



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 354 414**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02713807 .2**

96 Fecha de presentación : **11.03.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1372706**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54 Título: **Potenciador de vacuna de proteosomas-liposacáridos.**

30 Prioridad: **09.03.2001 US 274232 P**
09.10.2001 US 327297 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.03.2011

73 Titular/es: **ID Biomedical Corporation of Quebec**
525 Cartier Boulevard West
Laval, QC H7V 3S8, CA

72 Inventor/es: **Burt, David, S.;**
Lowell, George, H.;
White, Gregory, L.;
Jones, David y
Rioux, Clement

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 354 414 T3

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

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención

La presente invención se refiere a potenciadores para aumentar la capacidad inmunógena y la mejora de la respuesta inmune de antígenos y a los procedimientos y composiciones para preparar y usar los anteriores.

Antecedentes de la Invención

Se puede aumentar la capacidad de los antígenos para inducir respuestas inmunes en un hospedador combinando el antígeno con inmunoestimulantes o potenciadores. Se usan casi en exclusiva potenciadores basados en alúmina para vacunas humanas inyectables aprobadas, sin embargo, aunque la alúmina potencia algunos tipos de respuestas de anticuerpos en suero (Tipo 2), es poco apropiada para potenciar otros tipos de respuestas de anticuerpos (Tipo 1) y es un activador deficiente de respuestas inmunes celulares que son importantes para la protección frente a patógenos intracelulares y para vacunas terapéuticas para el cáncer y la alergia. Además, la alúmina potencia las reacciones alérgicas debido a la producción de IgE. Aunque se han probado numerosas sustancias y muestran ser potentes potenciadores de respuestas inmunes de anticuerpos y celulares (Tipo 1) en modelos animales, muy pocas han demostrado ser adecuadas para uso en seres humanos debido a los inaceptables niveles de reactogenicidad y/o a las decepcionantes capacidades inmunopotenciadoras. Además, no existen en la actualidad potenciadores aprobados capaces de potenciar respuestas inmunes en superficies mucosales por las que penetran en el hospedador la mayoría de agentes infecciosos. De hecho, en Estados Unidos se ha interrumpido el desarrollo de los potenciadores mucosales más prometedores administrados por vía nasal, las enterotoxinas bacterianas (por ejemplo, toxinas del cólera mutadas y lábiles al calor) debido a su capacidad de transportarse hasta, y producir inflamación en la región del bulbo olfatorio del SNC de los roedores. Existe necesidad de potentes potenciadores que sean seguros en seres humanos y capaces de inducir respuestas inmunes sistémicas y mucosales humorales y celulares protectoras.

Los liposacáridos (LPS) de las bacterias gram negativas son potentes potenciadores. Los LPS activan el sistema inmune innato ocasionando la producción de citocinas inflamatorias tales como IL-1, TNF- α , IL-10 e IL-12 procedentes de macrófagos y células dendríticas; IL-1, IL-6 e IL-8 procedentes de células endoteliales e IL-8 procedente de células epiteliales. Además, LPS es un activador de linfocitos B en ratones, y en alguna extensión en seres humanos, tal como se evidenció por la mitogenicidad de los linfocitos B y la estimulación de la secreción de anticuerpos policlonales. LPS media sus efectos mediante la unión con moléculas CD 14 y la activación de receptores de tipo toll (TLR) en la superficie de células presentadoras de antígenos que conducen

al inicio de una cascada transcripcional, expresión génica y secreción de moléculas proinflamatorias.

A pesar del potencial potenciador de los LPS, se ha restringido su uso en seres humanos debido a la endotoxici­dad asociada mediada por la porción del lípi­do A de la molécula. Se ha demostrado que la modificación química de la región del lípi­do A de los LPS detoxifica sustancialmente el lípi­do A (por ejemplo, monofosforil lípi­do A o MPL-A o, por ejemplo, detoxificación alcalina para eliminar algunos ácidos grasos) manteniendo a la vez algunas propiedades potenciadoras (véase Qureshi y col. J. Biol Chem 1982; 257:11808-15). Aunque MPL-A presentó una potente actividad potenciadora en animales, la experiencia en seres humanos ha sido inconsistente, mostrando una deficiente actividad potenciadora con algunos antígenos y una inaceptable reactogenicidad global en muchas situaciones.

Se han administrado a seres humanos complejos de proteosomas-LPS no covalentes, que contienen proteosomas de *Neisseria meningitidis* y LPS purificados de *Shigella flexneri* o *Plesiomonas shigelloides*, por vía intranasal y oral en ensayos clínicos en fase 1 y fase 2 en el contexto de vacunas independientes. Estas vacunas inducen respuestas inmunes protectoras frente a la infección por *Shigella flexneri* o *S. sonnei*, respectivamente, en animales (Mallet y col. Infect and Immun 1995; 63:2382-86) y seres humanos (Fries y col. Infect Immun. 2001; 69:4545-53) cuando se proporcionan mediante la ruta intranasal. Además, estos complejos fueron bien tolerados por las rutas nasal u oral a dosis muy altas en seres humanos (hasta 1,5 mg de proteosomas junto con cantidades comparables de LPS proporcionados intranasalmente y hasta 2 mg de cada uno de los componentes de proteosomas y LPS proporcionados oralmente) (Fries y col. 2000) y no mostraron toxicidad asociada al bulbo olfatorio u otro componente del SNC en estudios de toxicidad con animales pequeños. Los proteosomas consisten predominantemente en proteínas porinas y otras proteínas de la membrana externa. Las evidencias sugieren que las porinas proteosómicas pueden inducir también IL-12 procedente de células dendríticas y la inducción de linfocitos T CD8+ (Jeannin y col. Nature Immunology 2000; 1:502-509) y la activación de células Hela para producir IL-8 (Pridmore y col. J. Infect Dis 2000; 10:183). Las porinas proteosómicas regulan también por aumento moléculas B7.2 (CD28) coestimuladoras en células presentadoras de antígenos mediante la activación del receptor 2 de tipo toll (Massari y col. J. Immunol. 2002;168;1533-1537).

Dalseg y col. (en Vaccines 96 pp. 177-182 (Cold Spring Harbor laboratory Press. 1996)) informan del uso de vesículas de membrana externa de meningococos (VME) como potenciadores mucosales del virus de la gripe completamente inactivado. Dalseg y sus asociados y colaboradores han informado que las VME que ellos preparan emplean un procedimiento que retiene del 6% al 9% de lipooligosacárido endógeno (LOS) remanente en comparación con la

cantidad de proteína de VME total en peso. También han informado de que estas preparaciones de VME retienen específicamente un 16% de detergente (desoxicolato) en sus VME, una cantidad que puede ser poco saludable o tóxica en estudios de toxicidad o en seres humanos.

El documento US-A-5985284 se refiere a vacunas orales o intranasales que usan complejos hidrófobos que tienen proteosomas y lipopolisacáridos.

El documento WO 97/10844 se refiere a procedimientos mejorados para la producción de vacunas de subunidades de proteosomas multivalentes y complejadas de manera no covalente.

Orr y col., noviembre de 1994 (Infection and Immunity, Vol 62 Nº 11, p5198-5200) se refieren a la potenciación de la respuesta del lipopolisacárido (LPS) anti-Shigella mediante la adición de la subunidad B de la toxina del cólera a vacunas de LPS de proteosomas-Shigella flexneri 2a orales o intranasales.

Levi-R y col (Vaccine 13(14) 1995; 1353-1359) describen péptidos sintéticos de la gripe que tienen un grupo lauroilo añadido a sus aminoácidos terminales. Estos se acoplaron a proteosomas y se usaron a continuación para inmunizar ratones intranasalmente para estimular una respuesta inmune humoral y celular específica frente al virus de la gripe.

Breve descripción de la invención

El alcance de la presente invención se define mediante las reivindicaciones y cualquier información que no esté comprendida dentro de las reivindicaciones se proporciona únicamente para información.

La presente invención (IVX-908) describe composiciones y procedimientos para la producción de formulaciones novedosas que son potenciadoras de antígenos y dan como resultado vacunas o inmunoterapéuticas potenciadas cuando se combinan la invención y el(los) antígeno(s) mediante mezcla simple y las vacunas o inmunoterapéuticas potenciadas se administran mediante una ruta parenteral o mucosal.

La invención proporciona por tanto el uso de un potenciador en la fabricación de un medicamento para aumentar la inmunidad a un antígeno, comprendiendo dicho potenciador una preparación de proteínas de membrana externa de proteosomas preparada a partir de una primera bacteria gram negativa y una preparación de liposacáridos derivada de una segunda bacteria gram negativa, en la que las preparaciones de proteínas de membrana externa de proteosomas y liposacáridos forman un complejo potenciador no covalente estable, y en la que un contenido final de lipopolisacáridos en peso como porcentaje de la proteína total de los proteosomas es al menos de un 13%.

Se proporciona también el uso de un potenciador, tal como se ha definido anteriormente y del antígeno en la fabricación de una composición inmunógena.

Se proporciona además una composición inmunógena que comprende el potenciador tal como se ha definido anteriormente y un antígeno, en la que el potenciador aumenta la capacidad inmunógena del antígeno, y en la que el antígeno se selecciona entre

- (a) un antígeno derivado de un organismo infeccioso en el que el organismo infeccioso es un virus, y en el que la composición inmunógena induce la inmunidad frente al organismo infeccioso;
- (b) un antígeno recombinante de la gripe;
- (c) un antígeno fraccionado de la gripe;
- (d) un alérgeno, un alérgeno química o biológicamente modificado, o un material químico;
- (e) Bet v 1a o Bet v 1a recombinante (rBet v 1a);
- (f) extracto de polen de abedul; y
- (g) un extracto de alérgeno

Se proporciona además un procedimiento para preparar una composición inmunógena que comprende mezclar un potenciador tal como se ha definido anteriormente con el antígeno, para formar la composición inmunógena, en el que el antígeno se selecciona entre (a) un antígeno derivado de un organismo infeccioso en el que el organismo infeccioso es un virus; (b) un antígeno recombinante de la gripe; (c) un antígeno fraccionado de la gripe; (d) un alérgeno, un alérgeno química o biológicamente modificado, o un material químico; (e) Bet v 1a o Bet v 1a recombinante (rBet v 1a); f) extracto de polen de abedul; y (g) un extracto de alérgeno.

Se proporciona además el uso de un potenciador tal como se ha descrito anteriormente y de un antígeno, para la fabricación de una vacuna o inmunoterapéutica potenciada para inmunizaciones iniciales o de refuerzo antes de o posteriormente a la administración del antígeno sin el potenciador.

Se proporciona además un producto que contiene un adyuvante tal como se ha definido anteriormente y un antígeno para inmunizaciones iniciales o de refuerzo antes de o posteriormente a, la administración del antígeno, en el que el antígeno se selecciona entre (a) un antígeno derivado de un organismo infeccioso en el que el organismo infeccioso es un virus; (b) un antígeno recombinante de la gripe; (c) un antígeno fraccionado de la gripe; (d) un alérgeno, un alérgeno química o biológicamente modificado, o un material químico; (e) Bet v 1a o Bet v 1a recombinante (rBet v 1a); f) extracto de polen de abedul; y (g) un extracto de alérgeno.

El adyuvante descrito en el presente documento que consiste en componentes principales. El primer componente es una preparación de proteínas de membrana externa de proteosomas preparada a partir de bacterias gram negativas que incluyen, pero no se limitan a *Neisseria meningitidis*. El segundo componente es una preparación de liposacáridos. El liposacárido incluye lipopolisacárido (LPS) no modificado o modificado y lipooligosacárido derivado de *S. flexneri* o

Plesiomonas shigelloides u otras bacterias gram negativas que incluyen, pero no se limitan a especies de Shigella, Plesiomonas, Escherichia o Salmonella. Se pueden formular los dos componentes en unas relaciones iniciales específicas mediante los procedimientos descritos, con el fin de optimizar la interacción entre los componentes, dando como resultado complejos estables no covalentes de los componentes entre sí. El procedimiento implica generalmente la mezcla de los componentes en una solución detergente seleccionada (por ejemplo, Empigen BB, Triton X-100, y/o Mega-10) y a continuación efectuar la complejación de los componentes eliminando a la vez el detergente mediante diálisis o, preferiblemente, mediante metodologías de diafiltración / ultrafiltración. Se pueden usar también la mezcla, precipitación simultánea y/o liofilización de los dos componentes para efectuar la complejación o la asociación adecuada.

El resultado final del procedimiento es la producción de un potenciador que cuando se administra junto con antígenos forma una vacuna o inmunoterapia potenciada que se puede administrar mediante ruta mucosal (tal como nasal, oral, orofaríngea, ocular, mucosal genitourinaria incluyendo la vaginal, sublingual, intrapulmonar, intratraqueal o rectal) o una ruta parenteral (tal como intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, submucosal, intradérmica) o una ruta transdérmica tópica o transmucosal para inducir niveles aumentados de suero y/o anticuerpos mucosales y/o respuestas inmunes celulares de tipo 1 frente al antígeno en comparación con el antígeno en solitario proporcionado mediante las mismas rutas. En los siguientes ejemplos, las mezclas que contienen proteosomas-LPS (que usan LPS procedentes tanto de Shigella como de Plesiomonas o Escherichia o Salmonella) y un antígeno recombinante de la gripe fraccionado o purificado mono o multivalente y administrado mediante líquido o pulverización o mediante inyección como una vacuna de la gripe potenciada indujeron respuestas inmunes específicas contra la gripe incluyendo, por ejemplo, una o más de las siguientes: a) anticuerpos contra inmunoglobulinas séricas o anticuerpos séricos medidos en ensayos funcionales que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (HAI); se señala que las respuestas HAI son significativas debido a que se sabe que su inducción está correlacionada con la protección frente a la gripe en seres humanos; b) anticuerpos mucosales que incluyen IgA en secreciones mucosales recogidas de los tractos respiratorio, gastrointestinal o genitourinario que incluyen, pero no se limitan a la nasofaringe, pulmones y vagina y c) correlaciones de inmunidad mediada por células (IMC) que incluyen la interrupción o la disminución de las respuestas mayores o predominantes de tipo 2 para dar como resultado respuestas mixtas, equilibradas, aumentadas o predominantes de tipo 1, por ejemplo, tal como se midió por la inducción de citocinas tales como IFN- γ sin aumentos comparables en la inducción de algunas citocinas de tipo 2 tales como IL-5, cuyos niveles pueden, por ejemplo, mantenerse, disminuirse, o estar ausentes. Dichas respuestas de Tipo 1 son predictivas de la inducción de

otras respuestas asociadas a IMC tales como el desarrollo de linfocitos T citotóxicos (LTC) indicadores de inmunidad de tipo Th1. La capacidad del potenciador proporcionado nasal o intramuscularmente de estimular estos tres tipos de respuestas contra el antígeno indica que la vacuna puede proporcionar inmunidad frente a enfermedades infecciosas debido a que se generan anticuerpos séricos funcionales (que incluyen anticuerpos HAI) y anticuerpos pulmonares específicos del virus. También, la inducción de IgA vaginal para las vacunas potenciadas administradas mucosalmente que usan el potenciador de la presente invención apoya la utilización frente a las infecciones mucosales o alergias que distan del sitio de inmunización tales como en los tractos gastrointestinal o genitourinario. Además, la inducción de respuestas de tipo 1 ayuda a la eliminación de virus, parásitos o algunos patógenos bacterianos residuales o intracelulares. Además, la capacidad del potenciador de producir respuestas inmunes de tipo 1 frente al antígeno será beneficiosa para producir vacunas terapéuticas eficaces, por ejemplo, contra el cáncer, enfermedades autoinmunes y alergias donde son importantes las respuestas de LTC y de la citocina Th1.

Por ejemplo, la rinitis alérgica se puede controlar a menudo eficazmente mediante inmunoterapia – una serie de inyecciones con dosis crecientes de la sustancia frente a la cual el individuo es alérgico. Se puede curar la rinitis alérgica en aproximadamente un 50% de individuos que se han sometido a inmunoterapia clásica. Se asocia la inmunoterapia satisfactoria con una o más de las siguientes: un cambio en las respuestas de los linfocitos T que da como resultado la producción de citocinas de tipo 2 (por ejemplo, IL-5 e IL-4) a las que se producen citocinas de tipo 1 (por ejemplo, IFN- γ) y/o un aumento en IgG y/o la reducción en IgE específica del alérgeno. Sin embargo, con el fin de conseguir estos resultados, se requieren hasta tres años de inmunizaciones repetidas. El uso de alérgenos junto con potenciadores que promueven respuestas inmunes de tipo 1 puede potenciar la eficacia de dicha inmunoterapia y reducir el número de inmunizaciones requeridas.

En el siguiente ejemplo, los inventores muestran los resultados de los estudios en ratones inmunizados intranasalmente con IVX-908 junto con rBet v 1a como proteína recombinante que representa el alérgeno principal del polen del árbol del abedul o el extracto de polen del árbol del abedul. Los resultados de la proteína recombinante y del extracto de alérgeno demuestran que IVX-908 convierte la producción de citocinas por los linfocitos T frente a Bet v 1a de un fenotipo de tipo 2 a otro predominantemente de tipo 1. Además, la respuesta de tipo 1 se asocia con la producción creciente de IgG de suero específica de alérgeno en comparación con el alérgeno en solitario, y una reducción en la IGE de suero específica de Bet v 1a en comparación con el alérgeno administrado con fosfato de aluminio, un depósito y un potenciador de Tipo 2 conocidos por sensibilizar las respuestas alérgicas de ratones frente a un alérgeno. De manera importante, el

aumento en la citocina de tipo 1, IFN- γ , se observó también tras la inmunización de ratones alérgicos con el mismo alérgeno proporcionado con IVX-908. El estado prealérgico de los ratones imita la situación en seres humanos alérgicos, sugiriendo que las formulaciones de IVX-908/alérgeno pueden ser candidatas a vacunas terapéuticas para la alergia.

Se señala que los potenciadores descritos en el presente documento pueden ser fácilmente vacunas potenciadores que contienen antígenos únicos, monovalentes o multicomponentes tales como péptidos, proteínas, toxoides, glicoproteínas, glicolípidos, carbohidratos y/o polisacáridos, aislados de organismos biológicos del reino animal o vegetal que pueden ser organismos infecciosos, tales como parásitos, virus y bacterias, o pueden ser extractos o extractos purificados o químicamente modificados de alérgenos derivados de organismos unicelulares o multicelulares o pueden ser materiales químicos. Se prevé también que se podrían usar como antígenos microorganismos completos o perturbados entre los que se incluyen virus, bacterias o parásitos, atenuados o inactivados. Se pueden producir también estos materiales mediante procedimientos moleculares sintéticos o recombinantes para inducir inmunidad y para proteger de diversas cepas de un organismo concreto o de múltiples organismos, o de agentes productores de enfermedades o de alergias, cáncer o enfermedades autoinmunes. Se propone la utilidad en los campos humano y veterinario. Además, se pueden usar los potenciadores descritos en el presente documento para potenciar la inmunidad cuando se administra conjuntamente con el antígeno como vacuna o inmunoterapia potenciadora como inmunizaciones iniciales o de refuerzo antes a o después de administrar el antígeno (mediante las rutas mucosal o parenteral) sin dichos potenciadores.

Para el uso parenteral, nasal, oral o mediante supositorios, se puede proporcionar el potenciador junto con cantidades de una variedad de excipientes u otros potenciadores que incluyen aceites, emulsiones, nanoemulsiones, grasas, ceras, tampones, o azúcares, como diluyentes o vehículos habituales en la técnica para proporcionar la administración estable del producto en el formato de administración deseado.

De particular relieve, se enfatiza que usar la presente invención como un potenciador es particularmente novedoso, debido a que este puede, en una forma de realización preferida, combinar el efecto adyuvante de los proteosomas junto con el potencial inmunoestimulador de los LPS. Este complejo no se había predicho que fuera eficaz previamente en la técnica anterior debido a que contiene un LPS de longitud completa que es normalmente tóxico cuando se administra en solitario. Ya que un complejo de proteosomas y LPS estable no es tóxico por las rutas nasal y parenteral en los ejemplos dados, tal como se ha verificado mediante los estudios preclínicos de seguridad, así como en los estudios clínicos de capacidad inmunógena y toxicidad, la FDA aprobó los ensayos clínicos en fase I y fase II.

La presente invención puede estar compuesta de proteínas de membrana externa bacteriana purificadas o recombinantes procedentes de especies de bacterias gram negativas, entre las que se incluyen, pero no se limitan a cepas de *Neisseria meningitidis*. Se pueden derivar los LPS de bacterias gram negativas tales como, pero sin limitarse a *Shigella* o *Plesiomonas* o *Escherichia* o una especie de *Salmonella* y pueden ser de la misma o de las diferentes especies de bacterias usadas para proporcionar las proteínas de membrana externa de los proteosomas. En la forma de realización preferida el contenido final en peso de liposacárido o LPS como porcentaje de la proteína total del proteosoma puede estar entre aproximadamente un 13% y un 300%, dependiendo de la especificidad de la aplicación y la ruta de administración puede ser eficaz y práctica para el uso con porcentajes de liposacárido o LPS de 20% a 200%, o puede distinguirse además en una aplicación concreta con un porcentaje de liposacárido de entre 30% a 150%. La presente invención junto con el antígeno se diseñan para administrar vacunas potenciadas por las rutas mucosal (nasal, sublingual, oral o rectal) o parenteral (intramuscular, subcutánea, intradérmica o transdérmica) para uso en la prevención o en el tratamiento del cáncer, enfermedades autoinmunes, víricas o microbianas o frente a algunas toxinas o agentes o alergias de riesgo biológico que se adquieren por rutas mucosales tales como, y especialmente, mediante inhalación, o por ingestión o transmisión sexual, o por rutas parenterales tales como la transdérmica, intradérmica o subcutánea o intramuscular.

Se describe en el presente documento un procedimiento para preparar proteosomas con un contenido en lipooligosacárido endógeno (LOS) de entre 0,5% hasta aproximadamente 5% de la proteína total. Se describe también un procedimiento para preparar proteosomas con liposacárido endógeno de entre aproximadamente 12% a aproximadamente 25%, y preferiblemente entre 15% y 20% de la proteína total.

La presente invención especifica una composición que contiene liposacárido derivado de alguna especie bacteriana gram negativa que de manera preferible es natural o recombinantemente diferente de o igual que la especie bacteriana gram negativa que es la fuente de las proteínas de la invención. Se puede optimizar la composición, específicamente especificada por los formuladores y variarse para contener cantidades de proteosomas y liposacáridos tales que la composición resultantes de la presente invención contenga liposacárido en una cantidad que sea al menos aproximadamente un 13% en peso del peso de la proteína total del proteosoma y, en una forma de realización preferida, puede ser del 15% al 300% y puede preferirse adicionalmente, dependiendo de la aplicación, que sea de entre un 20% a un 200% de la proteína total en una base peso:peso o incluso entre un 30% y un 150% de la proteína total.

Una forma de realización más preferida de la presente invención es la composición potenciadora en la que se preparan los proteosomas a partir de *Neisseria meningitidis* y se

preparan los liposacáridos a partir de *Shigella flexneri* o *Plesiomonas shigelloides* y el contenido final de liposacáridos está entre 50% y 150% en peso de la proteína total del proteosoma.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A y B muestran, respectivamente, dos formas de realización para la fabricación de material proteosómico a granel (Diagrama de Flujo 1A y Diagrama de Flujo 1B).

La Figura 2 muestra un esquema para la fabricación de LPS de *S. flexneri* 2a (Diagrama de Flujo 2).

La Figura 3 muestra un esquema para la fabricación de potenciador IVX-908 de proteosomas-LPS (Diagrama de Flujo 3).

Las Figuras 4 a) y b) muestran los niveles de IgG específica de suero (a) y de IgA de lavado pulmonar (b) estimulados cuando se mezcló una cantidad constante de HA con diferentes cantidades de IVX-908 y se usó para inmunizar ratones intranasalmente. Las Figuras 4 c) y d) muestran los niveles de IgG específica de suero (c) y de IgA de lavado pulmonar (d) estimulados cuando se mezcló una cantidad constante de IVX-908 (tanto 1 como 0,3 ug) con diferentes cantidades de HA y se usó para inmunizar ratones intranasalmente.

La Figura 5 a) muestra el número de ratones inmunizados (n=10) o de control (n=9) que sobrevivieron al estímulo con un virus de la gripe de variante homotípica vivo, adaptado a ratón. La Figura 5 b) muestra la pérdida promedio de peso (una medida de la morbilidad asociada con la infección del virus de la gripe) en los supervivientes de cada grupo. Las barras de errores indican los errores estándar sobre el promedio.

La Figura 6 muestra las respuestas específicas de anticuerpo en el suero de ratones inmunizados i.n. o i.m. con ovoalbúmina con o sin IVX-908. Se expresaron los títulos como media geométrica de las concentraciones de IgG específica (ug/ml) con límites de confianza del 95% mediante barras de errores.

Descripción detallada de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre comprendida dentro de las reivindicaciones se proporciona únicamente para información.

Los resultados muestran las siguientes actividades de adyuvante IVX-908 cuando se mezcló con antígenos recombinantes y fraccionados del virus de la gripe:

A. Por la ruta inyectable:

1. Induce un aumento de hasta ocho veces en el HAI y la IgG del suero en comparación con la vacuna fraccionada inyectable de la gripe flu sola

2. Los cambios estimularon respuestas inmunes a respuestas de Tipo 1 (IMC) en comparación con la vacuna fraccionada de la gripe flu sola

B. Por la ruta nasal:

- 5 1. Induce un aumento >100 veces en las respuestas de HAI e IgG del suero, en comparación con el antígeno fraccionado de la gripe flu, proporcionado por la ruta nasal
- 10 2. Induce hasta 10 veces más HAI e IgG específicos de suero en comparación con la gripe fraccionada proporcionada mediante inyección
- 10 3. Induce >100-1000 veces más IgA específica en el pulmón y/o la nariz en comparación con el antígeno fraccionado de la gripe flu solo, proporcionado nasalmente o mediante inyección
- 15 4. Induce hasta 160 veces más IgA específica en el tracto genital en comparación con el antígeno fraccionado de la gripe flu solo, proporcionado nasalmente o mediante inyección
- 15 5. Cambio en las respuestas de Tipo 1 (IMC) en comparación con la gripe fraccionada sola
- 20 6. Cantidades de IVX-908 tan pequeñas como de 0,3 ug a 1 ug son suficientes para conseguir una óptima potenciación de las respuestas de IgG en suero frente a la HA fraccionada de la gripe
- 20 7. La HA recombinante de la gripe administrada simultáneamente con IVX-908, induce respuestas que son protectoras frente a la mortalidad y la morbilidad, y superiores a las inducidas mediante inyección o administración i.n. del antígeno en solitario
- 25 8. Fueron eficaces los IVX-908 preparados a relaciones de proteína:LPS de 3:1 a 1:3 usando LPS de especies de Shigella, Escherichia y Salmonella.

Los resultados muestran que la inmunización respiratoria o parenteral con la presente invención y el antígeno flu fraccionado inducen la formación de anticuerpos específicos potenciados dirigidos contra la HA de la gripe en cada una de las biomuestras de suero y mucosales en comparación con la inmunización con el producto fraccionado de la gripe sin potenciador.

Los resultados muestran las siguientes actividades del potenciador IVX-908 cuando se mezcló con rBet v 1a, el alérgeno principal del polen de abedul tanto como alérgeno recombinante como alérgenos de polen de abedul y se administró mediante la ruta nasal.

- 35 1. La mezcla de IVX-908 y rBet v 1a por vía nasal potenció la inducción de la citocina de tipo 1, IFN- γ en 50 y 74 veces en comparación con Bet v 1a solo y Bet v 1a formulado

en fosfato de aluminio, respectivamente. La mezcla de IVX-908 y del extracto de polen de abedul (BPEX) potenció la inducción de la citocina de tipo 1, IFN- γ en >44 y 3 veces en comparación con Bet v 1a solo y Bet v 1a formulado en fosfato de aluminio, respectivamente.

2. Los aumentos en la producción de IFN- γ por las mezclas de IVX-908/Bet v 1a e IVX-908/BPEX no se asociaron con un aumento en la secreción de IL-5, indicando que IVX-908 dirigió la respuesta inmune frente a Bet v 1a hacia una respuesta sesgada de tipo 1 de los linfocitos T.
3. La IgE en suero inducida por las mezclas de IVX-908/Bet v 1a e IVX-908/BPEX fue aproximadamente 37 y 44 veces inferior que la inducida por el alérgeno proporcionado con fosfato de aluminio, respectivamente.
4. La IgG en suero específica de alérgeno aumentó en >400 veces y 22 veces para ratones inmunizados con las mezclas de IVX-908/Bet v 1a e IVX-908/BPEX en comparación con Bet v 1a y BPEX solos, respectivamente.
5. En ratones sensibilizados con Bet v 1a más alúmina, la producción de citocina de tipo 1, IFN- γ , aumentó en 4,7 y 33 veces tras la inmunización con IVX-908/rBet v 1a e IVX-908/BPEX, respectivamente, en comparación con los alérgenos correspondientes en solitario. En estos ratones, los niveles de la citocina de tipo 2, IL-5 se redujeron en comparación con los alérgenos correspondientes solos.
6. En ratones inmunizados nasalmente con mezclas de IVX-908/alérgeno y a los que se proporcionó posteriormente una inyección de sensibilización con Bet v 1a más alúmina, la citocina de tipo 1, IFN- γ , aumentó en 10 veces en comparación con el extracto de polen de abedul solo. En estos ratones, los niveles de la citocina de tipo 2, IL-5, no se elevaron similarmente y de hecho, se redujeron algo en comparación con el extracto de polen de abedul solo.

Los resultados demuestran que las formulaciones de IVX-908/alérgeno inducen fuertes respuestas de la citocina de tipo 1 en ratones sin exposición previa y sensibilizados, sugiriendo que estas formulaciones preparadas con proteínas o extractos purificados o recombinantes de alérgenos se pueden usar como vacunas o terapéuticas para la inmunoterapia específica de las enfermedades alérgicas.

Los resultados muestran las siguientes actividades del potenciador IVX-908 cuando se mezcló con ovoalbúmina (OVA), un inmunógeno conocido por ser poco inmunógeno y administrado mediante la ruta nasal o inyectable.

1. Potencia los títulos de IgG específica de OVA en suero en más de 60 y 75 veces mediante las rutas nasal e inyectable, respectivamente, en comparación con el

antígeno en solitario.

2. Potencia la secreción de IFN- γ e IL-5 específicos de OVA a partir de esplenocitos reestimulados en comparación con el antígeno en solitario dando como resultado un tipo equilibrado de respuesta inmune.

5

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de proteosomas

Se muestran dos ejemplos de preparaciones de proteínas de membrana externa de proteosomas. Estas preparaciones se purificaron a partir de *Neisseria meningitidis* de tipo 2 mediante la extracción de pasta bacteriana inactivada con fenol con una solución de Empigen BB (EBB) al 6% (Albright y Wilson, Whithaven, Reino Unido) en cloruro de calcio 1 M seguido por precipitación con etanol, solubilización en EBB-Tris/EDTA-solución salina al 1% y a continuación precipitación con sulfato de amonio. Se volvieron a solubilizar los precipitados en tampón EBB al 1%, se diafiltraron y se almacenaron en tampón EBB a -70°C. Un diagrama de flujo de este procedimiento, que dio como resultado proteosomas que tenían un contenido en liposacáridos de entre 0,5% y 5%, se muestra en el Diagrama de Flujo 1A (Figura 1A) en las siguientes páginas. Se pueden preparar también proteosomas omitiendo la etapa de precipitación con sulfato de amonio para acortar el procedimiento según se desee con proteosomas resultantes que tienen un contenido en liposacáridos de entre 12% y 25%, y pueden, dependiendo de los materiales, estar entre 15% y 20% tal como se muestra en el Diagrama de Flujo 1B (Figura 1B).

Ejemplo 2: Producción de liposacáridos

El ejemplo del Diagrama de Flujo 2 (Figura 2) muestra el procedimiento para el aislamiento y la purificación de LPS a partir de las bacterias *S. flexneri* o *P. shigelloides*. Este procedimiento puede usarse de manera similar para preparar LPS a partir de otras bacterias gram negativas entre las que se incluyen, pero no están restringidas a especies de *Shigella*, *Plesiomonas*, *Escherichia* y *Salmonella*. Tras el crecimiento de las bacterias mediante fermentación, se rehidrató la pasta celular con 3 ml de NaCl 0,9 M, EDTA/ g de pasta 0,005 M. Se añadieron también diez mg de lisozima /g de pasta. Se dejó proceder la digestión con lisozima durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se añadieron cincuenta U/ml de Benzonasa (DNasa) con MgCl₂ 0,025 M. Se dejó proceder la digestión con DNasa durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la suspensión se rompió al hacerla pasar por un microfluidizador a entre 14.000 y 19.000 psi ($9,65 \times 10^7$ a $131,0 \times 10^7$). Se agregó la DNasa reciente y la suspensión se digirió durante 30 minutos más a temperatura ambiente. Se calentó la suspensión celular digerida a 68°C en un baño de agua. Se añadió un volumen igual de fenol al 90% (a la misma temperatura)

y se incubó la mezcla con agitación a 68°C durante 30 min. Se centrifugó la mezcla a 4°C para separar las fases acuosa y orgánica. Se cosechó la fase acuosa y se volvió a extraer la fase orgánica con WFI (agua para inyección) a 68°C durante 30 min. Se centrifugó la mezcla a 4°C para separar las fases acuosa y orgánica y se combinaron las fases acuosas. Se añadieron etanol al veinte por ciento y CaCl_2 10 mM a la fase acuosa combinada para precipitar los ácidos nucleicos. Se agitó la mezcla a 4°C durante la noche. A continuación los ácidos nucleicos precipitados se aglomeraron mediante centrifugación a 10.000XG durante 30 minutos y se recogió el sobrenadante.

Se concentró el sobrenadante y se diafiltró usando un cartucho de fibra hueca de PM 30.000 en NaCl 0,15 M, Tris 0,05 M, EDTA 0,01 M y Empigen BB al 0,1%, pH 8,0. Finalmente, se tomaron alícuotas del LPS filtrado estéril usando una unidad de filtro Millipak 60 de 0,22 µm en contenedores de almacenamiento estéril y se congelaron a -80°C.

Ejemplo 3: Preparación y caracterización de un complejo potenciador de proteosomas-liposacáridos

Se fabricó el potenciador complejando de manera no covalente Proteosomas con LPS. Los LPS se pueden derivar de cualquiera de numerosas bacterias gram negativas que incluyen, pero no se limitan a especies de Shigella o Plesiomonas o Escherichia o Salmonella tal como se describe en el Diagrama de Flujo 3. De manera breve, se descongelaron los proteosomas y los LPS durante la noche a 4°C y se ajustaron con tampón de Empigen BB al 1% en TEEN. Se descongelaron los proteosomas durante la noche y se ajustaron con tampón de Empigen BB al 1% en TEEN. Se mezclaron los dos componentes en cantidades dando como resultado una relación final de Proteosomas:LPS p/p de entre 10:1 y 1:3 y se agitaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de LPS:Proteosomas se diafiltró en un cartucho de fibra hueca de COPM 10.000 dimensionado apropiadamente (por ejemplo, Tamaño 9), en tampón TNS (Tris 0,05 M, NaCl 150 mM pH 8,0). Se detuvo la diafiltración cuando el contenido de Empigen en el permeato fue < 50 ppm (mediante el Ensayo de Turbidez con Empigen o mediante el Ensayo del Reactivo de Bradford). Se concentró el potenciador IVX-908 a granel y se ajustó con 5 mg/ml de proteína (mediante el ensayo de Lowry). Finalmente, se filtró estéril el potenciador usando una unidad de filtro Millipak 20 de 0,22 µm. Se tomaron alícuotas del potenciador a granel en contenedores de almacenamiento estéril y se congelaron.

Se ensayó el complejo Proteosomas-LPS para Empigen (400 ppm) usando HPLC en fase inversa; el contenido de proteína mediante Lowry, el contenido de LPS mediante la medida del ensayo del 2-ceto-3-desoxioctonato (KDO). Se caracterizó adicionalmente la mencionada invención para las distribuciones del tamaño de partículas tal como se determinó mediante el

análisis cuantitativo de números ponderados usando un dimensionador de partículas (Brookhaven Instruments modelo 90 o equipo similar) (10-100 nm). Sin embargo, el tamaño de partículas del complejo aumentará con una relación mayor de proteosomas a LPS. La estabilidad de las formulaciones del complejo debería ser consistente con la vacuna de LPS de *S. flexneri* anteriormente demostrada. Estos datos demuestran la estabilidad del complejo a temperatura refrigerada y acelerada (25 y 37°C).

Ejemplo 4: Preparación de las mezclas de antígeno IVX-908 de la gripe o del alérgeno del polen de abedul o de ovoalbúmina

Se preparó la presente invención mezclando el potenciador IVX-908 de Proteosomas-LPS (Ejemplo 3) con el antígeno en proporciones que promueven formulaciones óptimas para los resultados de estabilidad e inmunológicos.

Ejemplo 5: Protocolos de inmunización de ratones para estudios del antígeno de la gripe

Ratones BALB/c se inmunizaron intranasal o intramuscularmente en los días 1 y 21 con antígenos en volúmenes de 25 o 100 µl respectivamente que contenían 0,3 y 3 µg de hemaglutinina de la gripe (HA) como A/Beijing/262/95 o un antígeno bivalente fraccionado con detergente de A/Beijing/262/95 más A/Sydney/5/97 (antígeno GMP aprobado comercialmente) tanto en solitario como mezclados con 0,3-3 µg de potenciador IVX-908 (que contiene LPS a diversas relaciones de Proteosomas:LPS p/p). Se proporcionaron a los ratones del control inmunizaciones intranasales con solución salina tamponada con fosfato. Se sangraron los animales en el día 35 a través de la vena safena o mediante punción cardíaca. Se tomaron el lavado nasal o pulmonar o los lavados vaginales en el día 35. Se expusieron quirúrgicamente los pulmones de cada ratón y se insertó una cánula en la tráquea. Usando una jeringuilla que contenía solución salina tamponada con fosfato suplementada con albúmina de suero bovino al 0,1% e inhibidores de la proteasa (AEBSF 0,2 mM, 1 µg/ml de Aprotinina, Bestatina 3,25 µg y Leupeptina 10 µM), se recogieron 1 muestra de lavado nasal (aproximadamente 1 ml) y 2 muestras de lavado pulmonar (2 x 1 ml). Se combinaron los fluidos de los lavados pulmonares de los animales individuales, se sometieron a vortización y se centrifugaron para eliminar los restos celulares, y se almacenaron a -70°C hasta que se ensayaron mediante ELISA. Se llevaron a cabo lavados vaginales insertando un tampón humedecido con 25 µl de solución salina tamponada con fosfato suplementada (como anteriormente), en el interior de la vagina del ratón durante 30 segundos. Tras eliminar el tampón, se repitió el procedimiento con el extremo opuesto del tampón. Se almacenó el tampón congelado a -70°C y se reconstituyó en tampón de bloqueo de ELISA (véase el Ejemplo 8) en el momento del ensayo.

Ejemplo 6: Ensayo de inhibición de la hemaglutinación en suero (HAI)

Antes de la determinación de la actividad HAI, se calentaron los sueros de ratones a 56°C para inactivar el complemento. Se consiguió la eliminación de la hemaglutinación no específica tratando los sueros de los ratones con enzima destructora del receptor (EDR). A 0,1 ml de suero se añadieron 0,4 ml de EDR (100 unidades/ml) durante 12 a 18 h a 37°C. Se añadieron 0,3 ml de citrato de sodio (2,5%) durante 30 min a 56°C para inactivar el EDR. Se llevó el volumen de la muestra hasta 1 ml con PBS (para conseguir una dilución final de la muestra de 1:10). Se ensayaron diluciones en serie dos veces de cada muestra para su capacidad de inhibir la aglutinación de glóbulos rojos de pollo al 0,5% por el virus completo de la gripe en un ensayo HAI normalizado.

Ejemplo 7: Medida de anticuerpos específicos dirigidos contra la gripe en sueros, en fluidos pulmonares, nasales y vaginales

Se recogieron los sueros tras cada inmunización. Se recogieron los fluidos de los lavados de las cavidades pulmonar y nasal y los lavados vaginales tras la última inmunización. Se llevó a cabo el ELISA usando virus completo o antígeno fraccionado con detergente tal como el antígeno de detección de manera breve, se recubrieron con antígeno placas de microvaloración de 96 pocillos con fondo redondo (por ejemplo, Placas Easywash Costar EIA/RIA de 96 pocillos, Corning, NY) y se incubaron durante la noche. Tras la aspiración del antígeno usando un lavador de placas, se lavaron las placas una vez con PBS que contenía Tween al 0,1 % (PBS-T) y se incubaron con tampón de bloqueo que contenía PBS-T más leche en polvo al 2%. Tras aspirar el tampón de bloqueo y lavar con PBS-T, las muestras de sueros, de fluidos de lavado de la cavidad pulmonar o nasal, o de los lavados vaginales, se diluyeron en serie 2 veces en solución de bloqueo, se añadieron y se incubaron las placas durante dos horas a 37°C. Tras lavar con PBS-T, se añadieron IgG o IgA de cabra dirigida contra ratón marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP) purificada por afinidad y se incubaron las placas durante 30 min a 37°C. Tras aspirar y lavar dos veces con PBS-T, se agregó disolución reveladora y las placas se incubaron durante 30 min a t.a. y se detuvieron mediante la adición de H₂SO₄ antes de determinar los valores de la absorbancia usando un lector microvalorador de placas ELISA (Molecular Devices, Menlo Park, California). Los títulos de anticuerpos en las Tablas se expresaron como ng/ml de IgG o IgA específica determinados a partir de una curva patrón producida usando un ensayo de captura ELISA que utiliza patrones de IgG e IgA de ratón purificadas por afinidad (Sigma).

Ejemplo 8: Capacidad inmunógena aumentada e inmunidad estimulada mediante vacunas de la gripe potenciadas con IVX-908

Este ejemplo muestra las respuestas de anticuerpos en suero y mucosales inducidas tras la inmunización nasal con antígeno monovalente (A/Beijing/262/95) o la inmunización nasal o intramuscular con antígeno bivalente (A/Beijing/262/95 más A/Sydney/5/97) proporcionados con o sin potenciadores IVX-908. Los ratones recibieron 2 dosis de antígeno que contenía 0,3 µg de HA e IVX-908 (en el que IVX-908 consiste de una relación 1:1 p/p de proteosomas a LPS con 1,2 µg de proteína de proteosomas por cada 0,3 µg de HA) por cepa de antígeno de la gripe usada. Se analizaron los anticuerpos dirigidos contra la IgG de la gripe en sueros mediante HAI; se analizaron los anticuerpos contra IgG en sueros e IgA en los fluidos de la cavidad pulmonar y nasal mediante ELISA. En las Tablas 1-3 se muestran y se resumen los resultados. De manera breve:

VACUNA DE LA GRIPE ESTIMULADA CON IVX-908 proporcionada nasalmente:

1. respuestas estimuladas de EgG en suero entre 50 y 250 veces mayores que las del antígeno fraccionado de la gripe Flu proporcionado solo nasalmente y hasta 10 veces mayores que la de la vacuna de la gripe proporcionada mediante inyección (i.m.) (Tablas 1-3),
2. respuestas HAI estimuladas en suero 16 a 100 veces mayores que las de la gripe fraccionada sola proporcionada nasalmente y hasta 8 veces mayores que las estimuladas proporcionando el producto de la vacuna fraccionada de la gripe solo mediante inyección (Tablas 1-3),
3. respuestas estimuladas de IgA entre 20 y 120 veces mayores en la cavidad nasal que en la vacuna fraccionada de la gripe Flu proporcionada sola nasalmente o mediante inyección (i.m.) (Tabla 1),
4. respuestas estimuladas específicas de IgA de 50 a >600 veces mayores en el pulmón que las de la vacuna fraccionada de la gripe Flu sola proporcionada nasalmente o medio de inyección (i.m.) (Tablas 1-3),
5. indujo aumentos de 30 a >160 veces en la IgA específica vaginal en comparación con la vacuna fraccionada de la gripe Flu sola proporcionada nasalmente o mediante inyección (Tabla 2)

VACUNA DE LA GRIPE POTENCIADA CON IVX-908 proporcionada intramuscularmente:

1. induce aumentos de hasta 5 veces en la EgG específica de suero y un aumento de hasta 8 veces en HAI en suero en comparación con la vacuna fraccionada de la gripe Flu proporcionada sola mediante inyección (tabla 3)

Los datos demuestran que IVX-908 preparado con LPS tanto de *P. shigelloides* (Tablas 1 y 3) como de *S. flexneri* (Tabla 2) cuando se mezcló con antígenos fraccionados de la gripe, potenció las respuestas inmunes específicas del antígeno mucosal. Además, IVX-908 potenció las

respuestas inmunes específicas de HA frente a cada uno de los antígenos de HA monovalente individuales cuando se proporcionó como preparación multivalente (Tablas 2 y 3).

5 Tabla 1. Efecto potenciador de IVX-908 por la ruta intranasal con antígeno monovalente. HAI, IgG e IgA mucosales en suero de murino inducidos por el antígeno fraccionado de la gripe (A/Beijing/262/95) mezclado con potenciador IVX-908 (3 µg de HA por dosis en una relación 4:1 de IVX-908:HA) tras la inmunización nasal

	Gripe fraccionada + IVX-908 nasal	Fraccionado nasal	Fraccionado IM	PBS
IgG sérica (ng/ml)*	3.305.360	24.774	290.844	250
HAI (GMT)**	640	≤ 10	160	≤ 10
IgA pulmonar (ng/ml)*	6.168	32	10	10
IgA nasal (ng/ml)*	1.531	85	13	10
Todas las muestras tomadas 14 días después de la 2ª inmunización IVX-908 preparado con LPS de <i>P. shigelloides</i> . * Son Medias Geométricas de 10 ratones/grupo **HAI de los sueros combinados de 10 ratones/grupo				

10 Tabla 2. Efecto potenciador por la ruta nasal con antígeno bivalente. HAI, IgG e IgA en suero de murino dirigidos contra A/Beijing/262/95 (H1) inducidos por el antígeno bivalente fraccionado de la gripe (A/Beijing/262/95 H1 and A/Sydney/5/97 (H3) mezclado con potenciador IVX-908 (0,3 µg de HA/cepa por dosis en una relación 4:1 de IVX-908:HA) proporcionados nasalmente

A. respuesta dirigida contra A/Beijing/262195 (H1)				
	Gripe fraccionada + IVX-908 nasal	Fraccionado nasal	Fraccionado IM	PBS
IgG sérica (ng/ml)*	427.000	1.682	97.810	2000
HAI (GMT)**	160	≤ 10	20	≤ 10
IgA pulmonar (ng/ml)*	1.276	5	10	4
IgA vaginal (ng/ml)*	833	8	5	4
B. respuesta dirigida contra A/Sydney/5/97 (H3)				
	Gripe fraccionada + IVX-908	Fraccionado nasal	Fraccionado IM	PBS
IgG sérica (ng/ml)*	32.835	643	84.172	2000
HAI (GMT)**	80	≤ 10	320	≤ 10
IgA pulmonar (ng/ml)*	358	4	4	4
IgA vaginal (ng/ml)*	141-	5	4	4

(continuación)

Todas las muestras tomadas 14 días después de la 2ª inmunización

IVX-908 preparado con LPS de *S. flexneri*.

* Son Medias Geométricas de 10 ratones/grupo

**HAI de los sueros combinados de 10 ratones/grupo

Tabla 3. Efecto potenciador de HAI, IgG e IgA mucosales en suero de murino dirigidos contra A/Beijing/262/95 (H1) inducidos por el antígeno bivalente fraccionado de la gripe (A/Beijing/262/95 H1 and A/Sydney/5/97 (H3) mezclado con potenciador IVX-908 (0,3 µg de HA/cepa por dosis en una relación 4:1 de IVX-908:HA) proporcionados nasal o intramuscularmente

A. Respuesta dirigida contra A/Beijing/262/95 (H1)					
	Inmunización nasal		Inmunización muscular		
	Gripe fraccionada + IVX-908	Gripe fraccionada	Gripe fraccionada + IVX-908	Gripe fraccionada	PBS
IgG en suero (ng/ml)*	313.369	1.682	488.665	97.810	2000
HAI (GMT)**	160	≤ 10	160	20	≤ 10
IgA pulmonar (ng/ml)*	1006	5	16	10	4
B. Respuesta dirigida contra A/Sydney/5/97 (H3)					
	Inmunización nasal		Inmunización muscular		
	Gripe fraccionada + IVX-908	Gripe fraccionada	Gripe fraccionada + IVX-908	Gripe fraccionada	PBS
IgG en suero (ng/ml)*	62.064	643	253.860	84.712	2.000
HAI (GMT)**	160	≤ 10	320	320	20
IgA pulmonar (ng/ml)*	200	4	10	4	4
Todas las muestras tomadas 14 días después de la 2ª inmunización IVX-908 preparado con LPS de <i>P. shigelloides</i>. * Son Medias Geométricas de 10 ratones/grupo **HAI de los sueros combinados de 10 ratones/grupo					

Ejemplo 9: El cambio de las respuestas inmunes de tipo 2 a tipo 1 mediante vacunas por vía nasal de la gripe con proteosomas

Se analizaron cultivos de esplenocitos procedentes de ratones inmunizados con proteosomas-LPS potenciados y no potenciados con antígenos fraccionados de la gripe para su producción de citocinas de linfocitos T, interferón gamma (IFN- γ) e IL-5 como indicadores de la inducción de respuestas inmunes de tipo Th1 o Th2, respectivamente. De manera breve, se inmunizaron ratones Balb/c tanto intranasal como intramuscularmente tal como se ha descrito en el Ejemplo 6 con una formulación bivalente que contenía 3 μ g de FA de la gripe procedente de A/Beijing/262/95 plus A/Sydney/5/97 con o sin 24 μ g de Proteosomas-LPS de IVX-908. Se sometieron a eutanasia los ratones 14 días después de la segunda inmunización y se cosecharon los bazos de 5 ratones de cada grupo y se separaron las células en una única suspensión celular usando un tamiz celular de nylon de 100 μ m (Becton Dickinson, NJ). Se cultivaron los esplenocitos a $2,0 \times 10^6$ células/ml (200 μ l/pocillo) en medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Life technologies, Burlington, ON) que contenía suero bovino fetal al 8% (inactivado térmicamente durante 1 h a 56°C; Gibco BRL), glutamina 2 mM (Gibco BRL), 2-mercaptoetanol 50 μ M (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) y 50 μ g/ml de gentamicina (Gibco BRL) con o sin los virus de la gripe A/Beijing/265/95 (H1N1) purificado, inactivado con UV, e IVR-108 con genoma reordenado (H3N2) (NIBSC, Hertfordshire, Reino Unido) en un agregado de cultivos celulares de 96 pocillos (Corning, NY). Se incubaron las células durante 72 h a 37°C y se cosecharon los sobrenadantes y se congelaron a -80°C. Se midieron los niveles de citocinas de murino usando kits ELISA de tipo sándwich (conjunto OptEIA, adquirido de Pharmingen, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron las citocinas recombinantes como patrones.

De manera breve, los resultados en la Tabla 4 demuestran que IVX-908 proporcionado junto con un antígeno fraccionado bivalente multivalente de la gripe para formar una vacuna de la gripe potenciada tanto nasal como intramuscularmente, induce únicamente la citocina de tipo 1, INF γ , sin IL-5 detectable, una citocina de tipo 2. De manera inversa, el antígeno bivalente de la gripe proporcionado solo nasal o intramuscularmente induce una respuesta inmune mixta de tipo 1 y tipo 2, tal como se evidenció mediante la producción de INF- γ e IL-5. Estos resultados indican que IVX-908 induce respuestas serológicas específicas de antígeno potenciadas y respuestas de linfocitos T sesgadas contra antígenos hacia el tipo 1 de inmunidad. Las respuestas inmunes de tipo 1 son importantes para el aclaramiento de patógenos intracelulares, para el desarrollo de respuestas antitumorales y en el control de las respuestas alérgicas.

Tabla 4. Inducción de citocinas en murino a partir de esplenocitos. Se inmunizaron los ratones con antígeno fraccionado bivalente de la gripe (A/Beijing/262/95 H1 y A/Sydney/5/97 H3) y potenciador IVX-908 (3 µg de HA/cepa por dosis en una relación 4:1 de IVX-908:HA) proporcionados nasal o intramuscularmente. Se preparó potenciador IVX-908 con LPS de *P. shigelloides*. Se volvieron a estimular los esplenocitos con A/Beijing/262/95 (H1) completamente inactivado o Sydney (H3) con genoma reordenado

A. Inmunización y reestimulación de A/Beijing/262/95 (H1)				
Citocina (µg/ml)	Inmunización nasal		Inmunización muscular	
	Gripe fraccionada + IVX-908	Gripe fraccionada	Gripe fraccionada + IVX-908	Gripe fraccionada
INF-γ	6.934	272	171	834
IL-5	0	173	0	277
B. Inmunización y reestimulación de A/Sydney/5/97(H3)				
Citocina (µg/ml)	Inmunización nasal		Inmunización muscular	
	Gripe fraccionada + IVX-908	Gripe fraccionada	Gripe fraccionada + IVX-908	Gripe fraccionada
INF-γ	9.690	0	2.657	4.111
IL-5	0	635	0	820

Se determinaron INF-γ e IL-5 en los sobrenadantes de los esplenocitos de ratón reestimulados tal como se describe en el Ejemplo 10 con virus completamente inactivados (1,2 µg/ml y se expresaron en pg/ml de sobrenadante del cultivo). Los resultados son los promedios de los cultivos por triplicado, y han tenido los valores obtenidos para IFN-γ e IL-5 (pg/ml) de los esplenocitos de ratones inmunizados con PBS ya sustraídos.

Ejemplo 10: Definición de cantidades y relaciones óptimas de IVX-908 y del antígeno de la hemaglutinina para maximizar la potenciación

Se inmunizaron ratones i.n. en los días 0 y 14 con 1 µg de HA (cepa H3N2, A/Sydney/5/97) mezclada con IVX-908 (proteínas de proteosomas:LPS de *S. flex*, 1:1) en cantidades decrecientes de 10 ug a 0,03 ug. Un estudio posterior varió la cantidad de 3 a 0,3 ug manteniendo a la vez constante la cantidad de IVX-908 a 1 ó 0,3 ug. En ambos estudios se recogieron la sangre, el lavado pulmonar, el fluido de lavado nasal y los bazo en la eutanasia en el día 21 y se analizaron para el contenido de IgG o IgA, o se usaron para preparar esplenocitos para la estimulación *in vitro* según sea apropiado (tal como se describe en el Ejemplo 9 anterior).

Se evaluó la significancia de los datos mediante el análisis ANOVA usando la prueba de las comparaciones múltiples de Tukey-kramer.

La Figura 4 a) y b) muestran que por encima de un umbral de 0,3-1 ug de IVX-908, se estabilizaron las respuestas inmunes estimuladas, y por debajo de este umbral, las respuestas estimuladas disminuyeron significativamente. Se llevó a cabo un segundo estudio manteniendo la cantidad de IVX-908 constante en este umbral y variando la cantidad de HA entre 3 ug y 0,3 ug. Los resultados en la Figura 4 c) y d) muestran que se obtuvieron respuestas inmunes sistémicas y mucosales máximas cuando se mezcló HA con IVX-908 por encima de un umbral de 1-3 µg de HA (administrada i.n. tanto con 0,3 µg como con 1 µg de IVX-908). Los resultados indican que con el fin de estimular respuestas inmunes óptimas en ratones, deberían mezclarse 1-3 ug de HA con 0,3-1 ug de IVX-908.

Como en otros estudios, el análisis de las citocinas liberadas a partir de esplenocitos estimulados *in vitro* mostró que en la administración i.n. de HA con IVX-908 estimuló respuestas principalmente del fenotipo de tipo 1.

Ejemplo 11: Potenciación de respuestas inmunes sistémicas y mucosales, y protección frente a la inducción del virus vivo, estimulado mediante la administración intranasal de hemaglutinina recombinante mezclada con IVX-908

Se adquirió hemaglutinina recombinante de la gripe derivada de baculovirus (rHA; H1N1 cepa A/Texas/36/91), suministrada en forma de proteína sin escindir de longitud completa (HAO), procedente de una fuente comercial. Se evaluó la capacidad inmunógena de la rHA mediante la inmunización de grupos de ratones BALB/c hembras de 15, 6-8 semanas de edad. Para las inmunizaciones intranasales (i.n.), los ratones se anestesiaron ligeramente, 25 µl de vacuna que contenía 2 µg de rHA con o sin IVX-908 (8 µg de proteínas de proteosomas y 8 ug de LPS de *S. flex*), o PBS se aplicaron a las fosas nasales (12,5 µl por orificio nasal) y se dejó a los ratones inhalar las gotículas. Se consiguió la inmunización intramuscular (i.m.) mediante la inyección de 25 µl (2 µg de rHA) en las patas traseras. Se inmunizaron todos los ratones en los días 0 y 21. Se indujeron diez animales de cada grupo en el día 48 mediante instilación i.n. de 8 DL₅₀ de la variante homotípica del virus de la gripe adaptada a ratón (A/Taiwan/1/86) para evaluar la protección. Se registró cualquier muerte, y se usó la pérdida de peso como valoración indirecta de la morbilidad; se pesaron los ratones inmediatamente antes y cada 2 días después de la inducción. Se consideró que los ratones que perdieron ≥ 30% de su peso corporal pre-inducción o que mostraron una menor pérdida de peso (≥ 20%) junto con otros signos clínicos de sufrimiento y/o morbilidad (por ejemplo, piloerección, postura encorvada, movilidad reducida) habían alcanzado los criterios de valoración experimentales y se sometieron a eutanasia. Los 5 ratones

no inducidos de cada grupo se sometieron a eutanasia en el día 51 y se desangraron mediante punción cardíaca. Se separó el suero de la sangre coagulada y se almacenó a -70°C hasta el ensayo. Se retiraron los bazo asépticamente y se procesaron para la reestimulación *in vitro* (tal como se describe en el Ejemplo 9 anterior). Se llevaron a cabo los lavados nasales y el lavado pulmonar tal como se ha descrito anteriormente.

La Tabla 5a muestra las respuestas sistémicas y mucosales en las muestras recogidas en el día 51, y la Tabla 5b muestra las cantidades de IFN- γ e IL-5 procedentes de los esplenocitos tras la estimulación específica *in vitro*. La Figura 5 a) muestra la protección frente a la mortalidad, y b) la protección frente a la morbilidad, en ratones inmunizados o controles tras la inducción con virus vivos de la variante homotípica, adaptados a ratón

Los resultados demuestran que:

1. Las respuestas en suero estimuladas por IVX-908 + rHA fueron 4 x y 100 x mayores, respectivamente, que las respuestas inducidas solo por rHA proporcionado i.m. o i.n.
2. Únicamente rHA i.n. administrado con IVX-908 estimuló respuestas de IgA mucosales detectables.
3. La inmunización i.n. con IVX-908 +rHA indujo respuestas del fenotipo de tipo 1 en contraste con rHA i.m. solo que indujo respuestas del fenotipo de tipo 2.
4. A diferencia de los ratones inmunizados con rHA o los controles, todos los ratones (10/10) inmunizados i.n. con IVX-908 + rHA sobrevivieron a la inducción del virus vivo, 8/10 y 1/10 ratones inmunizados i.m. o i.n. solo con rHA sobrevivieron mientras que los ratones del control no sobrevivieron.
5. Los ratones inmunizados i.n. con IVX-908 + rHA no sufrieron pérdida de peso tras la inducción. Todos los ratones sobrevivientes inmunizados solo con rHA mediante rutas tanto i.n. como i.m., perdieron significativas cantidades de peso, indicando morbilidad como resultado de infección tras la inducción. De esta manera, IVX-908 + rHA i.n. protegió a los ratones frente a la morbilidad así como frente a la mortalidad tras la inducción.

La Tabla 5a muestra las respuestas sistémicas y mucosales estimuladas por la inmunización de ratones con 2 ug de rHA, con o sin IVX-908, tal como se describe en el Ejemplo 11. El título de HI es el recíproco de la dilución máxima de suero que va a inhibir la hemaglutinación, y los niveles de inmunoglobulina (IgG o IgA) se expresan como Media Geométrica de las Concentraciones con los límites de confianza del 95% entre paréntesis. ND = no detectado.

	IVX-908 + rHA (IN)	rHA (IM)	rHA (IN)	PBS
Título de HI	1280	320	10	10
IgG en suero (µg/ml)	109,3 (51,5-232,3)	25,0 (12,1-51,4)	1,1 (0,9-1,4)	1,0
IgA nasal (ng/ml)	77 (30-196)	ND	ND	ND
IgA pulmonar (ng/ml)	265 (112-629)	ND	ND	ND

La Tabla 5b muestra las cantidades (pg/ml, determinaciones llevadas a cabo por triplicado) de IFN- γ e IL-5 liberado en los sobrenadantes del cultivo tras la estimulación in vitro de linfocitos T esplénicos de ratones inmunizados con 2 µg de vacuna o de material de control. Se volvieron a

5

	IVX-908 + rHA (IN)	rHA (IM)	rHA (IN)	PBS
IFN- γ (pg/ml)	12960	2918	3081	3266
IL-5 (pg/ml)	3	34	3	3

Ejemplo 12: Inducción de anticuerpos séricos y mucosales y cambio de respuestas inmunes de tipo 2 hacia tipo 1 mediante formulación del alérgeno IVX-908/Bet v 1a por vía nasal

10

Se expresó la proteína Bet v 1a recombinante en E. coli con una His-Tag (His) añadida en el término amino y purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel. Se inmunizaron ratones BALB/c intranasalmente (en volúmenes de 28 µl (Tabla 6) o 36 µl (Tabla 7) tres veces con separación de dos (Tabla 7) o tres (Tabla 6) semanas tanto con 10 µg de Bet v 1a como proteína recombinante purificada (rBet v 1a) como con extracto de polen de abedul (BPEx) (Greer Labs. Inc.) solos o como una mezcla de 10 µg de rBet v 1a o BPEx más 10 µg de IVX-908 (Tablas 6 y 7). Se proporcionaron inmunizaciones intranasales a los ratones del control con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se proporcionaron a otros ratones 10 µg de Bet v 1a en 2 mg de fosfato de aluminio intraperitonealmente en un volumen de 150 µl en los días 0 y 21 (Tabla 6), o 3 µg de extracto de polen de abedul (BPEx) (Greer Labs. Inc.) en 1 mg de fosfato de aluminio en el día 0 (Tabla 7). Una (Tabla 6) o tres (Tabla 7) semanas tras la inmunización final, se sangraron los animales mediante posterior punción cardíaca para obtener fluidos de lavado pulmonar. Se midieron mediante ELISA la IgE específica de Bet v 1a (Conjunto de IgE de ratón OptEIA; BD Pharmingen, Mississauga, Ontario), IgG, IgG1 e IgG2a en suero, e IgA e IgA total en lavados broncoalveolares. Se determinaron los niveles de IFN- γ e IL-5 en los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos (10×10^6 esplenocitos/ml) tras dos y tres días respectivamente tras la reestimulación in vitro con 10 µg/ml de Bet v 1a. Se detectaron las citocinas mediante ELISA (BD

15

20

25

Pharmingen; Mississauga, Ontario). En la tabla 8, se muestra un ejemplo de inducción de citocinas en ratones inyectados intraperitonealmente en el día 71 con una dosis única de 10 µg de rBet v 1a en 2 mg de fosfato de aluminio tras 3 inmunizaciones nasales en los días 0, 17 y 29 con 10 µg de extracto de polen de abedul (BPEX) (Greer Labs. Inc.) solo o como una mezcla con 10 µg de IVX-908. En la Tabla 9, se muestra un ejemplo de inducción de citocinas tras 3 inmunizaciones de rBet v 1a o BPEX con o sin IVX-908 en ratones sensibilizados previamente de forma intraperitoneal con una única dosis de 10 µg de Bet v 1a en 2 mg de fosfato de aluminio.

En las Tablas 6, 7, 8 y 9 se muestran los resultados de las respuestas de las citocinas de los linfocitos T y de las inmunoglobulinas séricas y mucosales tras la inmunización intranasal con IVX-908/rBet v 1a o una mezcla de IVX-908BPEX.

rBet v 1a o BPEX potenciado con IVX-908 proporcionado nasalmente a ratones sin exposición previa (Tablas 6 y 7):

1. Dirigieron las respuestas de los linfocitos T inducidas por el alérgeno Bet v 1a a partir de un fenotipo sesgado de tipo 2 a uno mayor o predominantemente de tipo 1. Esto se debió a la producción aumentada de IFN-γ por los esplenocitos de ratones a los que se les había proporcionado el alérgeno formulado como IVX-908 en comparación con rBet v 1a o BPEX solos o con fosfato de aluminio con una disminución (para IVX-908BPEX) o mantenimiento (para IVX-908/rBet v 1a) de la producción de IL-5,
2. Producción aumentada de IgG en suero específica de Bet v 1a en comparación con rBet v 1a o BPEX proporcionado solo, y
3. Una reducción producida de 37-43 veces en los niveles de IgE en suero en comparación con los inducidos por rBet v 1^a en fosfato de aluminio, un régimen de inmunización conocido para sensibilizar animales de respuestas alérgicas en la posterior inducción con el antígeno.

Tabla 6. Inducción de citocinas de murino y de anticuerpos séricos y mucosales con 10 ug de rBet v 1a solo o formulado con IVX-908 (10 µg 1:1 de proteínas:LPS) mediante la ruta nasal, o con 2 mg de fosfato de aluminio por la ruta intraperitoneal tal como se describe en el Ejemplo 10.

	rBet v 1a	rBet v 1a + IVX-908	rBet v 1a + Alúmina	PBS
IFN-γ (pg/mL)	53	2.598	35	0
IL-5 (pg/mL)	965	905	1.746	0
Relación IL-5/IFN-γ	18	0,4	50	0
IgE (ng/mL) sérica	8	77	2.832	8
IgG (ng/mL) sérica	27	11.111	901.497	3,8
IgA/total IgA pulmonar (%)	1,3	0,4	1,7	0,4

Los resultados de IFN- γ e IL-5 se expresan como los pg/ml promedio de los cultivos por triplicado de la combinación de los bazos de 5 ratones/grupo. La IgG en suero se expresa como la suma de los títulos de IgG1 e IgG2a. La IgA pulmonar se muestra como la IgA específica expresada como % total de IgA. Se calcularon todos los títulos de inmunoglobulina usando la media geométrica de los títulos de las muestras de 7 a 10 (IgG e IgE) ó 5(IgA) ratones/grupo. Se preparó IVX-908 con LPS de *S. flexneri*.

Tabla 7. Inducción de citocinas de murino e IgG en suero por 10 μ g de extracto de polen de abedul (BPEX) solo o formulado con 10 μ g de IVX-908 mediante la ruta nasal tal como se describe en el Ejemplo 12. Para BPEX + alúmina, se proporcionó a los ratones una única inmunización i.p. de 3 μ g de extracto de polen de abedul junto con 1 mg de fosfato de aluminio.

	BPEX	BPEX + IVX-908	BPEX + Alúmina	PBS
IFN- γ (pg/mL)	< 10	435	142	0
IL-5 (pg/mL)	431	143	290	0
Relación IL-5/IFN- γ	> 43,1	0,33	2	0
IgE (ng/mL) sérica	16	19	829	16
IgG (ng/mL) sérica	105	2.300	nd	7,5

Los resultados de IFN- γ e IL-5 se expresan como los pg/ml promedio de los cultivos por triplicado de la combinación de bazos de 4-5 ratones/grupo. La IgG en suero es para los sueros combinados de 15 ratones excepto para el grupo de BPEX + IVX-908, donde se calculó la media geométrica de los resultados de 15 ratones individuales. La IgE en suero del grupo BPEX + IVX-908 representa la media geométrica de los sueros de 15 ratones individuales mientras que los resultados de BPEX + Alúmina son las medias geométricas de 86 ratones individuales. Se midieron los niveles de IgE en suero para BPEX y PBS en los sueros combinados de 15 animales. Se preparó IVX-908 con los LPS de *S. flexneri*.

BPEX potenciado con IVX-908 proporcionado nasalmente a ratones e inyectado posteriormente con rBet v 1a más alúmina (Tabla 8):

1. aumentó la producción de citocina de tipo 1, IFN- γ , en 10 veces con BPEX proporcionado solo
2. y disminuyeron ligeramente los niveles de la citocina de tipo 2, IL-5.

Tabla 8. Inducción de citocinas en ratones inyectados intraperitonealmente con rBet v 1a más alúmina tras 3 inmunizaciones nasales con 10 µg de extracto de polen solo o formulado en una relación 1:1 con IVX-908 (10 µg de Proteínas:LPS) tal como se describe en el Ejemplo 12.

	BPEx	BPEx + IVX-908
IFN-γ (pg/mL)	31	330
IL-5 (pg/mL)	384	276
Relación IL-5/IFN-γ	13	0,8

5

Los resultados de IFN-γ e IL-5 se expresan como las medias geométricas (pg/ml) de los cultivos de bazos de 8-10 ratones individuales/grupo. Se preparó IVX-908 con LPS de *S. flexneri*.

rBet v 1a o BPEx potenciado con IVX-908 proporcionado nasalmente a ratones sensibilizados con rBet v 1a (Tabla 9):

- 10
1. aumentó la producción de citocina de tipo 1, IFN-γ, en 4,7 y 33 veces para IVX-908/rBet v 1a e IVX-908BPEx, respectivamente, en comparación con los alérgenos correspondientes solos y
 2. disminuyó los niveles de citocina de tipo 2, IL-5.

15 Tabla 9. Inducción de citocinas de murino por 10 µg de rBet v 1a o extracto de polen de abedul proporcionado nasalmente solo o con 10 µg de IVX-908 en ratones sensibilizados con rBet v 1^a, tal como se describe en el Ejemplo 12.

	rBet v 1a	rBet v 1a + IVX-908	BPEx	BPEx + IVX-908	PBS
IFN-γ (pg/mL)	126	593	295	9790	55
IL-5 (pg/mL)	2353	1747	8160	6270	460
Relación IL5/IFN-γ	19	3	28	0,6	8

20 Los resultados de IFN-γ e IL-5 se expresan como medias geométricas (pg/ml) de cultivos de bazos de 4-5 ratones/grupo Se preparó IVX-908 con LPS de *S. flexneri*.

25 Los datos en las Tablas 6, 7, 8 y 9 demuestran que los alérgenos (proteínas o extractos purificados recombinantes) formulados con IVX-908 inducen respuestas inmunes de tipo 1 en ratones. Estas formulaciones mantuvieron la producción de citocinas de tipo 1 en ratones inyectados con posterioridad intraperitonealmente con una inyección sensibilizante de rBet v 1a más alúmina. De manera importante, estas formulaciones aumentaron también las citocinas de tipo 1 en ratones que se habían sensibilizado previamente o convertido en alérgicos al alérgeno.

Estos resultados sugieren que la potencial utilidad de las formulaciones de IVX-908/alérgeno como vacunas terapéuticas de enfermedades alérgicas.

Ejemplo 13: Potenciación de respuestas inmunes frente a un inmunógeno deficiente

Se inmunizaron ratones como anteriormente mediante rutas tanto i.n. como i.m., con ovoalbúmina (OVA – una proteína soluble deficientemente inmunógena) en cantidades decrecientes de 100 µg a 5 µg, con o sin 1 ug de IVX-908 (proteínas de proteosomas:LPS 1:1, usando LPS de *P. shig*). Tras la inmunización en los días 0 y 14, se sometieron a eutanasia los ratones en el día 21 y se recogieron el suero, los fluidos del lavado pulmonar y los bazos para análisis. En la Figura 6 se muestran las GMC.

Los datos confirman que OVA no potenciada es deficientemente inmunógena y estimuló títulos de IgG en suero apenas detectables incluso cuando se inmunizaron los ratones con 100 µg de OVA por las rutas tanto i.n. como i.m. Sin embargo, cuando se mezcló con IVX-908, se observaron aumentos de 60 veces en los títulos por ambas rutas de inmunización, aunque a mayores concentraciones (≥ 25 µg) de OVA. No se detectaron respuestas mucosales en ninguno de los ratones inmunizados. El análisis de los perfiles de citocinas estimulados por OVA u OVA + IVX-908 mostró que cuando se inmunizó i.n., la administración simultánea de IVX-908 indujo la secreción de elevados niveles de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-5 procedentes de esplenocitos. De esta manera, a diferencia de HA, que indujo la liberación de citocinas indicadora de una respuesta fenotípica de tipo 2 que varió a un fenotipo de tipo 1 cuando se administró HA con IVX-908, la potenciación de la OVA soluble, deficientemente inmunógena, pareció asociarse con la inducción de una respuesta fenotípica de tipo 1/ tipo 2 equilibrada.

Ejemplo 14: Efecto de la variación en la cantidad de LPS en IVX-908 sobre la inmunidad estimulada.

Para determinar los efectos de la variación en la relación de proteosomas a LPS en IVX-908 sobre la inmunidad estimulada, se llevó a cabo un estudio en el que se inmunizaron ratones i.n. como anteriormente con 3 ug de HA (cepa A/Sydney H2N2) mezclados con 1 ug (como LPS) de IVX-9 (1:1 o 1:2 complejo de proteosomas y LPS de *P. shigelloides*) En la eutanasia, se recogieron la sangre y los lavados pulmonares y se analizaron mediante ELISA para la IgG o la IgA específica, respectivamente. En la tabla 9 se muestran los resultados, e indican que aunque ambos IVX-908 estimulan niveles virtualmente idénticos de IgG específica en suero, existe una diferencia muy significativa ($P \leq 0,001$) entre las IgA mucosales estimuladas por los diferentes IVX-908. De manera clara, los proteosomas que comprenden IVX-908 complejados en una relación 1:1 con los LPS de *P. shigelloides*, estimularon títulos mayores de IgA específica mucosal

en fluidos de lavado pulmonar y poseen por tanto más actividad potenciadora mucosal que la relación 1:2 del complejo de proteínas de proteosomas:LPS.

La Tabla 9 muestra los niveles de inmunoglobulinas (IgG o IgA) expresados como la media geométrica de las concentraciones con los límites de confianza del 95% entre paréntesis, en suero y lavados pulmonares de ratones inmunizados de ratones inmunizados i.n. con HA + IVX-908 (Pr:LPS 1:1 ó 1:2).

	IVX908 (proteínas de proteosomas:LPS, 1:2)	IVX908 (proteínas de proteosomas:LPS, 1:1)
IgG (µg/ml) sérica	158,8 (105,4-239,2)	166,8 (108,5-256,3)
IgA (ng/ml) pulmonar	393 (1567-981)	2026 (1230-3335)

Ejemplo 15: Efectos potenciadores de IVX-908 preparado con LPS procedente de diferentes organismos.

Para determinar la capacidad potenciadora de IVX-908 preparado complejando proteosomas con LPS procedente de organismos novedosos, se dispusieron preparaciones de IVX-908 usando LPS de *E. coli* no patógena (017) y de *Salmonella essen*. Se dispusieron preparaciones de IVX-908 mezclando los proteosomas y los LPS en relaciones 3:1, 1:1 y 1:3 (p/p) en presencia de Empigen, y se eliminó el detergente mediante diálisis en casetes de diálisis. Se inmunizaron los ratones i.n. en el día 0 y el 14 con 3 µg de HA (B/Guangdong) mezclada con 3 µg ó 0,3 µg (como LPS) de IVX-908. Los ratones del control recibieron 3 µg de HA i.n. En la eutanasia en el día 21, se recogió la sangre y se analizó mediante ELISA para la IgG específica. En la Tabla 10 se muestran los resultados, e indican que las preparaciones de IVX-908 preparadas con LPS de patógenos diferentes de las especies de *Shigella* son capaces de potenciar respuestas inmunes a un antígeno de vacuna. Para los IVX-908 preparados con LPS de *E. coli*, las relaciones 1:1 y 1:3 de proteosomas a LPS a una dosis de 0,3 µg de LPS proporcionaron una potenciación significativa ($P \leq 0,001$) de la respuesta de la IgG sérica dirigida contra HA en comparación con la HA sola proporcionada i.n. Todas las relaciones de Pr:LPS (*S. essen*) a ambas dosis ensayadas estimularon una potenciación significativa ($P \leq 0,001$) de las respuestas séricas dirigidas contra HA sobre la HA sola proporcionada i.n. Los resultados para IVX-908 preparado con *S. essen* fueron comparables a los obtenidos para IVX-908 preparado con LPS de especies de *Shigella*.

La Tabla 10 muestra los títulos de IgG sérica dirigida contra HA como media geométrica de las concentraciones (ug/ml) con los límites de confianza del 95% entre paréntesis de 8 ratones por grupo inmunizados con preparaciones de HA + IVX-908 que contenía LPS de diferentes bacterias gram negativas y a relaciones de Pr:LPS diferentes.

inmunógeno	IgG sérica (ug/ml)		
	Relación Pr:LPS		
	3:1	1:1	1:3
HA + Pr:LPS de E. coli (0,3 ug de LPS)	0,83 (0,79-0,87)	4,75 (2,53-8,91)	38,93 (28-19-53,75)
HA + Pr:LPS de S. essen (0,3 ug de LPS)	19,89 (12,12-32,63)	28,24 (18,14-43,98)	22,91 (13,43-39,09)
HA + Pr: LPS de S. essen (3 ug de LPS)	76,41 (43,62-133,86)	38,52 (20,64-71,9)	69,05 (31,15-153,04)
HA + Pr: LPS de P. shig (3 ug de LPS)		38,97 (16,53-91388)	
HA + Pr:LPS de S. flex (3 ug de LPS)		19,19 (7,39-49,8)	
HA	0,83 (0,77-0,89)		

REIVINDICACIONES

1.- Uso de un potenciador en la fabricación de un medicamento para potenciar la inmunidad frente a un antígeno, comprendiendo dicho potenciador una preparación de proteínas de membrana externa de proteosomas preparada a partir de una primera bacteria gram negativa y una preparación de liposacáridos derivada de una segunda bacteria gram negativa, en el que las preparaciones de proteínas de membrana externa de proteosomas y liposacáridos forman un complejo potenciador no covalente estable, y en el que un contenido final de liposacáridos en peso como porcentaje de las proteínas totales de proteosomas es al menos de aproximadamente un 13%.

2.- Uso del potenciador tal como se define en la reivindicación 1 en la fabricación de:

- (a) el potenciador para aumentar la capacidad inmunógena y mejorar la respuesta inmune frente al antígeno;
- (b) una vacuna combinada con el antígeno, o
- (c) una inmunoterapia, para la inmunización inicial o de refuerzo antes de o posterior a la administración del antígeno.

3.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que:

- (a) la primera y la segunda bacteria gram negativas son iguales;
- (b) la primera y la segunda bacteria gram negativas son diferentes;
- (c) la primera bacteria gram negativa se selecciona del género *Neisseria*, en el que opcionalmente la *Neisseria* es *Neisseria meningitidis*; o
- (d) la segunda bacteria gram negativa se selecciona entre los siguientes géneros: *Escherichia*, *Shigella*, *Plesiomonas*, o *Salmonella*, en el que opcionalmente, la segunda bacteria gram negativa se selecciona entre *E. coli*, *S. flexneri*, *P. shigelloides*, o *S. essen*.

4.- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el contenido final en liposacáridos en peso como porcentaje de la proteína proteosoma total está entre:

- (a) 15% a 300%;
- (b) 20% a 200%; o
- (c) 30% a 150%.

5.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que la preparación de proteosomas

tiene un contenido en liposacáridos entre:

- (a) 0,5% y 5% de la proteína total;
- (b) 12% y 25% de la proteína total; o
- (c) 15% y 20% de la proteína total.

5

6.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que:

(a) la primera bacteria gram negativa es *Neisseria meningitidis* y la segunda bacteria gram negativa es *Shigella flexneri* y el contenido final en liposacáridos está entre 50% y 150%; o

10

(b) la primera bacteria gram negativa es *Neisseria meningitidis* y la segunda bacteria gram negativa es *Plesiomonas shigelloides* y el contenido final en liposacáridos está entre 50% y 150%

15

7.- Uso de un potenciador tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y del antígeno en la fabricación de una composición inmunógena.

8.- Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el antígeno se selecciona entre:

20

(a) un antígeno derivado de un organismo infeccioso del reino animal o del reino vegetal, en el que la composición inmunógena induce la inmunidad frente al organismo infeccioso;

(b) un alérgeno, un alérgeno química o biológicamente modificado, o un material químico;

(c) microorganismo completo o perturbado que incluye un virus, bacteria o parásito, atenuado y/o inactivado;

25

(d) un antígeno que está producido mediante procedimientos moleculares sintéticos o recombinantes;

(e) Bet v 1a o Bet v 1a recombinante (rBet v 1a);

(f) un antígeno recombinante de la gripe;

(g) antígeno fraccionado de la gripe;

30

(h) extracto de polen de abedul; o

(i) un extracto de alérgeno.

9.- Uso de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que la composición inmunógena es para uso como una inmunoterapia, una vacuna profiláctica potenciada, o una vacuna terapéutica para inducir una respuesta inmune específica del antígeno.

35

10.- Uso de acuerdo con las reivindicaciones 7 a 9 para la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmune al antígeno en un sujeto.

11.- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medicamento es para administración por una ruta seleccionada entre mucosal, entérica, parenteral, transdérmica/transmucosal, e inhalación para inducir una respuesta de anticuerpos séricos o mucosales o una respuesta inmune celular de Tipo 1 frente al antígeno.

12.- Uso de acuerdo con la reivindicación 11 en el que;

(a) la ruta mucosal es mediante la mucosa nasal, orofaríngea, ocular, o genitourinaria;

(b) la ruta entérica es oral, rectal o sublingual;

(c) la ruta parenteral es una cualquiera de inyección o infusión intraarterial, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, y submucosal;

(d) la ruta transdérmica/transmucosal es tópica; o

(e) la ruta de inhalación es intranasal, orofaríngea, intratraqueal, intrapulmonar o transpulmonar.

13.- Uso de un potenciador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medicamento se administra en una cantidad suficiente para potenciar una respuesta inmune a un antígeno cuando se compara con una respuesta inmune al antígeno cuando se administra el antígeno en ausencia del potenciador.

14.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13 en el que la respuesta inmune frente al antígeno incluye una o más de las siguientes: a) niveles crecientes de anticuerpos séricos específicos de IgG o anticuerpos séricos; b) anticuerpos mucosales que incluyen IgG en secreciones mucosales recogidas de los tractos respiratorio, gastrointestinal o genitourinario; y c) correlaciones de inmunidad mediada por células (IMC) que incluyen un cambio de respuestas de Tipo 2 mayores o predominantes a respuestas de Tipo 1 mixtas, equilibradas, crecientes o predominantes tal como se midió por los ensayos celulares o de anticuerpos o los ensayos de citocinas de Tipo 1 tales como IFN- γ con citocinas de Tipo 2 mantenidas, decrecientes o ausentes tales como IL-5.

15.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13 en el que el medicamento es

para la administración en una serie de etapas de administración.

16.- Una composición inmunógena que comprende el potenciador tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 6 y un antígeno, en el que el potenciador aumenta la inmunogenicidad del antígeno, y en el que el antígeno se selecciona entre

- (a) un antígeno derivado de un organismo infeccioso en el que el organismo infeccioso es un virus, y en el que la composición inmunógena incluye la inmunidad frente al organismo infeccioso;
- (b) un antígeno recombinante de la gripe;
- (c) antígeno fraccionado de la gripe;
- (d) un alérgeno, un alérgeno química o biológicamente modificado, o un material químico;
- (e) Bet v 1a o Bet v 1a recombinante (rBet v 1a);
- (f) extracto de polen de abedul; y
- (g) un extracto de alérgeno.

17.- La composición inmunógena de la reivindicación 16, en la que el antígeno está producido por procedimientos moleculares sintéticos o recombinantes.

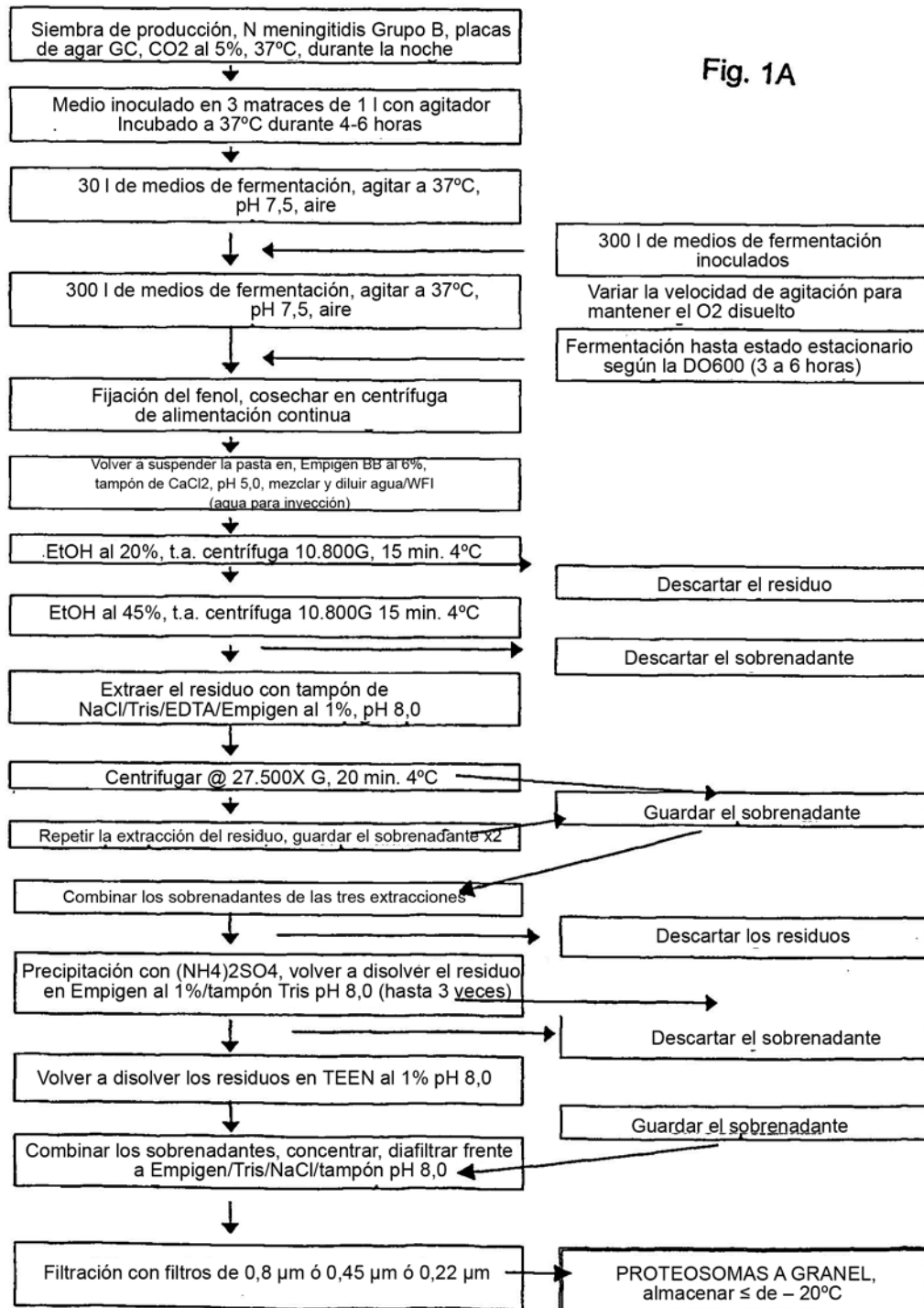
18.- La composición inmunógena de la reivindicación 16 ó 17, en la que la composición es una vacuna profiláctica inmunoterapéutica potenciada o una vacuna terapéutica que induce una respuesta inmune específica del antígeno.

19.- Un procedimiento para preparar una composición inmunógena que comprende mezclar un potenciador tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 6 con el antígeno, para formar la composición inmunógena, en el que el antígeno se selecciona entre (a) un antígeno derivado de un organismo infeccioso en el que el organismo infeccioso es un virus; (b) un antígeno recombinante de la gripe; (c) un antígeno fraccionado de la gripe; (d) un alérgeno, un alérgeno química o biológicamente modificado, o un material químico; (e) Bet v 1a o Bet v 1a recombinante (rBet v 1a); (f) extracto de polen de abedul; y (g) un extracto de alérgeno.

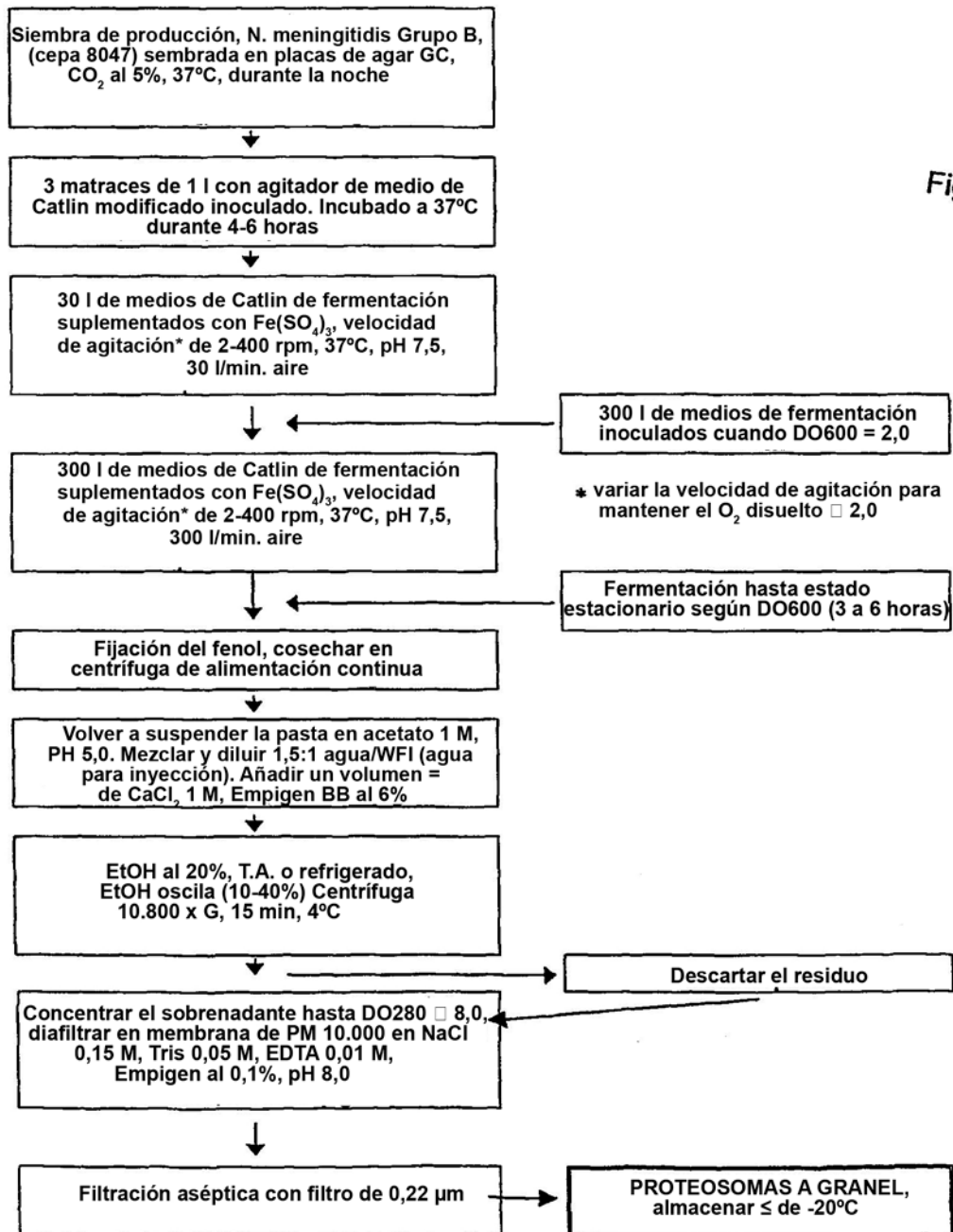
20.- Uso de (a) un potenciador tal como se define en la reivindicación 1 y (b) un antígeno, para la fabricación de una vacuna potenciada o inmunoterapéutica para las inmunizaciones inicial y de refuerzo antes de o posteriormente a la administración del antígeno sin el potenciador.

21.- Un producto que contiene un potenciador tal como se define en la reivindicación 1 y

- 5 un antígeno para las inmunizaciones inicial o de refuerzo antes de o posteriormente a, la administración del antígeno, en el que el antígeno se selecciona entre (a) un antígeno derivado de un organismo infeccioso en el que el organismo infeccioso es un virus; (b) un antígeno recombinante de la gripe; (c) un antígeno fraccionado de la gripe; (d) un alérgeno, un alérgeno química o biológicamente modificado, o un material químico; (e) Bet v 1a o Bet v 1a recombinante (rBet v 1a); (i) extracto de polen de abedul; y (g) un extracto de alérgeno.

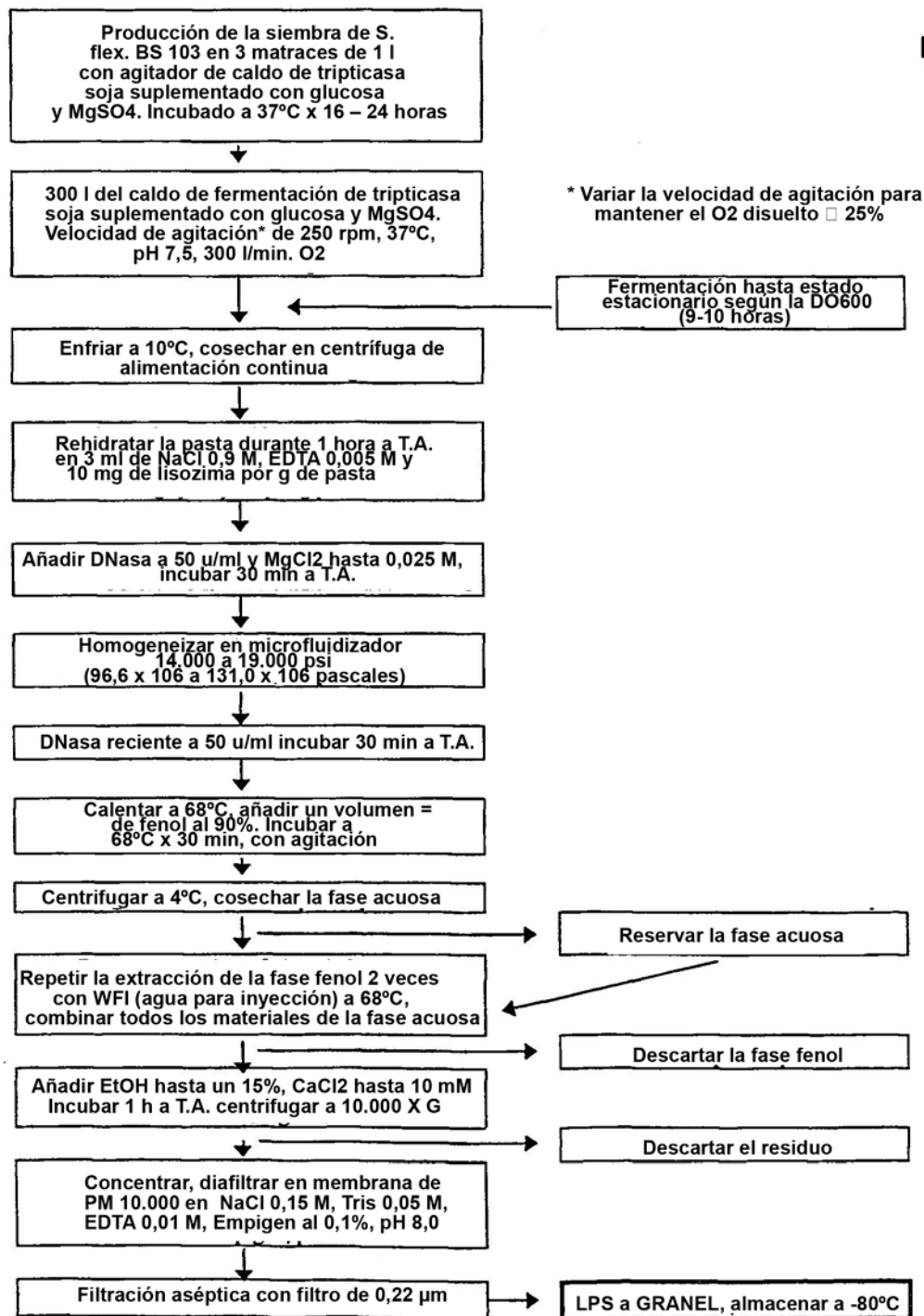
Fabricación de material a granel de proteosomas: DIAGRAMA DE FLUJO 1A

Fabricación de material a granel de proteosomas: DIAGRAMA DE FLUJO 1B



Fabricación de LPS de *S. flexneri* 2^a: DIAGRAMA DE FLUJO 2

Fig. 2



Fabricación de potenciador IVX-908 de proteosomas-LPS: DIAGRAMA DE FLUJO 3

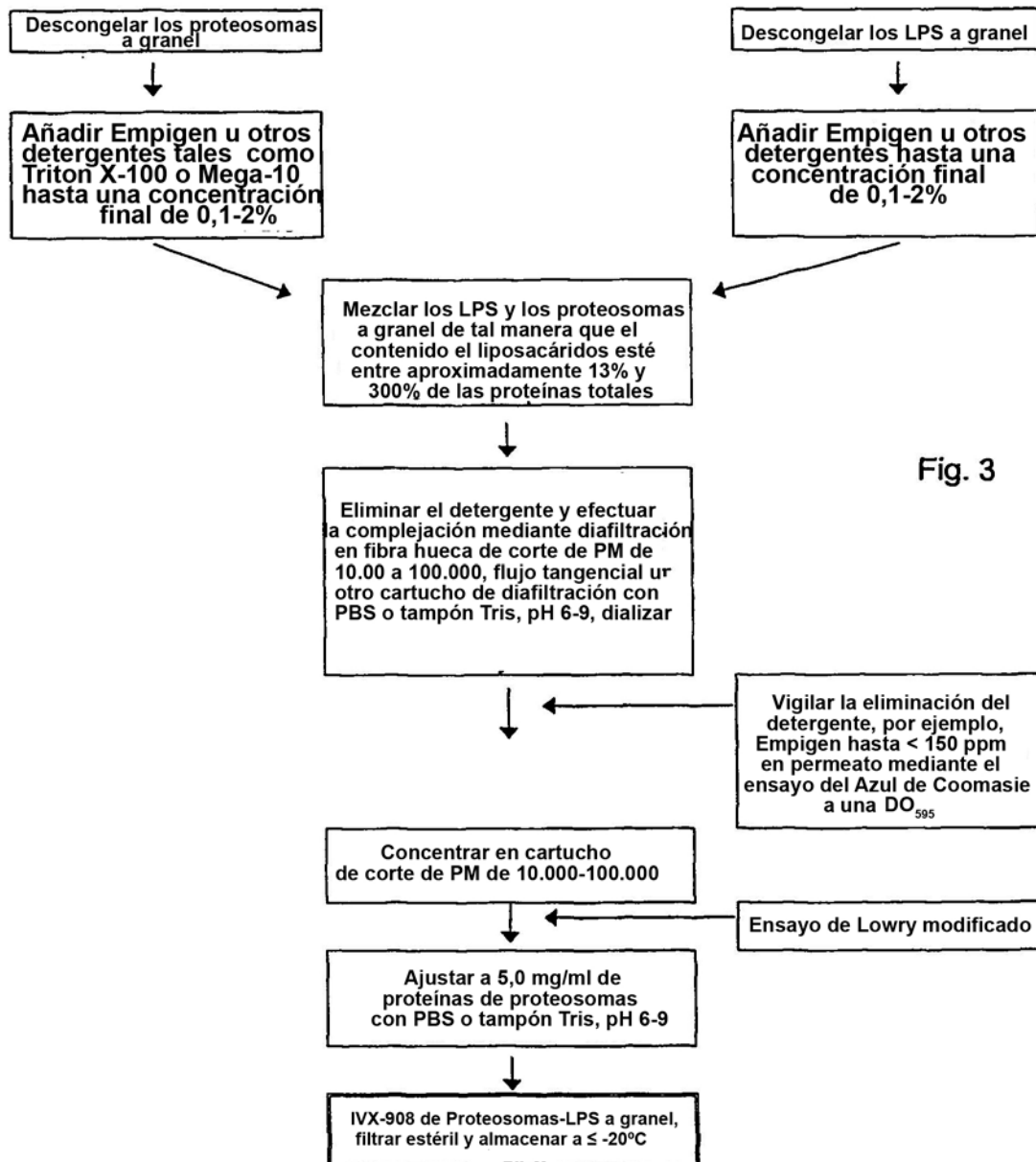


Fig. 3

Las Figuras 4 a) y b) muestra los niveles de IgG específica de suero (a) y de IgA de lavado pulmonar (b) estimuladas cuando se mezcló una cantidad constante de HA con diferentes cantidades de IVX-908 y se usó para inmunizar ratones intranasalmente.

a)

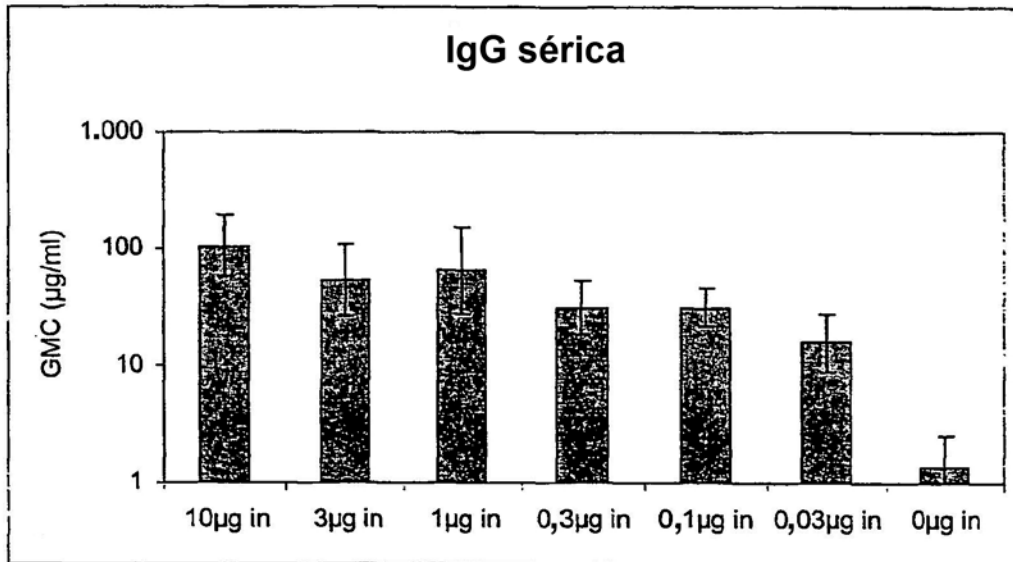


Fig. 4A

b)

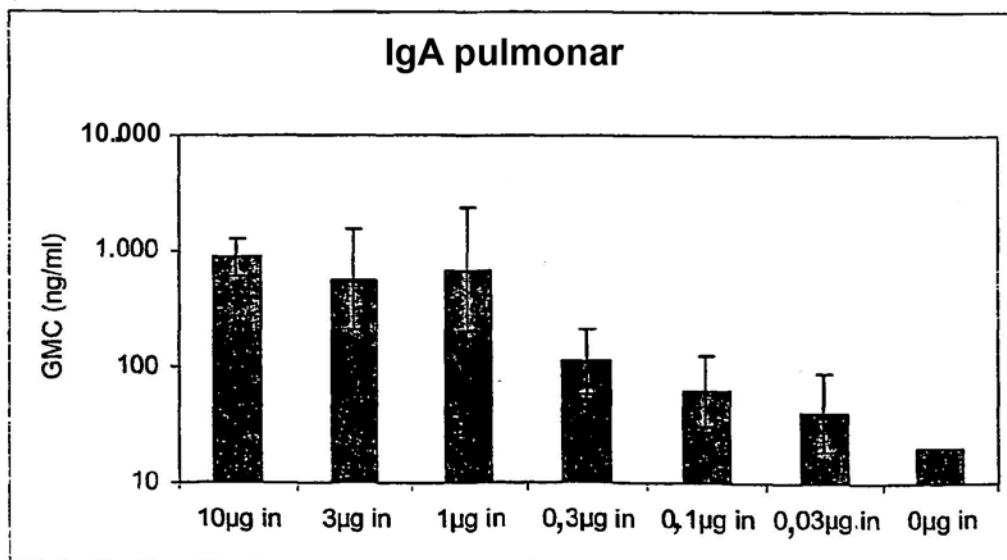


Fig. 4B

La Figura 4 c) y d) muestra los niveles de IgG específica de suero (C) y de IgA de lavado pulmonar (d) estimuladas cuando se mezcló una cantidad constante de IVX-908 (tanto 1 como 0,3 μ g) con diferentes cantidades de HA y se usó para inmunizar ratones intranasalmente.

c)

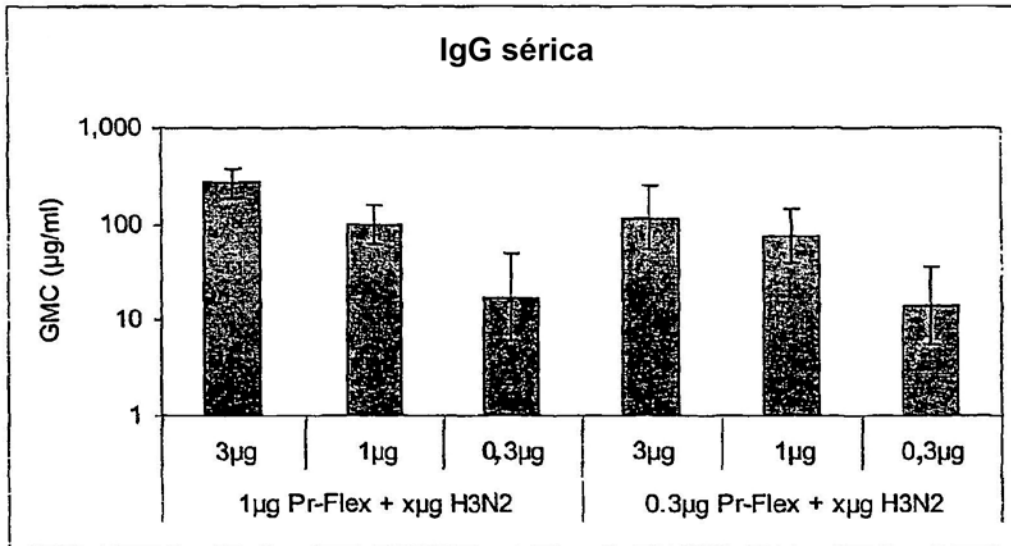


Fig. 4C

d)

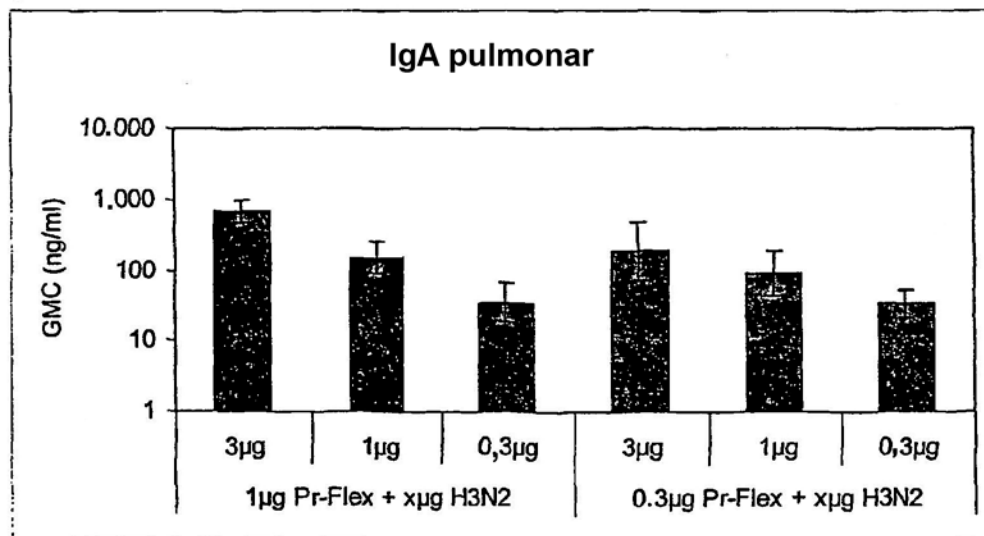


Fig. 4D

La Figura 5 a) muestra el número de ratones inmunizados (n=10) o de control (n=9) que sobrevivieron a la inducción con un virus de la gripe vivo de variante homotípica adaptado a ratón. La Figura 5 b) muestra la pérdida promedio de peso (una medida de la morbilidad asociada con la infección por el virus de la gripe) en los supervivientes en cada grupo. Las barras de errores indican los errores estándar sobre el promedio.

a)

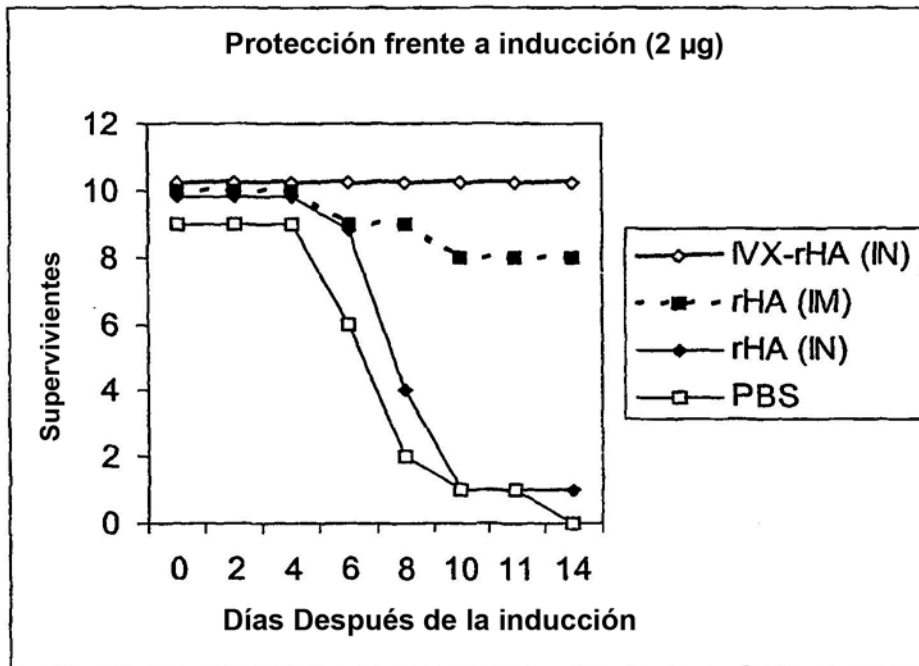


Fig. 5A

b)

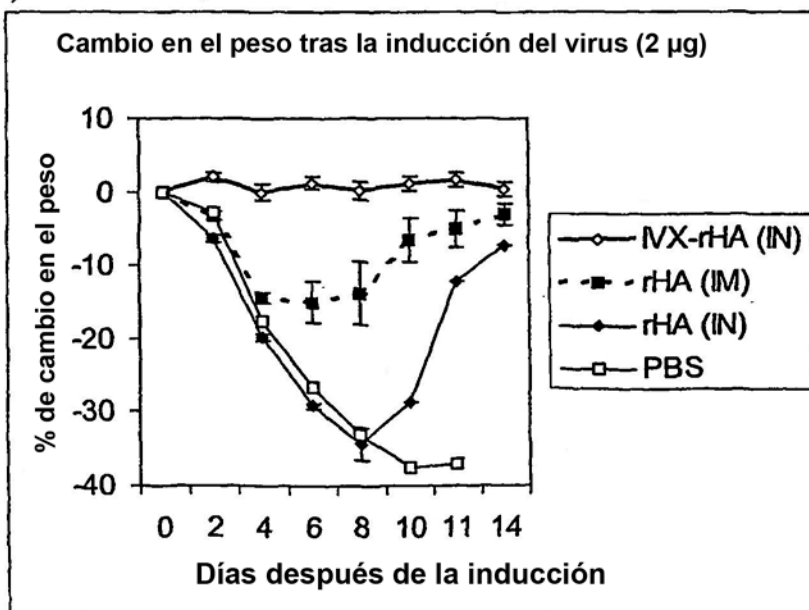


Fig. 5B

La Figura 6 muestra respuestas específicas de anticuerpo en suero de ratones inmunizados i.n. o i.m. con ovoalbúmina con o sin IVX-908. Los títulos se expresan como media geométrica de las concentraciones de IgG específica ($\mu\text{g/ml}$) con límites de confianza del 95% indicados mediante barras de errores.

