

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 120**

51 Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2009 E 15159788 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2987502**

54 Título: **Adyuvantes peptídicos**

30 Prioridad:

28.11.2008 US 118533 P

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

05.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 615 120 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Adyuvantes peptídicos

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere generalmente a adyuvantes, composiciones inmunogénicas y métodos útiles para la vacunación basada en polinucleótidos. La presente invención proporciona composiciones y métodos útiles para potenciar la respuesta inmune, especialmente la respuesta inmune humoral de los vertebrados.

Antecedentes de la invención

- 10 Las composiciones de vacuna incluyen a menudo adyuvantes inmunológicos para potenciar las respuestas inmunitarias. Por ejemplo, el Adyuvante Completo de Freund (CFA) es un potente agente inmunoestimulador que se ha utilizado con éxito con muchos antígenos de modo experimental. CFA incluye tres componentes: un aceite mineral, un agente emulsionante y micobacterias muertas, tal como *Mycobacterium tuberculosis*. Se mezclan soluciones de antígeno acuosas con estos componentes para crear una emulsión de agua en aceite. Aunque eficaz como adyuvante, la CFA causa efectos secundarios graves, incluyendo dolor, formación de abscesos y fiebre, principalmente debido a la presencia del componente micobacteriano. CFA, por lo tanto, no se utiliza en vacunas humanas y veterinarias.

- 20 Los adyuvantes inmunológicos ayudan a aumentar las respuestas inmunes inducidas por vacunas. Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la respuesta inmune específica potenciada frente al antígeno generada por la vacuna con adyuvante. En primer lugar, el adyuvante puede promover una liberación lenta del antígeno exponiéndolo al sistema inmune durante un periodo de tiempo prolongado y consecuentemente estimulando una respuesta inmunitaria más fuerte y posiblemente mejor definida. En segundo lugar, el adyuvante también puede ayudar a la liberación y absorción del complejo antigénico a células presentadoras de antígeno (APCs) tales como macrófagos y células dendríticas que a su vez pueden migrar a órganos linfoides e iniciar una respuesta concertada en interacción con células T y B. En tercer lugar, las células inmunes que incluyen APCs pueden ser activadas directamente por el adyuvante y luego iniciar una respuesta inmune más rápida y más fuerte a través de la estimulación subsecuente de células T y B. Las emulsiones de aceite en agua ingeridas por macrófagos que luego pueden migrar a los ganglios linfáticos drenantes, o moléculas estimuladoras de TLRs tales como ADN que contiene dinucleótido CpG no metilado, son ejemplos de adyuvantes que actúan principalmente de acuerdo con estos mecanismos. Un paradigma interesante con respecto a la reacción inmune es que las respuestas inmunes son generalmente más robustas cuando son estimuladas por un antígeno de rara aparición que por un antígeno encontrado con frecuencia en la naturaleza. El presente estudio explora la posibilidad de usar secuencias peptídicas cortas no presentes u observadas una sola vez en proteomas conocidos como inmunomoduladores para potenciar las respuestas inmunes inducidas por vacunas y protección contra infecciones virales letales.

- 35 El documento US 6.100.380 se refiere a péptidos inmunomoduladores y describe el uso de los pentapéptidos de la fórmula R'-Glx-Glx-Lys-R" en los que Glx es Glu o Gln. En particular, esta patente proporciona los péptidos Thr-Ala-Glu-Glu-Lys y Thr-Pro-Glu-Glu-Lys. La solicitud PCT del documento WO 1996/19494 A1 se refiere a péptidos que tienen actividad inmunomoduladora y proporciona el tetrapéptido H-Lys-Asn-Pro-Try-OH y análogos de los mismos como inmunomoduladores. Particularmente, el documento WO 1996/19494 A1 enseña el uso de dichos péptidos como adyuvante de vacuna.

40 Compendio de la invención

- De acuerdo con un primer aspecto, se proporciona un método de estimulación una respuesta inmune a un antígeno que comprende coadministrar a un individuo en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de una composición que comprende un antígeno y un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos KYMCW (SEQ ID NO: 12).

- 45 De acuerdo con un segundo aspecto, se proporciona una secuencia de péptido inmunoestimuladora que consiste en un péptido como se expone en SEQ ID NO: 12.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una composición una cantidad eficaz de un péptido adyuvante que consiste en una secuencia de aminoácidos KYMCW (SEQ ID NO: 12) y un antígeno de interés.

- 50 De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un método para estimular una respuesta inmune o potenciar una respuesta inmune a un antígeno que comprende administrar a un individuo que necesita o desea tal tratamiento una cantidad eficaz de un péptido adyuvante que consiste en la secuencia de aminoácidos KYMCW (SEQ ID NO: 12).

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona el uso de un péptido adyuvante que consiste en la secuencia de aminoácidos KYMCW (SEQ ID NO: 12); para estimular una respuesta inmune o potenciar una respuesta inmune a un antígeno en un individuo que necesita o desea tal tratamiento.

- 55 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de preparación de un medicamento

para estimular una respuesta inmune o potenciar una respuesta inmune frente a un antígeno que comprende mezclar una cantidad eficaz de un péptido adyuvante que consiste en KYMCW (SEQ ID NO: 12) con un excipiente adecuado.

5 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Ensayo de puntos por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISPOT). Respuesta de las células T tras la inmunización. Se vacunaron ratones BALB/c vía i.m. con 50 µg de vacuna de ADN pCAGα-HA que contenía uno cualquiera de: péptido foráneo 5mer1 (CHKWD (SEQ ID NO: 1)), 5mer2 (WHKCE (SEQ ID NO: 2)), 5mer3 (CKWRC (SEQ ID NO: 3)), 5mer4 (KWCEC (SEQ ID NO: 4)), 5mer5 (DCWMD (SEQ ID NO: 5)), 9mer1 (CWKCWCMFE (SEQ ID NO: 6)), 9mer3 (WNWCMHWDC (SEQ ID NO: 7)), 9mer4 (WHWCMMCWD (SEQ ID NO: 8)), 13mer1 (HEHWCMWCCMI (SEQ ID NO: 9)), 13mer3 (HMMCHWMCWCDMH (SEQ ID NO: 10)), o 13mer14 (CHMMCHWMCWCCMD (SEQ ID NO: 11)) fusionado al extremo carboxilo-terminal de HA. pCAGα-HA (50 µg) representa la respuesta basal de las células T. Los péptidos solapantes que abarcan toda la proteína HA de Hanoi 2005 se agruparon (10 péptidos / grupo) y se usaron para reestimar los esplenocitos. Los esplenocitos se recolectaron 10 días después de la vacunación y se reestimularon utilizando grupos de péptidos derivados de HA. Los datos representan la frecuencia de puntos por un millón de esplenocitos. Se analizaron 4 ratones por grupo. A partir de los datos se puede observar que no todos los péptidos hidrófobos produjeron una respuesta inmune igual.

Figura 2: Se realizó una neutralización de la respuesta de anticuerpos después de la inmunización para detectar la presencia de anticuerpos en suero que se esperaría para contrarrestar la infección. Se vacunaron ratones BALB/c vía i.m. con 50 µg de vacuna de ADN pCAGα-HA que contenía uno cualquiera de: péptido foráneo 5mer1 (SEQ ID NO: 1), 5mer2 (SEQ ID NO: 2), 5mer3 (SEQ ID NO: 3), 5mer4 (SEQ ID NO: 4), 5mer5 (SEQ ID NO: 5), 9mer1 (SEQ ID NO: 6), 9mer3 (SEQ ID NO: 7), 9mer4 (SEQ ID NO: 8), 13mer1 (SEQ ID NO: 9), 13mer3 (SEQ ID NO: 10), o 13mer14 (SEQ ID NO: 11) y HA. Los sueros recogidos de ratones inmunizados se evaluaron mediante ensayos de neutralización. Para los ensayos de neutralización, los sueros se trataron durante la noche a 37°C con la enzima destructora del receptor (RDE) y luego se inactivaron a 56°C durante 45 minutos. Se prepararon dos diluciones en serie de cada muestra, comenzando con una dilución 1:10, en un diluyente de virus y se mezclaron con igual volumen del aislado de virus de influenza homólogo usado para inmunización (100 unidades formadoras de placa (PFU) por pocillo) y se incubaron a 37°C durante 60 minutos. La mezcla se transfirió a continuación sobre células MDCK subconfluentes en placas de fondo plano de 96 pocillos y se incubó durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos control se infectaron con igual cantidad de vector viral sin adición de suero o con suero control no inmune. Se añadieron entonces 100 µl de diluyente de virus suplementado con 2,0 µg/ml de TPCK-tripsina a cada pocillo y se incubaron las placas a 37 °C, CO₂ al 5% durante 48 h. Las células se marcaron posteriormente por la presencia o la ausencia de efectos citopáticos (CPE) bajo un microscopio de luz. La dilución de suero más alta que no exhibía CPE se marcó positiva para el anticuerpo neutralizante y los títulos de neutralización se indicaron como el recíproco de esta dilución. Los péptidos que generaron una alta respuesta de células T también generaron una alta respuesta de anticuerpo neutralizante.

Figura 3: Respuesta de las células inmunes y eficacia protectora después de la inmunización con una vacuna de ADN recombinante de péptido foráneo. Se vacunaron los ratones BALB/c vía i.m. con 50 µg por ratón con la vacuna de ADN pCAGα-HA que contenía o bien el péptido anterior 5mer4 (KWCEC (SEQ ID NO: 4)) o 5mer7 (SEQ ID NO: 12) fusionado al extremo carboxilo-terminal de HA. Se seleccionó 5mer4 (SEQ ID NO: 4) debido a la alta respuesta de anticuerpos de células T y neutralizantes. Se seleccionó 5mer7 (SEQ ID NO: 12) debido a la similitud de secuencia con 5mer4. Inhibición de la hemaglutinación. Se recogió el suero el día 25 después de la vacunación. Se realizaron diluciones en serie sobre sueros obtenidos de ratones BALB/c vacunados y se añadieron cuatro dosis aglutinantes de virus a cada pocillo. Se incubaron los sueros y el virus con glóbulos rojos de pavo y se indicó la inhibición de la hemaglutinación (título HI) como el recíproco de la dilución más alta de suero que no bloqueaba la aglutinación de eritrocitos. Se vacunaron los ratones control con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. A partir de los datos fue sorprendente ver que péptidos similares se comportaron de manera diferente en el ensayo. Por lo tanto, la secuencia del péptido es importante.

Figura 4: Respuesta de las células inmunes y eficacia protectora después de la inmunización con una vacuna de ADN recombinante de péptido foráneo. Se vacunaron ratones BALB/c vía i.m. con 50 µg por ratón con la vacuna de ADN de pCAGα-HA que contiene o bien el péptido foráneo 5mer4 (SEQ ID NO: 4) o 5mer7 (nº de identificación de secuencia 12) fusionado al extremo carboxilo-terminal de HA. Títulos de anticuerpos neutralizantes (NAB) para ratones vacunados con pCAGα-HA-5mer4 o pCAGα-HA-5mer7. El experimento se repitió 3 veces. Se vacunaron grupos de 10 ratones BALB/c vía i.m. con una dosis única de 1µg de pCAGα-HA-5mer4, 1µg de pCAGα-HA-5mer7, 1µg de pCAGα-HA, 5 µg de pCAGα-HA o 10 µg de pCAGα-HA por ratón. 28 días más tarde se estimularon con 100 LD50 de H5N1A \ Hanoi \ 30408 \ 2005. Los ratones control se vacunaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Esto demuestra que en la respuesta suscitada es una que es eficaz en la generación de anticuerpos que pueden neutralizar eficazmente el virus.

Figura 5: Respuesta de células inmunes y eficacia protectora después de la inmunización con una vacuna de ADN recombinante de péptido foráneo. Se vacunaron los ratones BALB/c vía i.m. con 50 µg por ratón con la vacuna de ADN pCAGα-HA que contiene o bien el péptido foráneo 5mer4 (SEQ ID NO: 4) o 5mer7 (nº de identificación de

secuencia 12) fusionado al extremo carboxilo-terminal de HA. 28 días más tarde se estimularon con 100 LD50 de H5N1 A\ Hanoi \ 30408 \ 2005 y el porcentaje de supervivencia en el tiempo medido. Los ratones de control se vacunaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Estos datos demuestran que la vacunación que usó péptidos como adyuvantes proporcionó un mayor nivel de protección que el antígeno solo. También hay una respuesta a la dosis observada con el adyuvante y que el adyuvante puede resultar en una respuesta inmune más fuerte con niveles más bajos de antígeno.

Figura 6: Respuesta de células inmunes y eficacia protectora después de la inmunización con una vacuna de ADN recombinante de péptido foráneo. Se vacunaron ratones BALB/c vía i.m. con 50 µg por ratón con la vacuna de ADN pCAGα-HA que contiene o bien el péptido foráneo 5mer4 (SEQ ID NO: 4) o 5mer7 (SEQ ID NO: 12) fusionado al extremo carboxilo-terminal de HA. 28 días después se estimularon con 100 LD50 de H5N1 A\ Hanoi \ 30408 \ 2005 y se midió el peso. Los ratones control se vacunaron con tampón fosfato salino (PBS). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Esto demuestra que la vacunación con la combinación péptido-antígeno protege a los animales contra la pérdida de peso, que es un síntoma de la infección por influenza.

Figura 7: Eficacia protectora tras la inmunización con un péptido foráneo libre (exógeno) para la estimulación homóloga. Se vacunaron grupos de 10 ratones BALB / c vía i.m. con una dosis única de o bien 1 µg de pCAGα-HA + 5 µg de 5mer4 (SEQ ID NO: 4) como un péptido libre, 1 µg de pCAGα-HA + 50 µg de 5mer4 (SEQ ID NO: 4) como un péptido libre, o 1 µg de pCAGα-HA + dimetilsulfóxido (DMSO) por ratón. 28 días después se estimularon con 100 LD50 de H5N1 A\ Hanoi \ 30408 \ 2005. Los datos representan el porcentaje de supervivencia. Los ratones control se vacunaron con PBS. Estos datos demuestran que la vacunación con el tampón solo no induce protección contra el virus influenza y que existe un efecto de dosis con cantidades crecientes de adyuvante peptídico.

Figura 8: Eficacia protectora tras la inmunización con un péptido foráneo libre (exógeno) para la estimulación homóloga. Se vacunaron grupos de 10 ratones BALB / c vía i.m. con una dosis única de o bien 1 µg de pCAGα-HA + 5 µg de 5mer4 (SEQ ID NO: 4) como un péptido libre, 1 µg de pCAGα-HA + 50 µg de 5mer4 (SEQ ID NO: 4) como un péptido libre, o 1 µg de pCAGα-HA + dimetilsulfóxido (DMSO) por ratón. 28 días después se estimularon con 100 LD50 de H5N1 A\ Hanoi \ 30408 \ 2005. Los datos representan el peso corporal con el tiempo. Los ratones control se vacunaron con PBS. Esto demuestra que la vacunación con el péptido más el antígeno protege a los animales contra la pérdida de peso que es un síntoma de la infección por influenza.

Figura 9: Eficacia protectora tras la inmunización con un péptido foráneo libre (exógeno) para la estimulación homóloga. Se vacunaron grupos de 10 ratones BALB / c vía i.m. con una dosis única de o bien 1 µg de pCAGα-HA + 5 µg de 5mer4 (SEQ ID NO: 4) como un péptido libre, 1 µg de pCAGα-HA + 50 µg de 5mer4 (SEQ ID NO: 4) como un péptido libre, o 1 µg de pCAGα-HA + dimetilsulfóxido (DMSO) por ratón. 28 días después se estimularon con 100 LD50 de H5N1 A\ Hanoi \ 30408 \ 2005. Los datos representan el porcentaje de supervivencia. Los ratones control se vacunaron con PBS. Estos datos demuestran que la vacunación con el tampón solo no induce protección contra el virus influenza y que existe un efecto de dosis con cantidades crecientes de adyuvante peptídico.

Figure 10: Eficacia protectora tras la inmunización con diferentes dosis del péptido libre 5mer4 (SEQ ID NO: 4). Se vacunaron grupos de 10 ratones BALB/c vía i.m. con una dosis única de 100 µg de pCAGα-HA + o bien 50µg de 5mer4 (SEQ ID NO: 4) o 100 µg de 5mer4 (SEQ ID NO: 4) como un péptido libre por ratón. 28 días más tarde se provocaron con 100 DL50 del virus homólogo de Hanoi 2005. Los datos representan el peso corporal con el tiempo. Los ratones control se vacunaron con PBS o 50 µg del péptido libre. Esto demuestra que la vacunación con el péptido más el antígeno protege a los animales contra la pérdida del peso que es un síntoma de la infección por influenza.

Figura 11: Eficacia protectora tras la inmunización con diferentes dosis del péptido libre 5mer4. Se vacunaron grupos de 10 ratones BALB/c vía i.m. con una dosis única de 100 µg de pCAGα-HA + o bien 50µg de 5mer4 (SEQ ID NO: 4) o 100 µg de 5mer4 (SEQ ID NO: 4) como un péptido libre por ratón. 28 días más tarde se estimularon con 100 DL50 del virus homólogo de Hanoi 2005. Los datos representan el porcentaje de supervivencia. Los ratones control se vacunaron con PBS o 50 µg de péptido libre. Esto demuestra que el efecto requiere que el antígeno y el adyuvante sean eficaces en suscitar una respuesta inmune específica.

Figura 12: Eficacia protectora tras la inmunización con un péptido foráneo libre para la estimulación heteróloga. Se vacunaron grupos de 10 ratones BALB/c vía i.m. con una dosis única de 100 µg de pCAGα-Ha + 50 µg de 5mer4 (SEQ ID NO: 4) como un péptido libre por ratón. 28 días más tarde se estimularon con 100 LD50 de H5N1 A\ Hanoi \ 30408 \ 2005 adaptado a ratón. Los datos representan el porcentaje de pérdida de peso corporal con el tiempo. Los ratones control se vacunaron con PBS. Esto demostró que la vacunación con el péptido más el antígeno protege al animal contra la pérdida de peso que es un síntoma de la infección por influenza.

Figura 13: Eficacia protectora tras inmunización con un péptido foráneo libre para estimulación heteróloga. Se vacunaron grupos de 10 ratones BALB/c vía i.m. con una dosis única de 100 µg de pCAGα-Ha + 50 µg de 5mer4 (SEQ ID NO: 4) como un péptido libre por ratón. 28 días más tarde se estimularon con 100 LD50 de H5N1 A\ Hanoi \ 30408 \ 2005 adaptado a ratón. Los datos representan el porcentaje de supervivencia. Los ratones control se vacunaron con PBS. Esto demostró la eficacia del procedimiento de vacunación contra virus heterólogos.

Figura 14: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) tras la vacunación con la vacuna de la hepatitis B (Engerix-B). Se vacunaron ratones BALB/c vía i.m. con el equivalente de 1 µg de la vacuna Engerix-B con (A) 50 µg de péptido libre o (B) sin péptido como control. Se obtuvo suero de los ratones a las semanas 2, 4, 6 y 8 después de la vacunación. Se detectaron anticuerpos anti-HBS totales utilizando un kit de ELISA comercial. Estos datos indican que se genera una respuesta inmune mucho más fuerte en presencia de antígeno más péptido que con antígeno solo. El curso temporal de la respuesta inmune es como se esperaba.

Figura 15: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) tras la vacunación con la vacuna contra la gripe estacional (Fluviral 2008-2009). Se vacunaron ratones BALB/c vía i.m. con el equivalente de 5 µg de la vacuna Fluviral con (A) 50 µg de péptido libre o (B) sin péptido como control. Se obtuvo suero de los ratones a las semanas 2, 4, 6 y 8 después de la vacunación. Se detectaron anticuerpos anti-influenza IgG totales utilizando un kit de ELISA comercial. Estos datos demostraron que incluso en presencia de altos niveles de antígeno, el péptido reforzará la respuesta inmune.

Figura 16: Ensayo de puntos **por inmunoabsorción ligado a enzima** (ELISPOT), respuesta de las células T tras la inmunización. Se vacunaron ratones BALB/c vía i.m. con 50 µg de la vacuna de ADN pCAGα-HA + 50 µg de 5mer4 (SEQ ID NO: 4), CpG-ODN (10 µg), alumbre (Alhydrogel, 450 µg), una combinación de los tres, o HA solo. Los esplenocitos se recolectaron 10 días después de la vacunación y se reestimularon utilizando grupos de péptidos derivados de HA. Los datos representan la frecuencia de puntos por un millón de esplenocitos. Se analizaron 4 ratones por grupo. Estos datos muestran que la respuesta inmune generada al usar el péptido es más fuerte que la generada con alumbre solo y comparable a la generada por CpG. También hay un efecto aditivo aparente cuando se combinan los adyuvantes.

Figura 17: Ensayo de puntos **por inmunoabsorción ligado a enzima** (ELISPOT), respuesta de las células T tras la inmunización. Se vacunaron ratones BALB/c vía i.m. con 50 µg de la vacuna de ADN pCAGα-HA sola o combinada con grupos de 10 péptidos 5mer. Los esplenocitos se recolectaron 10 días después de la vacunación y se reestimularon utilizando grupos de péptidos derivados de HA. Los datos representan la frecuencia de puntos por un millón de esplenocitos. Las barras representan el total de todos los grupos. Se analizaron 4 ratones por grupo. Este enfoque permitió la detección rápida de péptidos estrechamente relacionados.

Figura 18: Ensayo de puntos **por inmunoabsorción ligado a enzima** (ELISPOT), respuesta de las células T tras la inmunización. Se vacunaron ratones BALB/c vía i.m. con 50 µg de la vacuna de ADN pCAGα-HA sola o combinada con 50µg de un 5mer de un grupo inmunodominante. Los esplenocitos se recolectaron 10 días después de la vacunación y se reestimularon utilizando grupos de péptidos derivados de HA. Los datos representan la frecuencia de puntos por un millón de esplenocitos. Las barras representan el total de todos los grupos. Se analizaron 4 ratones por grupo. Estos datos muestran que a pesar de los cambios de aminoácidos individuales en la secuencia peptídica, puede haber una gran diferencia en la resistencia de la respuesta de células T que se genera.

Comparación de respuestas de células T entre péptidos seleccionados. Ensayo de puntos **por inmunoabsorción ligado a enzima** (ELISPOT), respuesta de las células T tras la inmunización. Se vacunaron ratones BALB/c vía i.m. con 50 µg de la vacuna de ADN pCAGα-HA sola o combinada con 50 µg de un 5mer de un grupo inmunodominante. Los esplenocitos se recolectaron 10 días después de la vacunación y se reestimularon utilizando grupos de péptidos derivados de HA. Los datos representan la frecuencia de puntos por un millón de esplenocitos. Se analizaron 4 ratones por grupo. Los datos muestran que todos los péptidos seleccionados generaron una respuesta de células T fuerte frente al antígeno y que cambios relativamente pequeños en la secuencia pueden conducir a niveles diferentes de respuesta inmune. Esto puede ser dependiente del antígeno.

Descripción de las realizaciones preferidas

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente invención tienen el mismo significado como comúnmente se entiende por un experto en la técnica al que pertenece la invención. Aunque se pueden usar en la práctica o pruebas de la presente invención cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos.

Se describen composiciones adyuvantes que comprenden polipéptidos 5mer específicos en combinación con sistemas de administración de antígenos y/o moléculas inmunoestimuladoras, tales como secuencias de ácido nucleico inmunoestimuladoras, para potenciar la respuesta inmune de un antígeno coadministrado. La presente invención se basa en parte en el descubrimiento sorprendente de que el uso de péptidos hidrófobos seleccionados en combinación con antígenos proporciona títulos de anticuerpos significativamente más altos a un antígeno coadministrado, que los observados sin tales sistemas de administración o usando adyuvantes tradicionales. El uso de tales combinaciones proporciona un enfoque seguro y eficaz para potenciar la inmunogenicidad de una variedad de antígenos vacunales para su uso tanto en composiciones profilácticas como terapéuticas.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, técnicas de ADN recombinante e inmunología, dentro del conocimiento de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase p.ej. Fundamental Virology, 2ª edición, vol. I & II

(compilado por B. N. Fields y D. M. Knipe); Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (compilado por D. M. Weir y C. C. Blackwell, Blackwell Scientific Publications); T. E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W. H. Freeman and Company, 1993); A. L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edition, 1989); Methods In Enzymology (compilado por S. Colowick y N. Kaplan, Academic Press, Inc.).

Debe tenerse en cuenta que, tal como se utiliza en esta invención y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un antígeno" incluye una mezcla de dos o más antígenos, y similares.

Las siguientes abreviaturas de aminoácidos se utilizan en todo el texto:

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

Definiciones

Al describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan como se indica a continuación.

El término polipéptido y proteína se refieren a un polímero de restos de aminoácidos y no están limitados a una longitud mínima del producto. De este modo, se incluyen en la definición péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas están abarcadas por la definición. Los términos incluyen también modificaciones postexpression del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para los propósitos de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como supresiones, adiciones y sustituciones (de naturaleza generalmente conservadora), en la secuencia nativa, siempre y cuando la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de la mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por PCR.

Por "antígeno" se entiende una molécula que contiene uno o más epítopos que estimularán el sistema inmune de un huésped para producir una respuesta inmune celular específica de antígeno cuando se presenta el antígeno, o una respuesta humoral de anticuerpos. El término "antígeno" tal como se usa en la presente invención descriptiva denota tanto antígenos de subunidades, es decir, proteínas que son separadas y discretas de un organismo completo con el cual el antígeno está asociado en la naturaleza, así como bacterias, virus, parásitos u otros microbios muertos, atenuados o inactivados. Los anticuerpos tales como anticuerpos antiidiotípicos, o fragmentos de los mismos, y mimotopos de péptidos sintéticos, que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico, también se capturan bajo la definición de antígeno como se usa en la presente invención. De forma similar, también se incluye en la presente invención un oligonucleótido o polinucleótido que expresa una proteína terapéutica o inmunogénica, o determinante antigénico in vivo, tal como en aplicaciones de terapia génica y de inmunización de ácidos nucleicos. Además, para los propósitos de la presente invención, los antígenos pueden derivarse de cualquiera de varios virus, bacterias, parásitos y hongos conocidos, así como cualquiera de los diversos antígenos tumorales.

Una "respuesta inmunológica" a un antígeno o composición seleccionado es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmune humoral y/o celular a moléculas presentes en la composición de interés. Para los propósitos de la presente invención, una "respuesta inmune humoral" se refiere a una respuesta inmune mediada por moléculas de anticuerpo, mientras que una "respuesta inmune celular" es una mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por células T citolíticas (CTLs). Las CTLs tienen especificidad para los antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) y expresadas en las superficies de las células. Las CTLs ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por células T auxiliares. Las células T auxiliares actúan para ayudar a estimular la función y concentrar la actividad de las células efectoras inespecíficas frente a células que muestran antígenos peptídicos en asociación con moléculas de MHC en su superficie. Una "respuesta inmunitaria celular" también se refiere a la producción de citoquinas, quimiocinas y otras moléculas tales producidas por células T activadas y/u otros glóbulos blancos, incluyendo las derivadas de células T CD4 + y CD8 +. Una composición o vacuna que provoca una respuesta inmune celular puede servir para sensibilizar a un sujeto vertebrado mediante la presentación del antígeno en asociación con moléculas de MHC en la superficie celular. La respuesta inmune mediada por células está dirigida hacia, o cerca de, células que presentan antígeno en su superficie. Además, se pueden generar linfocitos T específicos de antígeno para permitir la futura protección de un huésped inmunizado. La capacidad de un antígeno particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse mediante una serie de ensayos, tales como ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, o

mediante ensayo de linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado. Tales ensayos son bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej. Erickson et al., J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doe et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376.

5 Los términos "cantidad eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" de una composición y antígeno adyuvante, tal como se proporcionan en la presente invención, se refieren a una cantidad no tóxica pero una cantidad suficiente de la composición para proporcionar la respuesta deseada, tal como una respuesta inmunológica, y opcionalmente, un efecto terapéutico correspondiente, o en el caso de la administración de una proteína terapéutica, una cantidad suficiente para efectuar el tratamiento del sujeto, como se define a continuación. Como se indicará a continuación, la
10 cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad y condición general del sujeto, la gravedad de la afección que se esté tratando y la macromolécula particular de interés, modo de administración, y similares. Una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual puede ser determinada por un experto en la técnica usando experimentación rutinaria.

15 El "sistema de administración de antígeno" comprende la composición de adyuvante y el antígeno y otros tampones y sustancias que pueden usarse para estabilizarse o actuar como portadores para la combinación.

En una primera realización, los péptidos se usan conjuntamente con antígenos que generan una respuesta humoral y celular dirigida a prevenir una enfermedad infecciosa coadministrando un péptido con un antígeno.

20 En otra realización más, la presente invención está dirigida a un método para estimular una respuesta inmune en un sujeto vertebrado que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno seleccionado y una composición adyuvante que comprende un péptido como se describe en la presente invención. Como se apreciará por un experto en la técnica, el antígeno y el péptido adyuvante se pueden administrar por una diversidad de medios y bajo una variedad de condiciones dentro de la invención. Por ejemplo, puede proporcionarse un sistema de administración de antígeno y/o una molécula inmunoestimuladora, en el que la
25 composición de adyuvante es capaz de aumentar la respuesta inmune al antígeno seleccionado. El antígeno puede estar presente en la composición adyuvante o puede administrarse en una composición separada. Si el antígeno se suministra por separado, se puede suministrar al mismo sitio o a un lugar diferente, y puede administrarse antes, después o simultáneamente con la composición de adyuvante.

30 Es importante observar que, tal como se describe en la presente invención, la administración del péptido adyuvante al individuo que necesita o desea una respuesta inmune estimulada, por ejemplo frente a un antígeno, puede realizarse mediante diversos medios, por ejemplo, administrando el péptido adyuvante y el antígeno juntos, por separado o incluso en lugares diferentes como se describe en la presente invención y como se conoce en la técnica. El péptido adyuvante se puede administrar como un péptido purificado o aislado o puede estar fusionado al antígeno ya sea químicamente o genéticamente (es decir, un péptido transgénico que comprende tanto un antígeno peptídico como el péptido adyuvante) o se puede administrar como un ácido nucleico que comprende el péptido adyuvante
35 que está dispuesto para ser expresado después de la administración de manera que el péptido coadyuvante se sigue administrando al individuo.

40 En una realización relacionada, la presente invención está dirigida a un método para prevenir una enfermedad infecciosa mediante la coadministración de un péptido seleccionado y una o más secuencias de ADN que pueden expresar proteína o proteínas del agente infeccioso. Estos agentes pueden incluir virus tales como hepatitis C, VIH, fiebres hemorrágicas y similares u otros antígenos donde se desea una respuesta fuerte de células T. Como se apreciará por un experto en la técnica, los agentes adecuados para coadministración incluyen, pero no están limitados de ninguna manera a vacunas de ADN, ARN o proteína, extractos virales y virus o bacterias desactivados.

En un aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de un péptido adyuvante que consiste en la secuencia de aminoácidos KYMCW (SEQ ID NO: 12) y un antígeno de interés.

45 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método de estimulación de una respuesta inmune o potenciación de una respuesta inmune frente a un antígeno que comprende administrar a un individuo que necesita o desea tal tratamiento una cantidad eficaz de un péptido adyuvante que consiste en la secuencia de aminoácido KYMCW (SEQ ID NO: 12).

50 El individuo que necesita o desea tal tratamiento puede ser un individuo que está siendo inmunizado, como se discute en la presente invención.

En una realización, el péptido adyuvante es KYMCW (SEQ ID NO: 12)

55 En una realización preferida, la "cantidad eficaz" o la "cantidad terapéuticamente eficaz" del péptido adyuvante está entre aproximadamente 50 µg y aproximadamente 5 mg por dosis o por administración. En una realización más preferida, la dosificación está entre aproximadamente 50 µg y aproximadamente 500 µg. Como se apreciará por un experto en la técnica, la cantidad eficaz puede variar de acuerdo con la edad, el peso y la condición del individuo al que se administra.

Como se discute en la presente invención, el péptido adyuvante de la invención puede administrarse como péptidos

"libres" (es decir, pueden ser péptidos aislados que consisten en la secuencia de aminoácidos KYMCW (SEQ ID NO: 12).

5 Alternativamente, la secuencia de aminoácidos puede estar unida o integrada dentro de un péptido antigénico o un péptido portador usando medios conocidos en la técnica. En otras realizaciones, dicha construcción puede ser codificada por una molécula de ácido nucleico que puede administrarse al individuo de manera que el péptido adyuvante se exprese después de la administración como se discute en la presente invención.

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

15 En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de los péptidos adyuvantes descritos anteriormente para inducir o acumular o potenciar una respuesta inmune en un individuo que necesita tal tratamiento. Como se discutió anteriormente, los péptidos adyuvantes se pueden administrar conjuntamente con el antígeno o se pueden administrar por separado o se pueden administrar en diferentes sitios.

20 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método de preparación de un medicamento o composición para estimular una respuesta inmune en un individuo que comprende mezclar un péptido adyuvante como se describe en la presente invención con un excipiente adecuado, por ejemplo, un excipiente, vehículo o diluyente de vacuna adecuado. En otras realizaciones, el medicamento o composición o vacuna puede prepararse mezclando el péptido coadyuvante como se ha descrito anteriormente con el antígeno deseado.

Como se discute en la presente invención, los péptidos adyuvantes se pueden administrar a cualquier vertebrado, pero preferiblemente se administran a seres humanos o animales, por ejemplo en aplicaciones veterinarias. Por consiguiente, en algunos aspectos de la invención, el "individuo" es un animal no humano o un animal vertebrado no humano. Alternativamente, los péptidos adyuvantes se pueden usar con fines de investigación.

25 Ejemplos

A continuación se presentan ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplo 1: Identificación de péptidos

30 Se cribaron las bases de datos de proteomas utilizando un algoritmo informático que buscaba péptidos 5 meros cortos de secuencias de aminoácidos que se producían como máximo una vez. Este análisis generó 417 secuencias nunca observadas y 1288 secuencias únicas de péptido 5-mero encontrado sólo una vez en todos los proteomas conocidos. Se generaron secuencias de nueve y trece meros por ordenador a partir de las 417 secuencias 5-meras identificadas previamente ausentes de proteomas conocidos. Se seleccionaron aleatoriamente seis 5 meros, tres 9 meros y tres 13 meros de varios valores predichos de hidrofobia para el análisis funcional. El efecto de cada péptido corto sobre la respuesta inmune se analizó primero evaluando la respuesta de células T frente al antígeno hemaglutinina (HA) del virus de la gripe aviar Hanoi 2005 expresado a partir de una vacuna de ADN basada en pCAG en ratones Balb/c. Cada secuencia de 5, 9 y 13 meros se clonó en marco en el extremo C del antígeno HA para facilitar la expresión y minimizar la desviación experimental potencial procedente de preparaciones peptídicas independientes de pureza variable. Se vacunaron intramuscularmente (i.m.) grupos de 4 ratones con 50 µg por ratón de cada ADN plasmídico que codifica para HA en el marco con cada secuencia peptídica corta y la respuesta de células T se controló a partir de esplenocitos 10 días más tarde. Se incluyó el mismo ADN plasmídico que codifica HA sin secuencias adicionales (pCAG-HA) como un control de referencia. Se utilizó una biblioteca de péptidos solapantes que cubrían toda la proteína HA para reestimar esplenocitos y la producción de IFN-g se evaluó mediante ELISPOT como una medida de la respuesta de células T. La Figura 1 muestra que pCAG-HA-5-meros # 4 (DMCKW, SEQ ID NO: 4) y # 6 (DMCKW, SEQ ID NO:13) aumentaron la producción de IFN-g después de la estimulación con varios péptidos individuales de la biblioteca HA cuando se compara con otros pCAG-HA-5, 9 o 13 meros modificados o con el control pCGA-HA no modificado. De los datos, se puede concluir que 5meros funcionaron mejor que 9meros o 13meros en la generación de una respuesta de células T. De los datos no parece que haya ningún patrón con respecto a la hidrofobia o secuencia que llevó a un aumento de la respuesta de las células T que fue bastante sorprendente. Las hidrofobias de los diversos péptidos se enumeran en la Tabla 1.

Además, se midieron los anticuerpos neutralizantes del virus HA y se identificaron 5mer4 y 5mer7 como péptidos que causaron un aumento significativo en la respuesta del anticuerpo neutralizante. Se identificaron péptidos adicionales usando un proceso similar. (Véase Figura 17 y Figura 18). Fue sorprendente encontrar que péptidos muy similares podrían tener un efecto drásticamente diferente sobre la respuesta observada como se muestra en la Figura 18. Los anticuerpos neutralizantes son un marcador de eficacia y parece que la vacunación con el 5mer4 (SEQ ID NO: 4) y 5mer7 (SEQ ID NO: 12) como coadyuvantes causó una respuesta significativa de anticuerpos mientras que otros 5 meros (5mer1 SEQ ID NO: 1), 5mer2 (SEQ ID NO: 2), 5mer3 (SEQ ID NO: 3)) y los 9 y 13meros no causaron una fuerte respuesta de anticuerpos neutralizantes como se muestra en la Figura 2. Por lo

tanto, para buscar péptidos adicionales que también podrían causar una respuesta inmune aumentada, se cribaron grupos de 10 péptidos seleccionados aleatoriamente en el ensayo de células T descrito anteriormente. Para los grupos que demostraron una respuesta de células T por encima de la línea base, se cribaron los péptidos individuales en el ensayo. A partir de los datos es sorprendente que las secuencias estrechamente relacionadas tenían efectos muy diferentes sobre la generación de una respuesta de células T. Por ejemplo, las secuencias peptídicas CYWWW (91, SEQ ID NO: 14) generaron una respuesta significativa de las células T, pero el péptido CYYWC (92, SEQ ID NO: 22), que es diferente por sólo un aminoácido generó una respuesta de células T que estaba por debajo de la línea de base del HA solo. Se encontraron diferencias similares para otros péptidos tales como el par de EHWCM (93, SEQ ID NO: 15) y EMWCM (94, SEQ ID NO: 23) donde los primeros generaron una gran respuesta de células T, pero el último no. Los péptidos que generaron una fuerte respuesta de células T en este ensayo se prevé que sean buenos adyuvantes basándose en las respuestas generadas por 5mer4 y 5mer7 (KYMCW, SEQ ID NO: 12) en estudios de animales expandidos. También se puede observar a partir de los datos que los péptidos que generaron una alta respuesta de células T también generaron una respuesta neutralizante de anticuerpos elevada que se podría predecir que conduciría a una respuesta eficaz en los estudios de supervivencia.

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

Ejemplo 2: Generación de una respuesta inmune protectora después de la vacunación

En base a respuestas inducidas de células T superiores, se estudiaron adicionalmente pCAG-HA fusionado con 5mer4 (SEQ ID NO: 4) o 5mer7 (SEQ ID NO: 12) en ratones Balb/c. La respuesta de anticuerpos se controló mediante ensayos de titulación de inhibición de la hemaglutinación (HI) y neutralización (NAB) de sueros 25 días después de la vacunación vía i.m. con cada vacuna de ADN que incluye la HA no modificada como control. El título de dilución recíproca de HI promedio fue de 85 ± 40 , 55 ± 35 o 25 ± 20 mientras que el título de NAB fue 25 ± 30 , 22 ± 10 o indetectable para pCAG-HA-5mer4 y 5mer7 o pCAG-HA, respectivamente. Para evaluar si las respuestas más altas de las células T y B se correlacionarían con una protección potenciada, se estimularon los ratones Balb/c con una dosis letal de Hanoi 05 28 días después de la inmunización vía i.m. con cada HA-5mer4 y 5mer7. La dosis de vacuna de ADN seleccionada se basó en la dosis de 1 µg de pCAG-HA no modificado que se encontró que era la dosis mínima probada para inducir la supervivencia con 30%. La vacunación con 1 µg de pCAG-HA-5mer7 protegió el 80% de los animales de la muerte con una pérdida de peso del 5% mientras que pCAG-HA-5meros #4 indujo 100% de supervivencia sin pérdida de peso estadísticamente significativa y sin signos clínicos de enfermedad. Esto demuestra que utilizando el péptido unido al antígeno como un adyuvante permite que se genere una respuesta inmune eficaz y proporciona protección contra los efectos típicamente encontrados en la infección por influenza.

Ejemplo 3: Generación de una respuesta inmune protectora después de la vacunación Basado en respuestas inducidas de células T superiores, se estudiaron adicionalmente pCAG-HA combinado con 5 o 50 µg de péptidos libres 5mer4 (SEQ ID NO: 4) en ratones Balb/c. La respuesta de anticuerpos se controló mediante ensayos de titulación de inhibición de la hemaglutinación (HI) y neutralización (NAB) de sueros 25 días después de la vacunación vía i.m. con cada vacuna de ADN incluyendo la HA no modificada como control. Para evaluar si las respuestas más altas de las células T y B se correlacionarían con una protección potenciada, los ratones Balb/c se estimularon con una dosis letal de Hanoi 05 28 días después de la inmunización vía i.m. con cada HA más 5 o 50 µg de 5mer4 (SEQ ID NO: 4). La dosis de vacuna de ADN seleccionada se basó en la dosis de 1 µg de pCAG-HA no modificado que se encontró que era la dosis mínima probada para inducir la supervivencia con 30%. La vacunación con 1 µg de pCAG-HA más 5 µg 5mer4 protegió al 50% de los animales de la muerte con pérdida de peso mínima mientras que pCAG-HA más 50 µg de 5mer4 indujeron una supervivencia del 90% sin pérdida de peso estadísticamente significativa y ausencia de signos clínicos de enfermedad. Los animales control no vacunados tratados tenían una mortalidad del 100%. Esto demostró que utilizando el péptido libre como adyuvante en conjunción con el antígeno permite que se genere una respuesta inmune eficaz y proporciona la protección de los efectos típicamente encontrados en la infección por influenza. Estos datos también demostraron que existe una respuesta a la dosis con diferentes niveles de adyuvante.

Ejemplo 4: Eficacia protectora tras la inmunización con un péptido foráneo libre para el estímulo heterólogo

Se vacunaron grupos de 10 ratones BALB/c vía i.m con una dosis única de 100 µg de pCAGalfa-HA + 50 ó 100 µg de 5mer4 (SEQ ID NO: 4) como un péptido libre por ratón. Los ratones control se inmunizaron con sólo 50 µg o 5mer4 o PBS. 28 días más tarde se estimularon con 100 LD50 de ratón adaptado H5N1 A \ Hong Kong \ 483 \ 1997. Los grupos de ratones que se inmunizaron con pCAGalfa-HA + 50 ó 100 mcg de 5mer4 (SEQ ID NO:4) mostraron ambos una supervivencia del 100% mientras que el grupo control con PBS mostró una mortalidad del 100% a los 18 días después de la estimulación. Esto demuestra que utilizando el péptido libre como un adyuvante junto con un antígeno permite que se genere una respuesta inmune eficaz y proporciona protección contra los efectos típicamente encontrados en infección por influenza utilizando virus relacionados que sugieren que se ha generado una respuesta inmune protectora cruzada amplia, fuerte.

Ejemplo 5: El adyuvante funciona con múltiples antígenos

5 Para demostrar que el efecto no se limita a las vacunas contra influenza, se vacunaron los ratones BALB/c vía i.m. con el equivalente de 1 µg de la vacuna de la Hepatitis B (Engerix-B) con 50 µg de péptido libre o sin péptido como control. Se obtuvo suero de los ratones a las semanas 2, 4, 6 y 8 después de la vacunación. Se detectaron anticuerpos anti-HBs totales utilizando un kit ELISA comercial. La tasa de respuesta es bastante drástica, con el grupo control Engerix B mostrando una respuesta muy pequeña a las 8 semanas después de la inmunización, y el Engerix B más 50 mcg de péptido mostrando una fuerte respuesta a las 6 y 8 semanas después de la inmunización. La generación de una respuesta de anticuerpos a las 6-8 semanas después de la inmunización es típica del tipo de respuesta generado con vacunaciones. Esto demostró que el péptido libre funciona con una amplia variedad de tipos de antígeno.

Ejemplo 6: El adyuvante funciona con múltiples antígenos

15 Para demostrar que el efecto no se limita a las vacunas contra influenza, se vacunaron los ratones BALB/c vía i.m. con el equivalente de 5 µg de la vacuna Fluviral®. Vacuna Fluviral® con (A) 50 µg de péptido libre o (B) sin péptido como control. Se obtuvo suero de los ratones a las semanas 2, 4, 6 y 8 después de la vacunación. Se detectaron anticuerpos anti-HBs totales utilizando un kit ELISA comercial. La tasa de respuesta es bastante drástica, el grupo control con vacuna Fluviral® que muestra una pequeña respuesta a las 8 semanas después de la inmunización y la vacuna Fluviral más 50 µg de péptido que muestra una respuesta más fuerte a las 6 y 8 semanas después de la inmunización. Dado que este estudio se realizó con un nivel relativamente alto de antígeno, sugiere que la cantidad de antígeno requerido podría ser menor de lo que se espera normalmente para generar una fuerte respuesta inmune. Esto también demostró que el péptido libre funciona con una amplia variedad de tipos de antígeno.

Aunque las realizaciones preferidas de la invención se han descrito anteriormente, se reconocerá y comprenderá que pueden realizarse varias modificaciones en la misma y las reivindicaciones adjuntas están destinadas a cubrir tales modificaciones.

25 Tabla 1: Secuencia seleccionadas

Secuencia de aminoácidos	Hidrofobia	Peso Molecular	Nombre	
KWCEC	0,74	649,78	5mer4	SEQ ID NO: 4
KYMCW	1,00	711,90	5mer7	SEQ ID NO: 12
CYWWW	1,85	824,95		SEQ ID NO: 14
EHWCM	0,90	686,81		SEQ ID NO: 15
FCCWW	1,87	725,88		SEQ ID NO: 16
TCCMW	1,36	624,80		SEQ ID NO: 17
TCWWH	1,29	713,81		SEQ ID NO: 18
TCYWW	1,45	739,85		SEQ ID NO: 19
WMICM	1,80	682,92		SEQ ID NO: 20
YWHMW	1,36	803,94		SEQ ID NO: 21

Tabla 2: Secuencias de 5meros 91-99 (de la Figura 18)

Número de secuencia	Secuencia
91 (SEQ ID NO: 14)	CYWWW
92 (SEQ ID NO: 22)	CYYWC
93 (SEQ ID NO: 15)	EHWCM
94 (SEQ ID NO: 23)	EMWCM
95 (SEQ ID NO: 24)	EWCMC
96 (SEQ ID NO: 25)	EWNCW
97 (SEQ ID NO: 26)	EYCWW
98 (SEQ ID NO: 16)	FCCWW
99 (SEQ ID NO: 27)	FHMMW

Listado de secuencias

- <110> Her Majesty the Queen in Right of Canada as Represented by the Minister of Health
- <120> Adyuvantes peptídicos
- 5 <130> 12283-PT-WO-EP-TLG
- <140> 09828499.5
- <141> 2009-11-30
- <150> 61/118,533
- <151> 2008-11-28
- 10 <160> 27
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- 15 <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza
- <400> 1
- Cys His Lys Trp Asp
- 1 5
- 20 <210> 2
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza
- <400> 2
- Trp His Lys Cys Glu
- 1 5
- <210> 3
- <211> 5
- 30 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza
- <400> 3
- Cys Lys Trp Arg Cys
- 1 5
- 35 <210> 4
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza
- <400> 4
- Lys Trp Cys Glu Cys
- 1 5
- 45 <210> 5
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza

<400> 5
 Asp Cys Trp Met Asp
 5 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza

<400> 6
 Cys Trp Lys Cys Trp Cys Met Phe Glu
 1 5

15 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza

20 <400> 7
 Trp Asn Trp Cys Met His Trp Asp Cys
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza

<400> 8
 Trp His Trp Cys Met Met Cys Trp Asp
 1 5

30 <210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza

<400> 9
 His Glu His Trp Cys Met Met Trp His Cys Cys Met Ile
 1 5 10

<210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 40 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza

<400> 10
 His Met Met Cys His Trp Met Cys Trp Cys Asp Met His
 45 1 5 10

<210> 11
 <211> 13
 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza

5 <400> 11
Cys His Met Met Cys His Trp Met Trp Cys Cys Met Asp
 1 5 10

<210> 12
 <211> 5
 <212> PRT

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza

<400> 12
Lys Tyr Met Cys Trp
 1 5

15 <210> 13
 <211> 5
 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza

<400> 13
Asp Met Cys Lys Trp
 1 5

<210> 14
 <211> 5

25 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza

<400> 14
Cys Tyr Trp Trp Trp
 1 5

30 <210> 15
 <211> 5
 <212> PRT

<213> secuencia artificial

35 <220>

<223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza

<400> 15
Glu His Trp Cys Met
 1 5

40 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza

45 <400> 16
Phe Cys Cys Trp Trp
 1 5

<210> 17

<211> 5
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza
 <400> 17
 Thr Cys Cys Met Trp
 1 5
 <210> 18
 10 <211> 5
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza
 15 <400> 18
 Thr Cys Trp Trp His
 1 5
 <210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 20 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza
 <400> 19
 Thr Cys Tyr Trp Trp
 1 5
 25 <210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza
 <400> 20
 Trp Met Ile Cys Met
 1 5
 <210> 21
 <211> 5
 35 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza
 <400> 21
 Tyr Trp His Met Trp
 40 1 5
 <210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza
 <400> 22
 Cys Tyr Tyr Trp Cys
 1 5

<210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza

 <400> 23
 Glu Met Trp Cys Met
 1 5
 10 <210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 <220>
 15 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza

 <400> 24
 Glu Trp Cys Met Cys
 1 5

 <210> 25
 <211> 5
 20 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza

 <400> 25
 Glu Trp Asn Cys Trp
 25 1 5

 <210> 26
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza

 <400> 26
 Glu Tyr Cys Trp Trp
 1 5
 35 <210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia peptídica corta que no se conoce en la naturaleza
 40 <400> 27
 Phe His Met Met Trp
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cantidad eficaz de un péptido adyuvante que consiste en una secuencia de aminoácido KYMCW (SEQ ID NO: 12) y un antígeno de interés.
- 5 2. Un método de preparación de un medicamento para estimular una respuesta inmune o potenciar una respuesta inmune frente a un antígeno que comprende mezclar una cantidad eficaz de un péptido adyuvante que consiste en una secuencia de aminoácidos KYMCW con un excipiente adecuado.

Figura 1

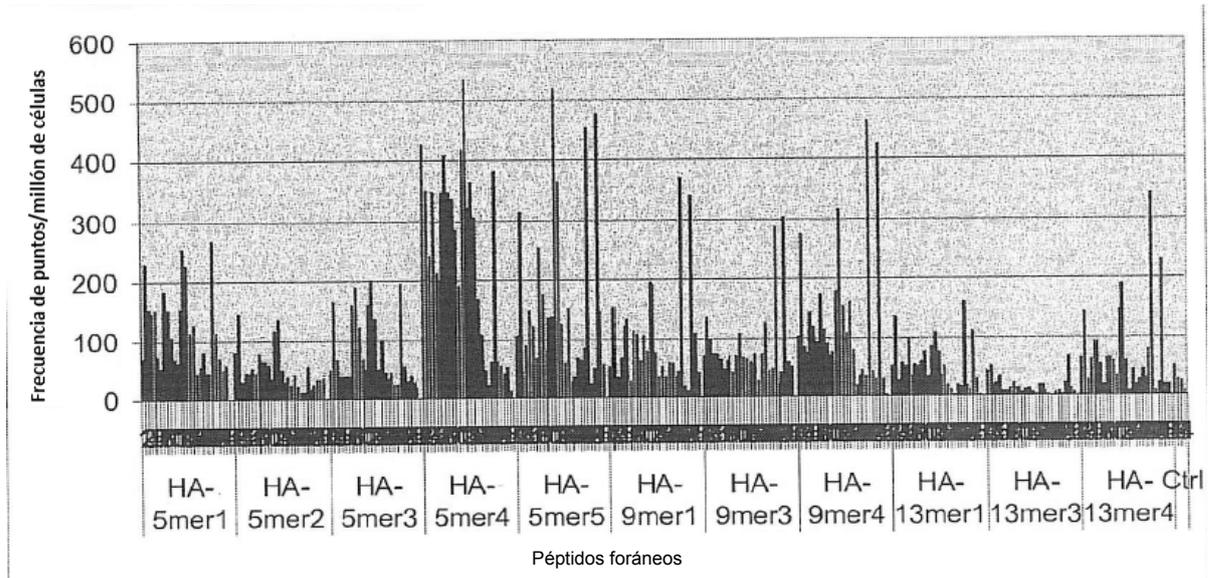


Figura 2

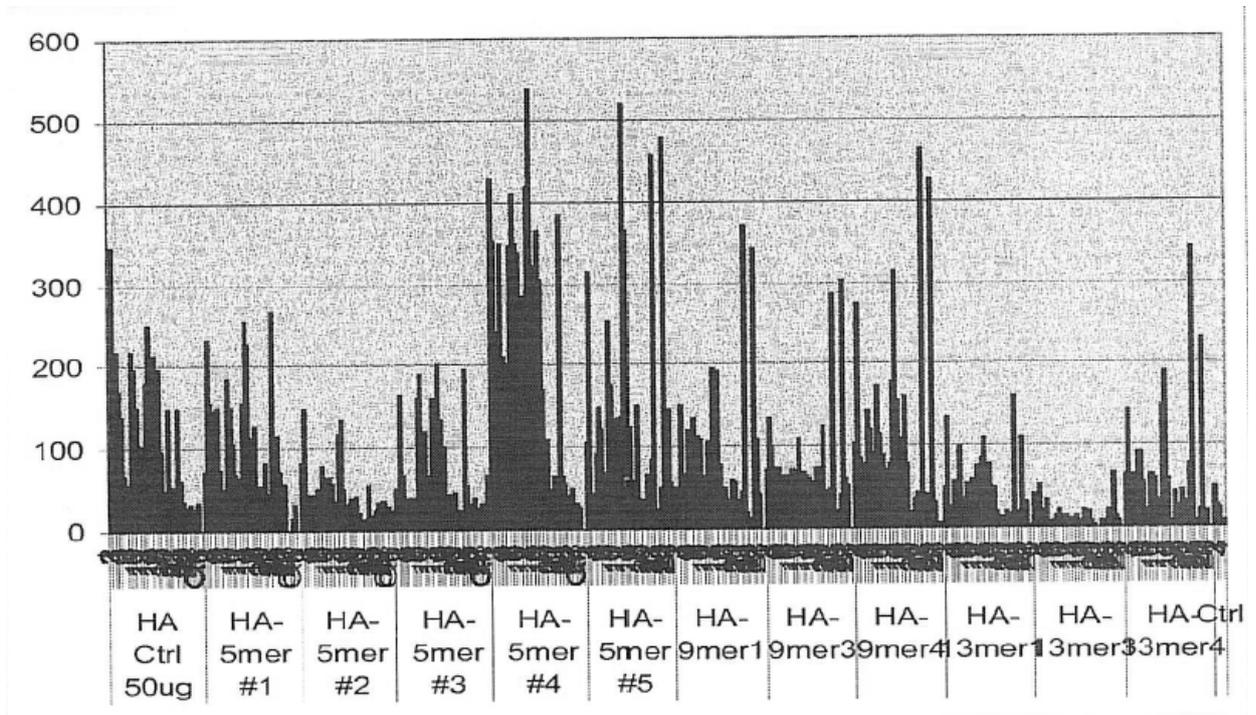


Figura 3

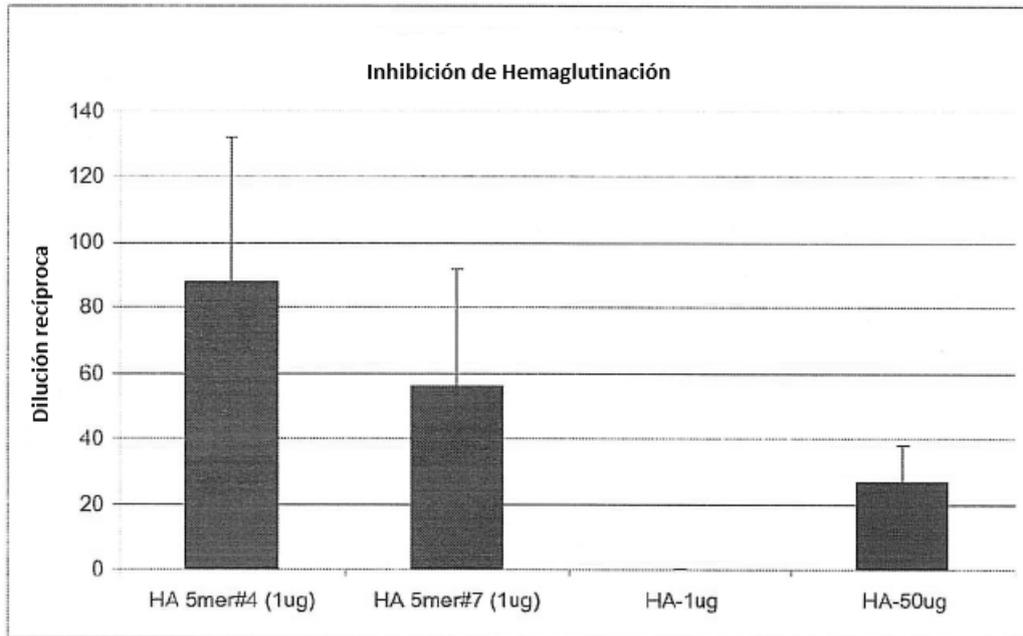


Figura 4

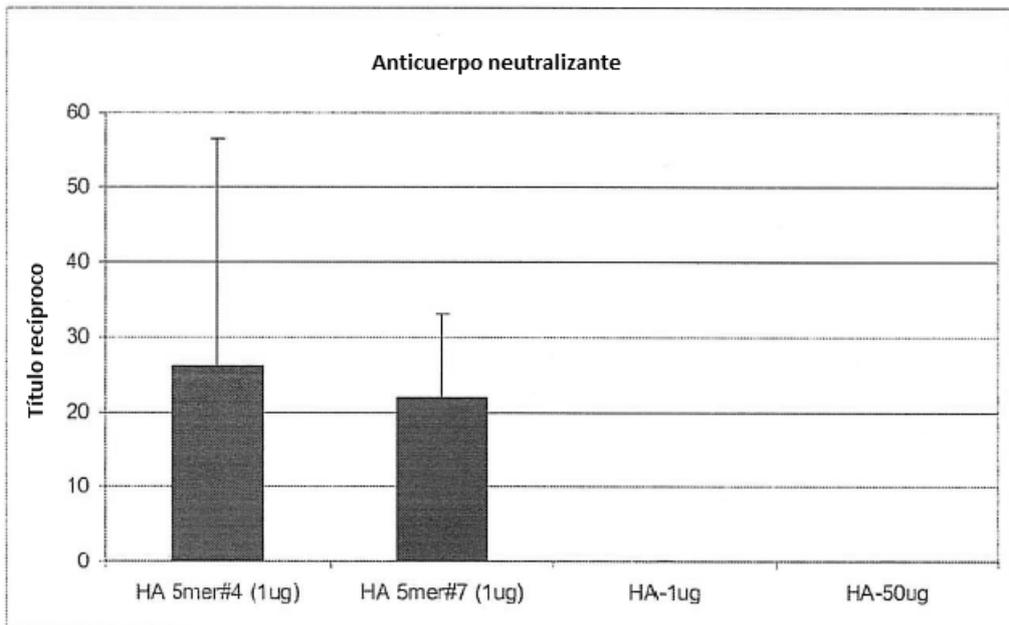


Figura 5

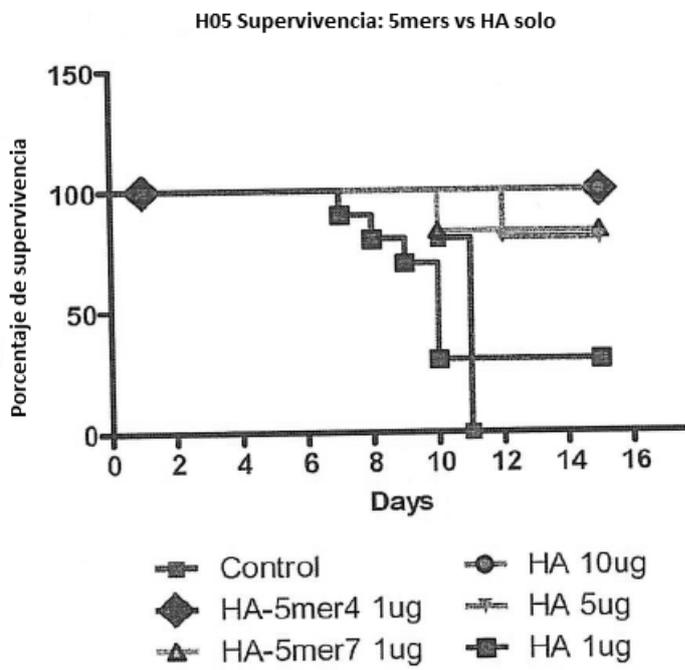


Figura 6

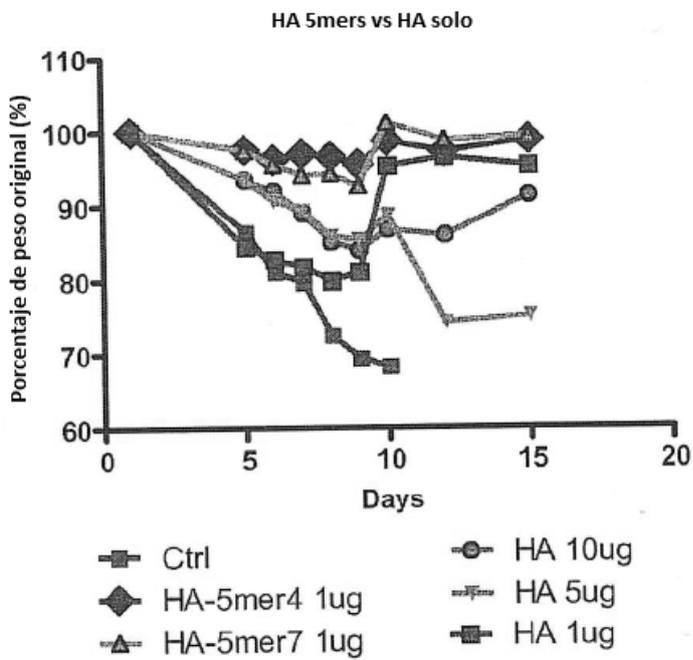


Figura 7

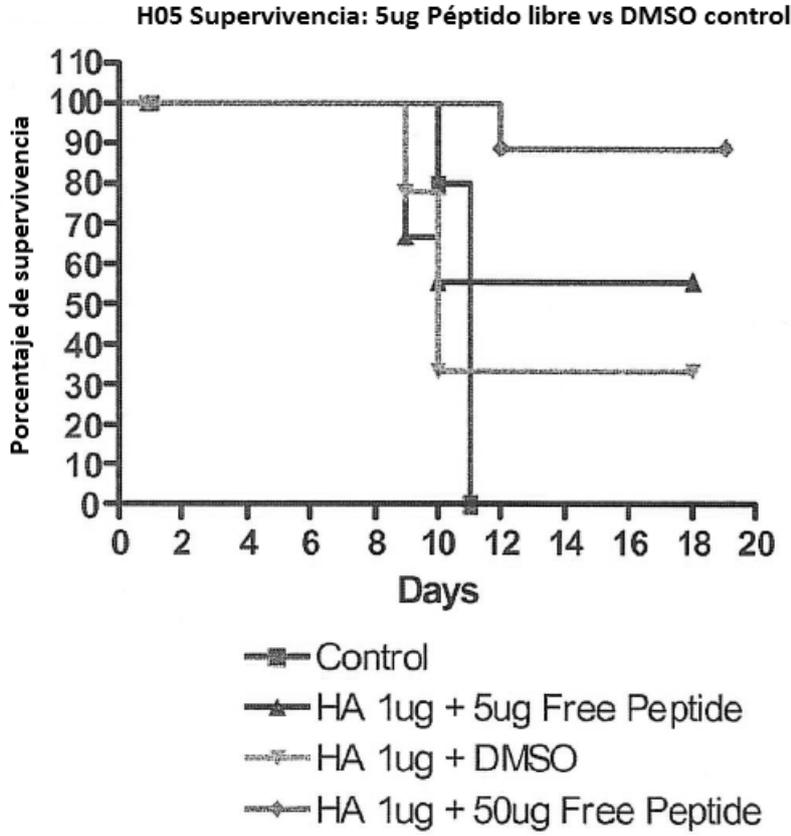


Figura 8

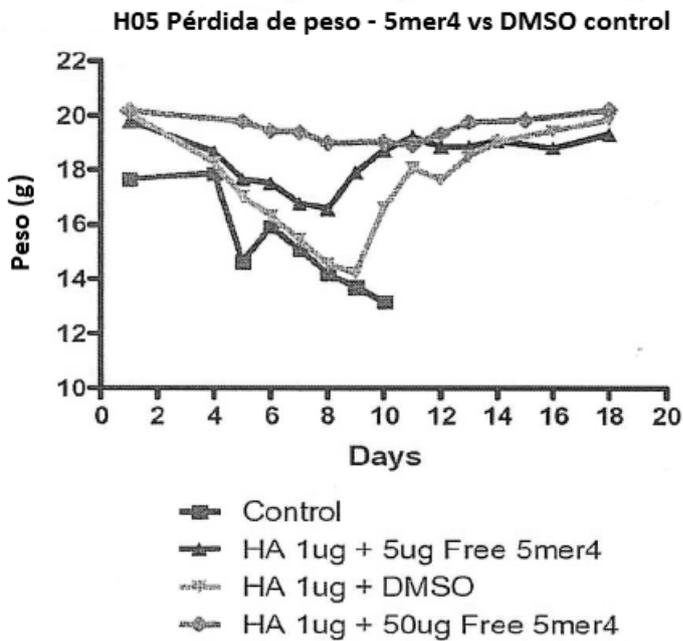


Figura 9

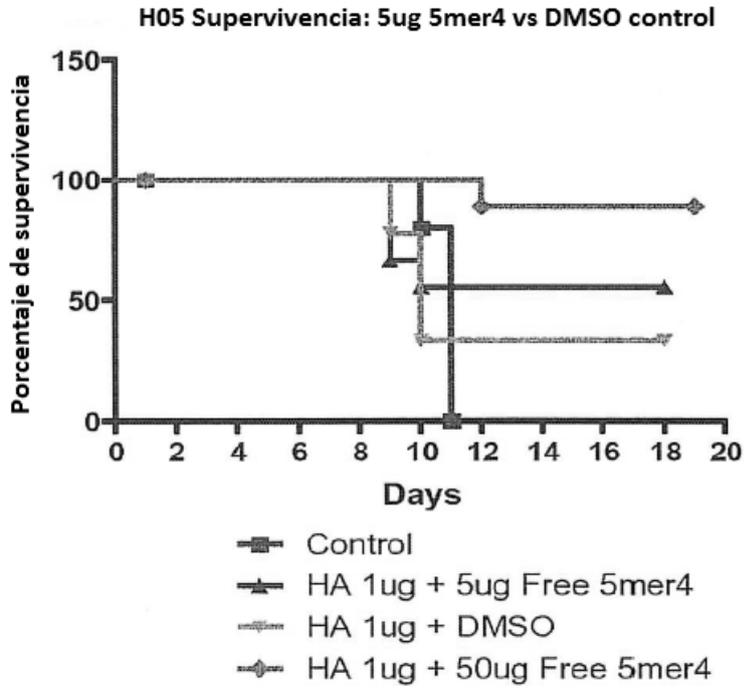


Figura 10

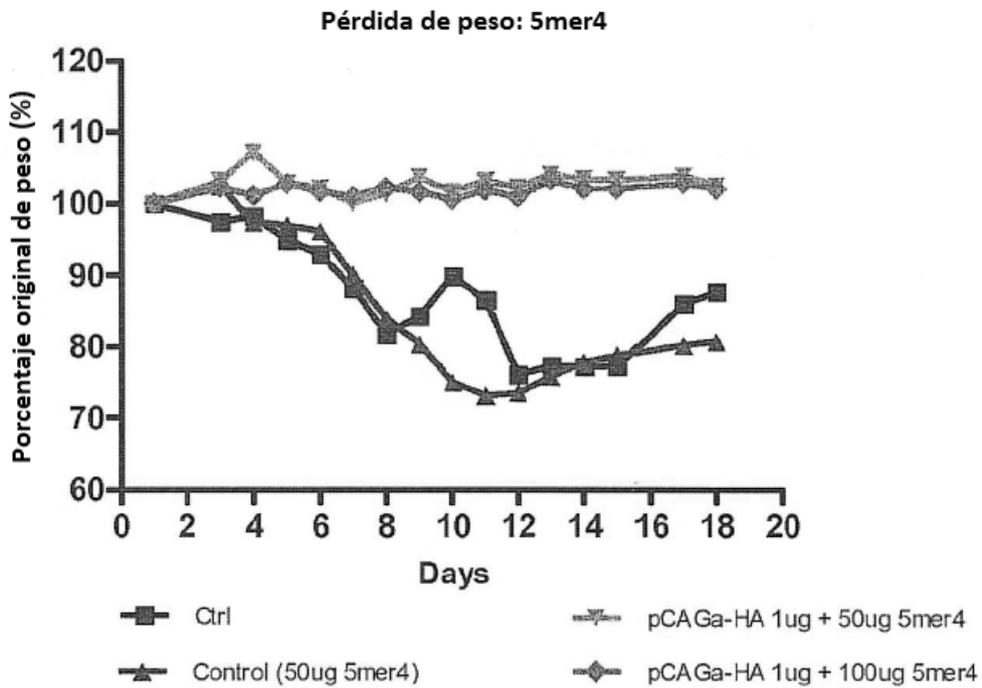


Figura 11

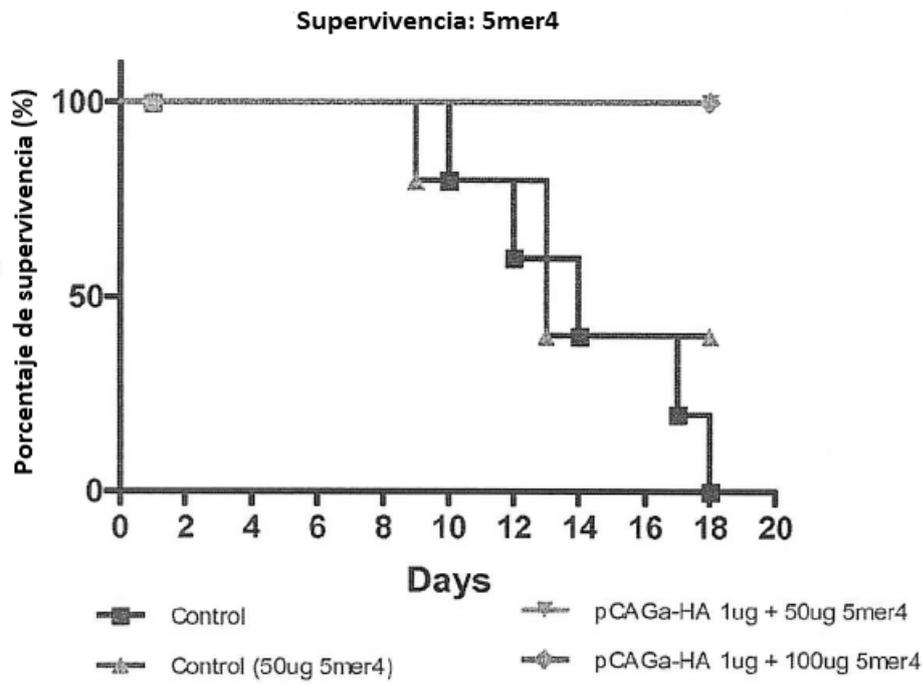


Figura 12

HK97 Pérdida de peso - HA 100 ug + 50 ug 5mer4 Libre

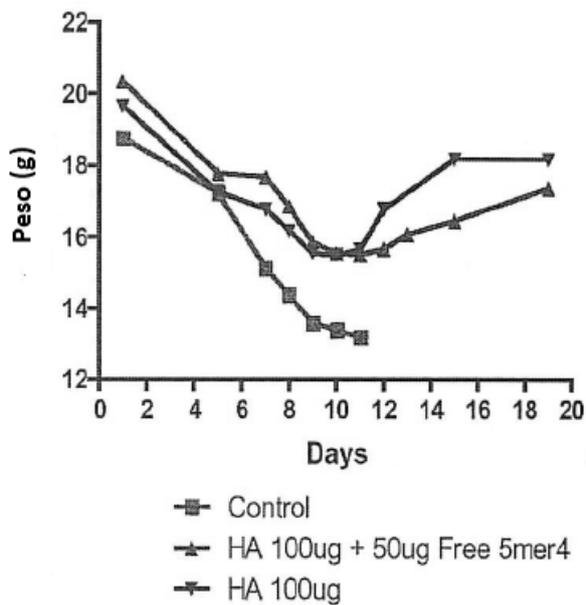


Figura 13

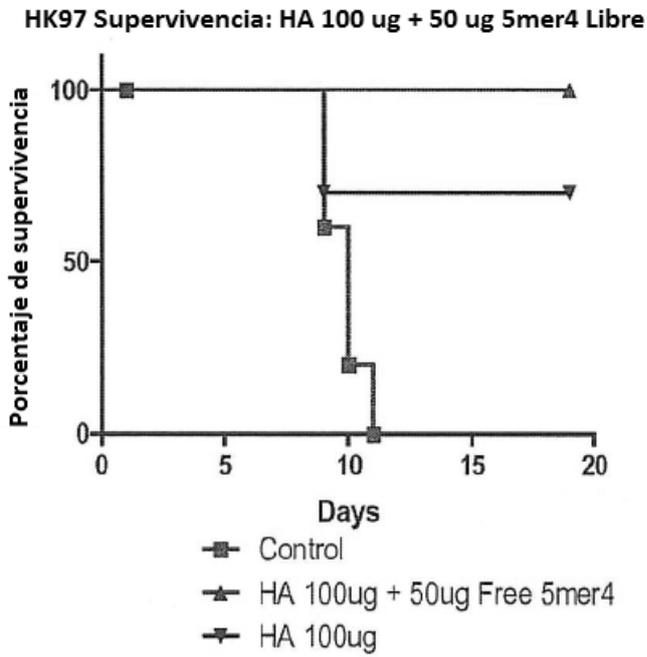
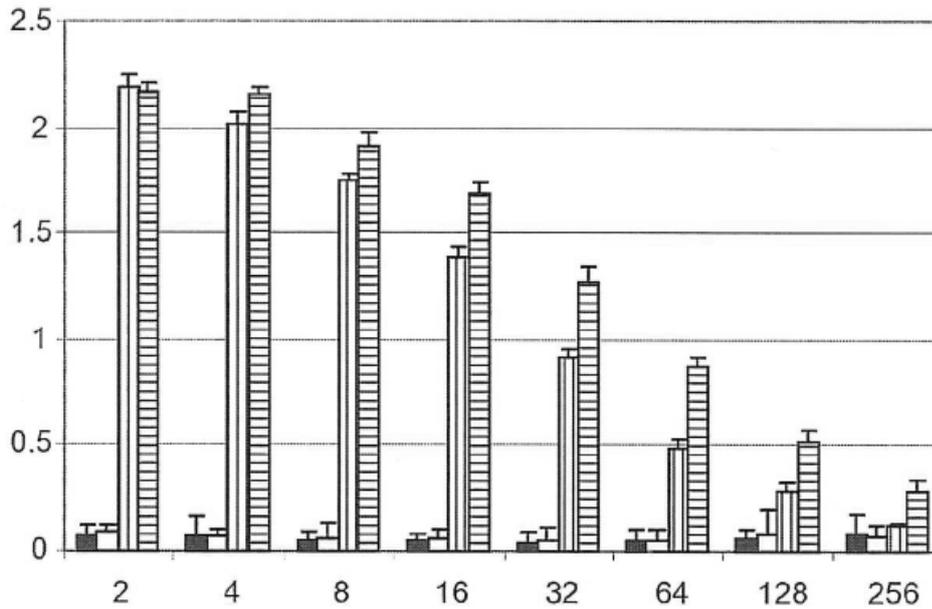


Figura 14A



A: Engerix-B (1µg) + 5mer4 libre (50µg)

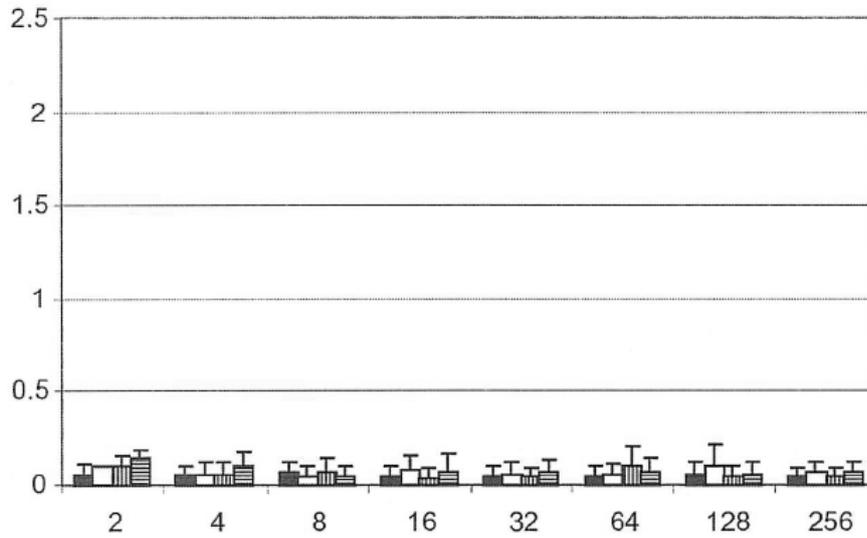
Negro = 2 semanas post inmunización

Blanco = 4 semanas post inmunización

Líneas verticales = 6 semanas post inmunización

Líneas horizontales: 8 semanas post inmunización

Figura 14B



B: Engerix-B (1µg) solo

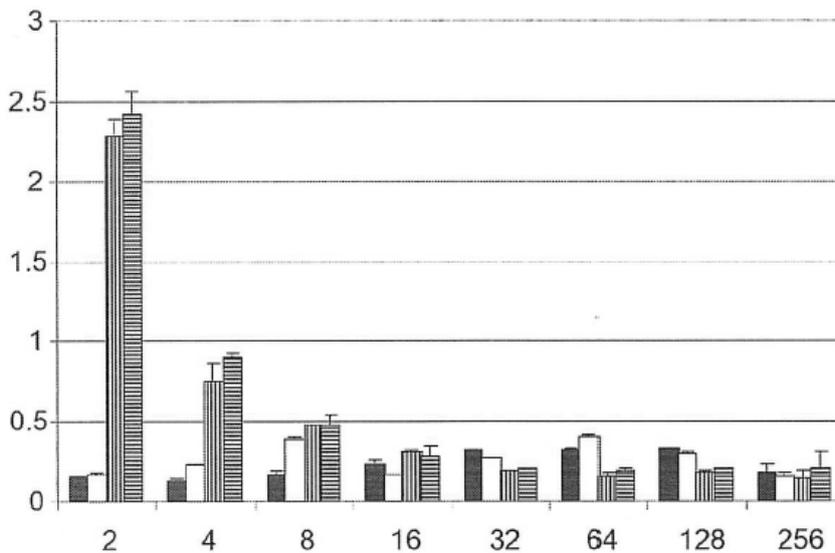
Negro = 2 semanas post inmunización

Blanco = 4 semanas post inmunización

Líneas verticales = 6 semanas post inmunización

Líneas horizontales = 8 semanas post inmunización

Figura 15A



A: Fluviral (5µg) + 5mer4 libre (50µg)

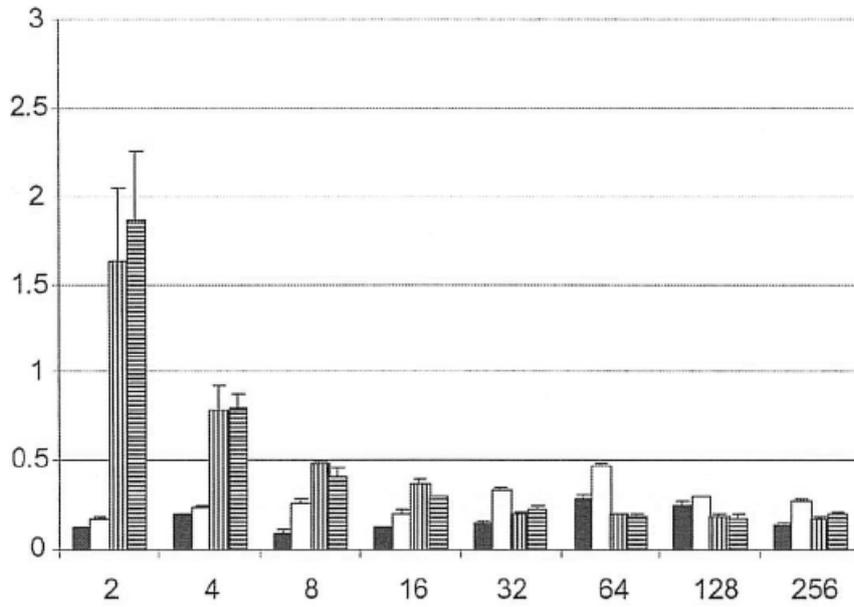
Negro= 2 semanas post inmunización

Blanco= 4 semanas post inmunización

Líneas verticales = 6 semanas post inmunización

Líneas horizontales = 8 semanas post inmunización

Figura 15B



B: Fluviral (5µg) solo

Negro = 2 semanas post inmunización

Blanco = 4 semanas post inmunización

Líneas verticales = 6 semanas post inmunización

Líneas horizontales = 8 semanas post inmunización

Figura 16

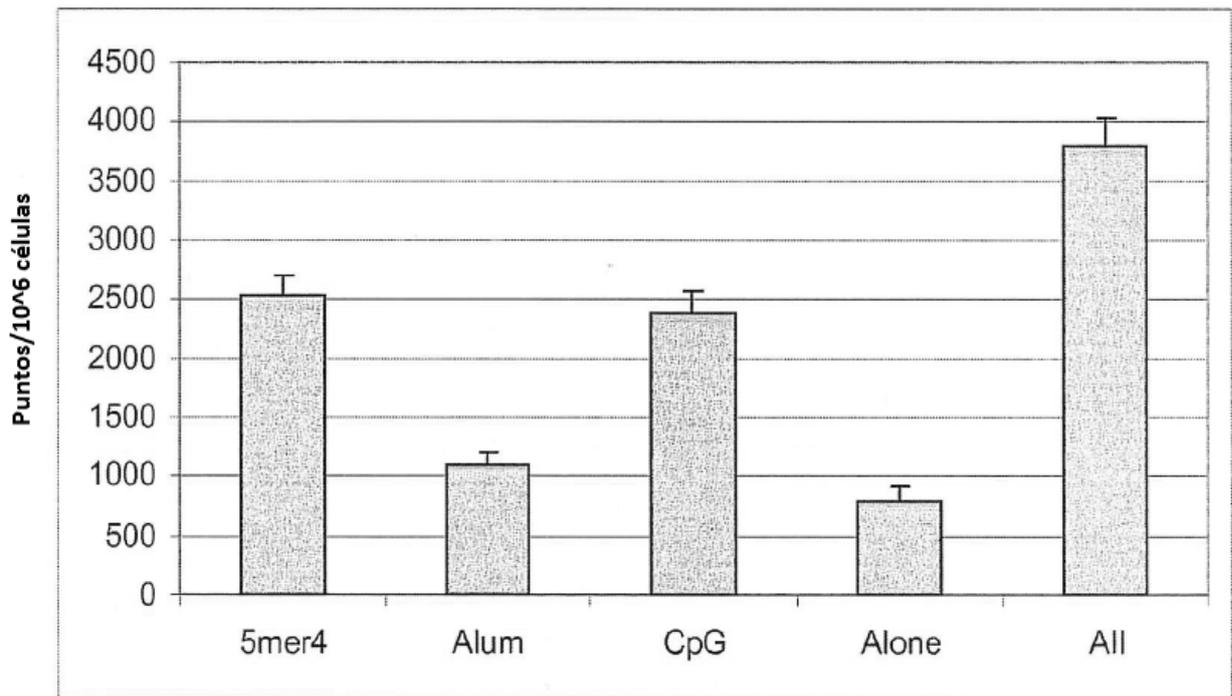


Figura 17

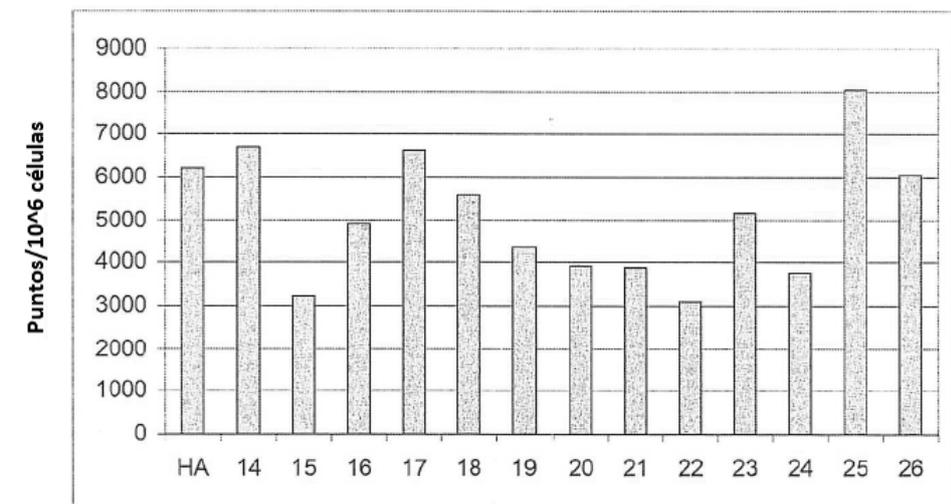
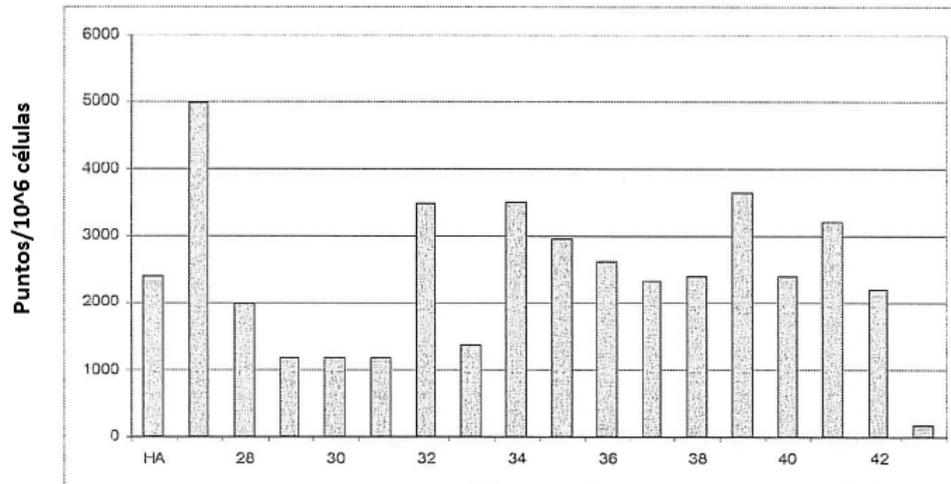
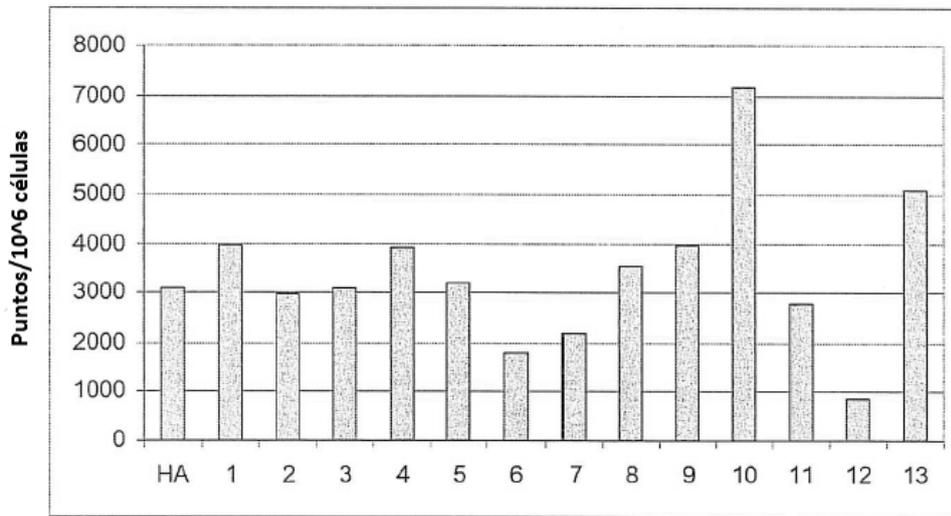


Figura 18

