(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 387 327**

(51) Int. Cl.:

***A61K 39/39*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA TRAS OPOSICIÓN T5

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2007 PCT/US2007/021017**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2008 WO08153541**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2007 E 07875082 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **03.07.2024 EP 2068918**

(54) Título: **Composición de vacuna que contiene un adyuvante sintético**

(30) Prioridad:

**26.09.2006 US 847404 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
**19.11.2024**

(73) Titular/es:

**ACCESS TO ADVANCED HEALTH INSTITUTE (100.0%)**
**1616 Eastlake Avenue East, Suite 400**
**Seattle, WA 98102, US**

(72) Inventor/es:

**REED, STEVEN, G. y**
**CARTER, DARRICK**

(74) Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

## DESCRIPCIÓN

Composición de vacuna que contiene un adyuvante sintético

**Declaración de interés del gobierno**

Esta invención se realizó en parte con apoyo del gobierno mediante la Subvención Nº AI-25038 concedida a los National Institutes of Health. El gobierno tiene ciertos derechos sobre esta invención.

**Antecedentes de la invención**

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de las composiciones farmacéuticas y de vacunas. Más específicamente, los modos de realización descritos en la presente memoria se refieren a composiciones farmacéuticas y de vacuna, así como a métodos profilácticos y terapéuticos relacionados, donde las composiciones comprenden un adyuvante lípido de glucopiranosilo (abreviado generalmente como GLA por sus iniciales en inglés: glucopyranosyl lípido adjuvant).

Descripción de la técnica relacionada

El sistema inmune de los organismos superiores ha sido caracterizado mediante la distinción entre agentes extraños (o no propios, *non-self*) de los componentes familiares o de uno mismo (propios, *self*), de forma que los agentes extraños provocan respuestas inmunes, mientras que los autocomponentes son ignorados o tolerados. Las respuestas inmunes se han caracterizado tradicionalmente bien como respuestas humorales, en las que se producen anticuerpos específicos para los antígenos mediante linfocitos B diferenciados denominados células plasmáticas, o bien como respuestas mediadas por células, en las que varios tipos de linfocitos T actúan para eliminar los antígenos mediante varios mecanismos. Por ejemplo, las células T auxiliares CD4+, que son capaces de reconocer antígenos específicos, pueden responder liberando mediadores solubles, tales como las citocinas, para incorporar células del sistema inmune adicionales para que participen en una respuesta inmune. También las células T citotóxicas CD8+, que también son capaces de reconocer un antígeno específico, pueden responden enlazándose y destruyendo o dañando las células o partículas que porten el antígeno. En la técnica inmunológica, se sabe proporcionar ciertas vacunas según varias formulaciones, generalmente con el propósito de inducir una respuesta inmune adecuada en un huésped.

Las diferentes estrategias para provocar respuestas inmunes específicas mediante la administración de una vacuna a un huésped incluyen la inmunización con patógenos infecciosos muertos por calor o vivos pero atenuados, tales como virus, bacterias o algunos patógenos eucarióticos; la inmunización con un agente infeccioso no virulento capaz de dirigir la expresión del material genético que codifica el(los) antígeno(s) para los que se requiere una respuesta inmune; y la inmunización con vacunas de subunidades que contienen inmunógenos (tales como proteínas) aislados a partir de un patógeno particular con el fin de inducir inmunidad frente al patógeno (véase, por ejemplo, Liu, 1998, *Nature Medicine* 4 (supl. 5): 515). Para algunos antígenos, puede haber uno o más tipos de inmunidades adecuadas para las que ninguno de estos enfoques ha sido particularmente eficaz, incluyendo el desarrollo de vacunas que son eficaces para proteger inmunológicamente al huésped frente a virus de inmunodeficiencia humana u otros patógenos infecciosos, cáncer, enfermedad autoinmune, u otros estados clínicos.

Se sabe desde hace tiempo, que el lipopolisacárido (LPS) enterobacterial es un estimulador potente del sistema inmune, aunque su uso en adyuvantes ha sido restringido por sus efectos tóxicos. Un derivado no tóxico del LPS, el lípido A monofosforilado (MPL), producido por eliminación del grupo carbohidrato y del grupo fosfato centrales de la glucosamina del extremo reductor, ha sido descrito por Ribi *et al.* (1986, *Inmunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins*, Plenum Publ. Corp. NY, pág. 407-419).

Una versión desintoxicada adicionalmente del MPL se produce eliminando la cadena acílica en la posición 3 del esqueleto disacárido, y se denomina lípido A monofosforilado 3-O-desacilada (3D-MPL). Puede ser purificada y preparada por métodos mostrados en el documento GB 2122204B, cuya referencia también describe la preparación del lípido A difosforilado y sus variantes 3-O-desaciladas. Por ejemplo, se ha preparado el 3D-MPL en forma de una emulsión que tiene un tamaño de partícula pequeño de menos de 0,2 □m de diámetro, y su método de elaboración se describe en el documento WO 94/21292. En el documento WO 9843670A2 se han descrito formulaciones acuosas que comprenden lípido A monofosforilado y un tensioactivo.

Los coadyuvantes obtenidos a partir de lipopolisacárido bacteriano para ser formulados en combinaciones adyuvantes pueden ser purificados y procesados a partir de fuentes bacterianas, o alternativamente pueden ser sintéticos. Por ejemplo, en Ribi *et al.* 1986 (*supra*) se describe el lípido A monofosforilado purificado, y el lípido A monofosforilado o difosforilado 3-O-desacilado obtenido a partir de *Salmonella sp.* se describe en el documento GB 2220211 y en la patente estadounidense Nº 4.912.094. Se han descrito el 3D-MPL y los disacáridos de glucosamina □□(1-6) así como otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos (documento WO 98/01139; patente estadounidense Nº 6.005.099 y documento EP 0729473B1; Hilgers *et al.* 1986 *Int. Arch. Allergy Immunol.* 79 (4): 392-6; Hilgers *et al.* 1987, *Immunology* 60 (1): 141-6; y el documento EP 0549074B1). Combinaciones del 3D-MPL y adyuvantes de saponina obtenidos a

partir de la corteza de *Quillaja Saponaria molina* han sido descritas en el documento EP 0761231B. El documento WO 95/17210 describe una sistema adyuvante en emulsión basado en el escualeno, □-tocoferol y monooleato de sorbitán polioxietilenado (TWEEN™ 80), formulado con el inmunoestimulante QS21 e incluyendo opcionalmente 3D-MPL. A pesar de la accesibilidad de dichas combinaciones, el uso de adyuvantes obtenidos a partir de productos naturales está acompañado por costes de producción elevados, inconsistencia entre lotes, dificultades asociadas con la producción a gran escala, e incertidumbre con respecto a la presencia de impurezas en la composición de una preparación dada.

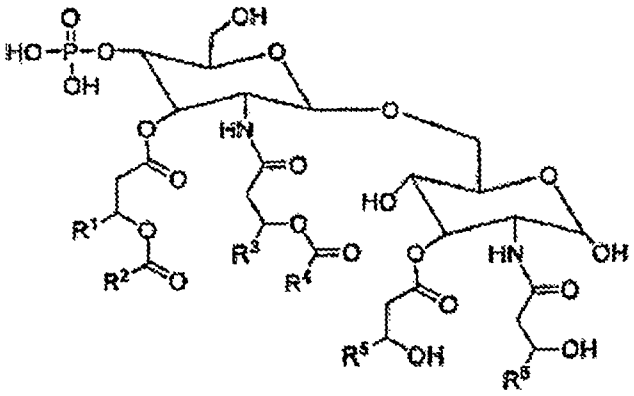
Hay una necesidad clara de vacunas mejoradas y, en particular, de vacunas que contengan de forma beneficiosa componentes adyuvantes químicamente definidos, de alta pureza, que presenten consistencia entre lotes y que puedan ser elaboradas de forma eficaz a escala industrial sin introducir contaminantes no deseados o estructuralmente no definidos. La presente invención proporciona composiciones y métodos para dichas vacunas, y ofrece otras ventajas asociadas.

Maeda H *et al.*: "Adjuvant activities of synthetic lípid A subunit analogues and its conjugates with muramyl dipeptide derivatives" *Vaccines*, vol. 7, Nº 3, 1989, páginas 275-281, XP000993028 ISSN: 0264-410X. Kanegasaki S. et al.: "Biological Activities of analogs of lípid A based chemically on the revised structural model comparison of mediator-inducing immunomodulating and endotoxic activities". *European Journal of Biochemistry*, vol. 43, Nº 2, 1984, páginas 237-242, XP002498330 ISSN: 0014-2956 describen un análogo sintético del lípido A monofosforilado con actividad adyuvante.

En un primer aspecto de la presente invención se proporciona una composición de vacuna que comprende:

a) un antígeno; y

b) un adyudante lípido de glucopiranosilo (GLA), en el que el GLA tiene la fórmula:

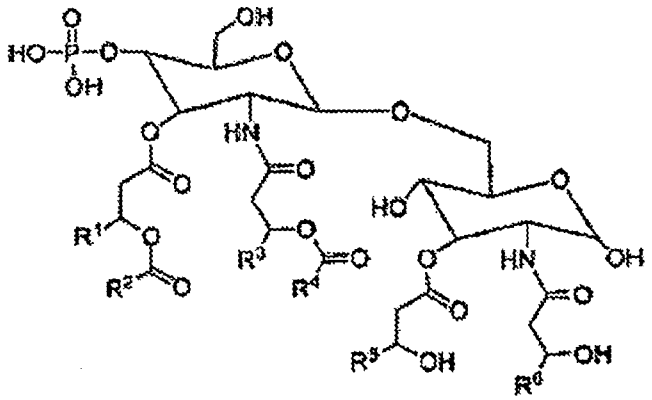


en la que:

$R^1$, $R^3$, $R^5$ y $R^6$ son iguales a undecilo; y

$R^2$ y $R^4$ son iguales a tridecilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición para usarla para estimular o aumentar una respuesta inmune deseada, específica para un antígeno, en un sujeto, comprendiendo la composición (a) un antígeno; y (b) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), en la que el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, (i) al menos un patógeno, (ii) al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con un cáncer, o (iii) al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con una enfermedad autoinmune, y estimular o aumentar de este modo una respuesta inmune deseada, específica para un antígeno, en la que el GLA tiene la fórmula:



en la que:

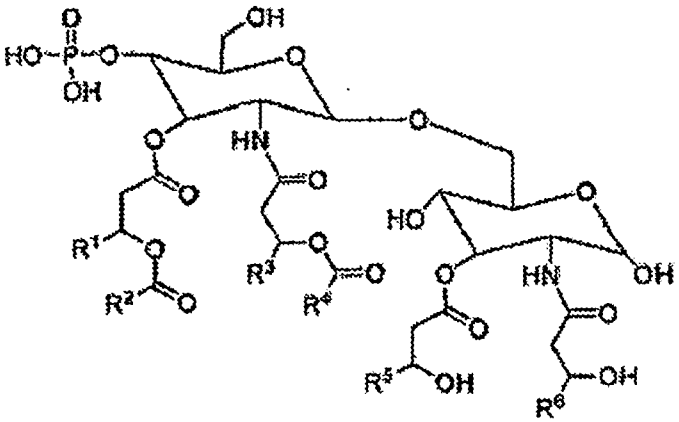
$R^1$, $R^3$, $R^5$ y $R^6$ son iguales a undecilo; y

$R^2$ y $R^4$ son iguales a tridecilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para inducir o mejorar una respuesta inmune de un paciente que comprende:

a) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y

b) un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y en la que el GLA tiene la fórmula:



en la que:

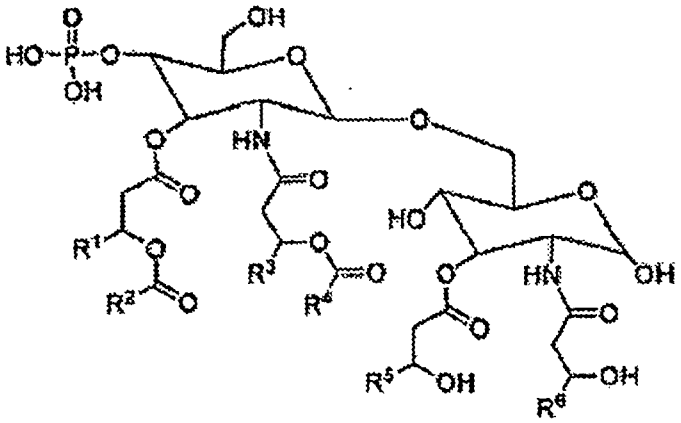
$R^1$, $R^3$, $R^5$ y $R^6$ son iguales a undecilo; y

$R^2$ y $R^4$ son iguales a tridecilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit que comprende:

a) una composición que comprende una adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable; y

b) un antígeno en un segundo contenedor, en el que la composición inmunológica no está en contacto con el antígeno, y en el que el GLA tiene la fórmula:



en la que:

$R^1$, $R^3$, $R^5$ y $R^6$ son iguales a undecilo; y

$R^2$ y $R^4$ son iguales a tridecilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

La presente invención en sus varios modos de realización se refiere a composiciones y su uso en métodos que emplean de forma ventajosa el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), como se expone en las reivindicaciones, como un adyuvante y componente de vacuna. Según un modo de realización de la invención descrita en la presente memoria, se proporciona una composición de vacuna que comprende un antígeno y un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) como se expone en las reivindicaciones.

En otros modos de realización se proporciona una composición de vacuna que comprende un antígeno; un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), como se expone en las reivindicaciones; y un agonista del receptor de tipo *toll* (abreviado generalmente TLR por sus iniciales en inglés: toll-like receptor), donde en algunos modos de realización adicionales el agonista del TLR se elige entre un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C. En otro modo de realización, se proporciona una composición de vacuna que comprende un antígeno; un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) como se expone en las reivindicaciones; y un vehículo que comprende al menos una entre un aceite e ISCOMATRIX™. En otro modo de realización, se proporciona una composición de vacuna que comprende un antígeno; un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) como se expone en las reivindicaciones; y uno o más entre: (i) al menos un coadyuvante, (ii) al menos un agonista del TLR, (iii) al menos un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, y (iv) al menos un modificador inmune de doble tallo en bucle (abreviado generalmente como dSLIM por sus iniciales en inglés: double stem loop immune modifier). En algunos modos de realización adicionales (i) el coadyuvante, si está presente, se elige entre alumbre, un alcaloide de una planta y un detergente, donde el alcaloide de una planta se elige de tomatina, y el detergente se elige entre saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina, (ii) el agonista del TLR, si está presente, se elige entre un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C, y (iii) el modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, si está presente, se elige entre resiquimod (R848), imiquimod y gardiquimod. En otro modo de realización se proporciona una composición de vacuna que comprende: un antígeno; un adyuvante lípido de glucopiranosilo(GLA) como se expone en las reivindicaciones; y al menos uno entre un coadyuvante y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde el coadyuvante se elige entre una citocina, un detergente y un copolímero de bloques o un polímero biodegradable, y el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un vehículo que se elige entre fosfato de calcio, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un liposoma, un novosoma, un niosoma y una micropartícula.

En un modo de realización particular, en el que se usa un liposoma o un vehículo similar, el GLA tiene estructura laminar del liposoma o está encapsulado. En otro modo de realización particular, en el que se usa una micropartícula, la micropartícula es una que se basa o comprende lípidos grasos poliméricos.

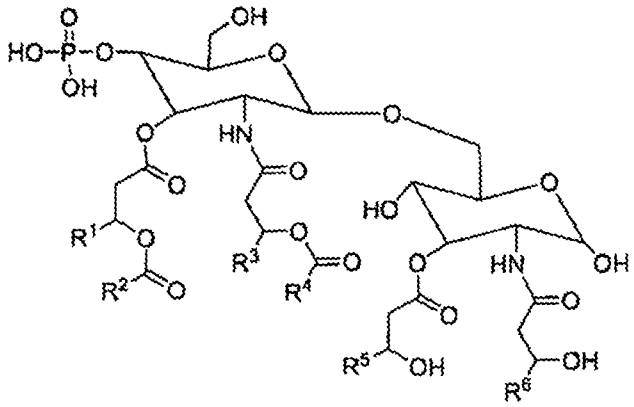
En algunos modos de realización adicionales, la citocina se elige entre GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF-□ e IFN-gamma; el copolímero de bloques o el polímero biodegradable se eligen entre Pluronic® L121, CRL 1005, PLGA, PLA, PLG y polil:C; y el detergente se elige entre el grupo que consiste en saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina.

En otros modos de realización se proporcionan una composición de vacuna que comprende: al menos un constructo de expresión recombinante que comprende un promotor unido de forma operativa a una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno; y un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA). En un modo de realización el constructo de

expresión recombinante está presente en un vector vírico, que en algunos modos de realización adicionales está presente en un virus que se elige entre un adenovirus, un virus adeno-asociado, un virus del herpes, un lentivirus, un poxvirus y un retrovirus.

Según algunos de cualquiera de los modos de realización que incluyen un agonista del TLR descritos anteriormente, el agonista del TLR es capaz de liberar una señal biológica que interacciona con al menos un TLR que se elige entre el TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8 y TLR-9. En algunos modos de realización adicionales, el agonista del TLR se elige entre un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C. En un modo de realización particular en el que se usa un agonista del TLR-7 y/o TLR-8, el agonista del TRL-7 y/o del TLR-8 está atrapado en una vesícula.

Según los modos de realización de la invención descritos anteriormente, el GLA tiene la fórmula:



en la que:

$R^1$, $R^3$, $R^5$ y $R^6$ son iguales a undecilo; y $R^2$ y $R^4$ son iguales a tridecilo.

Según algunos de cualquiera de los modos de realización descritos anteriormente, la composición de vacuna es capaz de provocar una respuesta inmune en un huésped. En algunos modos de realización adicionales, la respuesta inmune es específica para el antígeno. Según algunos de cualquiera de los modos de realización descritos anteriormente, el antígeno es capaz de provocar en un huésped una respuesta inmune que se elige entre una respuesta humoral y una respuesta mediada por células. Según algunos de cualquiera de los modos de realización descritos anteriormente, la composición de vacuna es capaz de provocar en un huésped al menos una respuesta inmune que se elige entre una respuesta de linfocitos T del tipo $T_H1$, una respuesta de linfocitos T del tipo $T_H2$, una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL), una respuesta de anticuerpos, una respuesta de citocina, una respuesta de linfocina, una respuesta de quimiocina, una respuesta inflamatoria. Según algunos de cualquiera de los modos de realización descritos anteriormente, la composición de vacuna es capaz de producir en un huésped al menos una respuesta inmune que se elige entre (a) producción de una o varias citocinas en la que la citocina se elige entre el interferón gamma (IFN-□), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-□), (b) la producción de uno o varias interleucinas en la que la interleucina se elige entre IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 e IL-23, (c) producción de una o varias quimiocinas, en la que la quimiocina se elige entre MIP-1□, MIP-1□, RANTES, CCL4 y CCL5, y (d) respuesta de linfocitos que se elige entre una respuesta de células T de memoria, respuesta de células B de memoria, respuesta de células T efectoras, respuesta de células T citotóxicas y respuesta de células B efectoras.

Según algunos de cualquiera de los modos de realización descritos anteriormente, el antígeno se obtiene a partir de al menos un patógeno infeccioso que se elige entre una bacteria, un virus y un hongo.

En algunos modos de realización adicionales, la bacteria es una actinobacteria y en algunos modos de realización adicionales aún, la actinobacteria es una micobacteria. En algunos otros modos de realización relacionados, la micobacteria se elige entre *M. tuberculosis* y *M. leprae*. En algunos otros modos de realización relacionados, la bacteria se elige entre *Salmonella*, *Neisseria*, *Borrelia*, *Chlamydia* y *Bordetella*.

En algunos otros modos de realización relacionados, el virus se elige entre un virus de herpes simple, un virus de inmunodeficiencia humana (VIH), un virus de inmunodeficiencia felina (VIF), citomegalovirus, virus de varicela zoster, virus de la hepatitis, virus de Epstein Barr (VEB), virus sinsicial respiratorio, virus del papiloma humano (VPH) y un citomegalovirus. Según algunos de cualquiera de los modos de realización descritos anteriormente, el antígeno se obtiene a partir de un virus de inmunodeficiencia humano, que en algunos modos de realización adicionales se elige entre el VIH-1 y el VIH-2.

En algunos otros modos de realización relacionados, el hongo se elige entre *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Coccidioides* y *Pneumocystis*. En algunos otros modos de realización relacionados, el hongo es una levadura que, en algunos modos de realización adicionales es una Candida, donde en algunos modos de realización adicionales aún, la Candida se elige entre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae, C. tripicalis* y *C. parpasilosis*.

Según algunos de cualquiera de los modos de realización descritos anteriormente, el antígeno se obtiene a partir de un parásito que, en algunos modos de realización adicionales es un protozoo, que en algunos modos de realización adicionales es un *Plasmodium*, que en algunos modos de realización adicionales aún se elige entre *P. falciparum, P. vivax, P. malariae* y *P. ovale*. En algunos otros modos de realización, el parásito se elige entre *Acanthamoeba, Entamoeba hisolytica, Angiostrongylus, Schistosoma Mansonii, Schistosoma haematobium, Schistosoma japonicum, Schistosoma mekongy, Cryptosporidium, Ancylostoma, Entamoeba histolytica, Entamoeba coli, Entamoeba dispar, Entamoeba hartmanni, Entamoeba polecki, Wuchereria bancrofti, Giardia, Leishmania, Enterobius vermicularis, Ascaris lumbricoides, Trichuris trichuria, Necator americanus, Ancylostoma duodenale, Brugia malayi, Onchocerca volvulus, Dracanculus medinensis, Trichinella spiralis, Strongyloides steroralis, Opisthorchis sinensis, Paragonimus spp., Fasciola hepatica, Fasciola magna, Fasciola gigantica, Taenia saginata* y *Taenia solium*.

Según algunos de cualquiera de los modos de realización descritos anteriormente, el antígeno se obtiene a partir de al menos una célula cancerosa. En algunos modos de realización adicionales, la célula cancerosa se origina en un tumor sólido primario y, en algunos otros modos de realización la célula cancerosa se origina en un cáncer que es un tumor sólido secundario o metastático, y en algunos otros modos de realización la célula cancerosa se origina en un cáncer que es un tumor circulante o un tumor ascítico. En algunos modos de realización relacionados, la célula cancerosa se origina en un cáncer que se elige entre el cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de mama, cáncer de próstata, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, pseudomixoma peritoneal, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrional y tumor de Wilsms. En algunos otros modos de realización relacionados, la célula cancerosa se origina en un cáncer que se elige entre tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oliodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y enfermedad de cadena pesada.

Según algunos de cualquiera de los modos de realización descritos anteriormente, el antígeno se obtiene a partir de, o tiene reacción inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con una enfermedad autoinmune. En algunos modos de realización adicionales, el epítope, la biomolécula, la célula o el tejido que está asociado con una enfermedad autoinmune se elige entre snRNP cuando la enfermedad autoinmune es el lupus eritematoso sistémico; al menos uno entre tiroglobulina, un receptor de tirotropina y una célula epitelial del tiroides cuando la enfermedad autoinmune es la enfermedad de Grave; una plaqueta cuando la enfermedad autoinmune es la púrpura trombocitopénica; al menos uno entre el antígeno del pénfigo, desmogleina-3, desmoplaquina, envoplaquina y antígeno 1 del penfigoide bulloso cuando la enfermedad autoinmune es el pénfigo; una proteína básica de mielina cuando la enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple; una célula beta del islote pancreático cuando la enfermedad autoinmune es la diabetes de tipo 1; y un receptor de la acetilcolina cuando la enfermedad autoinmune es miastenia gravis.

En otro modo de realización se proporciona una composición farmacéutica para inducir o aumentar una respuesta inmune, que comprende un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), como se expone en las reivindicaciones; y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización se proporciona una composición farmacéutica para inducir o aumentar una respuesta inmune, que comprende un antígeno; un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), como se expone en las reivindicaciones; y un vehículo o excipiente. En un modo de realización adicional, el agonista del TLR se elige entre un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C. En otro modo de realización se proporciona una composición farmacéutica para inducir o aumentar una respuesta inmune, que comprende: un antígeno; un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), como se expone en las reivindicaciones; al menos un coadyuvante que se elige entre las saponinas y los miméticos de la saponina; y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización se proporciona una composición farmacéutica para inducir o aumentar una respuesta inmune, que comprende un antígeno; un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), como se expone en las reivindicaciones; y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable que comprende al menos uno entre un aceite e ISCOMATRIX™. En otro modo de realización se proporciona una composición farmacéutica para inducir o aumentar una respuesta inmune, que comprende: (a) un antígeno; (b) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), como se expone en las reivindicaciones; (c) uno o más entre: (i) al menos un coadyuvante, (ii) al menos un agonista del TLR, (iii) al menos un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, y (iv) al menos un modificador inmune de doble tallo en bucle (dSLIM); y (d) un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos modos de realización adicionales, (i) el coadyuvante, si está presente, se

elige entre alumbre, un alcaloide de una planta y un detergente, donde el alcaloide de una planta es tomatina, y el detergente se elige entre saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina, (ii) el agonista del TLR, si está presente, se elige entre un lipopolisacáridos, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LelF) y al menos un antígeno de la hepatitis C, y (iii) el modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, si está presente, se elige entre resiquimod (R848), imiquimod y gardiquimod.

En otro modo de realización se proporciona una composición farmacéutica para inducir o aumentar una respuesta inmune, que comprende: un antígeno; un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) como se expone en las reivindicaciones; y al menos uno entre un coadyuvante y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde: el coadyuvante se elige entre una citocina, un copolímero de bloques o un polímero biodegradable y un detergente, y el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un vehículo que se elige entre fosfato de calcio, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un liposoma, un novosoma, un niosoma y una micropartícula. En algunos modos de realización adicionales, la citocina se elige entre GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF-□ e IFN-gamma; el copolímero de bloques o el polímero biodegradable se eligen entre Pluronic® L121, CRL 1005, PLGA, PLA, PLG y polil:C; y el detergente se elige entre el grupo que consiste en saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina.

En otro modo de realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende: al menos un constructo de expresión recombinante que comprende un promotor unido de forma operativa a una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno; un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) como se expone en las reivindicaciones; y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos modos de realización adicionales, el constructo de expresión recombinante está presente en un vector vírico, que en algunos modos de realización adicionales está presente en un virus que se elige entre un adenovirus, un virus adeno-asociado, un virus del herpes, un lentivirus, un poxvirus y un retrovirus.

Según algunos modos de realización adicionales de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, el antígeno y el GLA están en contacto entre ellos, y según algunos otros modos de realización de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, el antígeno y el GLA no están en contacto entre ellos. En algunos modos de realización adicionales en los que el antígeno y el GLA no están en contacto entre ellos, están presentes en contenedores separados. En otros modos de realización se proporciona una composición farmacéutica para inducir o aumentar una respuesta inmune que comprende una primera combinación que comprende un antígeno y un primer vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable; y una segunda combinación que comprende un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) y un segundo vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que el antígeno y el GLA no están en contacto entre ellos. En un modo de realización adicional, el antígeno y el GLA están presentes en contenedores separados. En algunos modos de realización relacionados, el primer vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable es diferente del segundo vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En otros modos de realización relacionados, el primer vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable no es diferente del segundo vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro modo de realización, se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto que tiene o se sospecha que está en riesgo de tener la enfermedad infecciosa, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende (a) un antígeno; y (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), en el que el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un patógeno infeccioso que está asociado con la enfermedad infecciosa, y tratar o prevenir de este modo la enfermedad infecciosa. En otro modo de realización, se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto que tiene o se sospecha que está en riesgo de tener la enfermedad infecciosa, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende (a) un antígeno; (b) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y (c) un agonista del receptor de tipo *toll* (TLR), en el que el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un patógeno infeccioso que está asociado con la enfermedad infecciosa, y tratar o prevenir de este modo la enfermedad infecciosa. En un modo de realización adicional, el agonista del TLR se elige entre un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LelF) y al menos un antígeno de la hepatitis C. En otro modo de realización, se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto que tiene o se sospecha que está en riesgo de tener la enfermedad infecciosa, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende (a) un antígeno; (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y (c) al menos un coadyuvante que se elige entre el grupo que consiste en las saponinas y los miméticos de la saponina, donde el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un patógeno infeccioso que está asociado con la enfermedad infecciosa, y tratar o prevenir de este modo la enfermedad infecciosa. En otro modo de realización se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto que tiene o es sospechoso de estar en riesgo de tener la enfermedad infecciosa, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende (a) un antígeno; (b) el adyuvante lípido glucopiranosilo (GLA); y (c) un vehículo que comprende al menos uno entre un aceite e ISOMATRIX™, donde el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un patógeno infeccioso que está asociado con la enfermedad infecciosa, y tratar o prevenir de este modo la enfermedad infecciosa. En otro modo de realización se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para

tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto que tiene o es sospechoso de estar en riesgo de tener la enfermedad infecciosa, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende (a) un antígeno; (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y (c) uno o más entre: (i) al menos un coadyuvante, (ii) al menos un agonista del TLR, (iii) al menos un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, y (iv) al menos un modificador inmune de doble tallo en bucle (dSLIM), donde el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un patógeno infeccioso que está asociado con la enfermedad infecciosa, y tratar o prevenir de este modo la enfermedad infecciosa. En algunos modos de realización adicionales (i) el coadyuvante, si está presente, se elige entre alumbre, un alcaloide de una planta y un detergente, donde el alcaloide de una planta es tomatina, y el detergente se elige entre saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina, (ii) el agonista del TLR, si está presente, se elige entre un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C, y (iii) el modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, si está presente, se elige entre resiquimod (R848), imiquimod y gardiquimod.

En otro modo de realización se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto que tiene o es sospechoso de estar en riesgo de tener la enfermedad infecciosa, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende: (a) un antígeno; (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo(GLA); y (c) al menos uno entre un coadyuvante y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde: el coadyuvante se elige entre una citocina, un copolímero de bloques o un polímero biodegradable y un detergente, y el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un vehículo que se elige entre el grupo que consiste en fosfato de calcio, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un liposoma y una micropartícula, donde el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un patógeno infeccioso que está asociado con la enfermedad infecciosa, y tratar o prevenir de este modo la enfermedad infecciosa. En algunos modos de realización adicionales, la citocina se elige entre GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF-□ e IFN-gamma; el copolímero de bloques o el polímero biodegradable se eligen entre Pluronic® L121, CRL 1005, PLGA, PLA, PLG y polil:C; y el detergente se elige entre el grupo que consiste en saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina.

En otro modo de realización se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto que tiene o es sospechoso de estar en riesgo de tener la enfermedad infecciosa, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende: (a) al menos un constructo de expresión recombinante que comprende un promotor unido de forma operativa a una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno; y (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), donde el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un patógeno infeccioso que está asociado con la enfermedad infecciosa, y tratar o prevenir de este modo la enfermedad infecciosa. En un modo de realización adicional, el constructo de expresión recombinante está presente en un vector vírico que, en algunos modos de realización adicionales aún, está presente en un virus que se elige entre un adenovirus, un virus adeno-asociado, un virus del herpes, un lentivirus, un poxvirus y un retrovirus. Según algunos modos de realización relacionados con los métodos descritos anteriormente, el antígeno se obtiene a partir de al menos un patógeno infeccioso que se elige entre una bacteria, un virus y un hongo.

En otro modo de realización se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir una enfermedad autoinmune en un sujeto que tiene o es sospechoso de estar en riesgo de tener la enfermedad autoinmune, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende: (a) un antígeno; y (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), donde el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con la enfermedad autoinmune, y tratar o prevenir de este modo la enfermedad autoinmune. En otro modo de realización se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir una enfermedad autoinmune en un sujeto que tiene o es sospechoso de estar en riesgo de tener la enfermedad autoinmune, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende: (a) un antígeno; (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y (c) un agonista del receptor de tipo *toll* (TLR), en el que el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con la enfermedad autoinmune, y tratar o prevenir de este modo la enfermedad autoinmune. En algunos modos de realización adicionales, el agonista del TLR se elige entre un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C. En otro modo de realización, se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir una enfermedad autoinmune en un sujeto que tiene o se sospecha que está en riesgo de tener la enfermedad autoinmune, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende (a) un antígeno; (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y (c) al menos un coadyuvante que se elige entre el grupo que consiste en las saponinas y los miméticos de la saponina, donde el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con la enfermedad autoinmune, y tratar o prevenir de este modo la enfermedad autoinmune. En otro modo de realización se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir una enfermedad autoinmune en un sujeto que tiene o es sospechoso de estar en riesgo de tener la enfermedad autoinmune, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende: (a) un antígeno; (b) el

adyuvante lípido glucopiranosilo (GLA); y (c) un vehículo que comprende al menos uno entre un aceite e ISOMATRIX™, donde el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con la enfermedad autoinmune, y tratar o prevenir de este modo la enfermedad autoinmune. En otro modo de realización se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir una enfermedad autoinmune en un sujeto que tiene o es sospechoso de estar en riesgo de tener la enfermedad autoinmune, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende: (a) un antígeno; (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y (c) uno o más entre: (i) al menos un coadyuvante, (ii) al menos un agonista del TLR, (iii) al menos un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, y (iv) al menos un modificador inmune de doble tallo en bucle (dSLIM), donde el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con la enfermedad autoinmune, y tratar o prevenir de este modo la enfermedad autoinmune. En algunos modos de realización adicionales (i) el coadyuvante, si está presente, se elige entre alumbre, un alcaloide de una planta y un detergente, donde el alcaloide de una planta es tomatina, y el detergente se elige entre saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina, (ii) el agonista del TLR, si está presente, se elige entre un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C, y (iii) el modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, si está presente, se elige entre resiquimod (R848), imiquimod y gardiquimod.

En otro modo de realización se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir una enfermedad autoinmune en un sujeto que tiene o es sospechoso de estar en riesgo de tener la enfermedad autoinmune, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende: (a) un antígeno; (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y (c) al menos un uno entre un coadyuvante y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde: el coadyuvante se elige entre una citocina, un copolímero de bloques o un polímero biodegradable y un detergente, y el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un vehículo que se elige entre el grupo que consiste en fosfato de calcio, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un liposoma y una micropartícula, donde el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con la enfermedad autoinmune, y tratar o prevenir de este modo la enfermedad autoinmune. En un modo de realización adicional, la citocina se elige entre GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF-□ e IFN-gamma; el copolímero de bloques o el polímero biodegradable se eligen entre Pluronic® L121, CRL 1005, PLGA, PLA, PLG y polil:C; y el detergente se elige entre el grupo que consiste en saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina.

En otro modo de realización se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir una enfermedad autoinmune en un sujeto que tiene o es sospechoso de estar en riesgo de tener la enfermedad autoinmune, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende: (a) al menos un constructo de expresión recombinante que comprende un promotor unido de forma operativa a una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno; y (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), donde el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con la enfermedad autoinmune, y tratar o prevenir de este modo la enfermedad autoinmune. En un modo de realización adicional, el constructo de expresión recombinante está presente en un vector vírico, que en algunos modos de realización adicionales está presente en un virus que se elige entre un adenovirus, un virus adeno-asociado, un virus del herpes, un lentivirus, un poxvirus y un retrovirus.

En alguno de los modos de realización descritos anteriormente relacionados con el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir una enfermedad autoinmune, la enfermedad autoinmune se elige entre la diabetes de tipo 1, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso, la miastenia gravis, la enfermedad de Crohn, la enfermedad de Graves, la púrpura trombocitopénica y el pénfigo. En algunos otros de los modos de realización descritos anteriormente relacionados con un método para tratar o prevenir una enfermedad autoinmune, el epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con una enfermedad autoinmune se elige entre: el snRNP cuando la enfermedad autoinmune es el lupus eritematoso sistémico; al menos uno entre tiroglobulina, un receptor de tirotropina y una célula epitelial del tiroides cuando la enfermedad autoinmune es la enfermedad de Grave; una plaqueta cuando la enfermedad autoinmune es la púrpura trombocitopénica; al menos uno entre el antígeno del pénfigo, desmogleina-3, desmoplaquina, envoplaquina y antígeno 1 del penfigoide bulloso cuando la enfermedad autoinmune es el pénfigo; una proteína básica de mielina cuando la enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple; una célula beta del islote pancreático cuando la enfermedad autoinmune es la diabetes de tipo 1; y un receptor de la acetilcolina cuando la enfermedad autoinmune es miastenia gravis.

Según otros modos de realización, se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto que tiene o es sospechoso de estar en riesgo de tener un cáncer, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende: (a) un antígeno; (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), donde el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con el cáncer, y tratar o prevenir de este modo el cáncer. Según otros modos de realización, se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto que tiene o es sospechoso de estar en riesgo de tener un cáncer, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende: (a) un antígeno; (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y (c) un agonista del receptor de tipo *toll* (TLR), donde el antígeno se obtiene a partir de, o

presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con el cáncer, y tratar o prevenir de este modo el cáncer. En algunos modos de realización adicionales, el agonista del TLR se elige entre un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C. Según otros modos de realización, se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto que tiene o es sospechoso de estar en riesgo de tener un cáncer, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende: (a) un antígeno; (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y (c) al menos un coadyuvante que se elige entre el grupo que consiste en las saponinas y los miméticos de la saponina, donde el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con el cáncer, y tratar o prevenir de este modo el cáncer.

Según otros modos de realización, se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto que tiene o es sospechoso de estar en riesgo de tener un cáncer, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende: (a) un antígeno; (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y (c) un vehículo que comprende al menos uno entre un aceite e ISCOMATRIX™, donde el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con el cáncer, y tratar o prevenir de este modo el cáncer. Según otros modos de realización, se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto que tiene o es sospechoso de estar en riesgo de tener un cáncer, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende: (a) un antígeno; (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y (c) uno o más entre: (i) al menos un coadyuvante, (ii) al menos un agonista del TLR, (iii) al menos un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, y (iv) al menos un modificador inmune de doble tallo en bucle (dSLIM), donde el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con el cáncer, y tratar o prevenir de este modo el cáncer. En algunos modos de realización adicionales (i) el coadyuvante, si está presente, se elige entre alumbre, un alcaloide de una planta y un detergente, donde el alcaloide de una planta es tomatina, y el detergente se elige entre saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina, (ii) el agonista del TLR, si está presente, se elige entre el grupo que consiste en lipopolisacáridos, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C, y (iii) el modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, si está presente, se elige entre resiquimod (R848), imiquimod y gardiquimod. Según otros modos de realización, se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto que tiene o es sospechoso de estar en riesgo de tener un cáncer, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende: (a) un antígeno; (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y (c) al menos uno entre un coadyuvante y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde el coadyuvante se elige entre el grupo que consiste en una citocina, un copolímero de bloques o un polímero biodegradable y un detergente, y el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un vehículo que se elige entre el grupo que consiste en fosfato de calcio, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un liposoma y una micropartícula, donde el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con el cáncer, y tratar o prevenir de este modo el cáncer. En un modo de realización adicional, la citocina se elige entre GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF-□ e IFN-gamma; el copolímero de bloques o el polímero biodegradable se eligen entre Pluronic® L121, CRL 1005, PLGA, PLA, PLG y polil:C; y el detergente se elige entre la saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina. Según otros modos de realización, se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto que tiene o es sospechoso de estar en riesgo de tener un cáncer, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende: (a) al menos un constructo de expresión recombinante que comprende un promotor unido de forma operativa a una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno; y (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), donde el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con el cáncer, y tratar o prevenir de este modo el cáncer. En un modo de realización adicional, el constructo de expresión recombinante está presente en un vector vírico, que en algunos modos de realización adicionales está presente en un virus que se elige entre un adenovirus, un virus adeno-asociado, un virus del herpes, un lentivirus, un poxvirus y un retrovirus.

En algunos modos de realización adicionales del uso descrito en métodos para tratar o prevenir el cáncer, el antígeno se obtiene al menos a partir de una célula cancerosa que, en algunos modos de realización adicionales, se origina en un cáncer que es un tumor sólido secundario o metastático, y en algunos otros modos de realización adicionales se origina en un cáncer que es un tumor circulante o un tumor ascítico. En algunos modos de realización, la célula cancerosa se origina en un cáncer que se elige entre el cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de mama, cáncer de próstata, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, pseudomixoma peritoneal, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrional y tumor de Wilsms. En algunos otros modos de realización

relacionados, la célula cancerosa se origina en un cáncer que se elige entre tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oliodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y enfermedad de cadena pesada.

Según algunos modos de realización adicionales de uno cualquiera de los usos descritos anteriormente en los métodos para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa o una enfermedad autoinmune o un cáncer, la etapa de administración se realiza una vez, mientras que en otros modos de realización adicionales de dichos métodos la etapa de administración se realiza al menos dos veces, y en algunos otros modos de realización adicionales la etapa de administración se realiza al menos tres veces, y en algunos otros modos de realización adicionales la etapa de administración se realiza cuatro o más veces. Según algunos modos de realización adicionales de uno cualquier de los métodos descritos anteriormente para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa o una enfermedad autoinmune o un cáncer, antes de la etapa de administración el sujeto es preparado con un agente de preparación que se elige entre un extracto bacteriano, una vacuna de virus vivo, al menos un constructo de expresión recombinante que comprende un promotor unido de forma operativa a una secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno, y un vector vírico que comprende un promotor unido de forma operativa con una secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno. En un modo de realización adicional, el extracto bacteriano se obtiene a partir del bacilo de Calmet-Guerin (BCG).

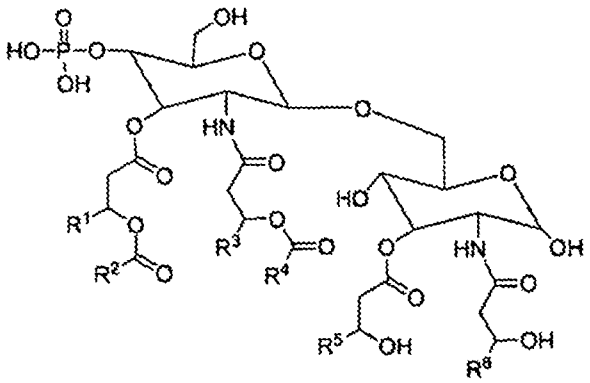
En otro modo de realización se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para producir o aumentar una respuesta inmune específica frente a un antígeno en un sujeto que comprende administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende (a) un antígeno; y (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA). En otro modo de realización se proporciona un método para producir o aumentar una respuesta inmune frente a un antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende (a) un antígeno, (b) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), y (c) un agonista de un receptor de tipo *toll* (TLR). En algunos modos de realización adicionales, el agonista del TLR se elige entre un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C. En otro modo de realización se proporciona un método para producir o aumentar una respuesta inmune frente a un antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende (a) un antígeno, (b) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), y (c) al menos un coadyuvante que se elige entre el grupo que consiste en las saponinas y los miméticos de la saponina. En otro modo de realización se proporciona un método para producir o aumentar una respuesta inmune frente a un antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende (a) un antígeno, (b) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), y (c) un vehículo que comprende al menos uno entre un aceite e ISCOMATRIX™. En otro modo de realización se proporciona un método para producir o aumentar una respuesta inmune frente a un antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende (a) un antígeno; (b) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y (c) uno o más entre: (i) al menos un coadyuvante, (ii) al menos un agonista del TLR, (iii) al menos un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, y (iv) al menos un modificador inmune de doble tallo en bucle (dSLIM). En algunos modos de realización adicionales (i) el coadyuvante, si está presente, se elige entre alumbre, un alcaloide de una planta y un detergente, donde el alcaloide de una planta se elige de tomatina, y el detergente se elige entre saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina, (ii) el agonista del TLR, si está presente, se elige entre el grupo que consiste en un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C, y (iii) el modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, si está presente, se elige entre resiquimod (R848), imiquimod y gardiquimod.

En otro modo de realización se proporciona un método para producir o aumentar una respuesta inmune frente a un antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende (a) un antígeno; (b) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y (c) al menos uno entre un coadyuvante y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde: el coadyuvante se elige entre una citocina, un copolímero de bloques, un polímero biodegradable y un detergente, y el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un vehículo que se elige entre el fosfato de calcio, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un liposoma y una micropartícula. En algunos modos de realización adicionales, la citocina se elige entre GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF- e IFN-gamma; el copolímero de bloques o el polímero biodegradable se eligen entre Pluronic® L121, CRL 1005, PLGA, PLA, PLG y polil:C; y el detergente se elige entre el grupo que consiste en saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina.

En otro modo de realización se proporciona un método para producir o aumentar una respuesta inmune frente a un antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende (a) al menos un constructo de expresión recombinante que comprende un promotor unido de forma operativa a una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno; y (b) el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA). En algunos modos de realización adicionales, el constructo de expresión recombinante está presente en un vector vírico, que en algunos modos de realización adicionales está presente en un virus que se elige entre un adenovirus, un virus adeno-asociado, un virus del herpes, un lentivirus, un poxvirus y un retrovirus.

En algunos modos de realización adicionales relacionados, el agonista del TLR, si está presente, es capaz de liberar una señal biológica interaccionando con al menos un TLR que se elige entre el TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8 y TLR-9. En algunos modos de realización adicionales, el agonista del TLR se elige entre un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C.

En modos de realización de los usos descritos anteriormente para producir o aumentar una respuesta específica frente a un antígeno, deseada en un sujeto, el GLA tiene la fórmula:



en la que:

$R^1$, $R^3$, $R^5$ y $R^6$ son iguales a undecilo; y

$R^2$ y $R^4$ son iguales a tridecilo.

En algunos modos de realización adicionales de los usos descritos anteriormente de métodos para producir o aumentar una respuesta específica frente a un antígeno, deseada en un sujeto, la composición de vacuna es capaz de producir una respuesta inmune en un huésped. En algunos modos de realización adicionales, la respuesta inmune es específica para el antígeno. En algunos modos de realización adicionales de los métodos descritos anteriormente para producir o aumentar una respuesta específica frente a un antígeno, deseada en un sujeto, el antígeno es capaz de producir en un huésped una respuesta inmune que se elige entre una respuesta humoral y una respuesta mediada por células. En algunos modos de realización adicionales de los métodos descritos anteriormente para producir o aumentar una respuesta específica frente a un antígeno, deseada en un sujeto, la composición de vacuna es capaz de producir en un huésped al menos una respuesta inmune que se elige entre el grupo que consiste en: una respuesta de linfocitos T del tipo $T_H1$, una respuesta de linfocitos T del tipo $T_H2$, una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL), una respuesta de anticuerpos, una respuesta de citocina, una respuesta de linfocina, una respuesta de quimiocina y una respuesta inflamatoria. En algunos modos de realización adicionales de los métodos descritos anteriormente para producir o aumentar una respuesta específica frente a un antígeno, deseada en un sujeto, la composición de vacuna es capaz de producir en un huésped al menos una respuesta inmune que se elige entre el grupo que consiste en: (a) producción de una o varias citocinas, donde la citocina se elige entre el grupo que consiste en interferón-gamma (IFN-□) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-□); (b) producción de una o varias interleucinas, donde la interleucina se elige entre IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 e IL-23, (c) producción de una o varias quimiocinas, en la que la quimiocina se elige entre MIP-1□, MIP-1□, RANTES, CCL4 y CCL5, y (d) una respuesta de linfocitos que se elige entre una respuesta de células T de memoria, respuesta de células B de memoria, respuesta de células T efectoras, respuesta de células T citotóxicas y respuesta de células B efectoras.

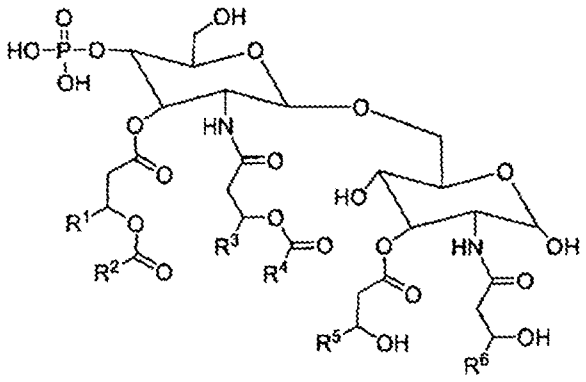
Según algunos otros modos de realización, se proporciona un método para preparar una composición de vacuna que comprende mezclar (a) un antígeno y (b) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA). Según algunos otros modos de realización se proporciona un método para preparar una composición de vacuna que comprende mezclar (a) un antígeno, (b) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) y (c) un agonista del receptor tipo *toll* (TLR). En algunos modos de realización adicionales, el agonista del TLR se elige entre un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C. Según otros modos de realización se proporciona un método para preparar una composición de vacuna que comprende mezclar (a) un antígeno, (b) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), y (c) al menos un coadyuvante que se elige entre el grupo que consiste en las saponinas y los miméticos de la saponina. Según algunos otros modos de realización se proporciona un método para preparar una composición de vacuna que comprende mezclar (a) un antígeno, (b) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), y (c) un vehículo que comprende al menos uno entre un aceite e ISCOMATRIX™. Según algunos otros modos de realización se proporciona un método para preparar una composición de vacuna que comprende mezclar (a) un antígeno, (b) un adyuvante lípido de

glucopiranosilo (GLA), y (c) uno o más entre: (i) al menos un coadyuvante, (ii) al menos un agonista del TLR, (iii) al menos un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, y (iv) al menos un modificador inmune de doble tallo en bucle (dSLIM). En algunos modos de realización adicionales (i) el coadyuvante, si está presente, se elige entre alumbre, un alcaloide de una planta y un detergente, donde el alcaloide de una planta se elige de tomatina, y el detergente se elige entre saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina, (ii) el agonista del TLR, si está presente, se elige entre el grupo que consiste en un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LelF) y al menos un antígeno de la hepatitis C, y (iii) el modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, si está presente, se elige entre resiquimod (R848), imiquimod y gardiquimod. Según algunos otros modos de realización se proporciona un método para preparar una composición de vacuna que comprende mezclar (a) un antígeno; (b) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y (c) al menos uno entre un coadyuvante y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde: el coadyuvante se elige entre el grupo que consiste en una citocina, un copolímero de bloques o un polímero biodegradable y un detergente, y el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un vehículo que se elige entre el grupo que consiste en fosfato de calcio, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un liposoma y una micropartícula. En algunos modos de realización adicionales, la citocina se elige entre GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF-□ e IFN-gamma; el copolímero de bloques o el polímero biodegradable se eligen entre Pluronic® L121, CRL 1005, PLGA, PLA, PLG y polil:C; y el detergente se elige entre el grupo que consiste en saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina.

Según otros modos de realización se proporciona un método para preparar una composición de vacuna que comprende mezclar (a) al menos un constructo de expresión recombinante que comprende un promotor unido de forma operativa a una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno; y (b) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA). En algunos modos de realización adicionales, el constructo de expresión recombinante está presente en un vector vírico, que en algunos modos de realización adicionales está presente en un virus que se elige entre un adenovirus, un virus adeno-asociado, un virus del herpes, un lentivirus, un poxvirus y un retrovirus. En algunos modos de realización, el GLA no está 3'-des-O-acilado.

En algunos modos de realización, el agonista del TLR es capaz de liberar una señal biológica interaccionando con al menos un TLR elegido entre TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8 y TLR-9. En algunos modos de realización adicionales, el agonista del TLR se elige entre un lipopolisacáridos, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LelF) y al menos un antígeno de la hepatitis C.

Según algunos modos de realización de los métodos de preparación de una composición de vacuna descritos anteriormente, el GLA tiene la fórmula:



en la que:

$R^1$, $R^3$, $R^5$ y $R^6$ son iguales a undecilo; y

$R^2$ y $R^4$ son iguales a tridecilo.

En algunos modos de realización adicionales, la etapa de mezcla comprende emulsionar, y en algunos otros modos de realización adicionales la etapa de mezcla comprende formar partículas, que en algunos modos de realización adicionales comprende micropartículas. En algunos otros modos de realización adicionales, la etapa de mezcla comprende formar un precipitado que comprende todo o una porción del antígeno y todo o una porción del GLA.

En algunos otros modos de realización, se proporciona una composición farmacéutica adyuvante inmunológica que comprende un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) como se expone en las reivindicaciones; y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos otros modos de realización, se proporciona una composición farmacéutica adyuvante inmunológica que comprende un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) como se expone en las reivindicaciones; y un agonista del receptor tipo *toll* (TLR). En algunos modos de realización adicionales, el

agonista del TLR se elige entre un lipopolisacáridos, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C. En algunos otros modos de realización, se proporciona una composición farmacéutica adyuvante inmunológica que comprende un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) como se expone en las reivindicaciones; y al menos un coadyuvante que se elige entre las saponinas y los miméticos de la saponina. En algunos otros modos de realización, se proporciona una composición farmacéutica adyuvante inmunológica que comprende un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) como se expone en las reivindicaciones; y un vehículo que comprende al menos uno entre un aceite e ISCOMATRIX™. En algunos otros modos de realización, se proporciona una composición farmacéutica adyuvante inmunológica que comprende (a) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) como se expone en las reivindicaciones; y (b) uno o más entre: (i) al menos un coadyuvante, (ii) al menos un agonista del TLR, (iii) al menos un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, y (iv) al menos un modificador inmune de doble tallo en bucle (dSLIM).

En algunos modos de realización adicionales (i) el coadyuvante, si está presente, se elige entre alumbre, un alcaloide de una planta y un detergente, donde el alcaloide de una planta es tomatina, y el detergente se elige entre saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina, (ii) el agonista del TLR, si está presente, se elige entre el grupo que consiste en lipopolisacáridos, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C, y (iii) el modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, si está presente, se elige entre resiquimod (R848), imiquimod y gardiquimod.

En algunos otros modos de realización, se proporciona una composición farmacéutica adyuvante inmunológica que comprende un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) como se expone en las reivindicaciones; y al menos uno entre un coadyuvante y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde: el coadyuvante se elige entre el grupo que consiste en una citocina, un copolímero de bloques o un polímero biodegradable y un detergente, y el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un vehículo que se elige entre el fosfato de calcio, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un liposoma y una micropartícula. En algunos modos de realización adicionales, la citocina se elige entre GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF e IFN-gamma; el copolímero de bloques o el polímero biodegradable se eligen entre Pluronic® L121, CRL 1005, PLGA, PLA, PLG y polil:C; y el detergente se elige entre el grupo que consiste en saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina.

En algunos otros modos de realización se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para alterar la capacidad de respuesta inmunológica en un huésped que comprende: administrar al huésped una composición farmacéutica adyuvante inmunológica que comprende un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) como se expone en las reivindicaciones, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y alterar de este modo la capacidad de respuesta inmunológica del huésped. En algunos otros modos de realización se proporciona un método para alterar la capacidad de respuesta inmunológica en un huésped que comprende administrar al huésped una composición adyuvante inmunológica que comprende un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) y un agonista del receptor tipo *toll* (TLR) y alterar de este modo la capacidad de respuesta inmunológica del huésped. En algunos modos de realización adicionales, el agonista del TLR se elige entre un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C. En algunos otros modos de realización se proporciona un método para alterar la capacidad de respuesta inmunológica en un huésped que comprende administrar al huésped una composición adyuvante inmunológica que comprende un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) y al menos un coadyuvante que se elige entre el grupo que consiste en las saponinas y los miméticos de la saponina y alterar de este modo la capacidad de respuesta inmunológica del huésped. En algunos otros modos de realización se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para alterar la capacidad de respuesta inmunológica en un huésped que comprende: administrar al huésped una composición adyuvante inmunológica que comprende un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) y un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende al menos uno entre un aceite e ISCOMATRIX™, y alterar de este modo la capacidad de respuesta inmunológica del huésped. En algunos otros modos de realización se proporciona un método para alterar la capacidad de respuesta inmunológica en un huésped que comprende administrar al huésped una composición adyuvante inmunológica que comprende un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) y uno o más entre: (i) al menos un coadyuvante, (ii) al menos un agonista del TLR, (iii) al menos un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, y (iv) al menos un modificador inmune de doble tallo en bucle (dSLIM), y alterar de este modo la capacidad de respuesta inmunológica del huésped.

En algunos modos de realización adicionales (i) el coadyuvante, si está presente, se elige entre alumbre, un alcaloide de una planta y un detergente, donde el alcaloide de una planta es tomatina, y el detergente se elige entre saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina, (ii) el agonista del TLR, si está presente, se elige entre el grupo que consiste en un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C, y (iii) el modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, si está presente, se elige entre resiquimod (R848), imiquimod y gardiquimod.

En algunos otros modos de realización se proporciona el uso del GLA de la invención en un método para alterar la capacidad de respuesta inmunológica en un huésped que comprende: administrar al huésped una composición adyuvante inmunológica que comprende el adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y al menos uno entre un coadyuvante y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde: el coadyuvante se elige entre el grupo que consiste

en el grupo que consiste en una citocina, un copolímero de bloques o un polímero biodegradable y un detergente, y el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un vehículo que se elige entre el grupo que consiste en fosfato de calcio, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un liposoma y una micropartícula, y alterar de este modo la capacidad de respuesta inmunológica del huésped. En algunos modos de realización adicionales, la citocina se elige entre GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF-□ e IFN-gamma; el copolímero de bloques o el polímero biodegradable se eligen entre Pluronic® L121, CRL 1005, PLGA, PLA, PLG y polil:C; y el detergente se elige entre el grupo que consiste en saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina.

En algunos modos de realización adicionales de los usos descritos anteriormente para alterar la capacidad de respuesta inmunológica en un huésped, la etapa de administración se realiza una, dos, tres, cuatro o más veces. En algunos otros modos de realización adicionales de los métodos descritos anteriormente para alterar la capacidad de respuesta inmunológica en el huésped, alterar la capacidad de respuesta inmunológica en el huésped comprende inducir o aumentar una respuesta inmune. En algunos otros modos de realización adicionales de los métodos descritos anteriormente para alterar la capacidad de respuesta inmunológica en el huésped, alterar la capacidad de respuesta inmunológica en el huésped comprende inhibir una respuesta inmune. En algunos modos de realización adicionales de los métodos descritos anteriormente para alterar la capacidad de respuesta inmunológica en un huésped, el método comprende además administrar simultáneamente o secuencialmente y en cualquier orden un antígeno que se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un patógeno infeccioso que está asociado con una enfermedad infecciosa frente a la que se desea una respuesta inmunológica inducida o aumentada. En algunos otros de dichos modos de realización, la etapa de administración del antígeno se realiza una, dos, tres, cuatro o más veces. En algunos otros modos de realización adicionales de los métodos descritos anteriormente para alterar la capacidad de respuesta inmunológica en un huésped, el método comprende además administrar simultáneamente o secuencialmente y en cualquier orden un antígeno que se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con una enfermedad autoinmune y frente a la que se desea una respuesta inmunológica inhibida. En algunos otros de dichos modos de realización, la etapa de administración del antígeno se realiza una, dos, tres, cuatro o más veces. En algunos otros modos de realización adicionales de los métodos descritos anteriormente para alterar la capacidad de respuesta inmunológica en un huésped, el método comprende además administrar simultáneamente o secuencialmente y en cualquier orden un antígeno que se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con un cáncer frente al que se desea una respuesta inmunológica inducida o aumentada. En algunos otros de dichos modos de realización, la etapa de administración del antígeno se realiza una, dos, tres, cuatro o más veces.

En otro modo de realización se proporciona un kit que comprende: una composición adyuvante inmunológica, como se ha descrito anteriormente, en un primer contenedor; y un antígeno en un segundo contenedor, en el que la composición adyuvante inmunológica no está en contacto con el antígeno. En otro modo de realización se proporciona un kit que comprende: una composición adyuvante inmunológica, como se ha descrito anteriormente, en un primer contenedor; y al menos un constructo de expresión recombinante que comprende un promotor unido de forma operativa a una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno en un segundo contenedor, en el que la composición adyuvante inmunológica no está en contacto con el constructo de expresión recombinante. En algunos modos de realización adicionales del kit que se acaba de describir, el antígeno se obtiene a partir de al menos un patógeno infeccioso que se elige entre una bacteria, un virus, un hongo y un protozoo. En algunos otros modos de realización adicionales del kit que se acaba de describir, el antígeno se obtiene a partir de al menos una célula cancerosa. En algunos otros modos de realización adicionales del kit que se acaba de describir, el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con una enfermedad autoinmune.

Estos y otros aspectos de la presente invención se harán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos. Además, en la presente memoria se exponen varias referencias que describen con más detalle algunos aspectos de esta invención y que se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad.

**Breve descripción de las distintas vistas de los dibujos**

La figura 1 muestra los datos de HPLC que demuestran el número y cantidad de materiales contaminantes en el MPL-AF y el GLA-AF. Estos cromatogramas se obtuvieron usando un sistema Agilent 1100 y un detector ESA Corona CAD. El método se realizó usando un gradiente de metanol a cloroformo en una columna Waters Atlantis C18. Las inyecciones incluían 2,5 □g de GLA y MPL respectivamente y 0,27 □g de fosfocolina (POPC) sintética que se usaba como agente solubilizante.

La figura 2 muestra los datos de ELISA que demuestran los niveles de citocinas y quimiocinas expresados por macrófagos humanos de la línea celular Mono Mac 6 (paneles a-e) y derivados de PBMC (paneles f-h) como respuesta a la estimulación con GLA. Las células se cultivaron a $1x10^5$ células/pocillo con una formulación acuosa de GSK Biologicals MPL® (MPL-AF), GLA (GLA-AF) o vehículo de AF solo durante 24 horas. Los niveles de MIP-1□, IP-10, IL-6, IL-23 e IL-1□ en los sobrenadantes se midieron mediante ELISA de fase doble.

La figura 3 muestra los datos de ELISA que demuestran los niveles de producción de anticuerpo anti-Fluzone inducido en ratón una semana después de cada inmunización (es decir, el 7º día, panel A y el 28º día, panel B) usando dos dosis diferentes de la vacuna Fluzone formulada con GLA-AF, o GLA-SE, en comparación con Fluzone solo. Los paneles A y B muestran los valores Ab de ELISA para ratón inmunizado dos veces con un intervalo de 3 semanas con 20 ml (1,8 □g) o 2 ml (0,18 mg) de vacuna Fluzone (Flu) en una formulación que contiene GLA-AF, GLA-SE o sin adyuvante, una semana después de la primera (A) o segunda (B) inyección. El panel C muestra los valores para el anticuerpo de neutralización (HAI) en los sueros de ratón después de la segunda inmunización.

La figura 4 muestra los datos de ELISA que demuestran los niveles de producción de anticuerpo anti-SMT inducida en ratón una semana después de la tercera inmunización usando antígeno SMT solo, o formulado con GLA-SE. Los ratones C57BL se inmunizaron tres veces a intervalos de tres semanas con antígeno SMT (10 □g por animal para cada inmunización) formulado en una emulsión estable que contenía GLA (GLA-SE; 20 □g por animal para cada inmunización), o se inyectaron con proteína SMT sola. Los sueros se recogieron mediante extracción una semana después de cada inmunización y se midieron por ELISA los niveles de los anticuerpos IgG1 y IgG2 específicos para la SMT. Se muestran las medias y el error estándar de la media (EEM) de los valores finales recíprocos.

La figura 5 muestra los datos de ELISA que demuestran los niveles de producción de anticuerpo anti-Leish-110f inducida en ratones una semana después de la primera inmunización usando antígeno Leish-110f formulado con diferentes cantidades de GLA (40, 20, 5 ó 1 □g) en comparación con controles salinos. Los ratones Balb/c fueron inmunizados tres veces con intervalos de dos semanas con el antígeno Leish-110f (10 □g por animal en cada inmunización) formulado en emulsiones estables que contenían 40, 20, 5 ó 1 mg de GLA (GLA-SE) o se inyectaron con disolución salina. Los sueros se recogieron mediante extracción una semana después de cada inmunización y se analizaron los niveles en el suero de los anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos para el Leish-110f. Se muestran las medias y el EEM de los valores finales recíprocos para los sueros recogidos 7 días después de la 1ª inmunización.

La figura 6 muestra los datos de ELISA que demuestran los niveles de producción de citocina IFN-□ anti-Leish-110f inducida en ratones una semana después de la tercera inmunización usando antígeno Leish-110f formulado con diferentes cantidades de GLA en comparación con controles salinos. Los esplenocitos de ratones Balb/c inmunizados tres veces en intervalos de dos semanas con antígeno Leish-110f (10 □g) formulado en una emulsión estable que contenía 40, 5 ó 1 □g de MPL (MPL-SE) o GLA (GLA-SE), o de ratones inyectados con una disolución salina, se cultivaron durante 3 días *in vitro* en medio solo o en un medio que contenía 10 mg/ml de Leish-110f, o 3 mg/ml de Concanavalina A (ConA). Se midieron por ELISA los niveles de IFN-□ en los sobrenadantes. Se muestran las medias y los EEM.

La figura 7 muestra los datos de ICS que demuestran las frecuencias de células T CD4+ y CD8+ que producen citocinas IFN-□, IL-2 y TNF específicas para ID83, inducidas en ratones una semana después de la tercera inmunización usando ID83 solo con formulaciones adyuvantes que contenían GLA (GLA-SE), GLA+CpG (GLA/CpG-SE) o GLA-GDQ (GLA/GDQ-SE). Los esplenocitos de los ratones C57BL/6, inmunizados tres veces en intervalos de tres semanas con proteína de fusión ID83 de M. tuberculosis (8 □g) se formularon con GLA-SE, GLA-CpG-SE, GLA-gardiquimod (GDQ)-SE, o inyectados con disolución salina, se cultivaron *in vitro* durante 12 horas en un medio que contenía 10 mg/ml de ID83. Los niveles celulares de IL-2, TNF e IFN-□ en células T controladas con CD3+CD4+ o CD3+CD8+ se detectaron por tinción intracelular y se midieron por citometría de flujo en un aparato BD LSRII FACS.

En la figura 8, el panel A muestra los datos de ICS que demuestran las frecuencias de células T CD4+ que producen citocina IFN-□ específica para el ML0276 en ratón una semana después de la tercera inmunización usando antígeno ML0276 formulado con formulaciones acuosas que contenían CpG, o Imiquimod (IMQ) o una emulsión oleosa estable que contenía GLA (GLA-SE) o los tres mezclados juntos, en comparación con controles de disolución salina y control *naive*. Los esplenocitos de ratón C57BL/6, inmunizado tres veces en intervalos de tres semanas con antígeno ML0276 de *M. leprea* (10 □g) formulado con CpG, imiquimod (IMQ), GLA-SE, una combinación de los tres, o inyectados con disolución salina, se cultivaron durante 12 horas *in vitro* en un medio que contenía 10 mg/ml de ML0276. El panel A muestra los niveles celulares de IFN-□ en células T CD3+CD4+ que fueron detectados por tinción intracelular y medidos por citometría de flujo en un dispositivo BD LSRII FACS. El panel B muestra la celularidad del ganglio linfático de drenaje.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención en sus múltiples modos de realización proporciona composiciones de vacuna, composiciones adyuvantes y métodos relacionados que incluyen el uso de un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA) sintético. El GLA proporciona un adyuvante inmunológico sintético que, ventajosamente con respecto a adyuvantes de la técnica anterior, y en particular con respecto a adyuvantes de productos naturales, puede ser preparado en una forma esencialmente homogénea. Además, el GLA puede ser preparado de forma eficaz y económica mediante un procedimiento sintético de elaboración química a gran escala, contrariamente a los adyuvantes derivados de productos naturales. Como adyuvante sintético que se sintetiza químicamente a partir de materiales iniciales definidos para obtener un producto definido químicamente que presenta consistencia cualitativa y cuantitativa entre lotes, el GLA ofrece por lo tanto beneficios sin precedentes que incluyen un control de calidad del producto mejorado. Sorprendentemente, aunque el lípido A 3-acilado monofosforilado ha sido asociado con algunas toxicidades, se ha

encontrado que cuando la posición amina 2 contiene una cadena acilo sencilla, las moléculas conservan propiedades de seguridad aceptables. Además, la síntesis de dichos compuestos se simplifica porque la desacilación específica en la posición 3 presenta desafíos tecnológicos. Por lo tanto, la invención ofrece ventajas adicionales en cuanto a seguridad y facilidad de síntesis.

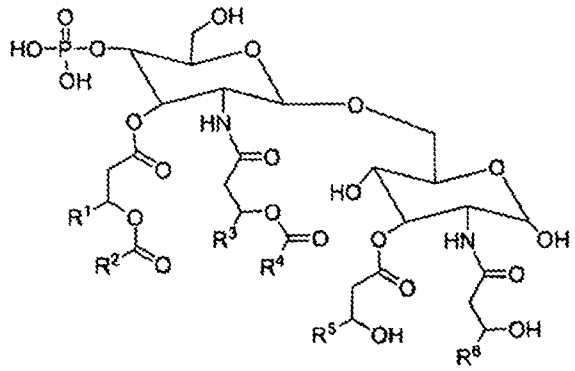
Como se ha descrito en la presente memoria, las composiciones que contienen GLA y los métodos para su uso incluyen en algunos modos de realización el uso del GLA con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para su actividad como adyuvante inmunológico, incluyendo como adyuvante cuando la administración del GLA a un sujeto puede ser totalmente independiente de, y/o separado temporalmente y/o espacialmente de, la administración al sujeto de uno o más antígenos frente a los que se desea la producción o el aumento de una respuesta inmune (por ejemplo, una respuesta específica frente al antígeno) en el sujeto. Otros modos de realización incluyen el uso del GLA en una composición de vacuna que también incluye uno o varios antígenos para los que se desea que la vacuna produzca o aumente una respuesta inmune. Como se describe en la presente memoria, estas composiciones de vacuna pueden incluir también en algunos modos de realización relacionados uno o más agonistas del receptor de tipo *toll* (TLR) y/o uno o varios entre uno o más coadyuvantes, un modificador de respuesta inmune de imidazoquinolina o un modificador inmune de doble tallo en bucle (dSLIM). En otros modos de realización relacionados, una composición de vacuna como la proporcionada en la presente memoria puede comprender GLA y uno o más constructos de expresión recombinante, comprendiendo cada uno de ellos un promotor unido de forma operativa a una secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno frente al que se desea la producción o el aumento de una respuesta inmune (por ejemplo, una respuesta específica frente al antígeno) en el sujeto.

GLA

Como también se ha indicado anteriormente, como adyuvante sintetizado químicamente, el GLA se puede preparar en una forma esencialmente homogénea, lo que se refiere a una preparación del GLA que es al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% y todavía más preferiblemente al menos 96%, 97%, 98% o 99% puro con respecto a la molécula de GLA.

La determinación del grado de pureza de una preparación de GLA dada puede ser realizada fácilmente por los expertos en los métodos de química analítica adecuados, tales como los análisis por cromatografía de gases, cromatografía líquida, espectrometría de masas y/o resonancia magnética nuclear.

Un GLA como el usado en la presente memoria tiene la siguiente fórmula estructura general:



en la que: $R^1$, $R^3$, $R^5$ y $R^6$ son iguales a undecilo; y $R^2$ y $R^4$ son iguales a tridecilo.

El GLA se puede obtener comercialmente, por ejemplo, de Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL; número de producto 699800, en el que $R^1$, $R^3$, $R^5$ y $R^6$ son undecilo y $R^2$ y $R^4$ son tridecilo).

Antígeno

Un antígeno para su uso en algunos modos de realización de las composiciones de vacuna y métodos que emplean GLA descritos en la presente memoria, puede ser cualquier epítope diana, molécula (incluyendo una biomolécula), complejo molecular (incluyendo complejos moleculares que contienen biomoléculas), conjuntos subcelulares, células o tejidos frente a los que se desea una producción o aumento de la inmunorreactividad en un sujeto. Frecuentemente, el término antígeno se refiere a un antígeno polipeptídico de interés. Sin embargo, antígeno, como se usa en la presente memoria, también se puede referir a un constructo recombinante que codifica un antígeno polipeptídico de interés (por ejemplo, un constructo de expresión). En algunos modos de realización preferidos, el antígeno puede ser, o se puede obtener a partir de, o puede presentar reactividad inmunológica cruzada con, un patógeno infeccioso y/o un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con una infección, cáncer, enfermedad autoinmune, alergia,

asma o cualquier otro estado en el que sería deseable o beneficioso la estimulación de una respuesta inmune específica frente al antígeno.

Preferentemente y en algunos modos de realización, las formulaciones de vacuna de la presente invención contienen un antígeno o composición antigénica capaz de producir una repuesta inmune frente a un patógeno humano o de otro mamífero, cuyo antígeno o composición antigénica puede incluir una composición obtenida a partir de un virus, tal como el VIH-1 (tal como tat, nef, gp120 o gp160), virus del herpes humano, tal como gD o sus derivados o una proteína inmediata temprana tal como la ICP27 del VHS1 o VHS2, citomegalovirus ((esp. Humana) (tal como gB o sus derivados), rotavirus (incluyendo virus vivos atenuados), virus de Epstein-Barr (tal como gp350 y sus derivados), virus de la varicela zóster (tal como gpI, II y IE63), o de un virus de la hepatitis como el virus de la hepatitis B (por ejemplo antígeno de superficie de la hepatitis B o uno de sus derivados), virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis C y virus de la hepatitis E, o de otros patógenos víricos, tal como paramixovirus: virus sincitial respiratorio (tal como las proteínas F y G o sus derivados), virus de parainfluenza, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano (por ejemplo, VPH6, 11, 16, 18, etc.), flavivirus (por ejemplo, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis vector-garrapata, virus de la encefalitis japonesa) o virus de la gripe (virus completamente vivos o inactivados, virus de la gripe fraccionado, cultivado en huevos o células MDCK, o virosomas de gripe completos (como ha sido descrito por Gluck, *Vaccine*, 1992, 10, 915-920) o sus proteínas purificadas o recombinantes, tales como las proteínas HA, NP, NA o M o sus combinaciones).

En algunos otros modos de realización preferidos, las formulaciones de vacuna de la presente invención contienen un antígeno o composición antigénica capaz de producir una respuesta inmune frente a un patógeno humano o de otro mamífero, cuyo antígeno o composición antigénica puede incluir una composición obtenida a partir de uno o más patógenos bacterianos, tales como *Neisseria spp.,* incluyendo *N. gonorrhea* y *N. meningitidis* (por ejemplo polisacáridos capsulares y sus conjugados, proteínas de enlace a la transferina, proteínas de enlace a la lactoferrina, PilC, adhesinas); *S. pyogenes* (por ejemplo, proteínas M o sus fragmentos, proteasa C5A, ácidos lipoteicoicos), *S. agalactiae, S. mutans: H. ducreyi*; *Moraxella spp.,* incluyendo *M. catarrhalis*, también denominada *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo, adhesinas e invasinas de alto y bajo peso molecular); *Bordetella spp.,* incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo pertactina, toxina pertussis o sus derivados, hemaglutinina filamentosa, ciclasa adenilato, fimbrias), *B. paraperfussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.,* incluyendo *M. tuberculosis* (por ejemplo ESAT6, antígeno 85-A, -B o –C), *M. bovis, M. leprae, M. avium, M. paratuberculosis, M. smegnatis*; *Legionella spp.,* incluyendo *L. pneumophila*; *Escherichia spp.,* incluyendo *E. coli* enterotóxica (por ejemplo, factores de colonización, toxina lábil frente al calor o sus derivados, toxina estable frente al calor o sus derivados), *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatogénica (por ejemplo toxina tipo Shiga o sus derivados); *Vibrio spp.,* incluyendo *V. cholera* (por ejemplo toxina del cólera y sus derivados); *Shigella spp.,* incluyendo *S. sonnei, S. dysenteriae, S. flexnerii*; *Yersinia spp.,* incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo, la proteína Yop), *Y. pestis, Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp.,* incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo, toxinas, adhesinas e invasinas) y *C. coli*; *Salmonella spp.,* incluyendo *S. typhi, S. paratyphi, S. choleraesuis, S. enteritidis*; *Listeria spp.,* incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp.*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo, ureasa, catalasa, toxina vacuolizante); *Pseudomonas spp.,* incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus, S. epiderimids*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis, E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetan* (por ejemplo, toxina del tétanos y sus derivados), *C. botulinum* (por ejemplo, toxina del botulínica y sus derivados), *C. difficile* (por ejemplos toxinas A o B del carbunco y sus derivados); *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo, toxina botulínica y sus derivados); *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphteriae* (por ejemplo, toxina de la difteria y sus derivados); *Borelia spp.*, incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo, OspA, OIPC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la *erlichiosis granulocítica* humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.* Incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo MOMP, proteínas de enlace a la heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo, MOMP, proteínas de enlace a la heparina), *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo las proteínas de membrana exterior raras), *T. denticola, T. hyodysenteriae*; u otros patógenos bacterianos.

En algunos otros modos de realización preferidos, las formulaciones de vacuna de la presente invención contienen un antígeno o composición antigénica capaz de producir una respuesta inmune frente a un patógeno humano o de otro mamífero, cuyo antígeno o composición antigénica puede incluir una composición obtenida a partir de uno o más parásitos (véase, por ejemplo, John, D. T. y Petri, W. A., *Markell and Voge's Medical Parasitology*, 9ª ed., 2006, WB Saunders, Filadelfia; Bowman, D. D., *Georgi's Parasitology for Veterinarians* - 8ª ed., 2002, WB Saunders, Filadelfia), tales como *Plasmodium spp.*, incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.*, incluyendo *T. gondii* (por ejemplo, SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba spp.*, incluyendo *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluyendo *B. microti*; *Trypanosoma spp.*, incluyendo *T. cruzi*; *Giardia spp.*, incluyendo *G. lamblia*; *Leshmania spp.*, incluyendo *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*; o a partir de helmintos capaces de infectar a un mamífero, tales como: (i) infecciones por nematodos (incluyendo, pero sin limitarse a ellos, *Enterobius vermicularis, Ascaris lumbricoides, Trichuris trichuria*, *Necator americanus, Ancylostoma duodenale, Wucheria bancrofti, Brugia malayi, Onchocerca volvulus, Dracanculus medinensis, Trichinella spiralis* y *Strongyloides stercoralis*; (ii) infecciones por trematodos (incluyendo, pero sin limitarse a ellos, *Schistosoma mansoni, Schistosoma haematobium, Schistosoma japonicum, Schistosoma mekongi, Opisthorchis sinensis, Paragonimus sp.*, *Fasciola hepatica, Fasciola magna, Fasciola gigantica*); y (iii) infecciones por cestodos (incluyendo, pero sin limitarse a ellos, *Taenia saginata* y *Taenia*

*solium*). Algunos modos de realización pueden por lo tanto considerar composiciones de vacuna que incluyen un antígeno obtenido a partir de *Schisostoma spp.*, *Schistosoma Manzoni, Schistosoma haematobium* y/o *Schistosoma japonicum*, u obtenido a partir de levaduras, tales como *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; y *Cryptococcus spp.*, incluyendo *C. neoformans*.

Otros antígenos específicos preferidos para *M. tuberculosis* son, por ejemplo, Th Ra12, Tb H9, Tb Ra 35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1 (WO 99/51748). Las proteínas para *M. tuberculosis* también incluyen proteínas de fusión y sus variantes, donde al menos dos, preferiblemente tres, polipéptidos de *M. tuberculosis* están fusionados en una proteína mayor. Las fusiones preferidas incluyen Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI (WO 99/151748).

Los antígenos más preferidos para *Chlamydia* incluyen, por ejemplo, las proteínas de elevado peso molecular (HWMP) (WO 99/17741), ORF3 (EP366412) y proteínas putativas de membrana (Pmps). Otros antígenos de *Chlamydia* de la formulación para vacuna se pueden elegir entre el grupo descrito en el documento WO 99/128475. Las vacunas bacterianas preferidas comprenden los antígenos obtenidos a partir de *Streptococcus spp.*, incluyendo *S. pneumoniae* (por ejemplo, polisacáridos capsulares y sus conjugados, PsaA, PspA, estreptolisina y proteínas de enlace a la colina) y el antígeno de proteína pneumolisina (*Biochem. Biophys. Acta*, 1989, 67, 1007); Rubins *et al., Microbial Pathogenesis*, 25, 337-342) y sus derivados mutantes destoxificados (WO 90/06951; WO 99/03884). Otras vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos obtenidos a partir de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenza* tipo B (por ejemplo PRP y sus conjugados), *H. influenza* no clasificable, por ejemplo OMP26, adhesinas de elevado peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbrina y péptidos derivados de la fimbrina (patente estadounidense Nº 5.843.464) o variantes de múltiples copias o sus proteínas de fusión.

Los derivados del antígeno de superficie de la hepatitis B son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, los antígenos PreS1 y Pars2 S descritos en las solicitudes de patente europea EP-A414374; EP-A-0304578 y EP198474.

En un aspecto preferido la formulación de vacuna de la invención comprende el antígeno del VIH-1, gp120, especialmente cuando se expresa en células CHO. En un modo de realización adicional, la formulación de vacuna de la invención comprende gD2t como se ha definido en la parte anterior de la presente memoria.

En un modo de realización preferido de la presente invención, las vacunas que contienen el adyuvante según las reivindicaciones comprenden un antígeno obtenido a partir del virus del papiloma humano (VPH) considerado responsable de las verrugas genitales (VPH 6 o VPH 11 y otros), y los VPH responsables del cáncer de cuello uterino (VPH 16, VPH 18 y otros). Formas particularmente preferidas de vacuna profiláctica o terapéutica contra las verrugas genitales comprenden partículas L1 o capsómeros y proteínas de fusión que comprenden uno o más antígenos elegidos entre las proteínas del VPH 6 y VPH 11, E6, E7, L1 y L2. Algunas formas preferidas de proteínas de fusión incluyen la L2E7 como se describe en el documento WO 96/26277 y la proteína D(1/3)-E7 descrita en el documento GB 9717953.5 (PCT/EP98/05285). Una composición para la profilaxis o vacuna terapéutica preferida frente a la infección o cáncer cervical por VPH puede comprender antígenos del VPH 16 o VPH 18. Por ejemplo, los monómeros del antígeno L1 o L2, o los antígenos L1 o L2 presentados juntos como una partícula similar a virus (abreviado generalmente como VLP por sus iniciales en inglés: virus like particle) o la proteína L1 sola presentada sola en una VLP o estructura de capsómero. Dichos antígenos, partículas similares a virus y capsómeros son conocidos *per se*. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 94/00152, WO 94/20137, WO 94/05792 y WO 93/02184.

Proteínas tempranas adicionales se pueden incluir solas o como proteínas de fusión, tales como E7, E2 o preferiblemente F5, por ejemplo; los modos de realización preferidos incluyen una VLP que comprende proteínas de fusión L1E7 (WO 96/11272). Los antígenos del VPH 16 particularmente preferidos comprenden las proteínas tempranas E6 o F7 en fusión con un portador de proteína D para formar fusiones proteína D-E6 o E7 a partir del VPH 16, o sus combinaciones; o combinaciones de E6 o E7 con L2 (WO 96/26277). Alternativamente, las proteínas tempranas E6 o E7 del VPH 16 o VPH 18 se pueden presentar en una sola molécula, preferiblemente en una fusión proteína D-E6/E7. Dicha vacuna puede contener opcionalmente cualquiera de las proteínas E6 y E7 del VPH 18 o ambas, preferiblemente en forma de una proteína de fusión proteína D-E6 o proteína D-E7 o una proteína de fusión proteína D-E6/E7. La vacuna de la presente invención puede comprender adicionalmente antígenos de otras cepas de VPH, preferiblemente de las cepas VPH 31 ó 33.

Las vacunas de la presente invención pueden comprender adicionalmente antígenos de los parásitos que producen la malaria. Por ejemplo, los antígenos preferidos de *Plamodia falciparum* incluyen el RTS, S y TRAP. El RTS es una proteína híbrida que comprende esencialmente toda la parte C-terminal de la proteína del circumesporozoito (CS) de *P. falciparum* unida, mediante cuatro aminoácidos de la porción preS2 del antígeno de superficie de la hepatitis B, al antígeno de superficie (S) de la hepatitis B. Su estructura completa se describe en la solicitud de patente internacional Nº PCT/EP 92/02591, publicada como WO 93/10152 y que reivindica la prioridad de la solicitud de patente británica Nº GB 9124390.7. Cuando se expresa en hongos, la RTS se produce como una partícula de lipoproteína y cuando es co-expresada con el antígeno S del VHB produce una partícula mixta denominada RTS,S.

Los antígenos TRAP se describen en la solicitud de patente internacional Nº PCT/GB89/00895 publicada como WO 90/01496. Un modo de realización de la presente invención es una vacuna contra la malaria en la que la preparación

antigénica comprende una combinación de los antígenos RTS,S y TRAP. Otros antígenos de plasmodia que son probables candidatos a ser componentes de una vacuna contra la malaria en varias etapas son los MSP1, AMA,1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, secuestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27125, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 de *P. falciparum* y sus análogos en *Plasmodium spp.*

Consecuentemente, algunos de los modos de realización descritos en la presente memoria consideran un antígeno que se obtiene a partir de al menos un patógeno infeccioso, tal como una bacteria, un virus o un hongo, incluyendo una actinobacteria, tal como *M. tuberculosis* o *M. leprae* u otra micobacteria; una bacteria tal como un miembro de los géneros *Salmonella, Neisseria, Borrelia, Chlamydia* o *Bordetella*; un virus, tal como un virus del herpes simple, un virus de inmunodeficiencia humana (VIH), un virus de inmunodeficiencia felina (VIF), citomegalovirus, virus de varicela zóster, virus de la hepatitis, virus de Epstein Barr (VEB), virus sinsicial respiratorio, virus del papiloma humano (VPH) y un citomegalovirus; un VIH, tal como VIH-1 o VIH-2; un hongo, tal como *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Coccidioides* y *Pneumocystis,* o una levadura incluyendo la especie *Candida*, tal como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae, C. tripicalis* y *C. parpasilosis*; un parásito, tal como un protozoo por ejemplo de la especie *Plasmodium*, incluyendo *P. falciparum, P. vivax, P. malariae* y *P. ovale*; u otro parásito, tal como uno o más entre *Acanthamoeba, Entamoeba hisolytica, Angiostrongylus, Schistosoma Mansonii, Schistosoma haematobium, Schistosoma japonicum, Cryptosporidium, Ancylostoma, Entamoeba histolytica, Entamoeba coli, Entamoeba dispar, Entamoeba hartmanni, Entamoeba polecki, Wuchereria bancrofti, Giardia* y *Leishmania.*

Por ejemplo, en los modos de realización de la vacuna que contiene GLA y que contiene antígenos obtenidos a partir de *Borrelia sp.*, los antígenos pueden incluir un ácido nucleico, antígeno o preparaciones antigénicas obtenidas a partir de un patógeno, proteínas o péptidos producidos de forma recombinante, y proteínas híbridas de fusión. Uno de dichos antígenos es el OspA. El OspA puede ser una proteína madura completa en forma lipidada por medio de su biosíntesis en una célula huésped (Lipo-OspA) o alternativamente puede ser un derivado no lipidada. Dichos derivados no lipidados incluyen la proteína de fusión NS1-OspA no lipidada que tiene los primeros 81 aminoácidos N-terminales de la proteína no estructural (NS1) del virus de la gripe, y la proteína OspA completa, y otra MDP-OspA es una forma no lipidada de la OspA que lleva 3 aminoácidos N-terminales adicionales.

En la técnica se conocen composiciones y los métodos para identificar sujetos que tienen, o que se sospecha que están en riesgo de tener, una infección con un patógeno infeccioso como se ha descrito en la presente memoria.

Por ejemplo, la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* produce la tuberculosis (TB). La bacteria generalmente ataca a los pulmones, pero también puede atacar al riñón, la espina dorsal y el cerebro. Si no se trata de una forma adecuada, la enfermedad TB puede ser mortal. La enfermedad se extiende de una persona a otra por el aire cuando una persona infectada estornuda o tose. En 2003, se registraron más de 14.000 casos de TB en Estados Unidos.

Aunque la tuberculosis generalmente puede ser controlada usando terapia antibiótica prolongada, dicho tratamiento no es suficiente para prevenir la propagación de la enfermedad, por lo que existe preocupación con respecto a la elección potencial de cepas resistentes a los antibióticos. Los individuos infectados pueden ser asintomáticos pero contagiosos durante un tiempo. Además, aunque el cumplimiento del régimen de tratamiento es crítico, el comportamiento del paciente es difícil de controlar. Algunos pacientes no completan el tratamiento, lo que lleva a que el tratamiento no sea eficaz y al desarrollo de resistencia al fármaco (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 7.087.713).

En la actualidad, la vacunación con bacterias vivas es el método más eficaz para inducir inmunidad protectora frente a la tuberculosis. La micobacteria empleada más comúnmente con este objetivo es el bacilo de Calmette-Guerin (BCG), una cepa no virulenta de *Mycobacterium bovis*. Sin embargo, la seguridad y eficacia del BCG es una fuente de discusión y en algunos países, como en Estados Unidos, no se vacuna al público en general. El diagnóstico se obtiene generalmente usando un ensayo dermatológico que implica la exposición intradérmica a la tuberculina DPP (derivado de la proteína purificada). Las respuestas de las células T específicas frente al antígeno, producen una induración medible en el lugar de la inyección durante las 48-72 horas después de la inyección, lo que indica que ha habido exposición a los antígenos de la micobacteria. Sin embargo, la sensibilidad y la especificidad han sido un problema con este análisis, ya que los individuos vacunados con el BCG no pueden ser distinguidos de los individuos enfermos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 7.087.713).

Aunque se ha demostrado que los macrófagos actúan como los principales efectores de la inmunidad frente a *M. tuberculosis*, las células T son los inductores predominantes de dicha inmunidad. El papel esencial de las células T en la protección frente a la infección por *M. tuberculosis* se muestra por la frecuente incidencia de la *M. tuberculosis* en pacientes con SIDA, debido a la disminución de las células T CD4 asociadas con la infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Se ha demostrado que las células T CD4 reactivas a las micobacterias son unas potentes productoras de interferón gamma (IFN-gamma) lo que, a su vez, se ha demostrado que provoca efectos anti-micobacterias de los macrófagos en ratones. Aunque el papel del IFN-gamma en los humanos es menos claro, algunos estudios han demostrado que la 1,25-dihidroxi vitamina D, tanto sola como combinada con el IFN-gamma o el factor de necrosis tumoral-alfa, activa a los macrófagos humanos para que inhiban la infección por *M. tuberculosis*. Además, se sabe que el IFN-gamma estimula a los macrófagos humanos para que elaboren la 1,25-dihidroxi-vitamina D3. De forma similar, se ha demostrado que el IL-12 tiene un papel en la estimulación de la resistencia a la infección por *M.*

*tuberculosis*. Para una revisión de la inmunología de la infección por *M. tuberculosis*, véase Chan y Kaufmann en *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*, Ed. Bloom, ASM Press. Washington D.C. (1994).

Los compuestos y métodos existentes para el diagnóstico de la tuberculosis o para inducir inmunidad protectora frente a la tuberculosis incluyen la utilización de uno o más polipéptidos que contienen al menos una parte inmunogénica de una o más proteínas de micobacterias y de moléculas de ADN que codifican dichos polipéptidos. Se pueden usar kits de diagnóstico que contienen dichos polipéptidos o secuencias de ADN y un reactivo de detección adecuado para la detección de la infección por micobacterias en pacientes y en muestras biológicas. Además, dichos compuestos pueden formularse en vacunas y/o en composiciones farmacéuticas para la inmunización frente a la infección por micobacterias (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses 6.949.246 y 6.555.653).

La malaria se eliminó en muchas partes del mundo en la década de 1960, pero la enfermedad todavía persiste y hay nuevas cepas emergentes de la enfermedad que son resistentes a los fármacos existentes. La malaria es un problema de salud pública importante en más de 90 países. Nueve de cada diez casos de malaria se producen en el África Subsahariana. Más de la tercera parte de la población está en riesgo, y cada año se infectan de malaria entre 350 y 500 millones de personas. Cuarenta y cinco millones de mujeres embarazadas están en riesgo de contraer la malaria este año. Entre los individuos ya infectados, más de 1 millón de los infectados mueren cada año debido a una enfermedad que es posible prevenir. La mayoría de estas muertes se producen en niños en África.

La malaria se transmite generalmente cuando una persona es picada por un mosquito anófeles hembra infectado. Para transmitirla, el mosquito debe haber sido infectado por haber extraído sangre de una persona infectada con malaria. La malaria es producida por un parásito y los síntomas clínicos de la enfermedad incluyen fiebre y síntomas similares a los de la gripe, tales como escalofríos, dolor de cabeza, dolor muscular y cansancio. Estos síntomas pueden ir acompañados de nauseas, vómitos y diarrea. La malaria también puede producir anemia e ictericia debido a la pérdida de glóbulos rojos. La infección con un tipo de malaria, *Plasmodium falciparum*, si no se trata con celeridad, puede producir fallo renal, convulsiones, confusión mental, coma y la muerte.

Se conoce un método *in vitro* para el diagnóstico de la malaria en un individuo que comprende poner en contacto un tejido o un fluido biológico tomado de un individuo con una molécula o una composición polipeptídica, en la que dicha molécula o composición polipeptídica comprende una o más secuencias peptídicas que llevan todo o una parte de uno o más epítopes T de las proteínas que se producen a partir de la actividad infecciosa de la *P. falciparum*, en condiciones que permiten que se produzca una reacción inmunológica *in vitro* entre dicha composición y los anticuerpos que pueden estar presentes en el tejido o el fluido biológico y la detección *in vitro* de los complejos antígeno-anticuerpo formados (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 7.087.231).

Se ha descrito la expresión y purificación de un ectodominio AMA-1 de *Plasmodium falciparum* (3D7) recombinante. Los métodos anteriores han producido una proteína altamente purificada que mantiene el plegado y los puentes de disulfuro de la molécula original. El AMA-1 recombinante es útil como reactivo de diagnóstico así como para la producción de anticuerpos, y como proteína para ser usada sola, o como parte de una vacuna para evitar la malaria (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 7.029.685).

En la técnica se han descrito polinucleótidos que codifican antígenos del péptido de malaria *P. vivax* específicos para la especie que son proteínas o fragmentos de proteínas secretadas en el plasma de un mamífero huésped susceptible después de la infección, ya que tienen anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos frente a estos antígenos. Los antígenos peptídicos, anticuerpos monoclonales y/o anticuerpos policlonales se utilizan en los análisis usados para diagnosticar la malaria, así como para determinar si el *Plasmodium vivax* es la especie responsable de la infección (patente estadounidense 6.706.872). También se ha informado de que los antígenos del péptido de malaria *P. vivax* específicos de la especie son proteínas o fragmentos de proteínas segregados en el plasma de un mamífero huésped susceptible después de la infección, ya que tienen anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos frente a estos antígenos. Los antígenos peptídicos, anticuerpos monoclonales y/o anticuerpos policlonales se utilizan en los análisis usados para diagnosticar la malaria, así como para determinar si el *Plasmodium vivax* es la especie responsable de la infección (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 6.231.861).

Un ectodominio AMA-1 de *Plasmodium falciparum* (3D7) recombinante también ha sido expresado mediante un método que produce una proteína altamente purificada que mantiene el plegado y los puentes de disulfuro de la molécula original. El AMA-1 recombinante es útil como reactivo de diagnóstico, para su uso en la producción de anticuerpos, y como vacuna (patente estadounidense 7.060.276). De forma similar, se conocen la expresión y la purificación de una MSP-$1_{42}$ de *Plasmodium falciparum* (3D7) recombinante que mantiene el plegado y los puentes de disulfuro de la molécula original. El MSP-$1_{42}$ recombinante es útil como reactivo de diagnóstico, para su uso en la producción de anticuerpos, y como vacuna (patente estadounidense 6.855.322).

Los métodos de diagnóstico para la detección de infecciones por malaria humana para identificar un sujeto que tiene o que se sospecha que está en riesgo de tener una infección con un patógeno infeccioso de malaria son los conocidos según estas memorias descriptivas y otras relacionadas. Específicamente, por ejemplo, las muestras de sangre se combinan con un reactivo que contiene el dinucleótido 2-acetilpiridina-adenina (APAD), un sustrato (por ejemplo, una sal de lactato o ácido láctico) y un tampón. El reactivo se diseña para detectar la presencia de una enzima glicolítica

única producida por el parásito de la malaria. La enzima se conoce como deshidrogenasa del ácido láctico del parásito (PLDH). La PLDH es fácilmente distinguible de la LDH del huésped usando el reactivo descrito anteriormente. La combinación del reactivo con una muestra de sangre parasitada produce la reducción del APAD. Sin embargo, el APAD no es reducido por la LDH del huésped. El APAD reducido puede ser detectado a continuación por varias técnicas, incluyendo análisis espectral, fluorimétrico, electroforético o colorimétrico. La detección del APAD reducido de la forma precedente proporciona una indicación positiva de infección por malaria (por ejemplo, véase la patente estadounidense 5.124.141). En otra metodología para el diagnóstico de la malaria, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos característica obtenida a partir del antígeno GLURP de *Plasmodium falciparum*, es reconocido en una muestra de ensayo mediante un anticuerpo específico cultivado frente a, o reactivo con, el polipéptido (patente estadounidense 5.231.168).

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria extendida con epidemias frecuentes en el subcontinente indio, África y América Latina y el desarrollo de una vacuna es una prioridad de la Organización Mundial de la Salud. Un complejo de diferentes enfermedades, los parásitos de leishmania producen infecciones gravísimas de los órganos internos, así como enfermedades dermatológicas graves. Una de las formas más devastadoras de la leishmaniasis es una infección que desfigura la nariz y la boca. El número de casos de leishmaniasis está en aumento y en la actualidad está fuera de control de muchas áreas. La leishmaniasis también está en aumento en algunos países desarrollados, específicamente en el Sur de Europa, como resultado de la infección por VIH. Los fármacos disponibles son tóxicos, caros y requieren inyecciones diarias durante un largo periodo de tiempo.

Los leishmania son parásitos protozoos que habitan en los macrófagos o en los glóbulos blancos sanguíneos del sistema inmune. Los parásitos se transmiten por la mordedura de pequeños insectos chupadores de sangre (simúlidos) que son difíciles de controlar ya que habitan en amplias áreas del planeta.

La leishmaniasis visceral es la más peligrosa de las tres manifestaciones de la enfermedad. Se calcula que se producen aproximadamente 500.000 nuevos casos de la forma visceral (kala-azar o “la enfermedad asesina”) cada año. En la actualidad hay más de 200 millones de personas en riesgo de contraer la leishmaniasis visceral. Más de 90 por ciento de los casos de leishmaniasis visceral se producen en la India, Bangladesh, Sudán, Brasil y Nepal. La mayoría de las muertes se producen en niños. Los que padecen la forma cutánea, a menudo quedan desfigurados de forma permanente.

Las infecciones por leishmania son difíciles de diagnosticar y típicamente implican el análisis de especímenes de biopsia de tejidos. Sin embargo, se han desarrollado varios ensayos diagnósticos serológicos e inmunológicos. (patente estadounidense 7.008.774; Senaldi *et al.* (1996) *J. Immunol. Methods* 193: 9 5; Zijlstra *et al.* (1997) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91: 671 673; Badaro *et al.* (1996) *J. Inf. Dis.* 173: 758 761; Choudhary, S. *et al.* (1992) *J. Comm. Dis.* 24: 32 36; Badaro R. *et al.* (1986) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 72 78; Choudhary, A. *et al.* (1990) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84: 363 366; y Reed, S. G. *et al.* (1990) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43: 632 639). Los promastigotes liberan productos metabólicos en el medio de cultivo para producir un medio condicionado. Estos productos metabólicos son inmunogénicos para el huésped. Véanse los documentos: Schnur, L. F. *et al.* (1972) *Isrl. J. Med. Sci.* 8: 932 942; Sergeiev, V. P. *et al.* (1969) *Med. Parasitol.* 38: 208 212; El-On, J. *et al.* (1979) *Exper. Parasitol.* 47: 254 269; y Bray, R. S. *et al.* (1966) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60: 605 609; patente estadounidense Nº 6.846.648; patente estadounidense Nº 5.912.166; patente estadounidense Nº 5.912.263; y patente estadounidense Nº 5.411.865).

Aproximadamente 40 millones de personas alrededor del mundo están infectadas con VIH, el virus que produce el SIDA. Aproximadamente 3 millones de personas mueren debido a la enfermedad cada año, 95 por ciento de ellos en el mundo en desarrollo. Cada año, cerca de 5 millones de personas se infectan con el VIH. En la actualidad, los países de África Subsahariana soportan la mayor carga de la enfermedad, pero se está expandiendo rápidamente a otros países, tales como India, China o Rusia. La epidemia está creciendo más rápidamente entre las poblaciones minoritarias. En Estados Unidos ha habido más de 950.000 casos declarados de SIDA. El SIDA golpea a la gente durante sus años más productivos. Las mujeres, por razones tanto biológicas como sociales, presentan un riesgo aumentado de VIH/SIDA.

El SIDA está producido por el virus de inmunodeficiencia humano (VIH) que mata y daña a las células del sistema inmune corporal y destruye progresivamente la capacidad del cuerpo para luchar contra las infecciones y algunos cánceres. El VIH se extiende más comúnmente por practicar sexo sin protección con una persona infectada. La mejor solución para el problema es prevenir la extensión del virus. Elaborar una vacuna contra el VIH segura, eficaz y asequible es una manera de alcanzar este objetivo. En todo el mundo, solo una de cada cinco personas en riesgo elevado de padecer infección por VIH tiene acceso a una protección eficaz.

Se conocen métodos para diagnosticar la infección por VIH, incluyendo el cultivo del virus, PCR o secuencias de ácido nucleicos definitivas de los especímenes de los pacientes, y análisis de anticuerpos para detectar la presencia de anticuerpos anti-VIH en el suero de los pacientes (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nº 6.979.535, 6.544.728, 6.316.183, 6.261.762 y 4,743.540).

Según algunos otros modos de realización como se ha descrito en la presente memoria, las composiciones de vacuna y las formulaciones y métodos de uso relacionados pueden incluir un antígeno que se deriva de una célula cancerosa, ya que puede ser útil para el tratamiento inmunoterapéutico de cánceres. Por ejemplo, la formulación de adyuvante puede encontrar utilidad con antígenos de rechazo tumoral, tales como los de los cánceres de próstata, mama, colorrectal, pulmón, pancreático, renal o melanoma. Los ejemplos de cánceres o antígenos derivados de células cancerosas incluyen MAGE 1,3 y MAGE 4 u otros antígenos MAGE tales como los descritos en el documento WO 99/40188, PRAME, BAGE, Lage (también denominado NY Eos 1), SAGE y HAGE (WO 99/53061) o GAGE (Robbins y Kawakami, 1996, *Current Opinions in Immunology* 8, págs. 628-636; Van den Eynde *et al.*, *International Journal of Clinical & Laboratory Research* (1997 y 1998); Correale *et al.* (1997) *Journal of the National Cancer Institute* 89, pág. 293. Estos ejemplos no limitantes de antígenos de cáncer se expresan en una amplia gama de tipos de tumor, tales como el melanoma, el carcinoma de pulmón, el sarcoma y el carcinoma de vejiga. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense Nº 6.544.518.

Otros antígenos específicos de tumor son adecuados para ser usados con el GLA según algunos de los modos de realización descritos en la presente memoria incluyen, pero sin estar limitados a ellos, gangliósidos específicos de tumor o asociados a un tumor, tales como $GM_2$ y $GM_3$ o sus conjugados con proteínas portadoras; o un antígeno para usarlo en una composición de vacuna con GLA para producir o aumentar una respuesta autoinmune anti-cáncer puede ser una hormona autopeptídica, tal como la hormona liberadora de la hormona gonadotropina completa (GnRH, WO 95/20600), un péptido corto de 10 aminoácidos, útil en el tratamiento de muchos cánceres. En otro modo de realización, se usan antígenos de próstata, tales como el antígeno específico de próstata (PSA), PAP, PSCA (por ejemplo, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95 (4) 1735-1740, 1998); PSMA o, en un modo de realización preferido un antígeno conocido como prostasa (por ejemplo, Nelson *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999), 96, 3114-3119; WO 98/12302; la patente estadounidense Nº 5.955.306; WO 98/20117; patente estadounidense Nº 5.840.871 y 5.786.148; y WO 00/04149. Otros antígenos específicos de próstata se describen en los documentos WO 98/137418 y WO/004149. Otro es el STEAP (*PNAS* 96 14523 14528 7-12 1999).

Otros antígenos asociados a tumores útiles en el contexto de la presente invención incluyen: Plu-1 (*J. Biol. Chem.* 274 (22) 15633-15645, 1999), HASH-1, HasH-2, Cripto (Salomon *et al. Bioassays* 199, 21: 61-70; patente estadounidense Nº 5,654.140) y Criptin (patente estadounidense Nº 5.981.215). Adicionalmente, los antígenos particularmente relevantes para vacunas en la terapia del cáncer también comprenden la tirosinasa y la survivina.

Los modos de realización descritos en la presente memoria que se refieren a composiciones de vacuna que contienen GLA que comprenden un antígeno del cáncer serán útiles frente a cualquier cáncer caracterizado por la expresión de un antígeno asociado al tumor, tal como la expresión del HER-2/neu o de otros antígenos específicos del cáncer o asociados al cáncer.

La diagnosis del cáncer en un sujeto que tiene o se sospecha que está en riesgo de tener cáncer se puede realizar por cualquiera entre una amplia gama de metodologías aceptadas en la técnica, que pueden variar dependiendo de varios factores que incluyen la presentación clínica, el grado de progresión del cáncer, el tipo de cáncer y otros factores. Los ejemplos de diagnosis del cáncer incluyen examen histopatológico, histocitoquímico, inmunohistocitoquímico y inmunohistopatológico de las muestras del paciente (por ejemplo, sangre, piel, biopsia, biopsia distinta de la de tejidos, especímenes quirúrgicos, etc.), los análisis por PCR para marcadores genéticos definidos (por ejemplo, ácido nucleico), análisis serológicos de antígenos asociados con cánceres circulantes o células que llevan dichos antígenos, o de anticuerpos de especificidad definida, u otras metodologías con las que los expertos en la técnica están familiarizados. Véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nº 6.734.172; 6.770.445; 6.893.820; 6.979.730; 7.060.802; 7.030.232; 6.933.123; 6.682.901; 6.587.792; 6.512.102; 7.078.180; 7.070.931; JP5-328975; Waslylyk *et al.*, 1993 *Eur. J. Bioch.* 211 (7) 18.

Las composiciones de vacuna y los métodos según algunos modos de realización de la presente invención también se pueden usar para la profilaxis o la terapia de enfermedades autoinmunes, que incluyen enfermedades, estados o trastornos en los que el sistema inmune del huésped o el sujeto media de forma perjudicial una respuesta inmune que esta dirigida contra los propios tejidos, células, biomoléculas (por ejemplo, péptidos, polipéptidos, proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, proteolípidos, lípidos, glicolípidos, ácidos nucleicos tales como ARN y ADN, oligosacáridos, polisacáridos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos o similares, y otros componentes moleculares de las células y tejidos expuestos) o epítopes (por ejemplo, estructuras de reconocimiento específicas definidas inmunológicamente, tales como las reconocidas por una región determinante de la complementaridad (CDR) de una región variable del anticuerpo o una CDR del receptor celular T.

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por lo tanto por una respuesta inmune anormal que implica bien a células o bien a anticuerpos que se dirigen en cualquier caso frente a tejidos autólogos normales. Las enfermedades autoinmunes en mamíferos pueden clasificarse de forma general en una de dos categorías diferentes: enfermedad mediada por células (por ejemplo, células T) o trastornos mediados por anticuerpos. Los ejemplos no limitantes de enfermedades autoinmunes mediadas por células incluyen esclerosis múltiple, artritis reumatoide, tiroiditis de Hashimoto, diabetes mellitus de tipo I (diabetes de inicio juvenil) y uvoretinitis autoinmune. Los trastornos autoinmunes mediados por anticuerpos incluyen, pero sin limitarse a ellos, miastenia gravis, lupus sistémico eritematoso (o SLE), enfermedad de Grave, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, asma autoinmune,

crioglobulinemia, púrpura trombocitopénica, esclerosis biliar primaria y anemia perniciosa. El (los) antígeno(s) asociado(s) con: el lupus sistémico eritematoso son las proteínas de ácido ribonucleico nuclear pequeño (snRNP); la enfermedad de Grave es el receptor de tirotropina, tiroglobulina y otros componentes de las células epiteliales del tiroides (Akamizu *et al.*, 1996; Kellerman *et al.*, 1995; Raju *et al.*, 1997, y Texier *et al., 1992*); el pénfigo son antígenos del pénfigo similares a caderina, tales como desmogleina 3 y otras moléculas de adhesión (Memar *et al.*,1996; Stanley, 1995; Plott *et al.* 1994; y Hashimoto, 1993); y la púrpura trombocitopénica trómbica son las plaquetas. (Véase la patente estadounidense 6.929.796; Gorski *et al.* (eds) *Autoimmunity*, 2001, Kluwer Academic Publisher, Norwell, MA; Radbruch y Lipsky, P. E. (eds) *Current Concepts in Autoimmunity and Chronic Inflammation* (*Curr. Top. Microbiol. and Immunol.*) 2001, Springer, NY).

La autoinmunidad tiene un papel en más de 80 enfermedades diferentes, incluyendo la diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, lupus, artritis reumatoide, escleroderma y enfermedades del tiroides. Faltan estimaciones cuantitativas rotundas de la morbilidad para la mayoría de las enfermedades autoinmunes. Los estudios más recientes hechos al final de la década de 1990 revelan que las enfermedades autoinmunes son la tercera enfermedad más común en Estados Unidos; y las enfermedades más comunes afectan a más de 8,5 millones de estadounidenses. Las estimaciones actuales sobre la prevalencia de la enfermedad varían de 5 a 8 por ciento de la población de Estados Unidos. La mayoría de las enfermedades autoinmunes afectan desproporcionadamente a las mujeres. Las mujeres tienen 2,7 veces más probabilidad de adquirir una enfermedad autoinmune. Las mujeres son más susceptibles de padecer una enfermedad autoinmune; los hombres tienen mayores niveles de actividad de las células asesinas naturales que las mujeres. (Jacobsen *et al*., *Clinical Immunology and Immunopathology*, 84: 223-243, 1997).

Las enfermedades autoinmunes se producen cuando el sistema inmune confunde los tejidos propios como no propios y lanza un ataque inapropiado. El cuerpo puede verse afectado de diferentes formas por las enfermedades autoinmunes, incluyendo, por ejemplo, el intestino (enfermedad de Crohn) y el cerebro (esclerosis múltiple). Se sabe que un autoanticuerpo ataca células propias o tejidos propios para dañar su función y como resultado produce enfermedades autoinmunes, y que el autoanticuerpo puede ser detectado en el suero de los pacientes antes de la existencia real de la enfermedad autoinmune (por ejemplo, aparición de signos y síntomas clínicos). La detección de un autoanticuerpo permite, por lo tanto, el descubrimiento o el reconocimiento temprano de la presencia o el riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune. En base a estos descubrimientos, se han descubierto varios autoanticuerpos frente a autoantígenos y los autoanticuerpos frente a autoantígenos han sido medidos en ensayos clínicos (por ejemplo, patente estadounidense 6.919.210, 6.596.501, 7.012.134 y 6.919.078), mientras que otros diagnósticos autoinmunes pueden implicar la detección de un metabolito relacionado (por ejemplo, la patente estadounidense 4.659.659) o la reactividad inmunológica (por ejemplo, las patentes estadounidenses Nº 4,614.722 y 5.147.785, 4,420.558, 5.298.396, 5.162.990, 4.420.461, 4.595.654, 5,846.758 y 6.660.487).

En algunos modos de realización, las composiciones según la invención serán particularmente aplicables en el tratamiento de pacientes ancianos y/o inmunodeprimidos, incluyendo sujetos en diálisis renal, sujetos en quimioterapia y/o radioterapia, receptores de transplante y similares. Generalmente dichos individuos presentan respuestas inmunes a las vacunas disminuidas y, por lo tanto, el uso de las composiciones de la invención puede aumentar las respuestas inmunes obtenidas en estos sujetos.

En otros modos de realización, el antígeno o antígenos usados en las composiciones de la invención incluyen antígenos asociados con enfermedades respiratorias, tales como las producidas o agravadas por la infección bacterial (por ejemplo, por neumococos), para la profilaxis y la terapia de estados tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). La COPD se define fisiológicamente por la presencia de obstrucción de las vías aéreas irreversible o parcialmente reversible en pacientes con bronquitis crónica y/o enfisema (*Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995, Nov; 152 (5 Pt 2): S77-121). El agravamiento de la COPD está causado a menudo por infección bacteriana (por ejemplo, por neumococos) (*Clin. Microbiol. Rev.* 2001 Abril; 14 (2): 236-63.

TLR

Como se describe en la presente memoria, algunos modos de realización de la presente invención se refieren a composiciones de vacuna y composiciones de adyuvante inmunológico, incluyendo composiciones farmacéuticas, que incluyen uno o más agonistas de receptor tipo *toll* (agonista del TLR). Los receptores tipo *toll* (TLR) incluyen receptores transmembranales de superficie celular del sistema inmune innato que confieren capacidad de reconocimiento en fase temprana a las células huésped para varias estructuras moleculares microbianas conservadas, tales como las que están presentes en una gran variedad de agentes patógenos (por ejemplo, Armant *et al.*, 2002, *Genome Biol.* 3 (8): revisiones 3011.1-3011.6; Fearon *et al.*, 1996 *Science* 272: 50; Medzhitov *et al.* 1997 *Curr. Opin. Immunol.* 9: 4; Luster 2002, *Current Opin. Immunol.* 14: 129; Lien *et al.* 2003 *Nat. Immunol.* 4: 1162; Medzhitov 2001 *Nat. Rev. Immunol.* 1: 135, Takeda *et al.* 2003 *Ann. Rev Immunol.* 21: 335; Takeda *et al.* 2005 *Int. Immunol.* 17: 1; Kaisho *et al.* 2004 *Microbe Infect.* 6: 1388; Datta *et al.* 2003 *J. Immunol.* 170: 4102).

La inducción de transducción de señal mediada por TLR para potenciar la iniciación de respuestas inmunes a través del sistema inmune innato puede ser realizada por agonistas del TLR, en los que participan los TLR de superficie celular. Por ejemplo, los lipopolisacáridos (LPS) pueden ser agonistas del TLR a través del TLR2 o TLR4 (Tsan *et al.* 2004 *J. Leuk. Biol.* 76: 514; Tsan *et al.* 2004 *Am. J. Physiol. Cell Phsiol.* 286: C739; Lin *et al.* 2005 Shock 24: 206); la

poli(inosina-citidina) (polil:C) puede ser un agonista del TLR a través del TLR3 (Salem *et al.* 2006 *Vaccine* 24: 5119); las secuencias de CpG (oligodesoxinucleótidos que contienen citosina-guanosina no metilada o restos de dinucleótido "CpG", por ejemplo, CpG 7909, Cooper *et al.* 2005, *AIDS* 19: 1473; CpG 10101 Bayes *et al. Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 27: 193;Vollmer *et al. Expert Opinion on Biological Therapy* 5: 673; Vollmer *et al.* 2004 *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 2314; Deng *et al.* 2004 *J. Immunol.* 173: 5148) pueden ser agonistas del TLR a través del TLR9 (Andaloussi *et al.* 2006 *Glia* 54: 526; Chen *et al.* 2006 *J. Immunol.*, 177: 2373); Los peptidoglicanos pueden ser agonistas del TLR2 y/o del TLR6 (Soboll *et al.*, *Biol. Reprod.* 75: 131; Nakao *et al.* 2005 *J. Immunol.* 174: 1566); 3M003 (4-amino-2-(etoximetil)-□□□-dimetil-6,7,8,9-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-c]-quinolin-1-etanol hidrato, peso molecular 318 Da, de 3M Pharmaceuticals, St Paul, MN, que también es una fuente de los compuestos relacionados 3M001 y 3M002; Gorden *et al.* 2005 *J. Immunol.* 174: 1259) puede ser un agonista del TLR7 (Johansen 2005 *Clin. Exp. Allerg.* 35: 1591) y/o un agonista del TLR8 (Johansen 2005); la flagelina puede ser un agonista del TLR5 (Feuillet *et al.*, 2006 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103: 12487); y los antígenos de la hepatitis C pueden actuar como agonistas a través del TLR7 y/o TLR9 (Lee *et al.* 2006 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 1828; Horsmans *et al.* 2005 *Hepatol.* 42: 724). Se conocen otros agonistas del TLR (por ejemplo, Schirmbeck *et al.* 2003 *J. Immunol.* 171: 5198) y pueden ser utilizados según algunos de los modos de realización descritos en la presente memoria.

Por ejemplo, y como antecedentes (véase, por ejemplo, la patente estadounidense Nº 6.544.518) se sabe que los oligonucleótidos inmunoestimuladores que contienen dinucleótidos CpG no metilados ("CpG") son adyuvantes cuando se administran tanto por vía sistémica como por vía mucosa (WO 96/02555; EP0468520; Davis *et al. J. Immunol.* 1998 160 (2): 870-876; McCluskie y Davis, *J. Immunol.* 1998 161 (9): 4463-6). CpG es una abreviatura para los restos de dinucleótido de citosina-guanosina presentes en el ADN. El papel central del resto CG en la inmunoestimulación fue explicado por Krieg, *Nature* 374, pág. 546, 1995. Un análisis detallado ha mostrado que el resto CG debe estar en cierto contexto de secuencia y que dichas secuencias son comunes en el ADN de las bacterias, pero son raras en el ADN de los vertebrados. La secuencia inmunoestimuladora es a menudo: Purina, Purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en la que el resto CG no está metilado, pero se conocen otras secuencias CpG no metiladas que son inmunoestimuladoras y que pueden ser usadas en algunos modos de realización de la presente invención. Cuando el CpG se formula en vacunas, puede ser administrado en una solución libre junto con antígeno libre (WO 96/02555; McCluskie y Davis, *supra*) o conjugado covalentemente con un antígeno (publicación PCT Nº WO 98/16247) o formulado con un vehículo, tal como hidróxido de aluminio (por ejemplo, Davis *et al. supra*, Brazolot-Millan *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95 (26) 15553-8).

Los oligonucleótidos preferidos para usarlos en adyuvantes o vacunas de la presente invención contienen preferentemente dos o más restos de dinucleótido CpG separados por al menos tres, más preferentemente al menos seis o más, nucleótidos. Los oligonucleótidos de la presente invención son típicamente desoxinucleótidos. En un modo de realización preferido, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o mas preferiblemente un enlace de fosforoditioato, aunque los enlaces de fosodiéster y otros enlaces internucleotídicos también están dentro del alcance de la invención, incluyendo oligonucleótidos con enlaces internucleotídicos mezclados. Los métodos para producir oligonucleótidos con fosforotioato o fosforoditioato se describen en las patentes estadounidenses Nº 5.666.153; 5.278.302 y en el documento WO 95/26204.

Los ejemplos de oligonucleótidos preferidos tienen secuencias que se describen en las siguientes publicaciones; para algunos de los modos de realización descritos en la presente memoria las secuencias contienen preferiblemente enlaces internucleotídicos de fosforotioato modificado:

- CPG 7909: Cooper *et al.*, "*CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antirretroviral-treated HIV-infected adults*" *AIDS* 2005, Sept 23; 19 (14): 1473-9.

- CPG 10101: Bayes *et al.* "*Gateways to clinical trials*". *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 2005, Apr, 27 (3): 193-219.

- Vollmer J. "*Progress in drug development of immunostilatory CpG oligodeoxynucleotid ligands for TLR9*". *Expert Opinion on Biological Therapy* 2005 May, 5 (5): 673-382.

Oligonucleótidos con CpG alternativos pueden comprender variantes de las secuencias preferidas descritas en las publicaciones citadas anteriormente que sean diferentes debido a que tienen sustituciones, inserciones, deleciones y/o adiciones de secuencias de nucleótidos sin consecuencias. Los oligonucleótidos con CpG usados en algunos de los modos de realización de la presente invención pueden ser sintetizados por cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo, EP0468520). De forma conveniente, dichos oligonucleótidos pueden ser sintetizados usando un sintetizador automático. Los oligonucleótidos son típicamente desoxinucleótidos. En un modo de realización preferido, el enlace internucleotídico en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferiblemente un enlace de fosforotioato, aunque los fofodiésteres también están dentro del alcance de los modos de realización contemplados en la presente memoria. También se consideran oligonucleótidos que comprenden diferentes enlaces internucleotídicos, por ejemplo, mezcla de fosforotioato y fosfodiésteres. También se pueden usar otros enlaces internucleotídicos que estabilicen el oligonucleótido.

Coadyuvante

Algunos de los modos de realización proporcionados en la presente memoria incluyen composiciones de vacuna y composiciones de adyuvante inmunológico, incluyendo composiciones farmacéuticas, que contienen, además del GLA, al menos un coadyuvante, que se refiere a un componente de dichas composiciones que tiene actividad como adyuvante pero que no es el GLA. Un coadyuvante que tiene dicha actividad como adyuvante incluye una composición que, cuando se administra a un sujeto tal como un humano (por ejemplo, un paciente humano), un primate no humano, un mamífero u otro organismo eucariótico superior que tiene un sistema inmune reconocido, es capaz de alterar (es decir, aumentar o disminuir en una forma estadísticamente significativa y, en algunos modos de realización, de aumentar o disminuir) la potencia y/o la duración de una respuesta inmune. (Véase, por ejemplo, Powell y Newman, "*Vaccine desing – The Subunit and Adjuvant Approach*", 1995, Plenum Press, Nueva York). En algunos modos de realización descritos en la presente memoria, el GLA y un antígeno adecuado, y opcionalmente uno o más coadyuvantes, pueden de esta manera alterar, por ejemplo, producir o aumentar, una respuesta inmune que se dirige contra el antígeno deseado que puede ser administrado al mismo tiempo que el GLA o puede administrarse separadamente en el tiempo y/o el espacio (por ejemplo, en un lugar anatómico diferente), pero algunos modos de realización de la invención no pretenden ser tan limitados y por lo tanto también contemplan la administración de GLA en una composición que no incluye un antígeno especifico sino que pueden incluir también uno o más agonistas del TLR, un coadyuvante, un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina y un modificador inmune de doble tallo en bucle (dSLIM).

Consecuentemente, y como se ha indicado anteriormente, los coadyuvantes incluyen composiciones distintas al GLA que tienen efectos como adyuvante, tales como las saponinas y los miméticos de saponina, incluyendo los miméticos QS21 y miméticos de QS21 (véase, por ejemplo, la patente estadounidense Nº 5.057.540; EP0362279B1; WO 95/17210), alumbre, alcaloides de plantas, tal como la tomatina, detergentes, tal como (pero sin estar limitado a ellos) la saponina, polisorbato 80, span 85 y estearil tirosina, una o más citocinas (por ejemplo GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF-alfa, IFN-gamma), un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, y un modificador inmune de doble tallo en bucle (dSLIM, por ejemplo Weeratna *et al.* 2005, *Vaccine* 23: 5263).

Los detergentes que incluyen saponina se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense 6.544.518; Lacaille-Dubois, M. y Wagner H. (1996, *Phytomedicine* 2: 363-386), la patente estadounidense Nº 5.057.540; Kensil, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst,* 1996, 12 (1-2): 1-55; y en el documento EP0362279B1. Las estructuras en partículas denominadas complejos estimuladores de la inmunidad (ISCOMS), que comprenden fracciones de Quil A (saponina) son hemolíticos y se han usado en la elaboración de vacunas (Morein, B. EP0109942B1). Se ha publicado que estas estructuras tienen actividad como adyuvantes (EP0109942B1; WO 96/11711). Se ha descrito que las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Quil A) son adyuvantes sistémicos potentes y el método para producirlas se describe en la patente estadounidense Nº 5.057.540 y en EP0362279B1. En estas referencias también se describe el uso del QS7 (una fracción no hemolítica de la Quil-A) que actúa como un potente adyuvante para vacunas sistémicas. El uso de la QS21 se describe además en Kensil *et al.* (1991, *J. Immunology* 146: 431-437). Las combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodestrina también son conocidas (WO 99/10008). Los sistemas adyuvantes en partículas que comprenden fracciones de QuilA, tales como QS21 y QS27, se describen en los documentos WO 96/33739 y WO 96/11711. Otras saponinas que se han usado en estudios sistémicos de vacunación incluyen las derivadas de otras especies de plantas como la *Gypsophila* y *Saponaria* (Bomford *et al.*, *Vaccine*, 10 (9): 572-577, 1992).

La escina es otro detergente relacionado con las saponinas que puede ser usado en las composiciones adyuvantes de los modos de realización descritos en la presente memoria. La escina se describe en el índice Merck (12ª Ed, entrada 3737) como una mezcla de saponina que se encuentra en las semillas del árbol castaño de indias, *Aesculus hippocastanum*. Se ha descrito su aislamiento y purificación por cromatografía (Fiedler, *Arzneimittel-Forsch* 4, 213 (1953)) y mediante resinas de intercambio iónico (Erbring *et al.*, patente estadounidense Nº 3.238.190). Se han purificado fracciones de escina y se ha demostrado que son biológicamente activas (Yoshikawa M. *et al.* (*Chem. Pharm. Bull.* (Tokio) 1996 Aug.; 44 (8) 1454-1464)). La digitonina es otro detergente que también se describe en el índice Merck (12ª edición, entrada 3204) como una saponina que se obtiene a partir de las semillas de *Digitalis purpurea* y se purifica según el procedimiento descrito por Gisvold *et al., J. Am. Pharm. Assoc.* 1934, 23, 664; y Rubenstroth-Bauer, *Physiol. Chem.* 1955, 301, 621.

Otros coadyuvantes que pueden ser usados según algunos modos de realización descritos en la presente memoria incluyen un co-polímero de bloques o un polímero biodegradable, que se refiere a un tipo de compuestos poliméricos conocidos para los expertos. Los ejemplos de copolímero de bloques o de polímero biodegradable que pueden ser incluidos en una composición de vacuna con GLA o un adyuvante inmunológico de GLA incluyen Pluronic® L121 (BASF Corp., Mount Olive, N. J.; véase, por ejemplo, Yeh *et al.*, 1996, *Pharm. Res.* 13: 1693; y la patente estadounidense Nº 5.565.209); CRL 1005 (por ejemplo, Triozzi *et al.*, 1997, *Clin. Canc. Res.* 3. 2355); poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLG) y polil:C. (Véase, por ejemplo, Powell y Newman, "*Vaccine desing – The Subunit and Adjuvant Approach*", 1995, Plenum Press, Nueva York).

Algunos modos de realización se refieren a vacunas con GLA y adyuvantes inmunológicos con GLA que incluyen un aceite, que en algunos de dichos modos de realización pueden contribuir a la actividad coadyuvante y en otros de dichos modos de realización pueden adicional o alternativamente proporcionar un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Se conocen muchos aceites adecuados y se pueden elegir para incluirlos en la

composición de vacuna y en composiciones adyuvantes inmunológicas basadas en la presente descripción. Los ejemplos de dichos aceites incluyen, como ilustración y no como limitación, escualeno, escualano, aceite mineral, aceite de oliva, colesterol y monooleato de manida.

Los modificadores de la respuesta inmune, tales como modificadores de la respuesta inmune de imidazoquinolina también son conocidos en la técnica y también se pueden incluir como coadyuvantes en algunos de los modos de realización descritos en la presente memoria. Algunos de los modificadores de respuesta inmune de imidazoquinolilna preferidos incluyen, como ejemplos no limitantes, el resiquimod (R848), imiquimod y gardiquimod (Hemmi *et al.*, 2002 *Nat. Immunol.* 3: 196; Gibson *et al.* 2002 *Cell. Immunol.* 218: 74; Gorden *et al.* 2005 *J. Immunol.* 174: 1259); estos y otros modificadores de respuesta inmune de imidazoquinolina también pueden tener, en condiciones adecuadas, actividad agonista de TLR como se ha descrito en la presente memoria. Otros modificadores de la respuesta inmune son los modificadores inmunes de doble tallo en bucle (dSLIM). Ejemplos específicos de dSLIM que se consideran para ser usados en algunos de los modos de realización descritos en la presente memoria se pueden encontrar en Schmidt *et al.* 2006, *Allergy* 61: 56; Weihrauch *et al.* 2005 *Clin. Cancer Res.* 11 (16): 5993-6001; *Modern Biopharmaceuticals*, J. Knäblein (Editor). John Wiley & Sons, 6 de Diciembre de 2005 (los dSLIM se presentan en las páginas 183 a ~200) y de Mologen AG (Berlin, FRG: [obtenido en línea el 08/18/06 en http://www.mologen.com/English/04.20-dSLIM.shtml].

Como también se ha indicado anteriormente, un tipo de coadyuvante para usarlo con el GLA como se ha descrito en la presente memoria puede ser los coadyuvantes de aluminio que se denominan generalmente "alumbre". Los coadyuvantes de alumbre se basan en: oxi-hidróxido de aluminio; hidroxifosfoato de aluminio; o varias sales registradas. Las vacunas que usan coadyuvantes de alumbre pueden incluir vacunas para cepas del tétanos, HPV, hepatitis A, virus de la polio inactivado, y otros antígenos como se ha descrito en la presente memoria. Los coadyuvantes de alumbre son ventajosos porque tienen un buen registro de seguridad, aumentan las respuestas de anticuerpos, estabilizan los antígenos, y su producción a gran escala es relativamente sencilla. (Edelman 2002 *Mol. Biotechnol*. 21: 129-148; Edelman, R. 1980 *Rev. Infect. Dis.* 2: 370-383).

Otros coadyuvantes que se pueden combinar con GLA para estimulación inmune eficaz incluyen las saponinas y los miméticos de la saponina, incluyendo la QS21 y compuestos estructuralmente relacionados que confieren efectos similares y se denominan en la presente memoria miméticos de la QS21. La QS21 ha sido reconocida como un coadyuvante preferido. La QS21 puede comprender una fracción no tóxica purificada por HPLC obtenida a partir de corteza de Quillaja *Saponaria Molina*. La producción de QS21 se describe en la patente estadounidense Nº 5.057.540. (Véanse también las patentes estadounidenses Nº 6.936.255, 7.029.678 y 6.932.972).

El GLA también puede combinarse en algunos modos de realización con "complejos inmunoestimuladores" conocidos como ISCOMS (por ejemplo, las patentes estadounidenses Nº 6.869.607, 6.846.489 y 6.027.732, 4.981.684), incluyendo el ISCOMATRIX® derivado de la saponina, que está disponible comercialmente, por ejemplo, en Iscotec (Estocolmo, Suecia) y CSL Ltd. (Parkville, Victoria, Australia).

Constructo de expresión recombinante

Según algunos modos de realización descritos en la presente memoria, la composición de vacuna con GLA puede contener al menos un constructo de expresión recombinante que comprende un promotor unido de forma operativa a una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno. En algunos modos de realización adicionales, el constructo de expresión está presente en un vector vírico, tal como un adenovirus, un virus adeno-asociado, un virus del herpes, un lentivirus, un poxvirus o un retrovirus. Las composiciones y los métodos para elaborar y usar dichos constructos de expresión y vectores son conocidos en la técnica, para la expresión de antígenos polipeptídicos como se proporcionan en la presente memoria, por ejemplo, según Ausubel *et al.* (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology* 2006 John Wiley & Sons, NY. Ejemplos no limitantes de constructos de expresión recombinante se pueden encontrar generalmente en la patente estadounidense Nº 6.844.192; 7.037.712; 7.052.904; 7.001.770; 6.106.824; 5.693.531; 6.613.892; 6.875.610; 7,067.310; 6.218.186; 6.783.981; 7.052.904; 6.783.981; 6.734.172; 6.713.068; 5.795.577 y 6.770.445 y en otras, con enseñanzas que pueden ser adaptadas a la expresión de antígenos polipeptídicos como se proporciona en la presente memoria, para su uso en algunos de los modos de realización descritos en la presente memoria.

Respuesta inmune

La invención proporciona por lo tanto composiciones para alterar (es decir, aumentar o disminuir de forma significativa, por ejemplo, respecto a un control apropiado como será evidente para los expertos en la técnica) respuestas inmunes en un huésped capaz de producir una respuesta inmune. Como es sabido por los expertos en la técnica, una respuesta inmune puede ser cualquier alteración activa del estatus inmune de un huésped, la cual puede incluir cualquier alteración en la estructura o función de uno o más tejidos, órganos, células o moléculas que participan en el mantenimiento y/o regulación del estatus inmune del huésped. Típicamente, se pueden detectar respuestas inmune mediante cualquiera entre varios parámetros bien conocidos, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, la determinación *in vivo* o *in vitro* de: inmunoglobulinas o anticuerpos solubles; mediadores solubles, tales como citocinas, linfocinas, quimiocinas, hormonas, factores de crecimiento y similares, así como otros péptidos pequeños, hidrocarburos,

nucleótidos y/o mediadores lípidos solubles; cambios de estado de activación celular como se determina por las propiedades funcionales o estructurales alteradas de las células del sistema inmune, por ejemplo, la proliferación celular, motilidad alterada, inducción de actividades especializadas, tales como la expresión génica específica o el comportamiento citolítico; la diferenciación celular por células del sistema inmune, incluyendo perfiles de expresión del antígeno de superficie alterados o en el inicio de la apoptosis (muerte celular programada); o cualquier otro criterio por el que se puede detectar la presencia de una respuesta inmune.

Las respuestas inmunes se pueden considerar a menudo, por ejemplo, como la discriminación entre las estructuras propias y las que no son propias por las células y tejidos de un sistema inmune de un huésped a los niveles molecular y celular, pero la invención no debe ser limitada por esto. Por ejemplo, las respuestas inmunes también pueden incluir cambios en el estado del sistema inmune que se producen por reconocimiento inmune de moléculas, células o tejidos propios, como puede acompañar a múltiples estados normales, tales como la regulación típica de los componentes del sistema inmune, o que pueden estar presentes en estados patológicos, tal como las respuestas autoinmunes inapropiadas observadas en enfermedades autoinmunes y degenerativas. Como otro ejemplo, además de la inducción por sobre-regulación de actividades de un sistema inmune particular (tal como producción de anticuerpos y/o citosina, o activación de la inmunidad mediada por células), las respuestas inmunes también pueden incluir supresión, atenuación o cualquier otra sub-regulación de la inmunidad detectable, que puede ser la consecuencia del antígeno elegido, la ruta de administración del antígeno, la inducción de tolerancia específica y otros factores.

La determinación de la inducción de una respuesta inmune por las vacunas de la presente invención puede establecerse por múltiples análisis inmunológicos bien conocidos que son habituales para los expertos en la técnica. Dichos análisis incluyen, pero sin que sea necesario limitarse a ellos, la determinación *in vivo* o *in vitro* de: mediadores solubles, tal como citocinas, linfocinas, quimiocinas, hormonas, factores de crecimiento y similares, así como otros péptidos pequeños, hidrocarburos, nucleótidos y/o mediadores lípidos solubles; cambios de estado de activación celular determinado por las propiedades funcionales o estructurales alteradas de las células del sistema inmune, por ejemplo, la proliferación celular, motilidad alterada, inducción de actividades especializadas, tales como la expresión génica específica o el comportamiento citolítico; la diferenciación celular por células del sistema inmune, incluyendo perfiles alterados de la expresión del antígeno de superficie o el inicio de la apoptosis (muerte celular programada). Los procedimientos para realizar estos análisis y otros similares son ampliamente conocidos y se pueden encontrar por ejemplo en Lefkovits (*Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*, 1998; véase también *Current Protocols in Immunology*; véase también, por ejemplo, Weir, *Handbook of Experimental Immunology*, 1986 Blackwell Scientific, Boston, MA; Mishell y Shigii (eds) *Selected Methods in Cellular Immunology*; 1979 Freeman Publishing, San Francisco, CA; Green y Reed, 1998 *Science* 281: 1309 y las referencias citadas en estos textos).

La detección de la proliferación de células T reactivas al antígeno se puede realizar por varias técnicas conocidas. Por ejemplo, la proliferación de células T se puede detectar midiendo la tasa de síntesis de ADN y la especificidad al antígeno se puede determinar controlando el estímulo (tal como, por ejemplo, células que presentan un antígeno de forma pulsada por un antígeno específico deseado o por un antígeno de control) a los que las células T reactivas al antígeno candidato son expuestas. Las células T que han sido estimuladas para proliferar presentan una tasa aumentada de síntesis de ADN. Un forma típica de medir la tasa de síntesis de ADN es, por ejemplo, por cultivos de células T marcadas con pulsos de trimidina tritiada, un precursor nucleósido que se incorpora en el ADN recién sintetizado. La cantidad de timidina tritiada que se incorpora puede determinarse usando un espectrofotómetro de centelleo de líquidos. Otras formas de detectar la proliferación de células T incluyen medir el aumento de producción de interleucina 2 (IL-2), el flujo de $Ca^{2+}$, o la absorción de colorante, tal como 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio. Alternativamente, se puede medir la síntesis de linfocinas (tal como el interferón gamma) o se puede determinar la cantidad relativa de células T que pueden responder a un antígeno particular.

La detección de producción de anticuerpos específicos para un antígeno se puede obtener, por ejemplo, analizando una muestra (por ejemplo, una muestra que contiene inmunoglobulina, tal como una muestra de suero, plasma o sangre) de un huésped tratado con una vacuna según la presente invención usando métodos *in vitro*, tal como radioanálisis inmunológico (RIA), ensayo con sustancias inmunosorbentes unidas a enzimas (ELISA), diálisis de equilibrio o immunotransferencia en fase sólida, incluyendo transferencia de Western. En los modos de realización preferidos, los modos de realización pueden incluir además la inmovilización por captura de antígeno diana con un anticuerpo monoclonal en fase sólida específico para el antígeno, por ejemplo, para aumentar la sensibilidad del análisis. La elaboración de mediadores solubles (por ejemplo, citocinas, quimiocinas, linfocinas, prostaglandinas, etc.) también puede ser determinada fácilmente por ensayo de sustancias inmunosorbentes unidas a enzimas (ELISA), por ejemplo usando los métodos, dispositivos y reactivos que están disponibles fácilmente en fuentes comerciales (por ejemplo, Sigma, St. Louis, MO; véase también el catálogo 2006 de R & D Systems, Minneapolis, MN).

Otros múltiples parámetros inmunológicos pueden ser controlados usando análisis rutinarios que son bien conocidos en la técnica. Estos pueden incluir, por ejemplo, análisis de la citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC), análisis inmunocitofluorimétrico de flujo de varias sub-poblaciones de células mononucleares linfoides o de sangre periférica usando sistemas de antígenos marcadores bien establecidos, inmunoquímica u otros análisis relacionados. Estos y otros análisis pueden encontrarse, por ejemplo, en Rose *et al.* (eds) *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 5ª ed. 1997, American Society of Microbiology, Washington DC.

Consecuentemente, se considera que las composiciones de vacuna y de adyuvante proporcionadas en la presente memoria serán capaces de producir o aumentar en un huésped al menos una respuesta inmune que se elige entre una respuesta de linfocitos T del tipo $T_H1$, una respuesta de linfocitos T del tipo $T_H2$, una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL), una respuesta de anticuerpos, una respuesta de citocina, una respuesta de linfocina, una respuesta de quimiocina, una respuesta inflamatoria. En algunos modos de realización la respuesta inmune puede comprender al menos uno entre la producción de una o varias citocinas en la que la citocina se elige el interferón gamma (IFN-□), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-□); la producción de uno o varias interleucinas en la que la interleucina se elige entre IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 e IL-23; la producción de una o varias quimiocinas, en la que la quimiocina se elige entre MIP-1□, MIP-1□, RANTES, CCL4 y CCL5; y una respuesta de linfocitos que se elige entre una respuesta de células T de memoria, respuesta de células B de memoria, respuesta de células T efectoras, respuesta de células T citotóxicas y respuesta de células B efectoras. Véase, por ejemplo, los documentos WO94/00153, WO 95/17209, WO 96/02555, las patentes estadounidenses Nº 6.692.752, 7.084.256, 6.977.073, 6.749.856, 6.733.763, 6.797.276, 6.752.995, 6.057.427, 6.472.515, 6.309.847, 6.969.704, 6.120.769, 5.993.800, 5.585.888; Smith *et al.* 1987 *J. Biol. Chem.* 262: 6951; Kriegler *et al.* 1988 *Cell* 53: 45-53; Beutler *et al.*, 1986 *Nature* 320: 584; y las patentes estadounidenses Nº 6.991.791, 6.654.462 y 6.375.944.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas comprenden generalmente GLA (disponible en Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; producto número 699800) y pueden comprender además uno o más componentes como se proporcionan en la presente memoria que se eligen entre un antígeno, un agonista del TLR, un coadyuvante (incluyendo opcionalmente una citocina, un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina y/o un dSLIM) y/o un constructo de expresión recombinante, combinado con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptables.

Por lo tanto, en algunos aspectos, la presente invención se refiere a "monoterapia" con GLA, en la que el GLA, como se describe en la presente memoria, se formula en una composición que está esencialmente desprovista de otros antígenos y que se administra a un sujeto con el fin de estimular una respuesta inmune, por ejemplo una respuesta inmune no específica, con el propósito de tratar o prevenir una enfermedad u otro estado, tal como una infección por un organismo. En otro modo de realización, por ejemplo, las composiciones y los métodos de la invención emplean un disacárido monofosforilado para estimular una respuesta inmune en un sujeto. En otro modo de realización particular, la composición y los métodos de la invención emplean una forma 2-monoacilo del Lípido A para estimular una respuesta inmune en un sujeto. En otro modo de realización particular, el GLA está en forma de un pulverizador, opcionalmente proporcionado como un kit.

El GLA puede estar preferiblemente formulado en una emulsión estable. En un modo de realización particular, por ejemplo, se proporciona una composición que comprende un derivado del lípido A en una emulsión estable esencialmente desprovista de otros antígenos. En otro modo de realización particular, se proporciona una composición que comprende un derivado 2-acilado monofosforilado del lípido A, adecuado para usarlo en mamíferos, donde la amina en la posición 2 tiene una cadena acilo sencilla y que está esencialmente desprovista de otros antígenos.

En algunos otros modos de realización, la composición farmacéutica es una composición de vacuna que comprende tanto GLA como un antígeno y que puede además comprender uno o más componentes, como se ha proporcionado en la presente memoria, que se eligen entre un agonista del TLR, un coadyuvante (incluyendo opcionalmente una citocina, un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina y/o un dSLIM) y similares y/o un constructo de expresión recombinante, combinado con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptables.

Los ejemplos ilustrativos de vehículos serán no tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Para vacunas basadas en GLA y ácido nucleico, o para vacunas que comprenden GLA y un antígeno, se administrará aproximadamente de 0,01 □g/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, típicamente por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa, o por otras vías.

Una dosis preferida es de aproximadamente 1 □g/kg a aproximadamente 1 mg/kg, prefiriéndose particularmente de aproximadamente 5 □g/kg a aproximadamente 200 □g/kg. Será evidente para los expertos en la técnica que el número y la frecuencia de administración dependerán de la respuesta del huésped. Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remingtons Pahrmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (Ed. A. R. Gennaro, 1985). Por ejemplo, se pueden usar disolución salina estéril y disolución salina tamponada con fosfato de pH fisiológico. En la composición farmacéutica se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes modificadores del sabor. Por ejemplo, se pueden como conservantes benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres del ácido p-hidroxibenzoico, Ibid. en 1449. Además, se pueden usar antioxidantes o agentes de suspensión, ibíd.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de los compuestos de la presente invención obtenidos mediante la combinación de dichos compuestos con un ácido orgánico o inorgánico (sales de adición ácida) o con una base orgánica o inorgánica (sales de adición básica). Las composiciones de la presente invención pueden usarse bien en forma de base libre o bien en forma de sales, y se considera que ambas formas están dentro del alcance de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma que permita que la composición sea administrada al paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un sólido, líquido o gas (aerosol). Las vías típicas de administración incluyen, sin limitación, oral, tópica, parenteral (por ejemplo, sublingual o bucalmente), sublingual, rectal, vaginal e intranasal (por ejemplo, mediante un pulverizador). El término parenteral, como se usa en la presente memoria, incluye la administración iontoforética (por ejemplo, las patentes estadounidenses Nº 7.033.598, 7.018.345, 6.970.739), sonoforética (por ejemplo, las patentes estadounidenses 4.780.212, 4.767.402, 4.948.587, 5.618.275, 5.656.016, 5.722.397, 6.322.532, 6.018.678), térmica (por ejemplo, véanse las patentes estadounidenses 5.885.211 y 6.685.699), transdérmica pasiva (por ejemplo, véanse las patentes estadounidenses 3.598.122, 3.598.123, 4.286.592, 4.314.557, 4.379.454, 4.568.343, 5.464.387, la patente británica Nº 2232802, y las patentes estadounidenses 6.871.477, 6.974.588 y 6.676.961), microaguja (por ejemplo, véanse la patentes estadounidenses Nº 6.908.453, 5.457.041, 5.591.139 y 6.033.928) y también las inyecciones subcutáneas, la inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal, intracavernosa, intratecal, intrameatal, intrauretral o técnicas de infusión. En un modo de realización particular, una composición como las descritas en la presente memoria (incluyendo las composiciones de vacuna y composiciones farmacéuticas) se administra intradérmicamente mediante una técnica elegida entre iontoforesis, microcavitación, sonoforesis o microaguja.

La composición farmacéutica se formula de forma que permita que los ingredientes activos contenidos en ella estén biodisponibles tras la administración de la composición al paciente. Las composiciones que se administrarán a un paciente tendrán la forma de una o más unidades de dosificación, donde por ejemplo, un comprimido puede ser una unidad de dosificación, y un contenedor con uno o más compuestos según la invención en forma de aerosol puede contener múltiples unidades de dosificación.

Para la administración oral, puede haber presente un excipiente y/o un aglomerante. Los ejemplos son sacarosa, caolín, glicerina, dextrinas de almidón, alginato de sodio, carboximetilcelulosa y etilcelulosa. También pueden estar presentes agentes colorantes y/o modificadores del sabor. También se puede emplear una capa de revestimiento.

La composición puede estar en forma de un líquido, por ejemplo un elixir, jarabe, disolución, emulsión o suspensión. Como dos ejemplos, el líquido puede ser para administración oral o para administrarse como inyección. Cuando se prevé la administración oral, las composiciones preferidas contienen uno o más entre un agente edulcorante, conservantes, colorantes y mejoradores del sabor. En una composición prevista para ser administrada mediante inyección, se pueden incluir uno o más tensioactivos, conservantes, agentes humectantes, agentes dispersantes, agentes para preparar suspensiones, tampones, estabilizantes o agentes isotónicos.

Una composición farmacéutica líquida como se usa en la presente memoria, sea en forma de disolución, suspensión o similares, puede incluir uno o más de los siguientes vehículos o excipientes: diluyentes estériles, tales como agua para inyección, disolución salina, preferiblemente disolución salina fisiológica, disolución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos, tal como escualeno, escualano, aceite mineral, un monooleato de manida, colesterol y/o mono- o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio para suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tal como el ácido etilendiamintetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede estar contenida en ampollas, jeringas desechables o frascos para varias dosis hechos de cristal o de plástico. Una composición farmacéutica inyectable es preferiblemente estéril.

En un modo de realización particular, una composición farmacéutica o de vacuna según la invención comprende una suspensión acuosa estable de menos de 0,2 □m y además comprende al menos un componente elegido entre el grupo que consiste en fosfolípidos, ácidos grasos, tensioactivos, detergentes, saponinas, lípidos fluorados y similares.

En otro modo de realización, una composición de la invención se formula de forma que pueda prepararse en forma de aerosol.

También puede ser deseable incluir otros componentes en la composición farmacéutica o para vacunas, tal como vehículos de liberación que incluyen, pero sin estar limitados a ellos, las sales de aluminio, emulsiones de agua en aceite, vehículos oleosos biodegradables, emulsiones de aceite en agua, microcápsulas biodegradables y liposomas. Los ejemplos de sustancias inmunoestimuladoras (coadyuvantes) adicionales para usarlas en dichos vehículos también se han descrito anteriormente y pueden incluir N-acetilmuramil-L-alanina-D-isoglutamina (MDP), glucano, IL-12, GM-CSF, interferón gamma e IL-12.

Aunque en las composiciones farmacéuticas según la invención se puede emplear cualquier vehículo adecuado conocido por los expertos en la técnica, el tipo de vehículo variará dependiendo del modo de administración o de si se desea una liberación prolongada. Para la administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el vehículo puede comprender preferiblemente agua, disolución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para la administración oral, se pueden emplear cualquiera de los vehículos anteriores o un vehículo sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. También se pueden emplear microesferas (por ejemplo, galactida poliláctica) como vehículos para las composiciones

farmacéuticas de esta invención. Microesferas biodegradables adecuadas se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses Nº 4.897.268 y 5.075.109. A este respecto, es preferible que la microesfera sea mayor de aproximadamente 25 micrones.

Las composiciones farmacéuticas (incluyendo vacunas con GLA y adyuvantes inmunológicos con GLA) también pueden contener diluyentes como tampones, antioxidantes, tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos), proteínas, aminoácidos, hidrocarburos incluyendo glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes, tal como EDTA, glutatión y otros estabilizantes y excipientes. Ejemplos de diluyentes apropiados son la disolución salina tamponada neutra o disolución salina mezclada con albúmina de suero no específica. Preferiblemente, el producto puede ser formulado como un liofilizado usando disoluciones de un excipiente apropiado (por ejemplo, sacarosa) como diluyente.

Como se ha descrito anteriormente, en algunos modos de realización, la invención expuesta incluye composiciones capaces de liberar moléculas del ácido nucleico que codifica los antígenos deseados. Dichas composiciones incluyen vectores víricos recombinantes (por ejemplo, retrovirus (véanse los documentos WO 90/07936, WO 91/02805, WO 93/25234, WO 93/25698 y WO 94/03622), adenovirus (véase Berkner, *Biotechniques* 6: 616-627, 1988; Li *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 4: 403-409, 1993; Vincent *et al., Nat. Genet.* 5: 130-134, 1993; y Kolls *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 215-219, 1993), poxvirus (véanse las patentes estadounidenses Nº 4.769.330, 5.017.487 y el documento WO 89/1973)); moléculas de ácido nucleico constructo de expresión recombinante que forma un complejo con una molécula policatiónica (véase el documento WO 93/03709) y ácidos nucleicos asociados con liposomas (véase Wang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7851, 1987). En algunos modos de realización, el ADN puede estar unido a adenovirus muertos o inactivados (véase Curiel *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 3: 147-154, 1992; Cotton *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6094, 1992). Otras composiciones adecuadas incluyen las combinaciones de ADN-ligando (véase Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264: 16985-16987, 1989) y de ADN-lípido (véase Feigner *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-1417, 1989).

Además de los procedimientos *in vivo* directos, se pueden usar procedimientos *ex vivo* en los que las células se retiran del huésped, se modifican y se colocan en el mismo animal o en otro. Será evidente que se pueden utilizar cualquier de las composiciones indicadas anteriormente para la introducción de moléculas de ácido nucleico que codifican un antígeno en células de tejido en un contexto *ex vivo*. Los protocolos para los métodos de absorción vírica, física y química son bien conocidos en la técnica.

Consecuentemente, la presente descripción es útil para aumentar o producir una respuesta inmune en un huésped, un paciente o un cultivo celular. Como se usa en la presente memoria, el término “paciente” se refiere a cualquier animal de sangre caliente, preferiblemente un humano. Un paciente puede estar afectado de una enfermedad infecciosa, cáncer, tal como cáncer de mama, o una enfermedad autoinmune, o puede ser normal (es decir, estar libre de cualquier enfermedad y/o infección detectable). Un “cultivo celular” es cualquier preparación que contiene células inmunocompetentes o células aisladas del sistema inmune (incluyendo, pero sin limitarse a ellas, células T, macrófagos, monocitos, células B y células dendríticas). Dichas células pueden aislarse por cualquiera entre varias técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, centrifugación por gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque). Las células pueden (pero no necesariamente) haber sido aisladas de un paciente afectado por un cáncer y pueden ser reintroducidas en el paciente después del tratamiento.

En algunos modos de realización, una composición líquida para administración bien parenteral o bien oral debe contener una cantidad de composición de vacuna con GLA de forma que se obtenga una dosis adecuada. Típicamente, esta cantidad es de al menos 0,01% en peso de un antígeno en la composición. Cuando se pretende que sea para administración oral, esta cantidad puede variar entre 0,1 y aproximadamente 70% del peso de la composición. Las composiciones orales preferidas contienen entre aproximadamente 4% y aproximadamente 50% del antígeno. Las composiciones y preparaciones preferidas se preparan de forma que una unidad de dosificación parenteral contiene entre 0,01 a 1% en peso de la composición activa.

La composición farmacéutica puede estar prevista para la administración tópica en cuyo caso el vehículo puede comprender adecuadamente una disolución, emulsión, ungüento o base de gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: vaselina, lanolina, polietilenglicoles, cera de abejas, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol, y emulsionante y estabilizadores. En una composición farmacéutica para administración tópica puede haber presentes agentes espesantes. Si está prevista para administración transdérmica, la composición puede incluir un parche transdérmico o un dispositivo para iontoforesis. Las formulaciones tópicas pueden contener una concentración del antígeno (por ejemplo, una composición de vacuna con GLA-antígeno) o GLA (por ejemplo, una composición de adyuvante inmunológico; el GLA está disponible en Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; por ejemplo el producto número 699800) o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10% p/v (peso por unidad de volumen).

La composición puede estar prevista para la administración rectal en forma, por ejemplo, de un supositorio que se fundirá en el recto y liberará el fármaco. La composición para administración rectal puede contener una base oleaginosa, tal como un excipiente no irritante adecuado. Dichas bases incluyen, sin limitación, lanolina, mantequilla de cacao y polietilenglicol. En los métodos de la invención, las composiciones de vacuna/adyuvantes pueden

administrarse mediante el uso de inserto(s), gránulo(s), formulación(ones) de liberación retardada, parche(s) o formulación(ones) de liberación rápida.

En algunos modos de realización también se consideran kits que comprenden las composiciones de vacuna con GLA y/o las composiciones de adyuvante inmunológico con GLA descritas en la presente memoria, que pueden proporcionarse en uno o más contenedores. En un modo de realización todos los componentes de las composiciones de vacuna con GLA y/o las composiciones de adyuvante inmunológico están presentes juntas en un único contenedor, pero los modos de realización de la invención no están previstos para estar limitados y también se consideran dos o más contenedores en los que, por ejemplo, una composición de adyuvante inmunológico con GLA está separada de, y no está en contacto con, el componente antigénico. Como teoría no limitante, se cree que en algunos casos se puede realizar de forma beneficiosa la administración solo de la composición de adyuvante inmunológico con GLA, mientras que en otros casos dicha administración puede ser beneficiosa si está separada temporalmente y/o espacialmente (por ejemplo, en lugares anatómicos diferentes) de la administración del antígeno, mientras que en todavía otros casos, la administración al sujeto se realiza de forma beneficiosa mediante la composición de vacuna con GLA como se ha descrito en la presente memoria y que contiene tanto el antígeno como el GLA y opcionalmente otros de los componentes descritos en la presente memoria igualmente.

Un contenedor según dichos modos de realización para un kit puede ser cualquier contenedor, vasija, frasco, ampolla, tubo, copa, caja, botella, matraz, jarra, plato, dispositivo con un solo pocillo o con varios pocillos, reservorio, tanque o similares, o cualquier otro dispositivo en el que las composiciones descritas en la presente memoria se puedan colocar, almacenar y/o transportar y al que se pueda acceder para retirar los contenidos. Típicamente dicho contenedor puede estar hecho de un material que es compatible con el uso previsto y del que la recuperación de los contenidos de los contenedores se puede obtener fácilmente. Los ejemplos preferidos de dichos contendores incluyen tubos y ampollas de vidrio y/o plástico sellados o resellables, incluyendo los que tienen un septo de caucho u otro medio de sellado que sea compatible con la retirada de los contenidos usando una aguja y una jeringa. Dichos contenedores pueden, por ejemplo, estar hechos de vidrio o un plástico o resina químicamente compatible, que puede estar hecho de, o puede estar revestido con, un material que permita la recuperación eficaz del material del contenedor y/o proteger el material de, por ejemplo, condiciones degradantes tales como la luz ultravioleta o temperaturas extremas, o de la introducción de contaminantes no deseados, incluyendo contaminantes microbianos. Los contenedores son preferiblemente estériles o esterilizables, y se hacen con materiales que sean compatibles con cualquier vehículo, excipiente, disolvente, vehículo o similares, de forma que puedan ser usados para preparar una suspensión o disolver las composiciones de vacuna y/o composiciones de adyuvante inmunológico y/o antígenos y/o constructos de expresión recombinante, etc. descritos en la presente memoria.

Los sistemas de emulsión también pueden usarse en composiciones de formulación de la presente invención. Por ejemplo, se han descrito muchos sistemas de emulsión sencillos o multifase. Se han sugerido adyuvantes de emulsión de aceite en agua que son útiles por sí mismos como composiciones adyuvantes (EP0399843B), también se han descrito combinaciones de emulsiones de aceite en agua y otros agentes activos como adyuvantes para vacunas (WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241). También se han descritos otros adyuvantes de emulsiones oleosas, tales como emulsiones de agua en aceite (véanse la patente estadounidense Nº 5.422.109; EP0480982B2) y emulsiones de aceite en agua (véanse la patente estadounidense Nº 5.424.067 y el documento EP0480981B). Los adyuvantes de emulsión oleosa para ser usados en la presente invención pueden ser naturales o sintéticos y pueden ser minerales u orgánicos. Los ejemplos de aceites minerales y orgánicos serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

En un modo de realización particular, una composición de la invención comprende una emulsión de aceite en agua en la que el GLA se incorpora en la fase oleosa. En otro modo de realización, una composición de la invención comprende una emulsión de aceite en agua en la que el GLA se incorpora en la fase oleosa y en la que hay un componente adicional presente, tal como un coadyuvante, un agonista del TLR o similares, como se ha descrito en la presente memoria.

Con el fin de que cualquier composición de aceite en agua sea adecuada para administración a humanos, la fase oleosa del sistema en emulsión comprende preferentemente un aceite metabolizable. El significado del término aceite metabolizable es bien conocido en la técnica. Metabolizable puede ser definido como “que es capaz de ser transformado por el metabolismo” (*Dorland’s Illustrated Medical Dictionary*, W. B. Saunders Company, 25ª ed. (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que sea no tóxico al receptor y que pueda ser transformado por el metabolismo. Los frutos secos (tales como el aceite de cacahuete), semillas y granos son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también son parte de esta invención y pueden incluir aceites disponibles comercialmente, tales como NEOBEE® y otros.

El escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno), por ejemplo, es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón y, en cantidades menores, en el aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz, y en levaduras, y es un aceite particularmente preferido para usarlo en esta invención. El escualeno es un aceite metabolizable debido al hecho de que es un intermedio en la biosíntesis del colesterol (índice Merck, 10ª edición, entrada Nº 8619). Emulsiones oleosas particularmente preferidas son las emulsiones de aceite en agua y, en particular, las emulsiones de escualeno en agua. Además, los adyuvantes

en emulsión oleosa de la presente invención más preferidos comprenden un antioxidante, que es preferiblemente el aceite alfa-tocoferol (vitamina E, EP0382271B1). Los documentos WO 95/17210 y WO 99/11241 describen adyuvantes en emulsión basados en el escualeno, alfa-tocoferol y TWEEN® 80, formulados opcionalmente con los inmunoestimulantes QS21 y/o 3D-MPL (que se han descrito anteriormente). El documento WO 99/12565 describe una mejora en estas emulsiones de escualeno con la adición de un esterol en la fase oleosa. Adicionalmente, se puede añadir un triglicérido, tal como la tricaprilina ($C_{27}H_{50}O_6$), a la fase oleosa con el fin de estabilizar la emulsión (WO 98/56414).

El tamaño de las gotas de aceite encontrado en la emulsión de aceite en agua estable es preferiblemente menor de 1 micrón, esencialmente puede estar en el intervalo de 30-600 nm, esencialmente de forma preferida aproximadamente 30-500 nm de diámetro, y los más preferible esencialmente entre 150-500 nm de diámetro, y particularmente aproximadamente 150 nm de diámetro, medido por espectroscopía de correlación fotónica. En este sentido, el 80% de las gotas de aceite en número debe estar dentro de los intervalos preferidos, más preferiblemente más del 90% y lo más preferible más de 95% de las gotas de aceite en número están dentro de los intervalos de tamaño definidos. Las cantidades de los componentes de las emulsiones oleosas de la presente invención están convencionalmente en el intervalo de 2 a 10% de aceite, tal como escualeno; y, si está presente, de 2 a 10% de alfa-tocoferol; y de 0,3 a 3% de tensioactivo, tal como monooleato de sorbitano polioxietilenado. Preferiblemente, la relación de aceite:alfa-tocoferol es igual o menor que 1 ya que esto proporciona una emulsión más estable. El Span 85 también puede estar presente, en una cantidad de aproximadamente 1%. En algunos casos, puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan adicionalmente un estabilizador.

El método para producir emulsiones de aceite en agua es bien conocido para los expertos en la técnica. Generalmente, el método comprende la mezcla de la fase oleosa con un tensioactivo, tal como una disolución de PBS/TWEEN 80®, seguido por homogenización usando un homogenizador. Por ejemplo, un método que comprende pasar la mezcla una vez, dos veces o más veces a través de una aguja de una jeringa sería adecuado para homogenizar pequeños volúmenes de líquido. De igual forma, el procedimiento de emulsionado en un microfluidizador (dispositivo microfluidficador M110S, con un máximo de 50 pasadas durante un periodo de 2 minutos con una entrada de presión de 6 bares (presión de salida de aproximadamente 850 bares)) podría ser adaptado para producir volúmenes menores o mayores de emulsión. Esta adaptación podría ser obtenida por experimentación rutinaria que comprenda la medida de la emulsión resultante hasta que se obtenga una preparación con las gotas de aceite del diámetro requerido.

Los siguientes ejemplos se ofrecen como ilustración y no como limitación.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1. Formulación acuosa de GLA**

Este ejemplo describe la preparación de una formulación acuosa de adyuvante que contiene GLA. La formulación acuosa de GLA (GLA-AF) contiene agua para inyección (API), GLA (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; número de producto 699800) y 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC). La formulación se preparó añadiendo una disolución de etanol y POPC a una cantidad pesada previamente de GLA. Este GLA húmedo se sometió a ultrasonidos durante 10 minutos para dispersar el GLA tanto como fue posible. A continuación, el GLA se secó en atmósfera de nitrógeno. El GLA seco y la POPC se reconstituyeron con API hasta el volumen correcto. Esta disolución se sometió a ultrasonidos a 60ºC durante 15-30 minutos hasta que el GLA y la POPC estuvieron en disolución. Para almacenamiento a largo plazo, las formulaciones de GLA-AF deben ser liofilizadas. El procedimiento de liofilización consistió en añadir glicerol a la disolución hasta que tuvo un 2% del volumen total. Entonces la disolución se colocó en frascos en cantidades de 1-10 ml. A continuación los frascos se llevaron a través del procedimiento de liofilización que consistió en congelar la disolución y a continuación ponerlo a vacío para extraer el agua congelada por sublimación.

**Ejemplo 2. Análisis por HPLC del GLA**

Este ejemplo describe el análisis por HPLC de la formulación acuosa de adyuvante que contiene GLA. Después de preparar la formulación (véase el ejemplo 1 anterior) se realizaron algunos ensayos de liberación y estabilidad para asegurar la calidad de producto y la reproducibilidad. En todas las formulaciones se analizó la liberación y la estabilidad a largo plazo usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), dispersión de de luz Dinámica (DLS), y examen visual. Los cromatogramas de HPLC se recogieron usando un sistema Agilent 1100 y un detector ESA Coron CAD. El método se realizó usando un gradiente de metanol a cloroformo en una columna Waters Atlantis C18. Las inyecciones incluían 2,5 □g de GLA (Avantis Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; número de producto 699800, GLA-AF) o MPL® (GSK Biologicals, Rixensart, Bélgica, MPL-AF) respectivamente y 0,27 □g de fosfocolina (POPC) sintética que se usó como agente solubilizante.

La figura 1 muestra los datos de HPLC que muestran el número y cantidades de materiales contaminantes en el MPL-AF y el GLA-AF.

Los perfiles de HPLC mostraron que el GLA-AF era esencialmente más puro que el MPL-AF. Es decir, hubo menos picos de contaminantes en el GLA-AF que en la formulación de adyuvante con MPL-AF. Un producto inicial más puro

es un gran beneficio para los investigadores, ya que la respuesta biológica obtenida es la del componente principal único usado en la formulación del GLA.

**Ejemplo 3: Formulación oleosa de GLA**

Este ejemplo describe la preparación de un mililitro de una formulación oleosa de adyuvante que contiene GLA. El GLA (100 microgramos; Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; número de producto 699800) se emulsionó en escualeno (34,3 mg) con glicerol (22,7 mg), fosfotidilcolina o lecitina (7,64 mg), Pluronic® F-68 (BASF Corp., Mount Olive, NJ) o un copolímero de bloques similar (0,364 mg) en disolución tampón de fosfato de amonio 25 milimolar (pH = 5,1) usando 0,5 mg de D,L-alfa-tocoferol como antioxidante. La mezcla se procesó a alta presión hasta que la emulsión formada no se separaba y que tenía un tamaño medio de partícula de menos de 180 nm. A continuación, la emulsión se filtró estérilmente, se introdujo en frascos unidosis que se taparon para almacenamiento a largo plazo. Esta preparación puede ser usada durante al menos tres años si se almacena a 2-8ºC.

**Ejemplo 4. Estimulación con GLA de macrófagos y células dendríticas murinos**

Este ejemplo describe un modelo *in vitro* que demuestra un efecto adyuvante del GLA. Se emplearon metodologías de cultivo de tejidos y reactivos convencionales. Células de la línea celular de macrófagos murinos J774 y RAW267.4 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) se mantuvieron según las recomendaciones del suministrador y se cultivaron como monocapas celulares adherentes en placas multipocillos. Las células dendríticas se obtuvieron a partir de células progenitoras de médula ósea según el protocolo de Xiong *et al.* (*J. Biol. Chem.* 2004, 279, págs. 10776-83). Se obtuvieron varias concentraciones de adyuvante de GLA sintético (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; número de producto 699800) diluyendo una preparación acuosa de adyuvante en un medio de cultivo celular (DMEM que contenía 10% de suero bovino fetal), y las células se mantuvieron durante 24 horas a 37ºC en una atmósfera humidificada que contenía 5% de $CO_2$, antes de recoger los sobrenadantes del cultivo sin células. En los fluidos sobrenadantes se analizaron las citocinas murinas solubles, tales como IL-12, IL-6 y TNF, y quimiocinas tales como RANTES, usando kits específicos de análisis por ELISA de fase doble (eBiosciences, San Diego, CA para las citocinas y R&D Systems, Minneapolis, MN para las quimiocinas) según las instrucciones del fabricante.

El GLA-AF indujo respuestas inmunes dependientes de la dosis en líneas celulares de macrófago en ratón y en CD murinas primarias, caracterizadas por la secreción de citocinas, tales como IL-12p40, IL-6 y TNF, y quimiocinas como RANTES.

**Ejemplo 5: estimulación por GLA de macrófagos y células dendríticas humanos**

Este ejemplo describe un modelo *in vitro* que demuestra el efecto adyuvante del GLA. Se emplearon metodologías de cultivo de tejidos y reactivos convencionales.

Células de la línea celular de macrófagos humanos Mono Mac 6 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) se mantuvieron según las recomendaciones del suministrador y se cultivaron como monocapas celulares adherentes en placas multipocillos. Las células dendríticas se obtuvieron a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) siguiendo un protocolo estándar. Se obtuvieron varias concentraciones de adyuvante bien de GLA sintético (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; número de producto 699800) como del producto natural MPL® (GSK Biologicals, Rixensart, Bélgica) diluyendo una preparación acuosa de adyuvante en un medio de cultivo celular (DMEM que contenía 10% de suero bovino fetal para las células Mono MAc 6, o suero humano al 10% para las CD), y las células se mantuvieron durante 24 horas a 37ºC en una atmósfera humidificada que contenía 5% de $CO_2$, antes de recoger los sobrenadantes del cultivo sin células. Se analizaron en los fluidos sobrenadantes citocinas humanas solubles, tales como IL-1□, IL-23 e IL-6 y TNF, y quimiocinas tales como IP-10, RANTES y MIP-1□, usando kits específicos de análisis por ELISA de fase doble (eBiosciences, San Diego, CA para las citocinas e Invitrogen, Carlsbad CA para las quimiocinas) según las instrucciones del fabricante.

La figura 2 muestra los datos de ELISA que demuestran los niveles de citocinas y quimiocinas expresados por macrófagos humanos de la línea celular Mono Mac 6 (paneles a-e) y derivados de PBMC (paneles f-h) como respuesta a la estimulación con GLA.

La respuesta inmune dependiente de la dosis inducida por GLA-AF en la línea celular de macrófagos humanos Mono Mac (figura 2, paneles a-e) y en las CD primarias (figura 2, paneles f-h) se caracterizó por la secreción de citocinas, tales como IL-1□, IL-6 y L-23, y quimiocinas, tales como RANTES, IP-10 y MIP-1□. El GLA-AF fue activo a concentraciones de 5-500 veces inferiores en comparación con el MPL-AF para todas las citocinas y quimiocinas que se analizaron.

**Ejemplo 6: estimulación de las células sanguíneas humanas por el GLA**

Este ejemplo describe un modelo *in vitro* que demuestra el efecto adyuvante del GLA. Se emplearon metodologías de cultivo de tejidos y reactivos convencionales.

Las células sanguíneas humanas completas se cultivaron con varias concentraciones de adyuvante bien de GLA sintético (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; número de producto 699800) o el producto natural MPL® (GSK Biologicals, Rixensart, Bélgica), obtenida diluyendo una preparación acuosa de adyuvante en un medio de cultivo celular (DMEM que contenía 10% de suero bovino fetal). Las células sanguíneas se mantuvieron durante 16 horas a 37ºC en una atmósfera humidificada que contenía 5% de $CO_2$, antes de recoger los sobrenadantes del cultivo sin células. Se analizó en los fluidos sobrenadantes la citocina IL-1□ soluble humana usando un kit específico de análisis por ELISA de fase doble (eBiosciences, San Diego, CA) según las instrucciones del fabricante.

El GLA-AF indujo una respuesta inmune dependiente de la dosis en células sanguíneas completas humanas, caracterizada por la secreción de citocina IL-1□. En este análisis 92 nM de GLA tuvieron una potencia equivalente a 57.000 nM de MPL-AF.

**Ejemplo 7: Uso *in vivo* de la vacuna que contiene GLA**

Este ejemplo describe un modelo *in vivo* que demuestra un efecto adyuvante en una vacuna frente a la gripe. Se emplearon métodos y reactivos inmunológicos estándar (*Currents Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* (eds) 2006, John Wiley & Sons, NY).

Se inmunizaron ratones (tres animales Balb/c por grupo) dos veces en intervalos de tres semanas con la vacuna Fluzone (Sanofi-Aventis, Swiftwater, PA, en dosis humanas de 1/25 (20 □l) y 1/250 ml (2 □l), sola, o formulada en (i) una emulsión acuosa que contenía GLA (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; número de producto 699800) 20 □g por animal para cada inmunización) según el procedimiento usado en el ejemplo 1 anterior ("GLA-AF"), o (ii) una emulsión estable que contenía GLA (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; número de producto 699800; 20 □g por animal para cada inmunización) según el procedimiento usado en el ejemplo 3 anterior ("GLA-SE"). Se recogieron los sueros mediante extracción sanguínea a los animales una semana después de cada inmunización, y se analizaron por ELISA los niveles en suero de los anticuerpos IgG totales específicos para la Fluzona, según los métodos publicados (*Ibid.*). Los niveles en suero de los virus que neutralizan los anticuerpos también se analizaron mediante un análisis de inhibición de la hemaglutinación (HAI) según métodos publicados.

La figura 3 muestra los datos de ELISA que demuestran los niveles de producción de anticuerpo anti-Fluzone inducido en ratón una semana después de cada inmunización (es decir, el 7º día, panel A y el 28º día, panel B) usando dos dosis diferentes de la vacuna Fluzone formulada con GLA-AF, o GLA-SE, en comparación con Fluzone sola. Se muestran los valores de las medias y EEM de los valores finales recíprocos para cada grupo/tiempo. La parte C de la figura 3 muestra los datos del análisis por HAI que demuestran los niveles de producción de anticuerpo que neutraliza al virus inducido en el ratón una semana después de la inmunización usando dos dosis diferentes de la vacuna Fluzone formulada con GLA-AF o GLA-SE en comparación con Fluzone sola. Se muestran los valores de las medias y EEM de los valores finales recíprocos en cada grupo/tiempo.

Los valores de IgG total y anticuerpo neutralizante como respuesta a la vacunación con Fluzona mejoraron al añadir GLA, bien en formulación acuosa o bien en formulación oleosa estable. El efecto como adyuvante del GLA fue mayor con la dosis de 2 □l de vacuna Fluzona e indujo respuestas humorales específicas del antígeno similares a (GLA-AF) o mayores que (GLA-SE) que las de 20 □l de vacuna Fluzone sola. Estos resultados sugieren que es posible reducir la dosis de vacuna Fluzona usando como adyuvante formulaciones que contengan GLA induciendo al mismo tiempo niveles elevados de IgG y de anticuerpo neutralizante. Esto es de particular importancia en el contexto de una infección pandémica mundial como en el caso de la gripe aviar.

**Ejemplo 8: Uso *in vivo* de una vacuna que contiene GLA**

Este ejemplo describe un modelo *in vivo* que demuestra un efecto adyuvante del GLA en una vacuna que contiene un antígeno de *Leishmania* específico. Se emplearon métodos y reactivos inmunológicos estándar (*Currents Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* (eds) 2006, John Wiley & Sons, NY).

Los ratones (tres animales C57BL/6 por grupo) se inmunizaron tres veces en intervalos de tres semanas con el antígeno SMT (10 □g por animal en cada inmunización) usado solo o formulado en una emulsión estable que contenía GLA (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; número de producto 699800; 20 □g por animal en cada inmunización) según el procedimiento usado en el ejemplo 3 anterior (GLA-SE).Se recogieron los sueros mediante extracción sanguínea a los animales una semana después de la tercera inmunización y se analizaron por ELISA los niveles en suero de los anticuerpos IgG1 e IgG2c específicos para el antígeno SMT, según métodos publicados.

La figura 4 muestra los datos de ELISA que demuestran los niveles de producción de anticuerpo anti-SMT inducida en ratón una semana después de la tercera inmunización usando antígeno SMT solo, o formulado con GLA-SE. Se muestran las medias y EEM de los valores finales recíprocos.

La predominancia de isotipo de anticuerpo, bien IG1 o bien IgG2c, se asocia con respuestas TH2 o TH1 respectivamente. Se ha demostrado que una respuesta TH1 es necesaria para la protección frente a la infección por *Leishmania*. La vacunación con SMT sola indujo predominantemente anticuerpo IgG1 específico para la SMT. La

vacunación con SMT + GLA-SE indujo valores de anticuerpo mayores y revirtió el fenotipo a una respuesta de anticuerpo específico del antígeno IgG2c predominantemente, asociada con la protección frente a la enfermedad.

**Ejemplo 9: Uso *in vivo* de una vacuna que contiene GLA**

Este ejemplo describe un modelo *in vivo* que demuestra un efecto adyuvante del GLA en una vacuna que contiene un antígeno de *Leishmania* específico. Se emplearon métodos y reactivos inmunológicos estándar (*Currents Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* (eds) 2006, John Wiley & Sons, NY).

Los ratones (tres animales Balb/c por grupo) se inmunizaron tres veces en intervalos de dos semanas con el antígeno Leish-110f (10 □g por animal en cada inmunización) formulado en una emulsión estable que contenía diferentes cantidades de GLA (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; número de producto 699800; 40, 20, 5 ó 1 □g por animal en cada inmunización) según el procedimiento usado en el ejemplo 3 anterior (GLA-SE).Se recogieron los sueros mediante extracción sanguínea a los animales una semana después de la tercera inmunización y se analizaron por ELISA los niveles en suero de los anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos para el antígeno Leish-110g, según métodos publicados (*Ibid.*)

La figura 5 muestra los datos de ELISA que demuestran los niveles de producción de anticuerpo anti-Leish-110f inducida en ratones una semana después de la primera inmunización usando antígeno Leish-110f formulado con diferentes cantidades de GLA (40, 20, 5 ó 1 □g) en comparación con controles salinos. Se muestran las medias y el EEM de los valores finales recíprocos en cada grupo.

Los valores de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos para Leish-110f presentaron una dependencia con la dosis de GLA. Se observó una predominancia de la respuesta TH1 asociada con el anticuerpo IgG2a para todas las concentraciones de GLA analizadas.

**Ejemplo 10: Uso *in vivo* de una vacuna que contiene GLA**

Este ejemplo describe un modelo *in vivo* que demuestra un efecto adyuvante del GLA en una vacuna que contiene un antígeno de *Leishmania* específico. Se emplearon métodos y reactivos inmunológicos estándar (*Currents Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* (eds) 2006, John Wiley & Sons, NY).

Los ratones (tres animales Balb/c por grupo) se inmunizaron tres veces en intervalos de tres semanas con el antígeno Leish-111f (10 □g por animal en cada inmunización) formulado en una emulsión estable que contenía GLA (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; número de producto 699800; 20 □g por animal en cada inmunización) según el procedimiento usado en el ejemplo 3 anterior (GLA-SE). Dos semanas después de la última inyección, se sacrificaron los ratones y se recogió el bazo para analizar por ELISA, según métodos publicados, las respuestas de citocinas IFN-□ e IL-4 dependiente de las células T a la estimulación *in vitro* con el antígeno.

La predominancia de una u otra citocina, bien IL-4 o bien IFN-□, está asociada con las respuestas TH2 o TH1 respectivamente. Se ha demostrado que es necesaria una respuesta TH1 para la protección frente a la infección por *Leishmania*. Todos los animales respondieron bien a ConA, potente mitógeno. La vacunación con Leish-111f + GLA-SE indujo respuestas de citocina específicas del antígeno Leish-111f, mientras que no se observaron dichas respuestas en el grupo de control salino. En comparación con el ConA, la vacunación con Leish-111f + GLA-SE indujo mucho más IFN-□ que IL-4, una relación TH1:TH2 o fenotipo asociado con la protección frente a la enfermedad.

**Ejemplo 11: Uso *in vivo* de una vacuna que contiene GLA**

Este ejemplo describe un modelo *in vivo* que demuestra un efecto adyuvante del GLA en una vacuna que contiene un antígeno de *Leishmania* específico. Se emplearon métodos y reactivos inmunológicos estándar (*Currents Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* (eds) 2006, John Wiley & Sons, NY).

Los ratones (tres animales Balb/c por grupo) se inmunizaron tres veces en intervalos de dos semanas con el antígeno Leish-110f (10 □g por animal en cada inmunización) formulado en una emulsión estable que contenía diferentes cantidades de (i) GLA (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; número de producto 699800; 40, 5 ó 1 □g por animal en cada inmunización) según el procedimiento usado en el ejemplo 3 anterior (GLA-SE), o (ii) MPL® (40, 5 ó 1 □g por animal en cada inmunización) en una emulsión suministrada por el fabricante (“MPL-SE, GSE Biologicals, Rixensart, Bélgica). Una semana después de la última inyección, se sacrificaron los ratones y se recogió el bazo para analizar por ELISA, según métodos publicados (*Ibid.*), las respuestas de citocina IFN-□ dependiente de las células T a la estimulación *in vitro* con el antígeno. Las respuestas de citocina IFN-□ han sido asociadas con un fenotipo protector TH1 frente a la infección por *Leishmania*.

La figura 6 muestra los datos de ELISA que demuestran niveles de producción de citocina IFN-□ anti-Leish-110f inducida en ratones una semana después de la tercera inmunización usando antígeno Leish-110f formulado con diferentes cantidades de GLA en comparación con controles salinos. En cada grupo se muestran las medias y los EEM.

Todos los animales respondieron bien a ConA, un potente activador celular y mitógeno. La vacunación con Leish-110f + GLA-SE indujo respuestas de citocina específicas del antígeno Leish-110f dependientes de la dosis, mientras que no se observaron dichas respuestas en el grupo de control salino. Para todas las concentraciones analizadas, el GLA-SE fue más potente que el MPL-SE en la inducción de niveles mayores de IFN-□ secretado por células T específicas para el antígeno.

En conclusión, la adición de GLA en una formulación oleosa estable al antígeno Leish-110f candidato para una vacuna frente a la *Leishmania* indujo predominantemente respuestas inmunes específicas del antígeno del tipo celular (células T) asociado con el fenotipo protector TH1. Además, el GLA-SE fue más potente que el MPL-SE en la inducción de citocinas asociadas a la protección, como el IFN-□.

**Ejemplo 12: Uso *in vivo* de una vacuna que contiene GLA**

Este ejemplo describe un modelo *in vivo* que demuestra un efecto adyuvante del GLA en una vacuna que contiene un antígeno de *Leishmania* específico. Se emplearon métodos y reactivos inmunológicos estándar (*Currents Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* (eds) 2006, John Wiley & Sons, NY).

Los ratones (tres animales Balb/c por grupo) se inmunizaron tres veces en intervalos de dos semanas con el antígeno Leish-110f (10 □g por animal en cada inmunización) formulado en una emulsión estable que contenía diferentes cantidades de (i) GLA (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; número de producto 699800; 20 □g o 5 □g por animal en cada inmunización) según el procedimiento usado en el ejemplo 3 anterior (GLA-SE), o (ii) MPL® (20 □g o 5 □g por animal en cada inmunización) en una emulsión suministrada por el fabricante ("MPL-SE, GSE Biologicals, Rixensart, Bélgica). Una semana después de la última inyección, se sacrificaron los ratones y se recogió el bazo para analizar por tinción celular intracelular (ICS) y por citometría de flujo, según métodos publicados (*Ibid.*), las respuestas de citocinas IFN-□, IL-2 y TNF dependiente de las células T a la estimulación *in vitro* con el antígeno. Estas tres citocinas han sido asociadas con un fenotipo protector TH1 frente a la infección por *Leishmania*.

Cuando se analiza a nivel celular, la frecuencia de células T CD4+ que expresan las tres citocinas IFN-□, IL-2 y TNF, o en una combinación de IFN-□ e IL-2, fue mayor en el grupo Leish-110f + GLA-SE en comparación con el grupo Leish-110f + MPL-SE, y esto se observó tanto para dosis de 20 □g como de 5 □g. Se ha publicado (Seder *et al.*) que elevadas frecuencias de células T CD4+ que expresan las tres citocinas IFN-□, IL-2 y TNF se correlaciona con la protección frente a la infección por *Leishmania*.

En conclusión, la adición de GLA en una formulación oleosa estable al antígeno Leish-110f candidato para una vacuna frente a la *Leishmania* indujo predominantemente respuestas inmunes específicas del antígeno del tipo celular (células T) asociado con el fenotipo protector TH1. Además, el GLA-SE fue más potente que el MPL-SE en la inducción de citocinas asociadas a la protección, como IFN-□, IL-2 y TNF.

**Ejemplo 13: Uso *in vivo* de una vacuna que contiene GLA**

Este ejemplo describe un modelo *in vivo* que demuestra un efecto adyuvante del GLA en una vacuna que contiene un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* específico. Se emplearon métodos y reactivos inmunológicos estándar (*Currents Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* (eds) 2006, John Wiley & Sons, NY).

Los ratones (tres animales C57BL/6 por grupo) se inmunizaron tres veces en intervalos de tres semanas con el antígeno ID83 (8 □g por animal en cada inmunización) usado solo o formulado en una emulsión estable que contenía GLA (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; número de producto 699800; 20 □g por animal en cada inmunización) según el procedimiento usado en el ejemplo 3 anterior (GLA-SE). Se recogieron los sueros mediante extracción sanguínea a los animales una semana después de la tercera inmunización y se analizaron por ELISA, según métodos publicados (*Ibid.*), los niveles en suero de los anticuerpos IgG1 e IgG2c específicos para el ID83. La predominancia de isotipo de anticuerpo, bien IG1 o bien IgG2c, se asocia con respuestas TH2 o TH1 respectivamente. Se ha demostrado que una respuesta TH1 es necesaria para la protección frente a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

La vacunación con ID83 solo indujo predominantemente un anticuerpo IgG1 específico del antígeno. Por el contrario, la vacunación con ID83 + GLA-SE indujo mayores niveles de anticuerpo y revertió el fenotipo a una respuesta de anticuerpo específica del antígeno IgG2c predominantemente, asociada con la protección frente a la enfermedad.

**Ejemplo 14: Uso *in vivo* de una vacuna que contiene GLA**

Este ejemplo describe un modelo *in vivo* que demuestra un efecto adyuvante del GLA en una vacuna que contiene un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* específico. Se emplearon métodos y reactivos inmunológicos estándar (*Currents Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* (eds) 2006, John Wiley & Sons, NY).

Los ratones (tres animales C57BL/6 por grupo) se inmunizaron tres veces en intervalos de tres semanas con el antígeno ID83 (8 □g por animal en cada inmunización) usado solo o formulado en una emulsión estable que contenía GLA (GLA-SE), GLA + CpG ($CpG_{1826}$, Coley Pharmaceuticals, 25 □g) (GLA/CpG-SE), o GLA + Gardiquimod (GDQ)

(Invivogen, 20 □g) (GLA/GDQ-SE). Tres semanas después de la última inyección, los ratones se sacrificaron y se recogió el bazo para analizar por ICS y citometría de flujo, según métodos publicados, las respuestas de citocinas IFN-□, IL-2 y TFN dependientes de las células CD4+ y CD8+ a la estimulación *in vitro* con el antígeno ID83 por citometría de flujo de acuerdo con los métodos publicados. La expresión de IFN-γ, IL-2 y las citocinas TNF han sido asociadas a las respuestas protectoras de TH1 contra la infección por *M. tuberculosis.*

La figura 7 muestra los datos de ICS que demuestran las frecuencias de células T CD4+ y CD8+ que producen citocinas IFN-□, IL-2 y TNF específicas para ID83, Inducidas en ratones una semana después de la tercera inmunización usando ID83 solo o con formulaciones adyuvantes que contenían GLA (GLA-SE), GLA + CpG (GLA/CpG-SE) o GLA + GDQ (GLA/GDQ-SE).

Las frecuencias de células T CD4+ o CD8+ que producen citocinas específicas para ID83 estuvieron al nivel del ruido para los grupos de control salino y la vacuna con ID83 solo. Las células T que producen citocina específica para el antígeno ID83, tanto CD4+ como CD8+, fueron inducidas por la vacunación con ID83 + GLA-SE, y su frecuencia se aumento adicionalmente mediante la adición de un segundo ligando TLR como el GDQ (TLR7/8) o CpG (TLR9). Las células T que expresan IFN-□+TNF o IFN-□+IL-2 fueron las poblaciones predominantes.

En conclusión, añadir al antígeno frente a *M. tuberculosis* un adyuvante con GLA-SE aumenta de manera importante la respuesta celular específica del antígeno (células T) medida por las frecuencias de células T que expresan citocinas IFN-□, IL-2 y/o TNF. La combinación del GLA-SE con otro ligando TLR aumentó adicionalmente la frecuencia de las células que producen citocinas específicas del antígeno, un fenotipo asociado con la protección frente a esta enfermedad.

**Ejemplo 15: Uso *in vivo* de una vacuna que contiene GLA**

Este ejemplo describe un modelo *in vivo* que demuestra un efecto adyuvante del GLA en una vacuna que contiene un antígeno de *Mycobacterium leprae* específico. Se emplearon métodos y reactivos inmunológicos estándar (*Currents Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* (eds) 2006, John Wiley & Sons, NY).

Los ratones (tres animales C57BL/6 por grupo) se inmunizaron tres veces en intervalos de tres semanas con el antígeno ML0276 (10 □g por animal en cada inmunización) con un adyuvante de formulaciones acuosas de CpG ($CpG_{1826}$, Coley Pharmaceuticals, 25 □g por animal en cada inmunización), o imiquimod (IMQ) (3M Pharma, 25 □g por animal en cada inmunización), o GLA (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; número de producto 699800; 25 □g por animal en cada inmunización, según el procedimiento usado en el ejemplo 3 anterior, GLA-SE), una mezcla de los tres o disolución salina como control negativo. Se recogieron los sueros mediante extracción sanguínea a los animales tres semanas después de la segunda inmunización y se analizaron por ELISA, según métodos publicados (*Ibid.*), los niveles en suero de los anticuerpos IgG.

Los animales del grupo de control salino no mostraron IgG específico para ML0276 y los de los grupos ML0276 + CpG y ML0276 + IMQ mostraron un nivel muy bajo de anticuerpo específico para el antígeno. Por el contrario, la vacunación con ML0276 + GLA-SE indujo un nivel significante de IgG específico de ML0276, que fue aumentado adicionalmente cuando se usaron los tres adyuvantes juntos.

En conclusión, los datos apoyan el efecto adyuvante del GLA-SE y/o una combinación de GLA-SE con ligandos TLR adicionales cuando se usa con el antígeno ML0276 para la inducción de anticuerpos específicos del antígeno.

**Ejemplo 16: Uso *in vivo* de una vacuna que contiene GLA**

Este ejemplo describe un modelo *in vivo* que demuestra un efecto adyuvante del GLA en una vacuna que contiene un antígeno de *Mycobacterium leprae* específico. Se emplearon métodos y reactivos inmunológicos estándar (*Currents Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* (eds) 2006, John Wiley & Sons, NY).

Los ratones (tres animales C57BL/6 por grupo) se inmunizaron tres veces en intervalos de tres semanas con el antígeno ML0276 (10 □g por animal en cada inmunización) con un adyuvante de formulaciones acuosas de CpG ($CpG_{1826}$, Coley Pharmaceuticals, 25 □g por animal en cada inmunización), o imiquimod (IMQ) (3M Pharma, 25 □g por animal en cada inmunización), o GLA (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; número de producto 699800; 25 □g por animal en cada inmunización, según el procedimiento usado en el ejemplo 3 anterior, GLA-SE), una mezcla de los tres o disolución salina como control negativo. Tres semanas después de la última inmunización se sacrificaron los ratones y se recogió el bazo para analizar por ICS y citometría de flujo, según métodos publicados, las respuestas de citocina IFN-□ dependiente de las células T CD4+ a la estimulación con antígeno ML0276. La expresión de citocina IFN-□ ha sido asociada con respuestas TH1 protectoras frente a la infección por *M. leprae*.

En la figura 8, el panel A muestra los datos de ICS que demuestran las frecuencias de células T CD4+ que producen citocina IFN-□ específica para ML0276 inducidas en ratón una semana después de la tercera inmunización usando antígeno ML0276 formulado con formulaciones acuosas que contienen CpG, o Imiquimod (IMQ) o una emulsión oleosa estable que contiene GLA (GLA-SE) o los tres mezclados juntos, en comparación con controles de disolución salina y control *naive*. Se muestran las medias en cada grupo. El panel B de la figura 8 muestra los datos que demuestran la

celularidad de los ganglios linfáticos que drenan el lugar de la infección con *M. leprae* en ratones inmunizados con antígeno ML0276 formulado con formulaciones acuosas que contienen CpG o imiquimod (IMQ) o una emulsión oleosa estable que contiene GLA (GAL-SE) o una mezcla de los tres, en comparación con los controles de disolución salina o *naïve*. En cada grupo se muestran las medias y EEM.

Los animales del grupo control de disolución salina no mostraron respuestas de IFN-□ específicas para ML0276 con una frecuencia de fondo de 0,04% de células positivas. Los de los grupos CpG e IMQ mostraron una frecuencia débilmente mayor de células que producen citocina específica para el antígeno con 0,17% y 0,11% respectivamente. Por el contrario, se observó un número significativamente mayor de células T CD4+ que producen IFN-□ específico para ML0276 (0,66%) cuando se usó GLA-SE como adyuvante, una frecuencia que fue aumentada adicionalmente cuando se mezclaron los tres adyuvantes (2,14%).

Subsiguientemente, un subgrupo de ratones se estimuló con *M. leprae* y se encontró que estaban protegidos por la vacuna con ML0276 + GLA-SE, según las medidas de la reducción del número de células en los nodos linfáticos que drenan el lugar de estimulación en comparación con los controles de disolución salina infectados. La vacunación con ML0276 + CpG y con ML0276 + IMQ indujo solo una pequeña disminución en el número de células en comparación con el control salino.

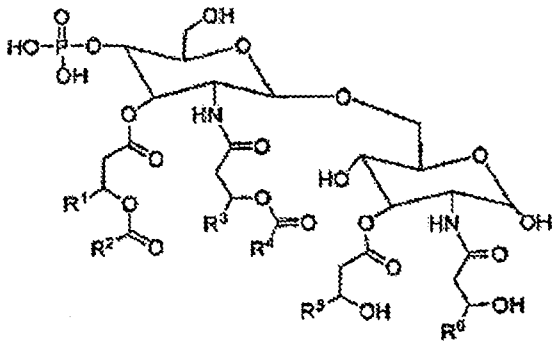
En conclusión, los datos apoyan el efecto como adyuvante del GLA-SE y/o una combinación de GLA-SE con ligandos TLR adicionales cuando se usan con el antígeno ML0276 para la inducción de respuestas celulares específicas del antígeno.

## REIVINDICACIONES

1.- Una composición de vacuna que comprende:

(a) un antígeno; y

(b) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), en el que el GLA tiene la fórmula:



en la que:

$R^1$, $R^3$, $R^5$ y $R^6$ son iguales a undecilo; y

$R^2$ y $R^4$ son iguales a tridecilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

2.- La composición de vacuna según la reivindicación 1, que comprende además al menos un componente adicional elegido entre el grupo que consiste en:

(a) un agonista del receptor de tipo *toll* (TLR);

(b) una saponina o mimético de la saponina;

(c) un vehículo que comprende al menos uno entre un aceite e ISCOMATRIX™;

(d) un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina;

(e) un modificador inmune de doble tallo en bucle (dSLIM);

(f) un coadyuvante; y

(g) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

3.- La composición de vacuna según la reivindicación 2, en la que:

(i) el coadyuvante, si está presente, se elige entre el grupo que consiste en alumbre, un alcaloide de una planta y un detergente, donde el alcaloide de planta se elige de tomatina, y el detergente se elige entre saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina;

(ii) el agonista del TLR, si está presente, se elige entre el grupo que consiste en un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LelF) y al menos un antígeno de la hepatitis C;

(iii) el modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, si está presente, se elige entre el grupo que consiste en resiquimod (R848) imiquimod y gardiquimod;

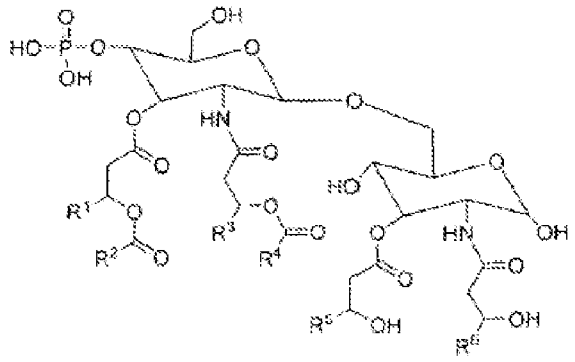
(iv) el coadyuvante, si está presente, se elige entre el grupo que consiste en una citocina, un detergente, un copolímero de bloques o un polímero biodegradable; y

(v) el vehículo farmacéuticamente aceptable, si está presente, comprende un vehículo que se elige entre el grupo que consiste en fosfato de calcio, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un liposoma y una micropartícula.

4.- La composición de vacuna según la reivindicación 1, en la que el antígeno comprende al menos un antígeno polipeptídico o al menos un constructo de expresión recombinante que comprende un promotor unido de forma operativa a una secuencia de ácido nucleico que codifica la menos un antígeno polipeptídico.

5.- La composición de vacuna según la reivindicación 1, en la que el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, (i) al menos un patógeno infeccioso que está asociado con una enfermedad infecciosa, (ii) al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con el cáncer, o (iii) al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con una enfermedad autoinmune,

6.- Una composición para usara para producir o aumentar una respuesta inmune específica del antígeno, deseada en un sujeto, comprendiendo la composición (a) un antígeno; y (b) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA), en la que el antígeno se obtiene a partir de, o presenta reactividad inmunológica cruzada con, (i) al menos un patógeno infeccioso, (ii) al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con un cáncer, o (iii) al menos un epítope, biomolécula, célula o tejido que está asociado con una enfermedad autoinmune, y producir o aumentar de este modo una respuesta inmune específica del antígeno deseada, donde el GLA tiene la fórmula:



en la que:

$R^1$, $R^3$, $R^5$ y $R^6$ son iguales a undecilo; y

$R^2$ y $R^4$ son iguales a tridecilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

7.- La composición de vacuna según la reivindicación 6, que comprende además al menos un componente adicional elegido entre el grupo que consiste en:

(a) un agonista del receptor de tipo *toll* (TLR);

(b) una saponina o mimético de la saponina;

(c) un vehículo que comprende al menos uno entre un aceite e ISCOMATRIX™;

(d) un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina:

(e) un modificador inmune de doble tallo en bucle (dSLIM);

(f) un coadyuvante; y

(g) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8.- La composición de vacuna según la reivindicación 7, en la que:

(i) el coadyuvante, si está presente, se elige entre el grupo que consiste en alumbre, un alcaloide de una planta y un detergente, donde el alcaloide de planta se elige de tomatina, y el detergente se elige entre saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina;

(ii) el agonista del TLR, si está presente, se elige entre el grupo que consiste en un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C;

(iii) el modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, si está presente, se elige entre el grupo que consiste en resiquimod (R848) imiquimod y gardiquimod;

(iv) el coadyuvante, si está presente, se elige entre el grupo que consiste en una citocina, un detergente, un copolímero de bloques o un polímero biodegradable; y

(v) el vehículo farmacéuticamente aceptable, si está presente, comprende un vehículo que se elige entre el grupo que consiste en fosfato de calcio, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un liposoma y una micropartícula.

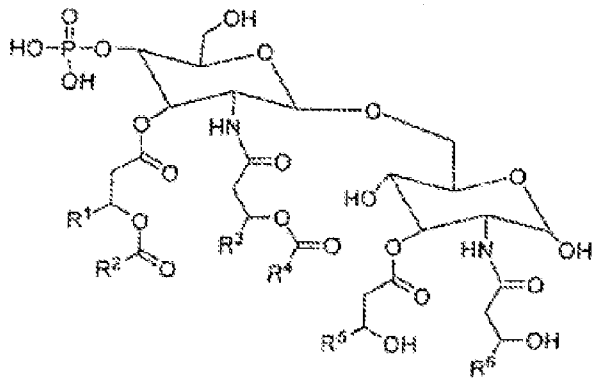
9.- La composición para ser usada según la reivindicación 6, en la que el antígeno comprende al menos un antígeno un antígeno polipeptídico o al menos un constructo de expresión recombinante que comprende un promotor unido de forma operativa a una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un antígeno polipeptídico.

10.- Una composición farmacéutica para usarla para producir o aumentar una respuesta inmune de un paciente, que comprende:

(a) un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y

(b) un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable,

y en el que el GLA tiene la fórmula:



en la que:

$R^1$, $R^3$, $R^5$ y $R^6$ son iguales a undecilo; y

$R^2$ y $R^4$ son iguales a tridecilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

11.- La composición farmacéutica para usarla según la reivindicación 10, que comprende además al menos un componente adicional elegido entre el grupo que consiste en:

(a) un agonista del receptor de tipo *toll* (TLR);

(b) una saponina;

(c) un vehículo que comprende al menos uno entre un aceite e ISCOMATRIX™;

(d) un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina;

(e) un modificador inmune de doble tallo en bucle (dSLIM);

(f) un coadyuvante; y

(g) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

12.- La composición farmacéutica para usarla según la reivindicación 11, en la que:

(i) el coadyuvante, si está presente, se elige entre el grupo que consiste en alumbre, un alcaloide de una planta y un detergente, donde el alcaloide de planta se elige de tomatina, y el detergente se elige entre saponina, Polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina;

(ii) el agonista del TLR, si está presente, se elige entre el grupo que consiste en un lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo del factor de elongación e iniciación 4a ribosómico eucariota en *Leishmania* (LeIF) y al menos un antígeno de la hepatitis C;

(iii) el modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, si está presente, se elige entre el grupo que consiste en resiquimod (R848) imiquimod y gardiquimod;

(iv) el coadyuvante, si está presente, se elige entre el grupo que consiste en una citocina, un detergente, un copolímero de bloques o un polímero biodegradable; y

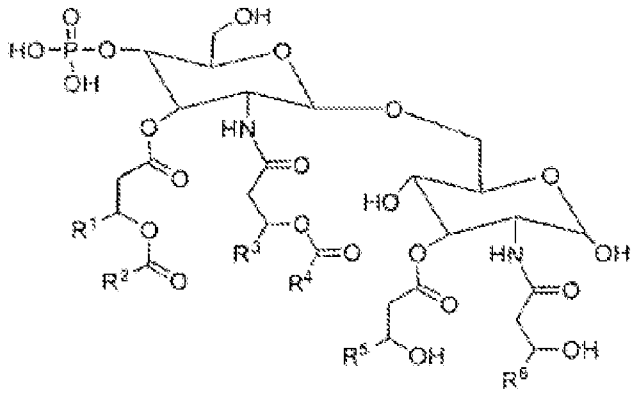
(v) el vehículo farmacéuticamente aceptable, si está presente, comprende un vehículo que se elige entre el grupo que consiste en fosfato de calcio, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un liposoma y una micropartícula.

13.- La composición farmacéutica para usarla según la reivindicación 10 para ser usada para estimular una respuesta inmune no específica en un sujeto.

14.- Un kit que comprende:

(a) una composición que comprende un adyuvante lípido de glucopiranosilo (GLA); y una vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable; y

(b) un antígeno en un segundo contenedor, donde la composición inmunológica no está en contacto con el antígeno, y donde el GLA tiene la fórmula:



en la que:

$R^1$, $R^3$, $R^5$ y $R^6$ son iguales a undecilo; y

$R^2$ y $R^4$ son iguales a tridecilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

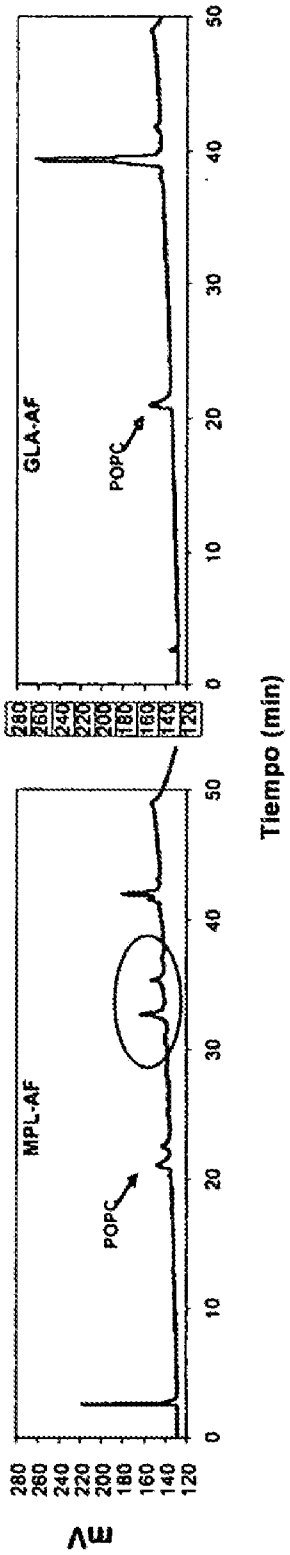



**Figura 1. Cromatograma por HPLC del MPL-AF y el GLA-AF**

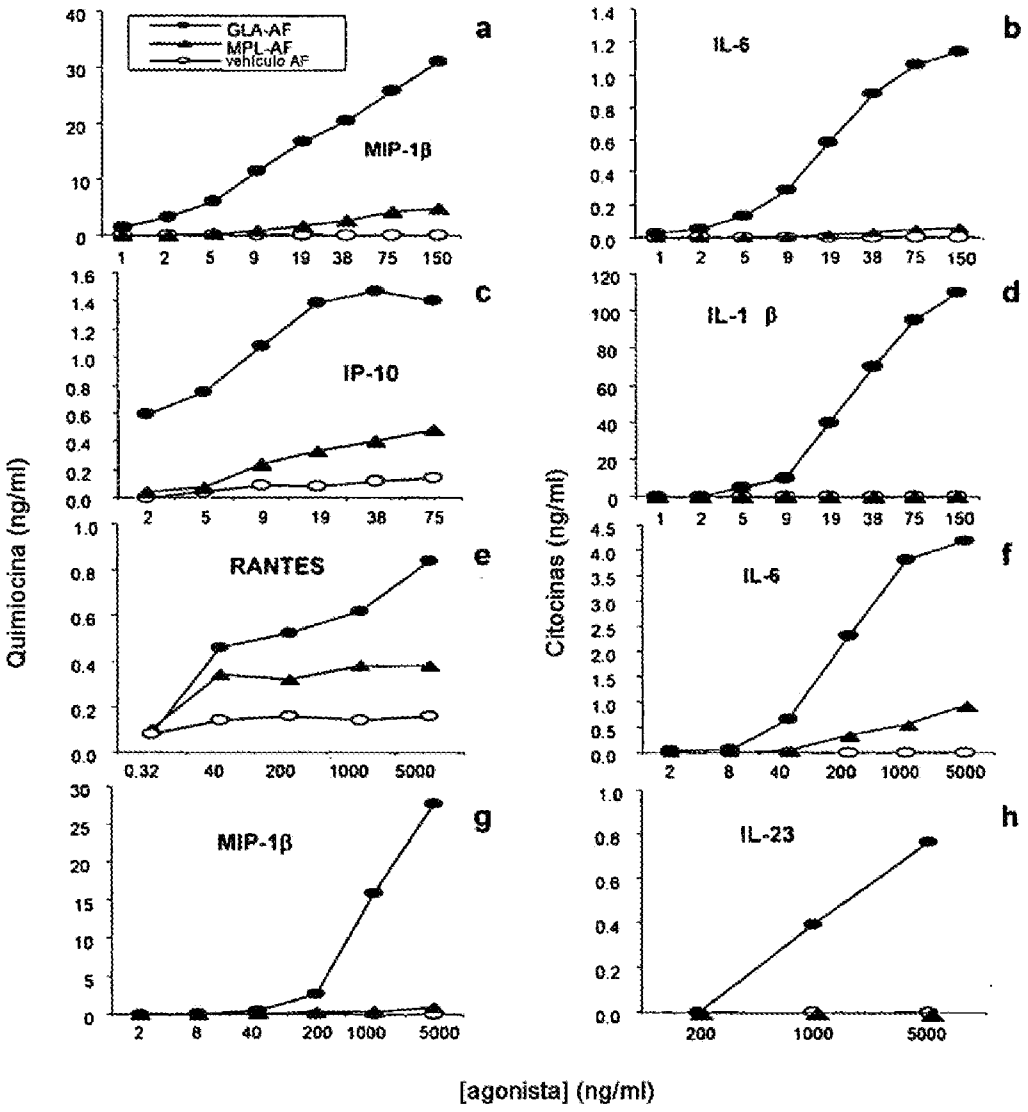



Figura 2. Efecto estimulador del GLA sobre células humanas que presentan antígenos

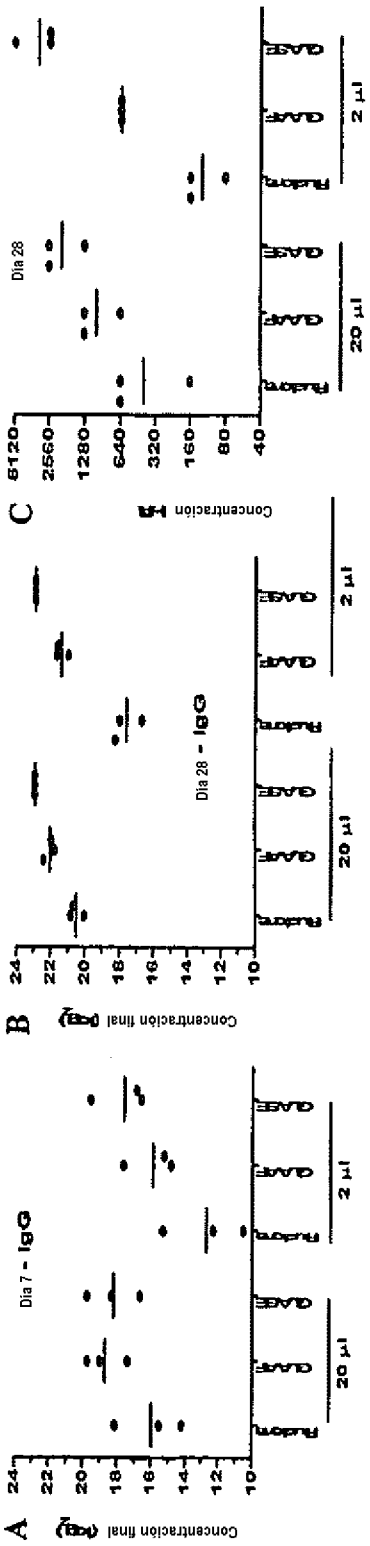



**Figura 3. Efecto del adyuvante de GLA-AF y GLA-SE en la vacuna de la gripe**

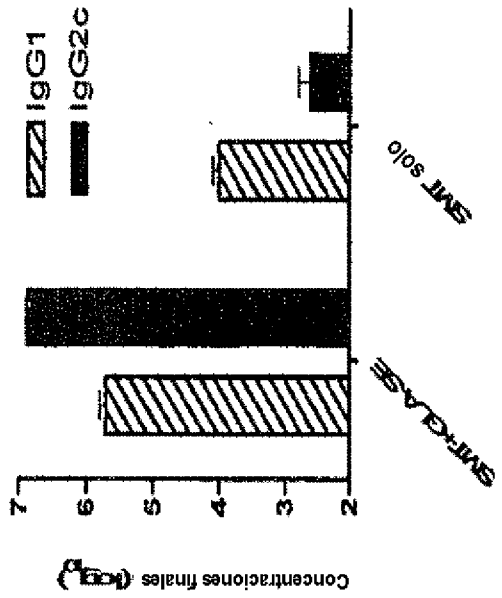



**Figura 4.Efecto adyuvante del GLA-SEsobre la respuesta humoral al antígeno SMT de *Leishmania***

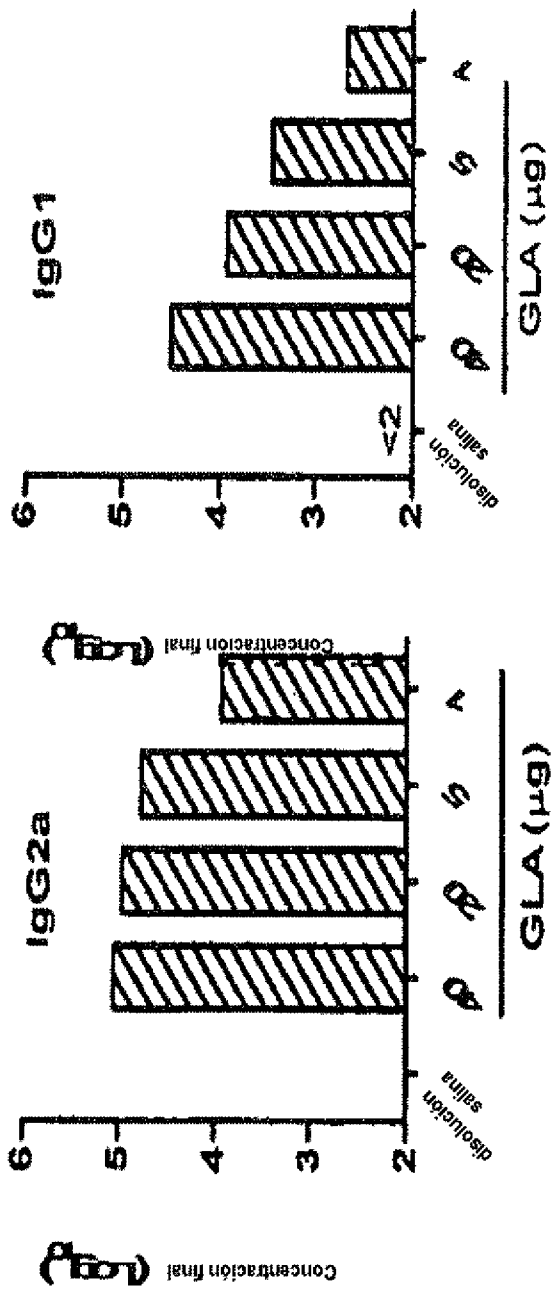



**Figura 5. Respuestas humorales específicas a Leish-110f**

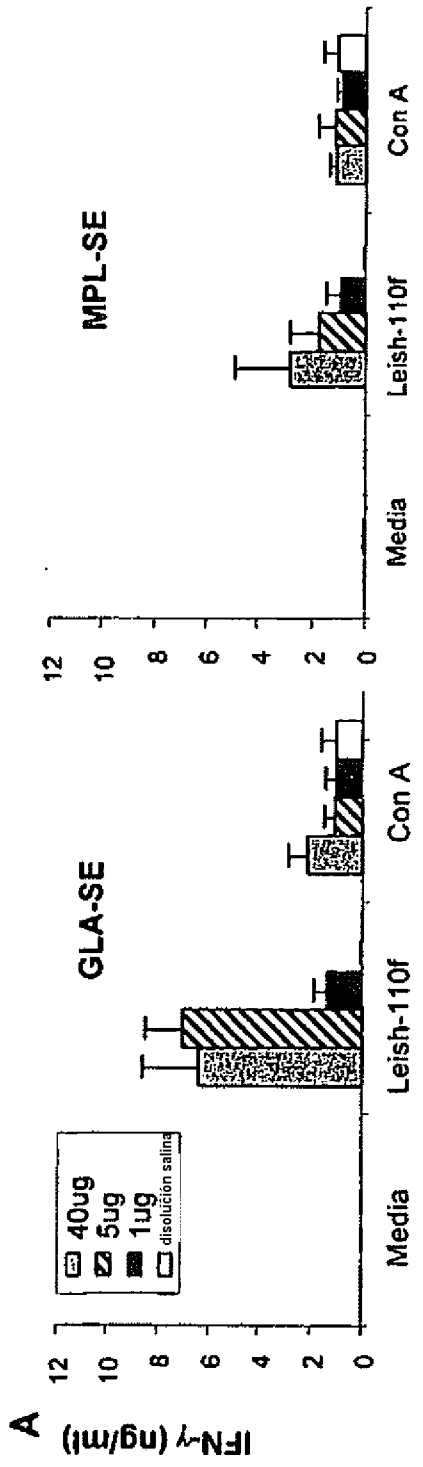



**Figura 6. Respuestas de citocina específicas Th1/Th2 a Lesih 110-f**

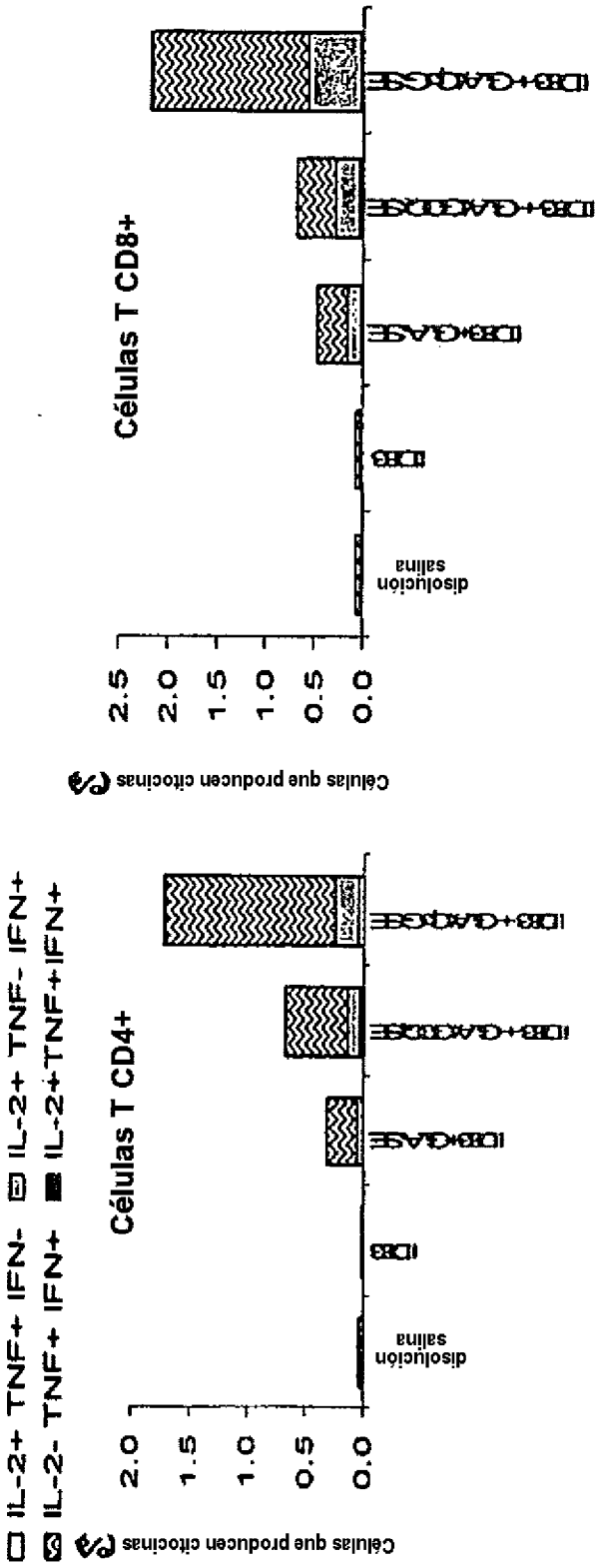



**Figura 7. Respuestas celulares específicas para el ID83**

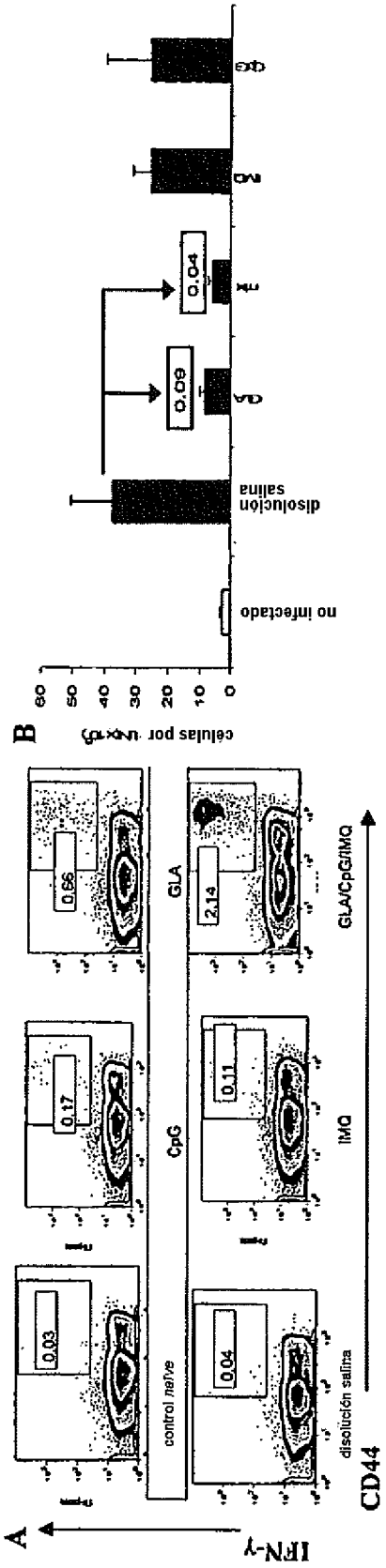



**Figura 8. Respuestas celulares específicas para el ML0276**