



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 307 958**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03745782 .7**
96 Fecha de presentación : **03.04.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1490106**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2004**

54 Título: **Uso de un lipopéptido o una lipoproteína como adyuvante en la vacunación terapéutica o profiláctica.**

30 Prioridad: **04.04.2002 EP 02007640**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73 Titular/es:
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH
Inhoffenstrasse 7
38124 Braunschweig, DE

72 Inventor/es: **Guzman, Carlos, Alberto y**
Mühlradt, Peter

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

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

DESCRIPCIÓN

Uso de un lipopéptido o una lipoproteína como adyuvante en la vacunación terapéutica o profiláctica.

5 La invención se refiere al uso de un lipopéptido o una lipoproteína como adyuvante en la vacunación terapéutica o profiláctica a través de las mucosas, es decir como adyuvante mucoso.

10 Un tercio de todas las muertes anuales en el mundo se producen todavía por enfermedades infecciosas, que además son responsables de al menos el 15% de los casos nuevos de cáncer. Además, las enfermedades infecciosas están implicadas supuestamente en la fisiopatología de diferentes enfermedades crónicas de tipo inflamatorio, vascular o degenerativo. Las enfermedades infecciosas generan a la sociedad costes elevados por costes de tratamiento y la ausencia laboral de los enfermos.

15 Para la defensa frente a las enfermedades infecciosas se siguen generalmente dos vías, concretamente el tratamiento y la profilaxis. A este respecto, las inoculaciones han pasado a ser las armas más eficaces frente a las enfermedades infecciosas. Sin embargo hay todavía muchas enfermedades infecciosas para las cuales no se dispone todavía de ninguna vacuna o no puede conseguirse una inmunización suficiente. Muchas vacunas son insuficientes debido a una eficacia reducida, efectos secundarios graves, una estabilidad reducida o costes elevados. Existe por tanto una gran necesidad de inóculos nuevos y mejorados (vacunas).

20 Tradicionalmente se han empleado vacunas para la profilaxis en enfermedades infecciosas y se han implementado bien en este campo para muchas enfermedades. Conocimientos recientes sugieren que las vacunaciones son además un medio muy adecuado en la inmunoterapia de otras enfermedades contagiosas, en las que hasta el momento no se ha inoculado, tal como la hepatitis vírica, infecciones por *Helicobacter pylori*, infecciones por virus del herpes, etc. Otro campo de aplicación es la inclusión de vacunas en inmunoterapias e inmunoprofilaxis frente a enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, tumores, alergias y para la anticoncepción en el ser humano y los animales. En parte (especialmente también en el caso mencionado en último lugar) la capacidad de uso de vacunas parece estar asociada a una vía de administración mucosa eficaz y la generación unida a esto de una buena inmunorreacción mucosa.

30 La mayoría de las infecciones o bien se limitan a las mucosas o bien los desencadenadores de enfermedad deben pasar la mucosa durante las fases de infección tempranas. Por tanto hay que buscar obligatoriamente que en el caso de una vacunación no se obtenga sólo una respuesta inmunitaria sistémica, sino sobre todo también una respuesta inmunitaria mucosa, para detener de este modo tanto la infección (colonización) como el desarrollo de la enfermedad en primer lugar. Una buena respuesta inmunitaria mucosa reduciría claramente el peligro de contagio.

40 Dado que el sistema inmunitario sistémico y el mucoso si bien se solapan parcialmente, no son idénticos, las vacunas administradas por vía parenteral para la protección frente a patógenos mucosos es menos eficaz (McGhee, Mestecky *et al.*, "The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development", Vaccine 10, 75-88 (1992)). Las vacunas administradas por vía parenteral realmente estimulan respuestas inmunitarias esencialmente sistémicas, mientras que las vacunas administradas por vía mucosa, es decir a través de las mucosas, imitan la respuesta inmunitaria tal como se produce por infecciones naturales. De esta manera la inmunización mucosa conduce a respuestas inmunitarias mucosas y sistémicas eficaces.

45 Además ha de esperarse que la administración mucosa de vacunas conlleve menos efectos secundarios y se acepte bien por parte de los pacientes. Por la vía mucosa es más fácil administrar las vacunas y se pueden conciliar mejor con los protocolos de vacunación. Su preparación está asociada con menores costes.

50 La administración de antígenos por vía mucosa está asociada hasta el momento con algunas dificultades considerables. Un problema principal consiste en que los antígenos así administrados apenas son inmunogénicos. Esto se basa en diferentes mecanismos tales como (i) la eliminación acelerada de antígenos mediante mecanismos de aclaramiento no específicos del huésped (por ejemplo actividad ciliar, peristaltismo), (ii) degradación de antígenos mediante enzimas que actúan localmente, (iii) modificación de antígenos y/o modificación estructural como consecuencia de valores de pH extremos (medio ácido en el estómago, alcalino en el tracto intestinal), (iv) permeabilidad débil a antígenos de las mucosas así como (v) sólo un acceso limitado a células presentadoras de antígenos.

55 Para superar estas dificultades se emplean diversas estrategias, por ejemplo, inclusión o asociación de los antígenos con partículas (micropartículas, nanopartículas, bacterias o fragmentos de bacterias) como portadores, uso de constructos de tipo viral, uso de liposomas o ISCOM (complejos inmunoestimulantes) o virosomas, uso de plantas transgénicas, producción de antígenos mediante portadores bacterianos o virales debilitados, o bien como vectores habituales o bien como portadores para vacunas de ácido nucleico y/o la administración de estos agentes auxiliares con adyuvantes mucosos. A pesar de los intensos esfuerzos en este campo no se ha llegado hasta el momento prácticamente a ningún adyuvante mucoso suficientemente eficaz y simultáneamente muy compatible listos para su puesta en práctica.

65 Como "adyuvantes" se designan sustancias, que se añaden en una inmunización del propio antígeno (es decir de la sustancia que provoca la reacción inmunitaria deseada), para reforzar la respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células ("Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie", tomo 1, Spektrum Akademischer Verlag 1995). El

uso de muchos adyuvantes se basa sólo en la experiencia, no pudiendo explicarse ni predecirse el efecto de manera exacta. Tradicionalmente se usan sobre todo los siguientes grupos de adyuvantes: hidróxido de aluminio, emulsiones de aceites minerales, saponinas, detergentes, compuestos de silicio, tiourea, endotoxinas de bacterias Gram negativas, exotoxinas de bacterias Gram positivas, bacterias destruidas o sus partes.

El uso de adyuvantes óptimos desempeña en la vacunación un papel decisivo. Los antígenos administrados sin adyuvante proporcionan sólo en pocas ocasiones una respuesta inmunitaria suficiente. Además no depende sólo de la intensidad de la respuesta inmunitaria producida, sino también de su calidad. La estimulación de un patrón de inmunización incorrecto puede conducir a reacciones inmunopatológicas y a un empeoramiento de los síntomas infecciosos. En este contexto el adyuvante puede ayudar a apoyar la reacción inmunitaria deseada.

Los adyuvantes autorizados para los seres humanos son limitados. Uno de los pocos adyuvantes aceptados para el ser humano por los organismos de autorización es el hidróxido de aluminio. Debido al hecho de que un adyuvante es activo en el caso de una aplicación sistémica, es decir apoya el efecto de un antígeno, no puede deducirse de esto que sea válido también para otras vías de aplicación. Un ejemplo típico es el hidróxido de aluminio, que puede apoyar la inmunogenicidad de una sustancia en el caso de una administración intramuscular, subcutánea, intraperitoneal o intradérmica, que sin embargo sigue siendo ineficaz en el caso de una administración mucosa.

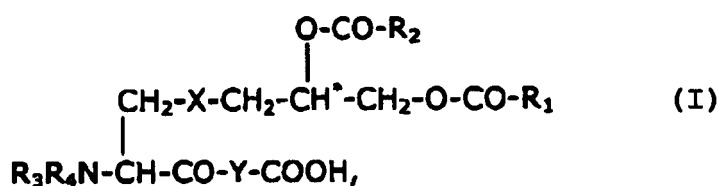
En los últimos años se han buscado de manera intensa nuevos adyuvantes, también aquéllos para la vía de administración mucosa. Sólo se han encontrado pocas sustancias, que pueden reforzar las respuestas mucosas. De éstas, algunas actúan como portadores, a los que deben unirse los antígenos o fusionarse con ellos. Mucho menos se encontraron “verdaderos” adyuvantes que puedan utilizarse universalmente, que se mezclen con los antígenos.

Como verdaderos adyuvantes mucosos se descubrieron la toxina termoestable de *Escherichia coli* y la toxina del cólera de *Vibrio cholerae*. De ambos se describió una eficacia como adyuvante mucoso (Holmgren *et al.*, “Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector system”, Vaccine 1179-1184, 1993 y Douce *et al.*, “Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1644-1648). Sin embargo la toxicidad inherente a ellas y los efectos secundarios potenciales perjudican su capacidad de uso en relación con las vacunaciones en seres humanos. Aunque se generaron derivados no tóxicos de estas moléculas por medio de ingeniería genética, se informa aún de efectos secundarios intensos, no tolerables, tales como modificaciones patológicas de la mucosa respiratoria y la entrada de la toxina en el cerebro (N. Garçon, presentación en el “Word Vaccine Congress”, Genf, del 26 al 28 de septiembre de 1999; y: van Ginkel, F.B. *et al.*, “cutting edge: The Mucosal Adjuvant Cholera Toxin Redirects Vaccine Proteins into Olfactory Tissues”, J. immunol. 2000, 165, 4778-4782).

Existe por tanto aún una necesidad urgente de nuevos adyuvantes mucosos compatibles y eficaces.

La invención se basaba por tanto en el objetivo de desarrollar una paleta de nuevos adyuvantes mucosos altamente eficaces y no tóxicos para los seres humanos, que pueden utilizarse con los más diversos componentes activos que han de apoyarse en vacunas convencionales o novedosas, tal como especialmente inóculos profilácticos o terapéuticos incluyendo vacunas contra el cáncer y vacunas de ADN.

Para la solución de este objetivo se prevé el uso de un lipopéptido o una lipoproteína de estructura (I) como adyuvante mucoso en la vacunación terapéutica o profiláctica a través de las mucosas,



en la que

R₁ y R₂, que pueden ser iguales o distintos entre sí, representan alquilo C₇₋₂₅, alquenilo C₇₋₂₅ o alquinilo C₇₋₂₅,

X representa S, O o CH₂,

R₃ y R₄ independientemente entre sí representan H o metilo e

Y representa una secuencia de aminoácidos no inmunógena por sí misma en la especie usada y compatible fisiológicamente, compuesta por de 1 a 25 aminoácidos,

y el átomo de carbono asimétrico marcado con * tiene la configuración R absoluta, según la regla de Cahn-Ingold-Prelog.

Si bien ya se mencionó conjuntamente en el documento DE 19652586 A1 el uso de un determinado péptido de S-(2,3-dihidroxiopropil)-cisteína con dos ácidos grasos de tipo éster unidos al grupo dihidroxiopropilo como adyuvante de vacuna, sólo era puramente hipotético y sin referencia a adyuvantes mucosos, de modo que había de partirse de una ruta de vacunación habitual.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos (Y) carboxiterminal unida al aminoácido 2,3-diaciloxipropil-sustituido se selecciona de las siguientes secuencias:

- a) GQTNT,
- b) SKKKK,
- c) GNNDESNISFKEK o
- d) GQTDNNSQSAAPGSGTTNT.

Actualmente se prefiere especialmente un péptido de S-[2,3-bispalmitoiloxi-(2R)-propil]cisteinilo, pudiendo ser la cadena peptídica a su vez una secuencia de aminoácidos no inmunógena por sí misma en la especie usada, fisiológicamente compatible, compuesta por de 1 a 25 aminoácidos.

Con el conocimiento actual, la cadena peptídica carboxiterminal podría tener una función que controla y dado el caso modifica la hidrofiliidad o la lipofiliidad del lipopéptido, de modo que en general pueden usarse todas las cadenas peptídicas o proteicas, que (según el fin de uso de la vacuna) cumplen este criterio. La cadena peptídica debe ser fisiológicamente compatible y especialmente no ser inmunógena por sí misma en la especie usada (es decir de la especie inoculada (vacunada), ya sea el ser humano o un animal).

Actualmente se considera decisiva para la eficacia como adyuvante mucoso la estructura según la fórmula (I), pareciendo que al centro asimétrico le corresponde en la posición designada una importancia central.

El adyuvante mucoso según la invención puede mezclarse con el antígeno o incorporarse con todos los métodos conocidos por los expertos unido a la molécula activa o el antígeno previsto para la vacunación, junto con éste en partículas físicas (por ejemplo micropartículas, nanopartículas, liposomas, ISCOM, polímeros) o biológicas (bacterias, partes de bacterias) o virosomas. En el caso de la unión a portadores pueden estar previstos como portadores también moléculas transportadoras o proteínas transportadoras.

Preferiblemente la lipoproteína o el lipopéptido usado según la invención se encuentra según la fórmula (I) indicada anteriormente en una preparación con el componente de vacunación activo (por ejemplo el antígeno), que es adecuada y está prevista para la aplicación intranasal, intra-NALT (nasal asociada al tejido linfoide), aerosolizada, oral, intrarrectal, conjuntival, intravaginal, intrauretral o para la aplicación en los conductos galactóforos del pecho femenino. Alternativamente el adyuvante mucoso según la invención puede encontrarse en un kit para la aplicación conjunta con una vacuna en una de las vías mencionadas anteriormente y dado el caso estar adaptado a la misma.

El lipopéptido o la lipoproteína según la invención se obtiene especialmente de manera sintética. Los lipopéptidos según la invención pueden obtenerse también con procedimientos conocidos en general en el campo técnico a partir de un clon de *Mykoplasma* y de manera especialmente ventajosa a partir de un clon de *Mykoplasma fermentans*. Los lipopéptidos según la invención se denominan también MALP, es decir "lipopéptidos activadores de macrófagos". A éstos pertenecen diferentes variantes, de los que MALP-2 es un lipopéptido de 2 kDa según la fórmula (I) con Y = GNNDESNISFKEK; R₃, R₄ = H y R₁, R₂ = palmitoil (C15) (S-(2,3-bispalmitoiloxipropil)-cisteinil-GNNDESNISFKEK).

La síntesis de los lipopéptidos y lipoproteínas puede realizarse ventajosamente según lo especificado en "Synthesis of N_α-Fmoc protected derivatives of S-(2,3-dihydroxypropyl)-cysteine and their application in peptide synthesis", J.W. Metzger, K.-H. Wiesmüller, G. Jung en: Int. J. Peptide Proteine Res. 38, 1991, 545-554". En éstos se designan sin embargo los lipopéptidos correspondientes a los naturales (por ejemplo obtenidos a partir de un clon de *Mykoplasma*) erróneamente como con configuración S, aunque los mismos compuestos según la nomenclatura internacional válida según Cahn-Ingold-Prelog deben designarse como con configuración R (véase por ejemplo D. Chapman en "Introduction to Lipids", Mc Graw-Hill, Londres, 1969, pág. 67 con respecto a "Phosphoglycerides"; Burgos *et al.* J. Org. Chem. 1987, 52 4973-4977; Morr *et al.* Eur. J. Immunol. 2002, 32:3337-3347).

En un perfeccionamiento de la invención el lipopéptido o la lipoproteína puede encontrarse en una preparación con al menos otro adyuvante y/o antígeno. Especialmente puede administrarse conjuntamente con uno o varios ligandos o sustancias antiinflamatorios, antiangiogénicos, citotóxicos o inmunomoduladores (por ejemplo quimiocinas, citocinas, ligando CD40) o con anticuerpos o administrarse en una preparación con éstos.

El lipopéptido o la lipoproteína puede también estar asociado o unido, tal como ya se mencionó anteriormente, con un portador físico o biológico. Además puede estar contenido y utilizarse en una preparación con otros aditivos y excipientes, especialmente conservantes o estabilizadores.

La invención representa un gran avance en los esfuerzos por proporcionar adyuvantes mucosos eficaces: el lipopéptido puede modificarse en el marco de la fórmula (I) y por consiguiente variarse en su eficacia cualitativa y cuantitativa y adaptarse al uso deseado. Puede producirse de una manera comparativamente barata y no es tóxico para el ser humano. Cantidades de mezclado comparativamente reducidas son suficientes en la mayoría de los casos para efectos de refuerzo claros. Los lipopéptidos según la invención pueden caracterizarse bien en sus propiedades químicas y bioquímicas y pueden obtenerse de una manera suficientemente pura especialmente de manera sintética (Mühlradt, P.F., M. Kless, H. Meyer, R. Sussmuth, G. Jung (1997), Isolation, structure, elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from Mycoplasma fermentans acting at picomolar concentration"; J. Exp. Med. 185: 1951; y Takeuchi, O., A. Kaufmann, K. Grote, T. Kawal, K. Hoshino, M. Morr, P.F. Mühlradt, y S. Akira (2000); "Cutting edge: Preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2-and MyD88-dependent signaling pathway"; J. Immunol. 164:554, U. Deiters, P.F. Mühlradt (1999) Mycoplasmal Lipopeptide MALP-2 induces the chemoattractant proteins MIP-1a, MCP-1 and MIP- 2 and promotes leukocytes infiltration in mice, Infect Immun, 67(7), 3390-3398), por tanto no han de esperarse efectos secundarios serios según el conocimiento actual.

Otra ventaja de la invención consiste en que en el caso de inmunizaciones con mezclado del adyuvante mucoso según la invención se encontraron altas concentraciones de IgA en las secreciones mucosas de los animales de ensayo tratados. Esta especie de anticuerpo es de especial importancia para la protección de las mucosas ante infecciones.

Dado que hasta el momento no se ha autorizado ningún adyuvante eficaz para la inmunización intranasal en pacientes humanos, la invención representa un avance médico importante en este campo.

Los lipopéptidos o lipoproteínas descritos en esta invención de estructura (I) general pueden usarse también como adyuvante de manera general, es decir de otros modos distintos al mucoso, incluyendo aplicaciones especiales para vacunas de ADN y vacunas contra el cáncer, vacunas contra enfermedades no infecciosas y similares, por ejemplo a través de las vías de vacunación habituales (intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal).

Los adyuvantes según la invención pueden combinarse con los más diversos antígenos para dar inóculos. Como antígenos pueden seleccionarse especialmente antígenos diana para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades infecciosas, tumores, enfermedades autoinmunitarias, alergias así como enfermedades inflamatorias crónicas o agudas. La selección puede realizarse entre otros a partir de la combinación de antígeno de agentes infecciosos tales como virus, bacterias, parásitos, *Rickettsia*, *Mycoplasma*, hongos y similares. Por una inoculación se entiende también un tratamiento con antígenos para el control de la fertilidad en poblaciones humanas o animales.

Las propiedades ventajosas que se derivan de los ejemplos del adyuvante mucoso según la invención no pueden deducirse a partir de ninguna publicación previa a esta solicitud.

Enfoque metódico para los experimentos/estudios

En la fase inicial se realizaron en primer lugar estudios de selección *in vitro*, para poder estimar el potencial de los lipopéptidos estudiados con respecto a la activación de células presentadoras de antígenos. Como células diana se usaron células dendríticas procedentes de la médula ósea, que se obtuvieron de precursores con ayuda de FEC-GM. Completamente en contra de lo que podría esperarse debido a la actividad de MALP-2 frente a macrófagos, MALP-2 mostró sólo una actividad débil frente a células dendríticas primarias. En comparación con las muestras control, que se habían incubado en presencia de lipopolisacáridos de *E. coli* (LPS, 10 ng/ml), se observó una activación débil de células dendríticas, tratadas con MALP-2 5 ng/ml.

Debido a estos ensayos previos no podía esperarse para MALP-2 y los lipopéptidos correspondientes ninguna idoneidad como adyuvante, dado que de los adyuvantes se presupone una cierta capacidad para activar células dendríticas. Las células dendríticas son el grupo principal de células presentadoras de antígenos en general. Desempeñan en la respuesta inmunitaria primaria un papel central, (1.) al representar las células presentadoras de antígenos más eficaces, (2.) ser la fuente más importante para clones de células T específicos, y (3.) ser los activadores más importantes de células T en reposo, que pueden provocar respuestas inmunitarias primarias *in vivo*. Aunque las células dendríticas tratadas con LPS muestran una fuerte regulación por incremento o multiplicación de CD40 incluyendo CD80 y CD86, en el caso de células dendríticas tratadas con MALP-2 puede percibirse, si acaso, sólo un efecto débil.

Esto era parcialmente de esperar y estaba de acuerdo con los resultados obtenidos en macrófagos. En este caso se había encontrado que tras una fase de regulación por incremento inicial en el caso de un tratamiento continuo con MALP-2 aparecían una conversión aumentada y una expresión reducida de moléculas CMH de clase II, que son esenciales para la presentación correcta de los antígenos (M. Frisch *et al.*, Eur. J. Immunol. (1996) 26, 1050-1057). Por ello es aún más sorprendente el efecto encontrado del adyuvante.

Los resultados de los ensayos previos contradecían por tanto fuertemente una posible actividad de los lipopéptidos y lipoproteínas estudiados en este caso como adyuvantes.

Aunque estos estudios *in vitro* sugerían que los lipopéptidos en cuestión no prometían ningún éxito, se incluyeron como muestras control negativas, es decir como ejemplos con poco efecto de sustancias activadoras de macrófagos, en estudios *in vivo* de los inventores, dado que las sustancias estaban disponibles de ensayos anteriores.

Sorprendentemente, completamente en desacuerdo con los ensayos *in vitro*, se encontró que por ejemplo MALP-2 en el caso de una administración junto con el antígeno modelo β -galactosidasa por vía o bien intranasal (i.n.) o bien intraperitoneal (i.p. (nota: en el modelo animal)) en una dosis de sólo 0,5 μ g por animal por dosis podían aumentarse los títulos séricos de IgG específicas de β -galactosidasa en de 675 a 3560 veces (i.n.) o en de 64 a 128 veces (i.p.). En el caso del uso de los lipopéptidos según la invención pueden provocarse ya tras la primera inmunización aproximadamente respuestas de IgG máximas, y estos títulos de IgG corresponden a los de la administración de 10 μ g (exceso de tres veces en moles) de la subunidad B de la toxina del cólera (TCB), un adyuvante mucoso bien caracterizado. Se encuentran resultados similares en el caso de una administración intradérmica o subcutánea de los lipopéptidos y lipoproteínas según la invención. Por tanto ha de partirse de que la administración de los lipopéptidos y lipoproteínas según la invención puede y debe tener lugar en al menos una concentración 3 veces menor (molar) en comparación con los adyuvantes convencionales.

También pudo mostrarse que la administración de los lipopéptidos según la invención por vía intranasal conduce en general a una estimulación eficaz del sistema inmunitario mucoso. Así se encontraron en el caso de la administración de MALP-2 como adyuvante al antígeno modelo con respecto a la IgA total, el 36% o el 23% de IgA específica para antígeno en lavados pulmonares y vaginales. Esto muestra que los lipopéptidos según la invención puede provocar no sólo respuestas inmunitarias mucosas locales, sino que la proliferación de células que producen IgA a otras regiones mucosas alejadas tiene lugar en una medida que conduce a buenas respuestas inmunitarias mucosas. Este efecto va unido a la vía de administración mucosa.

La administración conjunta de los lipopéptidos según la invención con el antígeno produjo también respuestas inmunitarias más fuertes que TCB, tanto regionalmente en los ganglios linfáticos como en el bazo ($p < 0,05$). El análisis de isotipos de IgG específicos para β -galactosidasa y los perfiles de las citocinas secretadas por las células estimuladas *in vitro* mostraron que la administración conjunta de los lipopéptidos desencadenaba un patrón de respuesta de Th2 dominante. Por tanto, los resultados de los estudios demuestran que los lipopéptidos según la invención representan adyuvantes eficaces para la administración mucosa de antígenos en vacunas.

Un aspecto importante que debe destacarse aquí es que un aumento por incremento de la dosis de lipopéptido (partiendo de las dosis óptimas mencionadas en el presente documento) conduce a una reducción constante de la respuesta inmunitaria. Este efecto contrario es inesperado y no podía deducirse a partir del estado de la técnica.

Parte de ejemplos

General

Los estudios representados en los ejemplos se realizaron de manera prioritaria con un MALP-2 sintético, correspondiente en su mayor parte a un lipopéptido procedente de *Micoplasma*, como adyuvante mucoso junto con β -galactosidasa como antígeno modelo. Este lipopéptido de ejemplo especial se seleccionó debido a sus propiedades intrínsecas determinadas previamente (propiedades bioquímicas, actividad estimuladora de macrófagos). Siempre que no se indique lo contrario, el lipopéptido sintético usado en los ejemplos es S-[2,3-bispalmitoiloxipropil]cisteinil-GNNDESNIKFKEK, denominado en lo sucesivo siempre simplemente "MALP-2".

Las dosis para MALP-2 se limitaron en primer lugar en estudios previos, en los que se administró MALP-2 por vía subcutánea, intradérmica, intranasal o intraperitoneal a ratones. En todos los protocolos, la administración simultánea o asociada de MALP-2 con β -galactosidasa condujo a un aumento significativo de la producción de anticuerpos específicos para β -galactosidasa. Las respuestas inmunitarias inducidas, que se obtuvieron en presencia de MALP-2 tras una inoculación por vía intranasal o intraperitoneal, se analizaron entonces y se compararon con las obtenidas en los ensayos comparativos con TCB como adyuvante.

Los ejemplos dan como resultado que el uso de MALP-2 en una dosis de sólo 0,5 μ g por administración condujo a un aumento significativo de las respuestas tanto humoral como celular específicas para β -galactosidasa. Ya una administración intraperitoneal condujo a una respuesta inmunitaria mejorada, sin embargo la vía intranasal demostró ser aún mucho más eficaz. A diferencia de esto, era necesaria un exceso tres veces mayor en moles de TCB para obtener respuestas humorales mucosas o sistémicas comparables. Con respecto a las respuestas celulares, las células de bazo de ratones inmunizados con MALP-2 mostraron una proliferación claramente mayor ($p < 0,05$) que la de animales que se habían vacunado con el exceso tres veces mayor en moles de TCB.

La respuesta primaria obtenida con MALP-2 como adyuvante por vía intranasal se caracterizó con respecto a la cinética de la respuesta de anticuerpos específica para β -galactosidasa por la presencia de títulos de anticuerpos elevados, que ya alcanzaba tras la primera inmunización casi la meseta máxima. Las respuestas humoral y celular se produjeron de una manera más intensa tras una vacunación i.n., lo que indica un efecto local diferenciado de MALP-2, que podía atribuirse o bien a su biodisponibilidad o bien a la distribución espacial de los receptores específicos en las células diana. Tal como ya se describió, se encontraron también en los tejidos mucosos que no podían alcanzarse directamente mediante la vía de vacunación respuestas inmunitarias claras, concretamente IgA específica para β -galactosidasa en lavados pulmonares y vaginales.

Por tanto, los estudios en el marco de la invención han dado como resultado que los lipopéptidos según la invención son adyuvantes mucosos nuevos y potentes, suprimiéndose el requisito de conjugar el antígeno diana con el lipopéptido activo, a diferencia de otros lipopéptidos.

- 5 A lo largo de todo el transcurso de los experimentos no se observó en los animales inoculados ningún efecto secundario serio o signos de toxicidad aguda o crónica. Por la unidad peptídica relativamente corta dentro de los lipopéptidos según la invención existe una inmunogenicidad relativamente reducida, lo que minimiza el peligro de que aparezcan respuestas inmunitarias frente a los propios lipopéptidos. Esto representa una ventaja clara con respecto a las proteínas como adyuvantes. Tras la administración intranasal de MALP-2 como adyuvante no pudo detectarse
10 ningún anticuerpo anti-MALP-2. Esto representa una ventaja clara con respecto a las proteínas como adyuvantes, dado que una respuesta inmunitaria frente al propio adyuvante puede perjudicar a una respuesta inmunitaria posterior frente a otro inóculo, que se administró conjuntamente con el mismo adyuvante. Los lipopéptidos según la invención pueden utilizarse en inóculos frente a los más diversos patógenos así como en vacunas contra el cáncer o vacunas para el control de la fertilidad. Otras ventajas de la invención radican en la buena durabilidad de los lipopéptidos en caso de
15 almacenamiento, una mayor pureza de los lipopéptidos que pueden producirse sintéticamente y un comportamiento químico y bioquímico previsible.

Leyendas de las figuras

- 20 Figura 1

Estudios in vitro con células dendríticas primarias

- 25 Se obtuvieron células dendríticas primarias a partir de médula ósea de ratones BALB/c usando el FEC-GM recombinante (5×10^4 U/ml) mediante maduración *in vitro* de precursores. Las células dendríticas maduras se estimularon con 10 ng/ml de lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* o 5 ng/ml de MALP2. A continuación se marcaron doblemente las células con anticuerpos específicos para CD11c (marcadores de células dendríticas) en combinación con anti-CD40 o anti-CD80 o anti-CD86. La expresión de CD40, CD80 o CD86 en las células marcadas con CD11c se analizó con
30 ayuda de citometría de flujo. Los resultados se expresan en porcentaje de células positivas con respecto a toda la población positiva para CD11c.

- Figura 2

- 35 *Análisis de células dendríticas tras el tratamiento con MALP-2 con ayuda de citometría de flujo (FACScan)*

- Se obtuvieron células dendríticas primarias a partir de médula ósea de ratones BALB/c usando el FEC-GM recombinante (5×10^4 U/ml) mediante la maduración *in vitro* de precursores. Las células dendríticas maduras se estimularon
40 con 10 ng/ml de lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* o 5 ng/ml de MALP2. A continuación se marcaron doblemente las células con anticuerpos específicos para CD11c (marcadores de células dendríticas) en combinación con anti-CD40 o anti-CD80 o anti-CD86 y se analizaron las células por medio de citometría de flujo. Las puertas se situaron basándose en un marcaje con isótopos de anticuerpos control no relacionados.

- 45 Figura 3

Respuestas humorales, estimuladas tras una inoculación con MALP-2 como adyuvante

- 50 Se inmunizaron ratones por vías subcutánea (s.c.), intraperitoneal (i.p.), intradérmica (i.d.) e intranasal (i.n.) con o bien β -galactosidasa pura (40 μ g) o β -galactosidasa mezclada con MALP-2 (0,5 μ g) en los días 0, 7 y 14. En el día 28 tras la inmunización primaria se tomaron muestras de suero y se determinó el título de los anticuerpos específicos para β -galactosidasa por medio de ELISA. Los resultados se representan como el $\log_2$ recíproco del título de criterio de valoración medio geométrico. Para el control se incluyó un grupo, en el que se inmunizaron los animales a través
55 de la vía con β -galactosidasa usando hidróxido de aluminio como adyuvante.

Figura 4

- 60 *Respuestas humorales, estimuladas tras la inoculación usando MALP-2 como adyuvante en una dosis de 1 μ g por animal e inmunización*

- Se inmunizaron ratones a través de la vía intraperitoneal (i.p.) e intranasal (i.n.) con o bien β -galactosidasa pura (40 μ g/dosis) o bien β -galactosidasa mezclada con MALP-2 (1 μ g/dosis) en los días 0, 7 y 14. En el día 28 tras la
65 inmunización primaria se tomaron muestras de suero y se determinó el título de los anticuerpos específicos para β -galactosidasa por medio de ELISA. Los resultados se representan como valores de absorción (DO 405 nm).

Figura 5

Reacciones celulares, estimuladas tras una inoculación usando diferentes concentraciones de MALP-2 como adyuvante

Respuestas de proliferación de células T específicas para β -galactosidasa de células de bazo de ratón inmunizadas por vías i.p. o i.n. con o bien β -galactosidasa pura (40 μ g/dosis) o bien β -galactosidasa mezclada con MALP-2 (1 ó 0,5 μ g/dosis) en los días 0, 7 y 14. En el día 28 tras la inmunización primaria se sacrificaron los animales y volvieron a estimularse las células de bazo *in vitro* cuatro días en presencia de 20 μ g/ml de β -galactosidasa soluble. Los resultados se representan como índices de estimulación (cpm de muestras /cpm en células control no estimuladas).

Figura 6

Cinética de las respuestas de IgG específica para β -gal en sueros de ratones inoculados

Los grupos de animales (n=5) se inocularon o bien por vía i.n. (A) o bien por vía i.p. (B) con 50 μ g de β -gal (β -gal más 10 μ g de TCB (β -gal plus 0,5 μ g de MALP-2 (β -gal plus 0,5 μ g de MALP-2) o una disolución tampón pura (β -gal plus 0,5 μ g de MALP-2). Los días de las inoculaciones (día 0, 14 y 21) están marcados con las flechas. Los resultados se representan como el $\log_2$ recíproco del título de criterio de valoración geométrico, la DEM (desviación estándar media) se indica por medio de líneas verticales.

Figura 7

IgA específica para β -galactosidasa en lavados pulmonares y vaginales de ratones inoculados por vía i.n.

Los resultados se representan como porcentaje de IgA específica para β -galactosidasa con respecto a la IgA presente en total. La DEM se indica mediante líneas verticales.

Figura 8

Determinación de los niveles de IgE en suero tras la inmunización usando MALP-2 como adyuvante

Se inocularon ratones por vía intraperitoneal (i.p.) e intranasal (i.n.) o bien con β -galactosidasa pura (40 μ g), exclusivamente MALP-2 o bien β -galactosidasa mezclada con MALP-2 (0,5 μ g) en los días 0, 7 y 14. En el día 28 tras la primera inmunización se tomaron muestras de suero y se determinaron los niveles de IgE por medio de un ELISA de captura. Los resultados se representan como concentraciones de IgE (ng/ml).

Figura 9

Respuestas de proliferación de células T específicas para β -galactosidasa del bazo (A y B) y células de los ganglios linfáticos regionales (C) de ratones inoculados por vía i.p. o i.n.

Las células se volvieron a estimular *in vitro* durante cuatro días con diferentes concentraciones de β -galactosidasa soluble. Los resultados se representan como valor de cpm medio restado de los valores de referencia de células no estimuladas de grupos triples. La DEM se representa mediante líneas verticales.

Figura 10

Perfiles de Th estimulados en ratones inoculados

Se determinaron las citocinas e isotipos de IgG específicos para β -galactosidasa sérica, separados de células de bazo estimuladas *in vitro*, en los ratones inoculados por medio de ELISA. Los resultados se representan como razones de concentración de IgG1/IgG2a e IL-10/IL-2 (las citocinas halladas con mayor frecuencia).

Figura 11

*Citocinas separadas de células estimuladas *in vitro* de ratones inoculados*

Se midió la producción de citocinas por medio de ELISA en el sobrenadante líquido de células, que se cultivaron durante 48 (IL-2) o 96 horas (IFN γ , IL-4 e IL-10) en presencia de β -gal (20 μ g/ml). Los resultados se representan como la razón entre las cantidades de citocina encontradas en los grupos inoculados en comparación con los ratones control no inoculados.

Figura 12

Respuestas humorales estimuladas tras la vacunación con MALP-2 como adyuvante en una dosis de 2 µg por animal por inmunización

Se inmunizaron los ratones o bien con β -galactosidasa sola (100 µg/dosis) o bien con β -galactosidasa mezclada con MALP-2 (2 µg/dosis) en los días 0, 7, 14 y 31 por vía oral. En el día 45 tras la inmunización primaria se tomaron muestras de suero y se determinaron los títulos de los anticuerpos específicos para β -galactosidasa con ELISA.

Ejemplo 1

Estimulación in vitro de células primarias de roedor dendríticas obtenidas a partir de la médula ósea por medio de MALP-2

Protocolo de ensayo: Se obtuvieron cultivos de células primarias dendríticas obtenidas a partir de la médula ósea de ratones BALB/c tras una maduración *in vitro* de precursores en presencia del FEC-GM recombinante (5×10^4 U/ml) según los procedimientos habituales. Las células dendríticas maduras se estimularon con lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* o 5 ng/ml de MALP2. Tras 12 ó 24 horas de estimulación se analizaron las células con ayuda de citometría de flujo, para establecer la expresión de marcadores superficiales, que son importantes para la capacidad de presentación de anticuerpos.

Para determinar los compuestos que tienen potencial como adyuvante en aplicaciones *in vivo* en el campo de las vacunaciones, se realizó un primer estudio *in vitro* con cultivos primarios de células dendríticas procedentes de médula ósea. Se seleccionaron células dendríticas, dado que son las células presentadoras de antígenos más eficaces y en las que la respuesta inmunitaria primaria desempeña un papel clave. En efecto son el único tipo de célula que puede activar *in vivo*, células T en reposo para iniciar una respuesta inmunitaria primaria. Como consecuencia se trataron células dendríticas con las unidades estudiadas o LPS, lo que sirvió como control. Se tomaron muestras en diferentes momentos, con anticuerpos marcados con fluorescencia, que son específicos para marcadores celulares, que son decisivos para las capacidades de presentación de antígenos de las células dendríticas, se marcaron y se analizaron por medio de citometría de flujo. Los resultados encontrados (figuras 1 y 2) muestran que a diferencia del grupo control positivo la expresión de CD40 y de la molécula coestimuladora CD86 en las células dendríticas tratadas con MALP-2 no se había aumentado. El efecto sobre la expresión de la molécula coestimuladora CD80 era reducido, en caso de que se produjera. Las moléculas coestimuladoras envían señales, que además son esenciales para la presentación de los epítomos implicados en el contexto de la molécula CMH para la activación eficaz de las células T. Ya se informó anteriormente de que el efecto de adyuvantes de las mucosas probados (adyuvantes mucosos) tales como por ejemplo toxina del cólera está unido a un refuerzo selectivo de la expresión de moléculas coestimuladoras. En consecuencia, los resultados encontrados *in vitro* indican claramente que MALP-2 no presenta ningún o poco potencial como adyuvante de las mucosas.

Ejemplo 2

Respuestas humorales, estimuladas tras una inoculación por diferentes vías usando MALP-2 en diferentes concentraciones como adyuvante

Protocolo de ensayo: Se compraron ratones BALB/c- (H-2d) hembra de seis a ocho semanas de edad de Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Alemania) y se trataron según las directrices locales y de la UE. Se inocularon grupos de 5 ratones en cada caso en el día 1, 7 y 14 o bien con 40 µg de β -galactosidasa pura (Boehringer, Mannheim, Alemania) o bien con mezclado de 1 ó 0,5 µg de MALP-2 sintético. Para la administración intranasal (i.n.) se aplicaron 10 µl en cada orificio nasal, mientras que en la inyección por vía i.p., s.c. y i.d. se resuspendió β -galactosidasa con o sin MALP-2 en 400, 100 o 100 µl de PBS. 28 días tras la inoculación primaria se tomaron muestras de suero y se conservaron a -20°C hasta la determinación de los anticuerpos específicos para β -gal. Se recubrieron placas de ensayo Nunc-Immuno MaxiSorp con 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 100 µl de β -galactosidasa (Boehringer, Mannheim, Alemania) con 5 µg/ml en tampón carbonato 0,05 M (pH 8,2) por pocillo. Se añadieron diluciones de suero con BSA al 1% y Tween-20 al 0,05% en PBS (100 µg/pocillo), y se incubaron las placas a 37°C durante 24 horas. Tras el lavado se añadió IgG de cabra anti-ratón específica de cadena γ biotinilada (Sigma Chemie, Deisenhofen, Alemania) y se incubaron las placas durante otra hora a 37°C. Tras lavar cuatro veces se añadieron 100 µl de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Pharmingen) a las células y se incubaron las placas durante 30 minutos a 37°C. Tras lavar cuatro veces se revelaron las reacciones por medio de ABTS en tampón citrato-fosfato 0,1 M (pH 4,35), que contenía H₂O₂ al 0,01%. Los resultados se representaron tras o bien la absorción a 405 nm o bien los títulos de criterio de valoración ($\log_2$ recíproco de la última dilución, que tras 30 minutos de incubación a 405 nm dio como resultado una densidad óptica de 0,1 unidades por encima de los valores del grupo control negativo).

A pesar de los resultados decepcionantes, que se establecieron en el estudio *in vitro* de células dendríticas primarias usando MALP-2, se decidió incluir en el segundo estudio *in vivo* grupos de animales, que se habían inoculado usando MALP-2 como adyuvante. En consecuencia se inocularon los ratones o bien con la β -galactosidasa de antígeno modelo pura o bien con el antígeno más MALP-2 por vía i.p., s.c., i.d. e i.n. Al contrario de lo esperado se estableció un fuerte

efecto adyuvante, cuando el antígeno estaba mezclado con 0,5 μg de MALP-2, y concretamente independientemente del modo y tipo de aplicación (figura 3). Las reacciones más fuertes se establecieron en las inoculaciones por vía i.p. e i.n. Sin embargo, las respuestas obtenidas eran siempre al menos tan fuertes (i.d.) o más fuertes que en el caso del uso de hidróxido de aluminio como adyuvante convencional en la inyección s.c. (figura 3).

Dado que en el caso de los estudios anteriores usando lipopéptidos convencionales se añadieron concentraciones esencialmente mayores del componente usado como adyuvante, se estudió el efecto de dosis mayores de MALP-2. Con este fin se inocularon animales con 1 μg de MALP-2 como adyuvante por las dos vías de inmunización más eficaces (i.p. e i.n.) con β -galactosidasa. A diferencia de lo esperado, el aumento de la dosis de MALP-2 condujo a un aumento del efecto adyuvante (figura 4). Esto mostró que en el caso de una aplicación de las concentraciones convencionales, que se indican en la bibliografía para otros lipopéptidos, en los estudios *in vivo* de MALP-2 no hubiera podido establecerse un efecto adyuvante al nivel de las respuestas humores.

Ejemplo 3

Respuestas inmunitarias humores, estimuladas tras una inoculación por diferentes vías usando MALP-2 como adyuvante en diferentes concentraciones

Protocolo de ensayo: Se compraron ratones BALB/c- (H-2d) hembra de seis a ocho semanas de edad de Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Alemania) y se trataron según las directrices locales y de la UE. Se inocularon grupos de 5 ratones en cada caso en el día 1, 7 y 14 o bien con 40 μg de β -galactosidasa pura (Boehringer, Mannheim, Alemania) o bien con mezclado de 1 ó 0,5 μg de MALP-2 sintético. Para la administración intranasal (i.n.) se aplicaron 10 μl en cada orificio nasal, mientras que en el caso de la inyección i.p. se resuspendió β -galactosidasa con o sin MALP-2 en 400 μl de PBS. Se extrajeron los bazo y se juntaron (se combinaron) para la determinación de las reacciones inmunitarias celulares. Las células se cultivaron en RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M y L-glutamina 1 mM (GIBCO BRL, Karlsruhe, Alemania) a 37°C en una atmósfera húmeda con CO_2 al 5%. Las suspensiones de células de bazo se ajustaron hasta 5×10^6 células/ml en medio completo. Se introdujeron hasta 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ en una placa de microtitulación de fondo plano (Nunc) con 96 pocillos y se incubaron estas placas durante 4 días con la adición de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de β -galactosidasa soluble. Durante las últimas 18 horas de cultivo se añadieron a cada pocillo 1 μCi de [^3H]timidina (Amersham International, Friburgo, Alemania). Las células se recogieron entonces con un colector de células (Inotech, Wohlen, Suiza) de papel de filtro (Filtermat A; Wallac, Friburgo, Alemania) y se determinó la cantidad de la [^3H]timidina insertada en el ADN de las células multiplicadas con ayuda de un contador de centelleo γ (Wallac 1450, Micro-Trilux). Los resultados se representan como media aritmética de la captación de [^3H]timidina en cpm. Los resultados se representan como índices de estimulación (IS, cpm de muestras /cpm en células control no estimuladas).

Teniendo en cuenta la sorprendente reducción del efecto adyuvante a nivel humoral, que se observó en el caso del uso de MALP-2 en mayores dosificaciones, se decidió establecer si puede observarse un efecto similar al nivel de las respuestas inmunitarias celulares. En consecuencia se inmunizaron ratones con o bien β -galactosidasa pura o bien β -galactosidasa mezclada con 1 μg de MALP-2. Veintiocho días tras la inmunización se purificaron los bazo, volvieron a estimularse *in vitro* con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de β -galactosidasa y se determinó su capacidad de multiplicación con ayuda de la medición de la inserción de [^3H]timidina en su ADN por medio de un contador de centelleo γ . Los resultados conseguidos (figura 5) confirman que el uso de MALP-2 en mayores dosificaciones no conduce sólo a que no puedan establecerse ninguna respuesta humoral más, sino que se reduce también la inmunización mediada por las células.

Ejemplo 4

La administración intranasal e intraperitoneal conjunta de MALP-2 con un antígeno soluble estimula respuestas humores sistémicas eficaces

Protocolo de ensayo: Se compraron ratones BALB/c- (H-2d) hembra de seis a ocho semanas de edad de Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Alemania) y se trataron según las directrices locales y de la UE. Se inocularon grupos de 5 ratones en cada caso en el día 1, 14 y 21 o bien con 40 μg de β -galactosidasa pura (Boehringer, Mannheim, Alemania) con mezclado de 0,5 μg de MALP-2 sintético o 10 μg de la subunidad B de la toxina del cólera (TCB; ICN Biomedicals Inc., Ohio) como adyuvante convencional. Para la administración intranasal (i.n.) se aplicaron 10 μl en cada orificio nasal, mientras que en la inyección i.p. se resuspendió β -galactosidasa con o sin MALP-2 en 400, 100 o 100 μl de PBS. Se tomaron muestras de suero en diferentes momentos (día 0, 13, 20 y 30) y se conservaron a -20°C hasta la determinación de los anticuerpos específicos para β -galactosidasa. Se recubrieron placas de ensayo con 96 pocillos Nunc-Immuno MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 100 μl de β -gal (Boehringer, Mannheim, Alemania) con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampón carbonato 0,05 M (pH 8,2) por pocillo. Se añadieron diluciones de dos veces en serie de los sueros o lavados en PBS con BSA al 1% y Tween-20 al 0,05% (100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$) y se incubaron las placas a 37°C durante 24 horas. Tras el lavado se añadió IgG de cabra anti-ratón específica de cadena γ biotinilada (Sigma Chemie, Deisenhofen, Alemania) y se incubaron las placas otra hora más a 37°C. Tras lavar cuatro veces se añadieron 100 μl de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Pharmingen) a las células y se incubaron las placas durante 30 minutos a 37°C. Tras lavar cuatro veces se revelaron las reacciones por medio de ABTS en tampón citrato-fosfato 0,1 M (pH 4,35), que contenía H_2O_2 al 0,01%. Los resultados se representaron como el $\log_2$ recíproco de la última dilución, que tras una incubación de 30 minutos dio como resultado una densidad óptima a 405 nm de 0,1 unidades en comparación con los valores del grupo control negativo.

Debido a los resultados alentadores de los estudios previos se decidió analizar en detalle las reacciones inmunitarias establecidas usando MALP-2 como adyuvante por las dos vías de inmunización más eficaces, concretamente i.p. e i.n., y compararlas con las de un adyuvante de las mucosas probado. En consecuencia se valoró la capacidad de MALP-2, de provocar una reacción inmunitaria humoral eficaz, determinándose los títulos de suero de anticuerpos específicos para β -galactosidasa en ratones inoculados. Tal como se representa en la figura 6A, la administración de β -galactosidasa pura (50 μ g/dosis) dio como resultado la inducción de títulos de anticuerpo muy reducidos, incluso tras una segunda inmunización de recuerdo (título de criterio de valoración de aproximadamente 1000). En comparación con esto, la administración β -galactosidasa usando MALP-2 por vía i.n. condujo ya con una dosis simple a la inducción de títulos muy elevados (> 60.000) de IgG específica en todos los ratones, y al final del protocolo de inmunización los títulos se encontraban por encima de 500.000 (figura 6). La cinética y la eficacia total de las reacciones de anticuerpo, que se consiguieron con 0,5 μ g de MALP-2, eran muy similares a las que se consiguieron con la administración de β -galactosidasa con 10 μ g de TCB, un adyuvante de las mucosas probado, que se usó como sustancia control positiva.

También se observó un efecto adyuvante claro cuando se aplicó MALP-2 por vía i.p. Especialmente la inyección conjunta de MALP-2 condujo a un aumento de 100 veces el título de IgG específica para β -galactosidasa en comparación con los títulos en animales que se habían inmunizado con β -galactosidasa pura (figura 6B). Esta diferencia podía establecerse ya tras la primera inmunización y se mantuvo tras inyecciones de inmunización de recuerdo. En el día 31 se establecieron en los animales, que se habían inmunizado o bien por vía i.n. o bien por vía i.p., títulos de anticuerpos similares. Sin embargo las reacciones primarias tras la inyección conjunta de MALP-2 son más marcadas tras la inoculación i.n.

Ejemplo 5

La administración conjunta intranasal de MALP-2 con un antígeno soluble estimula respuestas de anticuerpos de las mucosas eficaces

Protocolo de ensayo: En el día 31 se sacrificaron los ratones y se tomaron las muestras finales. Se obtuvieron lavados vaginales y pulmonares lavando los órganos con 1 ml de PBS, complementado con EDTA 50 mM, BSA al 0,1% y PMSF 10 mM. Los lavados se centrifugaron a continuación, para eliminar restos de tejido (10 min. a 3000 x g) y se conservó el líquido restante a -20°C. Para determinar la concentración de la IgA total en el líquido de lavado del pulmón y de la vagina se incubaron diluciones en serie de las muestras correspondientes en placas de microtitulación, habiéndose recubierto estas placas previamente con IgA de cabra anti-ratón (Sigma Chemie) como anticuerpo de captura (100 μ l/pocillo). Se usaron diluciones en serie de IgA de ratón purificada (Sigma Chemie) para la generación de una curva patrón.

Para estudiar la capacidad de MALP-2 para estimular las respuestas mucosas frente a antígenos que se administraron conjuntamente por vía i.n., se estudió la producción de IgA específica para β -galactosidasa en líquido de lavado pulmonar y vaginal de animales inmunizados. Mientras que tras la inoculación i.n. con β -galactosidasa pura no tuvo lugar ninguna producción de IgA específica para β -galactosidasa en el líquido de lavado pulmonar en una cantidad detectable, se estableció en el caso de los animales inmunizados con β -galactosidasa y MALP-2 un aumento significativo del nivel de IgA específica para antígeno (figura 7). La administración conjunta de MALP-2 condujo a la estimulación de una producción de IgA eficaz en mucosas que se encuentran alejadas, tal como se comprueba mediante la presencia de concentraciones significativas de IgA específica para β -galactosidasa en el líquido de lavado vaginal (figura 7). No se estableció ninguna diferencia significativa en el nivel del anticuerpo específico para β -galactosidasa en las mucosas entre los animales que se inmunizaron con 0,5 μ g de MALP-2 o 10 μ g de TCB.

Ejemplo 6

La inmunización usando MALP-2 como adyuvante no conduce a más IgE sérica

Protocolo de ensayo: Para la determinación de la concentración de la IgE total en el suero de animales inmunizados y control se incubaron diluciones en serie de las muestras correspondientes en placas de microtitulación, que se habían recubierto anteriormente con IgE anti-ratón (100 μ l/pocillo) como anticuerpo de captura. Tras el bloqueo con PBS con BSA al 1% y Tween-20 al 0,05% durante dos horas a temperatura ambiente se añadió una dilución 1:100 del suero en PBS-Tween (100 μ l/pocillo) y se incubaron las placas durante una hora a 37°C. Tras el lavado se añadió IgE anti-ratón biotinilada y se incubaron las placas otra hora más a 37°C. Tras lavar cuatro veces se añadieron 100 μ l de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Pharmingen) a los pocillos y se incubaron las placas durante 30 minutos a 37°C. Tras lavar cuatro veces se revelaron las reacciones por medio de ABTS en tampón citrato-fosfato 0,1 M (pH 4,35) y un contenido en H₂O₂ al 0,01%. Se usaron diluciones en serie de IgE de ratón purificada, para generar una curva patrón.

Es un hecho reconocido que el uso de determinados adyuvantes de las mucosas puede conducir a reacciones alérgicas, debido a un aumento de la producción de IgE. Para comprobar esta hipótesis, se ha comenzado someter a prueba el efecto de la administración de MALP-2 en el contenido sérico en IgE. Tal como se deduce de la figura 8, la administración de MALP-2 por vía parenteral (i.p.) o a través de las mucosas no conduce a un aumento del contenido sérico en IgE. Al contrario, la presencia de MALP-2 parece tener incluso un efecto positivo en el aumento del contenido en IgE tal como se observó en el día 28 tras la inoculación con β -galactosidasa pura por vía i.p.

Ejemplo 7

MALP-2 estimula reacciones de proliferación eficaces mediadas por células T eficaces, cuando se administra junto con un antígeno soluble

5 *Protocolo de ensayo:* Se extrajeron los ganglios linfáticos situados debajo de la mandíbula inferior y los bazos y se reunieron para el análisis de las reacciones inmunitarias celulares. Se multiplicaron las células en RPMI 1640, complementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina 10 U/ml, estreptomicina 50 µg/ml, 2-mercaptoetanol 5 x 10⁻⁵ M y L-glutamina 1 mM (GIBCO BRL, Karlsruhe, Alemania) y se conservaron a 37°C en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. Se ajustaron las suspensiones de células de ganglios linfáticos y bazo hasta 5 x 10⁶ células/ml en medio completo, se llevaron a una placa de microtitulación de fondo plano con 96 pocillos (Nunc) con 100 µl/pocillo y se incubaron las placas durante cuatro días en presencia de distintas concentraciones de β-galactosidasa soluble. Se sometió a prueba cada concentración en grupos de tres. Durante las últimas 18 horas de la incubación se añadió a cada pocillo [³H]timidina 1 µCi (Amersham International, Friburgo, Alemania). A continuación se recogieron las células sobre papel de filtro (Filtermat A; Wallac, Friburgo, Alemania) usando un colector de células (Inotech, Wohlen, Suiza) y se determinó la cantidad de la [³H]timidina incluida en el ADN de las células multiplicadas con ayuda de un contador de centelleo γ (Wallac 1450, Micro-Trilux). Los resultados se representaron como la media aritmética de la captación de [³H]timidina en cpm.

20 Se estudiaron las reacciones inmunitarias de las células T en el día 31, determinándose la multiplicación de las células que se habían obtenido a partir de los ganglios linfáticos y bazos tras la reestimulación *in vitro* con β-galactosidasa. Se usaron como grupo control positivo las células de bazo de animales que se habían inoculado con β-galactosidasa pura por vía i.p. y mostraron una reacción de multiplicación significativa en comparación con el grupo no inmunizado (figura 9A). Se estableció otro aumento de la proliferación en el caso de las células de bazo que procedían de animales que habían obtenido una inyección conjunta de MALP-2 y antígeno (p < 0,05). Aunque la administración i.n. de β-galactosidasa pura no provocó una multiplicación celular detectable, la administración conjunta de MALP-2 condujo a una respuesta de proliferación eficaz tanto en el caso de células regionales (células de ganglios linfáticos) como en sistémicas (células de bazo) (figura 9B y C). Es destacable, que se observó la proliferación de células T más fuerte en el caso de las células de bazo de ratones, en los que se había aplicado MALP-2 y β-galactosidasa por vía i.n. (figura 9B). En todos los casos se estableció un efecto claramente dependiente de la dosis mediante el aumento de la concentración de β-galactosidasa durante la reestipulación (5, 10, 20 µg/ml). Por último, el uso de MALP-2 (0,5 µg) como adyuvante condujo a un aumento estadísticamente significativo (p < 0,05) de la multiplicación de células T en comparación con la inmunización i.n. con (10 µg) más β-galactosidasa (figura 8B).

35 Ejemplo 8

Análisis de patrones de células T cooperadoras producidos mediante el uso de MALP-2 como adyuvante

40 *Protocolo de ensayo:* Se recubrieron placas de ensayo Nunc-Immuno MaxiSorp con 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 100 µl de β-galactosidasa (Boehringer, Mannheim, Alemania) a 5 µg/ml en tampón carbonato 0,05 M (pH 8,2) por pocillo. Se añadieron diluciones de dos veces en serie de suero o líquido de lavado en PBS con BSA al 1% y Tween 20 al 0,05% (100 µl/pocillo) y se incubaron las placas durante 2 horas a 37°C. Tras el lavado se añadió anticuerpo de rata anti-IgG1, -IgG2a, -IgG2b, o -IgG3 de ratón conjugada con biotina (Pharmingen, Hamburgo, Alemania) para determinar las subclases de Ig. Se incubaron las placas durante otra hora a 37°C. Tras lavar cuatro veces se añadieron a las células 100 µl de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Pharmingen) y se incubaron las placas durante 30 minutos a 37°C. Tras lavar cuatro veces se revelaron las reacciones con ABTS en tampón citrato-fosfato 0,1 M (pH 4,35), que contenía H₂O₂ al 0,01%. Para determinar la concentración de las subclases de IgG en suero, se generaron curvas patrón, recubriéndose los pocillos con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón específico para isotipo e incubándose entonces con anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3 de ratón purificados (Dianova, Hamburgo, Alemania).

55 Se extrajeron los sobrenadantes líquidos de los cultivos de las células en multiplicación en los días 2 y 4 y se conservaron a -70°C. La determinación de IFN-γ IL-2, IL-4 e IL-10 se realizó por medio de ELISA, usando anticuerpos comerciales de Pharmingen según las indicaciones del fabricante. Brevemente, se recubrieron las placas de microtitulación con 96 pocillos durante la noche con Acm de rata anti-IL-10, anti-IL-4, anti-IL-2 o anti-IFN-γ de ratón (Pharmingen) a 4°C. Tras tres lavados se bloquearon las placas y se añadieron los sobrenadantes líquidos a los pocillos. Para cada citocina se generó una curva patrón, usándose las citocinas de roedor recombinantes correspondientes (Pharmingen). Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante otras 4 horas. Tras el lavado se añadió Acm de rata anti-IL-10, anti-IL-4, anti-IL-2 o anti-IFN-γ de ratón biotinilado (Pharmingen) a los pocillos y se incubaron las placas durante una hora a temperatura ambiente. Tras lavar seis veces se añadió conjugado de estreptavidina-peroxidasa y se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se revelaron las placas tal como se describió anteriormente con ABTS.

65 En primer lugar se estableció la distribución de las subclases de la IgG específica para β-galactosidasa, que estaba presente en el suero de los ratones inmunizados. Tal como se representa en la tabla 1, el tipo principal de la IgG1 del isotipo IgI específico para β-galactosidasa era independiente del protocolo de inmunización. Este patrón de reacción de Th2 dominante podía reconocerse ya tras la primera dosis de inóculo y permanecía durante la siguiente inmunización

de recuerdo. La IgG1 era el único isotipo que se estableció con la administración de β -galactosidasa pura, mientras que la administración conjunta con TCB o MALP-2 condujo a la comprobación de otros isotipos específicos para β -galactosidasa, concretamente IgG2a (tipo Th1), IgG2b (tipo Th2) e IgG3 (tipo Th1). Sin embargo, la razón de IgG1/2a (figura 10), IgG1/2b o IgG1/3 seguía siendo superior a 100.

TABLA 1

Isotipos de IgG específicos para β -galactosidasa en suero de ratones inmunizados^a

Grupo de inmunización	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
β -gal (i.n.)	22,6 +/- 21,3	0,7 +/-	0,3 +/-	0,6 +/-
β -gal + MALP-2 (i.n.)	6439,0 +/- 1775,	20,8 +/-	43,3 +/-	2,4 +/-
β -gal + TCB (i.n.)	4108,3 +/- 1437,	31,9 +/-	49,2 +/-	2,4 +/-
β -gal (i.p.)	191,5 +/- 132,1	0,1 +/-	0,5 +/-	0,6 +/-
β -gal + MALP-2 (i.p.)	2829,7 +/- 1119,	10,0 +/-	15,8 +/-	2,3 +/-
Grupo control	0,4 +/- 0,0	0,23 +/-	0,1 +/-	0,4 +/-
		0,0	0,0	0,0

^a Los resultados se representan como la media
($\mu\text{g/ml}$) $\pm$ DEM (5 ratones por grupo)

Para caracterizar adicionalmente la clase de la reacción Th, que se produjo mediante la inmunización, se midió el contenido en IFN- γ , IL-2, IL-4 y IL-10 en los sobrenadantes líquidos de las células de bazo estimuladas *in vitro* (figura 11A). Se estableció que de estas cuatro citocinas IL-10 estaba representada en mayor medida, lo que indicaba que se había generado un patrón de respuesta de Th2. El contenido en IL-10 era significativamente superior en el caso de ratones, que se habían inmunizado por vía i.n. con MALP-2, que en el caso de los grupos control (2,2 ng/ml en comparación con 0,009 ng/ml, $p < 0,005$) y también en comparación con animales, en los que se había usado TCB como adyuvante de las mucosas (0,6 ng/ml, $p < 0,05$). El patrón de respuesta observado con una citocina dominante del tipo Th2 coincidía con la comprobación de IgG1 específica de β -galactosidasa en los mismos animales (figura 10). En realidad, la fuerte estimulación de la secreción de IL-10 coincide con el papel que esta citocina desempeña en la inhibición de la síntesis de citocinas mediante las células Th1, de la mejora de la multiplicación de las células B y de la estimulación de la producción de IgA.

A pesar del hecho de que, en los medios de cultivo celular de células que se obtuvieron a partir de ganglios linfáticos regionales, se establecieron valores absolutos reducidos de la concentración de citocinas, el patrón general era igual al establecido para los cultivos de células de bazo (figura 10). Es interesante que si bien se estimuló la separación de IL-10 y IL-4 también en las células de ratones, que se habían inmunizado por vía i.p. con β -galactosidasa pura, sin embargo mantenían la citocinas Th1 IL-2 y IFN- γ por debajo del límite de detección. A diferencia de esto, se establecieron IL-2 e IFN- γ también en los ratones que habían recibido el antígeno mezclado con TCB o MALP-2 (figura 10). Estos resultados coinciden con los patrones de isotipo de IgG establecidos (tabla 1) y afirman que si bien predominan los tipos de reacción Th2, MALP-2 también apoya la estimulación de las células Th1.

10 Ejemplo 9

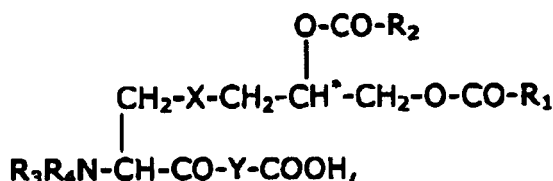
Inmunización oral con el antígeno modelo β -galactosidasa usando MALP-2 como adyuvante de las mucosas

Se compraron ratones BALB/c (H-2d) hembra de seis a ocho semanas de edad de Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Alemania) y se trataron de manera correspondiente a las directrices locales y a las directrices de la unión europea. Se inmunizaron grupos de 5 ratones cada uno en los días 1, 14, 21 y 31 con 100 μ g de β -gal (Boehringer, Mannheim, Alemania) o bien sola o bien con 2 μ g de MALP-2 sintético como adyuvante por vía oral (dosis de 25 μ l). Se extrajeron muestras de suero en el día 45 y se almacenaron a -20°C hasta la determinación de anticuerpos específicos para β -gal. Se recubrieron las placas de ensayo Nunc-Immuno MaxiSorp® de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 100 μ l de β -gal hasta 5 μ g/ml en tampón carbonato 0,05 M (pH 8,2) por pocillo. Se añadieron diluciones de dos veces en serie de los sueros o lavados en PBS con BSA al 1% y Tween 20 al 0,05% (100 μ l/pocillo) y se incubaron las placas durante 2 horas a 37°C. Tras el lavado se añadió IgG de cabra anti-ratón específica de las cadenas γ biotinilada (Sigma Chemie, Deisenhofen, Alemania) y se incubaron las placas durante una hora más a 37°C. Tras lavar cuatro veces se añadieron a las células 100 μ l de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Pharmingen) y se incubaron las placas durante 30 minutos a 37°C. Tras cuatro procesos de lavado se revelaron las reacciones con ABTS en tampón citrato-fosfato 0,1 M (pH 4,35), que contenía H₂O₂ al 0,01%. Los títulos de valor final se expresaron como los valores de log₂ logarítmicos recíprocos de la última dilución, lo que dio tras una incubación de 30 minutos una densidad óptica a 405 nm de 0,1 unidades por encima de los valores de los controles negativos. Se observaron respuestas inmunitarias frente a β -gal sólo en animales que se habían inmunizado o inoculado con MALP-2 como adyuvante de las mucosas (véase la figura 12).

Ha de esperarse que también en distintas dosificaciones se produzcan reacciones inmunitarias tanto en los fluidos corporales como en las células, que son más activas que las que se producen de la única administración del antígeno. Además, han de establecerse reacciones de las mucosas específicas de antígeno al menos localmente en el intestino (es decir, la presencia de IgA secretora específica para antígeno en lavados de intestino). Además ha de esperarse que puedan establecerse reacciones secretoras en mucosas alejadas.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un lipopéptido o una lipoproteína de estructura (I)



en la que

R₁ y R₂ que pueden ser iguales o distintos entre sí, representan alquilo C₇₋₂₅, alquenilo C₇₋₂₅ o alquinilo C₇₋₂₅

X representa S, O o CH₂,

R₃ y R₄ independientemente entre sí representan H o metilo e

Y representa una secuencia de aminoácidos no inmunógena por sí misma en la especie usada y compatible fisiológicamente, compuesta por de 1 a 25 restos de aminoácido, y el átomo de carbono asimétrico marcado con * tiene según la regla de Cahn-Ingold-Prelog la configuración R absoluta, como adyuvante mucoso en la vacunación terapéutica o profiláctica a través de las mucosas.

2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque Y está compuesto por de 12 a 25 aminoácidos.

3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque la secuencia de aminoácidos Y se selecciona de:

a) GQTNT

b) SKKKK

c) GNNDESNISFKEK

d) GQTDNNSQSAAPGSGTTNT.

4. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la lipoproteína o el lipopéptido según la estructura (I) es un péptido de S-[2,3-bispalmitoiloxi-(2R)-propil]cisteinilo.

5. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el adyuvante mucoso se encuentra en una preparación con el propio componente de vacuna, que está previsto para la aplicación intranasal, intra-NALT, oral en aerosol, intrarrectal, conjuntival, intravaginal o intrauretral o una aplicación en los conductos galactóforos del pecho femenino.

6. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el adyuvante mucoso se encuentra en un kit para la aplicación conjunta con una vacuna en los conductos galactóforos del pecho femenino, por vía intranasal, intra-NALT, oral en aerosol, intrarrectal, conjuntival, intravaginal o intrauretral.

7. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque el lipopéptido o la lipoproteína se encuentra en una preparación con al menos otro adyuvante y/o antígeno.

8. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque el lipopéptido o la lipoproteína está asociado con o unido a un portador físico o biológico.

9. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque el lipopéptido o la lipoproteína se administra conjuntamente con uno o varios ligandos o sustancias antiinflamatorios, antiangiogénicos, citotóxicos o inmunomoduladores o con anticuerpos o se encuentra en una preparación con éstos.

10. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque el lipopéptido o la lipoproteína se encuentra en una preparación, que contiene otros aditivos y excipientes, especialmente conservantes o estabilizadores.

11. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque la vacuna, que va acompañada del adyuvante, está en forma de péptidos, proteínas, ADN, polisacáridos, glicolípidos o glicoproteínas.

Fig. 1

Expresión de marcadores específicos mediante CD murinas obtenidas a partir de médula ósea tras la estimulación con MALP-2 o LPS

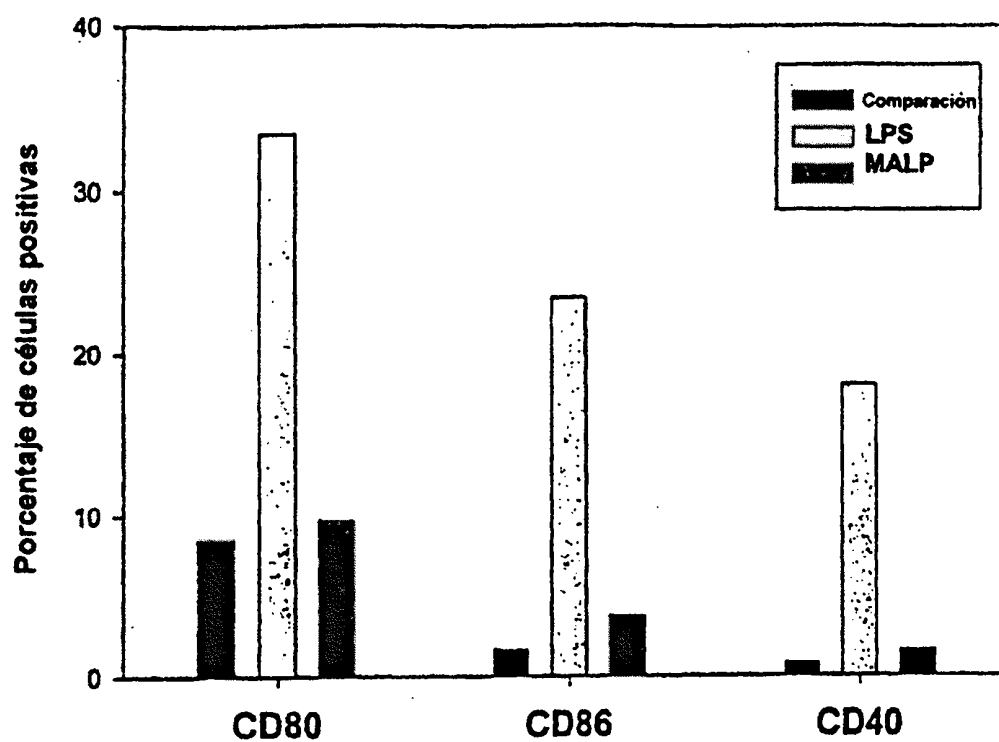


Fig. 2

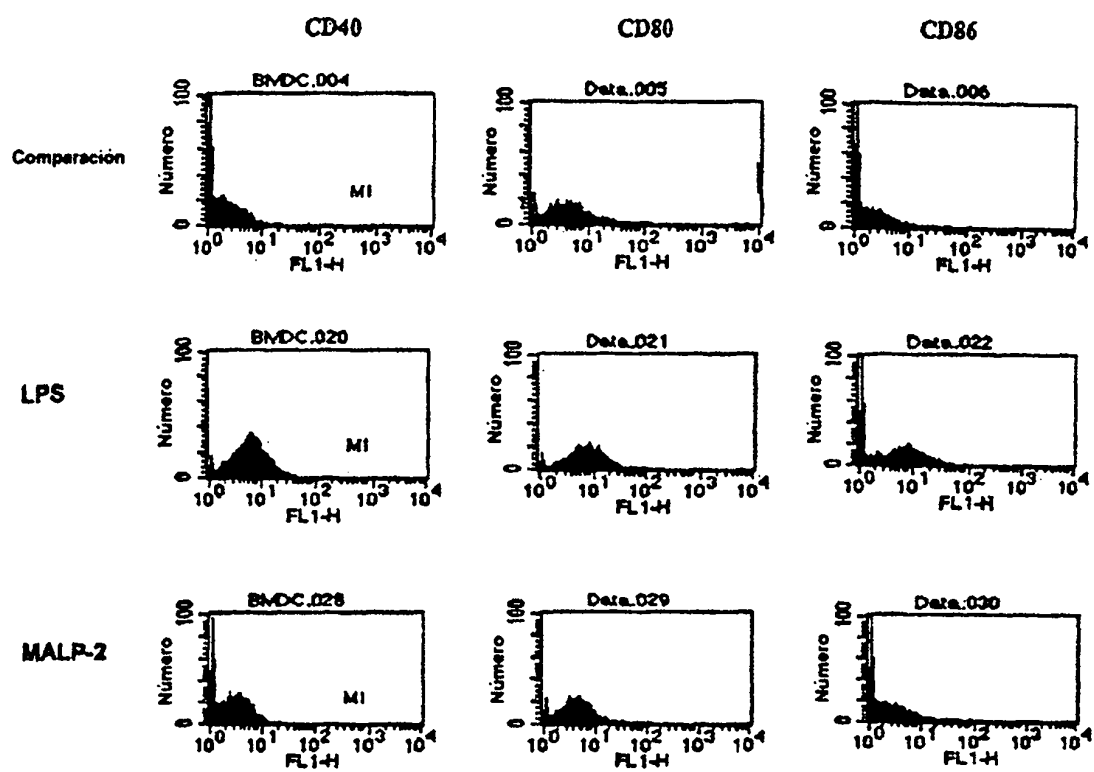


Fig. 3

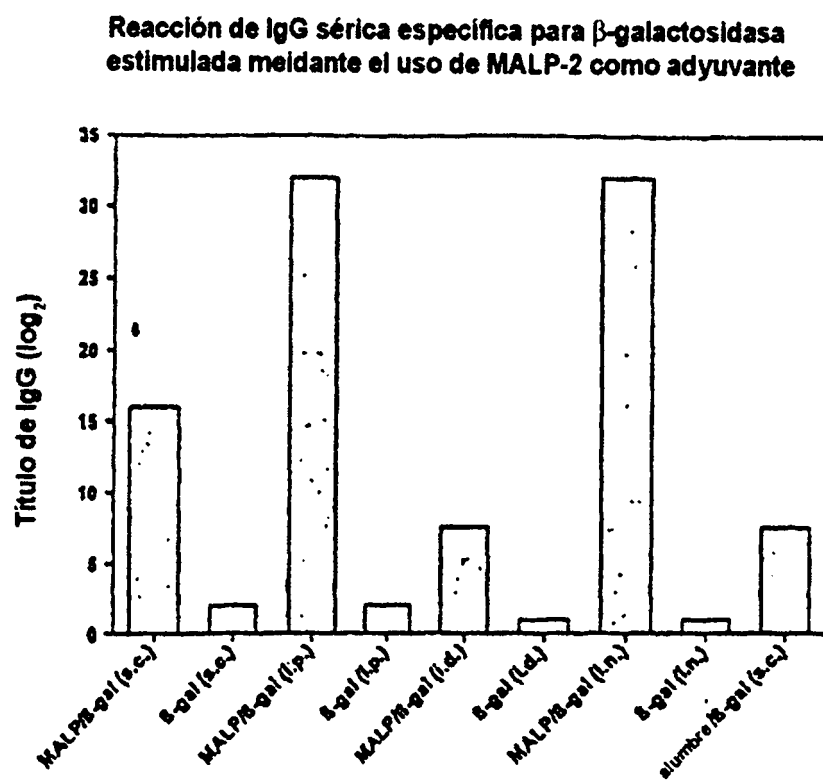


Fig. 4

**Reacción de IgG sérica específica para β -galactosidasa
mediante el uso de 1 μ g de MALP-2 como adyuvante**

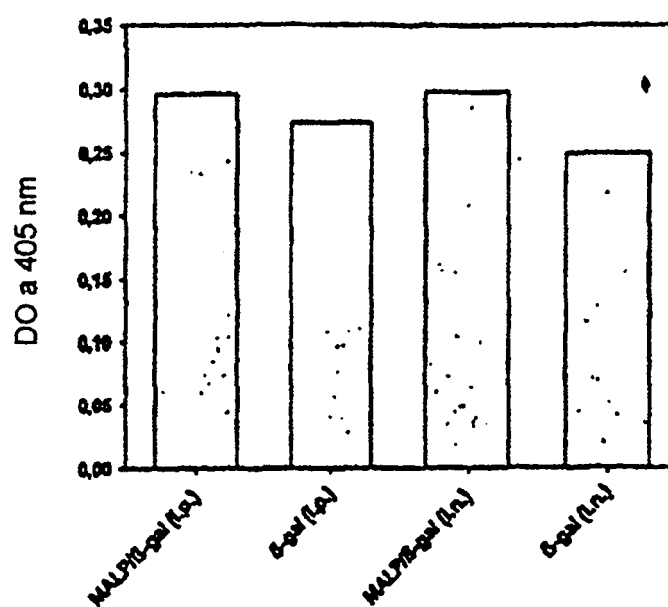


Fig. 5.

**Reacciones proliferativas específicas para β -galactosidasa
estimuladas mediante el uso de MALP-2 como adyuvante**

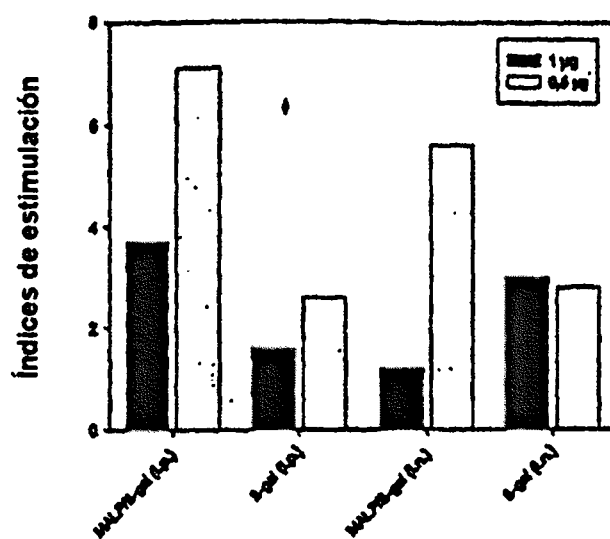


Fig. 6

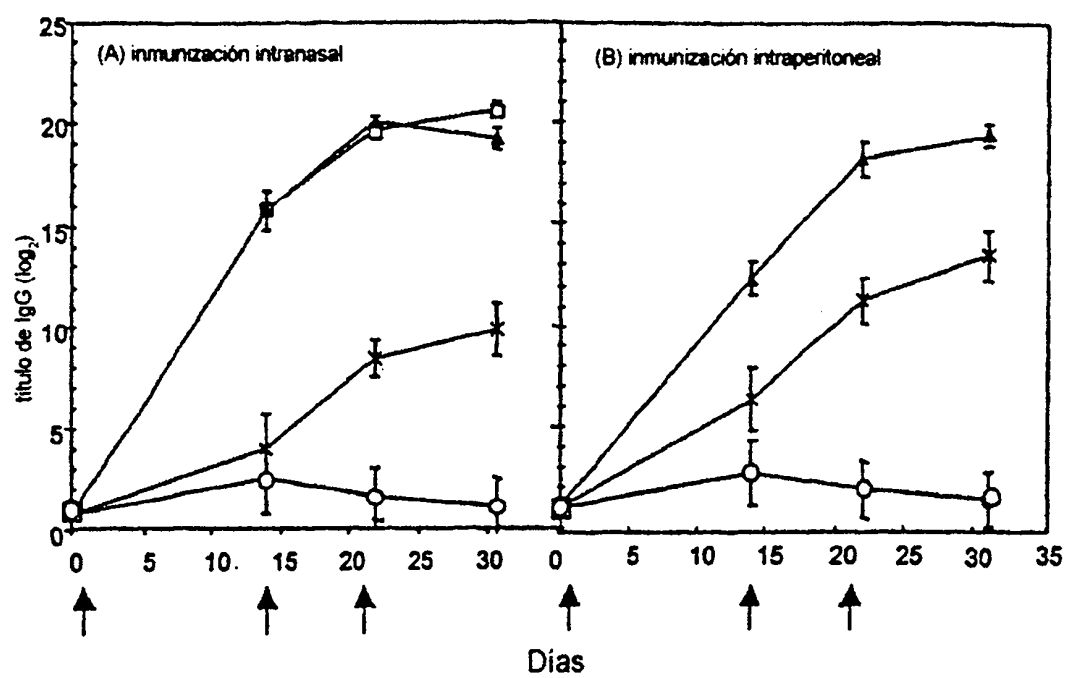


Fig. 7

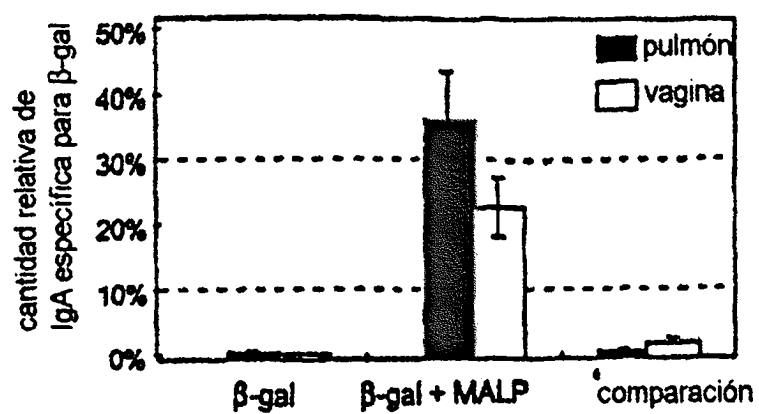


Fig. 8

Determinación de la IgE sérica en animales, que se inmunizaron usando MALP-2 como adyuvante

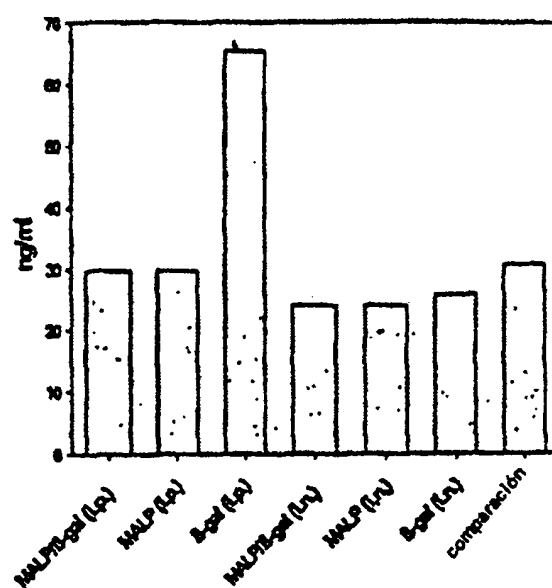


Fig. 9

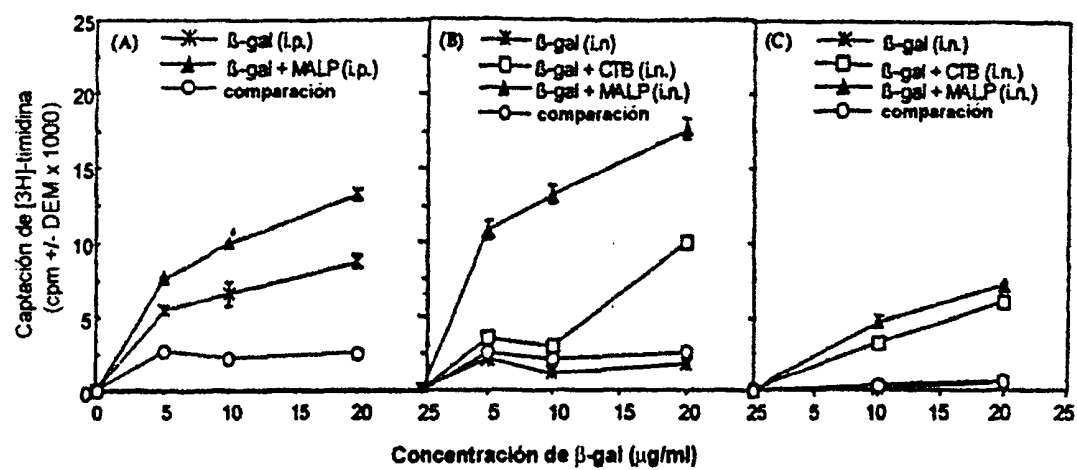


Fig. 10

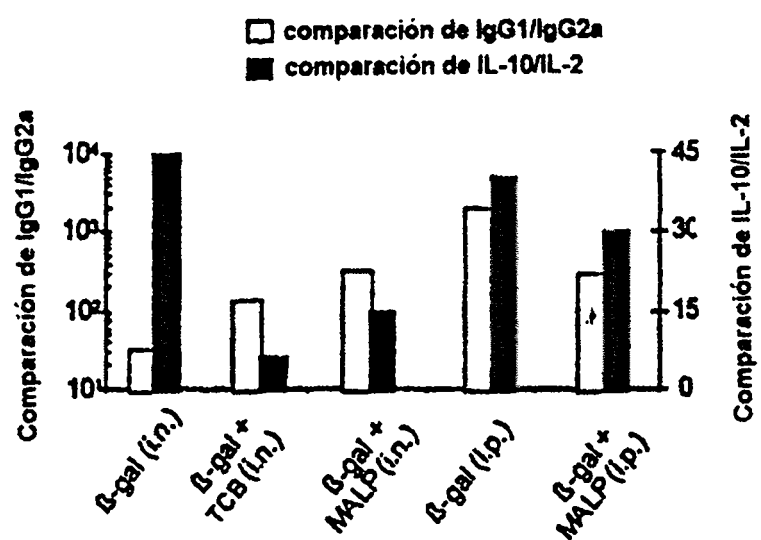


Fig. 11

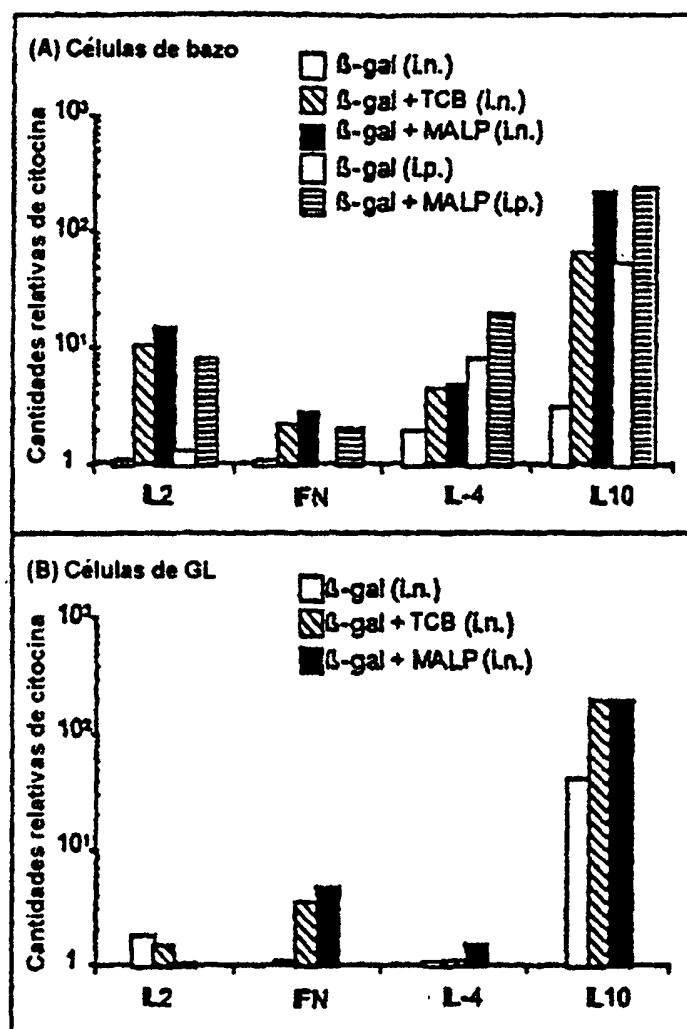


Fig. 12

