

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 831**

21 Número de solicitud: 201331159

51 Int. Cl.:

**C07C 317/28** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**26.07.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**08.10.2013**

Fecha de la concesión:

**28.07.2014**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**04.08.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)  
Hospital Real. Avda. del Hospicio s/n  
18071 Granada (Granada) ES**

72 Inventor/es:

**OSUNA CARRILLO DE ALBORNOZ, Antonio;  
CRUZ BUSTOS, Teresa y  
SANTOYO GONZÁLEZ, Francisco**

54 Título: **Adyuvante inmunológico para la formulación de vacunas y vacuna frente a Leishmaniasis que lo comprende**

57 Resumen:

Adyuvante inmunológico para la formulación de vacunas y vacuna frente a Leishmaniasis que lo comprende.

La presente invención se refiere al uso de compuestos que comprenden una molécula de naturaleza lipídica y un grupo vinil sulfona como adyuvante inmunológico. La molécula lipídica se une a un antígeno para formar un lipopéptido que actúa como vacuna. Además, la presente invención también se refiere a un inmunoadyuvante que comprende dichos compuestos, a una vacuna que comprende estos lipopéptidos, es decir, el compuesto de la invención utilizado como inmunoadyuvante y un antígeno y de forma particular, a la vacuna descrita anteriormente para Leishmaniasis.

ES 2 424 831 B1

**DESCRIPCIÓN**

**ADYUVANTE INMUNOLÓGICO PARA LA FORMULACIÓN DE VACUNAS Y  
VACUNA FRENTE A LEISHMANIASIS QUE LO COMPRENDE**

**CAMPO DE LA INVENCION**

5

La presente invención se refiere a inmunoadyuvantes o adyuvantes inmunológicos y a vacunas que los comprenden. Más particularmente, se refiere a vacunas frente a Leishmaniasis que comprenden dichos inmunoadyuvantes.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA**

**Vacunas**

15

Las vacunas constituyen, en las enfermedades para las que existen, el mejor método de prevención de cara a la salud personal y pública, teniendo como éxito indiscutible la inducción de una inmunoprofilaxis creada tras la vacunación. Ello ha llevado a la eliminación de algunas enfermedades que han supuesto auténticas lacras para la sanidad mundial, caso de la viruela, y a la casi desaparición de muchas de las enfermedades infecciosas que han azotado la humanidad, en aquellas poblaciones donde se practica este tipo de inmunoprofilaxis.

20

Las vacunas por lo general poseen dos ventajas sustanciales, son económicas y no inducen resistencias a los fármacos en los patógenos frente a las que van dirigidas.

25

En el caso de enfermedades virales, o para aquellas en las que la quimioterapia es inexistente, costosa o muy tóxica, constituyen la mejor forma de lucha.

30

Las vacunas inducen en el sistema inmunitario respuestas eficaces frente al agente infeccioso causante de la enfermedad o frente a las toxinas liberadas por dicho agente, a fin de eliminar los efectos causantes de la enfermedad.

35

En definitiva, inducen frente a los patógenos o sus toxinas una respuesta inmune capaz de neutralizar los efectos adversos de los antígenos del patógeno, considerándose a los antígenos como sustancias capaces de inducir una respuesta inmune. Pudiendo ser estos antígenos, organismos completos, una porción de los mismos, que forman parte del agente infeccioso, o sustancias segregadas por éstos o incluso cualquier sustancia natural, sintética u obtenida de forma artificial y que se

asemeja a las naturales que posee o excreta el agente patógeno.

Una vez que el sistema inmunitario ha sido sensibilizado al organismo patógeno, la exposición ulterior del sistema inmune al patógeno o sus sustancias da como resultado una respuesta inmunitaria rápida que anula a dicho patógeno antes de que puedan inducir en el organismo vacunado signos de enfermedad.

La meta de cualquier vacunación es inducir una respuesta inmune potente capaz de proteger el mayor tiempo posible a un organismo frente a una infección.

10

### **Adyuvantes**

A diferencia de lo que ocurre con las vacunas que emplean organismos vivos, las vacunas que emplean los agentes infecciosos muertos o atenuados, los antígenos purificados, o las toxinas requieren del uso de potenciadores de la inmunidad llamados adyuvantes.

El primer adyuvante descrito fue publicado en 1924 por Ramón [Sur la toxine et sur l'anatoxine diphthériques. Ann. Inst. Pasteur, 38, 1-10]. Desde entonces se han utilizado sales de aluminio en la mayoría de las vacunas.

Puede encontrarse una revisión de adyuvantes empleados en vacunas en [Vogel FR, Powell MF. A summary compendium of vaccine adjuvants and excipients. In: Powell MF, Newman MJ, editors. Vaccine design: the subunit and adjuvant approach. New York: Plenum Publishing. Corp.; 1995. p. 234–250].

La eficacia de una inmunización y de los adyuvantes va a depender del tipo de ruta de administración de la vacuna, ya que no se obtiene la misma respuesta con una inmunización a través de mucosas que con una administración parenteral, así dependiendo de ésta, el uso de nuevos vectores, sistemas de liberación de los antígenos, y/o adyuvantes dependerá de la ruta elegida.

Los adyuvantes se pueden clasificar en función de su modo de acción o de su naturaleza química o su origen, así tendremos:

35

- Sistemas de liberación de antígenos: entre los que se encuentran muchos de

los adyuvantes tradicionales como alúmina, liposomas, micropartículas; partículas “like-virus”; nano partículas de liberación de antígenos; liposomas; microesferas de polímeros; ISCOMs (nanopartículas formadas por fosfatidil colina, colesterol y Quil A).

5 - Potenciadores de la inmunidad:

- Adyuvantes inorgánicos;
- Adyuvantes de origen microbiano o de plantas: LPS (lipopolisacáridos); subunidades de toxinas de origen bacteriano (Toxina cólica B); Muramil dipeptido; DNA bacteriano; CpGs; o derivados del Lípido A, como el monofosforilípido A (“MPL”) o derivados químicos. Todos ellos se están probando como adyuvantes en experimentos clínicos.
- Otros adyuvantes son emulsiones oleosas en aceites vegetales o animales, o interleukinas o el ADN que las codifica.

15 Uno de los adyuvantes más prometedores actualmente lo constituyen lo que se denominan lipopéptidos, compuestos basados en la modificación química de los antígenos a modo de los potenciadores de inmunidad de origen bacteriano unidos a lípidos iguales o similares al lípido A.

20 El primer trabajo relacionado data de 1984 (Hopp TP. Immunogenicity of a synthetic HBsAg peptide: enhancement by conjugation to a fatty acid carrier. *Mol Immunol* 1984; 21: 13–16). En este trabajo se describe un aumento de la respuesta frente a péptidos sintéticos del virus de la influenza administrados junto a dipalmitil-lisina, constituyendo así la estrategia de unir proteínas a cadenas lipofílicas. Otros trabajos posteriores (Schild H, Deres K, Wiesmüller KH, Falk K, Jung G, Rammensee HG. Efficiency of peptide and lipopeptide for in vivo priming of virus-specific cytotoxic T cells. *Eur J Immunol* 1991; 2: 2649. Deres K, Schild H, Wiesmüller KH, Jung G, Rammensee HG. In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature* 1989; 342: 561–64., Schild H, Norda M, Deres K, et al. Fine specificity of cytotoxic T lymphocytes primed in vivo either with virus or synthetic lipopeptide vaccine or primed in vitro with peptide. *J Exp Med* 1991; 174:1665–68S) describen como un lipopéptido del virus de la influenza desencadenaba una respuesta citotóxica, este hecho aumentó enormemente el uso potencial de los lípidos unidos a proteínas en vacunas. Hasta la fecha existen numerosos estudios en los que sintetizan lipopéptidos o conjugados de proteínas con lípidos induciendo una respuesta CTL similar a cuando se han usado vacunas vivas, evitando así el riesgo que conllevan.

(Brynstad K, Babbit B, Huang L, Rouse BT. Influence of peptide acylation, liposome incorporation, synthetic immunomodulators on the immunogenicity of a 1-23 peptide of glycoprotein D of herpes simplex virus: implications for subunit vaccines. *J Virol* 1990; 64: 680–85). Los mecanismos celulares por los cuales los lipopéptidos provocan esta  
 5 respuesta tampoco se conocen exactamente, siendo un mecanismo complejo en el que el antígeno unido al lípido interacciona con las células presentadoras de antígeno (APC). (BenMohamed L, Thomas A, Bossus M, et al. High immunogenicity in chimpanzees of peptides and lipopeptides derived from four new *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic molecules. *Vaccine* 2000; 18: 2843–55.).

10

Los lipopéptidos activan a los macrófagos desencadenando una respuesta en la que intervienen la IL1, IL6 y el TNF- $\alpha$ . (Rouaix F, Gras-Masse H, Mazingue C, et al. Effect of a lipopeptidic formulation on macrophage activation and peptide presentation to T  
 15 péptidos sintéticos o recombinantes que al formar las micelas con los ácidos grasos protegen a los epítomos frente a las enzimas proteolíticas (BenMohamed L, Thomas A, Bossus M, et al. High immunogenicity in chimpanzees of peptides and lipopeptides derived from four new *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic molecules. *Vaccine* 2000; 18: 2843–55.; BenMohamed L, Gras-Masse H, Tartar A, et al. Lipopeptide immunization without adjuvant induces potent and long-lasting B, T helper; and cytotoxic T lymphocytes responses against a malaria liver stage antigen in mice and chimpanzees. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1242–53) de los tejidos y del suero mejorando así la inmunogenicidad del antígeno al ser mejor absorbido por las células APC (Deprez B, Sauzet JP, Boutillon C, et al. Comparative efficiency of simple lipopeptide  
 20 constructs for in vivo induction of virus-specific CTL. *Vaccine* 1996; 14: 375–82 ; Tsunoda I, Sette A, Fujinami R, et al. Lipopeptide particles as the immunologically active component of CTL inducing vaccines. *Vaccine* 1999; 17: 675–85.). Y en especial el poder ser usados dichos adyuvantes en sistemas de vacunación usando como antígeno con péptidos sintéticos.

30

### **Vacunas en Leishmaniasis**

La leishmaniasis, de modo general, constituye una enfermedad que agrupa a tres tipos de lesiones que varían en función de la especie etiológica y, en ocasiones, del estado  
 35 inmunológico del individuo. Dichas formas se dividen en cutáneas, mucocutáneas y viscerales. Después de la publicación del genoma de *Leishmania* se ha abierto la

posibilidad del empleo más racional de antígenos capaces de conferir una cierta inmunidad.

Si bien existen una serie de fármacos para la leishmaniasis que han sido útiles tanto  
5 para la leishmaniasis visceral como para la leishmaniasis cutánea desde  
aproximadamente los años 20 del siglo pasado, la elevada toxicidad que poseen  
algunas de estas moléculas, y la aparición de resistencias a los fármacos  
tradicionales y a los nuevos desarrollados obliga a un estudio continuo de  
10 investigación de nuevas moléculas; esto lleva a que quizás la vía más efectiva de  
controlar la leishmaniasis, en general, sea la búsqueda de un sistema de vacunación  
que aleje del riesgo de contraer la enfermedad a habitantes de zonas endémicas.

La primera generación de vacunas frente a *Leishmania* conocida como  
“leishmanización” fue desarrollada a principios de 1940 y ha sido usada durante más  
15 de 60 años en muchos países entre otros en Irán. Se basa en la inoculación  
intradérmica de promastigotes vivos de *L. major* para proteger de los efectos de esta  
especie, el problema es que en algunos individuos conduce a la aparición de lesiones  
cutáneas graves. La experiencia es positiva para algunos vacunados, pero muy  
negativa para otros.

20 Esta primera generación de vacunas utiliza promastigotes atenuados, muertos, o  
extractos, habiendo varios intentos para conseguir atenuarlos pero los resultados han  
sido negativos o inconclusos. Las más conocidas son la Mayrink\* de Brasil, producida  
posteriormente en Venezuela sólo para *L. mexicana* administrada con BGC y la  
25 vacuna frente a *L. major* producida en Irán. Los resultados profilácticos no fueron  
convincientes, pero sí se siguen empleando en inmunoterapia.

La segunda generación, consiste en vacunas que emplean *Leishmania* sp.  
modificadas genéticamente, proteínas nativas o recombinantes. Muchas proteínas de  
30 superficie han sido identificadas. Estas incluyen a la glicoproteína 63 (gp63),  
glicoproteína de membrana 46 (gp46 o M-2), ligando de fucosa-manosa (FML),  
receptor homólogo activado por Kinasa C (p36/LACK), proteína quimérica NH36,  
cistein proteinasa B y A (CP), GRP78, LD1, proteína de superficie hidrofílica acilada  
(HASP B1), LCR1, proteína de la saliva de los vectores 15 (SP15), antígeno de  
35 superficie en promastigotes 2 (PSA-2), A-2, histona H-1, MML, factor de elongación  
(LeIF), proteína homóloga de estrés inducible 1 (LmSTI1), TSA y Leish-111f, etc.

Muchos antígenos definidos pueden proteger a los animales experimentales pero hasta la fecha solo una está siendo ensayada clínicamente, Leish-111f junto al adyuvante MPL-SE.

- 5 De todas ellas, la única que ha pasado las fases de experimentación y que se comercializa en Brasil es el complejo glicoprotéico FML con un adyuvante de saponina frente a la leishmaniasis canina, bajo el nombre de Leishmune® (EP 1893640).

10 La tercera generación de vacunas se basa en vacunas de ADN. El descubrimiento de la inyección directa de plásmidos con ADN codificando proteínas ajenas podría conducir a la biosíntesis de proteínas endógenas y una respuesta inmune específica abriendo nuevos campos en el desarrollo de vacunas. Tienen ventajas respecto a las otras, ya que son fáciles de producir, estables y fácil de administrar. Hasta la fecha se han probado vacunas con genes codificando la gp63, LACK, cpa y cpb, NH36, KMP-  
15 11, TSA y LmSTI1 pero ninguna de ellas ha obtenido resultados frente a más de una especie.

Varias vacunas candidatas a su uso masivo han sido ensayadas hasta la fecha, pero los informes son contradictorios, ya que la eficacia en la protección y respuesta  
20 inmune generada por estos antígenos es confusa. La mayoría son capaces de inducir la respuesta tipo Th1 en los modelos animales, mientras que otros autores creen que la protección de la enfermedad implica ambas respuestas, Th1 y Th2. Además los factores como el número de dosis, inmunomoduladores empleados, protocolos experimentales y los animales usados complican la cuestión del estudio. En definitiva,  
25 hasta el día de hoy, sólo hay una vacuna registrada contra la leishmaniasis canina y humana (empleando el receptor de la fucosa-manosa FML). Es la vacuna Leish-111f + MPL-SE, que se está ensayando clínicamente [Skeiky et al., "Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL® adjuvant," Vaccine 20: 3292-3303, 2002].

30

## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere al uso de compuestos que comprenden una molécula de naturaleza lipídica y un grupo vinil sulfona como adyuvante inmunológico. La  
35 molécula lipídica se une a un antígeno para formar un lipopéptido que actúa como vacuna. Además, la presente invención también se refiere a un inmunoadyuvante que

comprende dichos compuestos, a una vacuna que comprende estos lipopéptidos, es decir, el compuesto de la invención utilizado como inmunoadyuvante y un antígeno y de forma particular, a la vacuna descrita anteriormente para Leishmaniasis.

5 Entre las ventajas que presenta este adyuvante se encuentran:

- Fácil preparación y unión a la molécula antigénica dándole estabilidad y unión a cadenas lipofílicas de manera covalente, lo que los convierte tanto a péptidos o proteínas nativas, recombinantes o péptidos sintéticos en moléculas anfipáticas con un grupo apolar constituido por la cadena lipídica.

10 • Deben rodear a los antígenos con los grupos hidrofóbicos protegiéndolos de la degradación enzimática y constituyendo a modo de “esférulas” que favorezcan la entrada mediante mecanismos de transmembrana, en las células presentadoras de antígenos (APC) y su posterior presentación antigénica.

15 • Pueden favorecer su acción al estimular determinados TLR (receptores tipo Toll) que favorezcan una respuesta inmune inflamatoria dadas las interleukinas capaces de inducir.

- Constituyen un “lipopéptido” y actúa como adyuvante dando una respuesta mayoritariamente TH17.

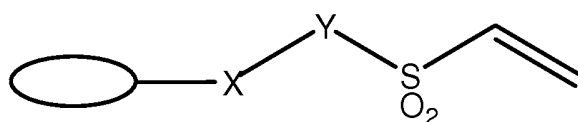
20 Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto que comprende un lípido como adyuvante inmunológico, donde dicho lípido está unido a la vinilsulfona directamente o mediante un linker.

25 El término “linker” (enlazador) se refiere a una molécula orgánica que une de forma covalente un lípido y un grupo vinilsulfona.

30 En esta memoria, el término “adyuvante”, “adyuvante inmunológico” o “inmunoadyuvante” se refiere a un agente, que no posee un efecto antigénico por sí mismo, pero que puede estimular el sistema inmune incrementando su respuesta a la vacuna.

En una realización preferida, el compuesto que comprende un lípido y un grupo vinil sulfona es el compuesto de fórmula general (I)





(I)

donde:

- 5 Y es un grupo  $-\text{CH}_2-\text{SO}_2\text{R}^1-$  o  $-\text{CH}_2-$ ; preferiblemente Y es  $-\text{CH}_2-$   
 $\text{R}^1$  es un radical seleccionado del grupo que comprende un alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ), un alquenilo ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ), un alquinilo ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ), un dialquilarilo ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ) $\text{Ar}(\text{C}_1-\text{C}_{10})$  o un grupo  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ ; preferentemente  $\text{R}^1$  es un grupo  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ ;  
 n toma valores de 1 a 20; preferiblemente n toma valores de entre 2 a 10, más  
 10 preferidamente n es de 2 a 5 y aún más preferiblemente n es 2.

X es un grupo  $-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}^2-\text{Z}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{Z}-\text{CH}_2-$  o  $-\text{CH}_2-$ ;

Z es S ó O;

- 15  $\text{R}^2$  es un radical seleccionado del grupo que comprende un alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ), un alquenilo ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ), un alquinilo ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ), un dialquilarilo ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ) $\text{Ar}(\text{C}_1-\text{C}_{10})$  ó un grupo  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$ ;  
 m toma valores de 1 a 20; preferiblemente m toma valores de entre 2 a 10, más  
 preferidamente m es de 2 a 5 y aún más preferiblemente m es 2; y

- 20  representa un lípido.

- Por "lípido" se entiende en la presente invención a una molécula de naturaleza apolar, como por ejemplo, hidrocarburos saturados o insaturados, como por ejemplo pero sin limitarse a grupos alquilos ( $\text{C}_1-\text{C}_{30}$ ), alquenos ( $\text{C}_2-\text{C}_{30}$ ), alquinos ( $\text{C}_2-\text{C}_{30}$ ) o esteroides. La  
 25 mayoría de este tipo de moléculas son biomoléculas, compuestas principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida oxígeno, aunque también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno, que tienen como característica principal el ser hidrofóbicas o insolubles en agua y sí en disolventes orgánicos. Preferiblemente, el lípido es un esteroide o un hidrocarburo alifático saturado o insaturado.

- 30 Por "hidrocarburo alifático" se refiere, en la presente invención, a moléculas orgánicas constituidas por carbono e hidrógeno, en las cuales los átomos de carbono forman cadenas lineales o ramificadas, saturadas o insaturada. Es decir, que pueden ser,

tanto grupos alquilo (saturados) como alquenos o alquinos (insaturados). Preferiblemente el lípido se puede seleccionar de entre un hidrocarburo (C<sub>4</sub>-C<sub>30</sub>), saturado o insaturado. Y más preferiblemente el número de carbono es de entre 10 y 20.

5

Por "esterol" se refiere en la presente invención a esteroides con 27 a 29 átomos de carbono. Su estructura química deriva del ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano, una molécula de 17 carbonos formada por tres anillos hexagonales y uno pentagonal. Se puede seleccionar de la lista que comprende, pero sin limitarse a colesterol, 10 epicolesterol, estigmasterol, lanosterol, ergosterol y coprostenol. Más preferiblemente el estero es colesterol.

15

Por "alquilo" se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, etc. Cuando nos referimos a lípidos serían cadenas alifáticas que tienen de 1 a 30 20 átomos de carbonos, más preferiblemente de 4 a 30 átomos de carbono y aún más preferiblemente de 10 a 20 átomos de carbono. Cuando nos referimos al grupo R<sup>2</sup>, independientemente, preferiblemente serían cadenas alifáticas que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, más preferiblemente de 2 a 5 átomos de carbono y aún más preferiblemente es un etilo.

25

Por "alqueno" se refiere en la presente invención a un radical alquilo, descrito anteriormente, y que tiene uno o más enlaces insaturados, concretamente tiene al menos un enlace doble, aunque también puede tener al menos un enlace triple. Los 25 radicales alqueno pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como un arilo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcóxicarbonilo, nitro, etc.

30

Por "alquino" se refiere en la presente invención a un radical alquilo, descrito anteriormente, y que tiene uno o más enlaces insaturados, concretamente tiene al menos un enlace triple, aunque también puede tener al menos un enlace doble. Los 30 radicales alqueno pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como un arilo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcóxicarbonilo, nitro, etc.

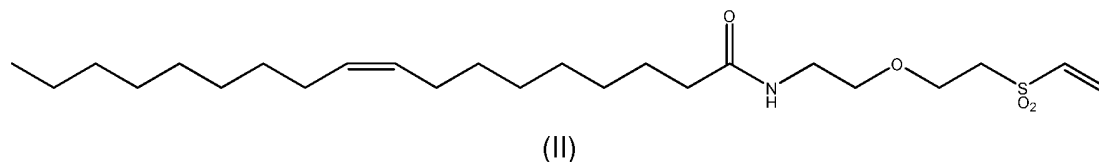
35

Por "dialquilarilo" se entiende en la presente invención a un grupo arilo que está

sustituido con dos grupos alquilo, alquenilo o alquinilo que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, más preferiblemente tienen de 1 a 5 átomos de carbono. Los grupos alquilo, alquenilo o alquinilo pueden ser iguales o diferentes, preferiblemente son iguales. Y por "arilo" se entiende en la presente invención a un sistema aromático o heteroaromático que tienen de 6 a 12 átomos de carbono o algún otro átomo, como por ejemplo O, N, S, etc..., pueden ser de anillo único ó múltiple, separado y/o condensado. Los grupos arilo típicos contiene de 1 a 3 anillos separados o condensados y desde 6 hasta 10 aproximadamente 18 átomos de carbono de anillo, tales como radicales fenilo, naftilo, indenilo, fenantrilo o antracilo

10

En otra realización preferida, el compuesto de fórmula (I) es el compuesto N-(2-(2-(vinilsulfonil)etoxi)etil)oleamida, de fórmula (II)



15

Una realización más preferida de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula (II) como adyuvante para la fabricación de vacunas. Más preferiblemente, como adyuvante en vacunas frente enfermedades parasitarias y más preferiblemente frente a Leishmaniasis.

20

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una vacuna que comprende el adyuvante inmunológico descrito en la presente invención junto con un antígeno o una composición antigénica.

25

En el contexto de la presente invención el término "vacuna" se refiere a un antígeno o una preparación o composición antigénica empleada para establecer la respuesta del sistema inmune a una enfermedad. Por "antígeno" o "preparado o composición antigénica" se entiende a una sustancia extraña a un organismo que, una vez introducido en éste, provocan la respuesta inmunitaria mediante la producción de anticuerpos, y una activación de la respuesta inmune humoral y/o celular y generan memoria inmunológica produciendo inmunidad permanente o transitoria. Este puede ser una proteína nativa, recombinante o péptido sintético. Dependiendo de antígeno o de la composición antigénica, las vacunas de la invención pueden ser vacunas frente a virus, protozoos, parásitos o tumores.

30

Por "enfermedad parasitaria", se entiende en la presente invención a una enfermedad infecciosa causada por protozoos, vermes (cestodos, trematodos, nematodos) o artrópodos. En particular los parásitos son protozoos o vermes, preferiblemente trematodos o nematodos. En una realización más preferida los parásitos pertenecen a la familia *Trypanosomatidae*, más preferiblemente los parásitos son del género *Leishmania*. Especies de las mismas, pueden ser, pero sin limitarse, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Leishmania trópica* o *Leishmania chagasi*, entre otras, conocidas por un experto en la materia.

10

Las enfermedades parasitarias a tratar podrían ser leishmaniosis (o leishmaniasis). "Leishmaniosis" es una enfermedad causada por un protozoo del género *Leishmania* y transmitido, principalmente por mosquitos flebotomos o jejenes. Esta enfermedad se produce en humanos y animales vertebrados, como pueden ser marsupiales, cánidos, roedores y primates.

15

En otra realización preferida, la presente invención se refiere a una vacuna frente a Leishmaniasis que comprende el adyuvante inmunológico descrito en la presente invención y los antígenos recombinantes. De los antígenos recombinantes se podrían utilizar, entre otras, la glicoproteína 63 (gp63), glicoproteína de membrana 46 (gp46 o M-2), ligando de fucosa-manosa (FML), receptor homólogo activado por Kinasa C (p36/LACK), proteína quimérica NH36, cistein proteinasa B y A (CP), GRP78, LD1, proteína de superficie hidrofílica acilada (HASPB1), LCR1, proteína de la saliva de los vectores 15 (SP15), antígeno de superficie en promastigotes 2 (PSA-2), A-2, histona H-1, MML, factor de elongación (LeIF), proteína homóloga de estrés inducible 1 (LmSTI1), TSA, Leish-111f, o Prohibitinas 1 y 2, entre otras. Preferiblemente la vacuna frente a Leishmaniasis comprende el adyuvante inmunológico descrito en la presente invención y los antígenos recombinantes consistentes en este caso en dos tipos de proteínas pertenecientes a las Prohibitinas recombinantes, Phb 1r y Phb 2r.

30

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de la vacuna de la invención que comprende las siguientes etapas:

35

- a. solubilización del adyuvante inmunológico de la invención en alcohol a un pH básico, en un tiempo de incubación que oscila entre los 10 minutos a 24 horas;
- b. añadir a la disolución de la etapa (a) el antígeno o la composición antigénica;

- c. incubar la mezcla del paso (b) a una temperatura de entre 0 y 37 °C durante 10 min a 24h.;
- d. añadir un tampón básico con un aminoácido o sustancia capaz de bloquear las funciones vinilsulfona que no hubieren reaccionado a la mezcla incubada de la etapa (c) e incubar durante 2 a 3 horas a una temperatura comprendida entre 4°C y 40°C, preferiblemente entre 22°C y 37°C.

Los adyuvantes inmunológicos del paso (a) son los compuestos lípido-vinilsulfona (LVS) descritos en la presente invención, más preferiblemente los compuestos de fórmula general (I) y aún más preferiblemente el compuesto de fórmula (II).

En una realización más preferida, la solubilización descrita en el paso (a) se lleva a cabo en metanol y buffer carbonato, preferentemente a 0.125 M (1:1), pH 8 hasta alcanzar una concentración final de 20mg/ml.

En otra realización preferida, en paso (b) la mezcla de la solución resultante en el paso (a) con el antígeno o la composición antigénica descritos anteriormente se lleva a cabo en una proporción 5:1.

En otra realización preferida, en paso (c) la incubación se lleva a cabo a una temperatura de laboratorio, preferiblemente entre 4°C y 37°C, más preferentemente a 4°C, y entre 10 min y 24h, preferentemente 12 horas.

En otra realización preferida, en el paso (d) el tampón básico es un carbonato y más preferiblemente el aminoácido o sustancia capaz de bloquear las funciones vinil sulfona que no hubieren reaccionado anteriormente es glicina, aún más preferiblemente tampón carbonato con Glicina 0.1 M.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

35

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **Fig. 1.-** Representación del peso en gramos, de los bazos medidos en los distintos grupos del ensayo. La gráfica refleja la variación del peso que presentaron los bazos de los grupos del ensayo. Donde Contr No Infec: corresponde al grupo control no infectados; Cont Infect: es el peso de los bazos de los grupos Infectados. Ph1+ Ph2 corresponde al peso de los bazos de los animales inmunizados con las dos proteínas recombinantes sin adyuvante. ph1+ph2 II corresponde al peso de los bazos de los animales inmunizados con las proteínas recombinantes junto al adyuvante de fórmula (II).

10

15 **Fig. 2.-**Representación del tamaño de la lesión cutánea en el foco de infección medidos en los distintos grupos del ensayo y el porcentaje de reducción de la lesión considerando máxima el tamaño de la inflamación de los animales infectados y no inmunizados con ninguna de las dos preparaciones. Donde Control: corresponde al grupo control no infectados; Control Infección: grupo de animales infectados. p1p2 control: Grupo de animales inmunizados con las dos proteínas recombinantes sin adyuvante. p1p2+II grupo de animales inmunizados con las proteínas recombinantes junto al adyuvante de fórmula (II).

20 **Fig. 3.-** Representación del Índice de estimulación comparando el grupo control con el grupo vacunado con el adyuvante de fórmula (II). Linfoproliferación de células esplenocíticas de ratones BALB/C inoculados y posteriormente infectados con *L. major*. Las células fueron incubadas a 37 °C durante tres días en medio RPMI. p1p2Control: corresponde al índice de estimulación de los esplenocitos de los bazos de los animales inmunizados con las dos proteínas recombinantes sin adyuvante; p1p2+II corresponde al índice de estimulación de los esplenocitos de los bazos de los animales inmunizados con las proteínas recombinantes junto al adyuvante de fórmula (II).

30 **Fig. 4.-** Representa los Niveles de expresión de la interleukina IL2 medidos en los distintos grupos del ensayo. Interleukina correspondiente a un tipo de respuesta TH1. Donde; Control: ratones sin inmunizar y sin infectar; Control Infec: ratones no inmunizados y sí infectados; p1p2+II: Phb1r y Phb2r unidas al adyuvante de fórmula (II); p1p2ontrol: Phb1r y Phb 2r sin el adyuvante de fórmula (II).

35

**Fig. 5.-** Representación de los Niveles de expresión de la interleukina IL12 medidos en

los distintos grupos del ensayo. Interleukina correspondiente a un tipo de respuesta TH1. Donde Control: corresponde al grupo control no infectados; Control Infec: grupo de animales infectados. p1p2 control: Grupo de animales inmunizados con las dos proteínas recombinantes sin adyuvante. p1p2+II grupo de animales inmunizados con las proteínas recombinantes junto al adyuvante de fórmula (II).

**Fig. 6.-** Niveles de expresión del Interferón  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) . Interleukina correspondiente a un tipo de respuesta TH1. Abreviaturas: Control: ratones sin inmunizar y sin infectar; Control Infec: ratones no inmunizados y sí infectados; p1p2+II: Phb1R y Phb2R unidas al adyuvante de fórmula (II); p1p2Control: Phb1R y Phb2R sin el adyuvante de fórmula (II).

**Fig. 7.-** Niveles de expresión del TNF- $\alpha$ . Donde, Control: corresponde al nivel de expresión de TNF- $\alpha$  del grupo control no infectados; Control Infec: corresponde al nivel de expresión de TNF- $\alpha$  de los grupos Infectados. p1p2Control: corresponde al nivel de expresión de TNF- $\alpha$  del grupo de los animales inmunizados con las dos proteínas recombinantes sin adyuvante. p1p2+II corresponde al nivel de expresión de TNF- $\alpha$  de los animales inmunizados con las proteínas recombinantes junto al adyuvante de fórmula (II).

**Fig. 8.-** Niveles de expresión de la IL4. Donde, Control: corresponde al nivel de expresión de IL4 del grupo control no infectados; Control Infec: corresponde al nivel de expresión de IL4 de los grupos Infectados. p1p2Control: corresponde al nivel de expresión de IL4 del grupo de los animales inmunizados con las dos proteínas recombinantes sin adyuvante. p1p2+II corresponde al nivel de expresión de IL4 de los animales inmunizados con las proteínas recombinantes junto al adyuvante de fórmula (II).

**Fig 9.-** Niveles de expresión de la IL10. Donde, Control: corresponde al nivel de expresión de IL10 del grupo control no infectados; Control Infec: corresponde al nivel de expresión de IL10 de los grupos Infectados. p1p2Control: corresponde al nivel de expresión de IL10 del grupo de los animales inmunizados con las dos proteínas recombinantes sin adyuvante. p1p2+II corresponde al nivel de expresión de IL10 de los animales inmunizados con las proteínas recombinantes junto al adyuvante de fórmula (II).

**Fig. 10.-** Niveles de expresión de la IL17. Donde, Control: corresponde al nivel de expresión de IL17 del grupo control no infectados; Control Infec: corresponde al nivel de expresión de IL17 de los grupos Infectados. p1p2Control: corresponde al nivel de expresión de IL17 del grupo de los animales inmunizados con las dos proteínas recombinantes sin adyuvante. p1p2+II corresponde al nivel de expresión de IL17 de los animales inmunizados con las proteínas recombinantes junto al adyuvante de fórmula (II).

**Fig. 11.-** Niveles de expresión del TGB- $\beta$ . Donde, Control: corresponde al nivel de expresión de TGB- $\beta$  del grupo control no infectados; Control Infec: corresponde al nivel de expresión de TGB- $\beta$  de los grupos Infectados. p1p2Control: corresponde al nivel de expresión de TGB- $\beta$  del grupo de los animales inmunizados con las dos proteínas recombinantes sin adyuvante. p1p2+II corresponde al nivel de expresión de TGB- $\beta$  de los animales inmunizados con las proteínas recombinantes junto al adyuvante de fórmula (II).

## EJEMPLOS

Se han realizado ensayos para demostrar la eficacia de este adyuvante utilizando como agente infectante *Leishmania major* cepa Friedlin (MHOM/IL/81/Friedlin, (clone VI). Se compara la respuesta que induce respecto al control de inmunización sin dicho adyuvante.

Para el ensayo de inmunización y posterior reto, se utilizaron 20 ratones Balb/c, divididos en lotes.

Dos grupos fueron inoculados intradérmicamente como se indica:

- 1) Grupo de ensayo inoculados con 10  $\mu$ g de unos antígenos recombinantes denominados como Phb 1r y Phb 2r, procedente de *Leishmania major* unidas al compuesto de fórmula (II) tal y como a continuación se describe y posteriormente retados como posteriormente se describe.
- 2) Grupo control del adyuvante, inoculados con 10  $\mu$ g de las proteínas recombinantes denominadas como Phb 1r y Phb 2r, sin unir a dicho compuesto y posteriormente retados.
- 3) Grupo Control Blanco con solo la inoculación de las formas del parásito



infectado al mismo momento y forma que se realizó el reto de los grupos anteriores.

4) Grupo Control no vacunado no retado.

5 Los grupos fueron vacunados, inoculándose 3 veces con las diferentes formas y formulaciones de los antígenos vacunales con un intervalo de 2 semanas las dos primeras inoculaciones y pasados 30 días de la segunda inoculación fueron vacunados por última vez.

10 Pasados 6 meses desde las inoculaciones, los grupos fueron infectados con 1000 formas metacíclicas purificadas de las formas metacíclicas infectantes (Kimblin, N., et al., Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(29): p. 10125-30) de *L. major* en la almohadilla plantar de las extremidades traseras.

15

Tres meses después de la infección todos los ratones fueron sacrificados, recolectándose la sangre y los bazos. Tras el sacrificio se midieron los bazos y las lesiones originadas en las extremidades, con el fin de determinar la protección que dichas formulaciones vacunales ejercieron sobre la infección.

20

Determinándose mediante qPCR los niveles de diferentes interleukinas, así como los niveles de expresión por parte de los parásitos intracelulares como forma de determinar el nivel de parasitación.

25 Con los sueros de los ratones se midieron los índices de absorbancia mediante técnicas inmunoenzimáticas, ELISA, frente a los antígenos inoculados al enfrentar dichos sueros a los mismos.

#### **UNION DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES AL COMPUESTO (II)**

30

El compuesto (II) fue solubilizado en metanol y buffer carbonato 0.125 M (1:1), pH 8 hasta alcanzar una concentración final de 20mg/ml. Se mezcló en con las proteínas en una proporción 5:1, incubándose 12 horas a 4°C.

35

Una vez transcurrido ese tiempo se le añadieron 20 µl de tampón carbonato 0.125M-glicina 1M, para bloquear los grupos sulfona no unidos a las proteínas incubándose 2

a 3 horas a 4°C.

## EVALUACION DEL EFECTO ADYUVANTE

### 5 **Medida de lesión y del bazo y titulación de sueros**

A los 6 meses de inmunización, se tomaron muestras de sangre de cada ratón para posteriormente titular el suero frente a las proteínas recombinantes mediante la técnica ELISA. Una vez transcurrido el periodo de ensayo, los lotes de ratones fueron sacrificados. En el momento del sacrificio se tomaron las medidas de la lesión producida en la pata y el tamaño del bazo. A su vez se recolectó el suero de cada animal para titularlo y ver su evolución comparado con la primera titulación realizada.

### Linfoproliferación

15

La linfoproliferación, medida como resultado de la síntesis de DNA por parte de los esplenocitos, fue llevada a cabo basándose en la incorporación de Timidina<sup>3</sup>H en el material precipitable de las células esplénicas. Para la obtención de las células empleadas en los estudios de linfoproliferación, se usaron esplenocitos obtenidos de los bazos de los animales inmunizados que tras eliminar los glóbulos rojos y determinar la viabilidad de los esplenocitos fueron cultivados en medio RPMI 1640 suplementado (5% SBF, 2 mM glutamina, 0.05 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM piruvato sódico, 100 U/ml de Penicilina y 100 µg/ml de Penicilina).

25 Los esplenocitos fueron estimulados con 25 µg/ml de las dos proteínas usadas como antígenos y como control positivo se estimularon con 5 µg/ml de Concanavalina A (Sigma). Los esplenocitos como control negativo, se mantuvieron en el medio sin adición de ningún compuesto, y 18 horas antes de la medida de estimulación a todos los cultivos se les agregó 1 µCi de 6-<sup>3</sup>H-Thimidine (con una actividad específica de 26-30 Ci/mmol), diluido en RPMI 1640 adicionado con 10% de suero bovino fetal.

30

Se realizaron duplicados de cada placa, una para la medida de la linfoproliferación y otra para colectar células y medir los niveles de citoquinas.

35 La placa de cultivo donde se realizaron los experimentos, se incubó durante 72 h a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se recolectaron a las 72 h y se

lavaron con PBS, centrifugándolas a 400g durante 5 min a 4 °C. El botón, conteniendo las células, que iba a ser tratado para medir la linfoproliferación, se resuspendió en 3 volúmenes de ácido tricloroacético frío al 10%, se incubó a 4°C durante 2 h, y tras ello fueron centrifugadas 10 minutos a 200g. Posteriormente se lavaron con 3 ml de una solución de ácido tricloroacético al 5% y finalmente se lavaron siempre por centrifugación, con etanol absoluto y etanol 80%. Una vez lavados los viales se llenaron con líquido de centelleo (PPO 4g; POPOP 0.1g; tolueno 1000 ml) y la radiactividad se midió en un espectrómetro  $\beta$  (BECKMAN LS 6000TA). El índice de linfoproliferación se determinó mediante la relación DPM cultivo Problema/DPM de los cultivos procedentes de células control no estimuladas. El nivel de estimulación máxima se realizó con los esplenocitos estimulados con ConA.

Todos los experimentos fueron repetidos tres veces.

#### 15 **Determinación de citoquinas**

La determinación de citoquinas se realizó mediante el nivel de expresión de las mismas mediante RTqPCR con los ARNm extraídos de los esplenocitos estimulados.

#### 20 **Determinación cuantitativa de citoquinas mediante RTQPCR**

Para la obtención de ARNm y, posteriormente, su retrotranscripción a ADNc se siguió la metodología descrita por (Nicolas, L., et al., Leishmania major Reaches Distant Cutaneous Sites Where It Persists Transiently while Persisting Durably in the Primary Dermal Site and Its Draining Lymph Node: a Study with Laboratory Mice. Infection and Immunity, 2000. 68(12): p. 6561-6566.)

<b>Genes</b>	<b>Cebador</b>	<b>Secuencias</b>
Gen de referencia (hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa)	HPTR	F: 5'-TGCTGACCTGCTGGATTACA-3' (SEQ ID NO: 1) R: 5'-TATGTCCCCCGTTGACTGAT-3'(SEQ ID NO: 2)
Factor de necrosis tumoral- $\alpha$	TNF- $\alpha$	F: 5'-AGCCCCCAGTCTGTATCCTT-3' (SEQ ID NO: 3) R: 5'-GGTCACTGTCCCAGCATCTT-3' (SEQ ID

		NO: 4)
Interferon gamma	INF- $\gamma$	F: 5'-CACCCCTGAAGTCGTTGTGAA-3' (SEQ ID NO: 5) R: 5'-CGTCAAAAGACAGCCACTCA-3' (SEQ ID NO: 6)
Factor de crecimiento transformante- $\beta$	TGF- $\beta$	F: 5'-GTGTGGAGCAACATGTGGAA-3' (SEQ ID NO: 7) R: 5'-CGTCAAAAGACAGCCACTCA-3' (SEQ ID NO: 8)
Interleukina 2	IL-2	F: 5'-AAGCTCTACAGCGGAAGCAC-3' (SEQ ID NO: 9) R: 5'-ATCCTGGGGAGTTTCAGGTT-3' (SEQ ID NO: 10)
Interleukina 4	IL-4	F: 5'-TTGAACGAGGTCACAGGAGA-3' (SEQ ID NO: 11) R: 5'-CACCTTGGGAAGCCCTACAGA-3' (SEQ ID NO: 12)
Interleukina 10	IL-10	F: 5'-CTGTTTCCATTGGGGACACT-3' (SEQ ID NO: 13) R: 5'-AAGTGTGGCCAGCCTTAGAA-3' (SEQ ID NO: 14)
Interleukina 12	IL-12	F: 5'-CCTGAAGTGTGAAGCACCAA-3' (SEQ ID NO: 15) R: 5'-TCAGGGGAACTGCTACTGCT-3' (SEQ ID NO: 16)
Interleukina 17	IL-17	F: 5'-TTCAGGGTCGAGAAGATGCT-3' (SEQ ID NO: 17) R: 5'-AAACGTGGGGGTTTCTTAGG-3' (SEQ ID NO: 18)

Tabla 1.- Cebadores usados para la cuantificación de la expresión de los genes de las distintas citoquinas mediante RTPCR.

Los niveles de expresión se realizaron en un termociclador C-1000\* unido al módulo CFX96\* para Real-Time de Biorad (Bio-Rad), empleando el kit SsofastEvagreenSupermix (Bio-Rad).

La eficiencia de ambas amplificaciones se comprobó cuantificando diluciones seriadas de productos amplificados por PCR. Los porcentajes de eficiencia se determinaron, según el método de  $\Delta CT$ , en donde la relación referencia/prueba =  $2^{CT \text{ referencia} - CT \text{ prueba}}$ , donde la referencia es el gen HPTR y la prueba son los genes de estudio. Todos estos ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

### **Análisis Estadístico**

Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos fueron llevados a cabo en el programa Prism 5.04 versión 2010 y el programa Graphpat Instar versión 3.06.

### **RESULTADOS**

En todos los ratones, se pesaron y se midieron los bazos y la lesión cutánea provocada por la infección. Como se puede observar en las figuras 1 y 2.

El menor peso de los bazos se produjo en los grupos donde se había inmunizado con las proteínas recombinantes ligadas al ácido graso vinil sulfona (rPhb1-rPhb2-LiVSulf), donde se obtuvo un peso de bazo similar al grupo no infectado (Cni).

Con respecto al tamaño de la lesión hubo una reducción del 61% del grupo que fue tratado con las proteínas en combinación al (rPhb1-rPhb2 LiVsulf) con respecto al grupo no tratado.

25

### **Estudio de los niveles de estimulación celular y determinación de la expresión de citoquinas**

El estudio del tipo de respuesta inmune inducida en los diferentes grupos de ratones en función de la determinación de interleukinas fue realizado mediante la determinación medición RT-PCR de los niveles de expresión de los genes de dichas proteínas: IL2, IL4, IL10, IL12, IL17, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y INF- $\gamma$ .

Se analizaron por otra parte los niveles de linfoproliferación (índices de estimulación), como nivel de respuesta a los tratamientos a partir de esplenocitos no estimulados o estimulados con los antígenos usados en las inmunizaciones, la incubación con dichos

antígenos se llevó a cabo durante 72 h. Como control positivo de la estimulación las células fueron incubadas con la lectina Con-A. Los índices de estimulación se determinaron por los niveles de incorporación de Timidina<sup>3</sup>H, (1  $\mu$ Ci/ pocillo) que se agregó 18 horas antes del sacrificio de las células. Los niveles de incorporación del análogo radiactivo al ADN de las células (como marcador de la división celular) se determinaron con un contador de centelleo expresándose los resultados en cuentas por minuto (cpm).

Los niveles de estimulación aparecen reflejados en la figura 3, de la que se deduce que máximos niveles de estimulación ocurrieron en los grupos rPhb1-rPhb2-LiVSulf (p1p2+II).

#### **DETERMINACION DE NIVELES DE EXPRESION DE INTERLEUKINAS MARCADORAS DE RESPUESTA Th1.**

Los niveles de expresión de las interleukinas tipo th1 es decir IL 2, IL 12, IFN  $\gamma$  y el factor de necrosis tumoral TNF  $\alpha$ , aparecen reflejados en la gráfica correspondientes donde se representan los niveles de expresión de dichas interleukinas en los esplenocitos no estimulados y estimulados con los antígenos (Fig. 4, 5 y 6, respectivamente).

Los niveles de IL2 presentan un aumento significativo en el grupo rPhb1-rPhb2-LiVSulf ( $p < 0.001$ ) (Fig. 4).

En la figura 5 se observan que los niveles de IL12 se incrementan en el grupo rPhb1-rPhb2-LiVSulf ( $p < 0.001$ ) y el resto de los grupos mantienen niveles similares al grupo control de infección.

Los niveles de INF- $\gamma$  aparecen mostrados en la figura 6. El grupo rPhb1-rPhb2-LiVSulf (p1p2+II) muestra un incremento altamente significativo ( $p < 0.001$ ) con respecto a los demás grupos.

Los niveles de expresión del Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ) muestran (Fig. 7), de nuevo, un incremento en el grupo rPhb1-rPhb2-LiVSulf ( $p < 0.001$ ).

#### **DETERMINACION DE NIVELES DE EXPRESION DE INTERLEUKINAS**

### **MARCADORAS DE RESPUESTA Th2.**

En este caso los niveles de expresión estudiados fueron las IL4 yIL10.

- 5 Como se puede observar en la figura 8 los grupos que presentan un aumento significativo de IL4 con respecto al grupo de infección fueron: p1p2+(II) ( $p < 0.001$ ).

Si analizamos los niveles de la IL 10 (Fig. 9) el único grupo que presenta un aumento es el grupo rPhb1-rPhb2-LiVSulf.

10

### **DETERMINACION DE NIVELES DE EXPRESION DE INTERLEUKINAS MARCADORAS DE RESPUESTA Th17.**

- 15 Los niveles de expresión de la IL 17, mostraron que en el grupo Phb1-rPhb2-LiVSulf, se indujo un incremento significativo de este tipo de respuesta, frente al resto de los grupos (Fig. 10).

### **DETERMINACION DE NIVELES DE EXPRESION DE INTERLEUKINAS MARCADORAS DE RESPUESTA Th3.**

20

Se analizó la expresión del factor de crecimiento tumoral (TGF- $\beta$ ) Fig. 11. El grupo p1p2+(II) mostró, nuevamente, un incremento significativo respecto al resto de los grupos.

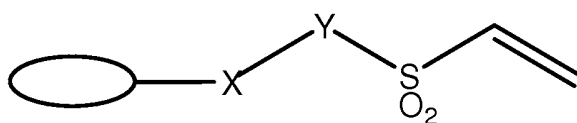
- 25 De estos resultados se deduce que el compuesto de fórmula (II), unido a los antígenos a través del grupo vinil sulfona dejando libres las cadenas lipídicas, actúa de adyuvante antigénico estimulando una respuesta tipo inflamatoria. Pudiendo ser usado en vacunación, por vía intercutánea, intraperitoneal, intramuscular o a través de mucosas, en los procesos de inmunización en los que se requiera activar este tipo de  
30 respuesta.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto que comprende un lípido y un grupo vinilsulfona como adyuvante inmunológico.

5

2. Uso según la reivindicación anterior, donde el compuesto es un compuesto de fórmula general (I):



(I)

10

donde:

Y es un grupo  $-\text{CH}_2-\text{SO}_2\text{R}^1-$  o  $-\text{CH}_2-$ ;

$\text{R}^1$  es un radical seleccionado del grupo que comprende un alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ), un alquenilo ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ), un alquinilo ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ), un dialquilarilo ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ) $\text{Ar}(\text{C}_1-\text{C}_{10})$  o un grupo  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ ;

15

n toma valores de 1 a 20;

X es un grupo  $-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}^2-\text{Z}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{Z}-\text{CH}_2-$  o  $-\text{CH}_2-$ ;

Z es S ó O;

$\text{R}^2$  es un radical seleccionado del grupo que comprende un alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ), un alquenilo ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ), un alquinilo ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ), un dialquilarilo ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ) $\text{Ar}(\text{C}_1-\text{C}_{10})$  ó un grupo  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$ ;

20

m toma valores de 1 a 20; y



representa un lípido.

25

3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el lípido es un esteroil.

4. Uso según la reivindicación anterior, donde el esteroil se selecciona de la lista que comprende colesterol, epicolesterol, estigmasterol, lanosterol, ergosterol y coprostenol.

30

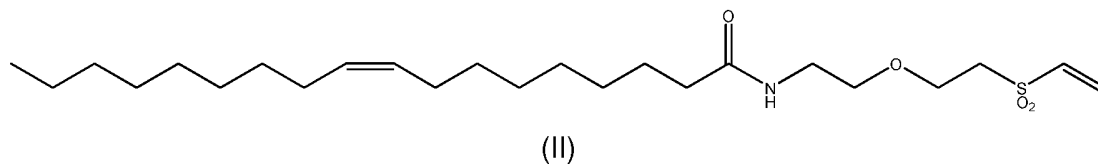
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el lípido es un hidrocarburo alifático ( $\text{C}_4-\text{C}_{30}$ ) saturado.



6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el lípido es un hidrocarburo alifático ( $C_4-C_{30}$ ) insaturado.
- 5 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, donde el lípido es un hidrocarburo alifático ( $C_{10}-C_{20}$ ).
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, donde X es un grupo  $-CO-NH-R^2-Z-CH_2-$  y Z se ha definido en la reivindicación 2.
- 10 9. Uso según la reivindicación 8 donde  $R^2$  es un grupo alquilo ( $C_2-C_5$ ).
10. Uso según la reivindicación 9 donde  $R^2$  es un grupo etilo.
- 15 11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 donde X es el grupo  $-Z-CH_2-$  y Z se ha definido en la reivindicación 2.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde Z es O.
- 20 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde Z es S.
14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, donde X es  $-CH_2-$ .
15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14, donde el grupo Y es  $-CH_2-$ .
- 25 16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14, donde  $R^1$  es un grupo  $(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$  y n toma valores de entre 1 a 10.
17. Uso según la reivindicación 16, donde n toma valores de entre 2 a 5.
- 30 18. Uso según la reivindicación 17, donde n es 2.

35

19. Uso según la reivindicación 1, donde el compuesto es de fórmula (II):



- 5 20. Uso de un compuesto descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para la fabricación de una vacuna.
- 10 21. Uso de un compuesto descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para la fabricación de una vacuna frente a una enfermedad parasitaria, preferiblemente Leishmaniasis.
- 15 22. Uso según la reivindicación anterior, donde la vacuna comprende como componente antigénico proteínas Prohibitinas 1 y 2 de Leishmania.
- 20 23. Uso según la reivindicación anterior, donde la vacuna es frente a la Leishmaniasis.
- 25 24. Una vacuna que comprende el compuesto descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y un antígeno o componente antigénico.
- 20 25. Vacuna según la reivindicación anterior, donde dicha vacuna se encuentra en una forma adecuada para su administración por vía parenteral, oral, a la mucosa, sublingual, transdérmica, tópica, por inhalación, intranasal, en aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, por pistola génica, parche dérmico o en forma de gotas oculares o enjuague bucal.
- 25 26. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 25 o 26, donde el componente antigénico comprende las proteínas Prohibitinas 1 y 2 de Leishmania.
- 30 27. Procedimiento de preparación de una vacuna según se describe en las reivindicaciones 24 a 26, que comprende las siguientes etapas:
- a. solubilización del adyuvante inmunológico descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 en alcohol a un pH básico, en un tiempo de incubación que oscila entre los 10 minutos a 24 horas;
  - b. añadir a la disolución de la etapa (a) el antígeno o la composición antigénica;

- c. incubar la mezcla del paso (b) a una temperatura de entre 0 y 37 °C durante 10 min a 24h;
  - d. añadir un tampón básico con un aminoácido o sustancia capaz de bloquear los residuos de sulfona que no hubieran reaccionado, a la mezcla incubada de la etapa (c) e incubar durante 2 a 3 horas a una temperatura de entre 4°C y 40°C.
- 5

10

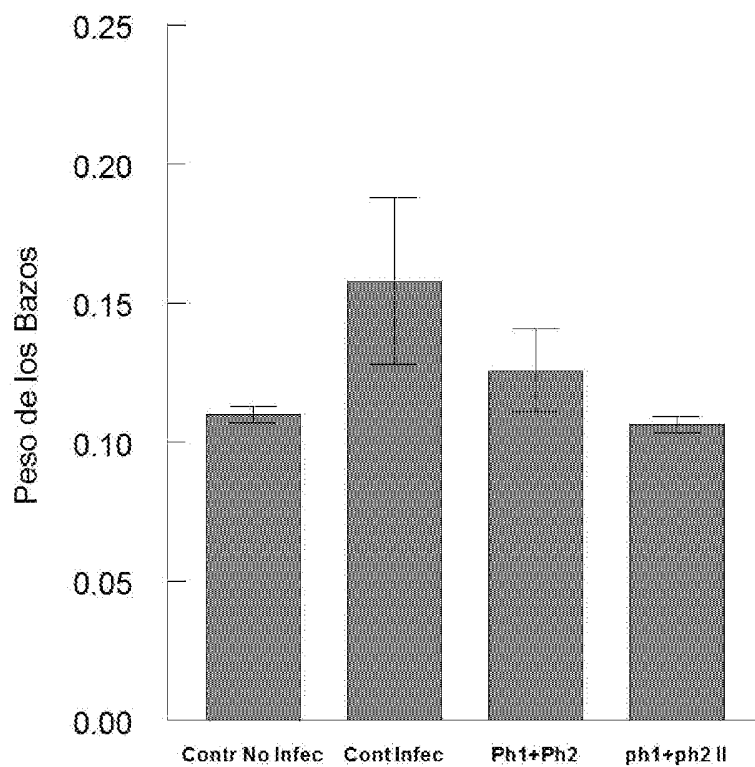


Fig. 1

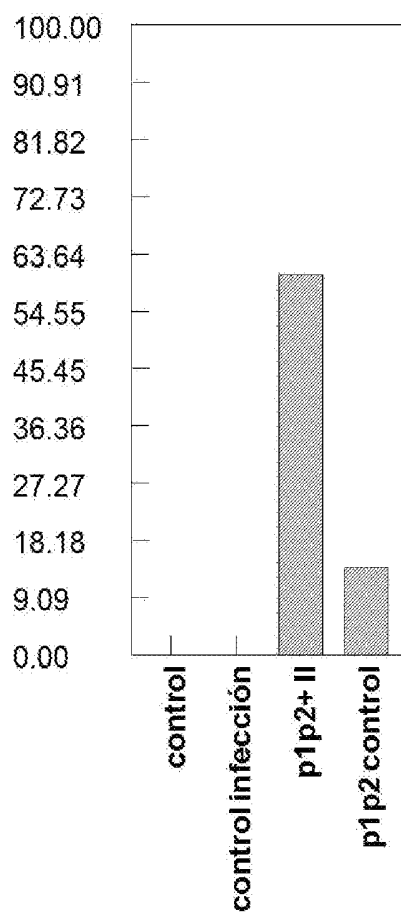


Fig. 2

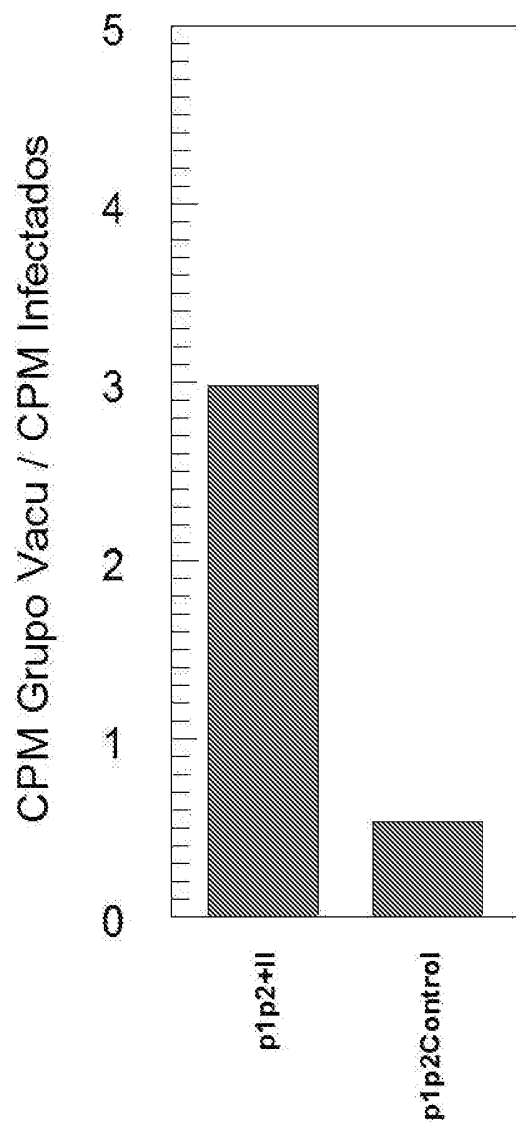


Fig. 3

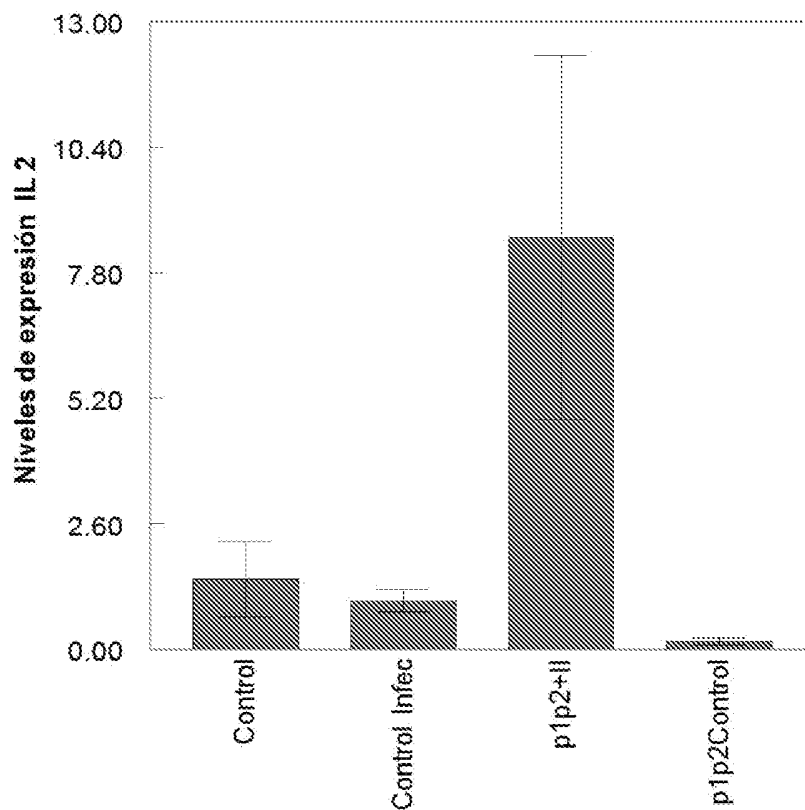


Fig. 4

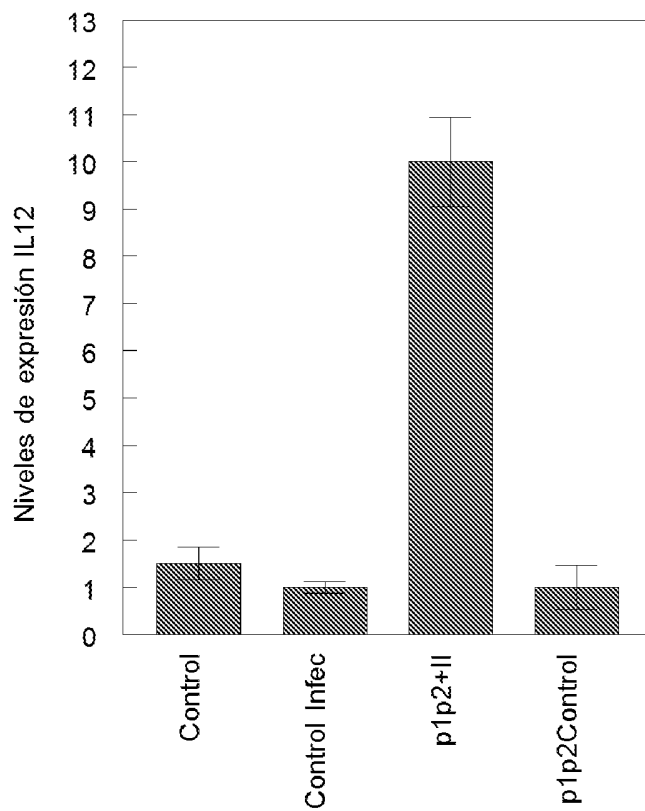


Fig. 5



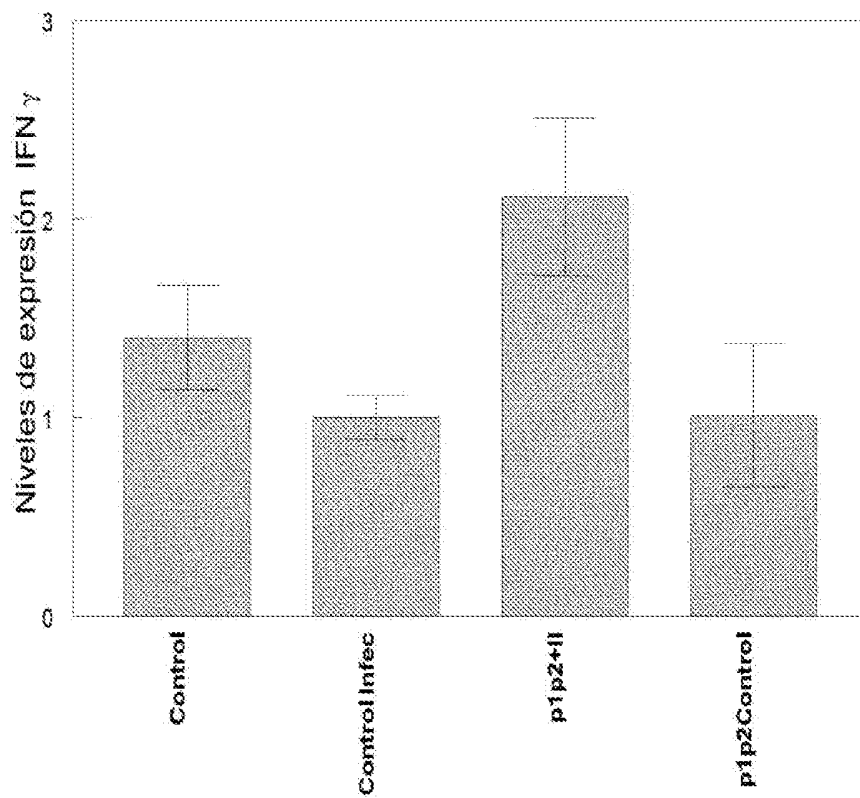


Fig. 6

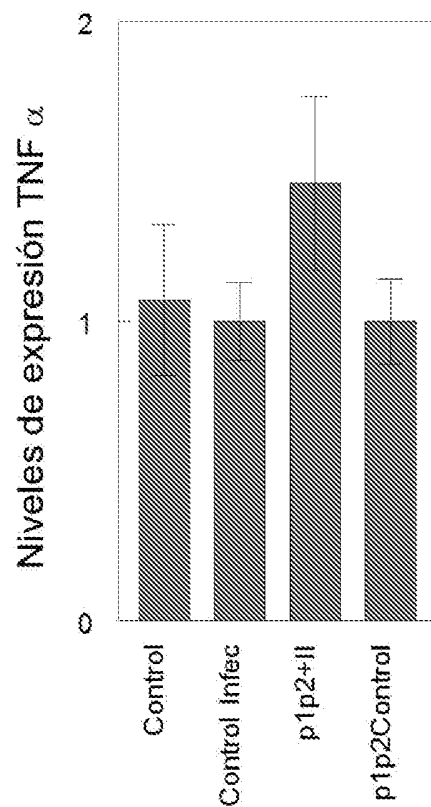


Fig. 7

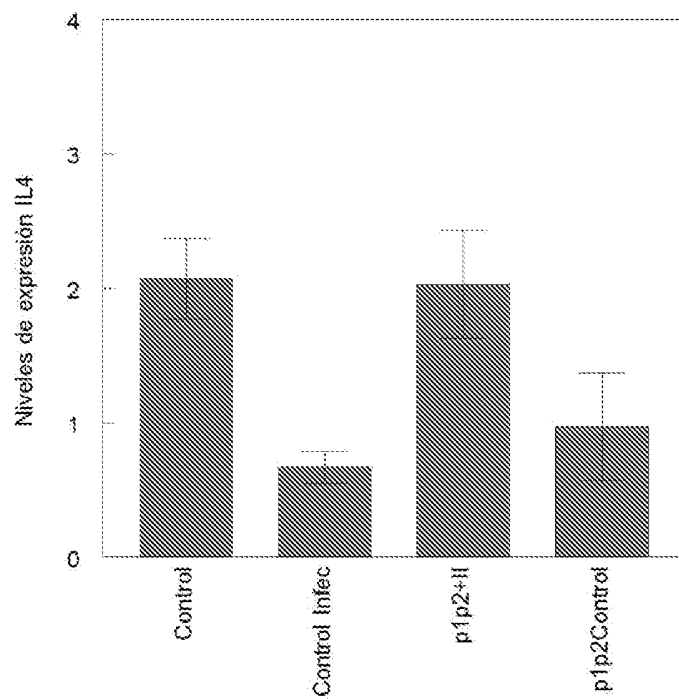


Fig. 8

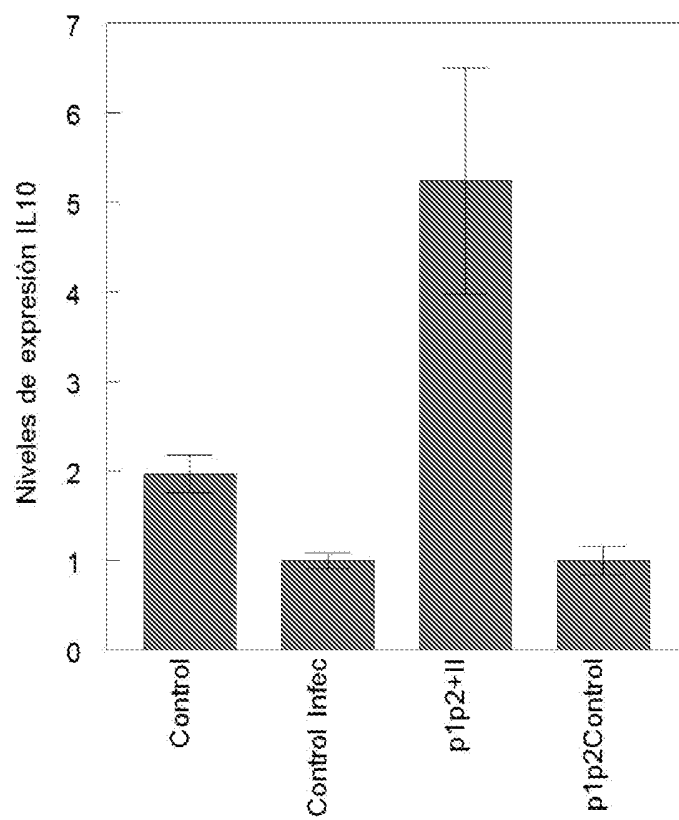


Fig. 9

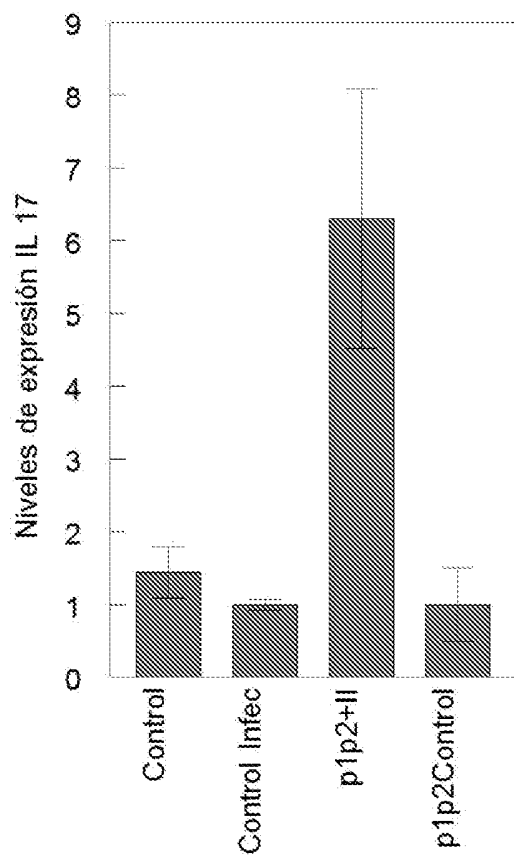


Fig. 10

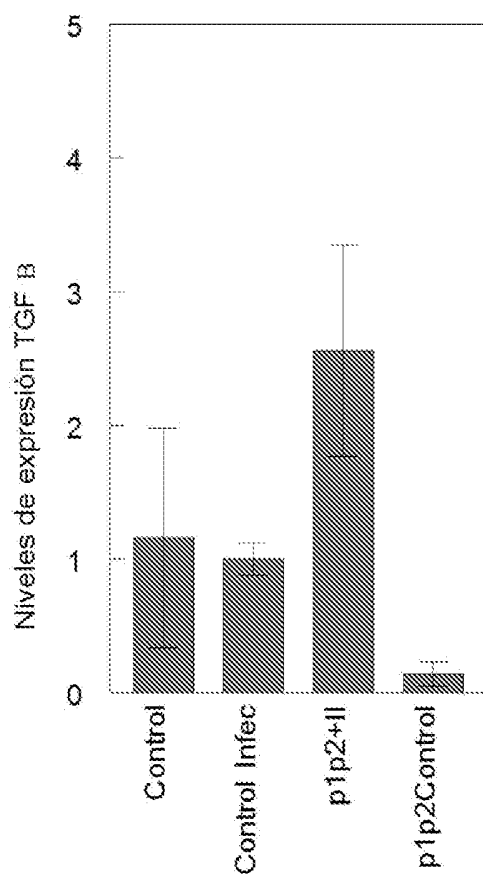


Fig. 11

# ES 2 424 831 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Granada

<120> ADYUVANTE INMUNOLÓGICO PARA LA FORMULACIÓN DE VACUNAS Y VACUNA  
FRENTE A LEISHMANIASIS QUE LO COMPRENDE

<130> IPR-474

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador HPTR directo

<400> 1  
tgctgacctg ctggattaca 20

<210> 2  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador HPTR reverso

<400> 2  
tatgtccccc gttgactgat 20

<210> 3  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador TNF-alfa directo

<400> 3  
agcccccagt ctgtatcctt 20

<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador TNF-alfa reverso

<400> 4  
ggtcactgtc ccagcatcctt 20

<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador INF-gamma directo

ES 2 424 831 B1

<400> 5  
caccctgaag tcgttgtgaa 20

<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador INF-gamma reverso

<400> 6  
cgtcaaaaga cagccactca 20

<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador TGF-beta directo

<400> 7  
gtgtggagca acatgtggaa 20

<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador TGF-beta reverso

<400> 8  
cgtcaaaaga cagccactca 20

<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador IL-2 directo

<400> 9  
aagctctaca gcggaagcac 20

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador IL-2 reverso

<400> 10  
atcctgggga gtttcaggtt 20

<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador IL-4 directo  
 <400> 11  
 ttgaacgagg tcacaggaga 20

<210> 12  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador IL-4 reverso  
 <400> 12  
 caccttgga ggcctacaga 20

<210> 13  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador IL-10 directo  
 <400> 13  
 ctgtttccat tggggacact 20

<210> 14  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador IL-10 reverso  
 <400> 14  
 aagtgtggcc agccttagaa 20

<210> 15  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador IL-12 directo  
 <400> 15  
 cctgaagtgt gaagcaccaa 20

<210> 16  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador IL-12 reverso  
 <400> 16  
 tcaggggaac tgctactgct 20



ES 2 424 831 B1

<210> 17  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Cebador IL-17 directo  
  
<400> 17  
ttcagggtcg agaagatgct 20

<210> 18  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Cebador IL-17 reverso  
  
<400> 18  
aaacgtgggg gtttcttagg 20



- ① N.º solicitud: 201331159  
② Fecha de presentación de la solicitud: 26.07.2013  
③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl. : **C07C317/28** (2006.01)  
**A61K39/39** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	P MOYLE et al., Current Medicinal Chemistry 2008, vol 15, nº 5, págs 506-516 (Bentham Science Publishers). "Self-adjuvanting lipopeptide vaccines", todo el documento.	1-27
A	I TSUNODA et al., Vaccine 1999, vol 17, págs 675-685. "Lipopeptide particles as the immunologically active component of CTL inducing vaccines".	1-27
A	WO 0147553 A1 (UNIVERSITY COLLEGE LONDON) 05.07.2001, reivindicaciones.	1-27
A	WO 2006122382 A2 (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO) 23.11.2006	21-27

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
25.09.2013

Examinador  
M. Fernández Fernández

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, CAS, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 05.09.2013

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-27	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-27	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	P MOYLE et al., Current Medicinal Chemistry 2008, vol 15, nº 5, págs 506-516 (Bentham Science Publishers). "Self-adjuvanting lipopeptide vaccines", todo el documento.	2008
D02	I TSUNODA et al., Vaccine 1999, vol 17, págs 675-685. "Lipopeptide particles as the immunologically active component of CTL inducing vaccines"	1999
D03	WO 0147553 A1 (UNIVERSITY COLLEGE LONDON)	05.07.2001
D04	WO 2006122382 A2 (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO)	23.11.2006

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La solicitud se refiere (reivindicaciones 1-18) al uso de un compuesto de fórmula (I) (ver reivindicación 2), que es un lípido con un grupo vinilsulfona, como adyuvante inmunológico. En la reivindicación 19 se especifica un compuesto de fórmula (II) y en las reivindicaciones 20-23 su uso para la fabricación de una vacuna frente a la leishmaniosis, en la que el antígeno son las proteínas Phb 1 y 2 de Leishmania. En las reivindicaciones 24-27 se reivindica la vacuna y su preparación.

El documento D1 divulga la utilización de lipopéptidos como adyuvantes para la preparación de una vacuna y recopila ejemplos que utilizan estos adyuvantes.

El documento D2 divulga la utilización de un lipopéptido con un resto palmitoilo como componente del adyuvante en una vacuna para el virus de influenza (ver especialmente página 684 conclusión).

El documento D3 divulga (ver reivindicaciones) un lipopéptido como adyuvante de un antígeno, comprende un péptido y un resto lipófilo, que es un ácido graso.

El documento D4 divulga una vacuna para leishmaniosis que comprende un complejo glicoproteico FML (fucose mannose ligand) y un adyuvante de saponina, luego no se considera relacionada con la vacuna descrita en la solicitud.

Ninguno de los documentos D1 a D4 divulga la utilización de un lípido con un grupo vinilsulfona terminal como adyuvante de un antígeno en una vacuna ni la vacuna frente a leishmaniosis que comprende dicho lipopéptido y proteínas Phb como antígeno. Los documentos D1 a D4 reflejan el estado de la técnica más próximo a la invención y, para un técnico en la materia, no sería posible deducir la utilización de un lípido tal como un ácido graso con un grupo vinilsulfona, como parte lipídica de un lipopéptido conveniente como adyuvante de un antígeno para preparar una vacuna útil para leishmaniosis.

Del estado de la técnica se deduce pues que la invención de las reivindicaciones 1-27 de la solicitud cumple las condiciones de novedad y actividad inventiva según lo establecido en los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.