

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 550**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 31/573 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61P 11/08 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01912024 .5**
96 Fecha de presentación: **02.02.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1259259**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.11.2002**

54 Título: **FORMULACIÓN DE ADYUVANTE PARA ADMINISTRACIÓN EN MUCOSAS.**

30 Prioridad:
23.02.2000 US 511582

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2011

73 Titular/es:
**BIOTEC PHARMACON ASA
STRANDG 3
9008 TROMSO, NO**

72 Inventor/es:
**Raa, Jan;
Berstad, Aud K. H.;
Bakke, Hilde;
Haneberg, Bjorn;
Haugen, Inger Lise;
HOLST, Johan;
Janakova, Liba;
Korsvold, Gro E. y
Oftung, Fredrik**

74 Agente: **de Elizaburu Márquez, Alberto**

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).

ES 2 369 550 T3

DESCRIPCIÓN

Formulación de adyuvante para administración en mucosas

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere en general a adyuvantes para el uso con vacunas; más específicamente, adyuvantes para el uso con vacunas mucosas que no son inmunógenos y que sirven para modular las reacciones inmunitarias hacia los antígenos que están en contacto con las superficies mucosas en seres humanos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las vacunas mucosas están ganando popularidad a escala mundial debido en parte a la comodidad de administración de estas vacunas, a diferencia de los medios de administración tradicionales subcutáneos o de otro tipo, a la comodidad al facilitar la autoadministración de las vacunas mucosas, a diferencia de los retrasos tradicionales asociados a reunir grupos de personas para la administración de las vacunas tradicionales, así como a la reducción y la eliminación final de las agujas hipodérmicas. Un beneficio adicional del desarrollo de vacunas mucosas eficaces es la autoadministración, por lo que se evita la necesidad de personal cualificado para los medios de administración tradicionales.

15

20

Las superficies mucosas son la vía de entrada más habitual de microorganismos que provocan enfermedades en animales y en seres humanos. Un sistema inmunitario especializado, equipado con grandes cantidades de células linfoides, protege estas superficies contra la invasión por microorganismos. El denominado sistema inmunitario de mucosas puede generar respuestas inmunitarias específicas intensas hacia microorganismos patógenos invasores, así como hacia antígenos de vacunas que se administran en las superficies mucosas. Existe un fundamento biológico sólido por el interés creciente tanto en la medicina humana como en la veterinaria hacia las vacunas mucosas que interactúan directamente con esta parte importante del sistema inmunitario. El desarrollo rápido en este campo también está estimulado por las ventajas evidentes de las vacunas que se pueden administrar en forma de aerosoles nasales o tónicos orales, en comparación con las vacunas inyectables. Sin embargo, las vacunas mucosas no se convertirán en alternativas realistas a las vacunas inyectables existentes a menos que se pueda mejorar la eficacia de tales vacunas. El uso de sustancias auxiliares, o adyuvantes, es una de las maneras más prometedoras de aumentar la respuesta de anticuerpos y la eficacia clínica de las vacunas mucosas.

25

30

Los adyuvantes se han usado durante mucho tiempo con las vacunas tradicionales para mejorar la respuesta inmunitaria, lo que permite usar menos vacuna para producir la respuesta inmunitaria.

35

Se ha realizado gran parte del trabajo relacionado con las diferencias entre la vía de inmunización, que compara los medios de inyección más tradicionales con la administración mucosa, y las conclusiones se han aceptado de manera generalizada. Existen pruebas sustanciales que sugieren dos sistemas inmunitarios; un sistema inmunitario periférico y un sistema inmunitario de mucosas. Se cree que estos sistemas funcionan por separado y simultáneamente en la mayoría de las especies, lo que incluye los seres humanos.

40

El centro de la presente solicitud son las vacunas mucosas, y más específicamente una formulación nueva de vacuna y adyuvante por la que el adyuvante debería ser atóxico, no debería alterar la integridad de las membranas mucosas, debería tener características fisicoquímicas que fueran adecuadas para el transporte a través de las células M en los tejidos mucosos, debería activar la inmunidad inespecífica sin inducir la producción de anticuerpos hacia sí mismo (el adyuvante), debería estimular que los linfocitos produzcan anticuerpos dirigidos específicamente hacia los antígenos, no debería inducir tolerancia hacia los antígenos, debería actuar como un vehículo compatible para los antígenos, debería aumentar la inmunidad inespecífica y debería mejorar la eficacia clínica de las vacunas específicas.

45

50

La presente invención describe por primera vez formulaciones de vacunas mucosas con las características deseadas, y presenta pruebas de un auténtico efecto adyuvante mucoso sin una respuesta simultánea de anticuerpos hacia sí mismo. Por lo tanto, se prevé que la formulación de adyuvante mucoso presentada en la presente memoria puede ser una nueva contribución útil para la medicina humana y veterinaria.

55

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La dirección selectiva de los antígenos y los adyuvantes hacia las células M de las superficies mucosas parece ser la manera más prometedora de generar una respuesta inmunitaria secretora, ya que estas células están especializadas en tomar muestras de los antígenos para la exposición directa a las células inmunitarias en los tejidos mucosos del tracto gastrointestinal y respiratorio. Se sabe que el transporte por medio de las células M es más eficaz para las sustancias particuladas que para las sustancias solubles. En contraste con las partículas, las sustancias solubles también se pueden adherir y penetrar hasta otras partes de la membrana epitelial, y por lo tanto interfieren con una variedad más amplia de células inmunocompetentes, y como consecuencia tienen un efecto menos predecible sobre la respuesta inmunitaria que los antígenos particulados y los adyuvantes particulados. La eficacia del transporte de

60

65

las partículas se ve afectada por el tamaño, y posiblemente también por su naturaleza química. Las partículas en el intervalo de tamaños de 1-10 micrometros parecen ser las transportadas de una manera más eficaz.

5 La búsqueda de vacunas más seguras y mejores, tanto para inyección como para administración mucosa, se ha concentrado en definir y producir antígenos purificados que inducen una respuesta elevada de anticuerpos y un alto grado de protección. La mayoría de los antígenos de vacunas purificados son, sin embargo, inmunógenos débiles cuando se aplican sobre las superficies mucosas. Por lo tanto, se ha hecho necesario proporcionar un adyuvante para aumentar la capacidad de los antígenos de las vacunas mucosas de inducir una respuesta de anticuerpos eficaz. Existen varias sustancias que tienen esta capacidad. Sin embargo, todos los adyuvantes que se han ensayado 10 en cuanto a su capacidad de aumentar la eficacia de las vacunas mucosas tienen una o más desventajas. Los defectos más serios de los productos existentes son 1) efectos tóxicos inaceptables, 2) inducción de la producción de anticuerpos hacia el propio adyuvante, 3) inducción de tolerancia inmunológica hacia los antígenos de la vacuna.

15 Varias sustancias con características lipófilas o de otro tipo que confieren una actividad de tensoactivo pueden incrementar la absorción a través de las membranas mucosas, por lo que se incrementa la inmunogenicidad mucosa de los antígenos de la vacuna. Tales excipientes se han mezclado y se han ensayado como adyuvantes nasales para los toxoides de difteria y tétano, y se han comparado con una vacuna adsorbida en aluminio administrada de forma nasal en un ensayo clínico en seres humanos. Se demostró un efecto adyuvante evidente, pero los efectos secundarios locales fueron importantes, probablemente provocados por el efecto de los excipientes sobre la membrana epitelial. La alteración de la integridad de la membrana también genera problemas relacionados con las respuestas inmunitarias hacia otros elementos distintos de los antígenos de la vacuna presentes de manera concomitante en la superficie mucosa.

25 El cólera es un inmunógeno mucoso excepcionalmente potente, así como un adyuvante potente para las respuestas de anticuerpos mucosas y sistémicas hacia antígenos no relacionados aplicados simultáneamente y en el mismo sitio. El mecanismo para su actividad adyuvante es complejo, y puede incluir la captación aumentada del antígeno a través de las células epiteliales por medio de su subunidad B, la activación de las células presentadoras de antígenos, y la estimulación del cambio de las células B. Sin embargo, el efecto directo tanto de CT como de CTB (toxina del cólera B) sobre las células T *in vitro* es inhibitorio, lo que se ha sugerido como un posible mecanismo para la acción adyuvante, así como para la inducción de tolerancia. 30

Se ha demostrado que el acoplamiento del antígeno a CTB recombinante aumenta la tolerancia sistémica tanto al propio CTB como al antígeno conjugado tras la administración oral. El efecto aparente de CTB como adyuvante en la administración nasal comparado con la tolerogenicidad en la administración intestinal puede ser debido a cantidades muy pequeñas de la holotoxina que contaminan las preparaciones comerciales de CTB, lo que restituye la actividad adyuvante. Sin embargo, un informe reciente que compara el CTB comercial y recombinante mostró efectos adyuvantes de CTB recombinante en la administración nasal, tanto al acoplar el antígeno de la vacuna a CTB como al mezclarlo con CTB. 35

40 Se ha demostrado que CT/CTB induce una inmunidad protectora tras la administración nasal con varios antígenos de vacuna diferentes. Además, se pueden inducir respuestas de memoria inmunológica a largo plazo hacia CT así como hacia el antígeno asociado. Debido a que la holotoxina "natural" es demasiado tóxica para el uso como adyuvante mucoso en seres humanos, se han desarrollado recombinantes nuevos del CT desprovistos de las propiedades tóxicas. Sigue sin estar establecido, sin embargo, si la acción adyuvante de CT se puede separar de su toxicidad. CTB se ha considerado atóxico, pero indujo efectos irritativos sustanciales cuando se probó de manera intranasal a dosis elevadas en seres humanos. 45

CT induce inmunidad hacia sí mismo así como hacia el antígeno mezclado, lo cual puede limitar su efecto adyuvante al usarlo repetidamente. Unos cuantos estudios que abordaron este problema demostraron que la inmunidad preexistente hacia este adyuvante puede inhibir las respuestas séricas hacia el antígeno, más que las respuestas mucosas locales. 50

Los estudios recientes que usaban CT como adyuvante para preparaciones de vacunas bacterianas con células completas han demostrado limitaciones adicionales en su acción adyuvante, especialmente en la administración nasal. Esto confirma que el mecanismo adyuvante de CT es diferente probablemente del mecanismo de los adyuvantes particulados, y que tiene una actividad adyuvante diferente en las diferentes vías de inmunización. 55

La enterotoxina termolábil HLT de *Escherichia coli* tiene una estructura A-B similar a CT, y un 80% de homología en la secuencia de aminoácidos. El mecanismo de la acción adyuvante de HLT no se ha estudiado de manera tan exhaustiva como para CT, y puede ser un poco diferente. Aún así, se ha sugerido que HLT puede impedir la tolerancia mucosa por medio de su efecto sobre los linfocitos intraepiteliales de la misma manera que CT. HLT es un poco menos tóxica que CT, y, como con CT, las cantidades muy pequeñas de la holo-toxina aplicadas con la subunidad B pueden restituir su acción adyuvante sin toxicidad. 60

65 HLT es un adyuvante mucoso potente, capaz de inducir respuestas inmunitarias protectoras distribuidas de forma generalizada tras la administración intranasal, y parece ser tan eficaz como CT en la inducción de inmunidad pro-

5 tectora. Es un adyuvante eficaz para los anticuerpos séricos y mucosos hacia más de un antígeno administrado simultáneamente con HLT. Se han construido mutantes atóxicos con la acción adyuvante preservada. Sin embargo, todavía hay que establecer si estos mutantes pueden inducir una inmunidad protectora, y si la acción adyuvante se puede separar de la toxicidad. Cuando se probó LTB recombinante, una subunidad de HLT, complementada con una cantidad muy pequeña de LT recombinante de manera intranasal como adyuvante para la gripe en un estudio con seres humanos, el efecto adyuvante pareció más bien modesto, y los efectos secundarios locales indeseados fueron importantes.

10 LTB recombinante acoplado a un antígeno aplicado de manera nasal puede inducir una tolerancia periférica de la misma manera que CTB de manera oral.

15 Otras toxinas bacterianas o derivados, tales como la toxina pertussis, también se parecen a la toxina del cólera, y se han producido mutantes atóxicos. La subunidad B atóxica indujo inmunidad protectora hacia la gripe tras administración nasal en un estudio, y un mutante atóxico se comparó con CT en otro. El mutante fue como mínimo tan eficaz como la toxina pertussis en cuanto a la inmunidad protectora, aunque menos inmunógeno que CT en cuanto al aumento de los anticuerpos sistémicos. La actividad adyuvante de la toxina pertussis se conoce muy bien, y se atribuye a sus efectos mitógenos.

20 El dipéptido de muramilo y los derivados son componentes derivados de la pared celular de las micobacterias, y se ha demostrado que estas sustancias inducen el aumento inespecífico de las respuestas inmunitarias cuando se administran de manera nasal antes de la exposición.

25 Se ha demostrado el mismo principio de acción con los derivados de quitina y la citocina GM-CSF. Se ha probado la citocina IL-2 de manera intranasal encapsulada en liposomas, e indujo una inmunidad protectora, mientras IL-4 fue ineficaz. IL-2 también fue superior a LTB en la inducción de inmunidad protectora cuando se combinó con el antígeno de la vacuna, a pesar de los niveles de anticuerpo comparables. IL-5 e IL-6 se han atrapado en microesferas y han aumentado las respuestas mucosas de IgA al aplicarlas de manera ocular.

30 **Liposomas**

Los liposomas son vesículas lipídicas artificiales que consisten en capas de lípidos, en los que se puede encapsular el antígeno dentro del compartimento acuoso del liposoma, o asociarlos con el antígeno en la superficie por medio de técnicas de acoplamiento superficial. Los liposomas se pueden preparar fácilmente y de manera económica a gran escala y en condiciones que son suaves para los antígenos atrapados. No inducen respuestas inmunitarias hacia sí mismos, y se usan en seres humanos para los fármacos administrados de manera parenteral.

35 Su acción adyuvante mucosa se atribuyó primero a su naturaleza particulada, por lo que implicaba una actividad portadora. La función portadora implica algún tipo de asociación física entre el portador y el antígeno, al menos la administración simultánea del antígeno y el portador. Sin embargo, se demostró en un estudio que los liposomas vacíos administrados hasta 48 horas antes de la inmunización intranasal con un antígeno en forma de subunidad podían inducir una inmunidad incrementada.

40 Cuando se prueba de manera intranasal con diferentes antígenos, los resultados sobre su efecto adyuvante son contradictorios. La mayoría de los estudios han demostrado el aumento de las respuestas humorales sistémicas y secretoras, con función protectora. Sin embargo, se ha señalado que estos estudios emplearon anestesia durante la deposición de la vacuna de forma nasal, y este procedimiento permite que la vacuna se extienda por todo el árbol respiratorio, lo que incluye los pulmones. Debido a que esto implica otras estructuras linfo-epiteliales que las del tejido nasal, puede dar como resultado respuestas inmunitarias diferentes de las que se inducen cuando el antígeno se deposita únicamente en la cavidad nasal. De hecho, se sugirió que los liposomas pueden ejercer su actividad adyuvante a través de su efecto sobre los macrófagos alveolares, que normalmente son células presentadoras de antígenos pobres. En los estudios en los que los liposomas se usaron de manera intranasal en animales sin anestésiar, los efectos adyuvantes no se demostraron de forma coherente. Un estudio con liposomas preparados a partir de membranas virales, que quizás se podrían clasificar más como proteosomas que como liposomas, demostró un efecto adyuvante para la protección contra la gripe en animales sin anestésiar. Así, sigue sin estar establecido el mecanismo de la actividad adyuvante de los liposomas. Además, debido a que los liposomas parecen ser seguros en su uso, también se debería estudiar la acción adyuvante mucosa en estudios con seres humanos.

55 **ISCOMS (complejos inmuno-estimulantes)**

60 Las matrices ISCOM son estructuras en forma de jaula cargadas negativamente, creadas mediante la interacción de los glicósidos saponinas con colesterol y fosfolípidos, en las que se pueden incorporar antígenos como proteínas. Se usan de manera generalizada en las vacunas veterinarias, y se ha demostrado que inducen tanto inmunidad humoral como respuestas mediadas por células T citotóxicas (CTL). Ha habido ciertos problemas por su toxicidad, posiblemente relacionada con el contenido del adyuvante incorporado de saponina, que tiene actividad de tensoactivo.

65

Durante los últimos años, se han probado los ISCOMS como adyuvantes mucosos. Sin embargo, no se demostró claramente la actividad adyuvante cuando se llevó a cabo una inmunización nasal en el animal experimental sin anestesiar.

5 Microesferas poliméricas biodegradables

Las microesferas poliméricas biodegradables se refieren normalmente a partículas que consisten en polímeros de DL-lactida y glicolida (PLG) que se biodegradan *in vivo* hasta los ácidos láctico y glicólico mediante hidrólisis. Los antígenos de la vacuna se pueden atrapar en la partícula, cuyo tamaño y, por tanto, cuya velocidad de degradación y distribución corporal se pueden controlar. Las partículas de PLG no son inmunógenas, y se ha demostrado que son seguras para el uso en seres humanos durante la administración parenteral de fármacos. Sin embargo, existen problemas relacionados con el procedimiento de encapsulación, que implica la exposición a disolventes orgánicos con la posibilidad de que se dé la desnaturalización del antígeno encapsulado, así como de que posiblemente se dejen cantidades muy pequeñas de estos disolventes dentro de las partículas. También se pueden dar cambios en el antígeno en el medio ácido dentro de la partícula tras la degradación hidrolítica *in vivo*.

La mayoría de los estudios de inmunización mucosa con antígenos de vacuna atrapados en PLG han usado la vía oral o gástrica, mientras la administración nasal se ha usado en algunos de ellos. Aumentaron las respuestas inmunitarias con función protectora, lo que incluye las respuestas de memoria, y en dos estudios también se indujeron respuestas mediadas por células. Las respuestas de CTL, sin embargo, se indujeron de manera más consistente con ISCOMS que con partículas de PLG en un estudio con administración oral del antígeno. Otro estudio demostró anticuerpos secretores incrementados con citocinas atrapadas en las partículas, aplicadas en el ojo.

Se reivindica que otras partículas tales como las partículas de poli(cianoacrilato de alquilo) son partículas biocompatibles que adsorben proteínas y han demostrado acciones adyuvantes tras la inmunización oral. Se han preparado microesferas preparadas a partir de α -ácidos, y también han demostrado actividad adyuvante tras la administración oral. Ninguna de estas partículas ha demostrado una inducción de inmunidad protectora, ni se han probado en seres humanos.

Los proteosomas son partículas, que consisten en vesículas de 60 a 100 nm, que se prepararon en un principio a partir de proteínas de la membrana externa de meningococos. Otras preparaciones de proteínas de membrana de diferentes bacterias o virus pueden tener características y actividades similares, y también se pueden denominar proteosomas. Se ha demostrado que los proteosomas son seguros para el uso en seres humanos en la administración parenteral como antígeno de vacunas, se preparan fácilmente a gran escala, y se pueden unir a péptidos sintéticos o proteínas que son inmunógenos débiles en las superficies mucosas. Además de su naturaleza particulada, pueden ejercer la actividad adyuvante por medio de su efecto sobre las células B. Su naturaleza lipófila puede implicar también el aumento de la absorción a través de las membranas biológicas.

Se han probado los proteosomas como adyuvantes mucosos en la administración nasal con lipo-polisacáridos bacterianos, enterotoxina B estafilocócica y proteínas virales. Algunos de estos estudios demostraron también que estas partículas podrían incrementar las respuestas inmunitarias protectoras a largo plazo. Fueron como mínimo tan buenos adyuvantes como la toxina del cólera. Un estudio reciente mediante el uso de vesículas de la membrana externa de meningococos como vacuna nasal en seres humanos demostró la inmunogenicidad, así como la ausencia de efectos secundarios. Además, se indujeron anticuerpos bactericidas que se correlacionaban con la protección clínica, pero con una actividad bactericida mayor de la esperada a partir de las medidas mediante ELISA de los títulos de anticuerpos específicos.

Las bacterias inactivadas también tienen potencial como adyuvantes particulados para la aplicación mucosa. Esto se ha demostrado en un estudio reciente con bacterias meningocócicas y *pertussis*, en el que los anticuerpos sistémicos y secretores hacia el virus de la gripe inactivado aumentaron en gran medida cuando se administraron de manera intra-nasal en ratones sin anestesiar. Las denominadas células bacterianas fantasma, conseguidas mediante lisis mediada por fagos, se han mencionado como portadores de vacunas potenciales para la administración mucosa.

Las toxinas bacterianas son adyuvantes mucosos potentes, pero, sin embargo, son demasiado tóxicos para usarlos en su forma nativa. Los derivados atóxicos y los agentes tensoactivos solubles pueden tener actividad adyuvante mucosa debido a la absorción incrementada del antígeno de la vacuna a través de la membrana mucosa epitelial. Sin embargo, existen problemas sin resolver relacionados con el mecanismo de la acción adyuvante frente a la tolerogenicidad de estos agentes, así como por los efectos secundarios cuando se usan en ensayos clínicos con seres humanos. La absorción mediada por las células M de los adyuvantes particulados parece una manera más fiable de inducir una respuesta inmunitaria tras la administración mucosa de antígenos de vacunas no proliferantes. Las partículas inertes como los liposomas, ISCOMs y las microesferas biodegradables muestran potencial para su uso en seres humanos por su historial de seguridad. Sin embargo, su efecto adyuvante en la administración nasal todavía se tiene que verificar, preferiblemente en estudios con seres humanos. Las partículas derivadas de bacterias, como los proteosomas y las bacterias en forma de células completas que se han probado nasalmente en seres humanos

sin efectos secundarios importantes, son adyuvantes mucosos potentes en animales. En la actualidad, tales partículas, aunque inmunógenas hacia sí mismas, parecen ser los adyuvantes mucosos más prometedores.

5 El documento US-A-5401727 describe un proceso para estimular el sistema inmunitario de animales acuáticos de la clase Osteichthyes y el subfilo Crustacea que comprende administrar una cantidad eficaz de un glucano de la pared celular de levadura compuesto de unidades de glucopiranosas unidas predominantemente mediante enlaces β -1,3 glicosídicos, que tienen al menos una rama que parte de ellas de unidades de glucopiranosas unidas mediante enlaces β -1,6 glicosídicos.

10 El documento EP-A-0384323 describe un β -1,3 glucano que tiene una cadena principal unida por enlaces β -1,3 con una cadena lateral de glucosa simple unida por enlaces β -1,6 administrado a un pez tratado con una vacuna.

15 El documento US-A-5032401 describe la incorporación de un fármaco en una partícula completamente de β -glucano y su administración a un individuo.

Sería un avance en la técnica si se pudieran superar los problemas reconocidos asociados a los adyuvantes y al uso de los mismos en la inmunización mucosa o las vacunaciones mucosas.

20 Por lo tanto, la presente invención proporciona un glucano que comprende monómeros de glucosa unidos entre sí en cadenas ramificadas mediante uniones β -1,3 y uniones β -1,6 para el uso en la modulación de las respuestas inmunitarias humanas hacia una vacuna vírica o bacteriana que se pone en contacto con, o que se administra sobre, una superficie mucosa, en el que dicho glucano se administra también sobre una superficie mucosa y en el que el glucano y la vacuna se co-administran. Sorprendentemente, se ha demostrado que el adyuvante de glucano anterior aumenta la eficacia de las formulaciones de vacunas mucosas que incluyen, pero sin limitación, las vacunas para el virus de la gripe, las vacunas para las alergias y las vacunas para el uso en el tratamiento de la artritis.

25 Las vacunas mucosas y el adyuvante del polisacárido beta-1,3/beta-1,6 (glucano) se pueden administrar de manera oral, nasal, rectal, vaginal, por medio de administración gástrica o por cualquier otro medio por el cual se permita que la vacuna y el adyuvante entren en contacto con las superficies mucosas.

30 **Preparación de Adyuvantes para las Vacunaciones Mucosas (Administración)**

Producto micro-particulado. Este producto se preparó según el procedimiento descrito en la patente de EE.UU. n°: 5.401.727, mediante extracciones repetidas en álcali y ácido de *Saccharomyces cerevisiae* seco. El procedimiento de extracción descrito elimina los componentes citoplasmáticos del interior de las células de levadura, así como los polisacáridos que contienen manosa y los proteoglicanos que están en la superficie celular. El producto preparado según el procedimiento descrito previamente consiste en un beta-1,3 beta-1,6-glucano con un tamaño de partícula de 2-5 micrometros. La estructura química de este micro-particulado de beta-1,3 beta-1,6-glucano se caracteriza por un 83% de glucosa unida de forma beta-1,3, un 6% de glucosa unida de forma beta-1,6 y un 5% de glucosa unida de forma beta-1,3,6, y es una cadena de beta-1,3-glucano con glucosa unida de forma beta-1,3,6 en los puntos de ramificación. El producto micro-particulado se preparó en forma de una suspensión al 3% (p/v) (suspensión de reserva) en agua destilada estéril y se conservó con formaldehído al 0,3%. El producto adyuvante micro-particulado se preparó a partir de esta suspensión de reserva mediante centrifugación y re-suspensión en agua destilada estéril para eliminar el formaldehído, seguido de dilución hasta concentraciones adecuadas para la administración mucosa.

45 **Producto micro-particulado tratado con enzima.** En este producto, las cadenas laterales de la glucosa unida de forma beta-1,6 en el producto micro-particulado se habían eliminado selectivamente mediante tratamiento enzimático con una enzima que actúa específicamente sobre las uniones beta-1,6 en una cadena de poli-glucosa, según la patente noruega n° 300 692: El producto micro-particulado (0,2 gramos), preparado como en la pat. de EE.UU. n°: 5.401.727, se suspendió en 40 ml de tampón de acetato amónico 50 mM de pH 5,0 y se mezcló con 20 unidades de la enzima beta-1,6-glucanasa. La mezcla se agitó continuamente durante 6 horas a 37 grados centígrados, y la acción de la enzima se paró mediante ebullición durante 5 minutos. Las partículas residuales tratadas con enzima se lavaron repetidamente en agua destilada estéril mediante centrifugación y re-suspensión. El producto resultante es un beta-1,3-glucano ramificado con cadenas laterales de beta-1,3-glucano conectadas por uniones de forma beta-1,6 en los puntos de ramificación, y sin glucosa unida de forma beta-1,6 en las cadenas laterales que se prolongan desde los puntos de ramificación.

60 **Producto solubilizado.** Este producto tiene la misma composición química que el producto particulado producido como se describió anteriormente. La diferencia es que las partículas se han roto hasta agregados moleculares más pequeños que se disuelven en agua. El producto se hizo según el procedimiento descrito en la patente noruega n° 300 692: El producto micro-particulado (2 gramos) se suspendió en 1 litro de ácido fórmico (90%) y se calentó hasta 80 grados centígrados con agitación continua. La suspensión se enfrió hasta 35 grados centígrados y se eliminó el ácido fórmico libre mediante evaporación a vacío. El residuo se suspendió en 0,5 litros de agua destilada y se hirvió durante 3 horas. Después de enfriar la suspensión, se filtró a través de un filtro de micro-poros (tamaño de poro de 0,44 micras), y se liofilizó. El producto liofilizado se suspendió en 0,1 litro de agua destilada y se dializó (umbral de

5000 Daltons) con agua destilada durante 24 horas, antes de liofilizarlo. El producto seco, disuelto en una disolución acuosa adecuada se usó en los experimentos.

5 **Producto tratado con enzima solubilizada.** Este producto se hizo mediante la solubilización del producto micro-particulado tratado con la enzima (6.1.2.) según el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Vacunas experimentales

10 Para investigar el efecto adyuvante de las preparaciones de beta-1,3 beta-1,6-glucano descritas anteriormente, se compararon formulaciones de vacunas experimentales para la gripe con respecto a su capacidad de a) inducir una respuesta de anticuerpos específicos y b) sensibilizar a las células T para que proliferen cuando se expongan posteriormente a los antígenos de la vacuna *in vitro*. Las Vacunas de control contenían virus de la gripe completo inactivado térmicamente (=INV) sin ningún adyuvante añadido o antígenos purificados ("vacuna fragmentada" = frag-INV) del mismo virus sin adyuvante. Las Vacunas experimentales se produjeron a partir de las mismas preparaciones de vacunas de virus de la gripe, pero mezcladas con los adyuvantes descritos anteriormente.

Los animales usados en el experimento fueron ratones BALB/c hembra, de 6-8 semanas de edad (en el inicio del experimento).

20 Diseño experimental

Se inmunizaron grupos de 6-10 ratones de manera intra-nasal con una de las formulaciones de vacuna cuatro veces a intervalos semanales. Las vacunas se administraron en forma de gotas, con volúmenes de dosis de 30 micro-litros en la cavidad nasal de ratones anestesiados. Los ratones sin inmunizar sirvieron como controles. Una semana tras la última dosis de vacuna, se recogieron muestras de saliva, suero y células del bazo para el análisis de las respuestas de anticuerpos específicos y de la proliferación de células T específicas del antígeno.

Análisis de las respuestas de células B y T

30 Se analizaron los tipos IgG e IgA de anticuerpos formados como respuesta específica hacia la vacuna de la gripe (INV) usada en los presentes estudios, tal como se ha descrito mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), tanto en suero como en saliva. Se analizó la proliferación específica del antígeno de las células T CD4+ en cultivos de células de bazo *in vitro* midiendo la tasa de incorporación de timidina marcada con ¹⁴C en los ácidos nucleicos.

35 Resultados

Se conocía previamente que todos los productos de beta-1,3 beta-1,6-glucano a los que se hace mención anteriormente aumentan la resistencia a la enfermedad de los animales estimulando los mecanismos de defensa innatos e inespecíficos (consúltese la pat. de EE.UU. n°: 5.401.727; patente noruega n° 300 693). También se conocía previamente que los beta-1,3 beta-1,6-glucanos no inducen la producción de anticuerpos hacia sí mismos. Se postuló previamente que los beta-1,3 beta-1,6-glucanos pueden actuar como adyuvantes que aumentan la eficacia de las vacunas cuando se inyectan junto con los antígenos de la vacuna en animales. Sin embargo, no se ha demostrado previamente que la administración de un beta-1,3 beta-1,6-glucano sobre una superficie mucosa de un animal afecte al sistema inmunitario específico dentro del organismo de tal manera que responda de forma más activa a los antígenos que se administran sobre las superficies mucosas. Los siguientes ejemplos demuestran que los productos de beta-1,3 beta-1,6-glucano inducen una capacidad aumentada de producir anticuerpos específicos hacia los antígenos de la vacuna que se co-administran sobre las superficies mucosas, y además, los productos de beta-1,3 beta-1,6-glucano sensibilizan a las células T en el bazo para que respondan de manera más activa a la exposición posterior a los mismos antígenos de la vacuna.

Ejemplo 1

Tabla 1: La cantidad de anticuerpos séricos (las cifras muestran kiloUnidades de IgG/ml) formados hacia una "vacuna fragmentada" del virus de la gripe (frag-INV) tras la inmunización nasal de ratones con la vacuna sola o con la misma vacuna mezclada con el adyuvante experimental.

Tratamiento	2 micro-gramos de INV	2 micro-gramos de INV + 75 micro-gramos de adyuvante	20 micro-gramos de INV	20 micro-gramos de INV + 75 micro-gramos de adyuvante
Media	46	81	94	190
Mediana	40	66	79	205

Los datos del Ejemplo 1 demuestran que la nueva formulación de adyuvante, en este caso el producto micro-particulado, aumenta la producción de anticuerpos séricos (IgG) hacia los antígenos de la vacuna de la gripe cuando se administra junto con una vacuna del virus de la gripe no proliferante en la cavidad nasal de los ratones.

5

Ejemplo 2

Tabla 2: La cantidad de anticuerpos secretores (saliva) (las cifras muestran las Unidades de IgA/ml) hacia una "vacuna fragmentada" del virus de la gripe (= frag-INV) tras la inmunización nasal de ratones con la vacuna sola o con la misma vacuna mezclada con el adyuvante experimental.

Tratamiento	2 micro-gramos de INV	2 micro-gramos de INV + 75 micro-gramos de adyuvante	20 micro-gramos de INV	20 micro-gramos de INV + 75 micro-gramos de adyuvante
Media	50	119	95	152
Mediana	47	108	68	156

10

Los datos del Ejemplo 2 demuestran que la nueva formulación de adyuvante no proliferante, en este caso el producto micro-particulado, aumenta la producción de anticuerpos secretores (IgA) hacia los antígenos de la vacuna de la gripe cuando se administra junto con una vacuna del virus de la gripe no proliferante en la cavidad nasal de los ratones.

Ejemplo 3

15

Tabla 3: La cantidad de anticuerpos secretores (saliva) (Unidades de IgA/ml) hacia una vacuna del virus de la gripe completo (= comp-INV) tras la inmunización nasal de ratones con la vacuna sola o con la misma vacuna mezclada con el adyuvante experimental.

Tratamiento	125 micro-gramos de INV	125 micro-gramos de INV + 75 micro-gramos de adyuvante
Media	863	1122
Mediana	815	1125

20

Los datos del Ejemplo 3 demuestran que la nueva formulación de adyuvante no proliferante aumenta la producción de anticuerpos secretores (IgA) también hacia los antígenos en una vacuna de virus de la gripe completo que se co-administra en la cavidad nasal de los ratones.

Ejemplo 4

Tabla 4: El efecto del nuevo adyuvante mucoso sobre la capacidad del antígeno del virus de la gripe de "sensibilizar" a las células T en el bazo de ratones para que respondan a la exposición posterior al mismo antígeno. La vacuna de la gripe (= INV) se administró en forma de un aerosol nasal, sola o co-administrada con 25, 75 y 150 micro-gramos del nuevo adyuvante. Tres semanas más tarde se midió in vitro la capacidad de las células T del bazo de responder a la misma vacuna de la gripe en forma de la tasa de proliferación, expresada como la tasa de incorporación (cpm) de timidina radiactiva en los ácidos nucleicos.

Micro-gramos de INV	Control	INV	INV + 25 micro-gramos de adyuvante	INV + 75 micro-gramos de adyuvante	INV + 150 micro-gramos de adyuvante
0,25	0	1100	15500	29500	36500
2,5	0	1400	5300	--	26500
25	0	3900	10200	--	6050

25

Los datos del Ejemplo 4 demuestran que cuando se administró la formulación de adyuvante micro-particulado experimental junto con una vacuna de la gripe no proliferante en la cavidad nasal de los ratones, aumentó la capacidad de las células T del bazo para proliferar cuando tales células se expusieron posteriormente a la misma vacuna de la gripe. Esto demuestra que la nueva formulación de adyuvante es un auténtico adyuvante mucoso para la respuesta de células T específicas de antígeno hacia un antígeno administrado sobre una superficie mucosa.

Ejemplo 5

Tabla 5: Respuesta de proliferación de células T del bazo en ratones que 3 semanas antes se habían vacunado con una vacuna de la gripe nasal sin adyuvante (Control) y con 75 micro-gramos del nuevo adyuvante (Vacuna experimental). Las células T se estimularon *in vitro* con 0,8 micro-gramos/ml de la vacuna del virus de la gripe o 0,8 micro-gramos del adyuvante. La respuesta se midió como la tasa de incorporación de timidina radiactiva (cpm) en los ácidos nucleicos.

Estimulado mediante	Vacuna de control (INV)	Vacuna experimental
INV	2800	23500
Adyuvante experimental	260	250

Los datos del Ejemplo 5 demuestran que la preparación de adyuvante mucoso no sensibiliza a las células T del bazo para que respondan cuando son expuestas posteriormente al mismo adyuvante, lo que demuestra que la nueva preparación de adyuvante mucoso no actúa como antígeno para las células T. Como comparación, las células T se sensibilizaron para que respondieran a la exposición posterior al antígeno del virus de la gripe de la vacuna, y esta sensibilización aumentó notablemente mediante la nueva formulación de adyuvante mucoso no replicante, lo que demuestra su potencia como adyuvante en las formulaciones de vacunas mucosas.

Ejemplo 6

Tabla 6: El efecto de la administración nasal repetida de una vacuna de la gripe completa (25 micro-gramos/ml) sin adyuvante (Vacuna de control) o mezclada con el nuevo adyuvante (75 micro-gramos/ml) (Vacuna experimental) sobre la producción de anticuerpos secretores (saliva) hacia el virus de la gripe en ratones. Los ratones se vacunaron de manera nasal 4 veces a intervalos de una semana al comienzo del experimento (semanas 0, 1, 2, 3), después en las semanas 8, 9, 10 y 11, después en las semanas 16, 17, 18 y 19. Se recogió saliva después de 4, 8, 12, 16 y 20 semanas y se analizó el contenido de IgA anti-INV (las cifras muestran U/ml).

		4 semanas	8 semanas	12 semanas	16 semanas	20 semanas
Vacuna de control	Media	500	516	1669	873	1275
	Mediana	425	548	1694	734	1453
Vacuna experimental	Media	552	633	2092	1456	1809
	Mediana	517	509	2136	1494	1668

Los datos del Ejemplo 6 demuestran que el nuevo producto adyuvante micro-particulado no induce tolerancia hacia los antígenos del virus de la gripe, y que el efecto del adyuvante mucoso con respecto a la producción de IgA secretora se mantiene durante al menos las 20 semanas de administración repetida del antígeno sobre las superficies mucosas de la cavidad nasal.

Ejemplo 7

Tabla 7: El efecto de la administración nasal repetida de la vacuna de la gripe completa (25 micro-gramos/ml) sin adyuvante (Vacuna de control) y con el adyuvante nuevo (75 micro-gramos/ml) (Vacuna experimental) sobre la producción de anticuerpos séricos hacia el virus de la gripe en ratones. Los ratones se vacunaron de manera intra-nasal 4 veces a intervalos de una semana al comienzo del experimento (semanas 0, 1, 2, 3), después en las semanas 8, 9, 10 y 11, después en las semanas 16, 17, 18 y 19. Se recogieron muestras de sangre después de 4, 8, 12, 16 y 20 semanas y se analizó el contenido de IgG anti-INV (las cifras muestran kU/ml).

		4 semanas	8 semanas	12 semanas	16 semanas	20 semanas
Vacuna de control	Media	102	262	937	1193	1380
	Mediana	102	284	842	954	1411
Vacuna experimental	Media	94	311	1436	1502	1830
	Mediana	100	319	1403	1606	1841

Los datos del Ejemplo 7 demuestran que el nuevo adyuvante mucoso, en este caso el producto micro-particulado, no induce tolerancia hacia los antígenos del virus de la gripe, y que el efecto adyuvante mucoso con respecto a la producción de IgG sérica se mantiene durante al menos las 20 semanas de administración repetida del antígeno sobre las superficies mucosas de la cavidad nasal.

Los ejemplos anteriores muestran resultados representativos de experimentos que apoyan las reivindicaciones expuestas más adelante. Se obtuvieron resultados correspondientes, pero con cifras diferentes, con las cuatro preparaciones adyuvantes descritas en la presente memoria.

Otros ejemplos

5 Los ejemplos anteriores demuestran que los productos de beta-1,3 beta-1,6-glucano, cuando están en contacto con una superficie mucosa, inducen efectos sobre tales funciones internas corporales como la producción de anticuerpos específicos contra los antígenos del virus de la vacuna y la sensibilización específica del antígeno de las células T del bazo. También se han obtenido resultados correspondientes con antígenos bacterianos en vacunas mucosas, en particular en *Neisseria meningitidis* y *Bordetella pertussis*.

10 Además, se informa en la presente memoria, por primera vez, que los mismos productos también provocan una reducción notable y visible de las reacciones inflamatorias y alérgicas cuando se administran en las superficies mucosas. Esta es una respuesta aparentemente paradójica a un producto que aumenta la inmunidad inespecífica, y por lo tanto fue una observación inesperada.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un glucano que comprende monómeros de glucosa unidos entre sí en cadenas ramificadas mediante uniones β -1,3 y uniones β -1,6 para el uso en la modulación de las respuestas inmunitarias humanas hacia una vacuna vírica o bacteriana que se pone en contacto con, o que se administra sobre, una superficie mucosa, en el que dicho glucano se administra también sobre una superficie mucosa y en el que el glucano y la vacuna se co-administran.
2. El glucano para el uso según la reivindicación 1 en el que el glucano está solubilizado.
- 10 3. El glucano para el uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que la vacuna viral es una vacuna del virus de la gripe.
- 15 4. El glucano para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la administración es nasal.
5. El glucano para el uso según la reivindicación 4 en el que la administración es mediante aerosol nasal o gotas nasales.
- 20 6. El glucano para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que la administración es oral, vaginal, rectal o gástrica.
7. El glucano para el uso según la reivindicación 1 en el que el glucano está micro-particulado.
- 25 8. El glucano para el uso según cualquiera de las reivindicaciones previas en el que el glucano y la vacuna están en una mezcla.
9. Una composición adyuvante que comprende un glucano como se definió en la reivindicación 1, junto con una vacuna del virus de la gripe, formulada para la administración en forma de aerosol nasal o gotas nasales.
- 30 10. El uso del glucano como se definió en cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la fabricación de una composición adyuvante administrada de manera mucosa que comprende además una vacuna vírica o bacteriana para el uso en la modulación de las respuestas inmunitarias humanas hacia dicha vacuna, cuya composición se pone en contacto con, o se administra sobre, una superficie mucosa.