

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 799**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2012 PCT/US2012/054786**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13039989**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2012 E 12831495 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2755680**

54 Título: **Formulaciones de vacunas particuladas**

30 Prioridad:

12.09.2011 US 201161533512 P

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

15.11.2018

73 Titular/es:

**PDS BIOTECHNOLOGY CORPORATION (100.0%)
675 US Highway One
North Brunswick, NJ 08902, US**

72 Inventor/es:

**BEDU-ADDO, FRANK;
CONN, GREGORY;
JACOBSON, ERIC;
MERCER, CAROL y
JOHNSON, KENYA**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 689 799 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

Formulaciones de vacunas particuladas

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio bajo 35 USC § 119 (e) de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° de Serie 61/533.512, presentada el 12 de septiembre de 2011.

10 CAMPO TÉCNICO

El desarrollo de inmunoterapias y vacunas terapéuticas seguras y eficaces para uso humano sigue siendo una necesidad médica importante para los pacientes en todo el mundo. Típicamente, una formulación de vacuna incluye un antígeno para estimular una respuesta inmunitaria dirigida. Sin embargo, algunas vacunas de desarrollo son ineficaces debido a que son estimuladores débiles de una respuesta inmunitaria en una amplia población de mamíferos. Por ejemplo, el antígeno en la formulación de vacuna puede ser poco inmunogénica en el mamífero. Además, algunas vacunas pueden no suministrar eficientemente los antígenos a las células presentadoras de antígenos ("APC") del sistema inmunitario del mamífero.

Además, algunos antígenos en formulaciones de vacuna son conocidos por ser malos estimuladores de una respuesta inmunitaria en mamíferos. Otros antígenos pueden requerir un procesamiento por el sistema inmunitario de los mamíferos en un epítipo antigénico específico con el fin de ser eficaz. Como resultado, es necesaria la liberación de mayores cantidades de estos antígenos. Sin embargo, la liberación de tales mayores cantidades puede no llevarse a cabo de forma eficaz y segura utilizando sistemas de liberación de nanopartículas. La administración de antígenos de proteínas y péptidos en una solución acuosa también puede no ser beneficiosa porque dichos antígenos son típicamente débilmente inmunogénicos y son escasamente absorbidos por APC. Aunque el desarrollo de antígenos en partículas de tipo virus (VLP) ha tenido éxito, las VLP son indeseablemente costosas de producir y requieren el uso de grandes proteínas recombinantes, requiriendo a menudo proteínas de fusión y técnicas de ensamblaje específicas y complejas. Además, las VLP excluyen el uso de antígenos peptídicos.

30 ANTECEDENTES Y CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

Las vacunas también incluyen típicamente adyuvantes en un intento de mejorar la eficacia de los antígenos en la formulación de vacuna. Por ejemplo, los adyuvantes, tales como emulsiones de agua en aceite, alumbre (por ejemplo, sales de aluminio) y otros productos químicos, se utilizan típicamente para mejorar la respuesta al antígeno en un mamífero. Además de los adyuvantes tradicionales, se pueden usar otros adyuvantes con efectos inmunitarios intrínsecos (por ejemplo, virosomas de la gripe y MF59 de Chiron). Sin embargo, estos adyuvantes son también indeseables porque las pruebas en modelos animales (de acuerdo con los informes de ensayos clínicos sobre vacunas contra HSV y la gripe) sugieren que simplemente mejoran la producción de anticuerpos neutralizantes en lugar de mejorar las respuestas de células T en los animales.

El documento US 2008/248044 A1 da a conocer péptidos poliepitópicos de VPH 16 E6 y E7. Dichos péptidos se pueden formular como lipopéptidos unidos a un resto de palmitoilo por medio de un residuo de K. Los lipopéptidos resultantes se formulan en micelas mediante dispersión en solución de ácido acético y dichas micelas se formulan en una vacuna.

Por lo tanto, existe una necesidad de nuevas formulaciones de vacunas que liberen eficazmente antígenos o promuevan la captación de antígenos por células presentadoras de antígenos con el fin de estimular una respuesta inmunitaria en un mamífero. Además, también son muy deseables procedimientos nuevos y eficaces de estimulación de respuestas inmunitarias mediadas por células en mamíferos, posiblemente mediante la inclusión de un modificador inmunológico ("inmunomodulador") seguro y eficaz en una formulación de vacuna. En consecuencia, la presente descripción proporciona formulaciones de vacuna y procedimientos de uso de las formulaciones que muestran propiedades deseables y proporcionan ventajas relacionadas de mejora en la simplicidad, la captación de antígenos y la inducción de una respuesta inmunitaria en un mamífero.

La presente descripción proporciona formulaciones de vacuna que comprenden al menos un ensamblaje de antígeno peptídico y al menos un adyuvante. La descripción también proporciona procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero y procedimientos para tratar una enfermedad en un mamífero que utiliza las formulaciones de vacuna.

Las formulaciones de vacuna y procedimientos de acuerdo con la presente descripción proporcionan varias ventajas en comparación con otras formulaciones y procedimientos en la técnica. En primer lugar, las formulaciones de vacunas incluyen un adyuvante que es un inmunomodulador para mejorar, dirigir o promover una respuesta inmunitaria apropiada en un mamífero. Los inmunomoduladores tienen el potencial de reforzar de manera eficaz la respuesta inmunitaria de un mamífero a antígenos si se incluyen en una formulación de vacuna. Por ejemplo, un inmunomodulador puede lograr ventajosamente uno o más de los siguientes: (1) mejorar la liberación y/o el

procesamiento de antígenos en la APC, (2) inducir la producción de citoquinas inmunomoduladoras que favorecen el desarrollo de la respuesta inmunitaria al antígeno, promoviendo así la inmunidad mediada por células, incluyendo linfocitos T citotóxicos ("CTL"), (3) reducir el número de inmunizaciones o la cantidad de antígeno requerida para una vacuna eficaz, (4) aumentar la vida media biológica o inmunológica del antígeno de la vacuna y (5) superar la tolerancia inmunitaria a antígeno mediante la inhibición de factores inmunosupresores. En algunas realizaciones, los adyuvantes a base de lípidos catiónicos se pueden utilizar como adyuvantes inmunomodificadores potentes y pueden provocar respuestas inmunitarias superiores de células T y anticuerpos en formulaciones de vacunas.

En segundo lugar, las formulaciones de vacunas, tales como formulaciones de vacunas particuladas, incluyen un ensamblaje de antígeno natural o de autoformación, tal como una estructura micelar o una estructura de bicapa, que promueve eficazmente mayores cantidades de captación de antígenos por las APC en comparación con formulaciones de vacunas tradicionales. Dicho ensamblaje de antígeno permite la formulación de antígenos en una forma adecuada para ser captados y procesados por APC en un mamífero, dando lugar a una respuesta inmunitaria específica de antígeno más potente. Además, la formación espontánea de los antígenos de proteína o péptido en estructuras particuladas organizadas simples, tales como estructuras micelares o bicapa en medios acuosos permite estructuras que se pueden captar y procesar con eficacia por las APC. En consecuencia, se pueden administrar potentes formulaciones de vacunas en una mezcla o en combinación con adyuvantes.

En tercer lugar, los péptidos o proteínas utilizados en los ensamblajes de antígenos pueden ser modificados de tal manera que la relación grupos hidrófilos con respecto a grupos lipófilos permite la formación de estructuras de bicapa o micelares. La modificación del antígeno de la proteína o péptido se puede conseguir por diversos medios, tales como mediante la unión de un grupo lipófilo (por ejemplo, una cadena hidrocarbonada o una secuencia de aminoácido hidrófoba) a un péptido hidrófilo y viceversa con una proteína o péptido hidrófobo. El tamaño de los grupos unidos también puede modificarse en función del tamaño del péptido y el grado de hidrofobicidad o hidrofiliidad deseado.

Por último, tal como se demuestra en la presente descripción, tales formulaciones de vacunas dan como resultado una inmunogenicidad significativamente mejor de las vacunas en comparación con la administración de cantidades idénticas de antígeno y adyuvante a través de formulaciones de vacunas tradicionales encapsuladas como liposomas o micelas.

Se contemplan las siguientes realizaciones numeradas y no son limitantes:

1. Una formulación de vacuna que comprende un adyuvante y un ensamblaje de antígeno.
2. La formulación de vacuna de la cláusula 1, en la que la formulación es una formulación de vacuna particulada.
3. La formulación de vacuna de la cláusula 1 o la cláusula 2, en la que el adyuvante y el ensamblaje de antígeno son una mezcla.
4. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 3, en la que el adyuvante es un inmunomodulador.
5. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 4, en la que el adyuvante es una nanopartícula.
6. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 5, en la que el adyuvante es un lípido catiónico.
7. La formulación de vacuna de la cláusula 6, en la que el lípido catiónico está purificado.
8. La formulación de vacuna de la cláusula 6 o la cláusula 7, en la que el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste en DOTAP, DOTMA, DOEPC, y combinaciones de los mismos.
9. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 6 a 8, en la que el lípido catiónico es DOTAP.
10. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 6 a 8, en la que el lípido catiónico es DOTMA.
11. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 6 a 8, en la que el lípido catiónico es DOEPC.
12. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 5, en la que el adyuvante es un enantiómero de un lípido catiónico.
13. La formulación de vacuna de la cláusula 12, en la que el enantiómero está purificado.
14. La formulación de vacuna de la cláusula 12 o la cláusula 13, en la que el enantiómero es R-DOTAP o S-DOTAP.
15. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 12 a 14, en la que el enantiómero es R-DOTAP.
16. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 12 a 14, en la que el enantiómero es S-DOTAP.
17. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 16, en la que el ensamblaje de antígeno es una estructura de auto-ensamblaje.
18. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 17, en la que el ensamblaje de antígeno es una estructura micelar.
19. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 17, en la que el ensamblaje de antígeno es una estructura de bicapa lipídica.
20. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 19, en la que el ensamblaje de antígeno es una estructura tubular.
21. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 19, en la que el ensamblaje de antígeno es

- una estructura esférica.
22. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 21, en la que el ensamblaje de antígeno comprende uno o más antígenos.
- 5 23. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 22, en la que uno o más antígenos son un antígeno basado en proteína.
24. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 23, en la que uno o más antígenos son un antígeno basado en péptido.
25. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 24, en la que uno o más antígenos se seleccionan del grupo que consiste en un antígeno de cáncer, un antígeno viral, un antígeno bacteriano y un antígeno patogénico.
- 10 26. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 25, en la que uno o más antígenos son un antígeno viral.
27. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 26, en la que uno o más antígenos son un antígeno bacteriano.
- 15 28. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 27, en la que uno o más antígenos son un antígeno patogénico.
29. La formulación de vacuna de la cláusula 28, en la que el antígeno patogénico es un antígeno sintético o recombinante.
30. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 29, en la que al menos un antígeno es una proteína o péptido de VPH.
- 20 31. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 30, en la que al menos un antígeno es un antígeno de melanoma.
32. La formulación de vacuna de la cláusula 31, en la que el antígeno de melanoma se selecciona del grupo que comprende gp100 (KVPRNQDWL [SEQ. ID. N° 8]), TRP2 (SYVDFVWL [SEQ. ID. N° 9]), y p53 (KYICNSSCM [SEQ. ID. N° 10]), y combinaciones de los mismos.
- 25 33. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 32, en la que al menos un antígeno se selecciona del grupo que consiste en una lipoproteína, un lipopéptido, y una proteína o péptido modificado con una secuencia de aminoácidos que tiene una mayor hidrofobicidad o una menor hidrofobicidad.
34. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 33, en la que uno o más antígenos es un antígeno lipidado o un antígeno modificado para aumentar la hidrofobicidad del antígeno.
- 30 35. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 34, en la que al menos un antígeno es una proteína o péptido modificado.
36. La formulación de vacuna de la cláusula 35, en la que la proteína o péptido modificado está unido a un grupo hidrófobo.
- 35 37. La formulación de vacuna de la cláusula 35 o la cláusula 36, en la que la proteína o péptido modificado unido a un grupo hidrófobo comprende además una secuencia enlazadora entre el antígeno y el grupo hidrófobo.
38. La formulación de vacuna de la cláusula 37, en el que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoílo.
39. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 38, en la que al menos un antígeno es una proteína o péptido no modificado.
- 40 40. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 39, en la que al menos un antígeno se selecciona del grupo que consiste en RAHYNIVTF (SEQ ID NO: 1), GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 2), KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 3), YMLDLQPETT (SEQ ID NO: 4), KSSYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 5), KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 6), KSSLLMGTGIVCPICSQKP (SEQ ID NO: 7), KVPRNQDWL (SEQ ID NO: 8), SYVDFVWL (SEQ ID NO: 9), KYICNSSCM (SEQ ID NO: 10), y KSSKVPRNQDWL (SEQ ID NO: 11).
- 45 41. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 40, en la que al menos un antígeno es RAHYNIVTF (SEQ ID NO: 1).
42. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 41, en la que al menos un antígeno es GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 2).
- 50 43. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 42, en la que al menos un antígeno es KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 3).
44. La formulación de vacuna de la cláusula 43, en la que KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 3) se modifica para comprender, además, un grupo hidrófobo.
45. La formulación de vacuna de la cláusula 44, en la que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoílo.
- 55 46. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 45, en la que al menos un antígeno es YMLDLQPETT (SEQ ID NO: 4).
47. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 46, en la que al menos un antígeno es KSSYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 5).
48. La formulación de vacuna de la cláusula 47, en la que KSSYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 5) se modifica para comprender, además, un grupo hidrófobo.
- 60 49. La formulación de vacuna de la cláusula 48, en la que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoílo.
50. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 49, en la que al menos un antígeno es KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 6).
51. La formulación de vacuna de la cláusula 50, en la que KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 6) se modifica para comprender, además, un grupo hidrófobo.
- 65 52. La formulación de vacuna de la cláusula 51, en la que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoílo.

53. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 52, en la que al menos un antígeno es KSSLMLGTLGIVCPICSQKP (SEQ ID NO: 7).
54. La formulación de vacuna de la cláusula 53, en la que KSSLMLGTLGIVCPICSQKP (SEQ ID NO: 7) se modifica para comprender, además, un grupo hidrófobo.
55. La formulación de vacuna de la cláusula 54, en la que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoílo.
56. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 55, en la que al menos un antígeno es KVPRNQDWL (SEQ ID NO: 8).
57. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 56, en la que al menos un antígeno es SYVDFVWL (SEQ ID NO: 9).
58. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 57, en la que al menos un antígeno es KYICNSSCM (SEQ ID NO: 10).
59. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 58, en la que al menos un antígeno es KSSKVPRNQDWL (SEQ ID NO: 11).
60. La formulación de vacuna de la cláusula 59, en la que KSSKVPRNQDWL (SEQ ID NO: 11) se modifica para comprender, además, un grupo hidrófobo.
61. La formulación de vacuna de la cláusula 60, en la que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoílo.
62. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 61, en la que la formulación induce una respuesta inmunitaria en un mamífero mediante la activación de la vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAP).
63. La formulación de vacuna de la cláusula 62, en la que la vía de señalización de MAP quinasa se activa mediante la estimulación de al menos una de quinasa regulada por señal extracelular ("ERK")-1, ERK-2, y p38.
64. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 1 a 63, en la que la formulación mejora la respuesta de los linfocitos T CD8+ específicos de antígeno funcional en un mamífero.
65. La formulación de vacuna según una cualquiera de las cláusulas 62 a 64, en la que el mamífero es un ser humano.
66. Un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar una cantidad eficaz de una formulación de vacuna al mamífero, en el que la formulación de vacuna comprende un adyuvante y un ensamblaje de antígeno.
67. El procedimiento de la cláusula 66, en el que la respuesta inmunitaria se activa a través de la vía de señalización de MAP quinasa en las células del sistema inmunitario del mamífero.
68. El procedimiento de la cláusula 67, en el que la vía de señalización de MAP quinasa se activa mediante la estimulación de al menos una de ERK-1, ERK-2, y p38.
69. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 66 a 68, en el que la respuesta inmunitaria activa los linfocitos T citotóxicos en el mamífero.
70. El procedimiento de la cláusula 69, en el que los linfocitos T citotóxicos son células T CD8+.
71. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 66 a 70, en el que la administración mejora la respuesta de los linfocitos T CD8 + específica de antígeno funcional en el mamífero.
72. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 66 a 71, en el que la respuesta inmunitaria activa una respuesta de anticuerpos en el mamífero.
73. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 66 a 72, en el que la respuesta inmunitaria activa interferón-gamma (IFN- γ) en el mamífero.
74. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 66 a 73, en el que la formulación es una formulación de vacuna de partículas.
75. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 66 a 74, en el que el adyuvante y el ensamblaje de antígenos son una mezcla.
76. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 66 a 75, en el que el adyuvante es un inmunomodulador.
77. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 66 a 76, en el que el adyuvante es una nanopartícula.
78. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 66 a 77, en el que el adyuvante es un lípido catiónico.
79. El procedimiento de la cláusula 78, en el que el lípido catiónico está purificado.
80. El procedimiento de la cláusula 78 o la cláusula 79, en el que el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste en DOTAP, DOTMA, DOEPC, y combinaciones de los mismos.
81. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 78 a 80, en el que el lípido catiónico es el DOTAP.
82. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 78 a 80, en el que el lípido catiónico es DOTMA.
83. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 78 a 80, en el que el lípido catiónico es DOEPC.
84. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 66 a 78, en el que el adyuvante es un enantiómero de un lípido catiónico.
85. El procedimiento de la cláusula 84, en el que el enantiómero está purificado.
86. El procedimiento de la cláusula 84 o la cláusula 85, en el que el enantiómero es R-DOTAP o S-DOTAP.
87. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 84 a 86, en el que el enantiómero es R-DOTAP.
88. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 84 a 86, en el que el enantiómero es S-DOTAP.
89. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 66 a 88, en la que el ensamblaje de antígeno es una estructura de auto-ensamblaje.
90. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 66 a 89, en la que el ensamblaje de antígeno es una estructura micelar.
91. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 66 a 89, en la que el ensamblaje de antígeno es una

- estructura de bicapa lipídica.
92. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 66 a 91, en la que el ensamblaje de antígeno es una estructura tubular.
93. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 66 a 91, en la que el ensamblaje de antígeno es una estructura esférica.
94. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 66 a 93, en la que el ensamblaje de antígeno comprende uno o más antígenos.
95. El procedimiento de la cláusula 94, en el que uno o más antígenos son un antígeno basado en proteína.
96. El procedimiento de la cláusula 94, en el que uno o más antígenos son un antígeno basado en péptidos.
97. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 96, en el que uno o más antígenos se seleccionan del grupo que consiste en un antígeno de cáncer, un antígeno viral, un antígeno bacteriano y un antígeno patogénico.
98. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 97, en el que uno o más antígenos son un antígeno viral.
99. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 97, en el que uno o más antígenos son un antígeno bacteriano.
100. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 97, en el que uno o más antígenos son un antígeno patógeno.
101. El procedimiento de la cláusula 100, en el que el antígeno patogénico es un antígeno sintético o recombinante.
102. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 101, en el que al menos un antígeno es una proteína o péptido de VPH.
103. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 102, en el que al menos un antígeno es un antígeno de melanoma.
104. El procedimiento de la cláusula 103, en el que el antígeno de melanoma se selecciona del grupo que comprende gp100 (KVPRNQDWL [SEQ. ID. N° 8]), TRP2 (SYVDFVWL [SEQ. ID. N° 9]) y p53 (KYICNSSCM [SEQ. ID. N° 10]) y combinaciones de los mismos.
105. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 104, en el que al menos un antígeno se selecciona del grupo que consiste en una lipoproteína, un lipopéptido y una proteína o péptido modificado con una secuencia de aminoácidos que tiene una mayor hidrofobicidad o una menor hidrofobicidad.
106. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 105, en el que uno o más antígenos es un antígeno lipidado o un antígeno modificado para aumentar la hidrofobicidad del antígeno.
107. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 106, en el que al menos un antígeno es una proteína o péptido modificado.
108. El procedimiento de la cláusula 107, en el que la proteína o péptido modificado está unido a un grupo hidrófobo.
109. El procedimiento de la cláusula 107 o cláusula 108, en el que la proteína o péptido modificado unido a un grupo hidrófobo comprende además una secuencia enlazadora entre el antígeno y el grupo hidrófobo.
110. El procedimiento de la cláusula 109, en el que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoilo.
111. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 110, en el que al menos un antígeno es una proteína o péptido no modificado.
112. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 111, en el que al menos un antígeno se selecciona del grupo que consiste en RAHYNIVTF (SEQ ID NO: 1), GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 2), KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID NO: 3), YMLDLQPETT (SEQ ID NO: 4), KSSYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 5), KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 6), KSSLLMGTGIVCPICSQKP (SEQ ID NO: 7), KVPRNQDWL (SEQ ID NO: 8), SYVDFVWL (SEQ ID NO: 9), KYICNSSCM (SEQ ID NO: 10) y KSSKVPRNQDWL (SEQ ID NO: 11).
113. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 112, en el que al menos un antígeno es RAHYNIVTF (SEQ ID NO: 1).
114. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 113, en el que al menos un antígeno es GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 2).
115. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 114, en el que al menos un antígeno es KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 3).
116. El procedimiento de la cláusula 115, en el que KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 3) se modifica para comprender, además, un grupo hidrófobo.
117. El procedimiento de la cláusula 116, en el que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoilo.
118. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 117, en el que al menos un antígeno es YMLDLQPETT (SEQ ID NO: 4).
119. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 118, en el que al menos un antígeno es KSSYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 5).
120. El procedimiento de la cláusula 119, en el que KSSYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 5) se modifica para comprender, además, un grupo hidrófobo.
121. El procedimiento de la cláusula 120, en el que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoilo.
122. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 121, en el que al menos un antígeno es KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 6).
123. El procedimiento de la cláusula 122, en el que KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 6) se modifica para comprender, además, un grupo hidrófobo.

124. El procedimiento de la cláusula 123, en el que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoilo.
125. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 124, en el que al menos un antígeno es KSSLLMGLTIVCPICSQKP (SEQ ID NO: 7).
- 5 126. El procedimiento de la cláusula 125, en el que KSSLLMGLTIVCPICSQKP (SEQ ID NO: 7) se modifica para comprender, además, un grupo hidrófobo.
127. El procedimiento de la cláusula 126, en el que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoilo.
128. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 127, en el que al menos un antígeno es KVPRNQDWL (SEQ ID NO: 8).
- 10 129. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 128, en el que al menos un antígeno es SYVDFVWL (SEQ ID NO: 9).
130. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 129, en el que al menos un antígeno es KYICNSSCM (SEQ ID NO: 10).
131. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 94 a 130, en el que al menos un antígeno es KSSKVPRNQDWL (SEQ ID NO: 11).
- 15 132. El procedimiento de la cláusula 131, en el que KSSKVPRNQDWL (SEQ ID NO: 11) se modifica para comprender, además, un grupo hidrófobo.
133. El procedimiento de la cláusula 132, en el que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoilo.
134. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 66 a 133, en el que el mamífero es un humano.
- 20 135. Un procedimiento para tratar una enfermedad en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar una cantidad eficaz de una formulación de vacuna al mamífero, en el que la formulación de vacuna comprende un adyuvante y un ensamblaje de antígeno.
136. El procedimiento de la cláusula 135, en el que el procedimiento es un tratamiento profiláctico.
137. El procedimiento de la cláusula 135, en el que la enfermedad es un cáncer.
- 25 138. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 137, en el que la administración activa una respuesta inmunitaria a través de la vía de señalización de MAP quinasa en células del sistema inmunitario del mamífero.
139. El procedimiento de la cláusula 138, en el que la vía de señalización de MAP quinasa se activa mediante la estimulación de al menos una de ERK-1, ERK-2 y p38.
- 30 140. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 139, en el que la respuesta inmunitaria activa los linfocitos T citotóxicos en el mamífero.
141. El procedimiento de la cláusula 140, en el que los linfocitos T citotóxicos son células T CD8+.
142. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 141, en el que la respuesta inmunitaria activa una respuesta de anticuerpos en el mamífero.
- 35 143. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 142, en el que la respuesta inmunitaria activa interferón-gamma (IFN- γ) en el mamífero.
144. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 143, en el que la administración mejora la respuesta de los linfocitos T CD8+ específicos de antígeno funcional.
145. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 144, en el que la formulación es una formulación de vacuna particulada.
- 40 146. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 145, en el que el adyuvante y el ensamblaje de antígeno son una mezcla.
147. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 146, en el que el adyuvante es un inmunomodulador.
- 45 148. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 147, en el que el adyuvante es una nanopartícula.
149. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 148, en el que el adyuvante es un lípido catiónico.
- 50 150. El procedimiento de la cláusula 149, en el que el lípido catiónico está purificado.
151. El procedimiento de la cláusula 149 o la cláusula 150, en el que el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste en DOTAP, DOTMA, DOEPC, y combinaciones de los mismos.
- 55 152. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 149 a 151, en el que el lípido catiónico es DOTAP.
153. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 149 a 151, en el que el lípido catiónico es DOTMA.
154. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 149 a 151, en el que el lípido catiónico es DOEPC.
155. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 148, en el que el adyuvante es un enantiómero de un lípido catiónico.
- 60 156. El procedimiento de la cláusula 155, en el que el enantiómero está purificado.
157. El procedimiento de la cláusula 155 o la cláusula 156, en el que el enantiómero es R-DOTAP o S-DOTAP.
158. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 155 a 157, en el que el enantiómero es R-DOTAP.
159. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 155 a 157, en el que el enantiómero es S-DOTAP.
- 65 160. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 159, en el que el ensamblaje de antígeno es una estructura de autoensamblaje.
161. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 160, en el que el ensamblaje de antígeno es una estructura micelar.
162. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 160, en el que el ensamblaje de antígeno es una estructura de bicapa lipídica.
163. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 162, en el que el ensamblaje de antígeno es

una estructura tubular.

164. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 162, en la que el ensamblaje de antígeno es una estructura esférica.

165. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 164, en la que el ensamblaje de antígeno comprende uno o más antígenos.

166. El procedimiento de la cláusula 165, en el que uno o más antígenos es un antígeno basado en proteína.

167. El procedimiento de la cláusula 165 o la cláusula 166, en el que uno o más antígenos son un antígeno basado en péptido.

168. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 167, en el que uno o más antígenos se seleccionan del grupo que consiste en un antígeno de cáncer, un antígeno viral, un antígeno bacteriano y un antígeno patogénico.

169. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 168, en el que uno o más antígenos son un antígeno viral.

170. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 168, en el que uno o más antígenos son un antígeno bacteriano.

171. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 168, en el que uno o más antígenos son un antígeno patogénico.

172. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 168, en el que el antígeno patogénico es un antígeno sintético o recombinante.

173. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 172, en el que al menos un antígeno es una proteína o péptido de VPH.

174. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 173, en el que al menos un antígeno es un antígeno de melanoma.

175. El procedimiento de la cláusula 174, en el que el antígeno de melanoma se selecciona del grupo que comprende gp100 (KVPRNQDWL [SEQ. ID. NO: 8]), TRP2 (SYVDFVWL [SEQ. ID. NO: 9]), y p53 (KYICNSSCM [SEQ. ID. NO: 10]), y combinaciones de los mismos.

176. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 175, en el que al menos un antígeno se selecciona del grupo que consiste en una lipoproteína, un lipopéptido y una proteína o péptido modificado con una secuencia de aminoácidos que tiene una mayor hidrofobicidad o una menor hidrofobicidad.

177. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 176, en el que uno o más antígenos son un antígeno lipidado o un antígeno modificado para aumentar la hidrofobicidad del antígeno.

178. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 177, en el que al menos un antígeno es una proteína o péptido modificado.

179. El procedimiento de la cláusula 178, en el que la proteína o péptido modificado está unido a un grupo hidrófobo.

180. El procedimiento de la cláusula 178, en el que la proteína o péptido modificado unido a un grupo hidrófobo comprende además una secuencia enlazadora entre el antígeno y el grupo hidrófobo.

181. El procedimiento de la cláusula 180, en el que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoilo.

182. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 181, en el que al menos un antígeno es una proteína o péptido no modificado.

183. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 182, en el que al menos un antígeno se selecciona del grupo que consiste en RAHYNIVTF (SEQ ID NO: 1), GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 2), KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID NO: 3), YMLDLQPETT (SEQ ID NO: 4), KSSYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 5), KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 6), KSSLLMGTGIVCPICSQKP (SEQ ID NO: 7), KVPRNQDWL (SEQ ID NO: 8), SYVDFVWL (SEQ ID NO: 9), KYICNSSCM (SEQ ID NO: 10), y KSSKVPRNQDWL (SEQ ID NO: 11).

184. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 183, en el que al menos un antígeno es RAHYNIVTF (SEQ ID NO: 1).

185. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 184, en el que al menos un antígeno es GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 2).

186. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 185, en el que al menos un antígeno es KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 3).

187. El procedimiento de la cláusula 186, en el que KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 3) se modifica para comprender, además, un grupo hidrófobo.

188. El procedimiento de la cláusula 187, en el que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoilo.

189. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 188, en el que al menos un antígeno es YMLDLQPETT (SEQ ID NO: 4).

190. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 189, en el que al menos un antígeno es KSSYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 5).

191. El procedimiento de la cláusula 190, en el que KSSYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 5) se modifica para comprender, además, un grupo hidrófobo.

192. El procedimiento de la cláusula 191, en el que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoilo.

193. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 192, en el que al menos un antígeno es KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 6).

194. El procedimiento de la cláusula 193, en el que KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 6) se modifica para comprender, además, un grupo hidrófobo.

195. El procedimiento de la cláusula 194, en el que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoilo.

196. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 195, en el que al menos un antígeno es KSSLLMGLTGLIVCPICSQKP (SEQ ID NO: 7).

5 197. El procedimiento de la cláusula 196, en el que KSSLLMGLTGLIVCPICSQKP (SEQ ID NO: 7) se modifica para comprender, además, un grupo hidrófobo.

198. El procedimiento de la cláusula 197, en el que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoilo.

199. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 198, en el que al menos un antígeno es KVPRNQDWL (SEQ ID NO: 8).

10 200. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 199, en el que al menos un antígeno es SYVDFVWL (SEQ ID NO: 9).

201. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 200, en el que al menos un antígeno es KYICNSSCM (SEQ ID NO: 10).

202. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 165 a 201, en el que al menos un antígeno es KSSKVPRNQDWL (SEQ ID NO: 11).

15 203. El procedimiento de la cláusula 202, en el que KSSKVPRNQDWL (SEQ ID NO: 11) se modifica para comprender, además, un grupo hidrófobo.

204. El procedimiento de la cláusula 203, en el que el grupo hidrófobo es un grupo palmitoilo.

205. El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas de 135 a 204, en el que el mamífero es un ser humano.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la respuesta inmunitaria antitumoral de diversos adyuvantes de lípidos catiónicos acoplados con el antígeno peptídico de VPH-16 E7 en comparación con adyuvantes tradicionales formulados de manera similar con el antígeno E7.

25 La Figura 2 muestra la eficacia de regresión del tumor con varias formulaciones encapsuladas con liposomas del complejo R-DOTAP/pE7₄₃₋₅₇ en comparación con el complejo R-DOTAP/pE7₄₉₋₅₇ en el que los aminoácidos 43 a 48 están ausentes de la región antigénica.

La Figura 3 muestra la eficacia de regresión del tumor utilizando una mezcla de micelas HVP-16 E7₄₃₋₅₇ modificadas con nanopartículas de adyuvantes liposomales de R-DOTAP o S-DOTAP en comparación con nanopartículas de liposomas con R-DOTAP vacías.

30 La Figura 4 muestra una imagen negativa microscopía electrónica con tinción de una formulación de vacuna que contiene micelas cilíndricas de pE7_{43-57M} compuestas de palmitoil-KSSGQAEPDRAHYNIVTF [SEQ. ID. No. 3] y nanopartículas esféricas de lípido catiónico R-DOTAP.

35 La Figura 5 muestra una imagen negativa de microscopía electrónica con tinción de una formulación de vacuna que contiene un ensamblaje de antígeno en estructuras de micelas esféricas que comprenden palmitoil-KSSYMLDLQPETT [SEQ. ID. NO: 5] y un adyuvante que comprende nanopartículas esféricas de liposomas con R-DOTAP R que coexisten en la mezcla formulada.

40 La Figura 6 muestra una imagen negativa de microscopía electrónica con tinción de una formulación de vacuna que contiene estructuras cilíndricas compuestas de pE7_{1-20M} o palmitoil - KSSMHGDPTLHEYMLDLQPETT [SEQ. ID. No. 6] y nanopartículas esféricas de lípido catiónico R-DOTAP.

La Figura 7 muestra los resultados de un estudio de ELISPOT que compara la respuesta inmunitaria específica de antígeno con el péptido de melanoma, gp100, en formulaciones de vacunas que contienen diversos antígenos de melanoma encapsulados en un adyuvante R-DOTAP y una formulación micelar de péptido de melanoma coadministradas con adyuvante de liposoma de R-DOTAP.

45 La figura 8 muestra los resultados de un estudio de ELISPOT que compara la respuesta inmunitaria específica de antígeno con el péptido de VPH-16 formulado en dosis idénticas como una micela y coadministrado con diversos adyuvantes frente al péptido de VPH-16 encapsulado en los adyuvantes de liposomas.

La presente invención se refiere a una formulación de vacuna de acuerdo con el conjunto de reivindicaciones.

50 A continuación, se describen en el presente documento diversas realizaciones de la invención. En una realización descrita en el presente documento, se proporciona una formulación de vacuna. La formulación de vacuna comprende un adyuvante y un ensamblaje de antígeno.

55 En otra realización, se proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero. El procedimiento comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una formulación de vacuna al mamífero, en el que la formulación de vacuna comprende un adyuvante y un ensamblaje de antígeno.

60 En aún otra realización, se proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad en un mamífero. El procedimiento comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una formulación de vacuna al mamífero, en el que la formulación de vacuna comprende un adyuvante y un ensamblaje de antígeno.

65 En las diversas realizaciones, la formulación de vacuna comprende un adyuvante y un ensamblaje de antígeno. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "adyuvante" se refiere a una sustancia que mejora, aumenta y/o potencia una respuesta inmunitaria de un mamífero a un antígeno. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ensamblaje de antígeno" se refiere a una composición que contiene uno o más antígenos.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la formulación de vacuna es una formulación de vacuna particulada. En algunas realizaciones, el adyuvante y el ensamblaje de antígeno son una mezcla.

5 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el adyuvante es un inmunomodulador. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "inmunomodulador" se refiere a un modificador inmunológico que mejora, dirige y/o promueve una respuesta inmunitaria en un mamífero.

10 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el adyuvante es una nanopartícula. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "nanopartícula" se refiere a una partícula que tiene un tamaño medido a escala nanométrica. Tal como se utiliza en el presente documento, la "nanopartícula" se refiere a una partícula que tiene una estructura con un tamaño de menos de aproximadamente 1000 nanómetros. En algunas realizaciones, la nanopartícula es un liposoma.

15 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el adyuvante es un lípido catiónico. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "lípido catiónico" se refiere a cualquiera de un número de especies de lípidos que llevan una carga neta positiva a pH fisiológico o que tienen un grupo protonable y están cargados positivamente a un pH más bajo que el pKa.

20 Los lípidos catiónicos adecuados de acuerdo con la presente descripción incluyen, pero no se limitan a: 3-beta [⁴N-(¹N,⁸-diguandino espermidina) carbamoil]colesterol (BGSC); 3-beta [N,N-diguandinoetil-aminoetano)-carbamoil]colesterol (BGTC); N,N¹N²N³Tetra-metiltetrapalmitilespermina (Cellfectin); N-t-butyl-N'-tetradecil-3-tetradecil-aminopropion-amidina (CLONfectin); bromuro de dimetildioctadecil amonio (DDAB); bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxi etil amonio (DMRIE); 2,3-dioleoiloxi-N-[2-(esperminacarboxamido) etil]-N,N-dimetil-1-p-trifluoracetato de ropanaminio (DOSPA); 1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxiespermil)-propil amida (DOSPER); 4-(2,3-bis-palmitoiloxi-propil)-1-metil-1H-imidazol (DPIM) yoduro de N,N,N',N'-tetrametil-N,N'-bis(2-hidroxietil)-2,3-dioleoiloxi-1,4-butano-diamonio (Tfx-50); cloruro de N-1-(2,3-dioleoiloxi)propil-N,N,N-trimetil amonio (DOTMA) u otros tensoactivos de amonio N-(N, N-1-dialcoxi)-alquil-N,N,N-trisustituidos; 1,2 dioleoil-3-(4'-trimetilamonio)butanol-sn-glicerol (DOBT) o butanoato de colesteril (4' trimetilamoniaco) (ChOTB), en el que el grupo trimetilamonio está conectado a través de un brazo espaciador de butanol a la doble cadena (para DOTB) o el grupo colesterilo (para ChOTB); DORI (DL-1,2-dioleoil-3-dimetilaminopropil-beta-hidroxietilamonio) o DORIE (DL-1,2-O-dioleoil-3-dimetilaminopropil-beta-hidroxietilamonio) (DORIE) o análogos de los mismos, tal como se describe en el documento WO 93/03709; éster de colina de 1,2-dioleoil-3-succinil-sn-glicerol (DOSC); éster de colesteril hemisuccinato (ChOSC); lipopoliaminas, tales como dioctadecilamidoglicilespermina (DOGS) y dipalmitoil fosfatidiletanolamilespermina (DPPES), yoduro de colesteril-3beta-carboxil-amido-etiltrimetilamonio, yoduro de 1-dimetilamino-3-trimetilamonio-DL-2-propil-colesteril carboxilato, colesteril-3- O-carboxiamidoetylenamina, yoduro de colesteril-3-beta-oxisuccinamido-etiltrimetilamonio, yoduro de 1-dimetilamino-3-trimetilamonio-DL-2-propil-colesteril-3-beta-oxisuccinato, yoduro de 2-(2-trimetilamonio)-etilmetilamino etil-colesteril-3-beta-oxisuccinato, 3-beta-N-(N', N'-dimetilaminoetano)carbamoil colesterol (DC-Chol) y 3-beta-N-(polietilenimina)-carbamoilcolesterol; O,O'-dimiristil-N-lisil aspartato (DMKE); O,O'-dimiristil-N-lisil-glutamato (DMKD); bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxi etil amonio (DMRIE); 1,2-dilauroil-sn-glicerol-3-etilfosfocolina (DLEPC); 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-etilfosfocolina (DMEPC); 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-etilfosfocolina (DOEPC); 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-etilfosfocolina (DPEPC); 1,2-diestearoil-sn-glicerol-3-etilfosfocolina (DSEPC); 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio propano (DOTAP); dioleoil dimetilamino propano (DODAP); 1,2-palmitoil-3-trimetilamoniopropano (DPTAP); 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio propano (DSTAP), 1,2-miristoil-3-trimetilamonio propano (DMTAP); y dodecil sulfato sódico (SDS). Además, también se contemplan variantes estructurales y derivados de la cualquiera de los lípidos catiónicos descritos.

50 En alguna realización, el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste en DOTAP, DOTMA, DOEPC, y combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el lípido catiónico es DOTAP. En aún otras realizaciones, el lípido catiónico es DOTMA. En otras realizaciones, el lípido catiónico es DOEPC. En algunas realizaciones, el lípido catiónico está purificado.

55 En algunas realizaciones, el lípido catiónico es un enantiómero de un lípido catiónico. El término "enantiómero" se refiere a un estereoisómero de un lípido catiónico que es una imagen especular no superponible de su estereoisómero homólogo, por ejemplo enantiómeros R y S. En diversos ejemplos, el enantiómero es R-DOTAP o S-DOTAP. En un ejemplo, el enantiómero es R-DOTAP. En otro ejemplo, el enantiómero es S-DOTAP. En algunas realizaciones, el enantiómero está purificado.

60 En diversas realizaciones descritas en el presente documento, el ensamblaje de antígeno es una estructura de autoensamblaje. En diversas realizaciones descritas en el presente documento, el ensamblaje de antígeno es una estructura micelar. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "micelar" se refiere a una agregación de moléculas, tal como en un sistema coloidal. En otras realizaciones, el ensamblaje de antígeno es una estructura de bicapa lipídica. En algunas realizaciones, el ensamblaje de antígeno es una estructura tubular. En aún otras realizaciones, el ensamblaje de antígeno es una estructura esférica.

65

En diversas realizaciones descritas en el presente documento, el ensamblaje de antígeno comprende uno o más antígenos. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a cualquier agente (por ejemplo, proteína, péptido, polisacárido, glicoproteína, glicolípido, ácido nucleico, o combinación de los mismos) que, cuando se introduce en un mamífero que tiene un sistema inmunitario (directamente o después de la expresión como en, por ejemplo, vacunas de ADN), es reconocido por el sistema inmunitario del mamífero y es capaz de provocar una respuesta inmunitaria. Tal como se define en el presente documento, la respuesta inmunitaria inducida por el antígeno puede ser humoral o mediada por células, o ambos. Un agente se denomina "antigénico" cuando es capaz de interactuar específicamente con una molécula de reconocimiento de antígeno del sistema inmunitario, tal como una inmunoglobulina (anticuerpo) o receptor de antígeno de células T (TCR).

En algunas realizaciones, uno o más antígenos es un antígeno basado en proteína. En otras realizaciones, uno o más antígenos es un antígeno basado en péptidos. En diversas realizaciones, uno o más antígenos se seleccionan del grupo que consiste en un antígeno de cáncer, un antígeno viral, un antígeno bacteriano y un antígeno patogénico. Un "antígeno microbiano", tal como se usa en el presente documento, es un antígeno de un microorganismo e incluye, pero no se limita a, virus infecciosos, bacterias infecciosas, parásitos infecciosos y hongos infecciosos. Los antígenos microbianos pueden ser microorganismos intactos y aislados naturales, fragmentos o derivados de los mismos, compuestos sintéticos que son idénticos o similares a antígenos microbianos naturales y, preferiblemente, inducen una respuesta inmunitaria específica para el microorganismo correspondiente (del que se produce el antígeno microbiano natural). En una realización, el antígeno es un antígeno viral. En otra realización, el antígeno es un antígeno bacteriano. En diversas realizaciones, el antígeno es un antígeno patogénico. En algunas realizaciones, el antígeno patogénico es un antígeno sintético o recombinante.

En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno de cáncer. Un "antígeno de cáncer", tal como se usa en el presente documento, es una molécula o compuesto (por ejemplo, una proteína, péptido, polipéptido, lipoproteína, lipopéptido, glicoproteína, glicopéptidos, lípidos, glicolípidos, carbohidratos, ARN y/o ADN) asociado con una célula tumoral o cancerosa y que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria (humoral y/o celular) cuando se expresa en la superficie de una célula presentadora de antígenos en el contexto de una molécula MHC. Por ejemplo, un antígeno de cáncer puede ser un antígeno asociado a tumor. Los antígenos asociados a tumores incluyen antígenos propios, así como otros antígenos que pueden no estar asociados específicamente con un cáncer, pero no obstante potencian una respuesta inmunitaria a y/o reducen el crecimiento de una célula tumoral o cancerosa cuando se administran a un mamífero. En una realización, al menos un antígeno es una proteína o péptido de VPH.

En algunas realizaciones, al menos un antígeno es un antígeno de melanoma. En una realización, el antígeno de melanoma se selecciona del grupo que comprende gp100 (KVPRNQDWL [SEQ. ID. No. 8]), TRP2 (SYVDFFVWL [SEQ. ID. No. 9]), y p53 (KYICNSSCM [SEQ. ID. No. 10]), y combinaciones de los mismos.

En diversas realizaciones, al menos un antígeno se selecciona del grupo que consiste en una lipoproteína, un lipopéptido y una proteína o péptido modificado con una secuencia de aminoácidos que tiene una mayor hidrofobicidad o una menor hidrofobicidad. En algunas realizaciones, uno o más antígenos son un antígeno modificado para aumentar la hidrofobicidad del antígeno. En una realización, al menos un antígeno es una proteína o péptido modificado. En algunas realizaciones, la proteína o péptido modificado está unido a un grupo hidrófobo. En otras realizaciones, la proteína o péptido modificado unido a un grupo hidrófobo comprende además una secuencia enlazadora entre el antígeno y el grupo hidrófobo. En algunas realizaciones, el grupo hidrófobo es un grupo palmitoílo. En todavía otras realizaciones, al menos un antígeno es una proteína o péptido no modificado.

En algunas realizaciones de la presente descripción, al menos un antígeno se selecciona del grupo que consiste en RAHYNIVTF (SEQ ID NO: 1), GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 2), KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 3), YMLDLQPETT (SEQ ID NO: 4), KSSYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 5), KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 6), KSSLLMGTGLGIVCPICSQKP (SEQ ID NO: 7), KVPRNQDWL (SEQ ID No: 8), SYVDFFVWL (SEQ ID NO: 9), KYICNSSCM (SEQ ID NO: 10), y KSSKVPRNQDWL (SEQ ID NO: 11). En una realización, al menos un antígeno es RAHYNIVTF (SEQ ID NO: 1). En otra realización, al menos un antígeno es GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 2). En todavía otra realización, al menos un antígeno es KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 3). En algunas realizaciones, KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ ID NO: 3) se modifica para comprender además un grupo hidrófobo. En una realización, el grupo hidrófobo es un grupo palmitoílo.

En otras realizaciones, al menos un antígeno es YMLDLQPETT (SEQ ID NO: 4). En otra realización, al menos un antígeno es KSSYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 5). En aún otra realización, KSSYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 5) se modifica para comprender además un grupo hidrófobo. En una realización, el grupo hidrófobo es un grupo palmitoílo.

En otras realizaciones, al menos un antígeno es KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 6). En otra realización, KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ ID NO: 6) se modifica para comprender, además, un grupo hidrófobo. En una realización, el grupo hidrófobo es un grupo palmitoílo.

En otras realizaciones, al menos un antígeno es KSSLLMGTGLGIVCPICSQKP (SEQ ID NO: 7). En algunas realizaciones, KSSLLMGTGLGIVCPICSQKP (SEQ ID NO: 7) se modifica para comprender además un grupo hidrófobo. En una realización, el grupo hidrófobo es un grupo palmitoílo.

5 En algunas realizaciones, al menos un antígeno es KVP RNQDWL (SEQ ID NO: 8). En otras realizaciones, al menos un antígeno es SYVDFVWL (SEQ ID NO: 9). En todavía otras realizaciones, al menos un antígeno es KYICNSSCM (SEQ ID NO: 10). En otra realización, al menos un antígeno es KSSKVPRNQDWL (SEQ ID NO: 11). En algunas realizaciones, KSSKVPRNQDWL (SEQ ID NO: 11) se modifica para comprender, además, un grupo hidrófobo. En una realización, el grupo hidrófobo es un grupo palmitoilo.

10 En diversas realizaciones descritas en el presente documento, la formulación de vacuna induce una respuesta inmunitaria en un mamífero mediante la activación de la vía de señalización de proteína quinasa activada por mitógeno (MAP). Se describe la inducción de una respuesta inmunitaria por adyuvantes, tales como lípidos catiónicos, por ejemplo, en el documento PCT/US2008/057678 (WO/2008/116078; "Stimulation of an Immune Response by Cationic Lipids") y PCT/US2009/040500 (WO/2009/129227; "Stimulation of an Immune Response by Enantiomers of Cationic Lipids"). En algunas realizaciones, la vía de señalización de MAP quinasa se activa mediante la estimulación de al menos una de quinasa extracelular regulada por señal ("ERK")-1, ERK-2, y p38. En 15 otras realizaciones, la formulación mejora la respuesta de los linfocitos T CD8 + específicos de antígeno funcional. El término "mamífero" es bien conocido por los expertos en la técnica. En una realización, el mamífero es un ser humano.

20 En una realización descrita en el presente documento, se proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero. El procedimiento comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una formulación de vacuna al mamífero, en el que la formulación de vacuna comprende un adyuvante y un ensamblaje de antígeno. Las realizaciones anteriormente descritas de la formulación de vacuna son aplicables al procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria en un mamífero descrito en el presente documento.

25 En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se activa a través de la vía de señalización de MAP quinasa en las células del sistema inmunitario del mamífero. En varias realizaciones, la vía de señalización de MAP quinasa se activa mediante la estimulación de al menos una de ERK-1, ERK-2, y p38.

30 En otras realizaciones, la respuesta inmunitaria activa los linfocitos T citotóxicos en el mamífero. En una realización, los linfocitos T citotóxicos son células T CD8+. En otra realización, la administración mejora la respuesta de los linfocitos T CD8+ específicos de antígeno funcional. En aún otra realización, la respuesta inmunitaria activa una respuesta de anticuerpos en el mamífero. En otras realizaciones, la respuesta inmunitaria activa interferón-gamma (IFN- γ) en el mamífero.

35 En una realización descrita en el presente documento, se proporciona un procedimiento de tratamiento de una enfermedad en un mamífero. El procedimiento comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una formulación de vacuna al mamífero, en el que la formulación de vacuna comprende un adyuvante y un ensamblaje de antígeno. Las realizaciones anteriormente descritas de la formulación de la vacuna y del procedimiento de inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero son aplicables al procedimiento de tratamiento de una enfermedad en un 40 mamífero descrito en el presente documento.

45 En algunas realizaciones, "tratamiento", "tratar" y "que trata", tal como se usan en el presente documento, con referencia a patógenos infecciosos, se refieren a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto a la infección con un patógeno o disminuye la probabilidad de que el sujeto sea infectado con el patógeno; y/o el tratamiento después de que el sujeto se haya infectado con el fin de luchar contra la infección, por ejemplo, reducir o eliminar la infección o prevenir que empeore. En una realización, el procedimiento es un tratamiento profiláctico.

EJEMPLO 1

50 Preparación de adyuvante y adyuvantes que incorporan un antígeno

Los adyuvantes se pueden preparar utilizando lípidos catiónicos solos. Alternativamente, los adyuvantes se pueden preparar usando mezclas de lípidos catiónicos y otros inmunomoduladores. Las formulaciones de vacuna se pueden preparar utilizando una formulación a base de lípidos catiónicos que incorpora un antígeno. En el presente ejemplo, 55 DOTAP fue utilizado como un lípido catiónico de ejemplo y el antígeno de péptido E7 de proteína de VPH se usó como un antígeno de ejemplo.

Se usó agua estéril para inyección (WFI) o un tampón en todos los procedimientos en los que se prepararon lípidos catiónicos en liposomas. En este ejemplo, los liposomas se prepararon utilizando películas lipídicas. El antígeno de 60 E7 utilizado para la incorporación en los liposomas fue un epítipo de CTL restringido a H-2D^b (aminoácido 49-57, RAHYNIVTF [SEQ. ID. NO. 1]) derivado de proteína E7 de VPH 16. Las películas lipídicas se realizaron en viales de vidrio mediante (1) disolución de los lípidos en un disolvente orgánico, tal como cloroformo, y (2) evaporación de la solución de cloroformo bajo una corriente constante de gas nitrógeno seco. Las trazas de disolvente orgánico se eliminaron manteniendo las películas bajo vacío durante la noche. Las películas lipídicas se hidrataron a 65 continuación mediante la adición de la cantidad requerida de WFI o tampón para obtener una concentración final de 4-10 mg/ml. Las suspensiones se extruyeron a continuación a un tamaño de 200 nm y se almacenaron a 4°C.

Para la preparación de lípido catiónico que incorpora un antígeno, la película lipídica de DOTAP se rehidrató por una solución acuosa de péptido E7. También se pueden utilizar otros procedimientos usados en la preparación general de liposomas que son bien conocidos para los expertos en la técnica.

5

EJEMPLO 2

Preparación de estructuras particuladas de péptido de antígeno

Las secuencias de péptidos se pueden preparar como antígenos para uso con la presente invención. En el presente ejemplo, el antígeno de péptido E7 de la proteína VPH se usó como un antígeno de ejemplo. Las secuencias de péptidos se pueden seleccionar por una hidrofiliidad adecuada y pueden modificarse uniendo una molécula hidrofóbica o secuencia a un residuo de aminoácido N-terminal. Por ejemplo, una cadena hidrofoba, tal como un resto de ácido palmítico, puede unirse covalentemente al residuo de aminoácido N-terminal de un péptido. Las estructuras particuladas de péptido de antígeno resultantes pueden ser, por ejemplo, micelas o bicapas.

15

En este ejemplo, se seleccionaron las secuencias de péptidos y se suspendieron en un disolvente adecuado a concentraciones que van de 20 a 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Pueden ser adecuadas otras concentraciones en base a las características deseadas de una vacuna específica.

20

En este ejemplo, se realizaron micelas o bicapas diluyendo la solución madre del péptido lipidado en un medio acuoso seleccionado. Estas diluciones contienen típicamente 0,5-2 mg/ml de un péptido determinado, pero pueden variar dependiendo de la cantidad de antígeno requerida para las características deseadas de una vacuna específica.

25

La estructura particulada de péptido puede entonces mezclarse 1: 1 (v/v) con una nanopartícula de liposoma vacío que comprende lípidos catiónicos.

EJEMPLO 3

30

Eficacia antitumoral de adyuvantes de lípido catiónico en comparación con adyuvantes tradicionales

La eficacia antitumoral de los lípidos catiónicos utilizados como adyuvantes puede compararse con adyuvantes tradicionales, conocidos que se sabe que inducen actividad CTL específica de antígeno. En este ejemplo, se formularon diversos adyuvantes lipídicos como liposomas con el antígeno de péptido E7 de proteína de VPH RAHYNIVTF (SEQ ID NO: 1) (también conocido como "E7"). Diversos lípidos catiónicos incluían DOTAP, DOTMA, y DOEPC. Un lípido aniónico incluía DOPG. También en este ejemplo, los adyuvantes conocidos tradicionales CpG y el adyuvante completo de Freund ("CFA") también se formularon con E7.

35

40

Para comparar la eficacia de las formulaciones de lípido catiónico/E7 con otros adyuvantes para inducir una respuesta inmunitaria a un tumor, se trataron de 6 a 12 ratones portadores de tumores por formulación seis días después de establecer tumores con liposomas formuladas con péptido E7. Las formulaciones de adyuvantes de lípidos catiónicos comprenden lípidos catiónicos (DOTAP, DOEPC y DOTMA) a una composición de lípido catiónico de una dosis de 100 nmoles. La formulación de adyuvante de lípido aniónico comprendía DOPG. Las formulaciones de adyuvantes tradicionales conocidos comprendían fuertes adyuvantes bien establecidos CFA o CpG ODN1826. Los grupos de control incluyeron sin tratamiento y antígeno e7 solo (es decir, sin adyuvante).

45

Se establecieron tumores subcutáneos de VPH positivo en ratones mediante la inyección de 10^5 células TC-1 en el flanco de cada ratón en el día 0. En el día 6, los ratones recibieron una única inyección subcutánea de las formulaciones en una inyección de 0,10 ml.

50

Tal como se muestra en la figura 1, los ratones que recibieron la formulación de CFA o CpG y las diversas formulaciones de lípidos catiónicos demostraron todos una inhibición efectiva del crecimiento del tumor en comparación con los grupos de control en el día 26. Los ratones que recibieron la formulación de lípido aniónico no mostraron regresión tumoral. Los ratones que recibieron las formulaciones a base lípidos catiónicos DOTAP/E7, DOTMA/E7 y DOEPC/E7 mostraron una mejor actividad anticáncer ($p < 0,01$) en comparación con los formulados con las formulaciones a base de adyuvantes establecidos CpG/E7 o CFA/E7.

55

EJEMPLO 4

60

Eficacia antitumoral de las formulaciones de vacuna que comprenden nanopartículas de lípido catiónico y ensamblajes de antígeno

La eficacia antitumoral de formulaciones de vacuna puede evaluarse mediante la evaluación de la regresión del tumor. En este ejemplo, la formulación de vacuna comprende nanopartículas de lípido catiónico y un ensamblaje de antígeno peptídico en una estructura tubular. Además, el lípido catiónico de ejemplo en el presente ejemplo es R-

65

DOTAP y el ensamblaje de antígeno de ejemplo es una micela de E7 de VPH-16.

En este ejemplo, el epítipo de CTL restringido a H-2D^b (aminoácido 49-57, RAHYNIVTF [SEQ. ID. NO. 1]) derivado de la proteína E7 de VPH 16 se extendió a los aminoácidos 43-57, GQAEPDRAHYNIVTF, [SEQ. ID. No. 2]. La SEQ. ID. No. 2 se extendió adicionalmente con los aminoácidos KSS, y se unió una cadena de palmitoilo hidrófobo al péptido alargado. Como resultado, se promovió de manera efectiva la formación de micelas o bicapas (es decir, palmitoil-KSSGQAEPDRAHYNIVTF [SEQ. ID. No. 3]). Se observó que la SEQ. ID. No. 2 era un antígeno débil cuando se formuló y evaluó, similar a la SEQ. ID. No. 1.

Se encapsularon aproximadamente 0,2-0,4 mg (0,1-0,2 mM) del antígeno peptídico en 2 mg/ml (2,9 mM) de las nanopartículas de liposomas que comprenden R-DOTAP, dando como resultado una débil respuesta inmunitaria y una falta de regresión del tumor eficaz (véase la Figura 2). Sin embargo, la formulación de la secuencia de antígeno peptídico en una estructura particulada comprendida solamente de la SEQ. ID. No. 3 permite que dosis más altas del antígeno se liberen en comparación con la administración a través de un sistema de liberación de adyuvante de lípido catiónico. Por lo tanto, se puede obtener un medio eficaz de superar la débil antigenicidad del péptido.

Para evaluar esta estrategia, se establecieron tumores VPH-positivos tal como se describe en el Ejemplo 3 anterior. En el día 6, los ratones (5 por grupo) recibieron una sola inyección subcutánea de diversas formulaciones de vacunas:

Formulación 1 (control negativo): nanopartículas de liposomas vacíos que comprenden R-DOTAP.

Formulación 2: una mezcla de 2,3 mg/ml de nanopartículas liposomales de R-DOTAP y 1,1 mg/ml del ensamblaje de antígeno peptídico de SEQ. ID. No. 3 como micelas (inyección de 0,10 ml).

Formulación 3: una mezcla de 2,3 mg/ml de nanopartículas liposomales de S-DOTAP y 1,1 mg/ml del ensamblaje de antígeno peptídico de SEQ. ID. No. 3 como micelas (inyección de 0,10 ml).

La Figura 3 muestra una regresión del tumor eficaz en ratones inyectados con la Formulación 2. La microscopía electrónica de barrido con imágenes en negativo muestra la presencia de una mezcla de un ensamblaje de antígeno en estructuras micelares tubulares y un adyuvante en nanopartículas esféricas de liposomas de R-DOTAP que coexisten en la mezcla de vacuna formulada (Figura 4). El presente ejemplo demuestra que una formulación de vacuna que comprende un adyuvante (por ejemplo, nanopartículas de liposomas de R-DOTAP) y un ensamblaje de antígeno (por ejemplo, antígeno de péptido E7 del VPH como partículas en micelas) puede promover eficazmente la regresión del tumor en un animal.

EJEMPLO 5

Respuesta inmunitaria en ratones transgénicos HLA-A2 humanizados utilizando formulaciones de vacuna que comprenden nanopartículas de lípido catiónico y ensamblajes de antígeno que contienen antígenos peptídicos individuales

Se sabe que la inducción de interferón- γ (IFN- γ) es el resultado de linfocitos T citotóxicos (células T CD8+) específicos de antígeno activados y es importante para el desarrollo de una respuesta inmunitaria terapéutica efectiva en un animal. Las respuestas inmunitarias en ratones transgénicos HLA-A2 humanizados usando formulaciones de vacuna que comprenden nanopartículas de lípido catiónico y ensamblajes de antígeno pueden ser evaluadas mediante la medición de la inducción de IFN- γ mediante un ensayo de puntos por inmunoadsorción unida a enzimas (ELISPOT). En este ejemplo, la formulación de vacuna comprende nanopartículas de lípido catiónico (por ejemplo, R-DOTAP) y un ensamblaje de antígeno peptídico de varias composiciones y estructuras.

Se evaluaron dos formulaciones de vacunas diferentes en el presente ejemplo. La formulación 1 comprendía las nanopartículas de adyuvante de lípido catiónico R-DOTAP y se utilizó el bien establecido antígeno peptídico humano antigénico de HLA-A2 E7 de VPH-16 YMLDLQPETT [SEQ. ID. No. 4]. SEQ. ID. No. 4 se modificó mediante la unión de 3 aminoácidos y ácido palmítico para obtener la secuencia palmitoil-KSSYMLDLQPETT [SEQ. ID. No. 5]. Se formaron espontáneamente estructuras peptídicas particuladas de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento. La formulación 1 contenía un adyuvante de aproximadamente 2,8 mg/ml de nanopartículas de adyuvante R-DOTAP y un ensamblaje de antígeno de aproximadamente 0,83 mg/ml del péptido de SEQ. ID. No. 5.

Los ratones fueron inyectados con 0,1 ml de la Formulación 1 en los días 0 y 7. Los ratones se sacrificaron y los esplenocitos se extrajeron de cada ratón para la evaluación en el día 14. Los esplenocitos se recogieron de los ratones inmunizados y se sembraron en pocillos de una placa de 96 pocillos (aproximadamente 250.000 esplenocitos por pocillo). Los pocillos individuales se expusieron a continuación al antígeno peptídico YMLDLQPETT [SEQ. ID. No. 4] y se analizó la respuesta inmunitaria. Cada punto que se reveló en el ensayo representa una sola célula de esplenocito reactiva y la lectura del análisis proporciona el número de puntos formados en la placa de 96 pocillos. Por lo tanto, el ensayo de ELISPOT proporcionó un ensayo cuantitativo para determinar eficazmente la respuesta inmunitaria resultante al antígeno YMLDLQPETT. Los resultados del ensayo de ELISPOT, que demuestran una alta eficacia de la Formulación 1, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Respuesta inmunitaria medida mediante ELISPOT

Número de formulación	Secuencia/composición de antígeno peptídico	Estructura de la partícula de antígeno resultante	Promedio # de puntos de IFN-γ por cada 250.000 esplenocitos
#1	-palmitoil- KSSYMLDLQPETT	Esférica	262,2
#2	-palmitoil- KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT	Tubular	122,4

5 La formulación 2 comprendía las nanopartículas de adyuvante de lípido catiónico R-DOTAP y utilizó un péptido que se seleccionó de los primeros 20 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína E7 de VPH-16. Este péptido se modificó a palmitoil-KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT [SEQ. ID. No. 6]. Se formaron espontáneamente estructuras peptídicas particuladas de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento. La formulación 2 contenía un adyuvante de aproximadamente 2,8 mg/ml de nanopartículas de adyuvante R-DOTAP y un ensamblaje de antígeno de aproximadamente 0,95 mg/ml del péptido de SEQ. ID. No. 6.

10 Los ratones fueron inyectados con 0,1 ml de la Formulación 2 en los días 0 y 7. Los ratones se sacrificaron y los esplenocitos se extrajeron de cada ratón para la evaluación en el día 14. De nuevo, tal como se muestra en la Tabla 1, se demostró una fuerte respuesta inmunitaria en respuesta a la inmunización con Formulación 2.

15 La microscopía electrónica de barrido de imágenes negativas mostró la presencia de una mezcla de un ensamblaje de antígeno en estructuras de micelas esféricas que comprenden palmitoil-KSSYMLDLQPETT y un adyuvante que comprende nanopartículas esféricas de liposomas R-DOTAP (es decir, Formulación 1), coexistentes en la mezcla formulada (véase la Figura 5).

20 La Figura 6 muestra un ensamblaje de antígeno en estructuras micelares tubulares que comprenden palmitoil-KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT y un adyuvante que comprende nanopartículas esféricas de liposomas DOTAP-R (es decir, la formulación 2), coexistentes en la mezcla formulada.

25 EJEMPLO 6

Respuesta inmunitaria en ratones transgénicos HLA-A2 humanizados utilizando formulaciones de vacuna que comprenden nanopartículas de lípido catiónico y ensamblajes de antígeno que contienen múltiples antígenos peptídicos

30 De forma similar a la del Ejemplo 5, se puede utilizar ELISPOT para evaluar la eficacia de una formulación de vacuna que comprende nanopartículas de lípido catiónico y ensamblajes de antígeno. En este ejemplo, la formulación de vacuna comprende nanopartículas de lípido catiónico (por ejemplo, R-DOTAP) y un ensamblaje de antígeno peptídico que comprende tres antígenos peptídicos.

35 La formulación en el presente ejemplo comprendía las nanopartículas de adyuvante de lípido catiónico R-DOTAP y un ensamblaje de antígeno de una estructura micelar mixta que comprende tres antígenos peptídicos. Se evaluó una respuesta inmunitaria a la secuencia del péptido YMLDLQPETT. Se compusieron partículas de péptidos mixtas de SEQ. ID. No. 5, SEQ. ID. No. 6, y palmitoil-KSSLLMGTLGIVCPICSQKP [SEQ. ID. No. 7]. Esta formulación contenía un adyuvante de aproximadamente 2,8 mg/ml de nanopartículas de adyuvante R-DOTAP y un ensamblaje de antígeno de aproximadamente 1 mg/ml de cada péptido.

40 Los ratones fueron inyectados con 0,1 ml de la formulación en los días 0 y 7. Los ratones se sacrificaron y los esplenocitos se extrajeron de cada ratón para la evaluación en el día 14. Tal como se muestra en la Tabla 2, se demostró una respuesta inmunitaria fuerte en respuesta a la inmunización con esta formulación.

45 Tabla 2: Respuesta inmunitaria medida mediante ELISPOT

Secuencia/composición de antígeno peptídico	Estructura de la partícula de antígeno resultante	Promedio # de puntos de IFN-γ por cada 250.000 esplenocitos
palmitoil-KSSGQAEPDRAHYNIVTF, - palmitoil- KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT, y - palmitoil- KSSLLMGTLGIVCPICSQKP	Tubular	447,1

50 EJEMPLO 7

Respuesta inmunitaria en la utilización de formulaciones de vacunas que comprenden nanopartículas de lípido catiónico y ensamblajes de antígeno que contienen antígenos de melanoma micelares

Las respuestas inmunitarias en ratones C57/BL6 usando formulaciones de vacuna que comprenden nanopartículas de lípido catiónico y ensamblajes de antígeno pueden evaluarse mediante ELISPOT. En este ejemplo, la formulación de vacuna comprende nanopartículas de lípido catiónico (por ejemplo, R-DOTAP) y un ensamblaje de antígeno peptídico de antígenos de melanoma en una estructura micelar.

En este ejemplo, la Formulación A comprendía las nanopartículas de adyuvante de lípido catiónico R-DOTAP y un ensamblaje de antígeno que encapsula tres antígenos de melanoma: gp100 (KVPRNQDWL [SEQ ID No. 8]), TRP2 (SYVDFVWL [SEQ ID No. 9]), y p53 (KYICNSSCM [SEQ. ID. No. 10]). Formulación A contenía un adyuvante de aproximadamente 4,3 mM de nanopartículas de adyuvante R-DOTAP y aproximadamente 0,25 mM de péptido gp100.

Con el fin de suministrar mayores cantidades de antígeno gp100, se desarrolló una formulación micelar. El antígeno modificado palmitoil-KSSKVPRNQDWL [SEQ. ID. No. 11] fue utilizado para desarrollar una formulación micelar. La formulación B comprendía aproximadamente 4,4 mM de TRP2 encapsulado en R-DOTAP liposomal y una formulación micelar de aproximadamente 0,46 mM de gp100. Las micelas realizadas a partir del antígeno modificado se prepararon tal como se describe en el Ejemplo 2. La eficacia de las vacunas se evaluaron en ratones C57/BL6 mediante ELISPOT tal como se describe en el Ejemplo 5.

La Figura 7 muestra un aumento mayor de 20 veces en la respuesta inmunitaria a la formulación que comprende el antígeno gp100 en una formulación micelar en comparación con antígeno gp100 que se encapsuló en liposomas. Se cree que la respuesta inmunitaria a mejorar debido a la duplicación aproximada de la cantidad de antígeno gp100 suministrado a través de la formulación micelar.

EJEMPLO 8

Comparación de la respuesta inmunitaria en formulaciones de vacuna que utilizan ensamblajes de antígeno micelar y ensamblajes de antígeno encapsulados liposomalmente

La respuesta inmunitaria usando formulaciones de vacuna que comprenden diferentes nanopartículas de lípidos catiónicos y diferentes ensamblajes de antígeno puede evaluarse mediante ELISPOT. En este ejemplo, las formulaciones de vacuna se pueden formular usando diversas nanopartículas de lípido catiónico (por ejemplo, DOEPC o DOTMA) o el adyuvante de emulsión Montanide. Además, las formulaciones de vacuna se pueden formular usando un ensamblaje de antígeno, ya sea en una estructura micelar o una estructura encapsulada liposomalmente.

Se evaluaron varias formulaciones de vacunas diferentes en el presente ejemplo. En una formulación, el ensamblaje de antígeno comprendía el antígeno peptídico [SEQ. ID. No. 2] (0,11 mM) y el adyuvante de lípido catiónico DOEPC (1 mM). En una segunda formulación, el ensamblaje de antígeno comprendía el antígeno peptídico modificado [SEQ. ID. No. 3] (0,11 mM) para permitir la formación de micelas y el adyuvante de lípido catiónico DOEPC (1 mM). En una tercera formulación, el ensamblaje de antígeno comprendía el antígeno peptídico [SEQ. ID. No. 2] (0,11 mM) y el adyuvante de lípido catiónico DOTMA (1 mM). En una cuarta formulación, el ensamblaje de antígeno comprendía el antígeno peptídico modificado [SEQ. ID. No. 3] (0,11 mM) y el adyuvante de lípido catiónico DOTMA (1 mM). En una quinta formulación, el ensamblaje de antígeno comprendía el antígeno peptídico [SEQ. ID. No. 2] (0,11 mM) y el adyuvante de emulsión Montanide. En una sexta formulación, el ensamblaje de antígeno comprendía el antígeno peptídico modificado [SEQ. ID. No. 3] (0,11 mM) y el adyuvante de emulsión Montanide.

En formulaciones en las que el ensamblaje de antígeno comprendía el antígeno peptídico no modificado [SEQ. ID. No. 2], el ensamblaje de antígeno se formuló como encapsulado liposomalmente. En comparación, en formulaciones en las que el ensamblaje de antígeno comprendía el antígeno peptídico modificado [SEQ. ID. No. 3], el ensamblaje de antígeno se formuló como micela y se mezcló con el adyuvante en una proporción 1:1 con el fin de mantener el contenido de antígeno y adyuvante idéntico en comparación con las formulaciones liposomales correspondientes. Los ensamblajes de antígeno encapsulados en liposomas y los ensamblajes de antígeno micelares se realizaron de acuerdo con los protocolos del Ejemplo 1 y el Ejemplo 2, respectivamente. La potencia de las diversas formulaciones de vacuna se evaluó mediante la determinación de la respuesta inmunitaria específica de antígeno a través de ELISPOT.

La Figura 8 muestra los resultados del presente ejemplo. Las dosis idénticas de antígeno y adyuvante condujeron a respuestas inmunitarias específicas de antígeno muy superiores cuando el ensamblaje de antígeno se suministró en forma micelar con un adyuvante específico. Es importante destacar que la respuesta inmunitaria observada es muy débil cuando se utiliza un ensamblaje de antígeno suministrado en forma liposomalmente encapsulado.

La respuesta inmunitaria observada también depende del adyuvante específico administrado con el antígeno micelar, tal como se observa con DOTMA, DOEPC y Montanide. Las formulaciones de DOTMA mostraron una respuesta inmunitaria superior a las formulaciones con DOEPC, y ambas formulaciones con lípidos catiónicos fueron superiores al adyuvante de emulsión Montanide.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> PDS BIOTECHNOLOGY CORPORATION BEDU-ADDO, Frank CONN, Gregory
 JACOBSON, Eric MERCER, Carol JOHNSON, Kenya

<120> FORMULACIONES DE VACUNAS PARTICULADAS

10 <130> 50165-222751

<150> 61/533,512
 <151> 2011-09-12

15 <160> 11

<170> PatentIn version 3.5

20 <210> 1
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

25 Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
 1 5

30 <210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 2

Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
 1 5 10 15

40 <210> 3
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido alargado

<400> 3

50 Lys Ser Ser Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val
 1 5 10 15

55 Thr Phe

60 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

65 Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr
 1 5 10

ES 2 689 799 T3

5 <210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido alargado
 10 <400> 5
 Lys Ser Ser Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr
 1 5 10
 15 <210> 6
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Péptido alargado
 <400> 6
 25 Lys Ser Ser Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu
 1 5 10 15
 30 Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr
 20
 35 <210> 7
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Péptido alargado
 <400> 7
 45 Lys Ser Ser Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys
 1 5 10 15
 Ser Gln Lys Pro
 20
 50 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido alargado
 60 <400> 8
 Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu
 1 5
 65 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT

ES 2 689 799 T3

<213> Homo sapiens

<400> 9

5 Ser Tyr Val Asp Phe Phe Val Trp Leu
1 5

10 <210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Péptido alargado
<400> 10

20 Lys Tyr Ile Cys Asn Ser Ser Cys Met
1 5

25 <210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Péptido alargado
<400> 11

35 Lys Ser Ser Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Formulación de vacuna que comprende una partícula de adyuvante de lípido catiónico y un ensamblaje de antígeno de proteína o péptido particulado de autoformación, en la que el ensamblaje de antígeno comprende una estructura micelar y en la que la estructura micelar se forma uniendo una molécula hidrófoba o secuencia a un residuo de aminoácido N-terminal de un antígeno de proteína o péptido a través de un enlazador.
2. Formulación de vacuna, según la reivindicación 1, en la que el lípido catiónico es un inmunomodulador.
- 10 3. Formulación de vacuna, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste en DOTAP, DOTMA, DOEPC, y combinaciones de los mismos.
4. Formulación de vacuna, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el lípido catiónico es DOTAP.
- 15 5. Formulación de vacuna, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el lípido catiónico es un enantiómero del lípido catiónico.
6. Formulación de vacuna, según la reivindicación 5, en la que el enantiómero es R-DOTAP.
- 20 7. Formulación de vacuna, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el ensamblaje de antígeno de autoformación comprende uno o más antígenos de proteína o péptido seleccionados del grupo que consiste en un antígeno de cáncer, un antígeno viral, un antígeno bacteriano y un antígeno patogénico.
- 25 8. Formulación de vacuna, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que al menos un antígeno es una proteína o péptido de VPH.
9. Formulación de vacuna, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que al menos un antígeno es un antígeno de melanoma.
- 30 10. Formulación de vacuna, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que uno o más antígenos es un antígeno modificado para aumentar o disminuir la hidrofobicidad del antígeno para provocar la formación de micelas.
- 35 11. Formulación de vacuna, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para usar en la inducción de una respuesta inmunitaria en un mamífero.

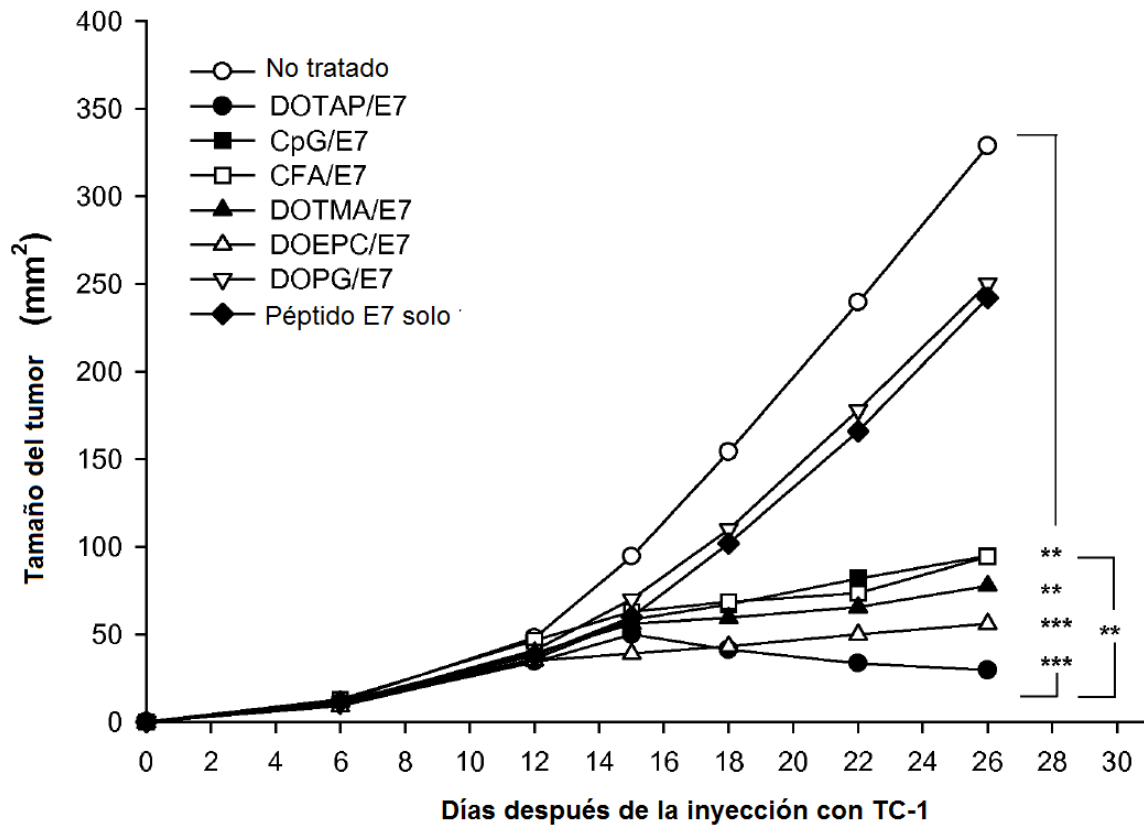


Figura 1

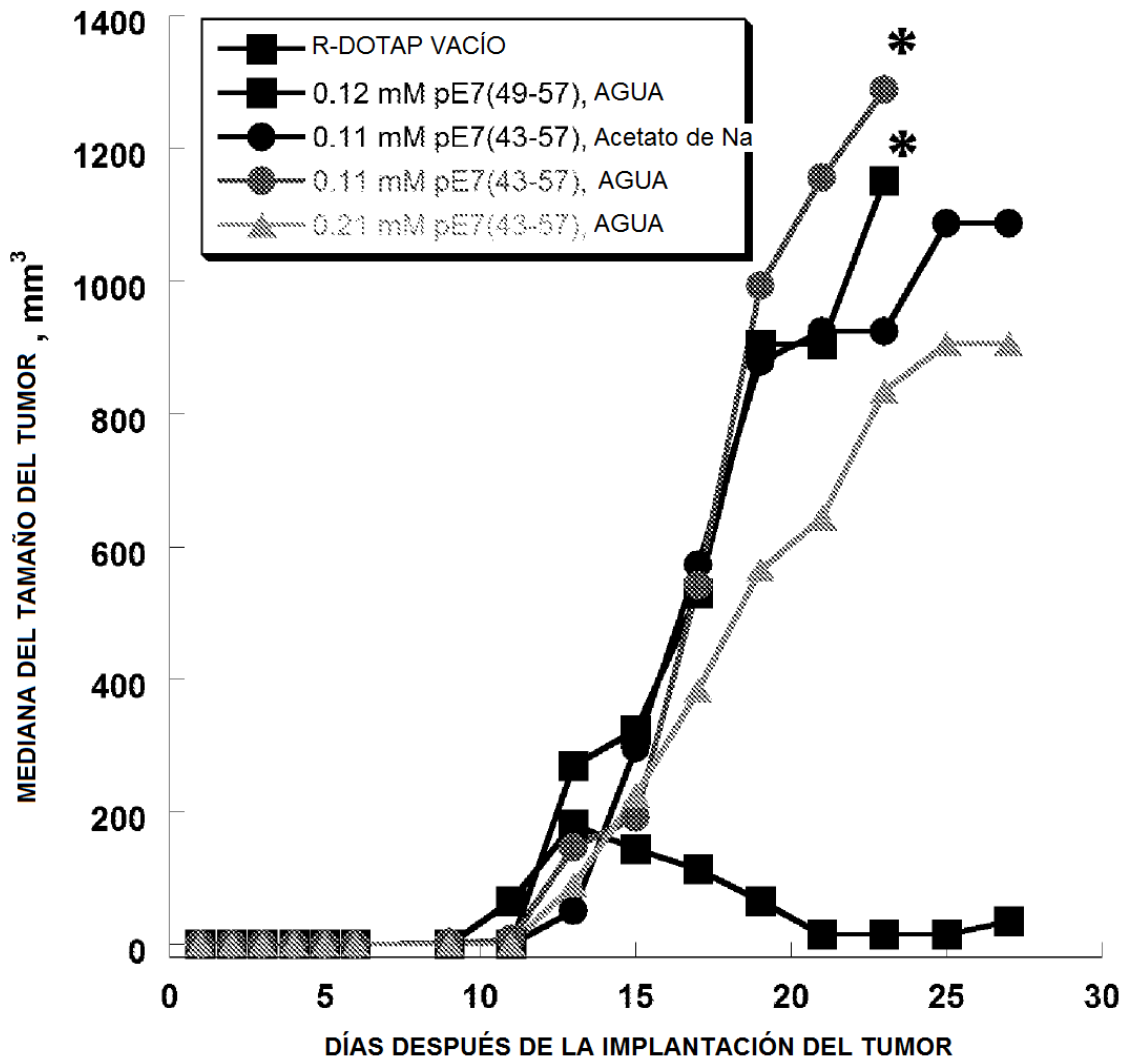


Figura 2

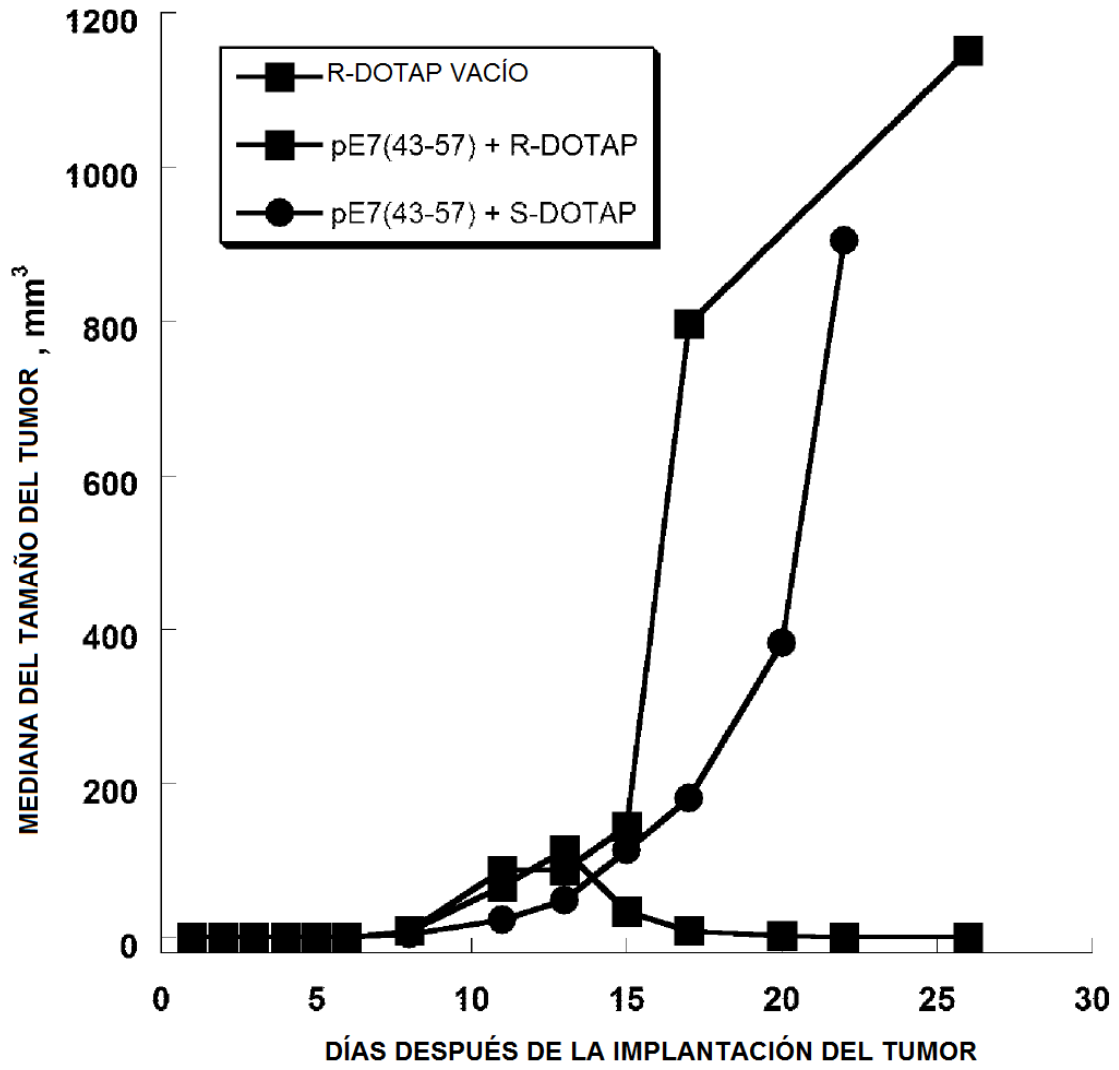
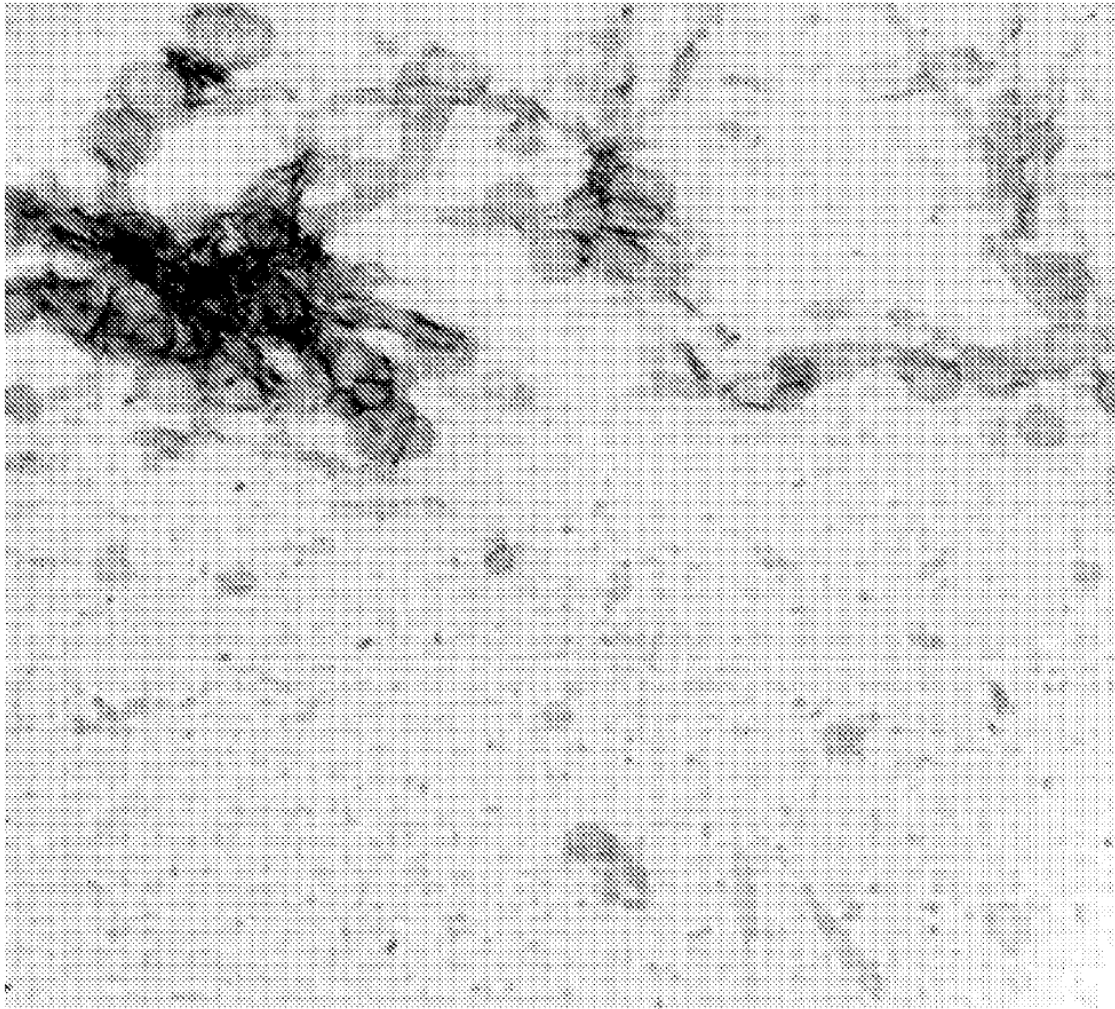


Figura 3



Eric Jacobson 060211.014

Carol's

Aumento de impresión: 48000x @ 7.0 pulgadas

1:19:43 p 06/03/11

Modo TEM: Imagen

500 nm

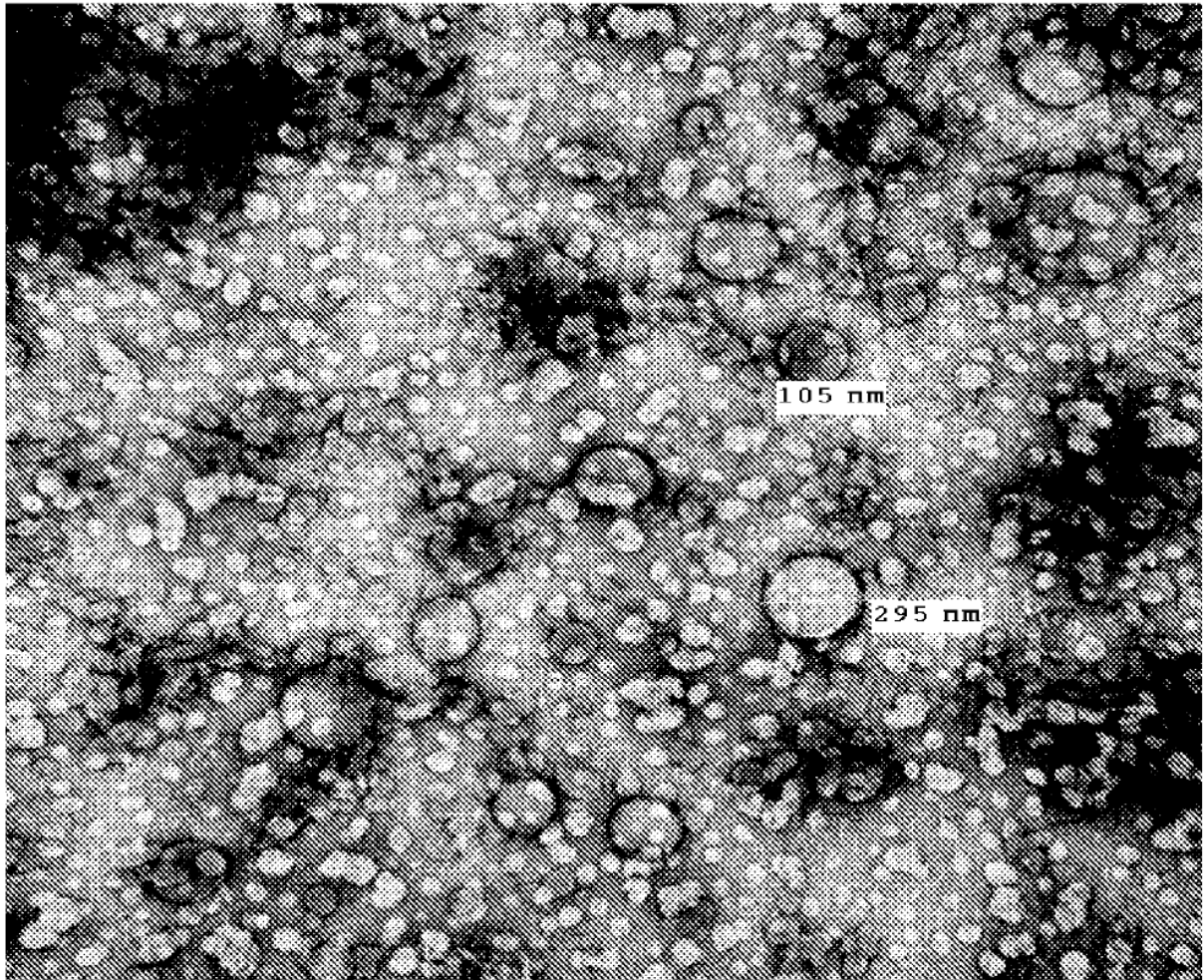
HV=80.0kV

Aumento directo: 40000x

X:-240.3 Y: 789.6 T:0

Sistema de cámara AMT

Figura 4



8.15.11.053

pE7:11-20. micelas.DOTAP
diluido 1:2 con DOTAP

Aumento de impresión: 48000x @ 7.0 pulgadas

11:24:27 a 08/15/11

Modo TEM: Imagen

rejilla de bajo aumento 3

500 nm

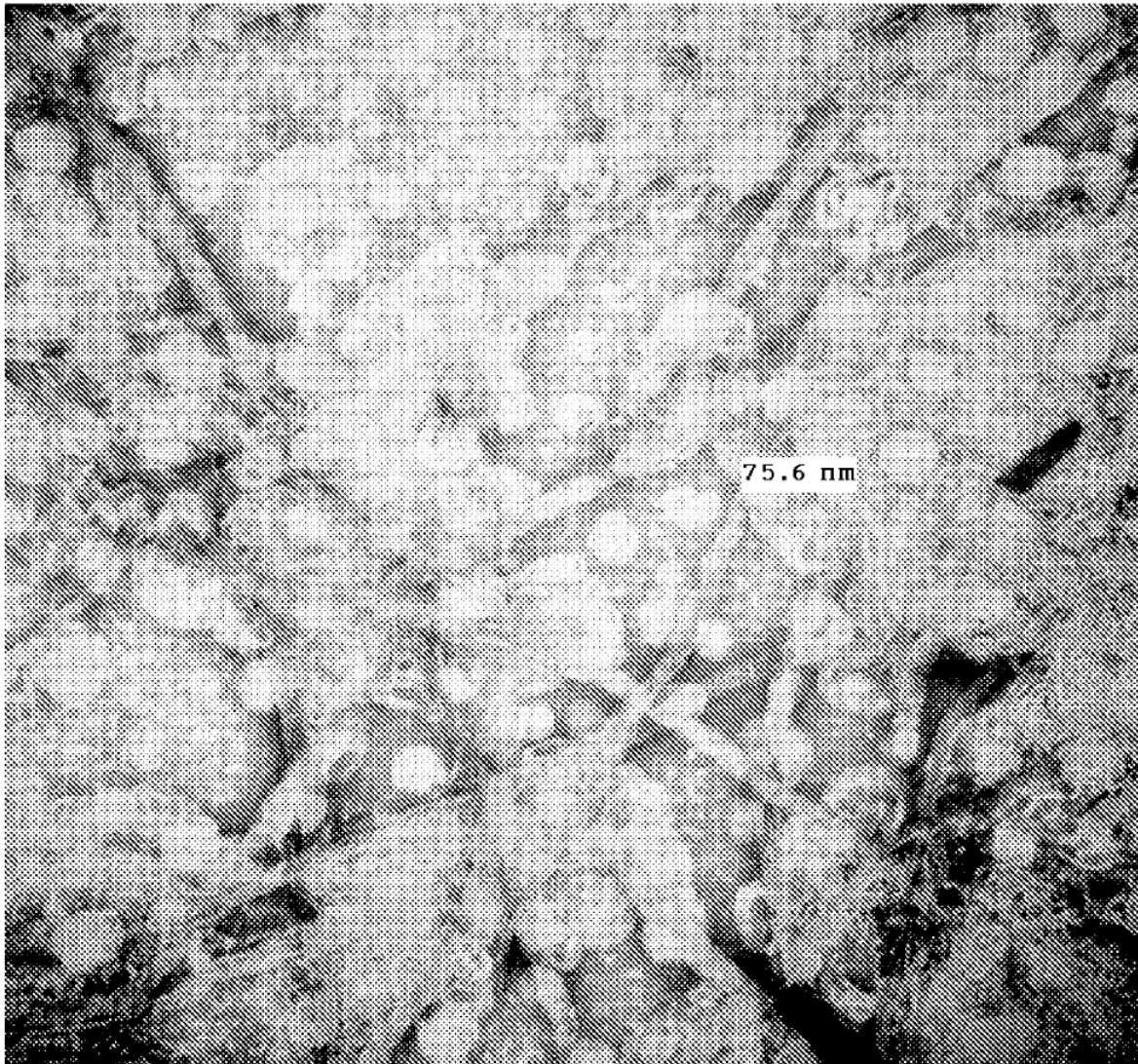
HV=80.0kV

Aumento directo: 40000x

X:-509.6 Y:-148.7 T:0

Sistema de cámara AMT

Figura 5



8.16.11.008

pE7:11-20 micelas 1:2 con H2O

Aumento de impresión: 144000x @ 7.0 pulgadas

10:06:20 a 08/16/11

Modo TEM: Imagen

100 nm

HV=80.0kV

Aumento directo: 120000x

X:-136.1 Y:-157 T:0

Sistema de cámara AMT

Figura 6

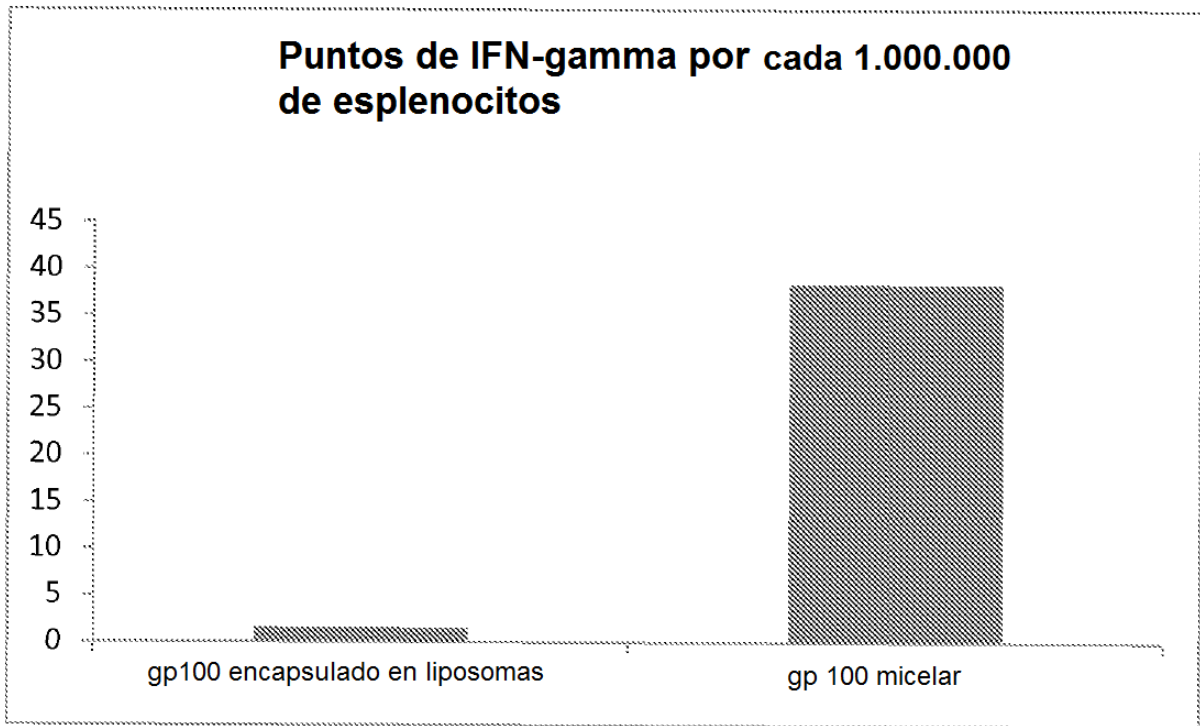


Figura 7

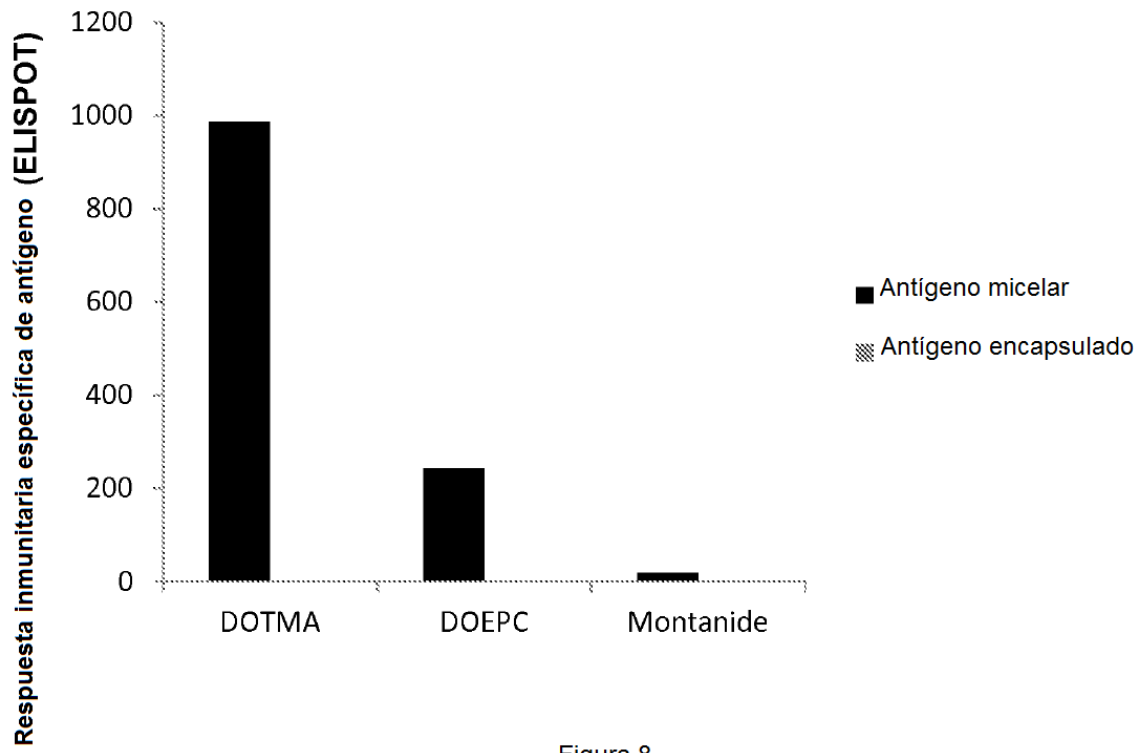


Figura 8