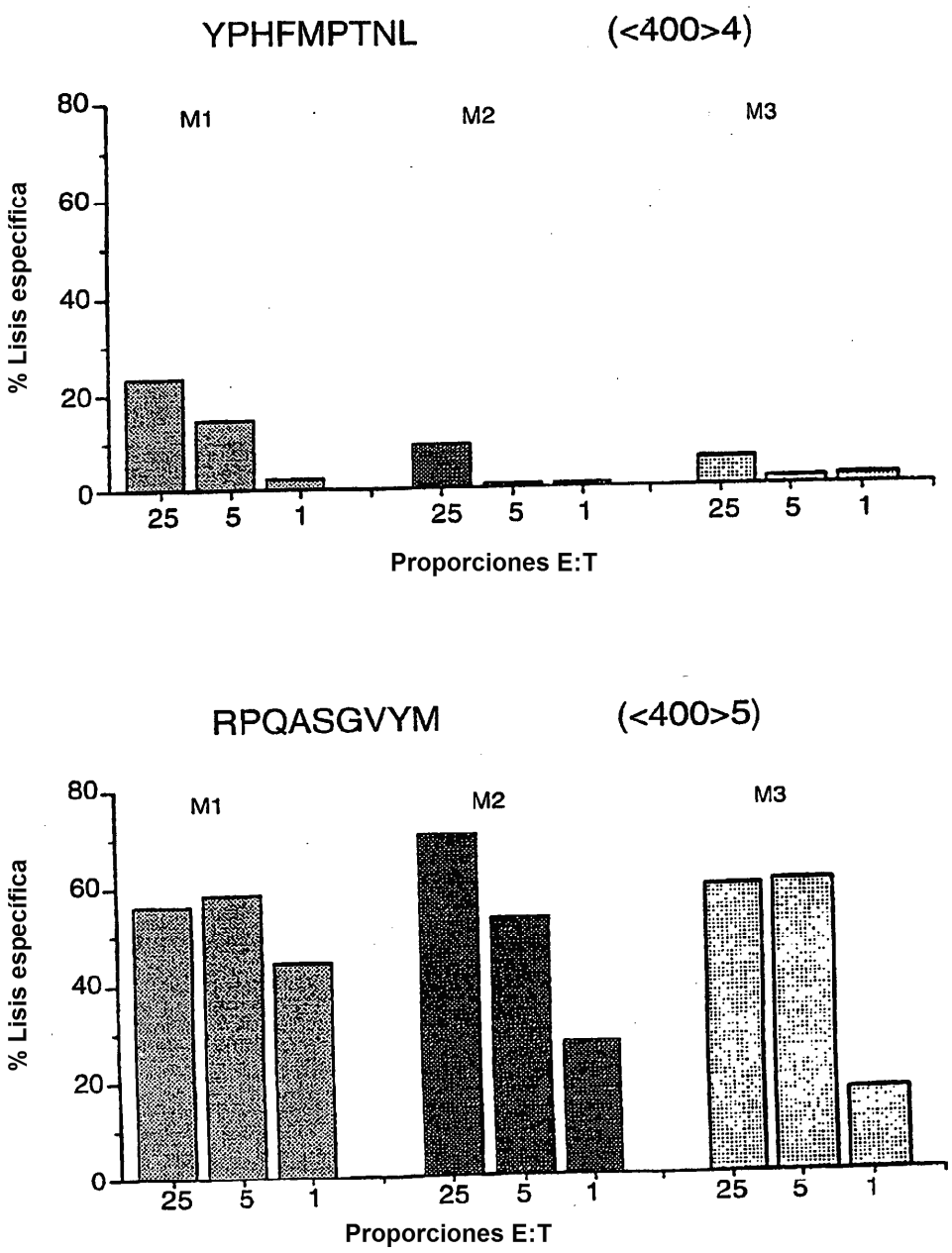


Figura 12b (ii)

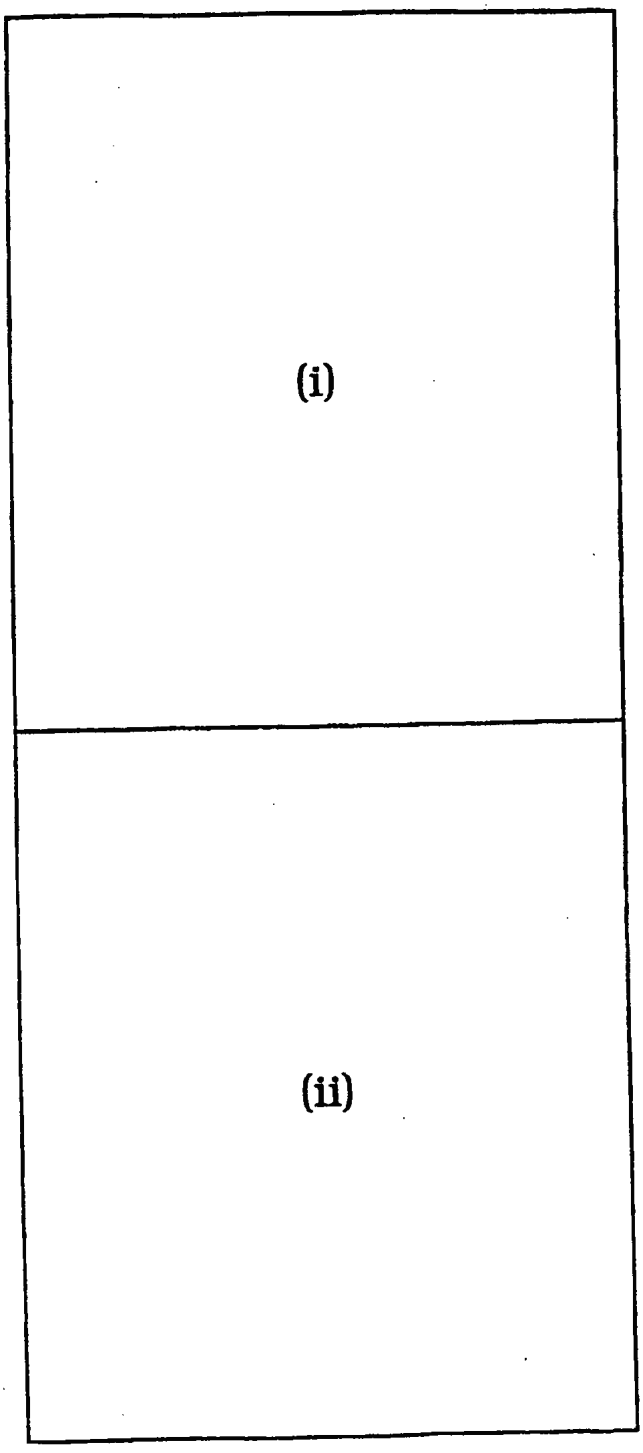
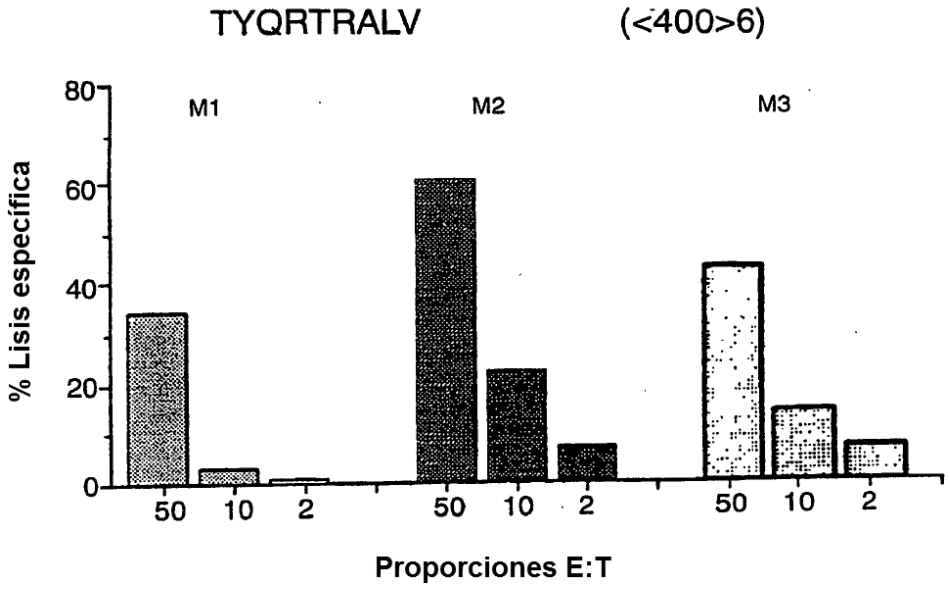


Figura 12c


TYQRTRALV
(<400>6)
M1
M2
M3
% Lisis específica
80
60
40
20
0
50
10
2
Proporciones E:T

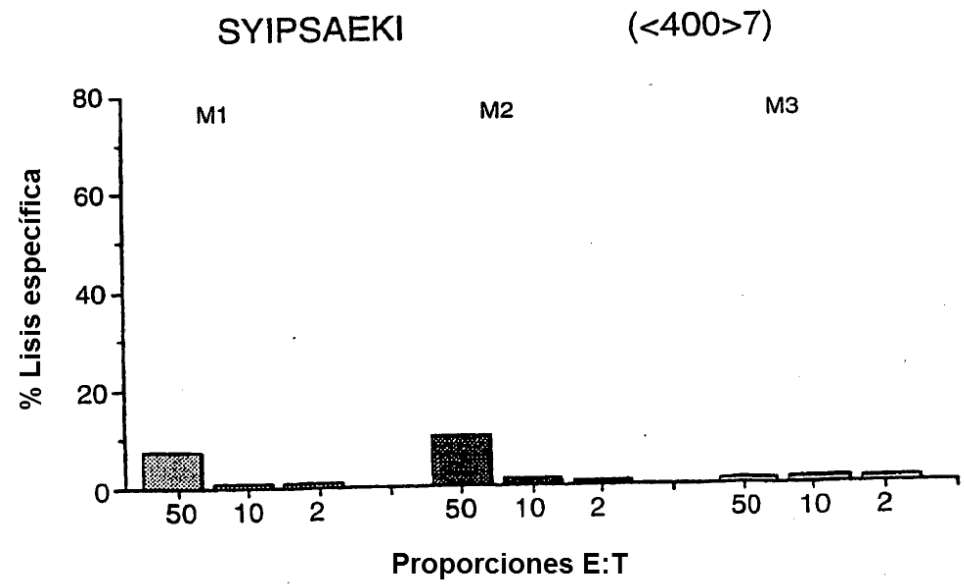
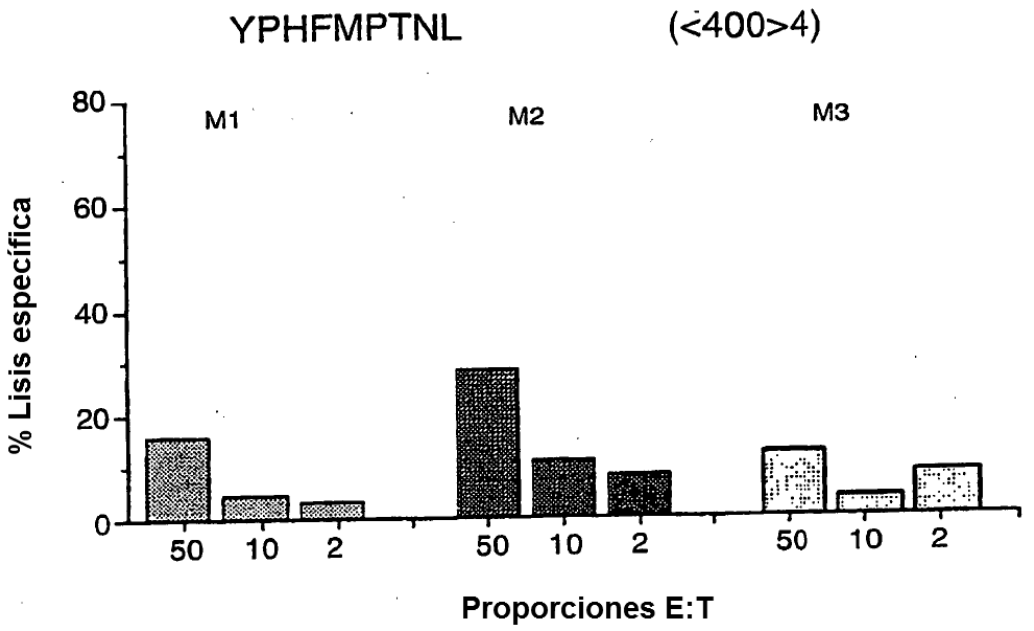

SYIPSAEKI
(<400>7)
M1
M2
M3
% Lisis específica
80
60
40
20
0
50
10
2
Proporciones E:T

Figura 12c (i)



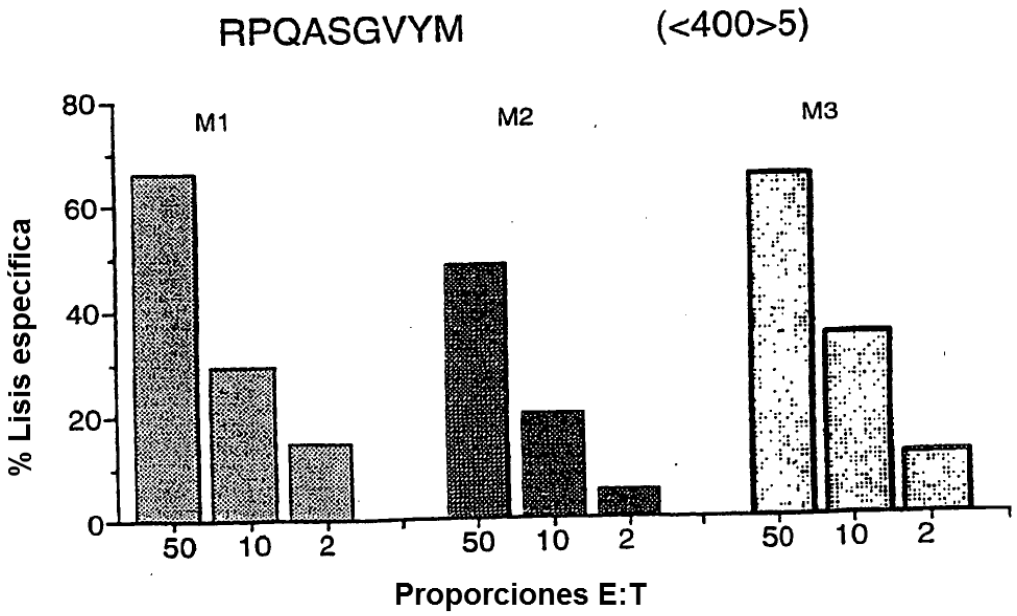


Figura 12c (ii)

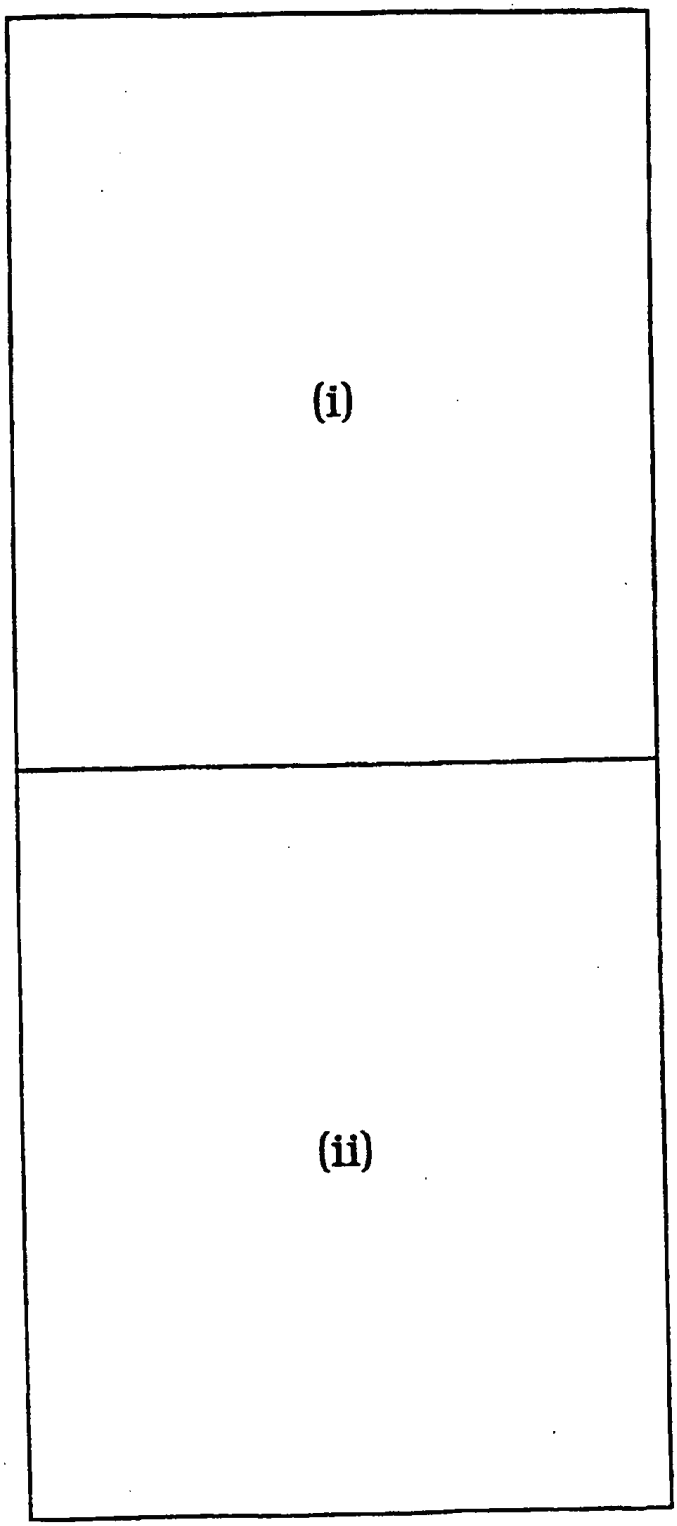
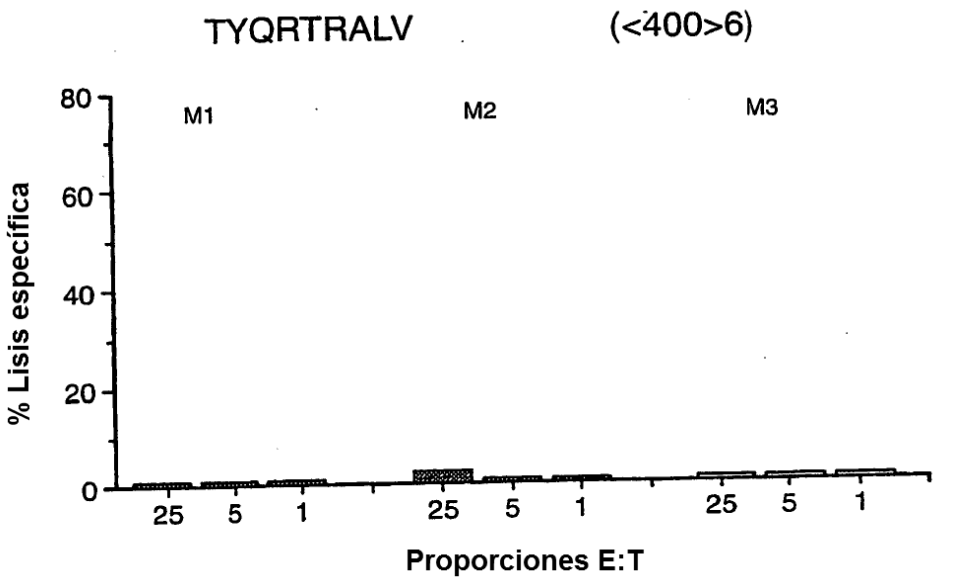


Figura 12d


TYQRTRALV
(<400>6)
M1
M2
M3
% Lisis específica
80
60
40
20
0
25
5
1
25
5
1
25
5
1
Proporciones E:T

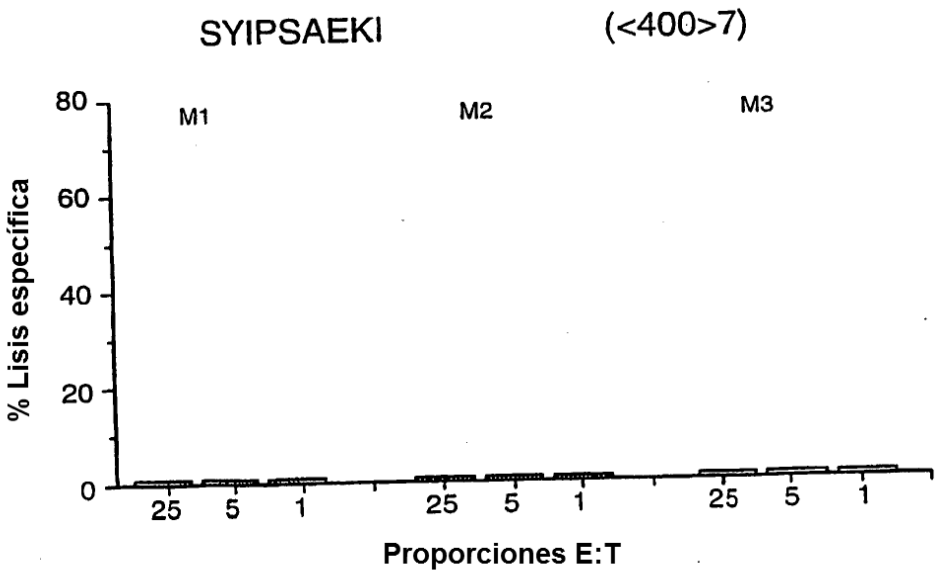
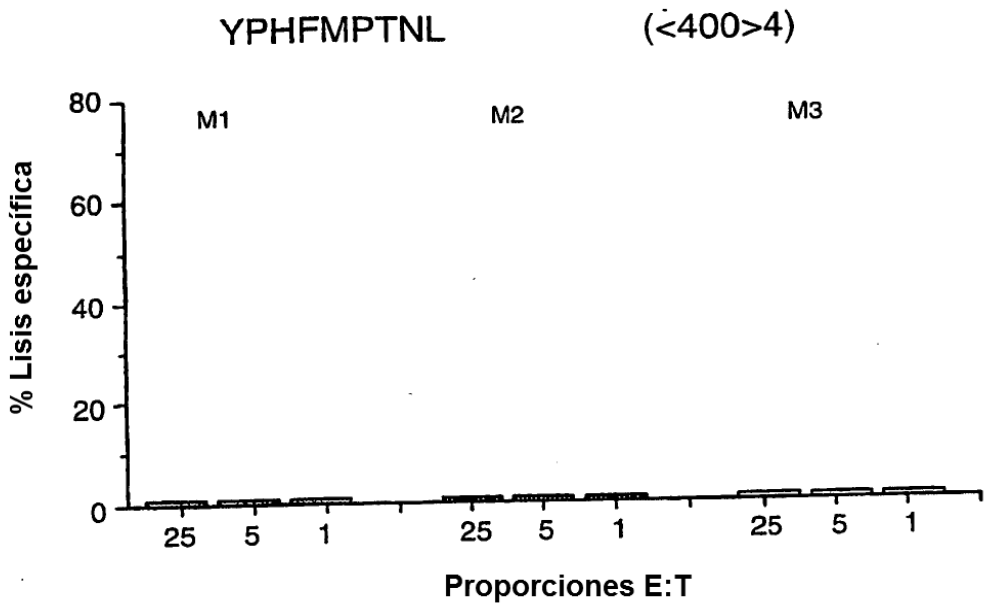

SYIPSAEKI
(<400>7)
M1
M2
M3
% Lisis específica
80
60
40
20
0
25
5
1
25
5
1
25
5
1
Proporciones E:T

Figura 12d (i)



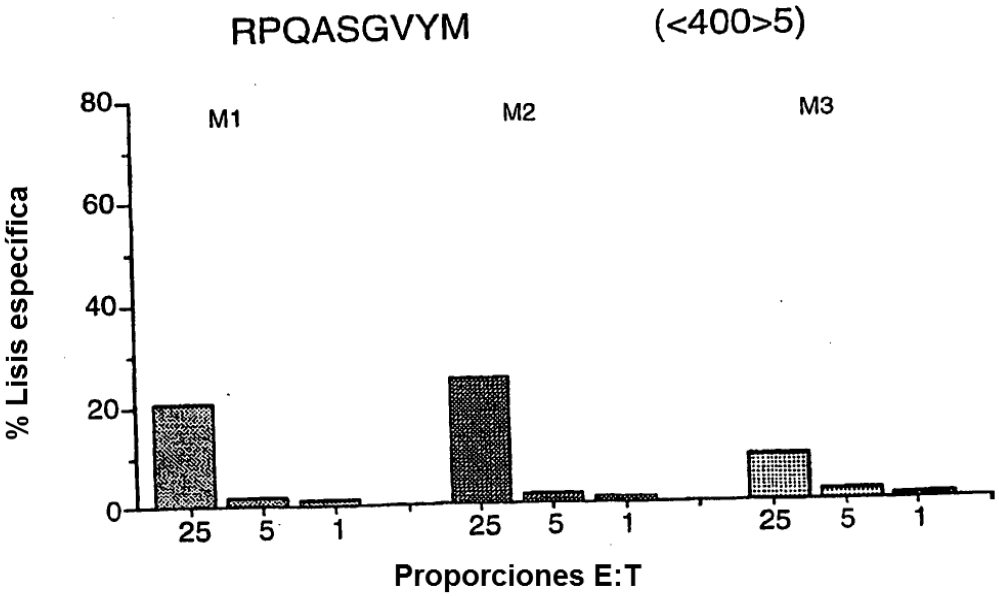


Figura 12d (ii)

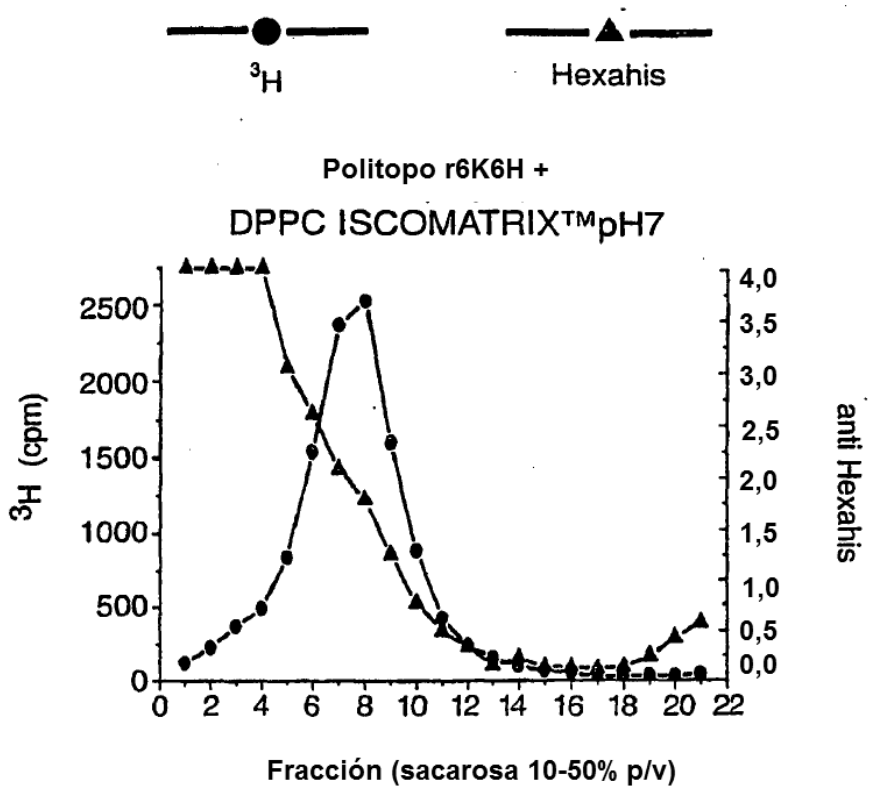


Figura 13a

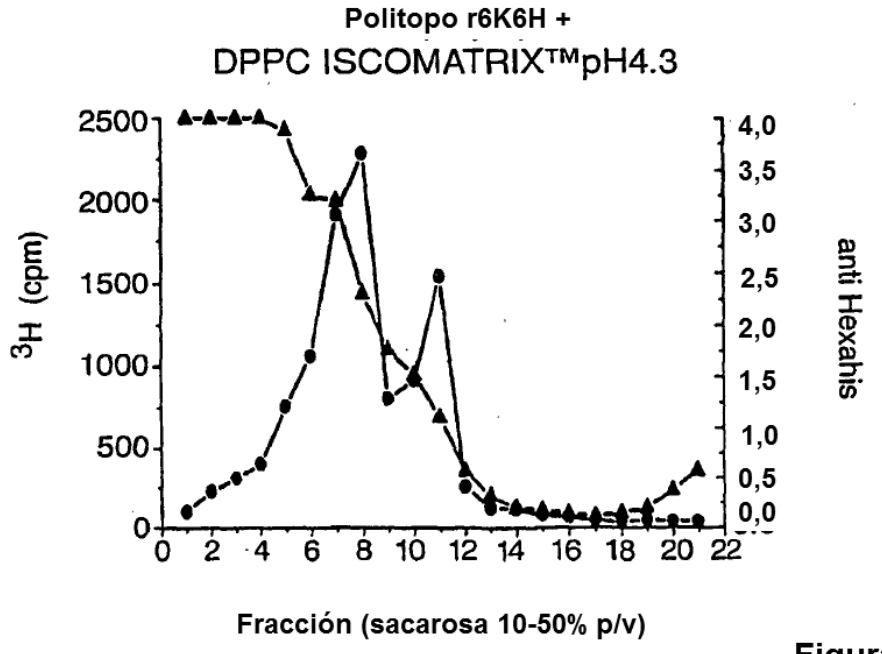


Figura 13b

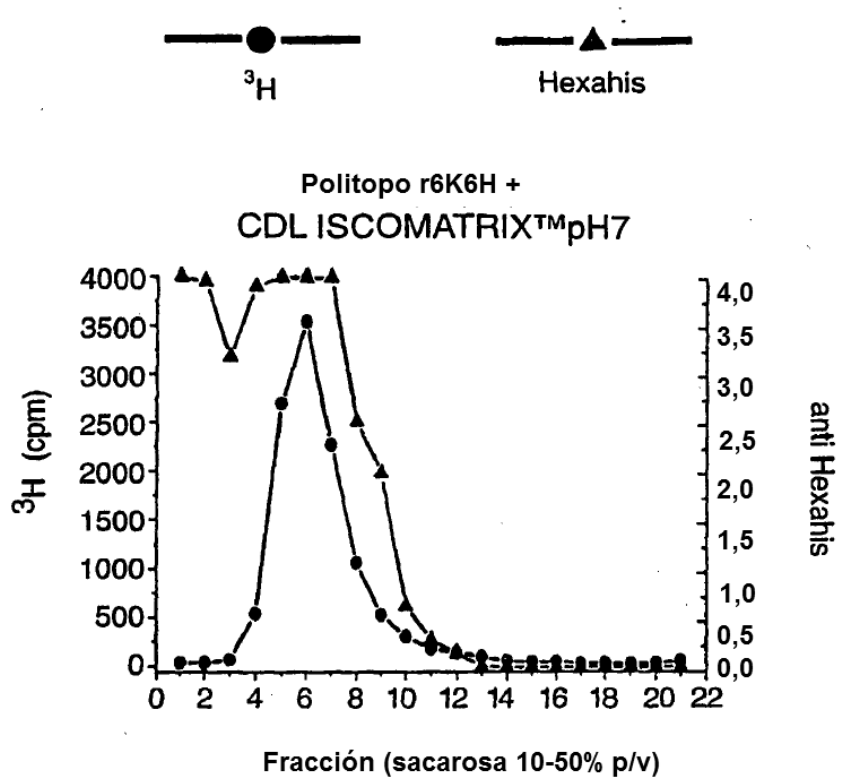


Figura 13c

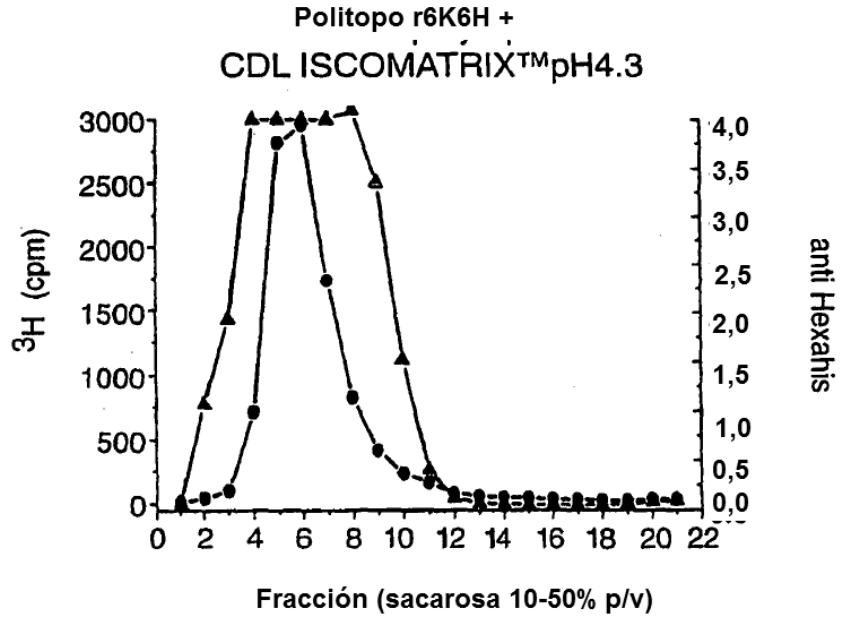


Figura 13d

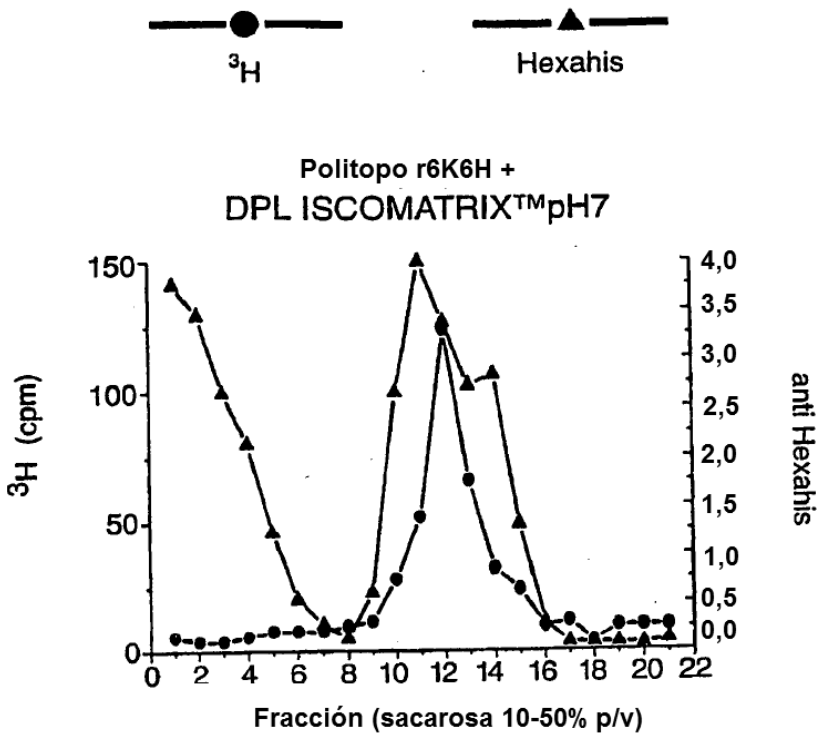


Figura 13e

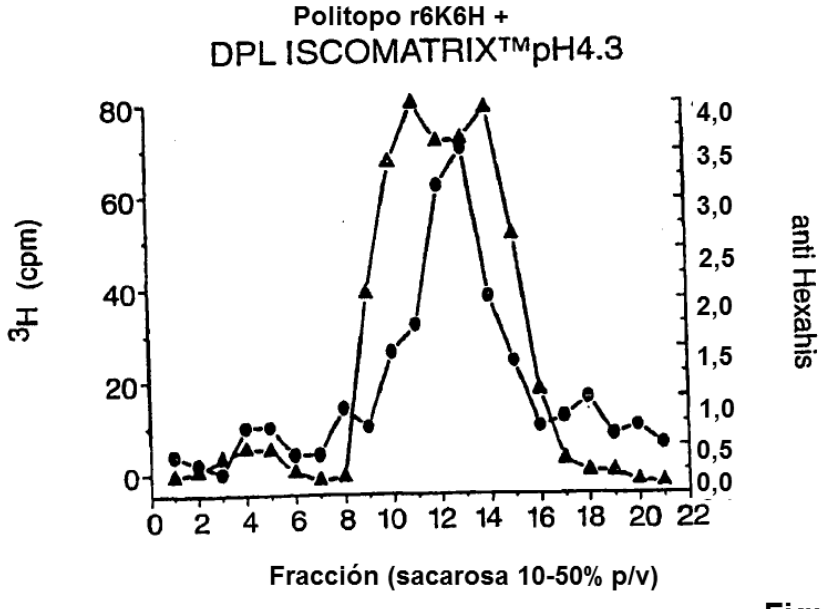


Figura 13f

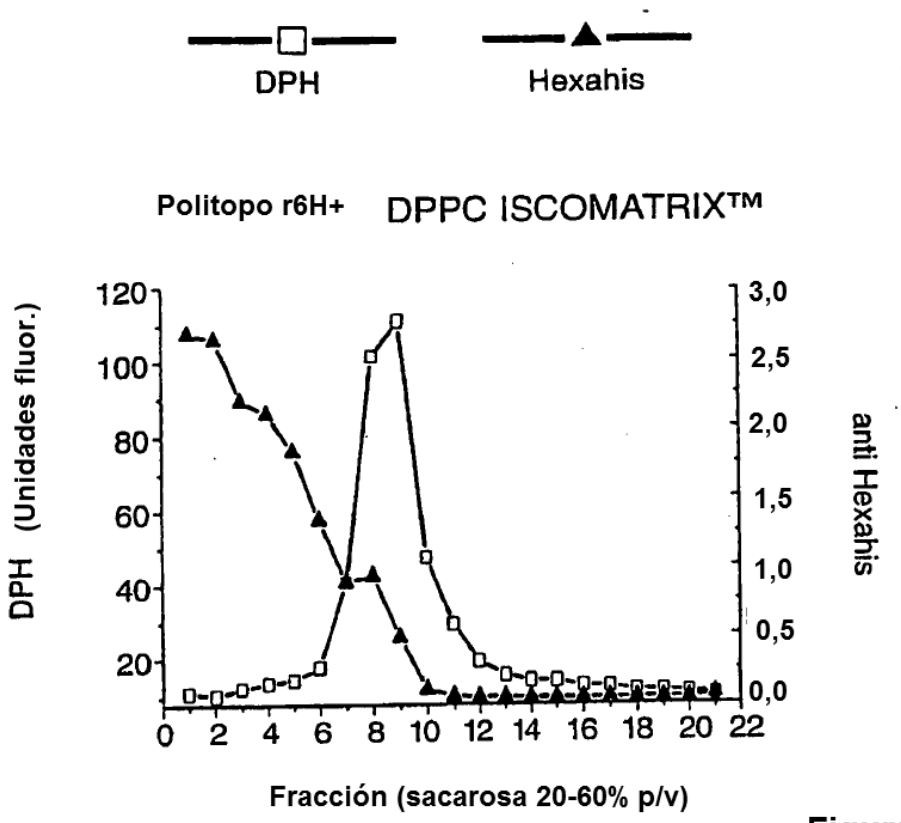


Figura 13g

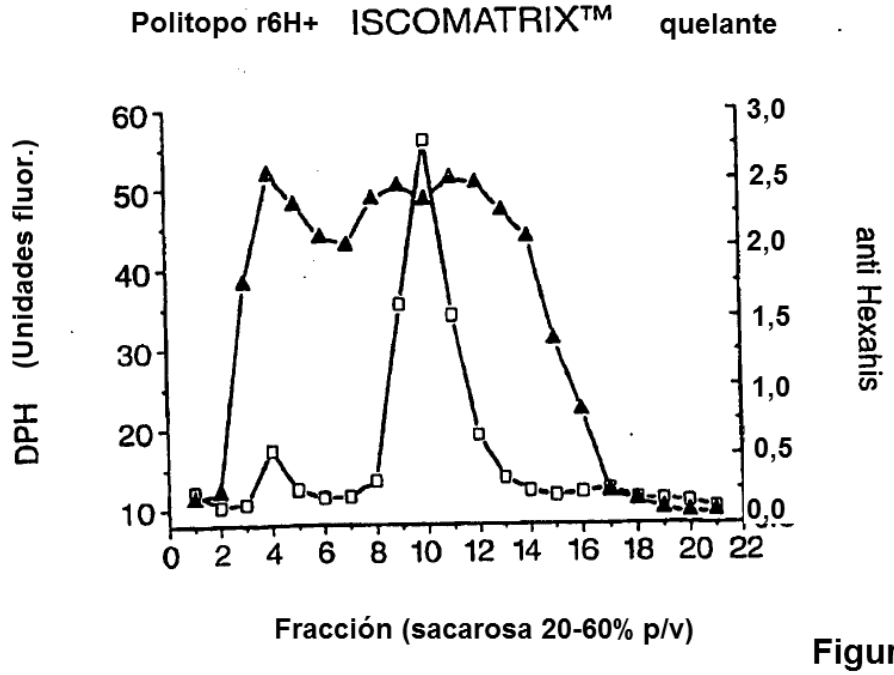


Figura 13h

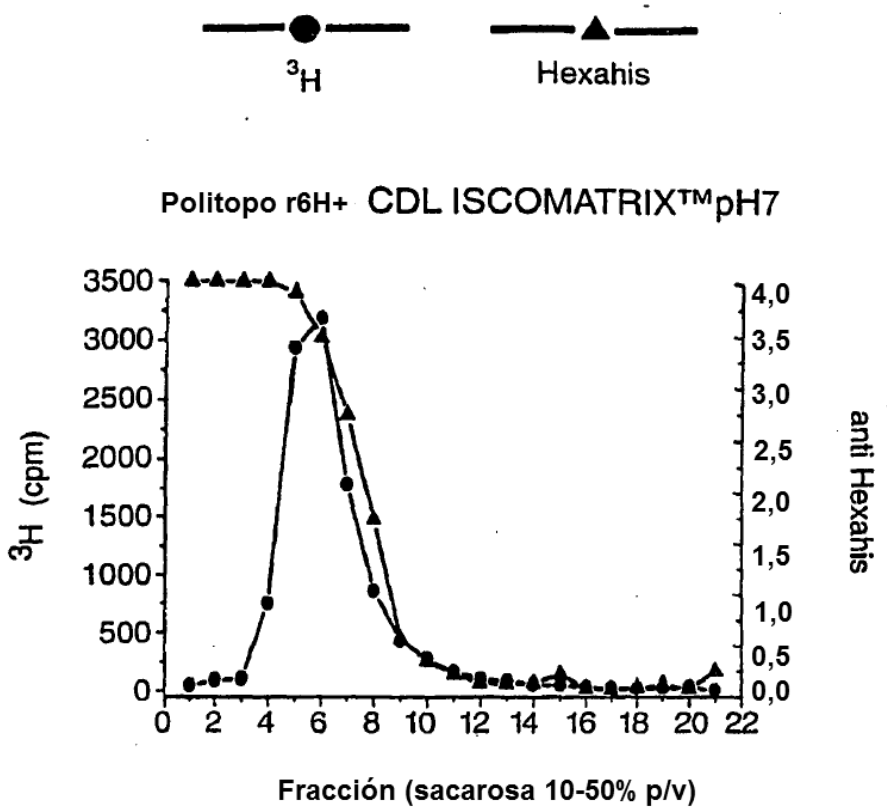


Figura 13i

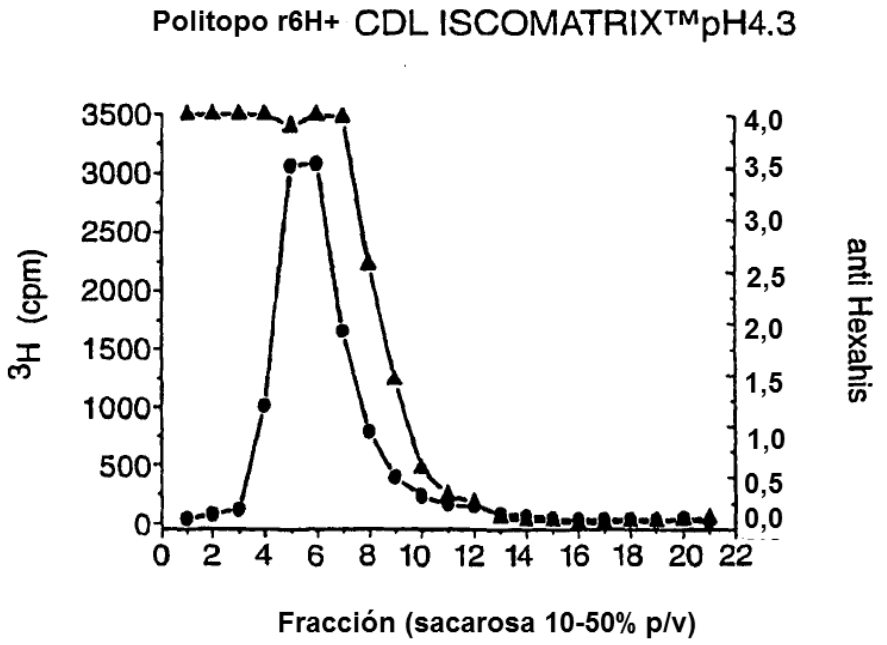


Figura 13j

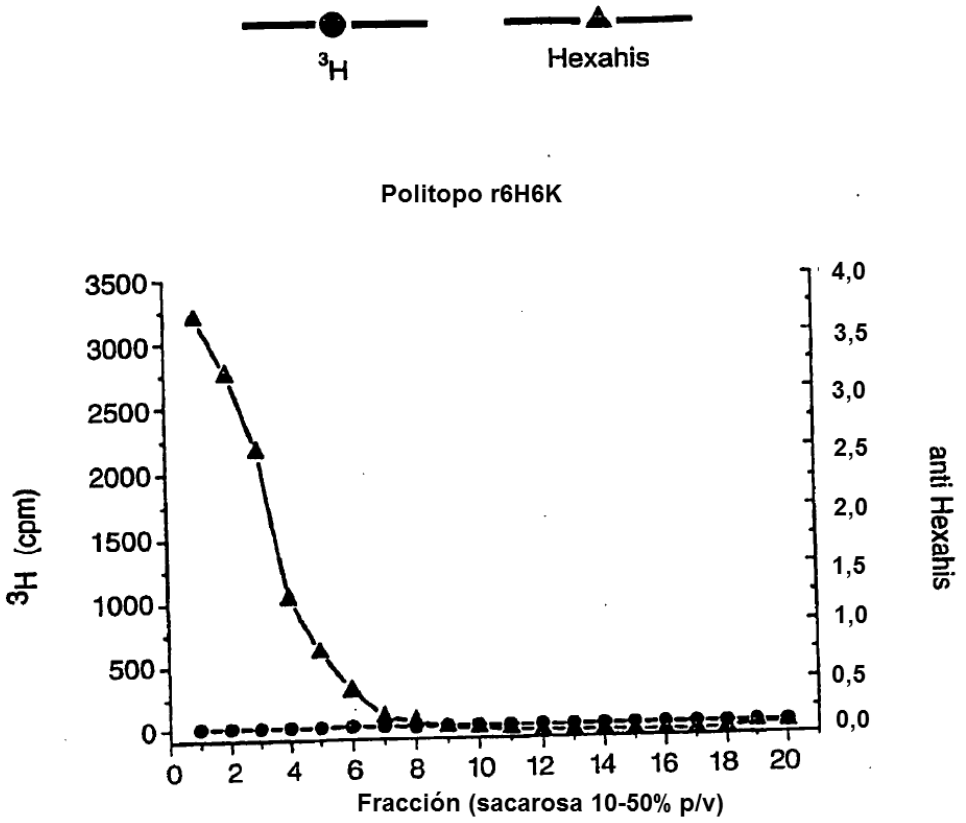

^{3}H
Hexahis
Politopo r6H6K
^{3}H (cpm)
anti Hexahis
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
Fracción (sacarosa 10-50% p/v)

Figura 13k

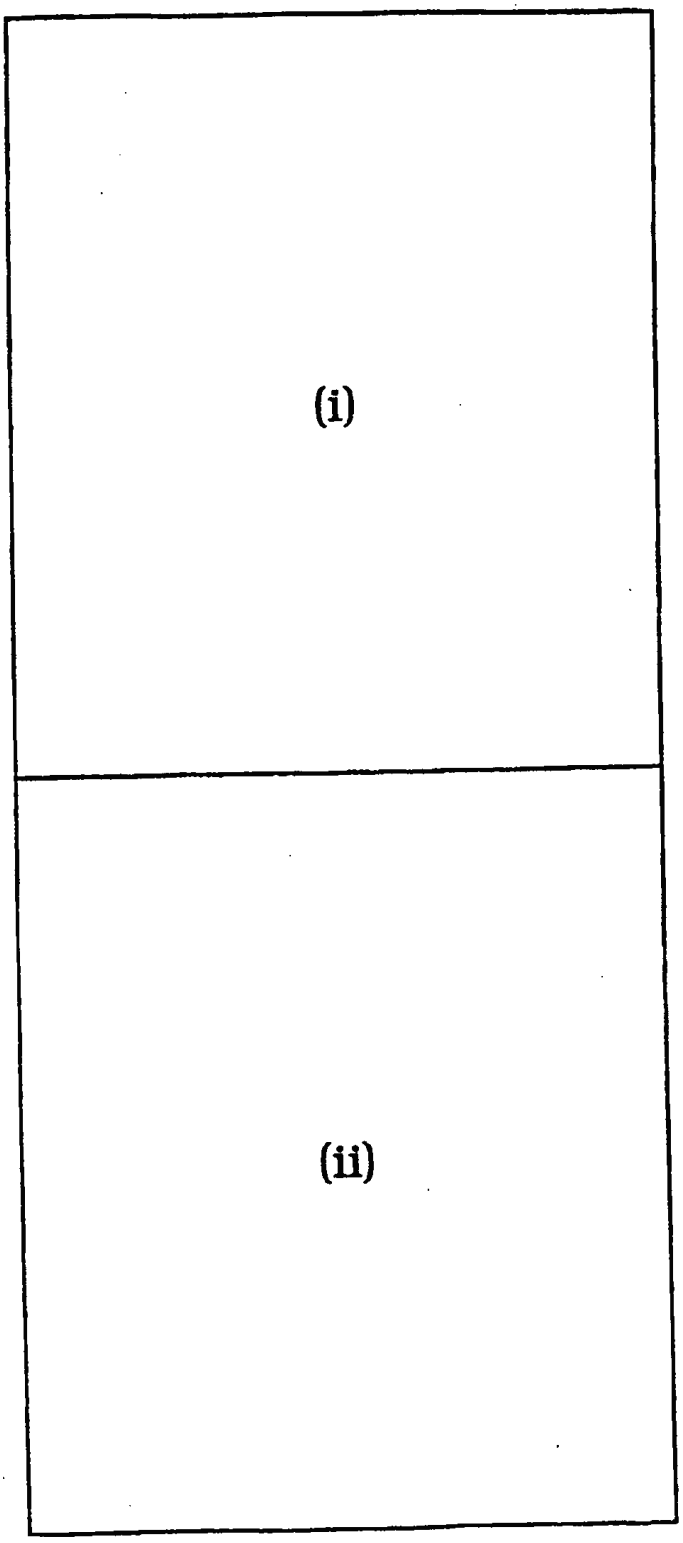
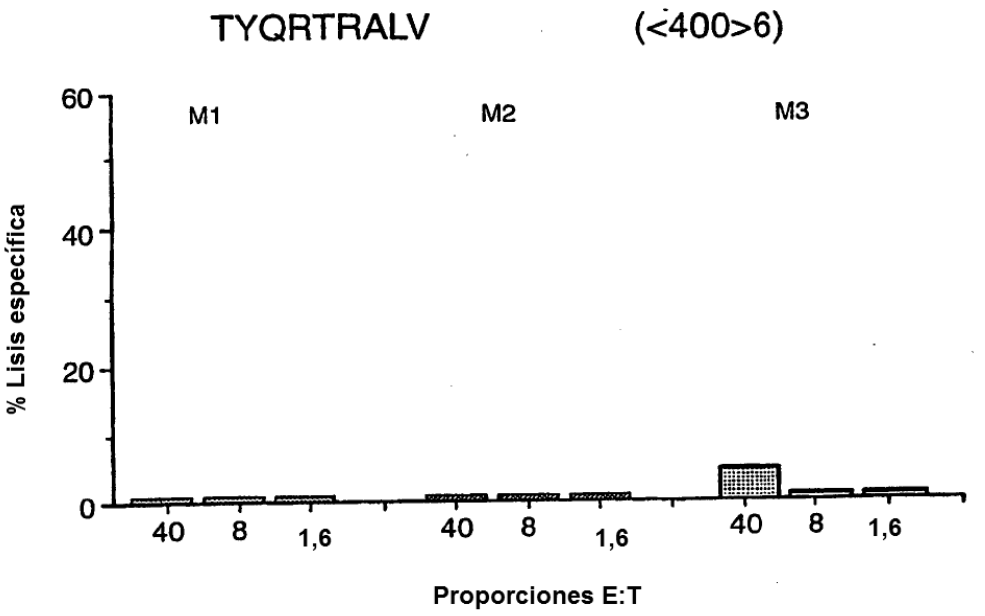


Figura 14a


TYQRTRALV (<400>6)
M1
M2
M3
60
40
20
0
% Lisis específica
40
8
1,6
40
8
1,6
40
8
1,6
Proporciones E:T

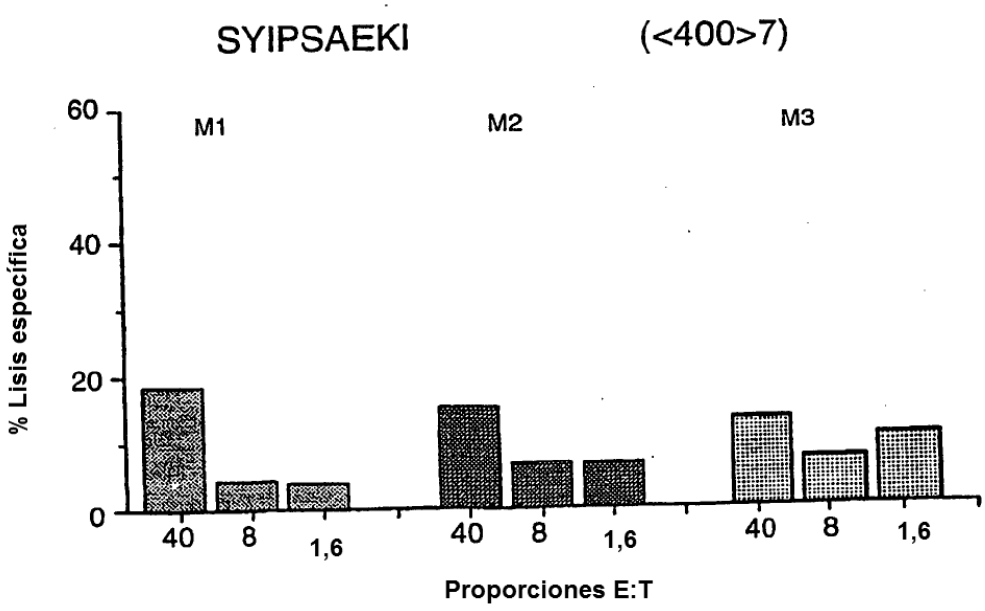
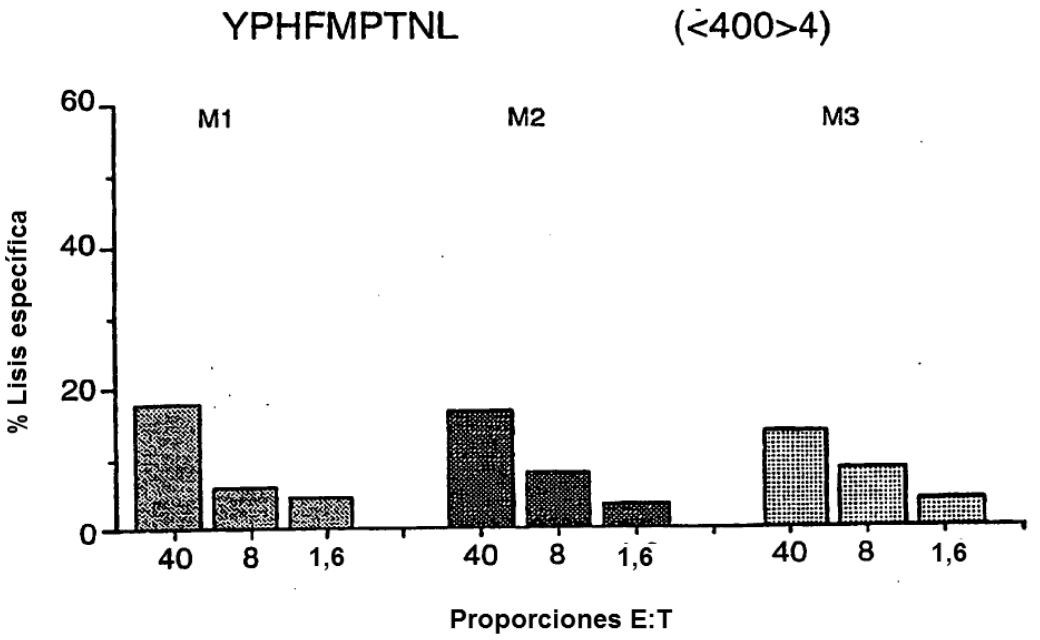

SYIPSAEKI (<400>7)
M1
M2
M3
60
40
20
0
% Lisis específica
40
8
1,6
40
8
1,6
40
8
1,6
Proporciones E:T

Figura 14a (i)



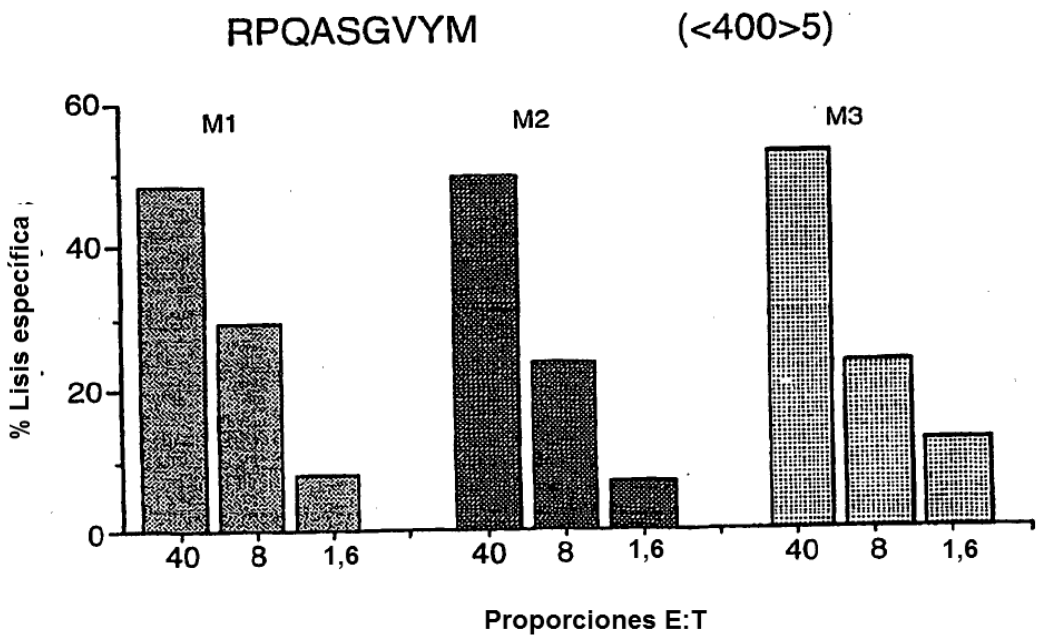


Figura 14a (ii)

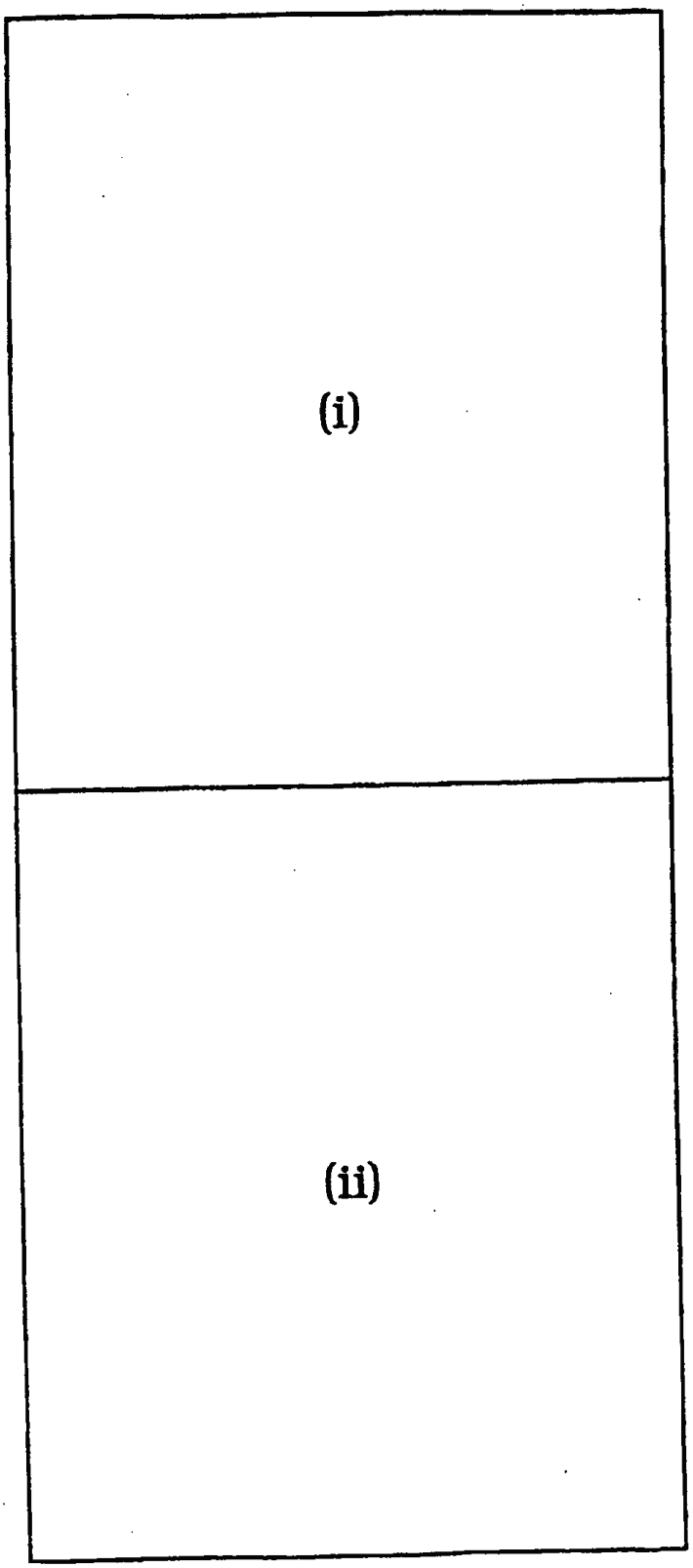
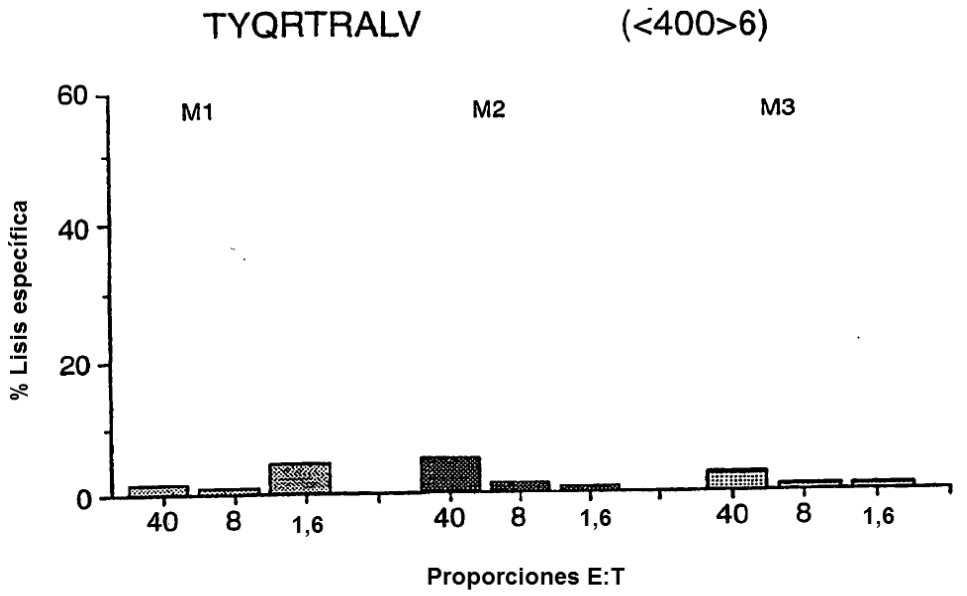


Figura 14b


TYQRTRALV
(<400>6)
M1
M2
M3
% Lisis específica
60
40
20
0
40
8
1,6
40
8
1,6
40
8
1,6
Proporciones E:T

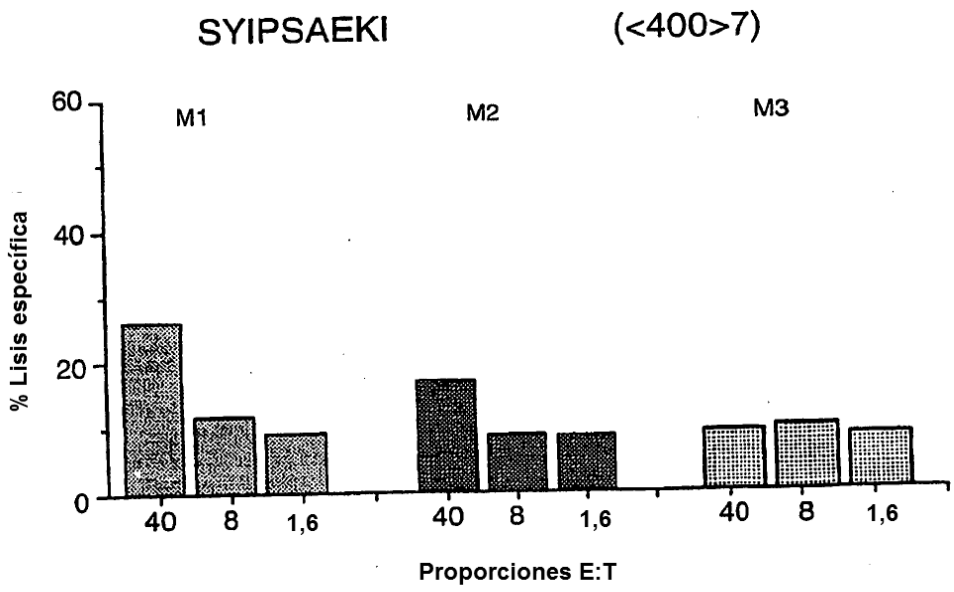
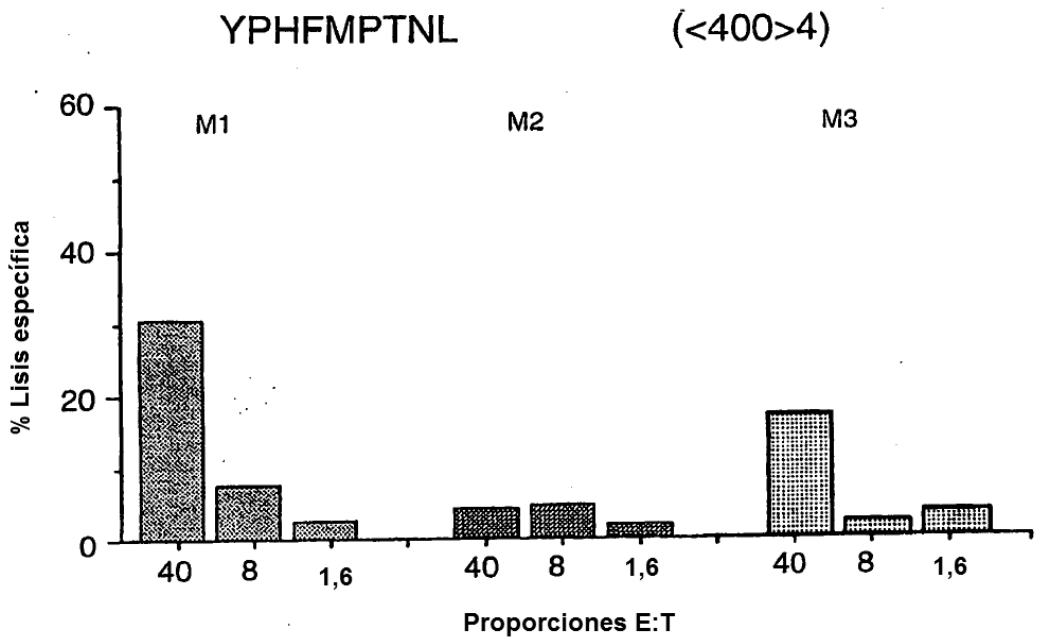

SYIPSAEKI
(<400>7)
M1
M2
M3
% Lisis específica
60
40
20
0
40
8
1,6
40
8
1,6
40
8
1,6
Proporciones E:T

Figura 14b (i)



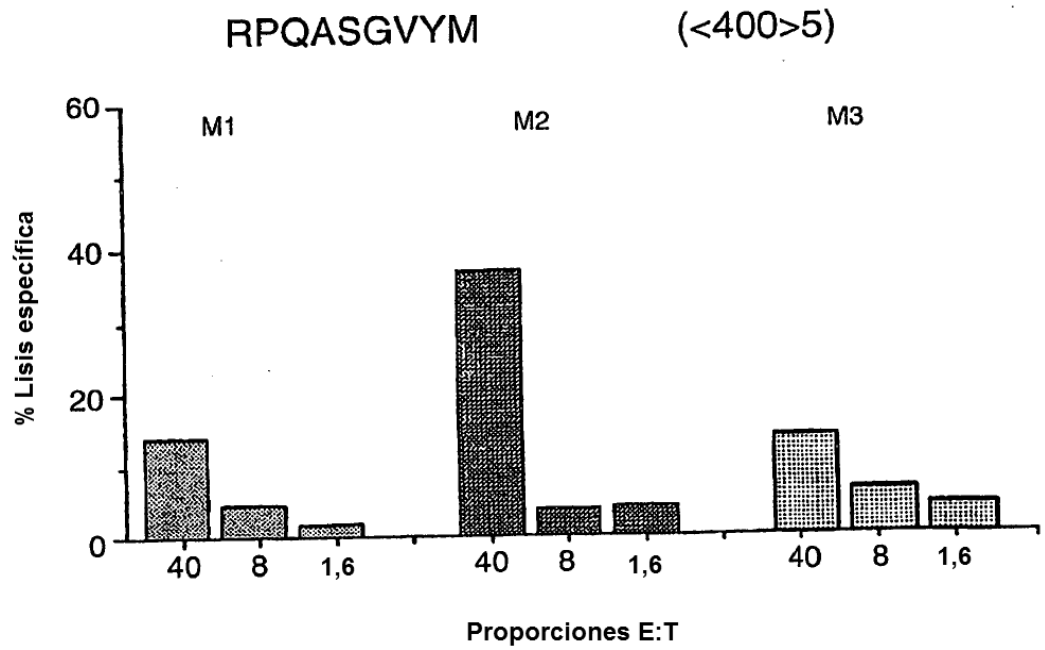


Figura 14b (ii)

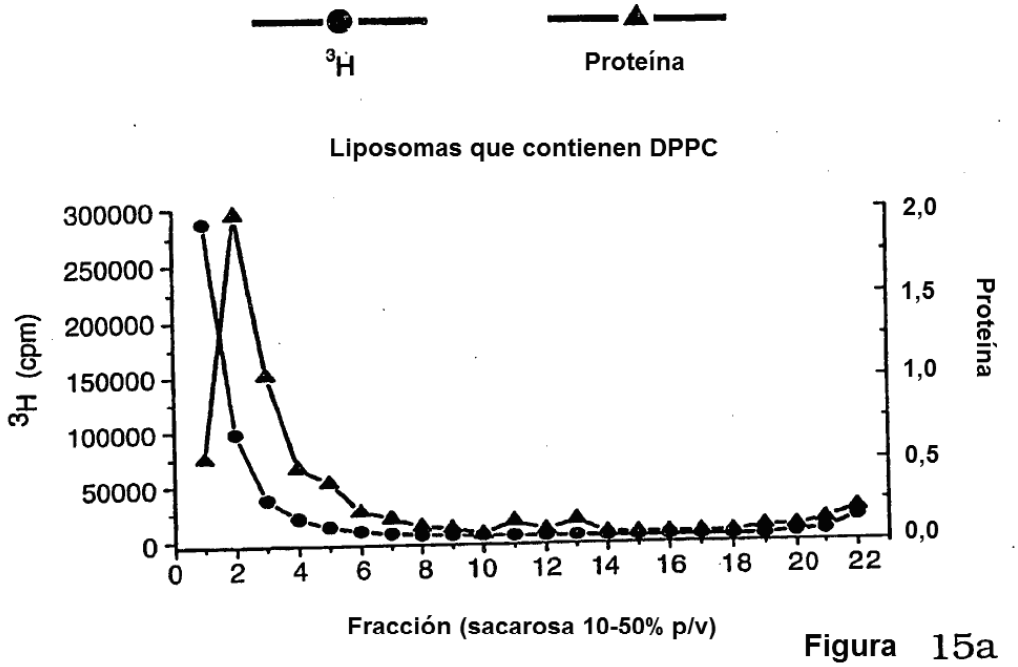


Figura 15a

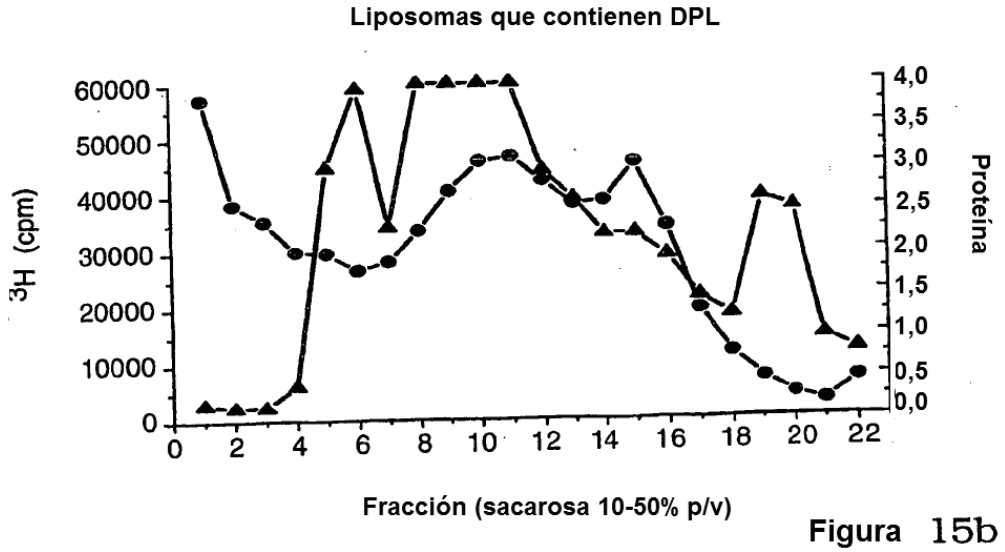


Figura 15b