



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 285**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/39** (2006.01)  
**A61K 39/21** (2006.01)  
**A61P 31/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99969285 .8**  
86 Fecha de presentación : **17.12.1999**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1140166**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2001**

54 Título: **Ayudante que contiene péptidos N-formilmetionílicos para vacunas.**

30 Prioridad: **18.12.1998 US 216702**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.11.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.11.2007**

73 Titular/es: **Connaught Technology Corporation**  
**3711 Kennett Pike, Suite 200**  
**Greenville, Delaware 19807, US**

72 Inventor/es: **Alexander, Jeannine y**  
**Cox, William, I.**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

**ES 2 284 285 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**

Adyuvante que contiene péptidos N-formilmetionílicos para vacunas.

**5 Antecedentes de la invención**

Un adyuvante es una sustancia que potencia la inmunogenicidad de un antígeno. Los adyuvantes pueden actuar reteniendo el antígeno localmente cerca del sitio de administración para producir un efecto de depósito, facilitando una liberación lenta, sostenida, del antígeno a las células del sistema inmunitario. Los adyuvantes también pueden atraer células del sistema inmunitario, y pueden atraer células inmunitarias hacia un depósito de antígeno y estimular tales células para provocar una respuesta inmunitaria.

Las proteínas recombinantes son candidatos prometedores de vacunas o de composiciones inmunógenas debido a que se pueden producir con gran rendimiento y pureza, y se pueden manipular para maximizar las actividades deseables y minimizar las indeseables. Sin embargo, debido a que son muy poco inmunógenas, los métodos para potenciar la respuesta inmunitaria frente a proteínas recombinantes son importantes en el desarrollo de vacunas o de composiciones inmunógenas. Tales antígenos, especialmente cuando se producen de forma recombinante, pueden provocar una respuesta más fuerte cuando se administran conjuntamente con un adyuvante.

Los adyuvantes se han usado durante muchos años para mejorar la respuesta inmunitaria del huésped frente a antígenos de interés en vacunas, especialmente vacunas subunitarias o de componentes formadas por proteínas recombinantes. Los adyuvantes intrínsecos, tales como lipopolisacáridos, normalmente son componentes de las bacterias inactivadas o atenuadas usados como vacunas. Los adyuvantes extrínsecos son inmunomoduladores que típicamente no están enlazados covalentemente a antígenos, y se formulan para potenciar la respuesta inmunitaria del huésped. Normalmente se usan como adyuvantes hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio (colectivamente denominados de forma habitual como alumbre) en vacunas humanas y veterinarias. Actualmente, el alumbre es el único adyuvante autorizado para uso humano, aunque se están ensayando cientos de adyuvantes experimentales tales como la toxina B del cólera. Sin embargo, los adyuvantes tales como la toxina B del cólera tienen deficiencias. Por ejemplo, mientras que la toxina B del cólera no es tóxica en el sentido de provocar cólera, incluso la más remota oportunidad de una pequeña impureza hace que tales adyuvantes tengan una aplicabilidad limitada.

Los formilmetionil-péptidos son ligandos biológicamente activos, de origen natural, de bajo peso molecular, producidos mediante bacterias entéricas oportunistas. El tipo más habitual de formilmetionil-péptido es formil-metionil-leucilfenilalanina (fMLP). El fMLP es un péptido proinflamatorio que es capaz de estimular muchas funciones leucocitarias. Estimula la quimiotaxia de neutrófilos, la liberación de enzima lisosómica, la producción de radicales de oxígeno libre, el flujo de Ca<sup>++</sup>, la liberación de leucotrienos por los neutrófilos, y la contracción del músculo liso. La estimulación de neutrófilos mediante fMLP induce alteraciones rápidas en su expresión de los receptores de adhesión. Además, se ha demostrado que fMLP induce la producción de superóxido y un incremento en los niveles de Ca<sup>++</sup> intracelular.

Se ha demostrado que fMLP induce quimiotaxia en un número de células, incluyendo macrófagos alveolares pulmonares, neutrófilos, células dendríticas (DC) y monocitos. De hecho, la actividad quimiotáctica o quimioatrayente de fMLP está tan suficientemente probada que a menudo se usa fMLP como un control positivo en ensayos quimiotácticos.

Hace una década, Kashkin *et al.* (Immunologiya 6:37-40 (1987)) dieron a conocer la actividad inmunomoduladora de fMLP cuando se inmoviliza con un antígeno dentro de un liposoma. En efecto, Kashkin demostró que cuando se coinmovilizó fMLP con seroalbúmina bovina (BSA) sobre la superficie de liposomas, y se administró a ratones subcutáneamente, esta combinación podía generar una respuesta inmunitaria humoral comparable a la obtenida mediante inmunización con BSA más el adyuvante completo de Freund. Sin embargo, este estudio señaló que fMLP y el antígeno se deben de coinmovilizar sobre la superficie de liposomas a fin de que se manifieste una actividad inmunostimuladora o adyuvante. De forma significativa, Kashkin *et al.* dieron a conocer que la administración de fMLP no tuvo ningún efecto inmunomodulador excepto si se formulaba junto con el antígeno sobre liposomas. El fMLP no tuvo ningún efecto cuando se añadió a suspensiones de liposomas cargados con antígeno antes de la inyección. El requisito de que el adyuvante y el antígeno se deben de formular juntos sobre la superficie de un liposoma hace este enfoque complicado y de aplicabilidad limitada.

Sería deseable potenciar la inmunogenicidad de antígenos mediante métodos distintos del uso de un adyuvante convencional, especialmente en preparaciones monovalentes; y, en preparaciones polivalentes, tener la capacidad de utilizar tal medio para la inmunogenicidad potenciada con un adyuvante, para obtener una respuesta inmunológica aún mayor. Existe la necesidad de adyuvantes seguros y eficaces que puedan potenciar la acción de vacunas, especialmente vacunas de componentes que comprenden proteínas recombinantes, y que sean fáciles de preparar y de usar.

**Objetivos y resumen de la invención**

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar composiciones de adyuvante que comprenden N-formilmetionil-péptidos tales como fMLP. Un objetivo adicional consiste en proporcionar métodos para mejorar una respuesta inmunitaria de un animal huésped o paciente contra un antígeno o antígenos de interés presente en una

composición inmunológica o en una vacuna, en los que la mejora reside en la coadministración de N-formilmetionil-péptido junto con el antígeno o antígenos de interés según se define en la reivindicación 1. Asimismo, la presente invención comprende formulaciones de antígeno junto con N-formilmetionil-péptido en una variedad de vehículos de administración. Se comprende además la manipulación mediante ingeniería genética molecular para la expresión procarionota de nuevos antígenos proteínicos en los que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica tales antígenos se ha alterado para que codifique antígenos proteicos que contengan los restos de formil-metionil-péptido inmunoes-timulantes.

### Descripción detallada

Se ha encontrado sorprendentemente en la actualidad que los péptidos N-formilmetionílicos, tales como fMLP, pueden servir como potentes adyuvantes cuando se administran con un antígeno o antígenos de interés en disolución; no hay necesidad de inmovilizar el N-formilmetionil-péptido junto con el antígeno dentro de la bicapa lipídica de liposomas. Este hallazgo tiene implicaciones de largo alcance. Obviando la necesidad de formulaciones liposómicas, la presente invención proporciona composiciones inmunológicas o vacunas más convenientes, fáciles de formular. La actividad inmunomoduladora del N-formilmetionil-péptido se puede alterar convenientemente en las administraciones subsiguientes, por ejemplo, se puede mezclar la misma preparación antigénica con niveles variables de N-formil-metionil-péptido para optimizar la respuesta inmunitaria deseada. Finalmente, el N-formilmetionil-péptido se puede manipular fácilmente mediante ingeniería en el antígeno de interés a nivel molecular. Esto permitirá la expresión, en un huésped procarionota, del antígeno recombinante de interés junto con el adyuvante N-formilmetionil-peptídico de la presente invención.

Los péptidos quimiotácticos N-formilmetionílicos reaccionan a un receptor específico sobre la membrana plas-mática. La interacción del péptido con el receptor estimula la quimiotaxia, la liberación de enzima lisosómica en neutrófilos, la formación de superóxido, y cambios en  $CA^{++}$  intracelular. Cualquier péptido capaz de unirse al re-ceptor quimiotáctico, y de accionarlo, proporcionará la característica adyuvante de la presente invención. Los N-formiltripéptidos son más eficaces que los dipéptidos. En una forma de realización preferida, se usa N-formilmetionil-leucilfenilalanina (fMLP).

El N-formilmetionil-péptido se puede introducir a nivel molecular en los antígenos recombinantes de interés, de tal manera que los antígenos expresados se diseñan para que contengan el N-formilmetionil-péptido cuando se expre-san en un huésped procarionota. También puede ser posible formular restos de metionil-péptido manipulados mediante ingeniería en antígenos recombinantes y expresados en huéspedes eucariotas, por ejemplo por medios enzimáticos. En cualquier caso, puede ser deseable suplementar tales antígenos N-formilmetionilados recombinantes con un N-formilmetionil-péptido adicional en composiciones inmunológicas.

La presente invención proporciona una composición inmunógena, inmunológica o de vacuna, que contiene el adyu-vante de N-formil-metionil-péptido, un antígeno o antígenos de interés, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable según la reivindicación 1. Una composición inmunológica que contiene el adyuvante de N-formilmetionil-péptido y un antígeno o antígenos de interés provoca una respuesta inmunológica al antígeno o antígenos de interés - local o sistémica. La respuesta puede ser, aunque no es necesario, protectora. Una composición inmunogénica que contiene el adyuvante de N-formilmetionil-péptido y el antígeno o antígenos de interés provoca igualmente una res-puesta inmunológica local o sistémica al antígeno o antígenos de interés, la cual puede ser, aunque no es necesario, protectora. Una composición de vacuna provoca una respuesta protectora local o sistémica. En consecuencia, las ex-presiones “composición inmunológica” y “composición inmunógena” incluyen una “composición de vacuna” (puesto que las dos primeras expresiones pueden ser composiciones protectoras).

Por lo tanto, la invención también proporciona un uso de la composición para inducir una respuesta inmunológica en un mamífero huésped, que comprende administrar al huésped una composición inmunógena, inmunológica o de vacuna que comprende el adyuvante de N-formilmetionil-péptido junto con el antígeno o antígenos de interés, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La determinación de la cantidad de antígeno y de adyuvante N-formilmetionil-peptídico en las composiciones de la invención, y la preparación de esas composiciones, se puede hacer según técnicas estándares bien conocidas por los expertos en materia farmacéutica o veterinaria. En particular, la cantidad de antígeno y de adyuvante en las com-posiciones de la invención, y las dosis administradas, se determinan mediante técnicas conocidas por los expertos en materia médica o veterinaria, teniendo en cuenta factores tales como el antígeno particular, el adyuvante (si está presente), la edad, el sexo, el peso, la especie y condición del animal o paciente particular, y la vía de administra-ción. De este modo, el experto en la materia puede determinar fácilmente la cantidad de antígeno y de adyuvante N-formilmetionil-peptídico en las composiciones, y que se van a administrar.

Preferentemente, el adyuvante N-formilmetionil-peptídico se debe de usar en la presente composición como una disolución de 2,5 a 250 pg en disolución salina tamponada con fosfato, y el antígeno está presente en una cantidad del orden de microgramos a miligramos, tal como aproximadamente de 0,0001 hasta aproximadamente 5% en peso, prefe-rentemente aproximadamente 0,0001 hasta aproximadamente 1% en peso, más preferentemente de aproximadamente 0,0001 hasta aproximadamente 0,05% en peso (véanse, por ejemplo, los Ejemplos a continuación o en solicitudes citadas en la presente memoria).

## ES 2 284 285 T3

Típicamente, sin embargo, el antígeno está presente en una cantidad del orden de microgramos a miligramos, o de aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 20% en peso, preferentemente aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 10% en peso, y más preferentemente de aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 5% en peso.

El adyuvante se puede usar con cualquier antígeno de interés para preparar una composición inmunológica o vacuna. Los antígenos de interés se pueden preparar a partir de bacterias, virus, parásitos, levaduras u hongos, o pueden ser componentes de células benignas o malignas de seres humanos o animales. Tales antígenos se pueden purificar, o pueden estar presentes en vacunas de células divididas o de células enteras. Tales antígenos se pueden preparar sintéticamente, semisintéticamente o mediante métodos recombinantes.

Son particularmente interesantes las vacunas subunitarias que comprenden componentes antigénicos aislados de agentes patógenos o de células cancerosas, ya que la respuesta inmunitaria frente a tales componentes antigénicos está típicamente potenciada por el uso de un adyuvante. Tales componentes antigénicos se pueden purificar a partir de agentes intactos, o se pueden preparar mediante métodos recombinantes.

Por supuesto, para cualquier composición a administrar a un animal o a un ser humano, incluyendo sus componentes, y para cualquier método particular de administración, se prefiere determinar para los mismos: la toxicidad, tal como mediante la determinación de la dosis letal (LD) y LD<sub>50</sub> en un modelo de animal adecuado, por ejemplo un roedor tal como un ratón; y la dosis de la composición o composiciones, la concentración de los componentes en la misma, y el tiempo de administración de la composición o composiciones, que provocan una respuesta inmunológica adecuada, tal como mediante titulaciones de los sueros y su análisis en busca de anticuerpos o antígenos, por ejemplo mediante análisis de ELISA y/o RFFIT. Tales determinaciones no requieren experimentación excesiva desde el conocimiento del experto en la materia, de esta descripción y de los documentos citados aquí. Y el tiempo para las administraciones secuenciales se puede averiguar sin experimentación excesiva.

Las composiciones de la presente invención pueden contener opcionalmente una o más sales de aluminio farmacéuticamente aceptables, tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o sulfato de aluminio, a un peso a volumen entre aproximadamente 0,1 y 2,0%, preferentemente entre aproximadamente 0,3% y aproximadamente 0,7%, más preferentemente aproximadamente 0,5%.

Los ejemplos de composiciones de la invención incluyen preparaciones líquidas para la administración a través de los orificios, por ejemplo oral, nasal, anal, vaginal, peroral, intragástrica, mucosal (por ejemplo, perlingual, alveolar, gingival, olfativa o de la mucosa respiratoria), etc., tales como suspensiones, jarabes o elixires; y preparaciones para la administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (por ejemplo, la administración inyectable), tales como suspensiones o emulsiones estériles. Tales composiciones pueden estar en mezcla con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado, tal como agua estéril, disolución salina fisiológica, glucosa o similar. Las composiciones también se pueden liofilizar. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, aditivos gelificantes o que potencian la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes, y similares, dependiendo de la vía de administración y de la preparación deseada. Para preparar las preparaciones adecuadas, sin experimentación excesiva, se pueden consultar textos estándares tales como "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17ª edición, 1985.

Las composiciones de la invención se proporcionan convenientemente como preparaciones líquidas, por ejemplo, disoluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones o composiciones viscosas, que se pueden tamponar hasta un pH seleccionado. Si se prefiere la absorción a través del tubo digestivo, las composiciones de la invención pueden estar en forma "sólida" de pastillas, comprimidos, cápsulas, comprimidos oblongos y similares, incluyendo preparaciones "sólidas" que se liberan a lo largo del tiempo, o que tienen un relleno líquido, por ejemplo un líquido cubierto de gelatina, con lo que la gelatina se disuelve en el estómago para el suministro al intestino. Si se desea la administración nasal o respiratoria (mucosal), las composiciones pueden estar en una forma y se pueden dispensar mediante un dispensador de tipo pulverizador por presión manual, un dispensador de tipo bomba o un dispensador de tipo aerosol. Los aerosoles habitualmente están a presión por medio de un hidrocarburo. Los dispensadores de tipo bomba dispensan preferentemente una dosis medida, o una dosis que tiene un tamaño particular de partículas.

Las composiciones de la invención pueden contener sabores y/o colores farmacéuticamente aceptables para hacerlas más atractivas, especialmente si se administran oralmente. Las composiciones viscosas pueden estar en forma de geles, lociones, ungüentos, cremas y similares, y contendrán típicamente una cantidad suficiente de un agente espesante de forma que la viscosidad esté entre aproximadamente 2.500 y 6.500 cps, aunque se pueden utilizar composiciones más viscosas, incluso hasta 10.000 cps. Las composiciones viscosas tienen una viscosidad preferentemente de 2.500 a 5.000 cps, puesto que, por encima de ese intervalo, se hacen más difíciles de administrar. Sin embargo, por encima de ese intervalo, las composiciones se pueden parecer a formas sólidas o de gelatina, que entonces se administran fácilmente como una pastilla tragable para la ingestión oral.

Las preparaciones líquidas normalmente son más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y composiciones sólidas. Adicionalmente, las composiciones líquidas son en cierto modo más convenientes de administrar, especialmente por inyección u oralmente, a animales, niños, particularmente niños pequeños, y a otros que pueden tener dificultad a la hora de tragar una pastilla, un comprimido, una cápsula o similar, o en situaciones de múltiples dosis. Por otro lado, las composiciones viscosas se pueden formular dentro del intervalo apropiado de viscosidad

## ES 2 284 285 T3

para proporcionar períodos de contacto más prolongados con la mucosa, tal como la protección del estómago o de la mucosa nasal.

5 Obviamente, la elección de los vehículos adecuados y de otros aditivos dependerá de la vía exacta de administración y de la naturaleza de la forma particular de dosificación, por ejemplo, la forma de dosificación líquida (por ejemplo, si la composición se va a formular en una disolución, una suspensión, un gel o en otra forma líquida), o una forma de dosificación sólida (por ejemplo, si la composición se va a formular en una pastilla, comprimido, cápsula, comprimido oblongo, en una forma de liberación con el tiempo, o en una forma llena de líquido).

10 Las disoluciones, suspensiones y geles contienen normalmente una cantidad principal de agua (preferentemente agua pura), además del antígeno, y un adyuvante opcional. También pueden estar presentes cantidades pequeñas de otros ingredientes, tales como agentes para ajustar el pH (por ejemplo, una base tal como NaOH), agentes emulsionantes o dispersantes, agentes tamponantes, conservantes, agentes humectantes, agentes gelificantes (por ejemplo, metilcelulosa), colorantes y/o sabores. Las composiciones pueden ser isotónicas, es decir, pueden tener la misma presión osmótica que la sangre y el líquido lagrimal.

15 La isotonicidad deseada de las composiciones de esta invención se puede lograr usando cloruro de sodio u otros agentes farmacéuticamente aceptables, tales como dextrosa, ácido bórico, tartrato de sodio, propilenglicol u otros solutos inorgánicos u orgánicos. Se prefiere particularmente el cloruro de sodio para tampones que contengan iones sodio. Para lograr la isotonicidad deseada y el pH de la composición final, se puede usar uno o más de los tampones de pH farmacéuticamente aceptables, tales como disolución salina tamponada con fosfato (PBS), Tris-HCl, tampón de citrato-fosfato, tampón de Tricina, tampón de Hepes y tampón de maleato. El cloruro de sodio se puede sustituir en el tampón de PBS por otras sales, tal como KCl, con tal de que la disolución final sea sustancialmente isotónica. Estos tampones se usan preferentemente para mantener las composiciones de la presente invención a un pH entre 6,0 y 8,0.

25 La viscosidad de las composiciones se puede mantener al nivel deseado usando un agente espesante farmacéuticamente aceptable. Se prefiere la metilcelulosa debido a que está fácil y económicamente disponible, y es fácil de trabajar con ella. Otros agentes espesantes adecuados incluyen, por ejemplo, goma de xantana, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carbómero, y similar. La concentración preferida del agente espesante dependerá del agente seleccionado. El punto importante es usar una cantidad que logrará la viscosidad seleccionada. Las composiciones viscosas normalmente se preparan a partir de disoluciones mediante adición de tales agentes espesantes.

30 Se puede utilizar un conservante farmacéuticamente aceptable para incrementar el período de caducidad de las composiciones. Puede ser adecuado el alcohol bencílico, aunque también se puede utilizar una variedad de agentes conservantes incluyendo, por ejemplo, parabenos, timerosal, clorobutanol, o cloruro de benzalconio. Una concentración adecuada del agente conservante será de 0,02% a 2% basada en el peso total, aunque puede haber una variación apreciable dependiendo del agente seleccionado.

40 Las composiciones de la presente invención se obtienen preferentemente con componentes estériles, o se hacen estériles a través de medios térmicos o de filtración conocidos. Las composiciones se pueden hacer estériles o se pueden esterilizar y después se pueden almacenar a 4°C, o se pueden congelar, preferentemente a una temperatura de -20°C o menor.

45 Los expertos en la materia reconocerán que los componentes de las composiciones se deben de seleccionar para que sean químicamente inertes con respecto al antígeno o antígenos particulares de interés y con respecto al adyuvante N-formilmeltonil-peptídico. Esto no presentará ningún problema a los expertos en los principios químicos y farmacéuticos, o los problemas se pueden evitar fácilmente haciendo referencia a textos estándares o mediante experimentos simples (que no implican experimentación excesiva), a partir de esta descripción y de los documentos citados en la presente memoria.

50 Las composiciones inmunológicamente eficaces de la presente invención se preparan mezclando los ingredientes siguiendo procedimientos generalmente aceptados. Por ejemplo, los componentes seleccionados se pueden mezclar simplemente en una mezcladora, o en otro dispositivo estándar, para proporcionar una mezcla concentrada que entonces se puede ajustar hasta la concentración final y hasta la viscosidad final mediante adición de agua o de un agente espesante y posiblemente un tampón para controlar el pH, o un soluto adicional para controlar la tonicidad. Generalmente, el pH puede ser de aproximadamente 3 a 7,5. Las composiciones se pueden administrar en dosis y mediante técnicas bien conocidas por los expertos en materia médica y veterinaria, teniendo en cuenta factores tales como la edad, el sexo, el peso y el estado del paciente o animal particular, y la forma de composición usada para la administración (por ejemplo, sólida frente a líquida). Las dosis para seres humanos u otros animales se pueden determinar sin experimentación excesiva por el experto en la materia a partir de la presente descripción, los documentos citados en la presente memoria y los Ejemplos a continuación (por ejemplo, a partir de los Ejemplos que implican a ratones).

65 Los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis de recuerdo, o para administraciones secuenciales, también son variables, y pueden incluir una administración inicial seguida de administraciones subsiguientes; no obstante, se pueden averiguar por el experto en la materia a partir de esta descripción, de los documentos citados en la presente memoria y de los Ejemplos a continuación.

## ES 2 284 285 T3

Los siguientes Ejemplos se proporcionan a título ilustrativo, y no se deben de considerar como limitativos de la invención.

### Ejemplos

#### 5 Ejemplo 1

*Respuesta inmunitaria potenciada a dosis subóptimas de gp160 mediante coadministración con el fMLP*

10 Se realizó un estudio de respuesta frente a la dosis en 9 grupos de ratones (Balb/cJ hembras; Jackson laboratories; tres ratones/grupo). En los días 0 y 21 todos los ratones se inmunizaron con 10  $\mu\text{g}$  o 0,1  $\mu\text{g}$  de la subunidad de gp160 de la cepa MN/LAI de VIH-1 (obtenida de Pasteur Merieux Connaught, Marcy l'Etoile, Francia), en un volumen total de 0,1 ml. Los ratones en los grupos 3-9 se inyectaron con niveles variables de fMLP (Sigma, St. Louis, MO) como se expone a continuación en la Tabla 1. En cada caso, el fMLP se administró simultáneamente con el inmunógeno. El fMLP se disolvió en metanol hasta 1 mg/ml, y se diluyó en PBS hasta los niveles mostrados en la Tabla 1. El grupo 2 sirvió como control para el disolvente de metanol usado para disolver fMLP. Todas las inmunizaciones se realizaron mediante inyección intramuscular, usando técnicas estándares.

TABLA 1

*Régimen de dosificación para gp 160/fMLP*

25	GRUPO 1:	gp160 10 $\mu\text{g}$
	GRUPO 2:	gp160 0,1 $\mu\text{g}$ + PBS + 0,025% de metanol
	GRUPO 3:	gp160 0,1 $\mu\text{g}$ + 25pg f-Met-Leu-Phe
30	GRUPO 4:	gp160 0,1 $\mu\text{g}$ + 2,5pg f-Met-Leu-Phe
	GRUPO 5:	gp160 0,1 $\mu\text{g}$ +0,25pg f-Met-Leu-Phe
	GRUPO 6:	gp160 0,1 $\mu\text{g}$ + 0,075pg f-Met-Leu-Phe
35	GRUPO 7:	gp160 0,1 $\mu\text{g}$ + 0,025pg f-Met-Leu-Phe
	GRUPO 8:	gp160 0,1 $\mu\text{g}$ + 0,0075pg f-Met-Leu-Phe
40	GRUPO 9:	gp160 0,1 $\mu\text{g}$ + 0,0025pg f-Met-Leu-Phe

45 En el Día 0, o antes de ese Día, los ratones procedentes de cada grupo experimental se sangraron individualmente desde el plexo retroorbital, y los sueros se prepararon a partir de la sangre. En o aproximadamente en los Días 21, 35 y 49, se tomaron muestras de sangre de cada ratón individual dentro de cada grupo experimental, y se prepararon los sueros. Todos los sueros se identificaron en busca de anticuerpos frente a gp160 de la cepa MN/LAI de VIH-1, mediante ELISA de cinética.

50 El ensayo de ELISA de cinética se realizó según lo siguiente. Brevemente, se revistieron placas de microtitulación con la subunidad de gp160 de la cepa MN/LAI de VIH-1 en tampón de revestimiento (carbonato-bicarbonato, pH 9,6), y se incubaron toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron entonces con PBS-Tween 20, y se bloquearon durante 2 horas a 37°C con PBS-Tween 20 + 0,1% de BSA. Las placas se lavaron entonces con PBS-Tween 20, y se añadieron los antisueros (diluidos 1:100 en PBS-Tween 20 + 0,1% de BSA). Las placas se incubaron durante 2 h a 37°C, después se lavaron. Se añadió a cada pocillo anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), y las placas se incubaron durante 1 h a 37°C. Las placas se lavaron, y se añadió a cada pocillo sustrato de dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD). Los pocillos se monitorizaron para determinar la velocidad del desarrollo de color a 450 nm, tomando lecturas repetidas cada dos minutos durante 15 minutos.

60 Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 2. 25 pg de fMLP coadministrado con 0,1  $\mu\text{g}$  de gp160 (una dosis subóptima) proporcionaron una respuesta inmunitaria comparable a la obtenida con una dosis óptima (10  $\mu\text{g}$ ) de gp160 sola.

65

## ES 2 284 285 T3

TABLA 2

*Respuestas de anticuerpos frente a gp160 de VIH mediante ELISA de cinética*

		<b>KELISA (mOD/min) Semanas</b>						
	<b>GRUPO</b>	<b>Subunidad <math>\mu</math>g</b>	<b>fMLP pg</b>	<b>RATÓN</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>7</b>
5								
10	1	10	0	a	3	10	35	27
				b	9	20	42	41
				c	4	21	48	41
15	2	0,1	0	a	4	7	7	6
				b	9	10	9	11
				c	3	2	2	7
20	3	0,1	25	a	8	21	49	34
				b	1	5	25	32
				c	2	7	27	24
25	4	0,1	2,5	a	4	5	13	14
				b	1	1	2	2
				c	1	13	38	37
30	5	0,1	0,25	a	1	5	5	4
				b	1	1	3	6
				c	3	8	18	15
35	6	0,1	0,075	a	1	2	7	4
				b	0	1	2	8
				c	4	5	8	4
40	7	0,1	0,025	a	2	6	33	34
				b	4	5	6	5
				c	2	3	19	12
45	8	0,1	0,0075	a	1	1	5	14
				b	1	2	3	3
				c	2	6	6	6
50	9	0,1	0,0025	a	1	12	13	17
				b	4	5	16	27
				c	1	1	3	4

Los ratones se inmunizaron en las semanas 0 y 3

+ suero de control = 42 mOD/min

### Ejemplo 2

*Efecto de fMLP sobre la respuesta de anticuerpos frente a p53 humana*

Se inyectaron intraperitonealmente (ip) o intramuscularmente (im) ratones Balb/cj hembras con  $5 \times 10^7$  unidades formadoras de placas (pfu) de vCP207, un ALVAC (poxvirus) recombinante que expresa p53 humana (la derivación de vCP207 se expone en la patente US nº 5.833.975, cuyas enseñanzas se incorporan aquí como referencia). Los ratones se ensayaron en grupos de tres. Un grupo de ratones se sensibilizó un día antes de la inyección ip con 0,1 ml de  $10^{-7}$  M de fMLP (4,376 ng); otro grupo se sensibilizó de forma similar antes de la inyección im. Se inyectó un tercer y un cuarto grupo con vCP207 solo, ip o im, respectivamente. Los ratones inyectados ip o im con ALVAC solo sirvieron como controles negativos.

## ES 2 284 285 T3

El programa de inmunización constó de tres inyecciones, separadas 14 días entre sí, empezando en el Día 0. En el Día 0 o antes de este Día, los ratones de cada grupo experimental se sangraron individualmente desde el plexo retroorbital, y se prepararon los sueros. En el Día 53 o aproximadamente en ese Día (el punto de las 8 semanas), los ratones de cada grupo experimental se sangraron individualmente desde el plexo retroorbital, y se prepararon los sueros. Las respuestas de anticuerpo frente a p53 humana se evaluaron mediante ELISA de cinética (realizado esencialmente como se describe en el Ejemplo 1, sustituyendo gp160 por p53 en la etapa de revestimiento de pocillos inicial) a las 8 semanas. Los resultados, mostrado a continuación en la Tabla 3, demuestran la potenciación de la respuesta de anticuerpo frente a p53 humana al sensibilizar con fMLP seguido de una inyección im de p53 humana de ALVAC.

TABLA 3

*Respuestas de anticuerpo frente a p53 humana*

	SENSIBILIZADOR	VÍA	RECOMBINANTE	(mOD/min.)		
				Semanas		
				0	8	
	Ninguno	lp	ALVAC	2	2	
				1	2	
				2	4	
	FMLP			0	0	
				1	1	
				0	1	
	Ninguno		p53 de AL-hu	1	17	
				0	15	
				0	11	
	FMLP			1	13	NS
				0	11	
				1	20	
	Ninguno	lm	ALVAC	0	4	
				0	1	
				0	0	
	FMLP			1	0	
				0	0	
				2	1	
	Ninguno		p53 de AL-hu	0	8	
				2	7	
				0	8	
	FMLP			1	10	0,0075
				0	12	
				1	11	

Los ratones se sensibilizaron 1 día antes de la inmunización mediante la misma vía  
 Los ratones se inmunizaron 3 veces, separadas 14 días, mediante lo indicado  
 Suero de control positivo = 15 mOD/min (~ título = 20.000)

## ES 2 284 285 T3

### Ejemplo 3

#### *Efecto de fMLP sobre la respuesta inmunitaria frente a env de MN de VIH (vCP125)*

5 La preparación de vCP125, un poxvirus recombinante a base de ALVAC que expresa env de MN de VIH se describió en la patente US n° 5.766.598, incorporada en la presente memoria como referencia.

10 Se inyectaron im a ratones Balb/cj hembras con  $5 \times 10^8$  pfu/ml de vCP125 solo, o en presencia de niveles variables de fMLP. Los parámetros de este estudio fueron los siguientes:

10 en el DÍA 0, se inoculó un grupo que comprende 9 ratones im con 0,1 ml de PBS que contiene ALVAC o vCP125, y una dosis programada de fMLP o PBS. fMLP se preparó recientemente para cada inmunización.

15 En el DÍA 0 o antes de este DÍA, se sangraron individualmente 3 ratones designados desde el plexo retroorbital, y los sueros se prepararon a partir de la sangre. Todos los ratones se inocularon im con 0,1 ml de PBS que contiene ALVAC o vCP125, y una dosis programada de fMLP o PBS.

20 En el DÍA 21 o aproximadamente en ese DÍA, los 3 ratones designados procedentes de cada grupo experimental se sangraron individualmente desde el plexo retroorbital, y los sueros se prepararon a partir de la sangre.

En el DÍA 21, se administraron a los ratones restantes inmunizaciones secundarias idénticas en dosis y en contenido a aquellas en el DÍA 0.

25 En los DÍAS 42 y 63, o en aproximadamente esos DÍAS, los 3 ratones designados procedentes de cada grupo experimental se sangraron individualmente desde el plexo retroorbital, y los sueros se prepararon a partir de la sangre.

30 Los sueros se recogieron durante el transcurso del estudio, y se evaluaron mediante ELISA de cinética (realizado esencialmente como se describe en el Ejemplo 1, usando env de VIH para recubrir los pocillos) frente a la glicoproteína de cubierta de VIH recombinante. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Las únicas respuestas de anticuerpo detectadas fueron las procedentes de ratones en los que la glicoproteína de env de VIH recombinante se había coadministrado con 0,25 ó 2,5 pg de fMLP.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 284 285 T3

TABLA 4

*Respuestas de anticuerpo frente a la glicoproteína de cubierta de VIH*

5	VIRUS	fMLP (pg)	RATÓN	KELISA (mOD/min.) Semanas				
				0	3	6	9	
10	ALVAC	0	a	2	1	1	1	
			b	5	1	9	1	
			c	1	1	1	2	
15			0,0025	a	3	1	4	2
		b		1	2	2		
		c		3	1	4	1	
20			2,5	a	1	1	1	2
		b		1	2	4	2	
		c		2	2	2	1	
25	VCP125	0	a	3	1	1	1	
			b	2	2	1	2	
			c	5	2	2	1	
30			0,0025	a	2	1	2	2
		b		7	8	5	6	
		c		5	1	2	3	
35			0,025	a	3	3	6	4
		b		1	1	1	1	
		c		1	2	1	2	
40			0,25	a	1	1	9	7
		b		1	1	2	2	
		c		3	1	3	2	
45			2,5	a	1	2	11	11
		b		1	1	4	9	
		c		2	3	3	1	
50		Los ratones se inmunizaron im durante las semanas 0 y 3. vCP125, HIV MN env en ALVAC. Suero de control POS, 62 OD/min.						

55 Ejemplo 4

60 *Respuesta inmunitaria potenciada frente a una dosis subóptima de hemocianina de lapa californiana (KLH) mediante coadministración con fMLP*

Se realizó un estudio de respuesta frente a la dosis en nueve grupos de ratones (Balb/cj hembras; 3 ratones/grupo).

65 En los DÍAS 0 y 28, todos los ratones en los grupos 1-7 se inmunizaron con 10 µg o 0,1 µg de KLH [¿fuente?] mediante la vía im, en un volumen total de 0,1 ml, según el programa de inmunización mostrado en la Tabla 5 a continuación.

## ES 2 284 285 T3

TABLA 5

*Régimen de dosificación para KLH, fMLP*

5	GRUPO 1:	KLH 100 µg/ml
	GRUPO 2:	KLH 1 µg/ml
10	GRUPO 3:	KLH 1 µg/ml + 2500 pg/ml fMLP
	GRUPO 4:	KLH 1 µg/ml + 250 pg/ml fMLP
	GRUPO 5:	KLH 1 µg/ml + 25 pg/ml fMLP
15	GRUPO 6:	KLH 1 µg/ml + 2,5 pg/ml fMLP
	GRUPO 7:	KLH 1 µg/ml + 0,25pg/ml fMLP
20	GRUPO 8:	2500 pg/ml fMLP
	GRUPO 9:	0,25 pg/ml fMLP

25 Los ratones en los grupos 3-7 se inmunizaron en presencia de diversas dosis de fMLP. Los formilpéptidos se administraron simultáneamente con la inmunización. Los formilpéptidos se prepararon de forma reciente para cada inmunización disolviendo en agua hasta 1 mg/ml y diluyendo hasta 2500 pg/ml en PBS. Los ratones en los grupos 8-9 recibieron sólo fMLP mediante la vía im.

30 En el Día 0 o antes de ese Día, los ratones procedentes de cada grupo experimental se sangraron individualmente desde el plexo retroorbital, y los sueros se prepararon a partir de la sangre.

En los Días 14, 28, 42 y 70, o en aproximadamente esos Días, los ratones de cada grupo experimental se sangraron individualmente.

35 Todos los sueros se identificaron en busca de anticuerpos frente a KLH mediante ELISA de cinética (como se describe en el Ejemplo 1, sustituyendo gp160 por KLH). Los resultados, expuestos en la Tabla 6 a continuación, indican que la coadministración de una cantidad desde 0,025 hasta 250 pg de fMLP dio como resultado una respuesta mejorada de anticuerpo frente a una dosis subóptima de antígeno de KLH, en comparación con los niveles logrados con la cantidad de antígeno solo.

45 (Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

# ES 2 284 285 T3

TABLA 6

*Generación de anticuerpos frente a KLH tras dos inmunizaciones*

	Grupo	Ratón	Dosis de KLH ( $\mu\text{g}$ )	Dosis de fMLP (pg)	Semanas (mOD/min.)					Media de la 10ª semana
					0	2	4	6	10	
5										
10	1	1	10	0	3	19	27	35	64	63
		2	10	0	4	11	14	54	65	
		3	10	0	3	9	21	69	59	
15	2	1	0,1	0	2	6	13	11	8	12
		2	0,1	0	3	10	20	13	15	
		3	0,1	0	5	5	7	13	13	
20	3	1	0,1	250	3	5	8	31	18	21
		2	0,1	250	2	2	7	17	25	
		3	0,1	250	1	2	5	14	19	
25	4	1	0,1	25	4	5	7	26	32	24
		2	0,1	25	3	3	10	38	30	
		3	0,1	25	2	7	3	6	9	
30	5	1	0,1	2,5	3	2	2	5	14	20
		2	0,1	2,5	2	2	5	22	29	
		3	0,1	2,5	2	3	2	18	26	
35	6	1	0,1	0,25	3	3	8	12	36	32*
		2	0,1	0,25	2	4	14	40	37	
		3	0,1	0,25	4	3	8	8	22	
40	7	1	0,1	0,025	3	3	3	35	23	20
		2	0,1	0,025	6	2	2	8	18	
		3	0,1	0,025	2	2	4	6	19	
45	8	1	0	250	1	2	3	3	4	3
		2	0	250	1	3	2	2	2	
		3	0	250	2	2	3	2	3	
50	9	1	0	0,025	2	3	3	3	4	3
		2	0	0,025	4	4	5	2	2	
		3	0	0,025	1	1	3	2	3	

Inmunización en las semanas 0 y 4.  
\* P < 0,05 grupo 6 frente a grupo 2

## Referencias

1. **Edelman**, Robert. Adjuvants for the Future, páginas 173-192. *En: New Generation Vaccines*. Levine *et al.* (eds.) Marcel Dekker, NY (1997).
2. **Wilkinson**, Peter C. Neutrophil Chemotaxis. Páginas 1160-1162. *En: Encyclopedia of Immunology*. Ivan M. Roitt (ed.), Academic Press (London) 1992.
3. *Chemotaxis* p. 329-332 (Wilkinson).
4. **Kashkin**, K.P. *et al.* Immunomodulatory Activity of a Chemotactic Peptide Conjugated With a Liposomal Antigen. *Immunologiya* 6: 37-40 (1987).
5. **Engvall**, E. Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. *En: Methods of Enzymology*. Vol. 70, p. 419-439. (H.V. Vunakis y J.J. Langone, Eds.) Academic Press, Nueva York.

## ES 2 284 285 T3

6. **Voller, A., D.E. Bidwell, G. Huldt, y E. Engvall.** A microplate method of ELISA and its application to malaria. *Bull Wld Hlth Org* 51: 209-221, 1974.

5 7. **Voller, A. y D.E. Bidwell.** A simple method for detecting antibodies to Rubella. *Brit J. Exp Path* 56: 338-339, 1975.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición inmunológica que comprende un antígeno de interés procedente de bacterias, virus, parásitos, levadura u hongos, o células benignas o malignas de seres humanos o de animales, y una cantidad eficaz de un adyuvante N-formilmetionil-peptídico, en la que (a) el antígeno y el N-formilmetionil-peptido están en disolución, o (b) el N-formilmetionil-peptido y el antígeno forman juntos una proteína de fusión, y la composición no contiene un liposoma.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, en la que el antígeno de interés está presente en una dosis subóptima, de forma que la administración del antígeno a un huésped en ausencia de adyuvante no daría como resultado la generación de una respuesta inmunitaria detectable.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1, en la que el adyuvante de N-formilmetionil-peptido es N-formilmetionil-leucilfenilalanina (fMLP).
4. Composición según la reivindicación 3, en la que el antígeno de interés es gp160.
- 20 5. Composición según la reivindicación 3, en la que el antígeno de interés es la glicoproteína de cubierta procedente de VIH-1.
6. Composición según la reivindicación 3, en la que el antígeno de interés es p53.
- 25 7. Uso de una cantidad subóptima de un antígeno de interés procedente de bacterias, virus, parásitos, levadura u hongos, o células benignas o malignas de seres humanos o de animales, y una cantidad potenciadora de la inmunogenicidad de un adyuvante N-formilmetionil-peptídico, para la preparación de una composición farmacéutica para potenciar la respuesta inmunitaria de un huésped frente al antígeno de interés, en la que dicha composición se va a administrar a dicho huésped, en el que (a) el antígeno y el N-formilmetionil-peptido están en disolución, o (b) el N-formilmetionil-peptido y el antígeno forman juntos una proteína de fusión, y la composición no contiene un liposoma.
- 30 8. Uso según la reivindicación 7, en el que el adyuvante N-formilmetionil-peptídico es N-formilmetionil-leucilfenilalanina (fMLP).
9. Uso según la reivindicación 8, en el que el antígeno de interés y el adyuvante de fMLP se administran concurrentemente al huésped.
- 35 10. Uso según la reivindicación 8, en el que el antígeno de interés y el adyuvante de fMLP se administran secuencialmente al huésped.
- 40 11. Uso de un antígeno de interés procedente de bacterias, virus, parásitos, levadura u hongos, o células benignas o malignas de seres humanos o de animales, y un adyuvante N-formilmetionil-peptídico, para la preparación de un medicamento para potenciar la respuesta inmunitaria de un huésped frente al antígeno, en el que el medicamento se va a administrar al huésped, en el que (a) el antígeno y el N-formilmetionil-peptido están en disolución, o (b) el N-formilmetionil-peptido y el antígeno forman juntos una proteína de fusión, y el medicamento no contiene un liposoma.
- 45 12. Uso según la reivindicación 11, en el que el virus es un poxvirus recombinante a base de ALVAC.
13. Uso según la reivindicación 11 ó 12, en el que el antígeno de interés es un componente de un agente patógeno o de una célula cancerosa.
- 50 14. Uso según la reivindicación 13, en el que el antígeno de interés es gp160 de MN de VIH.
15. Uso según la reivindicación 13, en el que el antígeno de interés es p53 humano.
- 55 16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que el antígeno de interés y el adyuvante N-formilmetionil-peptídico se administran concurrentemente al huésped.
17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que el antígeno de interés y el adyuvante N-formilmetionil-peptídico se administran secuencialmente al huésped.
- 60 18. Uso según la reivindicación 17, en el que el huésped se sensibiliza con el adyuvante N-formilmetionil-peptídico antes de la administración del antígeno de interés.
- 65