



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 342 150**

51 Int. Cl.:
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
B01D 15/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01998363 .4**
96 Fecha de presentación : **29.11.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1346727**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.2003**

54 Título: **Procedimiento de obtención de agregados antigénicos de la hepatitis B deslipidados y uso de los mismos.**

30 Prioridad: **01.12.2000 CU 279/00**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.07.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.07.2010

73 Titular/es: **CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (CIGB)**
Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacan Playa
Ciudad de la Habana 10600, CU

72 Inventor/es: **Aguilar Rubido, Julio, Cesar;**
Penton Arias, Eduardo;
Tleugulova, Dina;
Sewer Mensies, Minerva;
Muzio Gonzalez, Verena, Lucila;
Guill Nenieta, Gerardo, Enrique;
Simon Bernard, Iloki, Assanga;
Cruz Ricondo, Luis, Javier;
Falcon Cama, Viviana y
Tambara Hernández, Yanet

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Procedimiento de obtención de agregados antigénicos de la hepatitis B deslipidados y uso de los mismos.

5 La presente invención está relacionada con la rama médica, particularmente con el uso de nuevas formulaciones de vacunas.

El objetivo técnico de la invención propuesta es el desarrollo de un procedimiento para la preparación de estructuras antigénicas agregadas y sus formulaciones, capaces de potenciar la inmunogenicidad de los presentes antígenos administrados por vías sistémicas o mucosales.

La Patente EP 0 231 039 describe un procedimiento para la preparación de complejos inmunogénicos útiles como una vacuna.

15 La Patente EP 0 174 759 divulga partículas de agregados de proteínas útiles como una vacuna.

El procedimiento descrito en la presente invención genera estructuras agregadas antigénicas o antígenos en partículas, la adición de otros antígenos, componentes con características de agregación, deslipidación u oxidación, la post-selección de partículas agregadas entre 30-500 nm de tamaño, y la formulación de dichos agregados con los adyuvantes convenientes, favorece la inmunogenicidad de la composición antigénica resultante.

Desde que se sabe que el HBsAg es un inmunógeno eficaz, este fue el primer candidato de vacuna de un amplio uso en humanos y la primera vacuna recombinante anti-hepatitis B autorizada para uso universal. Las proteínas del HBsAg están auto-ensambladas en partículas de 22 nm (Heerman KH, Gerlich WH, *Surface protein of Hepatitis B virus*, A. McLachlan, ed. CRC Press, Boca Raton, Ann. Harbor, Boston, London, pág. 109, (1991)). La base molecular, celular y genética, de la respuesta inmune al HBsAg ha sido extensamente estudiada en un modelo murino (Milich, DR., "Genetic and molecular basis for T- and B-cell recognition of hepatitis B viral antigens", *Immunol. Rev.*, vol. 99, pág. 71, (1987)). Anteriormente, se había estudiado la forma en que las variaciones de las propiedades físico-químicas del antígeno de superficie afecta su inmunogenicidad para células T restringidas clase I de MHC. Se obtuvo la evidencia de que únicamente se generó una respuesta CTL restringida clase I de MHC eficaz con una inyección de baja dosis del antígeno nativo en partículas de 22 nm o con monómeros desnaturalizados con detergentes sin adyuvante (Schirmbeck, R. y otros, *Eur. J. Immunol.*, vol. 24, pág. 1088, (1994)). Igualmente, se ha investigado la inmunogenicidad de una preparación de agregados del antígeno de superficie de HBV obtenido mediante desnaturalización por calor para producir partículas de aproximadamente 1 μ m de diámetro.

El tipo de transformación antigénica *in vivo* tiene una influencia fundamental sobre la eficacia de la respuesta de la célula T primaria, así como sobre el espectro de la subclase de la célula T implicada. En la presentación de péptidos al MHC evidentemente operan procedimientos alternativos para las células T restringidas CD4+ clase II del MHC y para células T restringidas CD8+ clase I del MHC (Germain, RN. y otros, *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 11, pág. 403, (1993)). Se ha descrito una nueva vía endosómica para la transformación de partículas de HBsAg exógenas a los presentes epítomos restringidos clase I del MHC. Esta transformación de partículas de HBsAg exógenas de 1 μ m de diámetro desnaturalizadas por calor se produce en macrófagos pero no en otros tipos de células y está acompañada con la regurgitación de péptidos antigénicos procedentes de la transformación del macrófago. Este procedimiento que genera péptidos restringidos clase I del MHC antígenos exógenos ha sido diseñado como una tentativa a la vía fagocítica. Las partículas de HBsAg de 22 nm nativas son transformadas fundamentalmente por los agregados de 1 μ m y endocíticos por las vías fagocíticas. Además de la diferente transformación *in vitro* de estas dos preparaciones exógenas de HBsAg, su inmunogenicidad *in vivo* para la CTL clase I fue marcadamente diferente cuando se emplearon sin adyuvantes. La partícula de HBsAg nativa fue altamente inmunogénica en tanto que los agregados de antígenos de superficie desnaturalizados fueron de baja inmunogenicidad (Schirmbeck, R. y otros, *J. Immunol.*, vol. 155, págs. 4676-4684, (1995)).

Otros estudios realizados usando polarización por fluorescencia sugieren que la partícula de HBsAg está organizada como una bicapa lipídica que reacciona con agregados de proteína (Sonveaux, N., *Res. Virol.*, vol. 146, (No. 1), págs. 43-51, (1995)).

El tratamiento de HBsAg con cloroformo-metanol (2:1, v/v) y 1,1',3,3'-tetrametil-urea al 50%, no afectó la integridad morfológica de las partículas (mantuvieron su diámetro medio), aunque se liberó una parte importante de sus lípidos. La antigenicidad y la composición del polipéptido HBsAg no resultaron alteradas por la deslipidación (Neurath, AR., y otros, *Intervirology*, vol. 10, (No. 5), págs. 265-75, (1978)).

Teniendo en cuenta que las agregaciones de partículas no se han producido en las exigentes condiciones del procedimiento de producción, tal como la presencia de agentes caotrópicos, temperaturas moderadas y soluciones altamente concentradas, se ha estudiado la fuente de agregación de partículas del antígeno de superficie de la hepatitis B recombinante usando una combinación de técnicas de inmunoafinidad y cromatografía de exclusión por tamaños molecular. La investigación de los factores que conducen a un incremento en la base del pico que corresponde al HBsAg en la cromatografía de exclusión molecular ha demostrado la existencia de agregados de partículas, además de la variabilidad de tamaño de la partícula de HBsAg (Tleugabulova, D., *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, vol. 707, (Nos. 1-2), págs. 267-73, (1998), Tleugabulova, D., *Chromatographia*, vol. 45, págs. 317-320, (1997)). Como un resultado de

ello, el antígeno agregado se obtuvo en la fracción correspondiente a los agregados de partículas grandes pero no en la fracción en la que se encontró la proteína de HBsAg nativa; otro resultado de este artículo corrobora que los agregados están formados por partículas de 22 nm que migran como monómeros y dímeros en SDS-PAGE, así como el antígeno de superficie plegado correctamente (Tleugavuloba, D. y otros, *Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, vol. 25, (No. 1-2), págs. 209-19, (1998)).

Divulgación de la invención

Uno de los objetivos de la presente invención es un procedimiento para la obtención de estructuras antigénicas agregadas de una inmunogenicidad mayor que los antígenos que las originan. Dicho procedimiento incluye las etapas siguientes:

A) Selección de los antígenos de interés.

B) Adición de uno o varios antígenos de la mezcla en un medio que favorece el procedimiento de agregación, pudiendo estar constituido dicho medio por medios químicos, agentes oxidantes u otros componentes con capacidad de agregación.

C) Incubación de la mezcla.

D) Selección del agregado de partículas con un tamaño entre 30 y 500 nm mediante un procedimiento que permite la retención de estos tamaños moleculares, tal como cromatografía de exclusión molecular, diafiltración y diálisis.

E) Preparación de las formulaciones mediante la mezcla de las estructuras antigénicas seleccionadas en la etapa (C) a través de la adición del adyuvante de elección e igualmente la potencial adición de otros antígenos, estabilizadores y conservantes.

Mediante el procedimiento de la presente invención pueden obtenerse diversos agregados que únicamente contienen el antígeno de superficie del HBV, incluyendo igualmente combinaciones del antígeno de superficie y otra lipoproteína, lipopéptido o antígenos homólogos o heterólogos lipídicos procedentes de cualquier patógeno viral, bacteriano, unicelular o multicelular.

De acuerdo con el procedimiento de la invención, los antígenos que son parte de las estructuras obtenidas en la etapa (B) pueden agregarse al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B mediante interacciones hidrófobas, electrostáticas o covalentes, que generan agregados de diferentes tamaños.

El procedimiento para la obtención de estructuras antigénicas permite la agregación de los antígenos nucleocápsidos de la hepatitis B, C o VIH contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B; igualmente pueden agregarse antígenos procedentes de virus y bacterias tales como virus inactivados o proteínas de membrana exterior de patógenos bacterianos del tipo *Neisseria meningitidis*.

Para obtener las estructuras antigénicas agregadas pueden usarse β -ciclo-dextrinas como agente químico que favorece la deslipidación, la asociación de membranas y la agregación de las presentes partículas; otros agentes químicos son sales de amonio a concentraciones entre 10 y 50 mM, potenciadas mediante sales metálicas de cobre y hierro y otros que permiten la agregación.

Otros componentes del procedimiento que presentan actividad de agregación espontánea que pueden usarse conjuntamente o solos para este fin, son los antígenos homólogos y heterólogos que han evidenciado actividad de agregación sobre el HBsAg, entre ellos los antígenos nucleocápsidos virales e igualmente derivados de membrana exterior bacteriana o envolturas virales de naturaleza de lipoproteína o hidrófoba. Igualmente, se ha encontrado que adyuvantes de la misma naturaleza favorecen la agregación de HBsAg y la de HBsAg entre sí.

En general, el procedimiento de la presente invención permite la agregación de HBsAg o la agregación de HBsAg con otros antígenos o adyuvantes a través del desarrollo de interacciones hidrófobas, enlaces electrostáticos o covalentes, con períodos de incubación que varían desde 10 minutos hasta una semana, dependiendo de los constituyentes seleccionados.

La separación de agregados se logra mediante procedimientos de exclusión por tamaños molecular, entre ellos la cromatografía de exclusión molecular, diálisis, diafiltración u otro procedimiento que permita la retención de tamaños moleculares entre 30 y 500 nm.

Los autores de la presente invención han mostrado igualmente que aunque es posible generar agregados de alrededor de 1 micrómetro de tamaño por procedimientos no desnaturalizantes (temperatura máxima 28°C), similares a los obtenidos por Schirmbeck (Schirmbeck, R. y otros, *J. Immunol.*, vol. 155, págs. 4676-4684, (1995)), estos continúan siendo menos inmunógenos cuando se valora la respuesta humoral y DTH. Únicamente aquellos agregados de partículas de un tamaño entre 30 y 500 nm, con adyuvante de alumbre, han demostrado la generación de niveles de IgG

significativamente más altos que el control de antígeno nativo, mostrando adicionalmente un incremento significativo de las respuestas DTH e IgG2a. Todo esto evidencia la importancia de la selección posterior del antígeno mediante cromatografía de exclusión molecular. La causa de este rendimiento puede ser debida a la diferente presentación y/o transformación del antígeno o antígenos de interés.

5

Más aún, el procedimiento de la presente invención prevé la adsorción de las estructuras resultantes a adyuvantes tales como alumbre o sales de calcio, aceitoso u otro adyuvante comercialmente usado. Igualmente, puede agregarse a la formulación final otros antígenos y substancias estabilizantes y conservantes.

10 Otro objeto de la presente invención es la estructura antigénica agregada obtenida de acuerdo con el procedimiento anteriormente descrito, el cual favorece un incremento en la inmunogenicidad de la formulación resultante y un reconocimiento diferencial por el sistema inmune de los epítomos implicados. Dichas estructuras antigénicas agregadas se caracterizan por la presencia del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, solo o en combinación con otros antígenos que forman el agregado. Estos otros antígenos son lipoproteínas o hidrófobos, entre ellos el HBcAg, 15 que poseen adicionalmente la propiedad intrínseca de favorecer el estado de agregación entre ellos mediante enlaces hidrófobos. Otros antígenos de lipoproteínas y cápsidos virales hidrófobos han mostrado esta capacidad, entre ellos el antígeno nucleocápsido del virus de la hepatitis C, el virus del papiloma humano y el VIH 1 y 2, además de la membrana exterior de *N. meningitidis* en vesículas de proteoliposomas y algunos antígenos de envoltura viral.

20 Entre las estructuras antigénicas objeto de la presente invención, se incluyen las asociaciones de HBsAg con adyuvantes hidrófobos, las cuales pueden ser parte del agregado mediante el mismo procedimiento descrito anteriormente. En general, las estructuras antigénicas objeto de la presente pueden obtenerse mediante la agregación de al menos una, dos o más partículas hidrófobas de acuerdo con el procedimiento descrito y al menos una de carácter particular, y debería ser visible mediante microscopía electrónica tal como se describe en los ejemplos. La agregación de estas 25 estructuras favorece la modulación inmune, el reconocimiento diferencial y la potenciación de la inmunogenicidad de una manera general. Teniendo en cuenta estas características de las estructuras antigénicas objeto de la presente invención, es posible usarlas para el diseño racional de vacunas humanas y veterinarias preventivas y terapéuticas, a través de vías sistémicas o mucosales y su uso en sistemas de diagnóstico.

30 Entre las ventajas de las nuevas preparaciones resultantes del uso del procedimiento para la obtención de este tipo de antígenos, se encuentran las siguientes: incremento de la inmunogenicidad, capacidad de co-retención de nuevos adyuvantes, inmunomoduladores y antígenos durante la agregación.

35 Las preparaciones resultantes del presente procedimiento de invención, dependiendo de la vía de inoculación y las especies a inmunizar, pueden usarse en volúmenes de 0,01 hasta 10 ml y las dosis de antígeno pueden variar entre 0,001 y 1 mg en la formulación de vacuna final.

40 Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de formulaciones de vacuna de agregados de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B obtenidos mediante el uso de ciclodextrinas

45

Las partículas se obtuvieron a partir de antígeno nativo de 22 nm mediante el tratamiento controlado del antígeno con compuestos químicos con actividad de substracción de lípidos a partir de la partícula; en este caso, se usaron ciclodextrinas en concentraciones superiores a 1 mg/ml. Dependiendo de su concentración, el tiempo de incubación varió desde 24 horas hasta 7 días. La temperatura de incubación usada en este ensayo fue de 28 grados centígrados, 50 aunque se observó que a temperaturas superiores e inferiores es también posible obtener agregados. La temperatura es un factor que favorece el procedimiento de deslipidación parcial a través de la oxidación y substracción de lípidos. Posteriormente, los diferentes agregados se analizaron mediante filtración por gel y microscopía electrónica, encontrándose tamaños que variaron desde decenas de nanómetros hasta partículas que precipitaron debido a su enorme tamaño. Después de centrifugación para eliminar restos precipitados, se seleccionó el antígeno dependiendo de su tamaño para análisis inmunoquímico, el cual demostró un nivel decreciente de lípidos con respecto al nivel de proteínas. Se ha mostrado mediante HPLC que estos agregados tienen una alta estabilidad durante el tiempo de almacenamiento. El tratamiento controlado del antígeno con β -ciclodextrinas, entre 5-100 mg/ml durante 1-240 horas, a temperaturas que variaron desde 20 hasta 37°C, permite obtener un intervalo de tamaños que hace posible la posterior elección del tiempo de elución para el análisis inmunoquímico.

60

Después de esto, el antígeno agregado se adsorbió por el alumbre a una concentración final de entre 0,002 y 0,1 mg/ml y se usó para ensayos de inmunogenicidad.

65 Una variante de incubación con ciclodextrinas a diferentes tiempos y concentraciones implicó la adición de compuestos de inmunomodulación tales como lipo-polisacáridos y saponinas, que son parte del agregado final adsorbido por el alumbre, para producir la formulación de vacuna final.

ES 2 342 150 T3

Ejemplo 2

Preparación de formulaciones de vacuna de antígeno de superficie de agregados del virus de la hepatitis B usando agentes oxidantes

5 Con la adición de sustancias químicas oxidantes al antígeno normal fue posible la deslipidación en condiciones de tiempo, temperatura y concentración controlados, de la misma manera que con ciclodextrinas. Sales tales como peroxidisulfato de amonio entre 9 y 44 mM, permitieron la generación del antígeno deslipidado a partir de las partículas de antígeno de 22 nm, para producir incremento de tamaño mediante la fusión de partículas. Los tamaños óptimos se
10 seleccionaron mediante filtración por gel. La adsorción por el adyuvante se llevó a cabo sobre alumbre.

De la misma manera que en el Ejemplo 1, fue posible incluir en el agregado diferentes cantidades de otros adyuvantes e inmunomoduladores durante la incubación.

15 Ejemplo 3

Preparación de formulaciones de vacuna de estructuras químicas en forma de super-partículas, obtenidas mediante modificación de las condiciones de incubación de la levadura

20 Las partículas se obtuvieron de manera natural a partir de cepa de levadura de *Picchia pastoris*; el antígeno se seleccionó durante el procedimiento de purificación por sus características físico-químicas. El procedimiento de producción de antígeno se sometió a un tiempo de cultivo de larga duración, superior a 100 horas y exigentes condiciones oxidantes. Este procedimiento hace posible que una parte del antígeno permanezca en su estado nativo de tamaño de
25 partícula de 22 nm, pero una parte importante se agregó y deslipidó debido al incremento de las condiciones oxidantes intracelulares, tal como se demostró por los análisis de lípidos y proteínas realizados a muestras de los diferentes picos procedentes de la filtración por gel. Finalmente, la fracción se separó mediante HPLC de filtración por gel en columnas TSK G5000. Este material alcanzó hasta el 10% del antígeno total, el cual de hecho se descartó. La adsorción de adyuvante de alumbre se llevó a cabo en condiciones similares a las del antígeno normal.

30 Los análisis ambos antígenos demostraron que el HBsAg se agregó en un procedimiento que implica una pérdida significativa de lípidos de todos los tipos, lo cual se muestra para los fosfolípidos de ambos antígenos en la tabla siguiente:

35 *Composición de fosfolípidos (PL) de HBsAg separados mediante gel de sílice*

ng de PL/ μ g de proteína	HBsAg (50-500 nm)	HBsAg 22 nm
Fosfolípidos totales	285,6 \pm 81,9	1225,3 \pm 256,8(**)
Fosfatidilcolina	109,4 \pm 47,6	779,3 \pm 168,3(**)
45 Lisofosfatidilcolina	20,0 \pm 12,7	73,5 \pm 26,1(**)
Fosfatidiletanolamina	52,8 \pm 13,3	183,7 \pm 54,3(**)
Fosfatidilserina	28,8 \pm 11,1	78,4 \pm 26,0(**)
50 Fosfatidilinositol	25,3 \pm 10,1	74,7 \pm 18,8(**)
Fosfolípidos unidos a HBsAg	48,8 \pm 10,7	41,1 \pm 7,7(NS)

55 Con este ejemplo se pone en evidencia que puede obtenerse un nuevo antígeno en forma de super-partículas después de un procedimiento de oxidación y deslipidación natural. La estabilidad de estos agregados estaría basada en los procedimientos de agregación que pueden producirse durante la eliminación de lípidos procedentes de las partículas, que podría dejar expuestas regiones hidrófobas y por polimerizaciones de proteínas entre partículas al
60 quedar expuestos grupos sulfhidrilos.

Ejemplo 4

65 *Valoración de la inmunogenicidad de HBsAg agregado*

Con el objetivo de valorar la inmunogenicidad del HBsAg agregado resultante del Ejemplo 3, adsorbido en alumbre o en PBS para vía mucosal, se llevó a cabo un programa de inmunización con inoculaciones los días 0, 14 y 28 y

ES 2 342 150 T3

extracciones de sangre retro-orbitales el día 42 y se inmunizaron ratones Balb/c hembra de 10 a 15 semanas de edad, mediante vías intranasal e intramuscular. Las dosis por ratón se presentan en la tabla al final de este ejemplo, y los resultados se muestran en la Figura 1A, y el agregado de HBsAg se muestra en la Figura 1B.

5 Los análisis estadísticos de los resultados se llevaron a cabo mediante el ensayo Student y $p < 0,05$ se consideró una diferencia significativa.

10 A partir de este experimento, se demostró que es posible generar una mayor respuesta de IgG de HBsAg cuando se inmuniza mediante vías mucosales y sistémicas, con respecto al antígeno normal, en condiciones iguales. En la misma figura, se representa la comparación de este efecto para la respuesta DTH (barras), el cual resultó igualmente significativamente mayor para la variante agregada.

En la tabla siguiente se muestran los grupos de inmunización:

15	A-	5 µg de HBsAg deslipidado (50-500 nm)/PBS 1X	IN
	B-	10 µg de HBsAg deslipidado (50-500 nm)/PBS 1X	IN
20	C-	5 µg de HBsAg normal (22 nm)/PBS 1X	IN
	D-	5 µg de HBsAg deslipidado (50-500 nm)/Alumbre 0,5 mg/ml	IM
	E-	5 µg de HBsAg normal (22 nm)/Alumbre 0,5 mg/ml	IM

25 Ejemplo 5

Cinéticas de la respuesta de IgG anti-HBsAg

30 Con el objetivo de estudiar las cinéticas de la respuesta de IgG anti-HBsAg, se inmunizaron 10 grupos de ratones Balb/c hembras de 10-15 semanas de edad. El programa usado fue: inoculación las semanas 0, 2 y 18 y extracciones pre-inmune las semanas 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 20. En la tabla siguiente se describen los grupos ensayados:

35	1-	5 µg de HBsAg normal (22 nm)/Alumbre	IM
	2-	5 µg de HBsAg normal (22 nm)/PBS 1X	IM
	3-	5 µg de HBsAg deslipidado (Ejemplo 3)/Alumbre 0,5 mg/ml	IM
40	4-	5 µg de HBsAg deslipidado (Ejemplo 3)/PBS 1X	IM
	5-	5 µg de HBsAg deslipidado (Ejemplo 1)/Alumbre 0,5 mg/ml	IM
	6-	5 µg de HBsAg deslipidado (Ejemplo 1)/PBS 1X	IM
45	7-	5 µg de HBsAg deslipidado (Ejemplo 1)/Alumbre 0,5 mg/ml	IM
	8-	5 µg de HBsAg deslipidado (Ejemplo 1)/PBS 1X	IM
	9-	5 µg de HBsAg deslipidado (Ejemplo 1)/Alumbre 0,5 mg/ml	IM
50	10-	5 µg de HBsAg deslipidado (Ejemplo 1)/PBS 1X	IM

55 Los antígenos de los grupos 5 y 6, 7 y 8, y 9 y 10 se obtuvieron mediante incubación a diferentes tiempos y concentraciones de ciclodextrinas obteniéndose diferentes grados de agregación.

Para el experimento DHT, las mediciones se realizaron los días: 1(1,3), 2(1',3'), 3(1'',3'') y 5(1''', 3''').

60 Los análisis estadísticos de los resultados se realizaron mediante el ensayo Student; $p < 0,05$ se consideró una diferencia significativa.

65 En este experimento, se corroboró que el HBsAg deslipidado, con diferentes grados de agregación, tiene características inmunológicas que les distinguen entre sí. La mayor inmunogenicidad y respuesta DTH no se correspondió con el mayor tamaño del antígeno sino con tamaños de antígenos intermedios, aunque de acuerdo con el rendimiento de las cinéticas de aparición del anticuerpo al final del experimento, la mayor inmunogenicidad correspondió a la variante con un mayor grado de agregación. No obstante, se observó un incremento significativo de la respuesta DTH en los grupos inmunizados con adyuvante de alumbre, en comparación con los inmunizados con el antígeno en PBS; el grupo de antígeno agregado con un tamaño intermedio generó los mayores incrementos que llegaron a ser significativos el día

56. En la Figura 2a, están representados los títulos individuales del día 56 para todos los grupos inmunizados. En esta figura, están igualmente representados los resultados del experimento DTH realizado durante 5 días de la semana 22, usando 20 μg de HBsAg en la pata derecha y PBS en la pata izquierda en un volumen de inoculación de 20 μl . Todos los grupos restantes mostraron igualmente una respuesta significativamente menor con respecto a la diferencia en el diámetro entre las patas derecha e izquierda comparadas con el grupo 3, el cual se inoculó con HBsAg con adyuvante de alumbre con un nivel de agregación intermedio, obtenido tal como se describe en el Ejemplo 3. Merece tenerse en cuenta que, en los últimos ejemplos, se demostró que el reconocimiento en el caso de estructuras en forma de superpartículas, es más amplio con respecto a los epítomos reconocidos en el HBsAg, lo cual indica un mejor rendimiento para este tipo de estructura. Aunque a partir del grupo 5 al grupo 10, la reactividad del HBsAg anti-nativo es similar a la obtenida inmunizando con HBsAg nativo durante una parte importante del tiempo, se obtuvo igualmente una fuerte respuesta frente a otros epítomos presentes en el antígeno agregado; véase Ejemplo 8, Figura 4.

Ejemplo 6

Valoración de la relación IgG1/IgG2a

Con el objetivo de estudiar si existía una variación en la relación IgG1/IgG2a debido a su conexión entre la respuesta TH1/TH2, se ensayaron los sueros de los grupos D y E del programa de inmunización del Ejemplo 4 con el fin de determinar los niveles de anticuerpo anti IgG1 y IgG2a. Este análisis se realizó para los sueros de la extracción del día 42. Los niveles de anticuerpo IgG2a se incrementaron de manera significativa en el grupo inmunizado con el antígeno en forma de super-partículas (50-500 nm) hasta alcanzar una relación IgG1/IgG2a próxima a 1, comparada con el HBsAg normal también con adyuvante de alumbre (Figura 4).

La relación IgG1/IgG2a para el grupo HBsAg normal inmunizado con alumbre fue 6,2 veces mayor que la encontrada para el grupo HBsAg deslipidado de tamaño intermedio. A partir de este experimento, podría concluirse que la diferente presentación del antígeno de superficie no solamente genera un cambio cuantitativo sino también cualitativo con respecto al tipo IgG el cual resulta potenciado y la correlación de estas variaciones en la subclase IgG se imita con un incremento de la respuesta celular, lo cual corrobora los hallazgos de evaluación de DTH.

Ejemplo 7

Estudio de la reactividad HBsAg anti-nativo de los sueros de ratones inmunizados con diferentes variantes antigénicas

Después de la inmunización de ratones con los antígenos deslipidados obtenidos de acuerdo con los Ejemplos 1, 2 y 3, se comparó la reactividad de sus sueros con la de los sueros procedentes de ratones inmunizados con el antígeno normal. Como un resultado de este experimento, se observó que la respuesta inmune generada en los sueros procedentes de ratones inmunizados con las diferentes variantes tenían una reactividad diferente frente a HBsAg normal (22 nm), mostrándose la reactividad mayor por los sueros procedentes de ratones inmunizados con el antígeno normal, mientras que para los diferentes grados de deslipidación la reactividad frente a HBsAg fue también diferente. Incluso cuando existieron altos títulos frente a sus propios inmunógenos, los sueros procedentes de ratones inmunizados con variantes altamente oxidadas no reconocieron el HBsAg, lo que evidencia un diferente reconocimiento de los anticuerpos generados con los diferentes inmunógenos y lo que demuestra la diferente naturaleza antigénica de las estructuras recientemente generadas. En consecuencia, los resultados del Ejemplo 5 deben analizarse teniendo en cuenta que, aunque para las tres últimas variantes de antígenos agregados se han obtenido respuestas HBsAg anti nativos similares, existe igualmente presente una respuesta frente a otros epítomos de proteína de HBsAg no reconocidos mediante inmunización con HBsAg nativo.

Ejemplo 8

Reconocimiento de epítomos lineales por los sueros procedentes de ratones inmunizados con diferentes variantes de antígenos

Con el objetivo de comparar el reconocimiento de los anticuerpos generados por un HBsAg en forma de superpartículas obtenido mediante la variante de oxidación descrita en el Ejemplo 2, se realizó un mapaje sobre membrana de celulosa conteniendo secuencias de HBsAg lineales (región S), sintetizándose 37 péptidos de 12 aminoácidos cada uno de ellos solapados en 6 hasta completar la secuencia entera de la proteína.

El mapaje epitópico sobre membrana de celulosa se realizó de acuerdo con Ronald Frank (Frank, R., *Tetrahedron*, vol. 48, págs. 9217-9232, (1992)). Las muestras de sueros se ensayaron a una dilución de 1/100.

Los resultados relativos a los sueros procedentes de ratones inoculados con el antígeno normal y las diferentes variantes agregadas del mismo antígeno, evidenciaron que no existe un patrón de reconocimiento similar entre ambos antígenos, lo cual conduce a la conclusión de que se produce una presentación diferente para los epítomos B presentes sobre la superficie del HBsAg y sus variantes agregadas (Figura 4).

ES 2 342 150 T3

Ejemplo 9

Formación de agregados entre HBsAg y antígenos nucleocápsidos. Valoración inmunológica

5 Se incubaron volúmenes iguales de dos preparaciones conteniendo 0,1 mg/ml de HBsAg y HBcAg a 4°C durante una noche y, a continuación, se obtuvieron agregados mediante cromatografía de exclusión molecular con HPLC TSK G6000. Una muestra de estos agregados se trató para técnicas de visualización por microscopía electrónica, y la otra muestra se usó para su valoración inmunológica con programa de inmunización en ratones Balb/c mediante inoculación intranasal, con ambos antígenos de manera separada y con el agregado verificado mediante microscopía
10 electrónica (Figura 5A).

Los resultados evidenciaron que la mezcla de ambos antígenos agregados mediante vía intranasal permitió la potenciación de la respuesta frente al HBsAg (Figura 5B). En la tabla siguiente se representan los grupos de la figura:

15	1-10 µg de HBsAg/PBS 1X	IN
	2-10 µg de HBsAg/acemannano 3 mg/ml	IN
20	3-10 µg de HBsAg/10 µg de HBcAg/PBS 1X	IN
	4-10 µg de HBsAg/Alumbre 0,5 mg/ml	SC

25 Se obtuvieron resultados similares cuando se usaron otros antígenos cápsidos virales tales como hepatitis C y VIH para preparar la mezcla.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1

30 (A) Programa de tres dosis (semanas 0, 2 y 4). Las extracciones se realizaron la semana 6. Los tres primeros grupos se inocularon con 50 µl por vía intranasal. Los dos grupos restantes se inocularon por vía intramuscular en alumbre con 100 µl.

35 (B) HBsAg agregado (medida: 200 nm).

Figura 2

40 Programa de tres dosis (semanas 0, 2 y 18). Todos los grupos se inocularon por vía intramuscular con un volumen de 100 µl. Los valores de anticuerpo corresponden a la semana 8 (Figura 2A). Durante la semana 22 se realizó el ensayo DTH. La Figura 2B representa el valor DTH para los grupos 1 y 3 durante 5 días. La Figura 2C representa las cinéticas de incremento de los títulos durante el programa.

Figura 3

45 El mismo programa de tres dosis (semanas 0, 2 y 4) de la Figura 1. Análisis de los sueros de los grupos D y E procedentes de la extracción de la semana 6. Ambos grupos se inocularon por vía intramuscular en alumbre con 100 µl, el grupo D con HBsAg (50-500 nm) deslipidado y el grupo E con HBsAg normal con las mismas dosis. En el gráfico se representa el valor medio geométrico y el intervalo de la relación IgG1/IgG2a para cada ratón de ambos
50 grupos.

Figura 4

55 Mapaje de péptidos de solapamiento de la región S de HBsAg sobre membrana de celulosa conteniendo secuencias lineales. Se analizaron diluciones 1/100 de agrupaciones de sueros: 1, HBsAg (normal); 2, HBsAg (agregado); (3-5, anticuerpos monoclonales (MAbs) obtenidos mediante inmunización con antígenos agregados; 3, clon de 6; 4, clon de 7; 5, clon de 8); 6, suero no relacionado; 7, MAb (Hep 1). Cuatro intensidades de color representan la respuesta frente a péptidos: Blanco: respuesta negativa, gris claro: respuesta ligeramente positiva; gris oscuro: respuesta positiva; negro: respuesta muy positiva.

Figura 5

(A) Microscopía electrónica de agregados de HBsAg y HBcAg; las partículas de mayor densidad electrónica en el centro principal corresponden a HBcAg, las otras son HBsAg.

65 (B) Programa de 2 dosis (días 0, 14). Análisis de los sueros el día 26.

ES 2 342 150 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la preparación de estructuras antigénicas agregadas altamente inmunogénicas, el cual comprende las etapas siguientes:
- A) selección de los antígenos de interés;
 - B) adición de uno o varios antígenos de la mezcla en un medio que favorece la agregación;
 - 10 C) incubación de la mezcla;
 - D) deslipidación de la mezcla;
 - 15 E) selección de los agregados de partículas que tienen un tamaño desde 30 hasta 500 nm usando un procedimiento que permite la retención de estos tamaños moleculares; y opcionalmente,
 - F) preparación de formulaciones a partir de la mezcla de las estructuras antigénicas seleccionadas en la etapa (E), mediante la adición de un adyuvante de elección y adición opcional de otros antígenos, agentes estabilizantes y agentes conservantes;
 - 20 en el que los antígenos de interés comprenden el Antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg) opcionalmente en combinación con otros antígenos.
- 25 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los antígenos de interés comprenden HBsAg únicamente.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los antígenos de interés comprenden HBsAg en combinación con otros antígenos.
- 30 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que los otros antígenos están seleccionados entre el grupo constituido por antígeno nucleocápsido del Virus de la Hepatitis B (HBcAg), antígeno nucleocápsido del Virus de la Hepatitis C, antígeno nucleocápsido del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 ó 2, y proteína de membrana exterior de *Neisseria meningitidis*.
- 35 5. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio usado en la etapa (B) comprende agentes químicos, agentes oxidantes u otros componentes que tienen capacidad de agregación.
- 40 6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el medio usado en la etapa (B) comprende β -ciclodextrinas.
7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, en el que el medio usado en la etapa (B) comprende sales de amonio en una concentración de 10-50 mM, potenciado por sales de cobre y hierro y otras que permiten la agregación.
- 45 8. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que el medio usado en la etapa (B) comprende adyuvante de naturaleza hidrófoba total o parcial que favorece la agregación de HBsAg.
- 50 9. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de incubación (C) precisa desde 10 minutos hasta una semana.
10. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en la etapa (E) los agregados de partículas están seleccionados de un tamaño de desde 50 hasta 500 nm.
- 55 11. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el adyuvante de interés usado en la etapa (F) es un aluminio o adyuvante de sal de calcio o un adyuvante aceitoso.
- 60 12. Un agregado altamente inmunogénico de partículas antigénicas preparado de acuerdo con el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende Antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg) opcionalmente en combinación con otros antígenos, en el que el agregado de partículas tiene un tamaño de desde 30 hasta 500 nm.
13. Un agregado de acuerdo con la reivindicación 12, en el que los antígenos comprenden HBsAg únicamente.
- 65 14. Un agregado de acuerdo con la reivindicación 12, en el que los antígenos comprenden HBsAg en combinación con otros antígenos.

ES 2 342 150 T3

15. Un agregado de acuerdo con la reivindicación 14, en el que los otros antígenos están seleccionados entre el grupo constituido por antígeno nucleocápsido del Virus de la Hepatitis B (HBcAg), antígeno nucleocápsido del Virus de la Hepatitis C, antígeno nucleocápsido del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 ó 2, y proteína de membrana exterior de *Neisseria meningitidis*.

5

16. Un agregado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el agregado comprende adyuvante de naturaleza hidrófoba total o parcial.

10

17. Una formulación de vacuna que comprende un agregado altamente inmunógeno tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, conjuntamente con adyuvante, agente estabilizante o agente conservante.

18. Una formulación de vacuna de acuerdo con la reivindicación 17, para aplicación sistémica o mucosal.

15

20

25

30

35

40

45

50

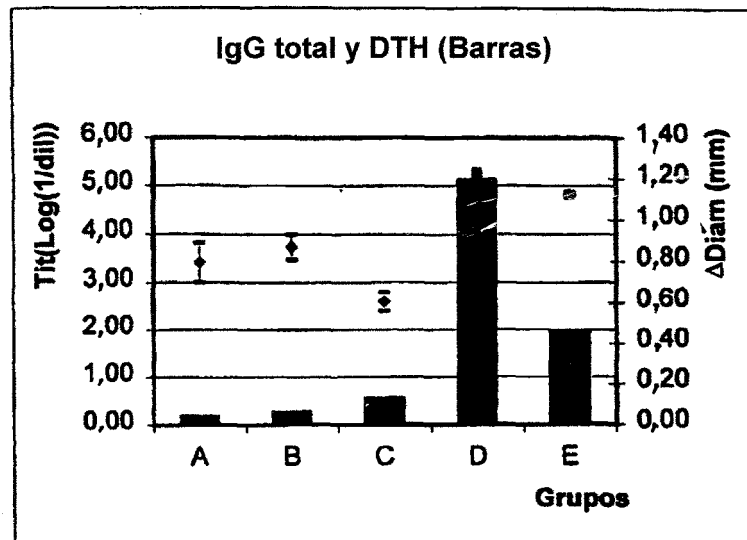
55

60

65

Figura 1

1A



1B

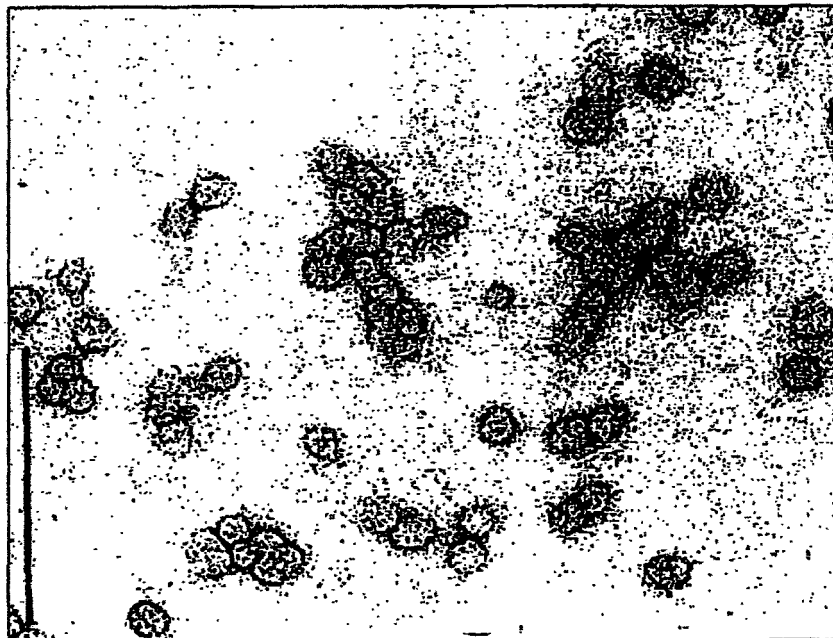


Figura 2

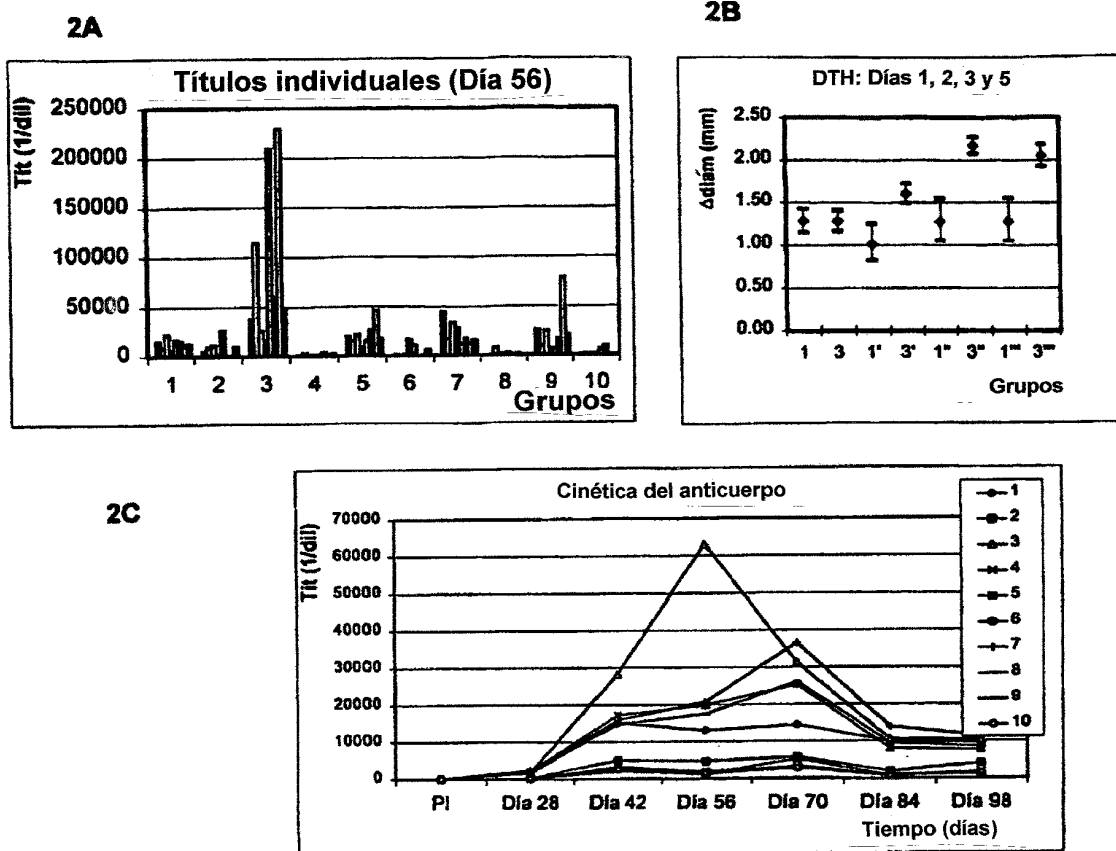


Figura 3

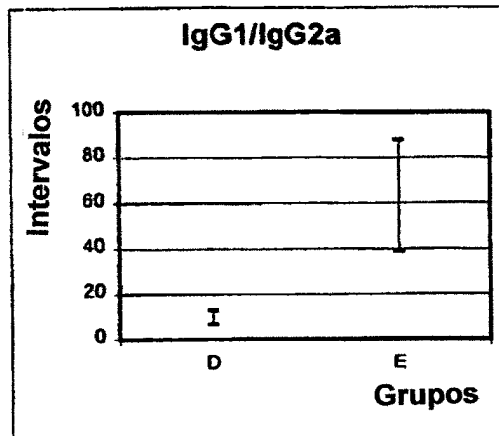
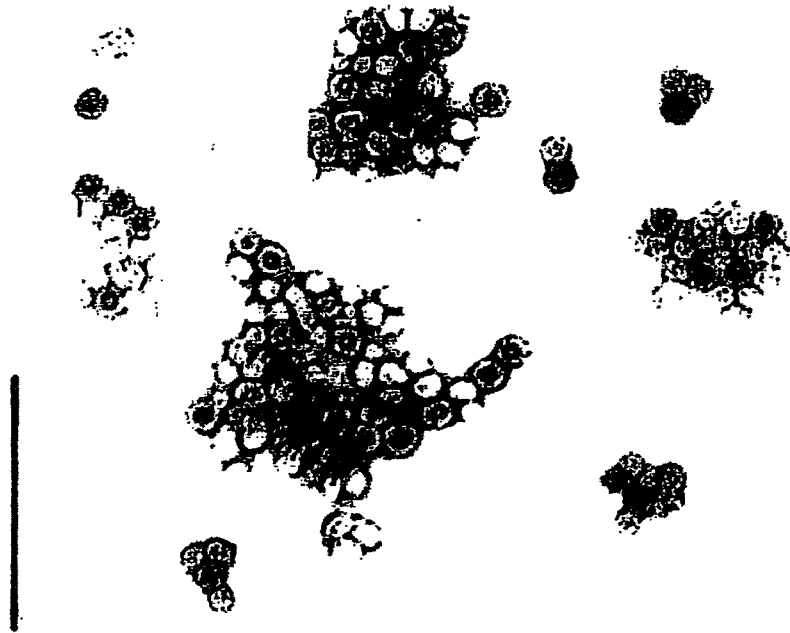


Figura 4

#	Secuencias	1	2	3	4	5	6	7
1	MENITSGFLGPL							
2	GFLGPLLVLQAG							
3	LVLQAGFFLLTR							
4	FFLLTRILTIPQ							
5	ILTIQSLDSWW							
6	SLDSWWTSLNFL							
7	TSLNFLGGSPVC							
8	GGSPVCLGONSQ							
9	LGONSQSPTS NH							
10	SPTS NH SPTSCP							
11	SPTSCPPICPGY							
12	PICPGYRWMCLR							
13	RWMCLRRFIIFL							
14	RFIIFL FILLC							
15	FILLCLIFLLV							
16	LIFLLVLLDYQG							
17	LLDYQGMLPVC P							
18	MLPVCPLIPGST		■					
19	LIPGSTTTSTGP		■					
20	TTSTGPCKTCTT	■	■					■
21	CKTCTTPAQGNS	■	■					
22	PAQGNMFPSCC		■	■	■	■		
23	MFPSCCCTKPTD							
24	CTKPTDGNCTCI							
25	GNCTCIPISSW							
26	PISSWAFAYL							
27	AFAYLWEWASV							
28	WEWASVRFSWLS							
29	RFSWLSLLVPFV							
30	LLVPFVQWFVGL							
31	QWFVGLSPTVWL							
32	SPTVWLSAIWMM							
33	SAIWMMWYWGPS							
34	WYWGPSLYSIVS							
35	LYSIVSPFIPLL							
36	PFIPLLPIFFCL							
37	LLPIFFCLWVYI							

Figura 5

5A



5B

