



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 890**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00988507 .0**
96 Fecha de presentación : **26.10.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1221972**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.07.2002**

54 Título: **Lectinas vegetales como adyuvantes de mucosas.**

30 Prioridad: **26.10.1999 US 161371 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.04.2011

73 Titular/es:
NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, Inc.
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608, US

72 Inventor/es: **Lavelle, Edward, C. y**
O'Hagan, Derek

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

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La invención se refiere al aumento de una respuesta inmune en un mamífero. Más concretamente, la invención se refiere al uso de lectinas vegetales como adyuvantes.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Debido a que la mayoría de los patógenos colonizan e invaden el huésped por la superficie de las mucosas, es lógico e interesante inducir la inmunidad en estas zonas con el fin de prevenir la infección (1). La administración de vacunas por vía mucosa es un procedimiento no invasivo y, por tanto, resulta relativamente sencillo y barato. Además, la posibilidad de provocar una serie de respuestas inmunes sistémicas y en las mucosas tras la administración de vacunas por vía mucosa posibilita la inmunización eficaz frente a muchas enfermedades. Por ejemplo, la IgA específica por sí sola puede proteger a los ratones contra la infección intranasal de la gripe (2) y la infección intestinal provocada por *Vibrio cholerae* (3). Sin embargo, lo común es que la administración por vía mucosa de inmunógenos no replicantes no provoque respuestas inmunes potentes. Para inducir respuestas, suele ser necesaria la administración de múltiples dosis elevadas (4). Además, con frecuencia, la administración de inmunógenos por vía mucosa no provoca una reacción a nivel sistémico (1).

Se puede emplear una serie de estrategias para aumentar las respuestas hacia las vacunas administradas por vía mucosa. Para administrar inmunógenos, se pueden usar vectores bacterianos y virales vivos que colonicen las mucosas (5). La adopción de una forma particulada por parte de los inmunógenos mediante la asociación con micropartículas biodegradables (6) o liposomas (7) también puede aumentar la inmunogenicidad de las mucosas.

Otro enfoque consiste en usar moléculas de tipo lectina con propiedades adyuvantes. Los adyuvantes de mucosas más potentes identificados hasta la fecha son la toxina del cólera producida por *Vibrio cholerae* (CT) y la enterotoxina lábil al calor (LT) de las cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli* (8, 9). Tanto CT como LT son inmunógenos y adyuvantes de mucosas bien caracterizados para las proteínas circundantes. Estas toxinas contienen subunidades A y B separadas (denominadas CTA y CTB, respectivamente). Las subunidades B median en la unión a los receptores de la superficie celular (20). El gangliósido GM1 es considerado el receptor principal de CT (21), pero CTB se puede unir a receptores de la superficie celular distintos de GM1 (22). Tras la unión de la subunidad B, la subunidad A alcanza el citosol y activa la adenil-ciclase conduciendo a un gran aumento de [AMPc] (10, 11). LT es estructural y funcionalmente similar a CT, y es comparable a CT como adyuvante sistémico y de mucosas (23, 24). En ratones, CT estimula considerablemente las respuestas inmunes humorales y las mediadas por células, incluyendo la producción de IgA y las funciones efectoras de las células T citotóxicas en las mucosas (10). La estimulación de respuestas locales y sistémicas específicas de la toxina, así como de respuestas a inmunógenos coadministrados, distingue estas moléculas de la mayoría de las proteínas solubles, que son poco inmunogénicas cuando se administran por vía mucosa (10, 11). En cualquiera caso, la toxicidad de estas moléculas imposibilita su aplicación clínica.

Se ha investigado sobre ciertas lectinas vegetales como agentes para la dirección específica de moléculas a un epitelio mucoso. Las lectinas vegetales son proteínas que contienen al menos un dominio no catalítico que se une específica y reversiblemente a un monosacárido u oligosacárido (13). Por ejemplo, Giannasca *et al.* (14) revela que la inmunización intranasal con un conjugado de lectina-inmunógeno estimuló la inducción de anticuerpos IgG específicos, mientras que el inmunógeno solo o mezclado con lectina no lo hizo. La patente estadounidense n.º 4.470.967 revela que un complejo de un inmunógeno de glucoproteína con una lectina puede actuar como adyuvante para aumentar la respuesta inmune contra el inmunógeno. De manera similar, el documento WO 86/06635 revela un complejo de inmunógeno-lectina modificado químicamente que se puede usar para provocar una respuesta inmune en vertebrados, incluyendo mamíferos. En cada uno de estos casos, sin embargo, la lectina fue acoplada físicamente al inmunógeno. Esto requiere al menos una etapa de preparación extra y, en realidad, puede modificar un epítipo del inmunógeno contra el que se desee obtener la respuesta inmune, tal como un epítipo contra el que se pudiera dirigir una respuesta inmune neutralizante.

El documento US 4414201 revela el uso de abrina, una lectina aislada de las semillas de Jequirití, para la fabricación de un medicamento destinado a producir una respuesta inmune hacia un inmunógeno en un mamífero.

El documento US EP0156633 revela el uso de abrina y de ricina, una lectina aislada de la semilla de la planta del aceite de ricino, para la fabricación de un medicamento destinado a producir una respuesta inmune contra un inmunógeno en un mamífero.

Stein *et al.* (*Anticancer drugs*, 1997, 8:557–559) describe el estudio relativo a la inducción de anticuerpos contra la lectina de muérdago en relación con diferentes extractos de muérdago.

O'Hagan *et al.* (*Vaccine*, 1999, 17:2229–2236) describe un estudio que muestra que la inmunización intranasal con gD2 recombinante reduce la gravedad y la mortalidad de enfermedades tras un desafío genital con el virus *Herpes simplex*.

de tipo 2 en cerdos de guinea.

Así pues, existe la necesidad en la técnica de procedimientos sencillos, eficaces y no tóxicos para aumentar las respuestas inmunes en un mamífero, particularmente, tras una administración por vía mucosa, que no impliquen la necesidad de formar un complejo con el inmunógeno y otra molécula ni de enmascarar o alterar potencialmente epítomos deseables.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona un procedimiento para aumentar una respuesta inmune en un mamífero mediante la administración a un mamífero de una mezcla que comprende un inmunógeno y una lectina vegetal. De ese modo, el mamífero produce una respuesta inmune mayor que la respuesta inmune producida en ausencia de la lectina vegetal.

La invención proporciona, por tanto, un procedimiento sencillo y eficaz para aumentar una respuesta inmune en un mamífero.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Gráfico de barras que muestra los niveles totales de IgA (ng/ml) medidos en lavados nasotraqueales de ratones tras cuatro dosis intranasales de inmunógeno.

FIG. 2A–D. Gráficas que muestran el efecto adyuvante de las lectinas vegetales. Títulos de anticuerpos IgG en suero específicos de OVA de ratones inmunizados intranasalmente. FIG. 2A: títulos de IgG en suero tras una dosis (día 13). FIG. 2B: títulos de IgG en suero tras dos dosis (día 27). FIG. 2C: títulos de IgG en suero tras tres dosis (día 41). FIG. 2D: títulos de IgG en suero tras la dosis final (día 56).

FIG. 3. Gráfica que muestra los títulos de anticuerpos IgG1 en suero específicos de OVA medidos en ratones inmunizados intranasalmente.

FIG. 4A–D. Gráficas que muestran los títulos de anticuerpos IgA específicos de OVA medidos en secreciones de ratones inmunizados intranasalmente. FIG. 4A: saliva; FIG. 4B: lavado vaginal; FIG. 4C: lavado nasotraqueal; FIG. 4D: lavado intestinal.

FIG. 5A–F. Títulos de anticuerpos IgG en suero específicos de lectinas vegetales y CT medidos en ratones inmunizados intranasalmente. FIG. 5A: CT; FIG. 5B: LEA; FIG. 5D: PHA; FIG. 5E: WGA; FIG. 5F: UEA–I.

FIG. 6A–D. Gráficas que muestran los títulos de anticuerpos IgG en suero específicos de gD2 de ratones inmunizados intranasalmente. FIG. 6A: día 14; FIG. 6B, día 28; FIG. 6C: día 41; FIG. 6D: día 55.

FIG. 7A–D. Gráficas que muestran los títulos de anticuerpos de las subclases de IgG en suero específicas de gD2. FIG. 7A: IgG1; FIG. 7B: IgG2a; FIG. 7C: IgG2b; FIG. 7D: IgG3.

FIG. 8A–D. Gráficas que muestran los títulos de anticuerpos IgA específicos de gD2 medidos en secreciones. FIG. 8A: saliva; FIG. 8B: lavado vaginal; FIG. 8C: lavado nasotraqueal; FIG. 8D: lavado intestinal.

FIG. 9. Títulos de las subclases de IgG y totales de IgG en suero específicos de gD2 de ratones inmunizados intranasalmente los días 1, 21 y 42 bien sólo con gD5 (5 µg) o con gD2 (5 µg) junto con 1 µg de CT, ML–I, nigrina B, nigrina B básica, ebulina r1, SNA II o SELfd. FIG. 9A: IgG; FIG. 9B: IgG1; FIG. 9C: IgG2a; FIG. 9D: IgG2b.

FIG. 10. Títulos de anticuerpos IgA específicos de gD2 de secreciones de ratones inmunizados intranasalmente los días 1, 21 y 42 bien sólo con gD2 (5 µg) o con gD2 (5 µg) junto con 1 µg de CT, ML–I, nigrina B, nigrina B básica, ebulina r1, SNA II o SELfd. FIG. 10A: saliva; FIG. 10B: lavado vaginal; FIG. 10C: lavado nasotraqueal; FIG. 10D: lavado del aparato digestivo.

FIG. 11. Títulos de anticuerpos IgA e IgG en suero específicos de gD2 medidos en ratones inmunizados intranasalmente los días 1, 21 y 42 bien sólo con gD2 (5 µg) o con gD2 (5 µg) junto con 1 µg de CT, ML–I o UEA–1. FIG. 11A: IgA en suero; FIG. 11B: IgG en suero.

FIG. 12. Títulos de anticuerpos de las subclases de IgG específicas de gD2 medidos en ratones inmunizados intranasalmente los días 1, 21 y 42 bien sólo con gD2 (5 µg) o gD2 (5 µg) junto con 1 µg de CT, ML–I o UEA–1. FIG. 12A: IgG1; FIG. 12B: IgG2a; FIG. 12C: IgG2b.

FIG. 13. Títulos de anticuerpos IgA específicos de gD2 medidos en secreciones de ratones inmunizados intranasalmente los días 1, 21 y 42 bien sólo con gD2 (5 µg) o con gD2 (5 µg) junto con 1 µg de CT, ML–I o UEA–1. FIG. 13A: saliva; FIG. 13B: lavado vaginal; FIG. 13C: lavado del aparato digestivo; FIG. 13D: lavado nasotraqueal.

FIG. 14. Concentraciones medias de la producción de IL–5, IL–4 e IFN y recuentos por minuto para el análisis de

proliferación de células T. FIG. 14A: producción de IL-5 en células de bazo; FIG. 14C: producción de IL-4 en células de bazo; FIG. 14E: producción de IFN en células de bazo; FIG. 14B: producción de IL-5 en nódulos linfáticos cervicales; FIG. 14D: producción de IL-4 en nódulos linfáticos cervicales; FIG. 14F: producción de IFN en nódulos linfáticos cervicales; FIG. 14G: proliferación de células T por células de bazo. Las respuestas se midieron en la semana 8 tras tres inmunizaciones (días 0, 21, 42) con gD2, MLI o UEA-1, o con gD2 + MLI, UEA-1 o LTK63. Las células de bazo y las células de nódulos linfáticos cervicales fueron aisladas y estimuladas *in vitro* con gD2 (0 µg/ml, 1 µg/ml o 5 µg/ml) o con gD2 acoplado a perlas de látex diluidas 1:1000 o 1:5000 o con PMA/cd3.

FIG. 15. Títulos de anticuerpos IgG en suero específicos de OVA de ratones inmunizados mediante alimentación por sonda los días 1, 14, 28 y 49 bien sólo con OVA (5 mg) o con OVA (5 mg) junto con CT (10 µg), ML-I (10 µg), ML-II (10 µg) o ML-III (10 µg). FIG. 15A: Títulos de IgG en suero tras una dosis (día 13); FIG. 15B: títulos de IgG en suero tras dos dosis (día 27); FIG. 15C: títulos de IgG en suero tras tres dosis (día 48); FIG. 15D: títulos de IgG en suero tras la dosis final (día 62).

FIG. 16. Títulos de anticuerpos IgA y de las subclases de IgG en suero específicos de OVA medidos en ratones inmunizados mediante alimentación por sonda los días 1, 14, 35 y 49 bien sólo con OVA (5 mg) o con OVA (5 mg) junto con CT (10 µg), ML-I (10 µg), ML-II (10 µg) o ML-III (10 µg). FIG. 16A: IgG1; FIG. 16B: IgG2a; FIG. 16C: IgG2b; FIG. 16D: IgG3.

FIG. 17. Títulos de anticuerpos IgA específicos de OVA medidos en secreciones de ratones inmunizados mediante alimentación por sonda los días 1, 14, 35 y 49 bien sólo con OVA (5 mg) o con OVA (5 mg) junto con CT (10 µg), ML-I (10 µg), ML-II (10 µg) o ML-III (10 µg). FIG. 17A: saliva; FIG. 17B: lavado vaginal; FIG. 17C: lavado nasotraqueal. FIG. 17D: lavado intestinal.

FIG. 18. Transferencia Western que muestra la WGA en homogenados de aparato digestivo recogidos de ratones 6 horas después de la alimentación por sonda con una sola dosis de 1 mg de WGA.

FIG. 19. Transferencias Western que muestran tejidos estomacales homogenizados y lavados de intestino delgado recogidos 1 hora después de la alimentación por sonda con una sola dosis de 1 mg de PHA.

FIG. 20. Transferencia Western que muestra la UEA1 de tejidos renales de ratón recogidos 24 horas después de la alimentación por sonda con una sola dosis de 1 mg de UEA 1.

FIG. 21. Transferencia Western que muestra la WGA de tejidos de hígado de ratón recogidos 24 horas después de la alimentación por sonda con una sola dosis de 1 mg de WGA.

FIG. 22. Transferencia Western que muestra la susceptibilidad de UEA1 nativo y extraído de riñón a la digestión por tripsina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Es un aspecto de la presente invención que ciertas lectinas vegetales actúan como adyuvantes de mucosas para aumentar las respuestas inmunes, incluyendo un aumento del título de anticuerpos, contra una variedad de inmunógenos, permitiendo así la preparación de composiciones inmunogénicas o de vacunas sencillas, no tóxicas y rentables. Las composiciones inmunogénicas o de vacunas de la invención son mezclas que comprenden una lectina vegetal y un inmunógeno. Tales mezclas son especialmente adecuadas para la administración por vía mucosa a mamíferos, incluyendo seres humanos, siendo, por tanto, útiles a efectos médicos tanto para animales como para seres humanos.

Las mezclas usadas en la invención comprenden una lectina vegetal y un inmunógeno. El inmunógeno y la lectina no están acoplados químicamente, sino que simplemente están mezclados en un medio líquido apropiado, tal como solución salina tamponada con fosfato u otra solución salina solución isotónica. Opcionalmente, una mezcla puede comprender agentes estabilizantes, entre los que se incluyen agentes antimicrobianos, conservantes y similares. Las proporciones de inmunógeno y de lectina de la mezcla pueden ser variadas, tal como de al menos aproximadamente 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 ó 10:1, en función de la combinación del inmunógeno y la lectina seleccionada en particular. Si se desea, se pueden incluir en la mezcla al menos 2, 3, 4 o más inmunógenos y/o lectinas diferentes en proporciones variables.

Las lectinas útiles en la invención incluyen lectinas vegetales, tales como la lectina I de muérdago (ML-I), lectina II de muérdago (ML-II), lectinas III de muérdago (ML-III), aglutinina de germen de trigo (WGA) y *Ulex europaeus* (UEA-I). Otras lectinas que pueden ser útiles incluyen la lectina de lenteja, la lectina de haba blanca (concanavalina A), así como las lectinas de haba enana, habón, árbol pata de camello, semilla de ricino, haba, veza bellosa, haba común, wisteria japonesa, jequirití, laburnum escocés, judía blanca, loto, frijol mungo, naranja de Osge, sófora, guisante, patata, habichuela roja, árbol de guisante siberiano, evónimo, guisante de olor, tomate y loto cultivado.

Las proteínas desactivadoras de los ribosomas (RIP) de tipo 2, tales como nigrina b, nibrina b básica, ebulina 1, ebulina r, ebulina f, nigrina f, SNA1, SNA1, SNAV, SNAVI, SNLRP1 de *Sambucus nigra*, SNLRP2, ricino, lectina de ricino, RIP *Polygonatum*, Sieboldina-6, abrina, abrina 11, modeccina, volkensina, SSA, cinamonina, porrectina, gelorina, RIP de *Evanthis hyemalis*, aglutinina de lirio, ML-I, ML-II y ML-III, son adyuvantes especialmente útiles. Tales lectinas contienen una subunidad A de N-glucosidasa responsable de la actividad desactivadora de los ribosomas y una subunidad B de unión a hidratos de carbono específica de la galactosa (29). ML-I, ML-II y ML-III son potentes adyuvantes de mucosas que pueden estimular altos títulos de anticuerpos en suero y en secreciones de mucosas. Las RIP de tipo 2 que no muestran toxicidad *in vivo*, tales como la ebulina-I (32), la nibrina b (33) y la nigrina b básica (34) son particularmente útiles. Alternativamente, es posible "desintoxicar" genéticamente las lectinas, como por ejemplo mediante la modificación de uno o más aminoácidos mediante mutagénesis dirigida, de modo que las lectinas conservan sus propiedades adyuvantes pero no son tóxicas para el receptor mamífero (véase 35-39; EP 0880361; EP 620850; EP 95/903889.4).

Es preferible que las lectinas de una mezcla estén en forma hidrosoluble y sin unir. Las lectinas adecuadas para su uso en las mezclas de la invención pueden ser adquiridas comercialmente, tal como en Sigma. Alternativamente, es posible purificar las lectinas usando protocolos de purificación de proteínas ampliamente conocidos en la técnica que incluyen la cromatografía por exclusión de tamaños, el fraccionamiento en sulfato de amonio, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de afinidad, la cristalización, el electroenfoco y la electroforesis sobre gel preparativo.

Los inmunógenos contra los que se puede aumentar una respuesta celular y/o humoral usando un adyuvante de lectina vegetal incluyen proteínas de agentes infecciosos, tales como virus, bacterias, micoplasmas, priones y levadura; así como hormonas; alérgenos, tales como el polen de césped, de malas hierbas, de árboles y de plantas; epitelios de animales, tales como de gatos, perros, ratas y cerdos; polvo doméstico y paja de trigo. Los procedimientos para obtener tales inmunógenos son ampliamente conocidos en la técnica. Es necesario que los inmunógenos no puedan elevar las respuestas celulares y/o humorales en ausencia de la lectina vegetal.

Las mezclas usadas en la invención se pueden administrar a un receptor mamífero en una variedad de formulaciones. Por ejemplo, se pueden introducir las mezclas en micropartículas o ser adsorbidas por la superficie de micropartículas, tales como poli(lactida-co-glucólidos) (PLG) (35; Patentes estadounidenses n.º 5.804.212; 6.876.761 y 5.603.960; PCT/US99/17308). También se pueden administrar las mezclas en combinación con polímeros bioadhesivos, tales como aquellos descritos en PCT/US99/12105, PCT/US99/11906, y las patentes estadounidenses n.º 5.955.097; 5.800.832; 5.744.155 y 5.814.329. Alternativamente, se pueden usar formulaciones entéricas de mezclas para una administración oral (véase la patente estadounidense n.º 5.968.554).

Las mezclas se pueden administrar a cualquier mamífero en el que se desee aumentar una respuesta inmune, incluyendo pero no limitándose a, ratas, gatos, perros, conejos, caballos, vacas, ratones, cerdos de guinea, chimpancés, babuinos y seres humanos.

Las mezclas usadas en la invención se administran por vía mucosa. Particularmente, se prefiere la administración intranasal por uno o ambos orificios nasales. Las dosis se pueden administrar, por ejemplo, en una o más gotas, a usando un pulverizado, tal como un aerosol o un pulverizado de no aerosol. Si se desea, se pueden usar múltiples administraciones de una mezcla para aumentar los títulos de los anticuerpos contra un determinado inmunógeno. Los intervalos entre múltiples administraciones pueden ser de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días, o de al menos 2, 3, 4 o más semanas, en función del inmunógeno y/o la lectina en particular de la mezcla. El volumen de la mezcla que será administrado variará según el modo de administración y el tamaño del mamífero. Los volúmenes más comunes para una administración intranasal varían desde al menos 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 200 ó 250 µl hasta al menos 500 µl o más por dosis intranasal.

La concentración del inmunógeno de una mezcla también variará según el inmunógeno en particular y la vía de administración seleccionada. Para una administración intranasal, por ejemplo, la concentración de un inmunógeno en una mezcla varía de al menos 0,033; 0,67; 0,1; 0,2; 0,33; 0,5; 0,67; 0,75; 1; 2; 2,5; 5; 7,1; 10; 12,5; 15; 17,5; 20 ó 25 µg/µl.

Lo preferible es que la administración de las mezclas de la invención aumente la producción de anticuerpos, así como las respuestas de las células T, incluyendo la producción de citocinas, la muerte de células diana, la activación de macrófagos, la activación de células B y la producción de linfocinas. Lo preferible es que las mezclas usadas en la invención aumenten la respuesta de las células T o el título de un anticuerpo en un porcentaje del al menos 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75 ó 100% o más en comparación con tales respuestas al inmunógeno solo, en ausencia de la lectina vegetal.

Los procedimientos para medir las respuestas de las células T son ampliamente conocidos en la técnica. (Véase Janeway *et al.*, eds., 1997, "IMMUNOBIOLOGY: THE IMMUNE SYSTEM IN HEALTH AND DISEASE", III ed., en las páginas 2:31-2-33; Abbas *et al.*, 1997, "CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY", III ed., en las páginas 250-277 y 290-293).

El título de los anticuerpos se mide preferiblemente mediante ELISA según lo descrito en el Ejemplo 1 que se presenta a continuación. IgG, incluyendo los subtipos de IgG IgG1, IgG2a, IgG2b y IgG3, así como los anticuerpos IgA dirigidos contra el inmunógeno se pueden medir en suero, saliva y secreciones de mucosas, incluyendo lavados vaginales, nasales y del aparato digestivo (véase el Ejemplo 1).

5 **EJEMPLO 1**

Materiales y procedimientos

Inmunógenos y lectinas. La toxina del cólera (CT), la ovalbúmina (OVA, tipo V, huevo de gallina) y la WGA fueron adquiridas en Sigma (Poole, RU). La PHA de habichuela se preparó según lo descrito anteriormente (15). La UEA-I y LEA se obtuvieron en Vector Laboratories. La ML-I fue aislada según lo descrito anteriormente (16).

- 10 *Animales.* Se dejó que ratones Balb/c hembra de ocho semanas de vida (Harlan Olac, Bicester, RU) tuvieran libre acceso a alimento comercial para ganado (Labsure, Manea, RU) y agua.

- 15 *Programa de inmunización por vía mucosa.* Se hicieron sangrías a grupos de ratones ($n = 10$) una semana antes de la primera inmunización. En los días 1, 14, 28 y 42, los ratones fueron inmunizados intranasalmente con PBS, sólo OVA (10 μg) u OVA (10 μg) mezclada con CT (1 μg), ML-I (1 μg), LEA (10 μg), PHA (10 μg), WGA (10 μg) o UEA-I (10 μg). En otros ejemplos, los ratones fueron inmunizados intranasalmente con 5 μg de glucoproteína D2 (gD2) del virus *Herpes simplex* de tipo 2 los días 1, 14, 28 y 49 sola o en una mezcla con 1 μg bien de CT, ML-I, ML-II o ML-III. Se administró a los ratones una dosis de 30 μl de cada preparación (15 μl por cada orificio nasal) con pipetas de punta fina.

- 20 *Recogida de sangre y secreciones de mucosas.* Se recogieron muestras sanguíneas un día antes de cada inmunización haciendo una sangría en la vena de la cola tras una incubación de 10 minutos a 37°C. Dos semanas después de la inmunización final, los animales fueron anestesiados terminalmente (hipnorina más diazepam) para hacer posible la recogida de secreciones salivales y vaginales. Entonces los ratones fueron sacrificados mediante una sobredosis de anestesia seguida de una exsanguinación. La sangre se recogió de inmediato y se centrifugó, y el suero se almacenó a -20°C.

- 25 Se usaron mechas de celulosa absorbentes (Whatman International, RU) para la recogida de la saliva y el fluido vaginal según lo descrito anteriormente (17). Se usó líquido de lavado (PBS 0,01M enfriado en hielo, EDTA 50mM, PMSF 5mM, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina) para la elución del anticuerpo de las mechas y para los lavados nasales e intestinales. La saliva se recogió mediante la inserción de una punta de la mecha en la boca durante 2 minutos (17). Se extrajo el anticuerpo de las mechas en 400 μl de líquido de lavado de mucosas. El fluido vaginal se recogió mediante la purga y la aspiración repetidas de 50 μl de líquido de lavado y la inserción de una mecha durante 2 minutos. Se extrajo el anticuerpo de las mechas en 400 μl de líquido de lavado. Los lavados nasotraqueales se recogieron de los animales decapitados mediante el retropurgado con 0,5 ml de líquido de lavado de mucosas procedente de la traquea. Los lavados intestinales se obtuvieron mediante el purgado del intestino delgado con 10 ml de líquido de lavado enfriado con hielo. Todas las secreciones fueron almacenadas a -20°C hasta que fueron requeridas para el análisis.

- 35 *Detección de anticuerpos específicos mediante ELISA.* Los ELISA se configuraron para permitir la medición de la IgG específica, la IgA y las subclases de IgG contra OVA, CT y las lectinas vegetales. Se valoraron los sueros (a partir de 1:100) y las secreciones de las mucosas (a partir de 1:2) en el tampón de dilución adecuado. Se revistieron las placas de microvaloración (Immunolon 4, Dynatech) con 75 μl de inmunógeno por pocillo (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para las CT/lectinas, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para medir las respuestas frente a OVA y 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para medir las respuestas frente a gD2) en tampón de carbonato-bicarbonato, pH 9,6, y se incubaron a 4°C durante una noche. Tras lavar, se bloquearon las placas con gelatina al 2%/tampón de dilución y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se lavaron las placas y se añadieron las muestras, diluidas en serie, y se incubaron a 37°C durante 1 hora.

- 45 Se añadió antisuero biotinilado en tampón de dilución y se incubó a 37°C durante 1 hora. Tras más lavados, se añadió peroxidasa ExtrAvidin® (Sigma) diluida 1:750 en tampón de dilución y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se lavaron las placas y se añadieron 50 μl /pocillo de solución reveladora (sustrato de peroxidasa para micropocillos TMB (1–C), Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Se incubaron las placas en la oscuridad agitando a 37°C durante 30 minutos. Se detuvo la reacción mediante la adición de H₂SO₄ 1M y se leyó la absorbancia a 450 nm.

- 50 Los tampones de dilución para los ELISA fueron los siguientes: CT (PBS + Tween al 0,1% (PBST)), OVA (PBST), WGA (N-acetilglucosamina 100mM/PBST), PHA (fetuína al 0,1%/PBST), UEA-I (L-fucosa 30mM/PBST), LEA (hidrolizado de chitina (1:200) (Vector)/PBST), ML-I (D-galactosa 100mM/PBST). Las diluciones de trabajo de los antisueros de captura biotinilados anti-IgG (1:8000) y anti-IgA (1:2600) (Sigma) se determinaron tras análisis preliminares con sueros preinmunes y positivos mezclados. Las diluciones de trabajo de los antisueros de las subclases de IgG (Serotect) fueron según lo recomendado por los fabricantes (IgG1 (1:4000), IgG2a (1: 4000), IgG2b (1:2000), IgG3 (1:2000)). Los títulos finales se determinaron como la dilución de una muestra de suero o de mucosa con un valor de DO de 0,1 unidades más que la media de las muestras control en la misma dilución.

5 La IgA total se cuantificó como la IgA específica con las siguientes modificaciones: se revistieron las placas con IgA de cabra anti-ratón (1:8000; específica de la cadena α , Sigma), se usó PBST como diluyente y gelatina al 2% en PBST como solución de bloqueo. Los niveles de IgA totales se calcularon a partir de la región lineal de la curva estándar de IgA (IgA kappa, Sigma). Los títulos totales finales de IgA se determinaron como la dilución de una muestra con un valor de DO de 0,1 unidades más que el tampón solo.

10 *Estadísticas* Los datos se expresan como la media $\pm$ la desviación estándar. Se usó una prueba de la t bilateral para datos independientes para analizar la significación entre los grupos. En los casos en los que las desviaciones estándar resultaron ser significativamente diferentes entre los grupos, se usó una prueba no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis con la posterior prueba de comparaciones múltiples de Dunn) para medir la significación. También se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con la posterior prueba de comparaciones múltiples de Dunn para medir la significación de los datos de IgA total.

EJEMPLO 2

Efecto de la inmunización sobre los niveles totales de IgA de los sueros y las secreciones.

15 En los días 1, 14, 28 y 42, los ratones fueron inmunizados por vía intranasal bien con PBS, sólo con OVA (10 μ g) o con OVA (10 μ g) junto con CT (1 μ g), ML-I (1 μ g), LEA (10 μ g), PHA (10 μ g), WGA (10 μ g) o UEA-I (10 μ g). Las muestras se recogieron dos semanas después de la inmunización final. En la FIG. 1, se muestran los resultados. Los datos representan la media $\pm$ DE.

20 Tras cuatro inmunizaciones intranasales con CT + OVA, se produjo un aumento significativo de la concentración de IgA total en los lavados nasotraqueales ($p < 0,01$) en comparación con el resto de los grupos. La administración conjunta de CT y OVA no produjo un aumento significativo de la concentración de IgA total en los sueros ni en otras muestras de secreciones de las mucosas. No se produjo un efecto significativo de inmunización con ninguna de las lectinas vegetales sobre los niveles totales de IgA en ninguna de las secreciones ni en el suero.

EJEMPLO 3

Efecto adyuvante de las lectinas vegetales sobre las respuestas de los anticuerpos específicos de OVA en suero.

25 En los días 1, 14, 28 y 42, los ratones fueron inmunizados intranasalmente bien sólo con OVA (10 μ g) o con OVA (10 μ g) junto con CT (1 μ g), ML-I (1 μ g), LEA (10 μ g), PHA (10 μ g), WGA (10 μ g) o UEA-I (10 μ g). Los sueros se recogieron 1 día antes de cada inmunización y al finalizar el estudio. Las FIG. 2A-D muestran los resultados de este experimento. Los puntos se refieren a datos individuales y el símbolo (-) representa el título medio.

30 Dos semanas después de una sola inmunización, se detectó IgG específica de OVA en el suero de 5/10 ratones inmunizados con CT + OVA y de 1/10 ratones inmunizados con ML-I + OVA, pero no se detectó IgG específica de OVA en el resto de los grupos. Tras una segunda dosis, se midieron respuestas más altas con anticuerpo detectable en todos los ratones inmunizados con CT + OVA (título medio 40.321) y en 9/10 ratones inmunizados con ML-I + OVA (título medio 11.090). Del resto de los grupos, la IgG específica sólo se detectó en los ratones inmunizados con UEA-I + OVA (título medio 91).

35 Tras cuatro dosis, los títulos medios de IgG más elevados se produjeron en los ratones inmunizados con CT + OVA, siendo aproximadamente 286 veces superiores que los de los ratones que sólo habían recibido OVA. El título medio del grupo inmunizado con ML-1 + OVA fue aproximadamente 118 veces superior que el de los ratones que sólo habían recibido OVA. Los títulos de los ratones inmunizados con PHA + OVA fueron similares a los de los ratones que sólo recibieron OVA. La administración de LEA + OVA provocó un pequeño aumento del título medio en comparación con la administración de OVA sola (5 veces mayor). La administración de WGA y UEA-I con OVA condujo respectivamente a aumentos 41 y 51 veces mayores en los títulos medios de IgG anti-OVA en suero en comparación con la OVA sola.

40 Al contrario que en los grupos que recibieron CT + OVA y ML-1 + OVA, las respuestas de los grupos inmunizados con WGA o UEA-I + OVA fueron muy variables. Como resultado de ello, tras la dosis final, solo los grupos de CT + OVA y ML-I + OVA (sin una diferencia significativa entre los grupos) resultaron tener títulos medios de IgG específica de OVA significativamente superiores ($p < 0,001$) que el grupo que sólo recibió OVA. Los títulos de estos grupos también fueron significativamente superiores que en el grupo de PHA + OVA ($p < 0,001$).

45 A diferencia de los niveles altos de IgG específica, se detectaron títulos muy bajos de IgA específica de OVA en los sueros. De hecho, tras la dosis final, sólo se detectaron niveles significativos de IgA específica de OVA en suero en los ratones inmunizados con CT + OVA (título medio, 220) y ML-I + OVA (título medio, 80).

EJEMPLO 4*Patrones de las subclases de IgG específicas de OVA*

En los días 1, 14, 28 y 42, los ratones fueron inmunizados intranasalmente sólo con OVA (10 µg) o con OVA (10 µg) junto con CT (1 µg), LEA (10 µg), PHA (10 µg), WGA (10 µg) o UEA-I (10 µg). Las muestras se recogieron dos semanas después de la inmunización final. FIG. La FIG. 3 muestra los resultados de este experimento. Los puntos se refieren a datos individuales y el símbolo (-) representa el título medio.

El análisis del perfil de las subclases de los anticuerpos IgG específicas de OVA indicó una respuesta muy sesgada. Los títulos de IgG1 fueron similares a los títulos de IgG específica de OVA en la mayoría de los grupos. En los ratones inmunizados con CT + OVA y ML-I + OVA respectivamente, los títulos medios fueron aproximadamente 450 veces y 255 veces mayores que en los ratones inmunizados sólo con OVA. Los títulos del grupo de CT + OVA fueron significativamente mayores que los del resto de los grupos a excepción del de ML-I + OVA ($p < 0,05$). Los títulos del grupo de ML-I + OVA fueron significativamente mayores que los de los grupos que sólo recibieron OVA o PHA + OVA ($p < 001$).

La IgG2a específica de OVA se detectó en 8/10 y 2/10 ratones inmunizados con CT + OVA (título medio 561) y ML-I + OVA (título medio 331), respectivamente. No se detectó IgG2a específica en el resto de los grupos. La IgG2b específica sólo se detectó en 2/10 ratones inmunizados con CT + OVA y en ninguno del resto de los grupos. No se detectó IgG3 específica. Estos datos son sorprendentemente diferentes a las respuestas hacia isotipos de IgG específicos de CT en estos ratones en los que se detectaron títulos relativamente altos de IgG2a específica y niveles significativos de IgG2b e IgG3 (Tabla 1).

EJEMPLO 5*Efecto adyuvante de las lectinas vegetales sobre las respuestas de IgA específica de OVA en mucosas.*

En los días 1, 14, 28 y 42, los ratones fueron inmunizados intranasalmente sólo con OVA (10 µg) o con OVA (10 µg) junto con CT (1 µg), ML-I (1 µg), LEA (10 µg), PHA (10 µg), WGA (10 µg) o UEA-I (10 µg). Los títulos se midieron dos semanas después de la inmunización final. En las FIG. 4A-D, se muestran los resultados. Los puntos se refieren a datos individuales y el símbolo (-) representa el título medio.

Se detectó IgA específica en todas las zonas de mucosas muestreadas de los ratones inmunizados con CT + OVA y ML-I + OVA. No se hubo una diferencia significativa entre los dos grupos. No se detectó IgA específica de OVA en la saliva de los ratones inmunizados sólo con OVA, LEA + OVA o PHA + OVA, pero sí se detectó en 2/10 y 4/10 ratones inmunizados con WGA + OVA y UEA-I + OVA, respectivamente. Por el contrario, se midió IgA específica en la saliva de 9/10 y 10/10 ratones inmunizados con CT + OVA y en ML-I + OVA, respectivamente, con un título medio dos veces superior en el grupo de CT + OVA.

En los lavados vaginales, se detectó IgA específica de OVA en 9/10 y 7/10 ratones inmunizados con CT + OVA y ML-I + OVA, respectivamente. El título medio fue cuatro veces superior en el grupo de CT + OVA, pero esto se debió en buena a un alto respondedor. No se detectó IgA específica de OVA en los lavados vaginales de los ratones inmunizados con PHA + OVA y sí se detectó en 1/10 ratones inmunizados bien sólo con OVA, con LEA + OVA o con WGA + OVA, y en 3/10 ratones inmunizados con UEA-I + OVA.

Se detectaron títulos altos de IgA específica de OVA en los lavados nasotraqueales de todos los ratones inmunizados con CT + OVA o ML-I + OVA, con un título aproximadamente cinco veces mayor en el grupo de CT + OVA. Los títulos de IgA específica de OVA de los lavados nasotraqueales fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) en los ratones inmunizados con CT + OVA que en el resto de los grupos, a excepción del grupo de ML-I + OVA.

Sorprendentemente, los títulos de IgA específica de OVA de los lavados nasotraqueales de estos grupos fueron comparables a los títulos de IgA de los sueros. Los títulos totales de IgA de los sueros de los ratones inmunizados con CT + OVA y ML-I + OVA fueron 33 veces y 73 veces mayores que los de los lavados nasotraqueales, respectivamente. Se detectó IgA específica en los lavados nasotraqueales de 1/10 ratones inmunizados sólo con OVA, pero no se detectó en ninguno de los ratones inmunizados con PHA + OVA. Se midió IgA específica de OVA en los lavados nasotraqueales de 7/10 ratones inmunizados con WGA + OVA y en 5/10 ratones inmunizados con UEA-I + OVA o LEA + OVA, respectivamente.

Se detectó IgA específica de OVA en los lavados del aparato digestivo de todos los ratones inmunizados con CT + OVA o ML-I + OVA, con un título aproximadamente cuatro veces mayor en el grupo de CT + OVA. Los títulos de estos grupos no fueron significativamente diferentes entre sí, pero fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) a los del resto de los grupos. Entre el resto de los grupos, la IgA específica de OVA de los lavados del aparato digestivo sólo se detectó esporádicamente en un título máximo de 1:2.

EJEMPLO 6*Respuestas específicas de la CT/lectina vegetal*

En los días 1, 14, 28 y 42, los ratones fueron inmunizados intranasalmente con OVA (10 µg) junto con CT (1 µg), ML-I (1 µg), LEA (10 µg), PHA (10 µg), WGA (10 µg) o UEA-I (10 µg). En las FIG. 5A-F, se muestran los resultados. Los datos se representan como la media $\pm$ DE. Los datos son títulos de IgG específica en suero medidos dos semanas después de la dosis final de inmunógeno.

La IgG específica de CT en suero se detectó en todos los animales tras una sola dosis de CT + OVA, y los títulos aumentaron con cada dosis posterior. Tras cuatro dosis, se detectaron anticuerpos específicos de las cuatro subclases de IgG en los sueros (Tabla 1). Los títulos más altos fueron de IgG1, aunque también se detectaron IgG2a, IgG2b y IgG3 específicas de CT. Tras la dosis final, se detectó IgA específica de CT en los sueros de todos los ratones, con un título medio de 4.481.

También se detectó IgA específica en la saliva, el lavado vaginal, el lavado nasotraqueal y el lavado del aparato digestivo de todos los animales. Los títulos de IgA salival concordaron relativamente entre los animales (un título medio aproximadamente 10 veces menor que en suero). Los títulos totales de IgA en saliva de estos ratones fueron 1.340 veces menores que en suero. Los títulos de IgA vaginal fueron muy variables, debiéndose al aumento del título medio a un solo respondedor alto. Se midieron títulos altos de la IgA específica de CT en los lavados nasotraqueales de todos los animales con un título medio comparable al título de IgA en suero. También se detectó IgA específica en los lavados intestinales de todos los ratones, pero a un título medio menor que en el resto de zonas de mucosa muestreadas.

La administración intranasal de una sola dosis de ML-I + OVA estimuló la producción de IgG específica de ML-I en 3/10 ratones. Tras la segunda dosis y dosis posteriores, se detectaron títulos altos de IgG específica en todos los ratones (FIG. 5). Con el análisis de las subclases de IgG específicas de ML-I en suero se encontraron altos títulos de IgG1 específica de ML-I (Tabla 1). También se detectaron IgG2a e IgG2b específicas de ML-I, pero no se detectó IgG3 específica. Se detectó IgA específica de ML-I en todos los sueros y todas las zonas de mucosa muestreadas de todos los ratones tras cuatro dosis. Los títulos en saliva coincidieron en todos los animales, aunque un solo respondedor muy alto aumentó el título medio en los lavados vaginales. Se midieron títulos altos de la IgA específica de ML-I en los lavados nasotraqueales de todos los animales. Como con la CT, el título medio específico de ML-I de los lavados nasotraqueales fue comparable al título de IgA en suero (aproximadamente dos veces inferior), lo que fue notable, pues los títulos totales de IgA en los lavados nasotraqueales fueron 73 veces inferiores a los de los sueros de estos ratones. También se detectó IgA específica en los lavados del aparato digestivo de todos los animales.

En los ratones inmunizados con LEA + OVA, se detectó IgG específica de LEA en suero en 9/10 ratones tras una sola dosis. El título aumentó tras cada una de las siguientes dosis hasta un nivel relativamente alto tras la inmunización final (FIG. 5). Con el análisis de las subclases de IgG se descubrieron títulos altos de IgG1 específica de LEA y un título medio bajo de IgG2a (Tabla 1). Tras cuatro dosis, se detectó IgA específica en suero en 7/10 ratones, pero a un nivel bajo. También se detectó IgA específica en las cuatro secreciones de mucosa analizadas, aunque en comparación con los datos de los grupos de CT + OVA y ML-I + OVA, los títulos fueron muy variables.

Tras una sola dosis de PHA + OVA, se detectó IgG específica de PHA en suero en 1/10 ratones. Tras las dosis posteriores, el título aumentó y la IgG específica resultó estar presente en 8/10 animales tras la dosis final (FIG. 5). De las subclases de IgG, sólo se detectó IgG1 específica (Tabla 1). Se detectaron títulos bajos de IgA específica en los sueros de todos los animales. No se detectó IgA específica de PHA en la saliva ni en los lavados vaginales, pero sí se detectó en los lavados nasotraqueales de 5/10 ratones y en los lavados del aparato digestivo de 1/10 ratones.

Los títulos más bajos del anticuerpo específico fueron generados contra WGA, incluso tras cuatro dosis de WGA + OVA (FIG. 5). Se detectó IgG1 específica en 2/10 ratones y no se detectó el resto de subclases de IgG (Tabla 1). Se detectó IgA específica en un número de ratones tras cuatro dosis, pero en un título máximo de 1:100. Se midieron títulos bajos de IgA específica en un número pequeño de ratones en saliva, lavados vaginales y lavados nasotraqueales. Estos datos se diferencian de los datos específicos de OVA de este grupo, en el que se detectaron niveles relativamente altos de IgG específica de OVA en los sueros de una serie de ratones.

No se detectó IgG específica de UEA-I en suero tras una sola dosis de UEA-I + OVA, pero sí se detectó tras dosis posteriores y en 8/10 ratones tras la dosis final (FIG. 5). Se detectó IgG1 específica en 9/10 ratones tras la dosis final (Tabla 1), IgG2a específica en 1/10 ratones, y no se detectaron IgG2b ni IgG3. Tras la dosis final, se detectó IgA específica en suero en 3/10 ratones. Se detectaron títulos relativamente bajos de IgA en saliva, lavados vaginales y lavados nasotraqueales.

Los presentes datos indican que el tipo de respuesta provocada contra el adyuvante y el inmunógeno puede diferir. Se detectaron títulos altos de IgG1 específica tanto contra OVA como contra CT, pero aunque se midieron títulos relativamente altos de IgG2a específica de CT, fueron bajos o nulos los de IgG2a específica de OVA. La administración

de ML-I + OVA condujo a resultados similares, aunque los títulos de IgG2a específica de ML-I fueron relativamente bajos. Con el trabajo anterior, se descubrieron títulos más altos de IgG1 específica de OVA que de IgG2a tras la administración de OVA +CT, mientras que se encontraron títulos más altos de IgG2a específica de CT que de IgG1 en los mismos ratones (24). La alimentación de los ratones con CT + hemocianina de lapa californiana (KLH) estimuló una potente respuesta secretora de IgA específica de KLH en los ratones que resultaron ser altos respondedores contra la CT, siendo mucho menor el efecto en los bajos respondedores (29). Así pues, el efecto adyuvante oral de la CT dependió de una potente respuesta inmune contra la propia CT. Sin embargo, tanto WGA como UEA-I aumentaron la respuesta de la IgG en suero contra la OVA (aunque no significativamente) y no fueron muy inmunogénicos. Un estudio reciente descubrió que varias lectinas de la dieta, incluyendo la PHA, podían desencadenar basófilos humanos para liberar IL-4 y IL-13. Por ejemplo, ConA y PHA-E indujeron niveles de IL-4 tan altos como los obtenidos mediante la estimulación con anticuerpos anti-IgE. Las lectinas que estimularon niveles elevados de IL-4 también desencadenaron la liberación de IL-13 e histamina, posiblemente, mediante la inducción de IL-4, que es necesaria para cambiar hacia una respuesta de tipo Th2 (30).

A pesar de la inducción de títulos elevados de IgG en suero contra OVA en los ratones inmunizados con CT o ML-I + OVA, la IgA en suero apenas fue detectable. Con el trabajo anterior no se detectó IgA específica del inmunógeno en suero en los ratones tras dos inmunizaciones intranasales con proteína *zot* de *V. cholerae* o LT + OVA (19). De igual manera, se descubrió que la administración oral de LT + TT estimuló niveles elevados de anticuerpos IgG en suero contra TT, mientras que no se detectó IgA anti-TT en suero (23). Aunque tanto CT como ML-I estimularon eficazmente la IgA anti-OVA en todas las secreciones de mucosas, los niveles más altos se obtuvieron en los lavados nasotraqueales y en la saliva. Debido a que los títulos totales de IgA en suero de los ratones inmunizados con CT +OVA y ML-I + OVA fueron 33 veces y 73 veces mayores que en los lavados nasotraqueales y 1.340 veces y 1.176 veces mayores que en la saliva, respectivamente, los títulos de IgA específica de OVA de estas zonas indican la inducción de respuestas locales. Los títulos de los anticuerpos de los lavados vaginales fueron muy variables, lo que puede ser reflejo de las influencias hormonales (31).

Tabla 1

Antígeno	Título de las subclases de IgG y de IgG en suero					Título de IgA				
	IgG	IgG1	IgG2a	IgG2B	IgG3	Suero	saliva	vagina	nasal	Ap. digestivo
CT	532.481	339.481	83.201	3681	1.201	4.481	409,6	358,8	3.200	211,2
ML-I	337.961	409.601	2.881	901	—	1.841	64	440,3	819,2	33,6
LEA	61.441	78.081	361	11	—	361	11	10,2	49,6	5,2
PHA	8.561	7.161	—	—	—	211	—	—	4,6	0,2
WGA	141	21	—	—	—	51	0,2	0,6	1,4	—
UEA-I	10.881	18.441	11	—	—	31	1,8	1	5	—

EJEMPLO 7

Tres lectinas diferentes de muérdago europeo (Viscum album), ML-I, ML-II y ML-III, aumentan los títulos de los anticuerpos IgG específicos de gD2 en suero tras una administración intranasal.

Se mezcló un microgramo de cada una de estas tres lectinas con 5 µg de glucoproteína D2 (gD2) del virus *Herpes simplex* de tipo 2 y se administraron intranasalmente a los ratones los días 1, 14, 28 y 49 según lo descrito anteriormente. Otros ratones fueron inmunizados intranasalmente con 5 µg de gD2 sola o con 5 µg de gD2 mezclada con 1 µg de CT. Los sueros se recogieron 1 día antes de cada inmunización y al finalizar el estudio. Los títulos de los anticuerpos IgG específicos de gD2 en suero fueron medidos según lo descrito anteriormente.

En las FIG. 6A–D, se muestran los resultados. Los puntos se refieren a datos individuales y el símbolo (-) representa el título medio. Cada una de las tres lectinas de muérdago presentó una actividad adyuvante comparable a la mostrada por CT.

EJEMPLO 8

Aumentos en los títulos de los anticuerpos de las subclases de IgG específicas de gD2 en suero tras una administración intranasal.

En los días 1, 14, 35 y 49, los ratones fueron inmunizados intranasalmente bien sólo con gD2 (5 µg) o con gD2 (5 µg) junto con CT (1 µg), ML-I (1 µg), ML-II (1 µg) o ML-III (1 µg). Las muestras se recogieron dos semanas después de la inmunización final. Los datos corresponden a los títulos medidos dos semanas después de la inmunización final. FIG. 7A: IgG1; FIG. 7B: IgG2a; FIG. 7C: IgG2b; FIG. 7D: IgG3. Los puntos se refieren a datos individuales y el símbolo (-)

representa el título medio. Los valores de p entre paréntesis se refieren a la significación de los datos en comparación con el grupo de sólo gD2.

Los títulos de los anticuerpos IgG1, IgG2a y IgG2b específicos en suero aumentaron en los ratones tratados con cada una de las tres lectinas de muérdago.

5 EJEMPLO 9

ML-I, ML-II y ML-III aumentan los títulos de los anticuerpos IgA específicos de gD2 en ratones tras una inmunización intranasal.

10 En los días 1, 14, 35 y 49, se midieron los títulos de los anticuerpos IgA específicos de gD2 en las secreciones de los ratones inmunizados intranasalmente bien sólo con gD2 (5 µg) o con gD2 (5 µg) junto con CT (1 µg), ML-I (1 µg), ML-II (1 µg) o ML-III (1 µg). Los datos de la FIG. 8 corresponden a los títulos medidos dos semanas después de la inmunización final. FIG. 8A: saliva; FIG. 8B: lavado vaginal; FIG. 8C: lavado nasotraqueal; FIG. 8D: lavado intestinal. Los puntos se refieren a datos individuales y el símbolo (-) representa el título medio. Los valores de p entre paréntesis se refieren a la significación de los datos en comparación con el grupo de sólo gD2.

15 Cada una de las lectinas de muérdago aumentó los títulos de los anticuerpos IgA específicos de gD2 de cada una de las secreciones analizadas.

La Tabla 2 muestra las respuestas de los anticuerpos específicos de las lectinas en ratones inmunizados intranasalmente con gD2 (5 µg), sola o junto con CT/lectinas vegetales (1 µg). Los ratones (n = 10) fueron inmunizados los días 0, 14, 28 y 42, y las muestras se recogieron los días 56 y 57.

Tabla 2

Lectina/ toxina	Título de las subclases de IgG y de IgG en suero					Título de IgA				
	IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	Suero	Saliva	Vaginal	Nasal	Ap. digest.
ML-I	313.600	742.400	2.200	18.400	—	2.700	53	84	432	6
ML-II	655.360	655.360	3.040	23.040	—	520	98	34	166	30
ML-III	179.200	327.680	1.220	9.920	—	520	58	88	113	7
CT	523.378	568.889	176.356	193.422	211	7.111	484	409	1.771	53

20

EJEMPLO 10

Inmunogenicidad y adyuvaticidad en las mucosas de RIP de tipo II no tóxicas y moléculas relacionadas

25 Se comparó la inmunogenicidad y la adyuvaticidad en las mucosas (intranasal) de RIP de tipo II no tóxicas (nigrina B, nigrina B básica, ebulina r1) y moléculas relacionadas con sus subunidades B (SNA II, SELfd) con las de ML-I y CT. Se inmunizaron intranasalmente ratones con gD2 (5 µg) sola o junto con lectinas vegetales o toxina del cólera (CT) (1 µg). Los ratones fueron inmunizados los días 0, 21 y 42, y las muestras se recogieron los días 56 y 57. Se midieron las respuestas específicas de las lectinas y las respuestas contra el antígeno circundante, gD2, mediante ELISA.

30 La FIG. 9 muestra los títulos totales de las subclases de IgG y de IgG en suero específicos de gD2 de ratones inmunizados intranasalmente los días 1, 21 y 42 bien sólo con gD2 (5 µg) o gD2 (5 µg) junto con 1 µg de CT, ML-I, nigrina B, nigrina B básica, ebulina r1, SNA II o SELfd. Los sueros se recogieron al finalizar el estudio. Los puntos se refieren a datos individuales y el símbolo (-) representa el título medio. Los valores de p entre paréntesis se refieren a la significación de los datos en comparación con el grupo de sólo gD2.

35 La FIG. 10 muestra los títulos de anticuerpos IgA específicos de gD2 de secreciones de ratones inmunizados intranasalmente los días 1, 21 y 42 bien sólo con gD2 (5 µg) o gD2 (5 µg) junto con 1 µg de CT, ML-I, nigrina B, nigrina B básica, ebulina r1, SNA II o SELfd. Los datos corresponden a los títulos medidos dos semanas después de la inmunización en (a) saliva; (b) lavado vaginal; (c) lavado nasotraqueal; (d) lavado intestinal. Los puntos se refieren a datos individuales y el símbolo (-) representa el título medio. Los valores de p entre paréntesis se refieren a la significación de los datos en comparación con el grupo de sólo gD2.

La tabla 3 muestra la inmunogenicidad de las RIP de tipo II y las moléculas relacionadas. Se midieron las respuestas

de los anticuerpos en ratones inmunizados intranasalmente con gD2 (5 µg) o junto con CT/lectinas (1 µg). Los grupos de ratones (n = 10) fueron inmunizados los días 0, 14, 28 y 42, y las muestras se recogieron los días 56 y 57.

Tabla 3

Lectina/ toxina	Título de las subclases de IgG y de IgG en suero					Título de IgA				
	IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	Suero	Saliva	Vaginal	Nasal	Ap. digest
ML-I	921.600	1.556.480	6.820	96.000	10	1.880	28,8	421	716,8	.10
Nigrina B	120	880	20	60	–	10	0,2	0,4	–	0,6
Nigrina B básica	–	10	–	–	–	–	–	–	–	–
Ebulina r1	5.920	9.100	480	6.160	–	170	1,6	0,2	4,4	–
SNA II	40	50	–	40	–	80	–	–	1,4	1
SELfd	310	750	–	90	–	150	–	–	–	–

- 5 La FIG. 11 muestra los títulos de anticuerpos IgA e IgG en suero específicos de gD2 medidos en ratones inmunizados intranasalmente los días 1, 21 y 42 bien sólo con gD2 (5 µg) o gD2 (5 µg) junto con 1 µg de CT, ML-I o UEA-1. Los datos corresponden a los títulos medidos dos semanas después de la inmunización final. Los puntos se refieren a datos individuales y el símbolo (-) representa el título medio. Los valores de p entre paréntesis se refieren a la significación de los datos en comparación con el grupo de sólo gD2.
- 10 La FIG. 12 muestra los títulos de anticuerpos de las subclases de IgG específicas de gD2 medidos en ratones inmunizados intranasalmente los días 1, 21 y 42 bien sólo con gD2 (5 µg) o gD2 (5 µg) junto con 1 µg de CT, ML-I o UEA-1. Los datos corresponden a los títulos medidos en los sueros dos semanas después de la inmunización final. Los puntos se refieren a datos individuales y el símbolo (-) representa el título medio. Los valores de p entre paréntesis se refieren a la significación de los datos en comparación con el grupo de sólo gD2.
- 15 La FIG. 13 muestra los títulos de anticuerpos IgA específicos de gD2 medidos en secreciones de ratones inmunizados intranasalmente los días 1, 21 y 42 bien sólo con gD2 (5 µg) o gD2 (5 µg) junto con 1 µg de CT, ML-I o UEA-1. Los datos corresponden a los títulos medidos dos semanas después de la inmunización en (a) saliva; (b) lavado vaginal; (c) lavado nasotraqueal; (d) lavado intestinal. Los puntos se refieren a datos individuales y el símbolo (-) representa el título medio. Los valores de p entre paréntesis se refieren a la significación de los datos en comparación con el grupo de sólo gD2.
- 20 La FIG. 14 muestra las concentraciones medias de la producción de IL-5, IL-4 e IFN y los recuentos por minuto del análisis de proliferación de células T en (a) células de bazo y (b) nódulos linfáticos cervicales en la semana 8 tras tres inmunizaciones (días 0, 21, 42) con gD2, ML-I o UEA-1, o con gD2 junto con ML-I, UEA-1 o LTK63. Las células de bazo y las células de nódulos linfáticos cervicales fueron aisladas y estimuladas *in vitro* con gD2 (0 µg/ml, 1 µg/ml o 5 µg/ml) o con gD2 acoplado a perlas de látex diluidas 1:1.000 o 1:5.000 o con PMA/cd3.
- 25 La FIG. 15 muestra los títulos de anticuerpos IgG en suero específicos de OVA de ratones inmunizados mediante alimentación por sonda los días 1, 14, 28 y 49 bien sólo con OVA (5 mg) o con OVA (5 mg) junto con CT (10 µg), ML-I (10 µg), ML-II (10 µg) o ML-III (10 µg). Los sueros se recogieron 1 día antes de cada inmunización y al finalizar el estudio. FIG. 15A: títulos de IgG en suero tras una dosis (día 13); FIG. 15B: títulos de IgG en suero tras dos dosis (día 27); FIG. 15C: títulos de IgG en suero tras tres dosis (día 48); FIG. 15D: títulos de IgG en suero tras la dosis final (día 62). Los puntos se refieren a datos individuales y el símbolo (-) representa el título medio.
- 30 La FIG. 16 muestra los títulos de los anticuerpos IgA y de las subclases de IgG en suero específicos de OVA medidos en ratones inmunizados mediante alimentación por sonda los días 1, 14, 35 y 49 bien sólo con OVA (5 mg) o con OVA (5 mg) junto con CT (10 µg), ML-I (10 µg), ML-II (10 µg) o ML-III (10 µg). Las muestras se recogieron dos semanas después de la inmunización final. FIG. 16A: IgG1; FIG. 16B: IgG2a; FIG. 16C: IgG2b; FIG. 16D: IgG3. Los puntos se refieren a datos individuales y el símbolo (-) representa el título medio.
- 35 La FIG. 17 muestra los títulos de los anticuerpos IgA específicos de OVA medidos en las secreciones de ratones inmunizados mediante alimentación por sonda los días 1, 14, 35 y 49 bien sólo con OVA (5 mg) o con OVA (5 mg) junto con CT (10 µg), ML-I (10 µg), ML-II (10 µg) o ML-III (10 µg). Los datos corresponden a los títulos medidos dos semanas después de la inmunización final. FIG. 17A: saliva; FIG. 17B: lavado vaginal; FIG. 17C: lavado nasotraqueal; FIG. 17D: lavado intestinal. Los puntos se refieren a datos individuales y el símbolo (-) representa el título medio.
- 40

La Tabla 4 muestra las respuestas de los anticuerpos específicos de OVA en los ratones inmunizados mediante alimentación por sonda sólo con OVA (5 mg) o con OVA junto con lectinas (10 µg) administradas en 0,5 ml de bicarbonato sódico. Los grupos de ratones (n = 10) fueron inmunizados los días 0, 14, 28 y 42, y las muestras se recogieron los días 56 y 57.

5

Tabla 4

Lectinal/ toxina	Título de las subclases de IgG y de IgG en suero					Título de IgA				
	<i>IgG</i>	<i>IgG1</i>	<i>IgG2</i>	<i>IgG2b</i>	<i>IgG3</i>	<i>Suero</i>	<i>Saliva</i>	<i>Vagina</i> <i>I</i>	<i>Nasal</i>	<i>Ap. diges</i> <i>t</i>
Sólo OVA	30.500	62.260	—	120	—	40	—		0,4	—
ML-I + OVA	361.33	625.86	1.689	16.267	—		8		43	4
ML-II +	3	7	533	4.367	—	133	1	6	9	8
OVA ML-III	290.80	462.40	1.300	15.700	—	200	15	3	100	17
+	0	0	2.311	7.578	—	1.375	11	8	119	26
CT + OVA	362.00	603.20						10		
	0	0								
	401.06	534.75								
	7	6								

La Tabla 5 muestra las respuestas de los anticuerpos específicos de OVA en los ratones inmunizados sólo con OVA (5 mg) o con OVA junto con lectinas (10 µg). Se administró a los ratones el antígeno (± ML1) bien mediante alimentación por sonda en 0,1 ml de PBS o incorporado en los gránulos de pienso. Los grupos de ratones (n = 5) fueron inmunizados los días 0, 14, 28 y 42, y las muestras se recogieron los días 56 y 57.

10

La Tabla 6 muestra las respuestas de los anticuerpos específicos de ML1 en los ratones inmunizados oralmente sólo con OVA (5 mg) o con OVA junto con lectinas (10 µg). Se administró a los ratones el antígeno (± ML1) bien mediante alimentación por sonda en 0,1 ml de PBS o incorporado en los gránulos de pienso. Los ratones fueron inmunizados los días 0, 14, 28 y 42, y las muestras se recogieron los días 56 y 57.

15

Tabla 5

Lectina	Título de las subclases de IgG y de IgG en suero					Título de IgA				
	<i>IgG</i>	<i>IgG1</i>	<i>IgG2a</i>	<i>IgG2b</i>	<i>IgG3</i>	<i>Suero</i>	<i>Saliva</i>	<i>Vagina</i> <i>I</i>	<i>Nasal</i>	<i>Ap. diges</i> <i>t</i>
Sólo OVA	6.600 (4)	25.640 (3)	160(1)	3.240(3)	—	—	—	3,2 (1)	—	—
ML-I + OVA (PBS)	6.120 (5)	8.340 (5)	—	—	—	80 (1)	—	—	—	2 (2)
Sólo OVA (GRÁNULO S)	20 (1)	40 (1)	—	—	—	—	—	—	—	—
ML-I + OVA (GRÁNULO S)	160 (3)	20 (1)	—	40 (2)	—	—	—	—	—	0,4(1)

Tabla 6

Lectina	Título de las subclases de IgG y de IgG en suero					Título de IgA				
	IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	Suero	Saliva	Vagina	Nasal	Ap. diges.
Sólo OVA (PBS)										
ML-I + OVA (PBS)	6.080 (5)	33.280 (5)	240(2)	4.640 (5)	—	1.440 (5)	0,4 (1)	2 (3)	0,4 (1)	16 (5)
Sólo OVA (GRÁNULO S)										
ML-I + OVA (GRÁNULO S)	6.600 (5)	31.040 (5)	120 (2)	2.260 (5)	—	560 (4)	—	35,2 (4)	0,8 (1)	3,2 (3)

EJEMPLO 11

- 5 Eficacia de las RIP de tipo II (ML1, ebulina R1) como adyuvantes cuando se administran con antígenos por vía transcutánea.

10 En relación con los estudios que demostraron la eficacia de las lectinas de muérdago como adyuvantes administrados por vía mucosa, los presentes estudios se llevaron a cabo para evaluar el potencial de las RIP de tipo II como adyuvantes administrados transcutáneamente. El reciente trabajo ha demostrado la inducción eficaz de respuestas inmunes cuando se usa CT como adyuvante por esta vía (Glenn *et al.*, 1998, 1999). Además de ML-1, se usó CT como control positivo y ebulina r1, porque fue la más inmunogénica de las RIP de tipo II no tóxicas administradas intranasalmente.

PROTOCOLO

15 Los grupos de ratones Balb/c hembra (n = 5) fueron inmunizados los días 0 y 21, y las muestras se recogieron los días 0, 20 y 35 para su análisis mediante ELISA. Se estudiaron tres antígenos circundantes diferentes, ASB, DT y gD2. Los antígenos (50 µg) fueron administrados a los ratones bien solos o mezclados con lectina/toxina (50 µg). Las respuestas de los anticuerpos específicos se determinaron mediante ELISA. Además, se midieron las respuestas de la CT y las lectinas para evaluar su inmunogenicidad mediante la vía transcutánea. Se afeitó la espalda de los ratones con una esquiladora n.º 40 y se dejó descansar a los animales durante 48 h. Se anestesió a los ratones con hypnorm-diazepan

20 durante el procedimiento de inmunización. Se limpió la piel con etanol 1 min antes de aplicar la solución. Se aplicó la solución de inmunización (100 µl) sobre la piel afeitada en una superficie de 2 cm². Tras 30 min, se aplicaron 100 µl más de agua destilada y se dejaron los ratones durante 90 min. Se lavaron bien los ratones con agua corriente tibia, se secaron mediante golpecitos y se volvieron a lavar.

Grupos de estudio

- 25 I. ASB
1. 50 µg de ASB
 2. 50 µg de ASB + 50 µg de CT
 3. 50 µg de ASB + 50 µg de ML-1
 4. 50 µg de ASB + 50 µg de Ebulina r1
- 30 II. Toxoide diftérico (DT)
1. 50 µg de DT
 2. 50 µg de DT + 50 µg de CT
 3. 50 µg de DT + 50 µg de ML-1

4. 50 µg de DT + 50 µg de Ebulina r1

III. Glucoproteína D2 (gD2) del Virus *Herpes simplex*

1. 50 µg de gD2
2. 50 µg de gD2 + 50 µg de CT
3. 50 µg de gD2 + 50 µg de ML-1
4. 50 µg de gD2 + 50 µg de lectina II

La Tabla 7 muestra los títulos de los anticuerpos específicos de ASB en suero medidos tras 1 y 2 dosis transcutáneas de ASB (50 µg) sola o junto con CT/lectina vegetal (50 µg).

Tabla 7

Adyuvante/ antígeno	Número de ratón	Título de IgG en suero Semana 3	Título de IgG en suero Semana 5	Título de IgG1 en suero Semana 5	Título de IgG2a en suero Semana 5
ASB	1	100	100	100	< 100
	2	< 100	6.400	6400	< 100
	3	< 100	25.600	25600	< 100
	4	< 100	1.600	1600	< 100
	5	< 100	12.800	12800	< 100
CT + ASB	1	< 100	819.200	819200	< 100
	2	3.200	1.638.400	1638400	12.800
	3	6.400	409.600	409600	1.600
	4	1.600	819.200	819200	3.200
	5	400	819.200	819200	800
ML1 + ASB	1	800	102.400	102400	< 100
	2	1.600	204.800	204800	1.600
	3	1.600	204.800	204800	400
	4	< 100	409.600	409600	< 100
	5	< 100	204.800	204800	200
Ebulina r1 + ASB	1	< 100	102.400	102400	< 100
	2	800	204.800	25600	< 100
	3	200	204.800	102400	< 100
	4	< 100	409.600	204800	< 100
	5	< 100	204.800	204800	< 100

La Tabla 8 muestra los títulos de los anticuerpos específicos de DT en suero medidos tras 1 y 2 dosis transcutáneas de DT (50 µg) sola o junto con CT/lectina vegetal (50 µg).

Tabla 8

Adyuvante/ antígeno	Número de ratón	Título de IgG en suero Semana 3	Título de IgG en suero Semana 5	Título de IgG1 en suero Semana 5	Título de IgG2a en suero Semana 5
DT	1	100	< 100	200	< 100
	2	< 100	25.600	102.400	< 100
	3	< 100	12.800	25.600	100
	4	100	800	3.200	< 100
	5	< 100	100	400	< 100
CT + DT	1	25.600	1.638.400	1.638.400	800
	2	12.800	1.638.400	1.638.400	1.600
	3	25.600	3.276.800	6.553.600	3.200
	4	25.600	1.638.400	3.276.800	3.200
	5	51.200	819.200	1.638.400	1.600
ML1 + DT	1	800	51.200	102.400	< 100
	2	100	25.600	102.400	100

	3	< 100	6.400	12.800	< 100
	4	< 100	51.200	102.400	100
	5	< 100	6.400	12.800	100
Ebulina r1 + DT	1	< 100	400	800	< 100
	2	800	100	200	< 100
	3	1.600	102.400	204.800	100
	4	400	12.800	25.600	< 100
	5	< 100	51.200	204.800	< 100

La Tabla 9 muestra los títulos de los anticuerpos específicos de gD2 en suero medidos tras 1 y 2 dosis transcutáneas de gD2 (50 µg) sola o junto con CT/lectina vegetal (50 µg). Debido a las bajas respuestas, no se determinaron los niveles de IgGa ni de IgG1 en suero.

5

Tabla 9

Adyuvante/ antígeno	Número de ratón	Título de IgG en suero Semana 3	Título de IgG en suero Semana 5
gD2	1	< 100	< 100
	2	100	100
	3	< 100	< 100
	4	< 100	< 100
	5	< 100	< 100
CT + gD2	1	100	1.600
	2	< 100	102.400
	3	< 100	3.200
	4	< 100	3.200
	5	< 100	6.400
ML1 + gD2	1	< 100	< 100
	2	< 100	< 100
	3	< 100	1.600
	4	< 100	< 100
	5	< 100	< 100
Ebulina r1 + gD2	1	< 100	< 100
	2	< 100	< 100
	3	100	< 100
	4	100	200
	5	100	< 100

La Tabla 10 muestra los títulos de los anticuerpos específicos de las lectinas y de CT en suero medidos tras 1 y 2 dosis transcutáneas de CT/ML1/Ebulina r1 (50 µg).

Tabla 10

Adyuvante/ antígeno	Número de ratón	Título de IgG en suero Semana 3	Título de IgG en suero Semana 5
CT	1	3.200	102.400
	2	3.200	51.200
	3	3.200	12.800
	4	< 100	204.800
	5	204.800	1.638.400
	6	12.800	102.400
	7	12.800	204.800
	8	3.200	204.800
	9	3.200	102.400
	10	800	204.800
	11	< 100	102.400
	12	< 100	819.200
	13	< 100	102.400
	14	800	409.600

	15	800	102.400
ML 1	1	800	1.600
	2	400	3.200
	3	400	1.600
	4	800	51.200
	5	< 100	25.600
	6	< 100	< 100
	7	< 100	400
	8	< 100	< 100
	9	< 100	800
	10	< 100	< 100
	11	< 100	12.800
	12	< 100	1.600
	13	< 100	1.600
	14	< 100	25.600
	15	< 100	200
Ebulina r1	1	< 100	400
	2	100	< 100
	3	100	< 100
	4	800	200
	5	200	< 100
	6	100	< 100
	7	100	< 100
	8	< 100	100
	9	< 100	< 100
	10	< 100	< 100
	11	< 100	< 100
	12	< 100	< 100
	13	< 100	100
	14	< 100	400
	15	100	< 100

EJEMPLO 12

Unión, absorción y translocación de lectinas administradas oralmente a ratones

- 5 *Administración de lectinas y recogida de tejidos.* Se mantuvieron ratones Balb/c hembra a una dieta para ganado normal con libre acceso a agua antes de los experimentos. Se privó a los ratones de comida durante una noche y se administraron las lectinas mediante alimentación por sonda usando agujas de dosificación oral curvadas (20 g x 25 mm) (1 mg de lectina/ratón en 100 µl de solución salina fisiológica) a grupos de 24 ratones. En este procedimiento tuvieron acceso a agua. Se sacrificaron los animales en grupos de 8 mediante anestesia con halotano seguida de la exsanguinación tras 1 h, 6 h y 24 h. Se recogió sangre mediante punción cardíaca. Los ratones fueron diseccionados y se extirpó todo el aparato digestivo que fue dividido en el estómago, dos partes de intestino delgado y el intestino grueso. Se lavó el contenido del aparato digestivo con 10 ml de PBS enfriado en hielo para indicar la cantidad de lectina sin unir que había presente. Se colocaron los tejidos del aparato digestivo en bolsas de polietileno y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. En cada caso, se tomaron secciones de intestino y se fijaron en formalina al 4% para el examen de la unión de las lectinas mediante histología. Se almacenaron todos los tejidos del aparato digestivo y los lavados a -20°C hasta que fueron necesarios para el análisis. Además, se recogieron el hígado, el bazo y los riñones de los animales.

- 20 *Extracción de lectinas del tejido.* Se extrajeron tejidos de los animales que habían recibido las lectinas o la solución salina control mediante homogenización en solución 20mM de diaminopropano. Se colocaron las secciones de tejido en la solución de extracción (995 µl de diaminopropano 20mM + 5 µl de 5 mg/ml de aprotinina (Sigma)) y se homogenizaron (Janke and Kunkel IKA®-Labortechnik, Ultra – Turrax®) a 24.000 rpm durante 2 minutos sobre hielo. Se lavó la cabeza del homogenizador con agua destilada en 1 ml de solución de extracción y, de nuevo, en agua destilada entre las muestras. Se centrifugaron las muestras (Jouan, MRI 22) durante 20 min a 18.600 g a 2°C. Se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a

-20°C hasta que fueron necesarios para los análisis.

- 25 *Procesamiento de los lavados del aparato digestivo.* Para proporcionar una señal de la cantidad de lectina libre (sin unir) presente en el aparato digestivo, se analizó la cantidad de lectina presente en los lavados del aparato digestivo.

Se añadieron lavados (500 µl) a tampón de dilución (495 µl) + el inhibidor de la proteasa aprotinina (5 µl de 5 mg/ml) y se centrifugaron (Microspin 12S, Sorvall® Instruments, Du Pont) a 8000 rpm durante 10 min.

Procesamiento de las muestras sanguíneas. Tras la recogida, se dejaron las muestras sanguíneas a temperatura ambiente durante 1 hora y se centrifugaron a 7.000 rpm durante 6 min (Microspin 12S, Sorvall® Instruments, Du Pont). Se recogió el plasma y se almacenó a

–20°C hasta que fue necesario para el análisis.

Análisis de unión ELISA de lectinas vegetales al aparato digestivo. Se configuró el análisis ELISA para poder cuantificar la WGA de las muestras de tejido extraídas y de los lavados. Se revistieron las placas de microvaloración (Immunolon 4, Dynatech) con 75 µl de una dilución 1:64.000 de anti-WGA de conejo por pocillo en tampón de carbonato–bicarbonato, pH 9,6 y se incubaron a 4°C durante una noche. Tras lavar, se bloquearon las placas con PBST/gelatina al 2%/N–acetilglucosamina 200mM y se incubaron a 37°C durante 1 h. Se lavaron las placas; se añadieron patrones y muestras, se diluyeron en serie en tampón de dilución (PBST/N–acetilglucosamina 200mM) y se incubaron a 37°C durante 1 h. Se trazó la curva estándar para la WGA mediante la valoración de la solución de WGA de 10 ng/ml a 78 pg/ml. Se añadió anti-WGA biotinilado a una dilución de 1:16.000 en tampón de dilución y se incubó a 37°C durante 1 h. Tras más lavados, se añadió peroxidasa ExtrAvidin® (Sigma) en una dilución de 1:1.000 en tampón de dilución y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se lavaron las placas y se añadieron 50 µl/pocillo de solución reveladora (sustrato de peroxidasa para micropocillos TMB (1–C), Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, EE.UU.) y se incubaron en la oscuridad con agitación a 37°C durante 30 min. Se detuvo la reacción mediante la adición de H₂SO₄ 1M (50 µl/pocillo) y se leyó la absorbancia a 450 nm. Se calcularon los niveles de WGA a partir de la región lineal de la curva estándar.

Electroforesis en gel de poliacrilamida–SDS y transferencia Western. Se aplicaron los geles de electroforesis en gel de poliacrilamida–SDS y se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF usando un aparato transferencia en semiseco. Tras la transferencia, se bloquearon las membranas en solución de caseína al 2,5% durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas y se añadió el anticuerpo primario (anti–lectina marcado con biotina) en una dilución de 1:2.500 en 5 ml de solución de caseína al 1,2%. Tras la incubación con agitación a temperatura ambiente durante una noche, se lavaron muy bien las membranas con PBS y peroxidasa ExtrAvidin® añadida en una dilución 1:5.000 en caseína al 1,2%. Tras una incubación de 1 h con agitación a temperatura ambiente, se lavaron muy bien las membranas con PBS y agua destilada. Se transfirió el fluido en exceso de las membranas y se añadió solución reveladora (kit de picodetección West Super signal® (Pierce, Rockford, EE.UU.)) y se dejó en la oscuridad durante 5 min. Se secó el exceso de fluido de las membranas y se expusieron las membranas a una película (Kodak X–OMAT LS (Sigma)) y se procesaron.

RESULTADOS

Estabilidad y unión de lectinas vegetales en el aparato digestivo de los ratones tras una alimentación por sonda. Las lectinas PHA, WGA y UEA–1 fueron estables en el tracto digestivo de los ratones durante 6 h tras la alimentación por sonda (Tablas 11 y 12; FIG. 18 y 19). En el intestino delgado, sólo se detectaron las lectinas en el PM subunitario del control positivo. En el estómago, hubo signos de la agregación de las lectinas tras 6 y 24 h en los casos de la PHA y la UEA–1. Sin embargo, la mayoría de la lectina detectada en el estómago también estaba intacta. Con el análisis de la unión de las lectinas al aparato digestivo se encontraron diferencias en la ubicación de la unión de las lectinas a la hora y a las 6 horas de la administración. La PHA (sin estar WGA presente) se unió al intestino delgado proximal, mientras que no se detectó UEA–1 en esta región, sino unido al intestino delgado distal (Tabla 11). El patrón de unión resultó ser similar a la hora y a las 6 horas de la administración de las lectinas. A las 24 h de la administración, no se detectaron lectinas en los tejidos de aparato digestivo homogenizados. Esto indicó que las lectinas no se volvieron a unir al aparato digestivo tras su separación, sino que lo más probable es que fueran excretadas tras separarse.

La Tabla 11 muestra la detección de PHA (isótopo E2L2) en el tracto digestivo de los ratones a la 1, 6 y 24 h de la administración de 1 mg mediante alimentación por sonda. El símbolo + indica la detección de la lectina en las transferencias Western, y el número de ratones con signo positiva (de los 8 de cada grupo) se presenta entre paréntesis. El peso molecular subunitario de la PHA del control positivo fue de 29,5 kDa.

La Tabla 12 muestra la detección de UEA1 en el tracto digestivo de los ratones a la 1, 6 y 24 h de la administración de 1 mg mediante alimentación por sonda. El símbolo + indica la detección de la lectina en las transferencias Western, y el número de ratones con signo positiva (de los 8 de cada grupo) se presenta entre paréntesis. El peso molecular subunitario aparente de la UEA1 del control positivo fue de 34,7 kDa.

Tabla 11

REGIÓN DEL APARATO DIGESTIVO	TIEMPO TRAS LA ADMINISTRACIÓN (h)	PM (kDa)							
		125,9	114,8	91,2	58,1	43,7	29,5	9,3	7,6
Lavado del aparato digestivo	1								
	6								
	24								
Estómago	1	125,9	114,8	91,2	58,1	43,7	29,5	9,3	7,6
	6	—	—	—	—	—	+(8)	—	—
	24	—	—	—	—	—	—	—	—
Homogenizado de intestino delgado (proximal)	1	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	+(7)	—	+(8)	—	—
	24	—	—	—	+(3)	—	—	—	—
Homogenizado de intestino delgado (distal)	1	—	—	—	—	—	—	+(4)	+(4)
	6	—	—	—	—	—	+(8)	—	—
	24	—	—	—	—	—	+(8)	—	—
Homogenizado de intestino grueso	1	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	—	+(6)	—	—
	24	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabla 12

REGIÓN DEL APARATO DIGESTIVO	TIEMPO TRAS LA ADMINISTRACIÓN (h)	PESO MOLECULAR APARENTE (kDa)							
		144,5	114,8	100	87,1	75,9	64,6	52,5	34,7
Estómago	1	—	—	—	—	—	—	—	+(4)
	6	—	—	—	+(4)	+(3)	+(3)	—	—
	24	—	—	—	+(1)	—	+(3)	—	—
Lavado del intestino delgado	1	—	—	+(2)	—	+(1)	—	—	+(4)
	6	—	—	—	—	—	—	—	—
	24	—	—	—	—	—	—	—	—
Homogenizado de intestino delgado (proximal)	1	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	—	—	—	—
	24	—	—	—	—	—	—	—	—
Homogenizado de intestino delgado (distal)	1	—	—	—	—	—	—	—	+(4)
	6	—	—	—	—	—	—	—	+(5)
	24	—	—	—	—	—	—	—	—
Homogenizado de intestino grueso	1	—	—	—	—	—	—	—	+(2)
	6	—	—	—	—	—	—	—	+(4)
	24	—	—	—	—	—	—	—	—

5 *Detección de lectinas en órganos internos y sangre.* Se usaron ensayos de transferencia Western quimioluminiscentes sensibles para determinar la absorción de las lectinas. Para las tres lectinas, se midió la absorción en el hígado y en el riñón (Tabla 13, FIG. 20 y 21). La FIG. 20 muestra que las UEA1 detectadas en el tejido renal están a un peso molecular mayor que en el control positivo. Hay una reacción cruzada con el tejido renal control. Sin embargo, hay otras bandas visibles en los tejidos de los animales que recibieron la lectina. Estas bandas están a un peso molecular mayor que en el control.

10 Las lectinas se detectaron en el tejido del hígado de 1 a 24 h después de la administración. Sin embargo, el PM de las bandas reactivas fue considerablemente superior que el PM subunitario esperado. De hecho, no se detectó ninguna de las 3 lectinas al PM subunitario esperado en los órganos internos. Para determinar una señal del grado de absorción de las lectinas, se configuró un ELISA de sándwich que cuantificara la WGA. Esto permitió determinar las lectinas del aparato digestivo y los órganos internos (Tabla 13). Se detectó la lectina en los homogenizados de aparato digestivo hasta las 6 h de la administración aproximadamente al nivel administrado de la lectina. A las 24 h, ya no se detectaba nada de lectina en los homogenizados. De los órganos internos, los niveles más elevados de lectina se detectaron en

15

el tejido del hígado. El nivel de lectina en esta parte del cuerpo aumentó desde la primera hora a las 24 h. Sin embargo, la cantidad más alta de lectina detectada (289,3 ng) representaba una pequeña fracción de la dosis administrada. Se detectaron niveles muy bajos de WGA en las células sanguíneas o en los sueros o en el bazo. La detección del nivel más alto de lectina en el hígado y en el riñón está en línea con los resultados de la transferencia Western, en los que las lectinas eran detectables en el tejido de hígado y riñón, pero no en la sangre ni en otros órganos.

Estabilidad de lectinas nativas o absorbidas a la proteólisis por tripsina. Para determinar si las lectinas absorbidas detectadas en el hígado y en los riñones conservaban las propiedades de las lectinas nativas, se incubaron PHA, WGA y UEA-1 nativas y extraídas de tejido durante 1 h con una solución de tripsina. Las tres lectinas fueron muy estables a la enzima en su forma nativa. Sin embargo, las lectinas modificadas detectadas en el tejido de hígado y de riñón fueron degradadas por la enzima (Fig. 22). Esto indica que las células del hígado y del riñón son capaces de modificar las lectinas vegetales a formas que son sensibles a la proteólisis. Esto puede ser un mecanismo para la degradación de las lectinas vegetales ingeridas que sobreviven en el tracto digestivo y son absorbidas.

La TABLA 13 muestra la detección de WGA en tejidos tras una administración oral por sonda a grupos de ratones (n = 8) de una sola dosis de 1 mg de lectina en 0,1 ml de PBS. Se determinó la lectina mediante un ELISA de sándwich cuantitativo y los datos se presentan como los µg de lectina por órgano o por ml de sangre.

Tabla 13

TEJIDO	TIEMPO TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE LAS LECTINAS (h)		
	1	6	24
Homogenizado de aparato digestivo	ND	1018,1 ± 949,2	–
Lavado de aparato digestivo	5,5 ± 5,8	2,5 ± 1,4	0,4 ± 0,7
Hígado	28,5 ± 33	48 ± 42,1	289,3 ± 546
Bazo	0,6 ± 0,9	3,3 ± 2,1	11,9 ± 9,2
Riñón	0,5 ± 0,5	1,9 ± 0,8	1,6 ± 2,2
Suero	0,4 ± 0,7	2,1 ± 1,8	1,1 ± 2
Células sanguíneas	0,3 ± 0,5	1,8 ± 2,5	0,5 ± 0,8

Referencias

- McGhee, J.R. y Kiyono, H. 1999. "The mucosal immune system", p. 909–945. En W.E. Paul (ed.), *Fundamental Immunology*, IV ed. Lippincott–Raven Publishers, Filadelfia.
- Robertson, S.M. y Cebra, J.J. 1976. "A model for local immunity". *Ric Clin Lab.* 6: 105.
- Winner, L. III, Mack, J., Weltzin, R., Mekalanos, J.J., Krachenbuhl, J.P. y Neutra, M.R. 1991. "New model for analysis of mucosal immunity: intestinal secretion of specific monoclonal immunoglobulin A from hybridoma tumors protects against *Vibrio cholerae* infection". *Infect Immun* 59: 977–982.
- Nossal G.J.V. 1999. "Vaccines", p. 1387–1425. En: W.E. Paul (ed.), *Fundamental Immunology*, IV ed. Lippincott–Raven Publishers, Filadelfia.
- Ward, S.J., Douce, G., Figueiredo, D., Dougan, G. y Wren, B.W. 1991. "Immunogenicity of a *Salmonella typhimurium* aroA aroD vaccine expressing a nontoxic domain of *Clostridium difficile* toxin A". *Infect Immun.* 67: 2145–2152.
- O'Hagan, D.T. 1998. "Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines". *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 34: 305–320.
- Rogers, J.A. y Anderson, K.E. 1998. "The potential of liposomes in oral drug delivery". *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.* 15: 421–480.
- Elson C.J. y Ealding W. 1984. "Generalised systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin". *J. Immunol.* 132: 2736–2741.
- Clements, J.D., Hartzog N.M. y Lyon F.L. 1988. "Adjuvant activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens". *Vaccine*, 6: 269–277.
- Lycke, N. 1997. "The mechanism of cholera toxin adjuvanticity". *Res. Immunol.* 148: 504–520.

11. Williams N.A., Hirst T.R. y Nashar T.O. 1999. "Immune modulation by the choleralike enterotoxins: from adjuvant to therapeutic". *Immunol. Today*. 20: 95–101.
12. Pizza M., Domenighini M., Hol W., Giannelli V., Fontana M.R., Guiliani M., Magagnoli C., Peppoloni S., Manetti R. y Rappuoli R. 1994. "Probing the structure activity relationship of *Escherichia coli* LT–A by site–directed mutagenesis". *Mol. Microbiol.* 14: 51–60.
13. Van Damme E.J.M., Peumans W.J., Pusztai A. y Bardocz, S. 1998. "Plant lectins: a special class of plant protein", p 1–28. En E.J.M Van Damme., W.J. Peumans, A. Pusztai y S. Bardocz (ed.) *Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications*. John Wiley and Sons, Chichester, Inglaterra.
14. Giannasca P.J., Boden J.A. y Monath T.P. 1997. "Targeted delivery of antigen to hamster nasal lymphoid tissue with M–cell directed lectins". *Infect Immun* 65:4288–4298.
15. Bardocz S., Grant G., Pusztai A., Franklin M.F. y Carvalho A de F.F.U. 1996. "The effect of phytohemagglutinin at different dietary concentrations on the growth, body composition and plasma insulin of the rat". *Br. J. Nutr.* 76: 613–626.
16. Eifler R., Pfuller K., Gockeritz W. y Pfuller U. 1994. "Improved procedures for isolation of mistletoe lectins and their subunits: lectin pattern of the European mistletoe", p. 144–151. En J. Basu, M. Kundu y P. Chakrabarty (ed.), "Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry", Wiley Eastern Limited, Nueva Delhi, India.
17. Ugozzoli M., O'Hagan D.T. y Ott G.S. 1998. "Intransal immunization of mice with herpes simplex virus type 2 recombinant gD2: the effect of adjuvants of mucosal and serum antibody responses". *Immunology*. 93: 563–571.
18. Roberts, M., Bacon, A., Rappuoli, R., Pizza, M., Cropley, I., Douce, G., Dougan, G., Marinaro, M., McGhee, J. y Chatfield, S., 1995. "A mutant pertussis toxin molecule that lacks ADP–ribosyltransferase activity, PT–9K/129G is an effective mucosal adjuvant for intranasally delivered proteins". *Infect. Immun.* 63: 2100–2108.
19. Marinaro, M., Di Tommaso, A., Uzzau, S., Fasano, A. y De Magistris, M.T. 1999. "Zonula occludens toxin is a powerful mucosal adjuvant for intranasally delivered antigens". *Infect. Immun.* 67: 1287–1291.
20. Fukuta, S., Magnani, J.L., Twiddy, E.M., Holmes, R.K. y Ginsburg, V. 1988. "Comparison of the carbohydratebinding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat–labile enterotoxins Lth–1, LT–IIa and LT–lib". *Infect Immun* 56:1748–1753.
21. Fishman, P.H. 1982. "Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins". *J. Membrane. Biol.* 69: 85–97.
22. Li, T–K. y Fox, B.S. 1996. "Cholera toxin B subunit binding to an antigen–presenting cell directly co–stimulates cytokine production from a T cell clone". *Int. Immunol.* 8: 1849–1856.
23. Takahashi, I., Marinaro, M., Kiyono, H., Jackson, R.J., Nakagawa, L., Fujihashi, K., Hamada, S., Clements, J.D., Bost, K.L. y McGhee, J.R. 1996. "Mechanisms for mucosal immunogenicity and adjuvancy of *Escherichia coli* labile enterotoxin". *J. Infect. Dis.* 173: 627–635.
24. Douce, G., Fontana, M., Pizza, M., Rappuoli, R. y Dougan, G. 1997. "Intransal immunogenicity and adjuvannnticity of site–directed mutant derivatives of cholera toxin". *Infect. Immun.* 65:2821–2828.
25. Bussing, A. 1996. "Induction of apoptosis by the mistletoe lectins. A review of the mechanisms of cytotoxicity mediated by *Viscum album* L. Apoptosis", 1: 25–32.
26. Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C. y Gabius, H.J. 1990. "Increased secretion of tumor necrosis factor–alpha, interleukin–1, and interleukin–6 by human mononuclear cells exposed to beta–galactoside–specific lectin from clinically applied mistletoe extract". *Cancer Res.* 50: 3322–3326.
27. Hajto T., Hostanska K. y Gabius, H.J. 1989. "Modulatory potency of the beta– galactoside–specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients". *Cancer Res.* 49: 4803–4808.
28. Sugii, S. y Tsuji, T. 1989. "Binding specificities of heat–labile enterotoxin isolated from porcine and human enterotoxigenic *escherichiaz coli* for different gangliosides". *Ca. J. Microbiol.* 35: 670–673.
29. Lycke, N. y Sevennerholm. A.–M. 1990. "Presentation of immunogens at the gut and other mucosal surfaces", p. 207–227. En Woodrow, M. Levine (ed.). *The Molecular Approach to New and Improved Vaccines*. Marcel Dekker Inc., NY.

30. Haas, H., Falcone, F.H., Schramm, G., Haisch, K., Gibbs, B.F., Klaucke, J., Poppelmann, M., Becker, W-M., Gabius, J. y Schlaak, M., 1999. "Dietary lectins can induce in vitro release of IL-4 and 1L-13 from human basophils". *Eur. J. Immunol* 29: 918-927.
- 5 31. Di Tommaso A., Saletti G., Pizza M., Rappuoli R., Dougan G., Abrignani S., Douce G. y De Magestris M.T. 1996. "Induction of antigen-specific antibodies in vaginal secretions by using a nontoxic mutant of heat-labile enterotoxin as a mucosal adjuvant", *Infect. Immun.* 64: 974-979.
32. Shibuya *et al.*, 1987. *J. Biol. Chem.* 262, 1596-1601.
33. Gribes *et al.*, 1993. *Plant Mol. Biol.* 22, 1181-86.
34. Citous *et al.* 1996 *Cell. Mol. Biol.* 42, 473-76.
- 10 35. O'Hagan. 1998. *J. Pharm. Pharmacol.* 50, 1-10.
36. Marchetti *et al.* 1998. *Vaccine* 16, 33-37.
37. Giuliani *et al.* 1998. *J. Exp. Med.* 187, 1123-32.
38. Partidos *et al.* 1999. *Imunol. Lett.* 67, 209-16.
39. O'Hagan *et al.* 1991. *Vaccine* 17, 2229-36.
- 15 40. Glenn, G.M., Rao, M., Matyas, G.R. y Alving, C.R. (1998). "Skin immunization made possible by cholera toxin". *Nature* 391, 851.
41. Glenn, G.M., Scharton-Kersten, T., Vassell, R., Matyas, G.R. y Alving, C.R. (1999). "Transcutaneous immunization with bacterial ADP-ribosylating exotoxins as antigens and adjuvants". *Infect Immun* 67, 1100-1106.
42. Lavelle *et al.*, "Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice". *Immunology* 99, 30-37, 2000.
- 20 43. Lavelle *et al.*, "The identification of plant lectins with mucosal adjuvant activity". *Immunology*, en prensa.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una mezcla que comprende un inmunógeno y una lectina vegetal en la fabricación de un medicamento para producir una respuesta inmune hacia el inmunógeno en un mamífero, en el que el medicamento se administra por vía mucosa y la respuesta inmune es mayor que la respuesta inmune contra el inmunógeno producido en ausencia de la lectina vegetal.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que el medicamento se administra mediante un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en la administración oral, administración intranasal, administración intrarrectal y administración vaginal.
- 10 3. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1–2, en el que el medicamento se administra usando un vehículo de micropartículas.
4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1–3, en el que el medicamento se administra en combinación con un polímero bioadhesivo.
5. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la lectina vegetal se selecciona del grupo que consiste en ML–1, ML–11, ML–111, WGA y UEA–1.
- 15 6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1–4, en el que la lectina vegetal es una proteína desactivadora de los ribosomas de tipo 2.
- 20 7. El uso de la reivindicación 6, en el que la proteína desactivadora de los ribosomas de tipo 2 se selecciona del grupo que consiste en nigrina b, nibrina b básica, ebulina 1, ebulina r1, ebulina r, ebulina f, nigrina f, SNA1, SNA1, SNAV, SNAVI, SNLRPI de *Sambucus nigra*, SNLRP2, ricino, lectina de ricino, RIP *Polygonatum*, Sieboldina–6, abrina, abrina 11, modeccina, volkensina, SSA, Cinamonina, porrectina, gelorina, *Evanthis hyemalis*, RIP, aglutinina de lirio, ML–I, ML–11 y ML–III.
8. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el mamífero se selecciona del grupo que consiste en un perro, un gato, un ratón, una rata, un conejo, un cerdo de guinea, un chimpancé, un babuino y un ser humano.
- 25 9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la respuesta inmune es una respuesta de las células T.
10. El uso de la reivindicación 9, en el que la respuesta de las células T es una respuesta Th2.
11. El uso de la reivindicación 9, en el que la respuesta de las células T es una proliferación de células T.
12. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1–8, en el que la respuesta inmune es una respuesta de anticuerpos.
- 30 13. El uso de la reivindicación 12, en el que el mamífero produce un anticuerpo que se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos IgG e IgA.
14. El uso de la reivindicación 13, en el que los anticuerpos IgG se seleccionan del grupo que consiste en IgG1, IgG2a e IgG2b.
15. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 12–14, en el que los anticuerpos son detectables en suero.
- 35 16. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 12–15, en el que los anticuerpos son detectables en una secreción de mucosa.
17. El uso de la reivindicación 16, en el que la secreción de mucosa se obtiene de una mucosa seleccionada del grupo que consiste en mucosa de aparato digestivo, mucosa vaginal, mucosa oral y mucosa nasal.
18. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 12–17, en el que se mide el título de un anticuerpo usando un ELISA.
19. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla comprende dos o más lectinas.
- 40 20. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla comprende dos o más inmunógenos.
21. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inmunógeno es una proteína de un agente infeccioso.
22. El uso de la reivindicación 21, en el que el agente infeccioso es un virus.
23. El uso de la reivindicación 22, en el que el inmunógeno es una proteína glucoproteína D2 del virus *Herpes simplex*

de tipo 2.

24. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 2–23, en el que el medicamento se administra usando un pulverizado nasal.

5

25. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 2–23, en el que se administra una gota de un líquido que contiene el medicamento.

26. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se administran al menos dos dosis del medicamento.

27. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla comprende un inmunógeno y una lectina vegetal en una proporción de al menos 1:1.

10

28. El uso de la reivindicación 27, en el que la proporción es al menos 10:1.

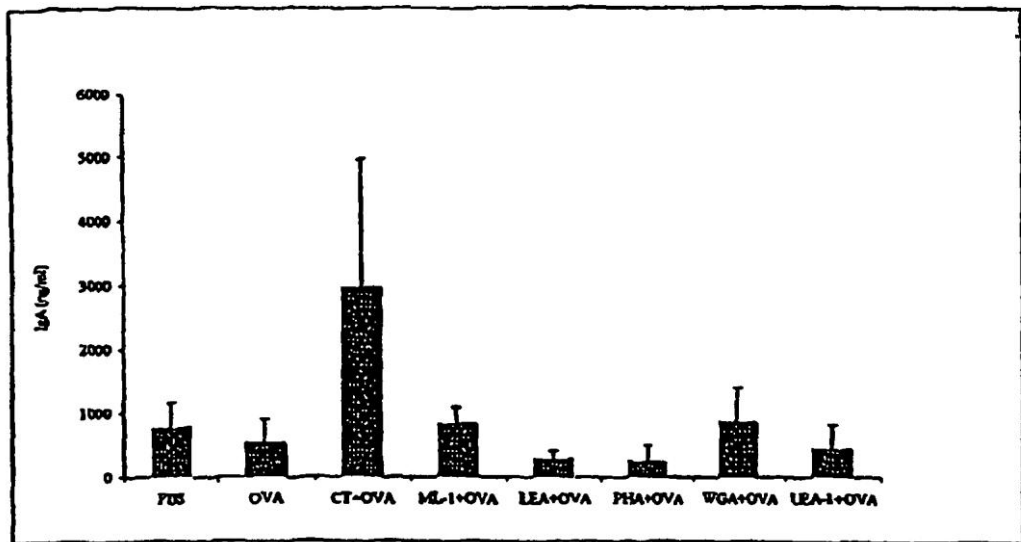


Figura 1

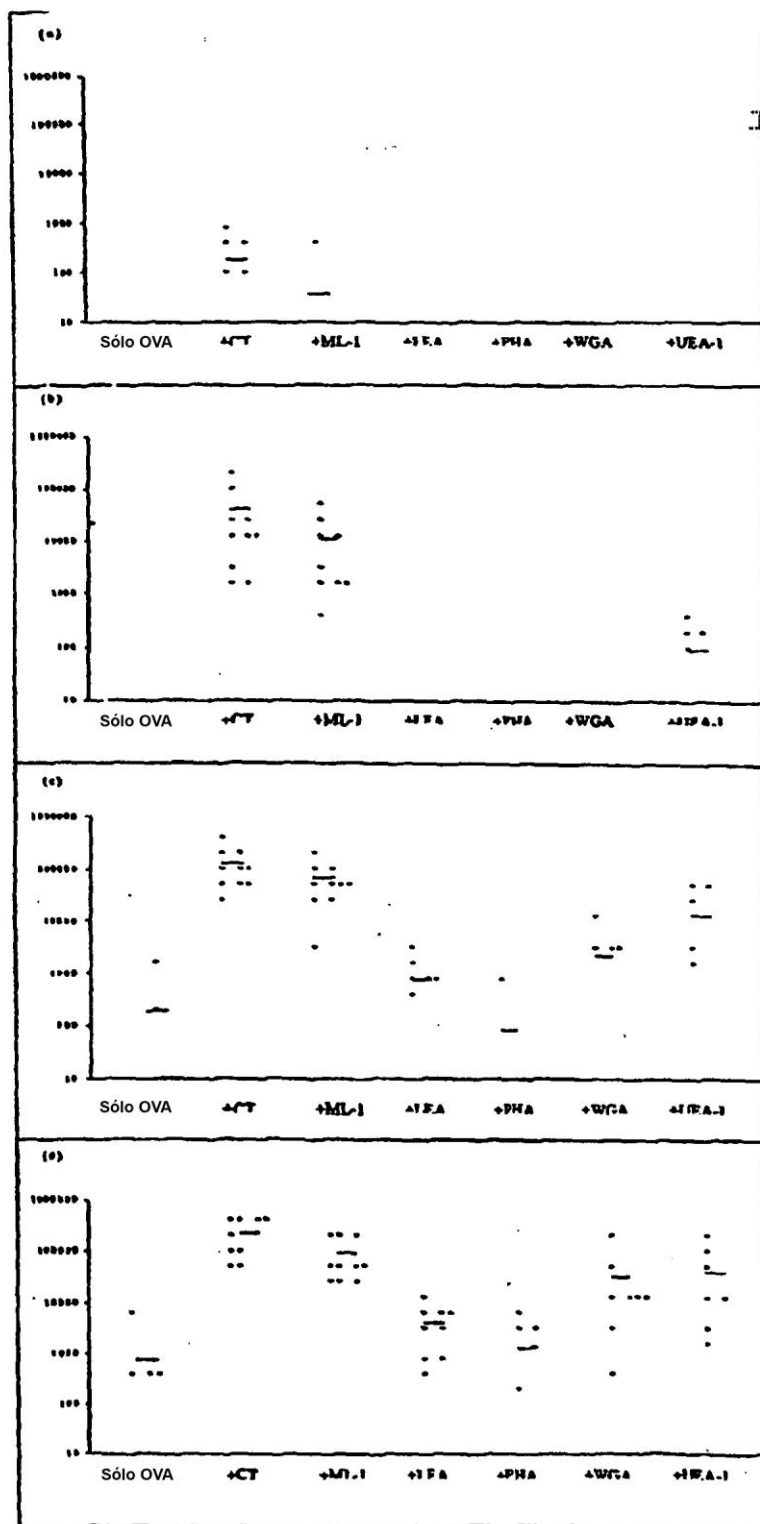


Figura 2

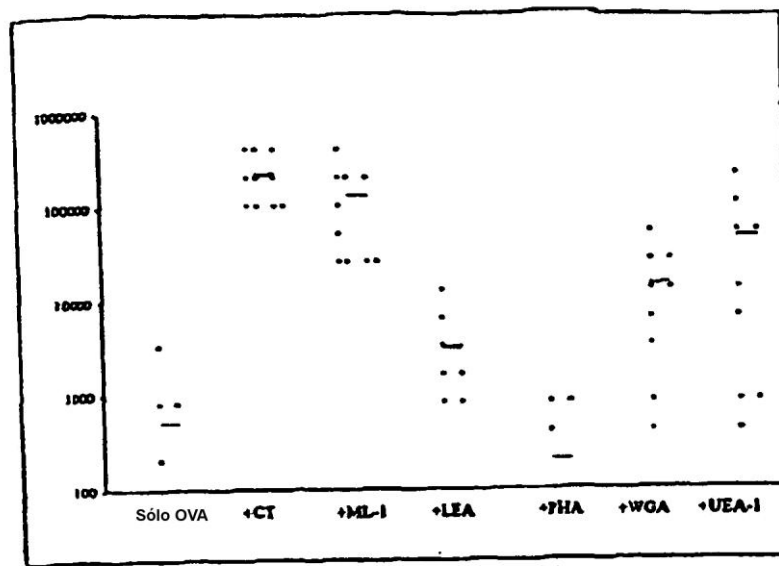


Figura 3

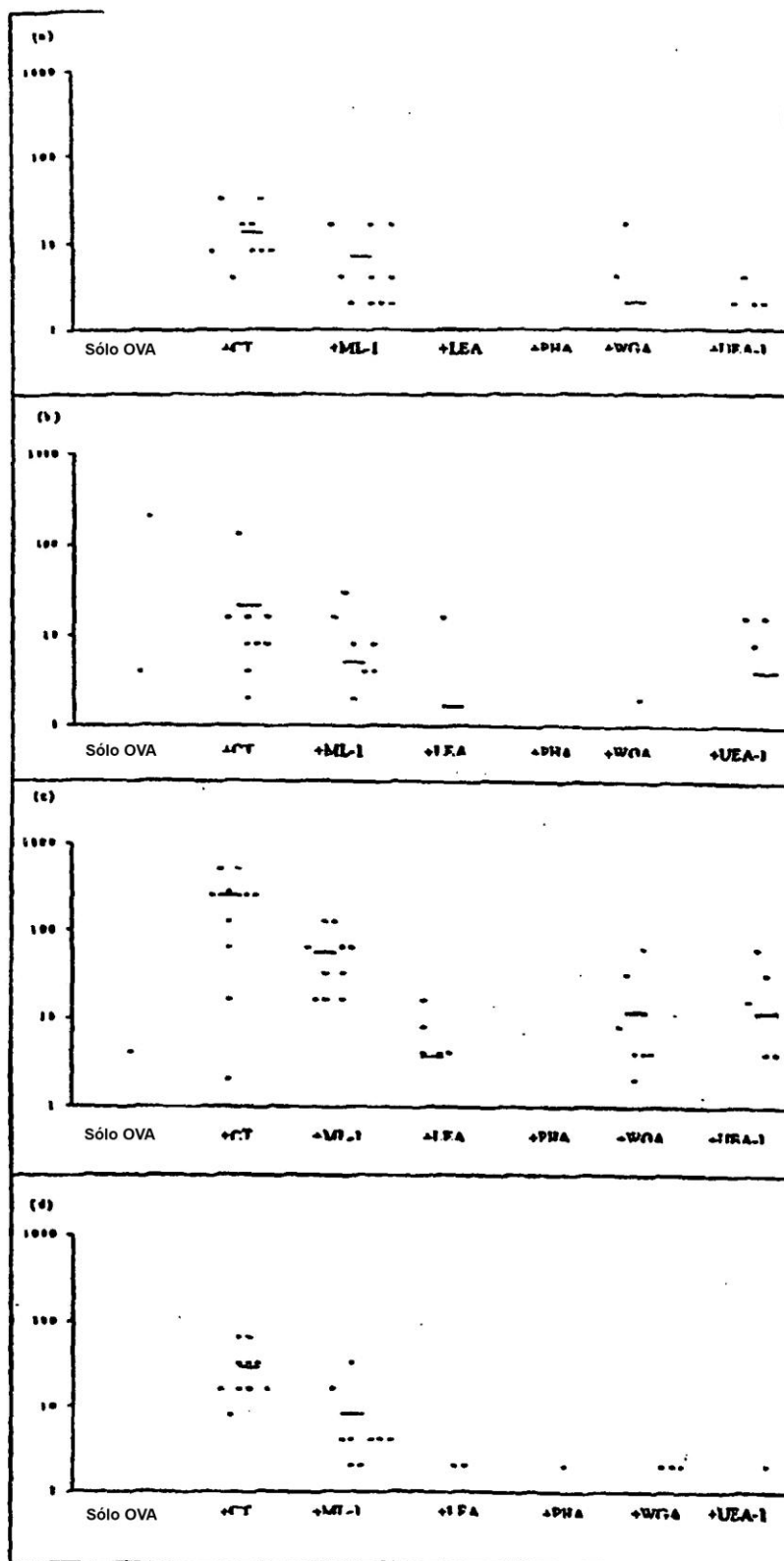


Figura 4

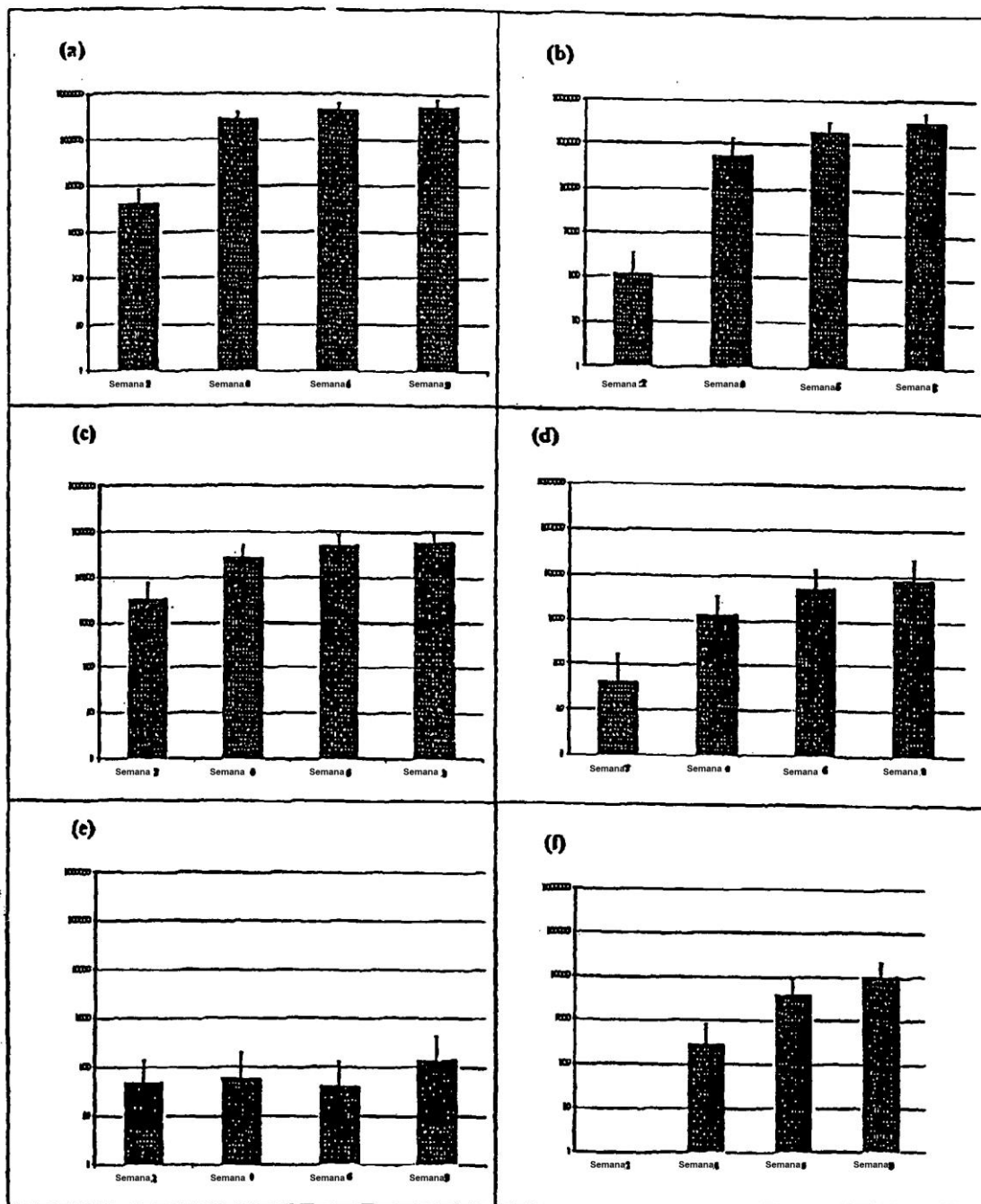


Figura 5

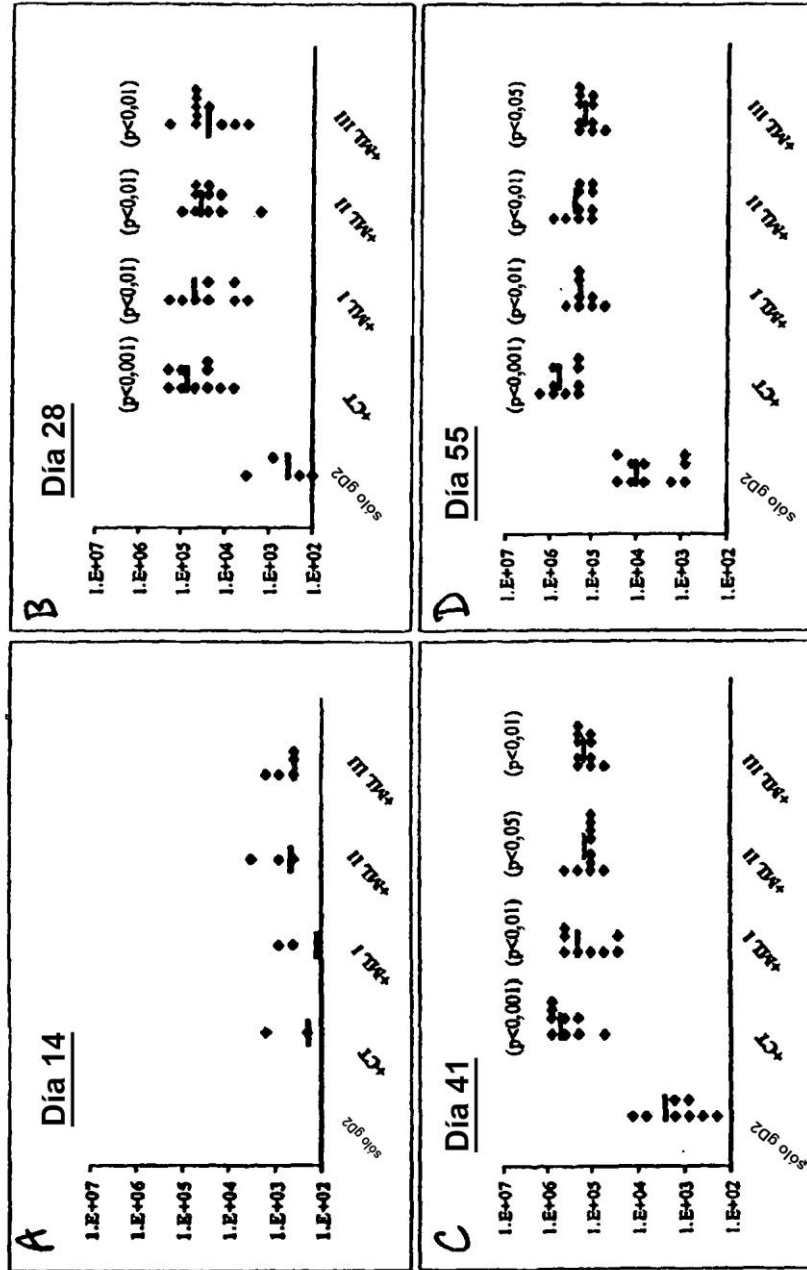


Fig. 6

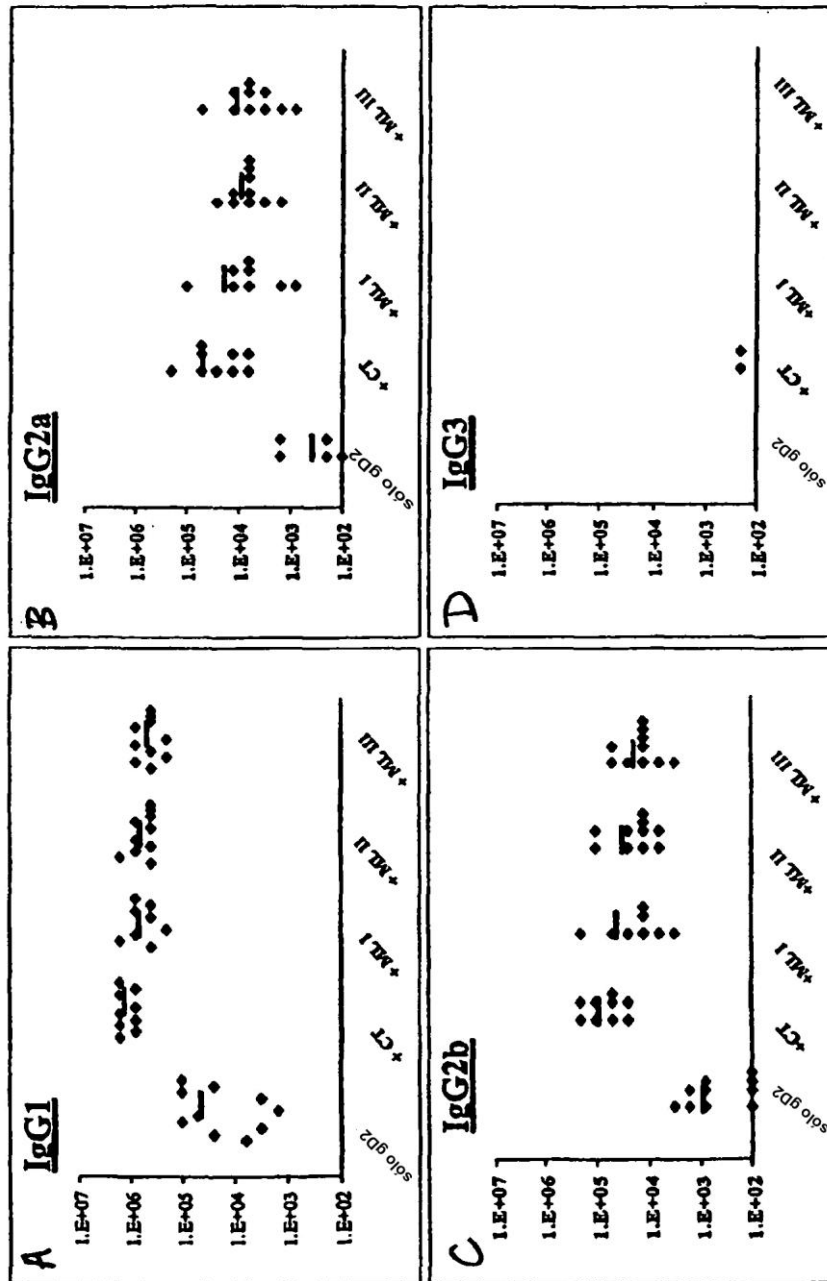


Fig. 7

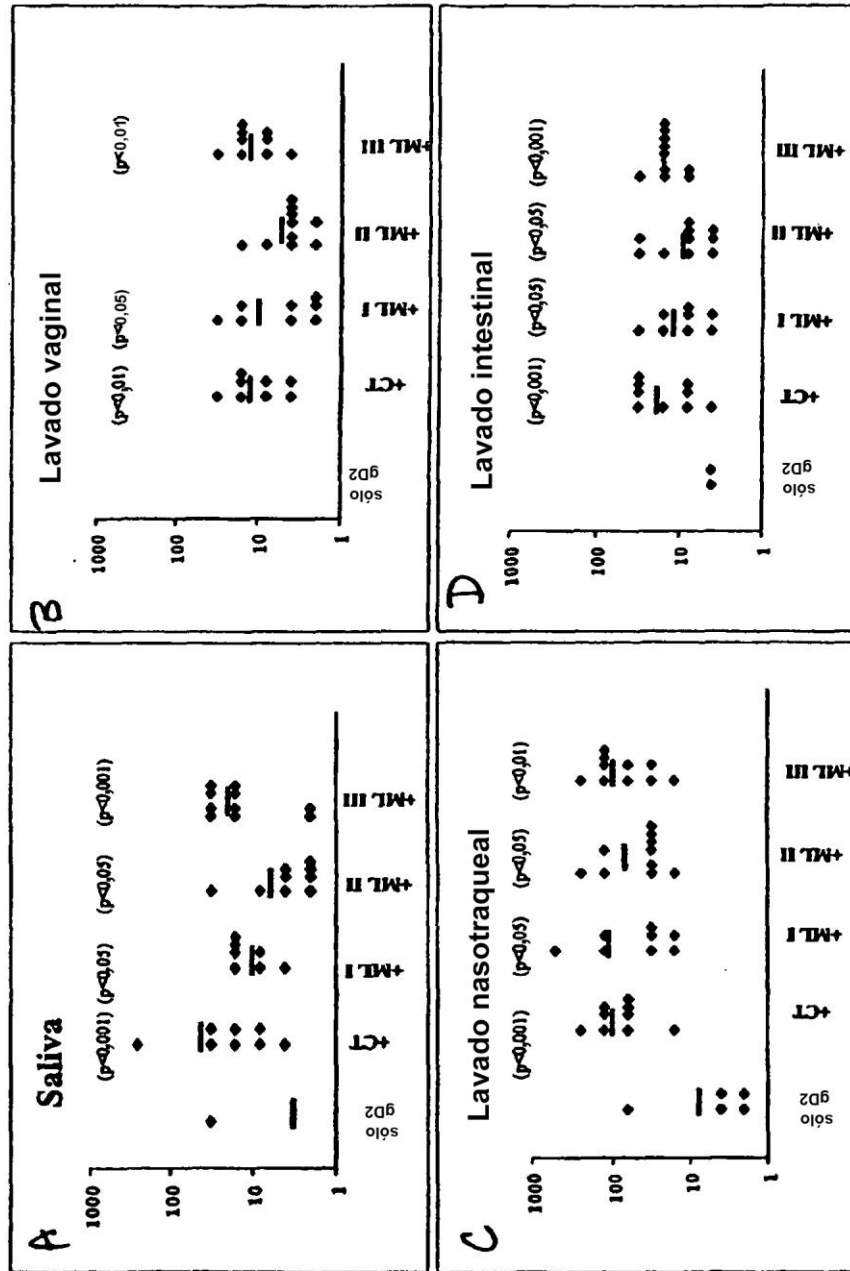


Fig. 8

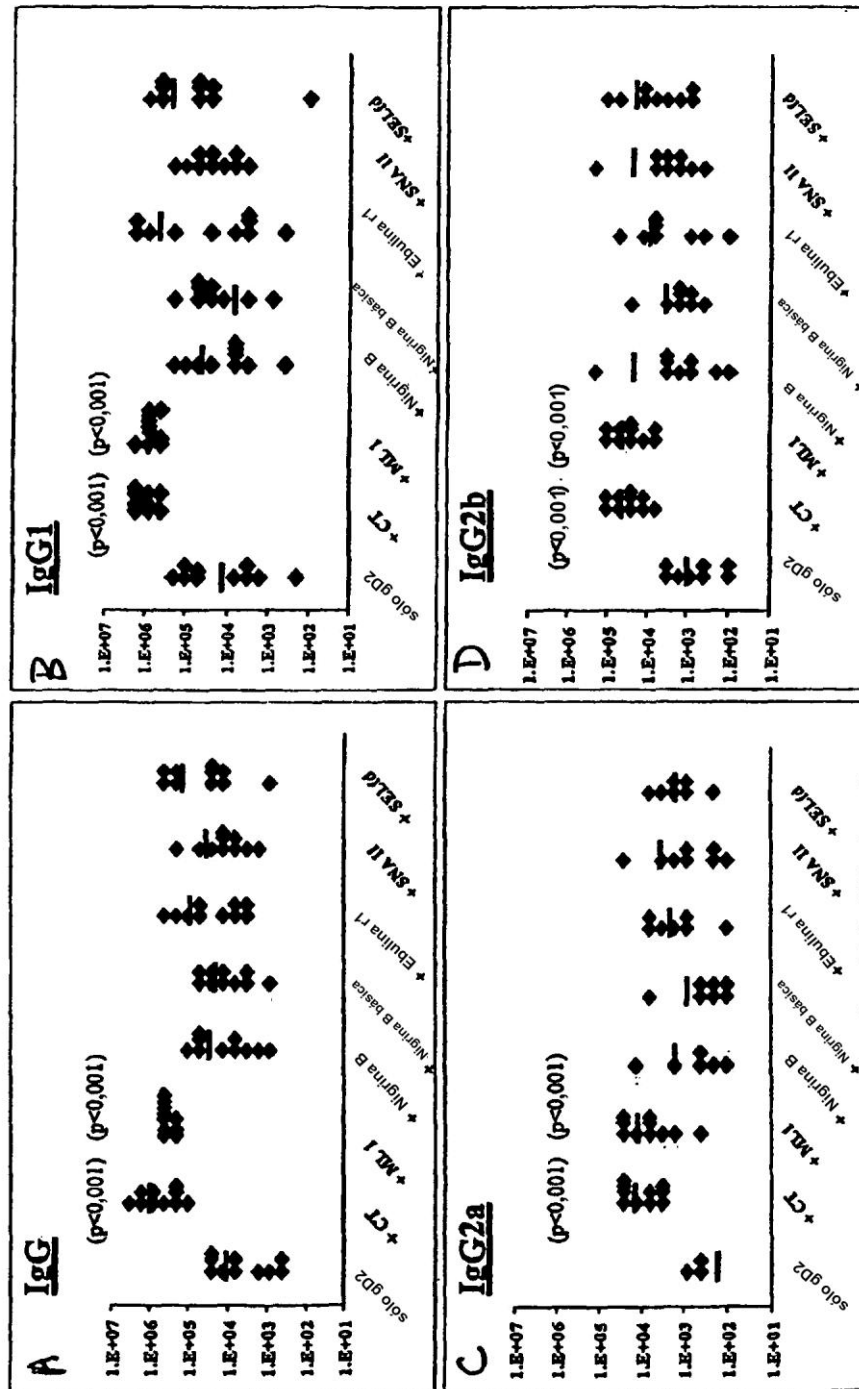


Fig. 9

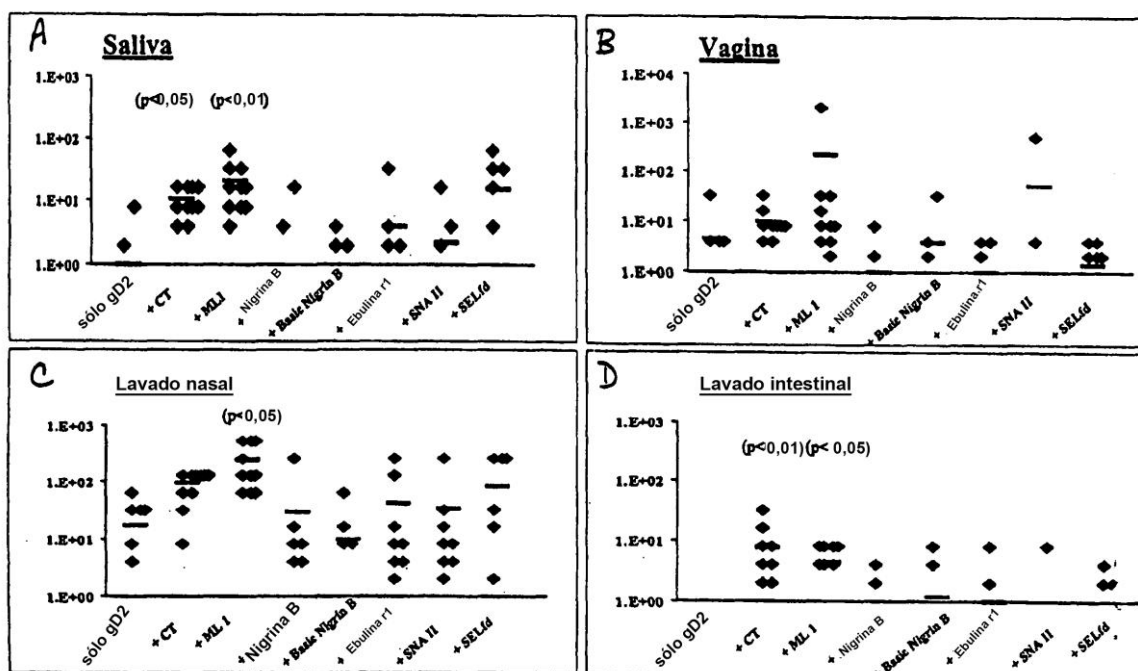


Fig.10

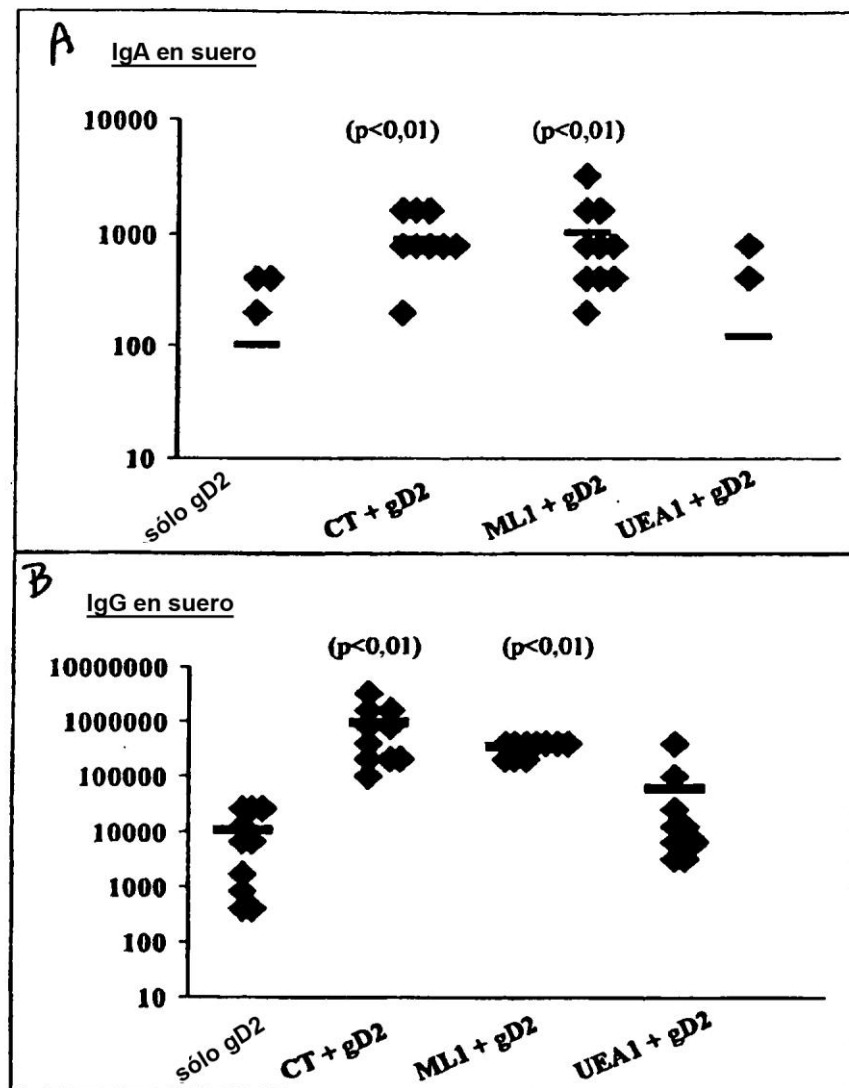


FIG. 11

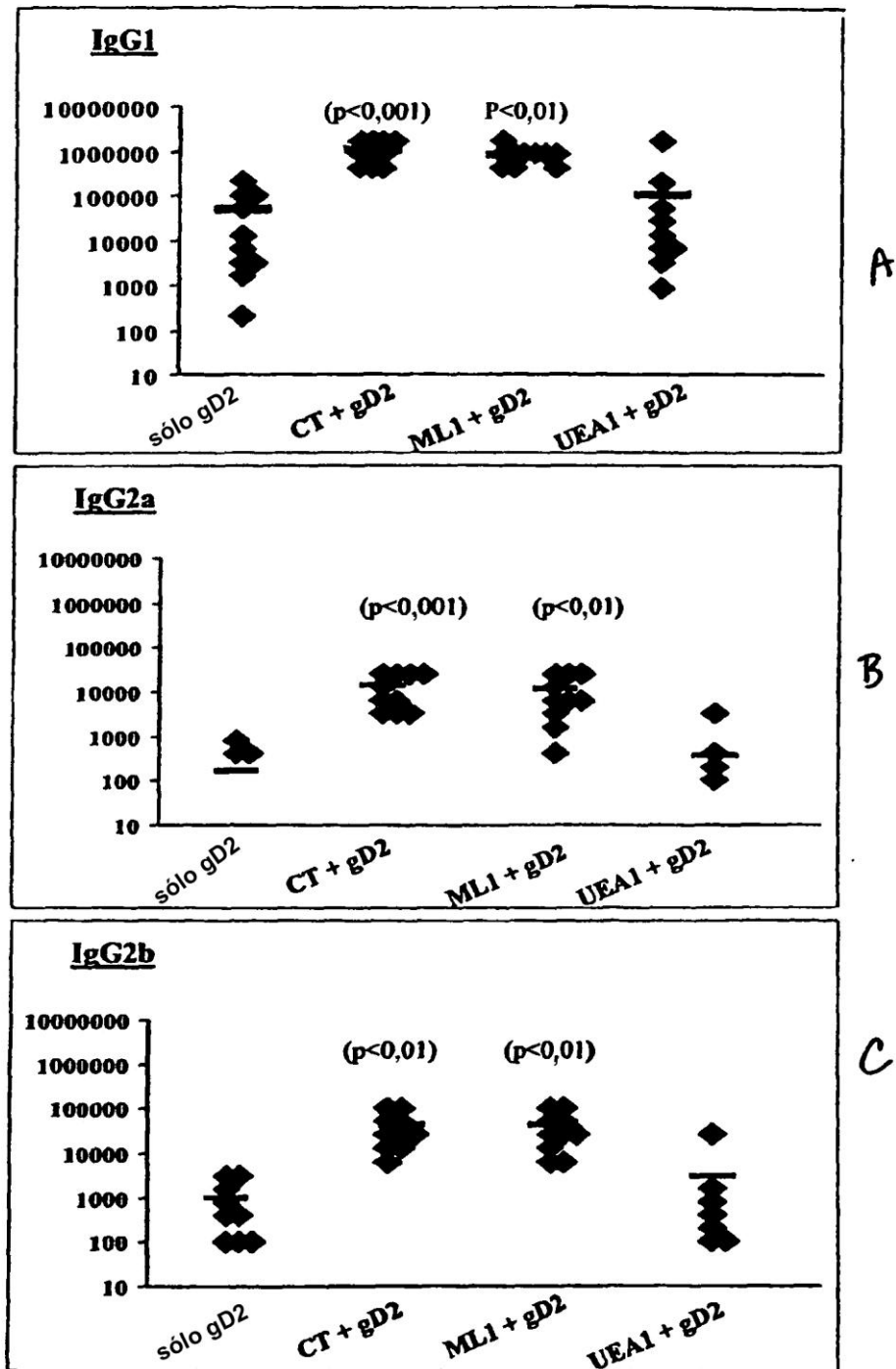


Fig.12

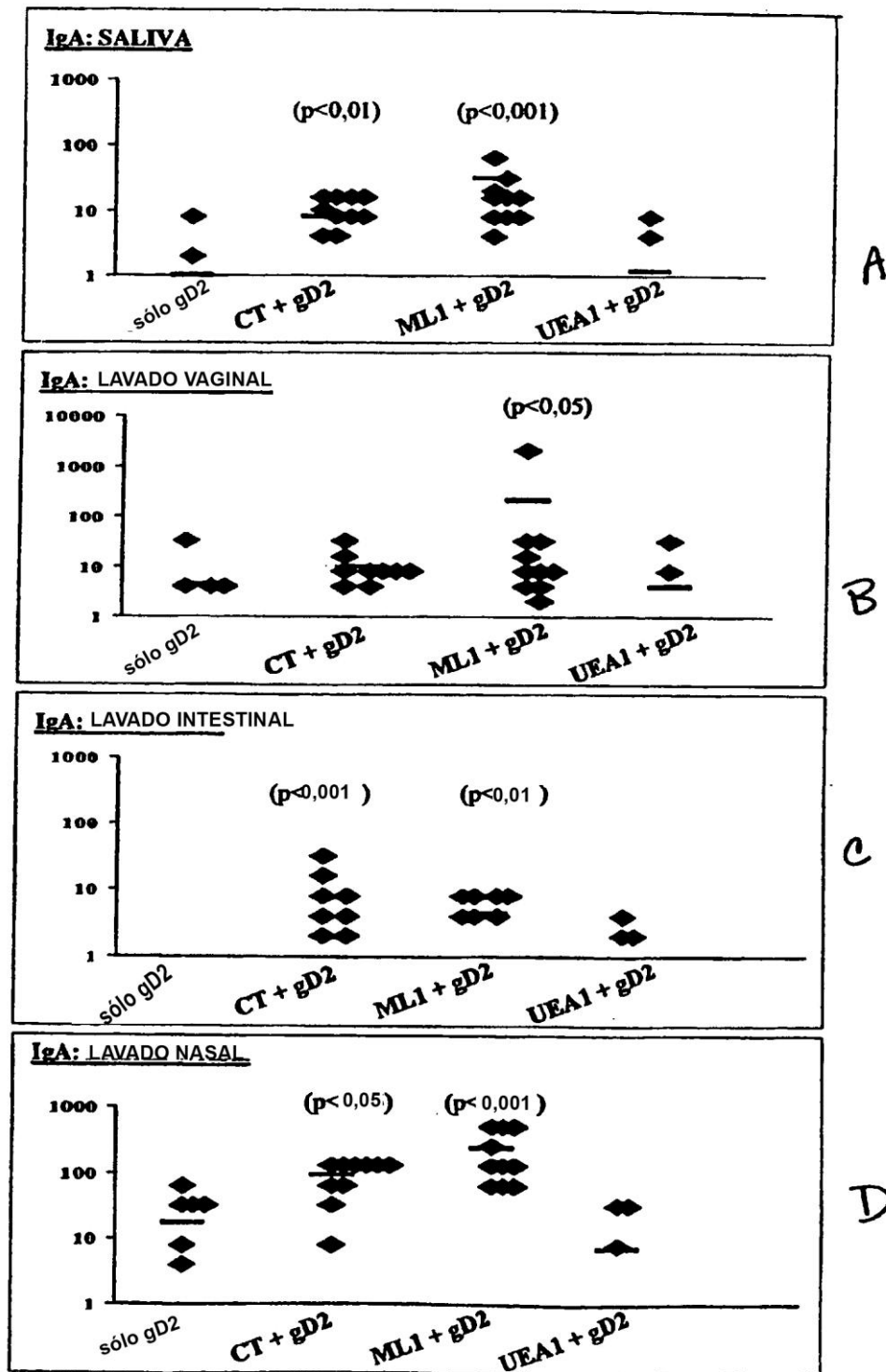


FIG. 13

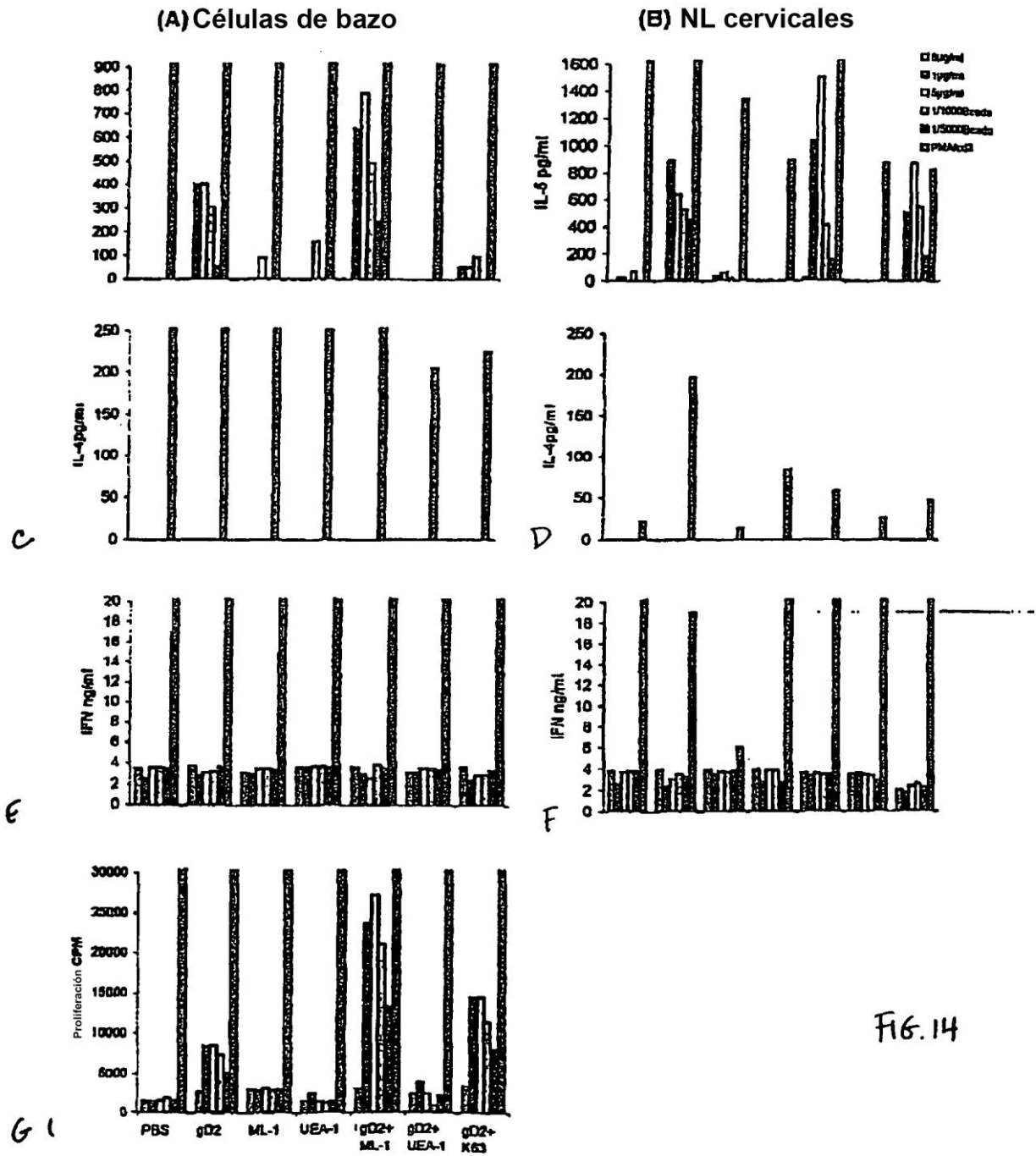


FIG. 14

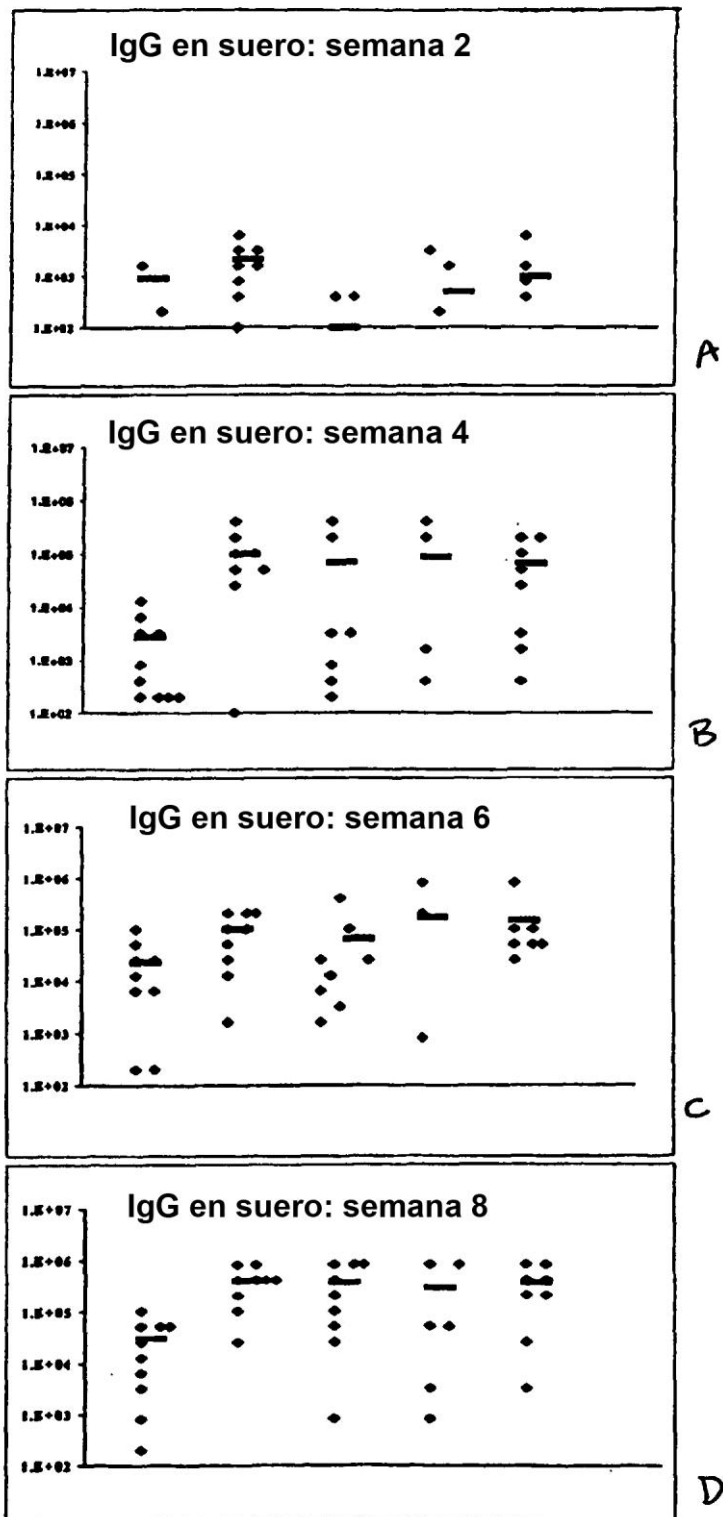


FIG 15

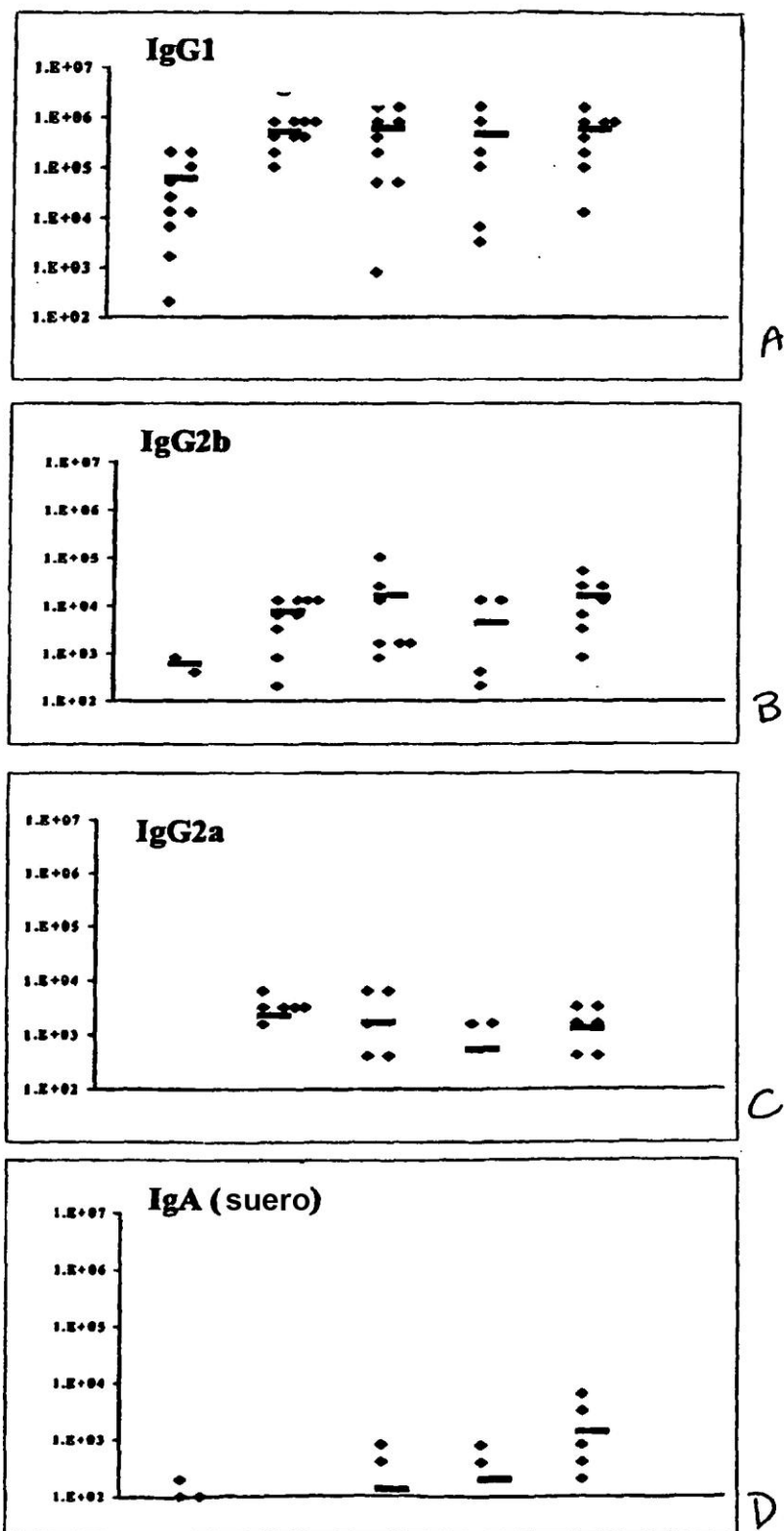


FIG. 16

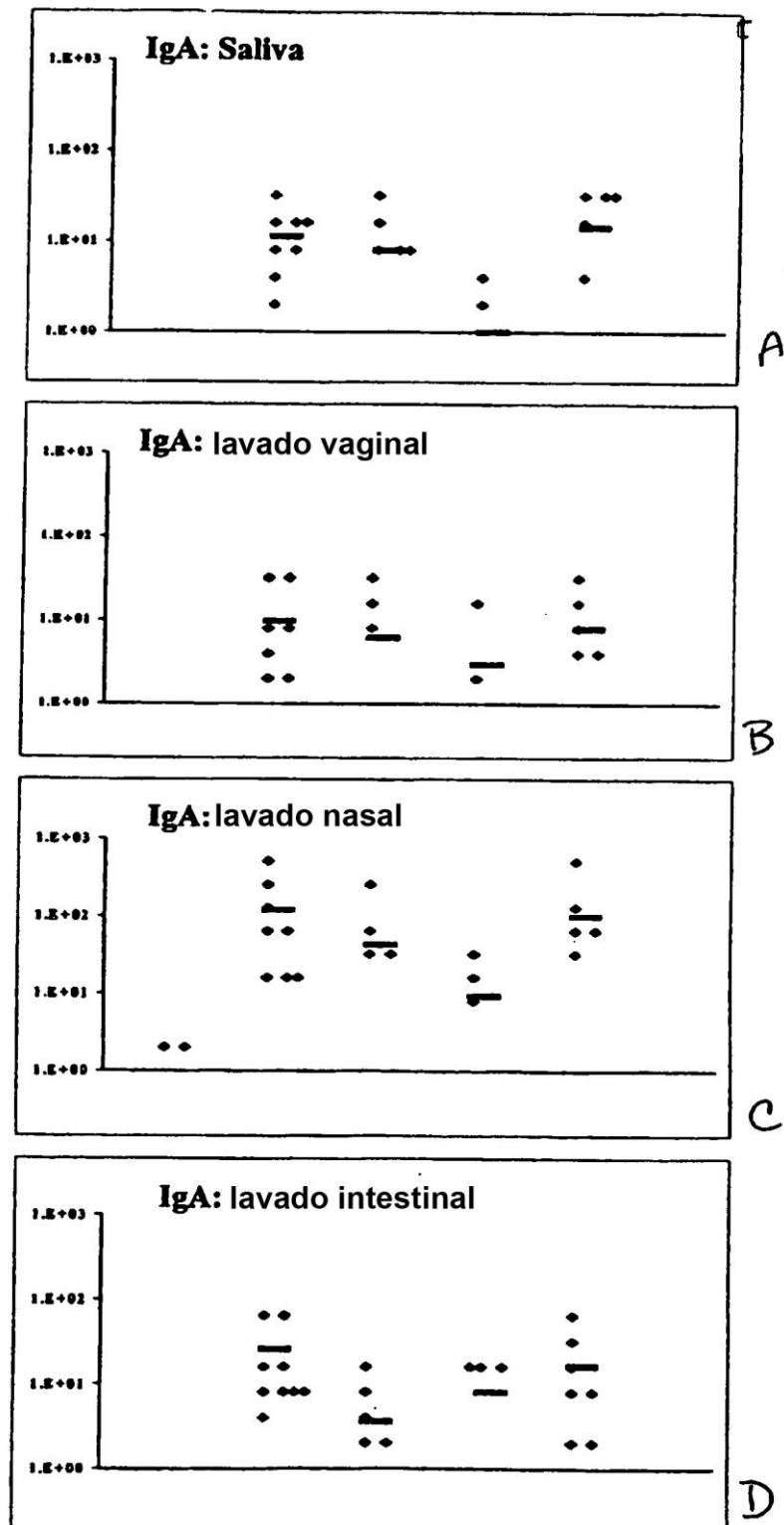


FIG. 17

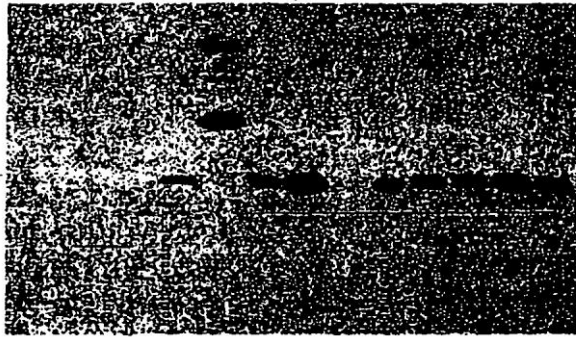


FIG. 18

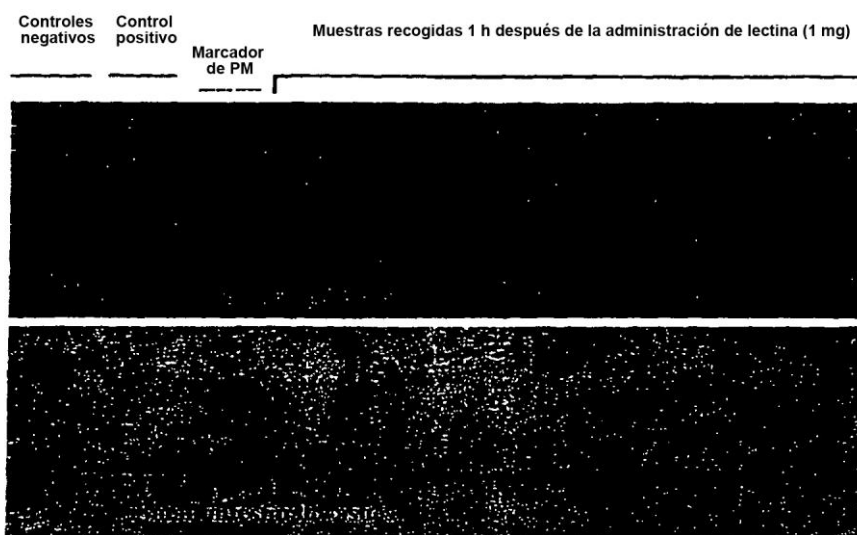


FIG. 19

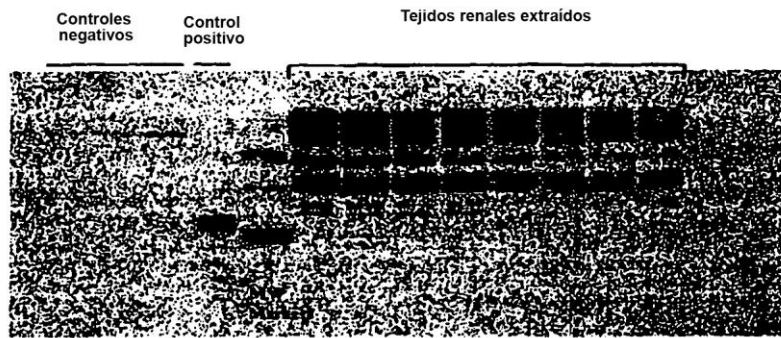


FIG. 20

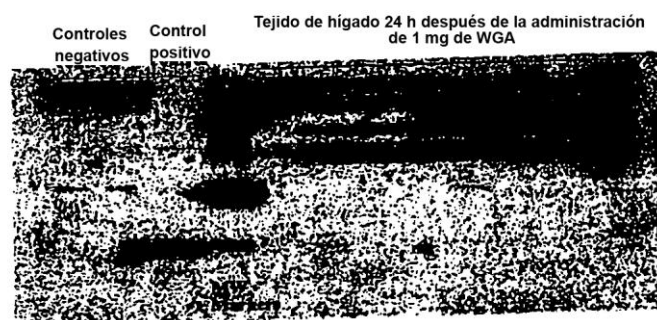


FIG.21

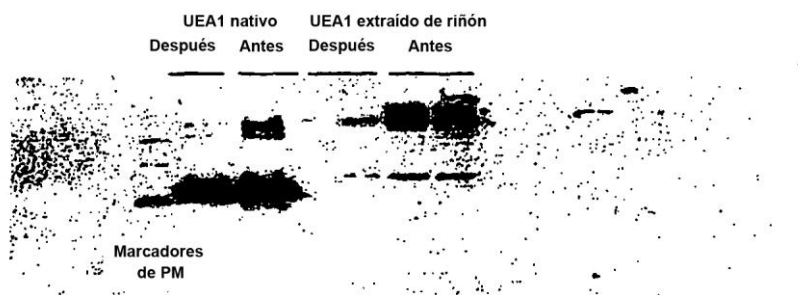


FIG. 22