

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 227**

51 Int. Cl.:  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03773445 .6**
- 96 Fecha de presentación: **27.11.2003**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1602360**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.12.2005**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE ESTRUCTURAS COCLEARES, COMPOSICIONES DE VACUNA, ADYUVANTES Y SUS INTERMEDIOS.**

30 Prioridad:  
**27.11.2002 CU 29202**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.03.2012**

73 Titular/es:  
**INSTITUTO FINLAY, CENTRO DE INVESTIGACIÓN-PRODUCCIÓN DE VACUNAS Y SUEROS.  
AVE 27 NO 19805 E/198 Y 202, LA CORONELA,  
LA LISA  
CIUDAD DE LA HABANA 11600, CU**

72 Inventor/es:  
**PEREZ MARTIN, Oliver Germán;  
BRACHO GRANDO, Gustavo Rafael;  
LASTRE GONZALEZ, Miriam de San Juan Bosco;  
SIERRA GONZALEZ, Victoriano Gustavo;  
CAMPA HUERGO, Concepción;  
MORA GONZALEZ, Nestor;  
BARBERA MORALES, Ramón Faustino;  
DEL CAMPO ALONSO, Judith Mónica;  
RODRÍGUEZ RAMÍREZ, Tamara;  
ZAYAS VIGNIER, Caridad;  
GIL MARTÍNEZ, Danay y  
TABOADA SUAREZ, Carlos**

74 Agente/Representante:  
**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).

ES 2 376 227 T3

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de estructuras cocleares, composiciones de vacuna, adyuvantes y sus intermedios

La presente invención tiene aplicaciones en el campo de la inmunología, específicamente en el ámbito de adyuvantes y vacunas.

5 En la búsqueda de vacunas eficaces, el descubrimiento de antígenos adecuados ha demostrado ser un desafío en varios ámbitos de conocimiento más allá de la vacunología. Una vez que el antígeno apropiado ha sido aislado, este último a menudo produce un efecto inmunológico que es insuficiente para los fines en cuestión, o no induce los efectos deseados, exigiendo la aplicación de adyuvantes adecuados. La elaboración de vacunas para enfermedades para las cuales actualmente no existe protección, así como la mejora de las vacunas existentes y el desarrollo de adyuvantes potentes para su uso en vacunas múltiples y de nueva generación, constituye, a día de hoy, una necesidad urgente. También lo es el desarrollo de vacunas que incluyan diferentes antígenos y demuestren ser eficaces tanto en el tratamiento de adultos como de niños y, lo más importante, en el de recién nacidos, así como el descubrimiento de adyuvantes que funcionen a nivel de la mucosa y sean capaces de resistir el contenido ácido del estómago.

15 La inmunización mucosal es una práctica vacunológica cada vez más extendida, dado que muchos microorganismos penetran en el cuerpo a través de las membranas mucosas. Las mucosas presentan una serie de particularidades, incluyendo: la existencia de un sistema mucoso común (que permite inducir respuestas locales así como distantes), y el hecho de que la Ig (inmunoglobulina) A es el principal anticuerpo empleado en sus mecanismos de defensa inmunológica.

20 Este tipo de inmunización también ofrece una serie de ventajas, incluyendo una administración sencilla que no requiere el uso de jeringas, un menor coste de producción y un nivel más bajo de reactogénesis, lo que le hace mucho más seguro con respecto a vacunas parenterales y la inducción de reacciones tanto mucosales como sistémicas. La inmunización mucosal, sin embargo, se encuentra con una serie de obstáculos: el contenido ácido del estómago, que alcanza niveles de pH extremadamente ácidos; la basicidad del duodeno y la peristalsis del tracto digestivo que, en combinación con la acción de células M de órganos inductores que actúan a nivel de la mucosa, especializadas en el muestreo de antígenos, reduce la eficacia de los antígenos en la vacuna. Los cilios y las formaciones mucosas en los órganos de la mucosa respiratoria también interfieren en el muestreo de los antígenos por parte de las células M. La presente estrategia usada para evitar el contacto del antígeno con un medio de pH ácido consiste en la administración de vacunas en soluciones bicarbonatadas en momentos muy alejados de las horas de las comidas, para reducir la acidez del estómago y asegurar un rápido paso a través de éste (Benitez JA et al., Infect and Immun 1999, 67(2): 539-545), o el recubrimiento de los antígenos con agentes resistentes a sustancias ácidas, tales como liposomas.

Actualmente, se conocen bien los procedimientos usados en la preparación de liposomas, y en el recubrimiento de materiales liposolubles sólidos, (Schneider Patente de Estados Unidos N° 4.089.801, Ash et al., Patente de Estados Unidos N° 4.448.765 y Miller et al., Patente de Estados Unidos N° 4.133.874). Los principales problemas planteados por la encapsulación de materiales farmacéuticos en liposomas incluyen: la poca estabilidad que muestra en ensayos de laboratorio; la liberación del material encapsulado; la reducción de la eficacia del fármaco; la susceptibilidad mostrada a condiciones medioambientales adversas, digestión en el tracto gastrointestinal y fusión indirecta con membranas celulares (<http://www.BDSiAdvantages.html>). Por otro lado, los liposomas son estructuras inestables que, en su mayor parte, no pueden ser liofilizadas, un problema que se ha superado mediante el desarrollo de estructuras cocleares.

Los cocleatos son estructuras lipídicas multilaminares enrolladas en forma de conchas marinas. La producción de cocleatos mediante la fusión de liposomas unilaminares y el empleo de cationes divalentes, es una práctica bien conocida (D. Papahadjopolous et al., Biochem. Biophys. Acta, 1975; 394: 483). Este procedimiento ha sido modificado para producir una suspensión de vesículas multilaminares que contienen y están rodeadas por el antígeno. Este último se convierte en pequeñas vesículas proteicas lipídicas unilaminares mediante sonicación en nitrógeno, que se realiza para formar los cocleatos en presencia de iones divalentes (Gould-Fogerite et al. Patente de Estados Unidos N° 5.643.574, 1 de julio de 1997). Estas técnicas se resumen en la figura 1.

Los cocleatos, así como otras micro-estructuras auto-ensambladas, se han empleado en la administración de agentes terapéuticos (Yager, et al. Patente de Estados Unidos N° 5.851.536, 22 de diciembre de 1998, Gould-Fogerite, et al. Patente de Estados Unidos N° 5.994.318, 30 de noviembre de 1999 y Yager, et al. Patente de Estados Unidos N° 6.180.114, 30 de enero de 2001). Estos incluyen preparaciones de cocleatos que contienen adyuvantes (Gould-Fogerite et al. Patente de Estados Unidos N° 5.994.318, 30 de noviembre de 1999). Sin embargo, tanto liposomas como cocleatos deben obtenerse de lípidos negativos en presencia de colesterol, los cuales se extraen generalmente de animales en procedimientos costosos (Mannino et al. Patente de Estados Unidos N° 4.663.161, 5 de mayo de 1987) que son cada vez menos aceptables a la luz de las nuevas normativas farmacéuticas y que incluyen preferiblemente una proteína purificada obtenida de un microorganismo, o un péptido, en el caso de preparaciones de vacuna. Además, debe señalarse que el uso de cocleatos obtenidos de vesículas de la membrana externa de organismos vivos como adyuvantes por derecho propio, o su preparación con otros

activadores de señales importantes en la inducción de respuestas inmunológicas, tales como estructuras moleculares asociadas con patógenos (estructuras filogenéticamente conservadas para las que hay receptores en el huésped, y que son reconocidas como un signo de peligro por ese huésped), no se ha considerado anteriormente.

5 El objetivo de la presente invención es obtener una nueva estructura coclear a partir de vesículas que se encuentran en las membranas externas de organismos vivos, que presentan propiedades de adyuvante y de vacuna debido a su particular composición de proteínas y lipídica, así como a las estructuras moleculares asociadas a patógenos descubiertos en el organismo. Una vez formadas, las estructuras cocleares se homogeneizan a su propio tamaño para hacerlas más eficaces inmunológicamente. Las estructuras cocleares obtenidas mediante la presente invención se caracterizan por que, teniendo una composición proteolipídica hasta ahora no intentada por otros autores, son capaces de auto-ensamblarse y de producir estructuras enrolladas, en forma de concha marina. Las composiciones de proteínas y lipídicas de las estructuras cocleares dependerán de los microorganismos que han suministrado las vesículas de su membrana externa, es decir, dependerá de las características de las proteínas que se encuentran en su membrana. De la misma manera, las estructuras mencionadas contienen concentraciones de estructuras moleculares asociadas a patógenos, entre el 1 y el 7 % con respecto a la concentración de proteínas, suministrada por la membrana del microorganismo en cuestión, que se insertan y no se encuentran dentro en un estado libre. Además, estas estructuras pueden purificarse a partir de otros microorganismos y pueden añadirse a la preparación. Las estructuras añadidas y existentes deben estar a una concentración entre el 1 y el 30 % con respecto a la concentración de proteínas. Una de las estructuras moleculares asociadas a patógenos usada durante la producción de estructuras cocleares era el lipopolisacárido de *Vibrio cholerae* o *N. meningitidis* (ejemplo 20).

20 Las estructuras cocleares obtenidas mediante la invención inducían una respuesta celular que demostró ser eficaz en lactantes alimentados con leche materna, mostraron propiedades de resistencia térmica así como ácida y básica, y - en conjunto - demostraron ser muy adecuadas para administración mucosal (ejemplos 2, 4, 6, 8 y 10). Estas propiedades fueron útiles en el diseño de adyuvantes heterólogos (adyuvantes empleados para reforzar vacunas diferentes de las que producían las vesículas de la membrana externa) y vacunas homólogas (vacunas usadas contra el microorganismo que ha suministrado las vesículas de la membrana externa), empleando las estructuras mencionadas. Con respecto a la composición de vacuna que contiene dicha estructura, es importante señalar que la respuesta de los sueros era superior, en diversos momentos del experimento, a la obtenida mientras se empleaba una vacuna basada en vesículas de la membrana externa con un adyuvante de óxido de aluminio, conocido en el mercado como VAMENGOC-BC®, y que también inducía inmunoglobulina A específica al ser administrada a través de la mucosa. Además, las estructuras cocleares estimulaban los linfocitos CD8, una parte importante de todas las respuestas inmunológicas a organismos intra-celulares.

35 La acción adyuvante de las estructuras cocleares se evaluó mediante diversos ensayos, incluyendo: la producción de IL12 en la línea celular histiocitaria humana U937 (ejemplo 11) y la producción de óxido nítrico en la línea celular macrófaga murina J774, en ausencia de todos los estímulos (ejemplo 13); la estimulación de dendritas humanas (ejemplo 15) y la reducción en la induración de lesiones en el experimento de estimulación, "estimulando" a ratones inmunizados con estructuras cocleares que contienen antígenos derivados de este organismo protozoo con *Leishmania major* (ejemplo 16). Las estructuras cocleares producidas mediante la invención hacen que el adyuvante o la vacuna resultante induzca respuestas más tempranas, más intensas y más duraderas "in vivo", mientras que una inducción eficaz de mediadores implicados en la inducción de una estructura celular, y una buena estimulación de células que presentan antígenos profesionales (células dendríticas), se observó "in vitro" (ejemplos 11, 13 y 15).

40 El uso de vesículas que se encuentran en la membrana externa de microorganismos, que constituyen el punto de partida para la formación de estructuras cocleares, como vacunas o como adyuvantes heterólogos, de modo que la eliminación de la adsorción de hidróxido de aluminio no limita las capacidades inmunógenas del primero, también se describe en este documento. Vale la pena mencionar que la capacidad de estas vesículas para inducir respuestas parenterales todas por sí mismas no se ha investigado suficientemente. Dichas vesículas se conocen como nanoesferas auto-ensambladas, y están constituidas por una bicapa lipídica con proteínas y polisacáridos insertados en ella. Estas pueden extraerse de cualquier patógeno y pueden presentar diferentes estructuras moleculares (especialmente lipopolisacárido, peptidoglicano, lipoproteína, ácido teicoico, flagelina o lipofosfoglicano). El lipofosfoglicano y el lipopolisacárido se obtuvieron de *Leishmania major* y *N. meningitidis* o *Salmonella tify*, respectivamente, durante el proceso de obtención de las vesículas de las membranas externas de los organismos, que permanecen insertadas en la primera y nunca en un estado libre, en proporciones entre el 1 y el 7 % del peso de la proteína.

55 Usadas en las preparaciones de vacuna, las vesículas de la membrana externa extraídas de *Salmonella tify* o de *N. Meningitidis* B inducían una respuesta de la IgA cuando se inoculaban por vía nasal, y una buena respuesta inmunológica cuando se inoculaban por vía parenteral (ejemplos 3, 5, 7, 12 y 14).

60 El efecto adyuvante de las vesículas de la membrana externa se evaluó mediante una serie de ensayos, incluyendo: la producción de IL12 en la línea histiocitaria humana U937 (ejemplo 12) y la producción de óxido nítrico en la línea macrófaga murina J774 en ausencia de otros estímulos (ejemplo 14); el refuerzo de la respuesta celular (un aumento de IgG2a) mediante la combinación de polisacáridos con vesículas que se encuentran en en la membrana externa de *N. meningitidis*, en comparación con su fusión con un toxoide tetánico (ejemplo 18) y el refuerzo de la respuesta de anticuerpos reactivos contra polisacáridos Vi de *S. Tify* mediante combinación con vesículas de la

membrana externa que se encuentran en en las mismas bacterias (ejemplo 19).

El uso de estructuras cocleares y vesículas de la membrana externa como adyuvantes o vacunas dio como resultado un refuerzo inesperado de la respuesta inmunitaria inducida mediante dosis anteriores de vacunas o mediante contacto con el germen. Es importante señalar que este último se administró de forma diferente a los obtenidos de estructuras cocleares o vesículas (ejemplo 22).

En este documento, también se describe un procedimiento para obtener estructuras cocleares de las vesículas que se encuentran en en las membranas externas de organismos vivos. Se adoptan las siguientes etapas para conseguir esto: en primer lugar, la membrana externa, que está estructurada en vesículas por microorganismos vivos o células, se purifica usando cualquiera de los procedimientos empleados ampliamente por expertos en la materia. Los procedimientos preferidos son los descritos en los documentos EP 301992, US 5.597.572, EP 11243 o US 4.271.147, Zollinger et al. (J. Clin. Invest. 1979, 63: 836-848), Frederikson et al. (NIPH Annals 1991, 14: 67-80), Sauders et al. (Infect. Immun. 1999,67: 113-119), Drabick et al. (Vaccine 2000, 18: 160-172), WO 01/09350 o EP 885900077.8 y US 5.597.572. Las membranas se purifican de modo que contengan entre el 1 y el 7 % de lipopolisacárido, insertado completamente en la vesícula. Se prepara una solución de una concentración total de proteína de entre 3 y 6 mg/ml, aumentando la concentración de detergente no iónico a de 8 a 12 veces la de la concentración de proteína, para disolver completamente las vesículas. Esta solución se esteriliza posteriormente mediante filtración a través de una membrana con un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ , en la que los agregados de vesícula que no se habían disuelto también se eliminan.

Después de esto, se realiza una diálisis rotacional o filtración tangencial. La diálisis se realiza durante 24 horas contra una solución que contiene concentraciones adecuadas de un ión multivalente (particularmente  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , a concentraciones que varían entre 2,5 y 6,5 mM) a un estado de pH de pH 7,4  $\pm$  0,2. Finalmente, las estructuras cocleares obtenidas se someten a un tratamiento mecánico (sonicación en un baño de agua a entre 15  $^{\circ}\text{C}$  y 25  $^{\circ}\text{C}$  de temperatura durante 45 minutos, en particular), para homogeneizar los tamaños de partícula.

Esto constituye un procedimiento rápido y eficaz para obtener estructuras cocleares que contienen múltiples proteínas y lípidos a partir de la membrana externa del microorganismo empleado, así como estructuras moleculares asociadas a patógenos obtenidos de forma natural. Estas estructuras demuestran un alto nivel de estabilidad e inmunogenicidad.

Por otro lado, el procedimiento sencillo y eficaz para obtenerlas nos permite introducir nuevos antígenos en la estructura mencionada. Los nuevos antígenos se añaden a la suspensión de vesículas de la membrana externa preparada para obtener dichas estructuras, después de aumentar la concentración de detergentes y antes de la adición de los iones multivalentes durante el proceso de diálisis. Entre los antígenos que pueden añadirse están sacáridos, lipoproteínas, péptidos, conjugados y ácidos nucleicos. Estos deben estar a una concentración entre 0,2 y 2,7  $\mu\text{g}$  por cada de 3 a 9  $\mu\text{g}$  de proteínas. También es posible incorporar otras estructuras moleculares asociadas a patógenos para estimular la respuesta innata y adquirida, algo que le hace útil como adyuvantes heterólogos. El lipopolisacárido de *Vibrio cholerae*, amastigotos o promastigotos de *Leishmania mayor*, eran las estructuras empleadas especialmente, lo que nos permitió inducir respuestas celulares así como la actividad de anticuerpos reactivos contra ellas. Además de esto, ADN plasmídico, que contiene proteína verde fluorescente, se introdujo y se colocó contra líneas macrofágicas; la fluorescencia de la molécula permitió más tarde determinar su presencia intracelular. Un derivado alergénico de *Dermatophagoides siboney* también se introdujo y se determinó la respuesta celular inducida resultante (ejemplos 16 y 17).

El uso de organismos vivos como fuente de materia prima para obtener estructuras cocleares no ha sido descrito por ningún autor. Tampoco lo ha sido el proceso de incorporación de una o más estructuras moleculares asociadas a patógenos en las estructuras cocleares, como en el caso de la presente invención.

La invención se describirá mediante los siguientes ejemplos específicos.

#### 45 **Ejemplo 1. Obtención de las estructuras cocleares**

Se empezó con las vesículas extraídas de las membranas externas de microorganismos usando los procedimientos descritos en los documentos EP 885900077.8 o US 5.597.572. Éstas se re-suspendieron en una solución tampón de Tris-EDTA con el 0,5 % de desoxicolato sódico. La concentración de proteínas de la suspensión se determinó usando el procedimiento de Lowry, modificado por Peterson (Analyt. Biochem. 83, 346, 1977). El contenido de fosfolípidos de las vesículas se determinó determinando el contenido de fósforo inorgánico (Bartlett, J Biol. Chem 234, 466, 1959). Ambas concentraciones de proteínas y de fosfolípidos se emplearon para determinar las condiciones óptimas y la cantidad de detergente necesaria para la formación de las estructuras cocleares. Se preparó una solución que contenía las vesículas, ajustada a una concentración de proteínas final de 5-6 mg/ml en un tampón Tris-EDTA que contenía desoxicolato sódico a una concentración de 6 a 15 veces la concentración total de proteínas. Esta solución se filtró en el aparato de diálisis usando un filtro con un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ . La diálisis se realizó usando el procedimiento de agitación rotacional durante un periodo de 24 horas, con un cambio continuo y lento del tampón de diálisis. Esta última solución estaba compuesta por NaCl 50-150 mM, Imidazol 1-4 mM, HEPES 3-5 mM y CaCl 2-7 mM en  $\text{H}_2\text{O}$  preparada en condiciones estériles que se conservaron durante todas

las etapas del procedimiento. La formación de estructuras cocleares se confirmó mediante la aparición de un precipitado blanco y mediante posteriores observaciones al microscopio óptico y electrónico. La concentración de proteínas y fosfolípidos se calculó una vez más y se ajustó para posteriores ensayos. Las propiedades físicas y químicas de las proteínas incluidas en las estructuras cocleares se comprobaron y se compararon con las de las vesículas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con Azul de Coomassie. La integridad estructural de estas últimas se determinó y se confirmó usando el procedimiento de transferencia de Western (figura 2-4).

**Ejemplo 2. Respuestas inducidas por las estructuras cocleares en ratones, comparadas con las inducidas por la vacuna VA-MENGOC-BC®.**

Ratones Balb/c se inmunizaron por vía intramuscular con 12 pg de proteínas por ratón, en 2 dosis separadas por 21 días, con VA-MENGOC-BC® o estructuras cocleares. Se tomaron muestras de sangre de los animales en los momentos indicados después de la segunda dosis y se evaluaron las respuestas séricas de IgG contra vesículas de la membrana externa mediante un ensayo ELISA. Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las respuestas inducidas por las estructuras cocleares y la vacuna, siempre a favor de las primeras, a 17, 27 y 180 días después de la segunda dosis (figura 5)

**Ejemplo 3. Respuestas inducidas en ratones por vesículas de la membrana externa administradas por vía parenteral, en comparación con las inducidas por la vacuna VA-MENGOC-BC®.**

Ratones Balb/c se inmunizaron por vía intramuscular con 12 pg de proteínas por ratón en dos dosis separadas por 21 días, con VA-MENGOC-BC® o vesículas de la membrana externa. Se tomaron muestras de sangre de los animales en los momentos indicados después de la segunda dosis y las respuestas séricas de IgG contra las vesículas se evaluaron mediante un ensayo ELISA. No se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las respuestas inducidas por las vesículas y las inducidas por la vacuna. Estos resultados confirman la utilidad de las vesículas y las vacunas por sí mismas (figura 6)

**Ejemplo 4. Eficacia de inmunización nasal (IN) o gástrica (IG) con estructuras cocleares**

Ratones Balb/c se inmunizaron por vía intranasal (IN) o intragástrica (IG) con 100 ó 12 pg de proteínas por ratón, en dos dosis separadas por 21 días, respectivamente. Se tomaron muestras de sangre de los animales en los momentos indicados después de la segunda dosis y las respuestas séricas de IgG contra las vesículas se evaluaron mediante un ensayo ELISA. Se indujeron buenas respuestas de IgG contra las vesículas de la membrana externa con ambas concentraciones de estructuras cocleares inoculadas por vía intranasal y por vía intragástrica. Esto sugiere que pueden conseguirse buenas respuestas sistémicas mediante inoculación mucosal (figura 7).

**Ejemplo 5. Eficacia de inmunización nasal (IN) con vesículas de la membrana externa**

Ratones Balb/c se inmunizaron por vía intranasal (IN) con 12 pg de proteínas por ratón, en dos dosis separadas por 21 días. Se tomaron muestras de sangre de los animales en los momentos indicados después de la segunda dosis y las respuestas séricas de IgG contra las 15 vesículas se evaluaron mediante un ensayo ELISA. Se obtuvieron buenas respuestas de IgG contra las vesículas mediante este procedimiento de inoculación, lo que sugería que pueden obtenerse respuestas sistémicas valiosas mediante inoculación intranasal (figura 8)

**Ejemplo 6. Eficacia de estructuras cocleares administradas por vía intranasal o por vía intragástrica en la inducción de IgA en la saliva**

Ratones Balb/c se inmunizaron por vía intranasal (IN) o por vía intragástrica (IG) con 100 ó 12 pg de proteínas por ratón, en dos dosis separadas por 21 días, respectivamente. Se tomaron muestras de saliva de los animales 9 días después de que se administrara la última dosis y la respuesta de IgA contra vesículas de la membrana externa se evaluó mediante un ensayo ELISA. Se obtuvieron respuestas significativas de IgA contra las vesículas usando el procedimiento IN y se obtuvo un pequeño pero importante aumento en la IgA anti-vesículas usando el procedimiento IG (figura 9).

**Ejemplo 7. Eficacia de vesículas de la membrana externa administradas por vía intranasal en la inducción de IgA en la saliva**

Ratones Balb/c se inmunizaron por vía intranasal (IN) con 12 pg de proteínas por ratón, en dos dosis separadas por 21 días. Se tomaron muestras de saliva de los animales 9 días después de que se administrara la última dosis y la respuesta de IgA contra vesículas de la membrana externa se evaluó mediante un ensayo ELISA. Se obtuvieron respuestas significativas de IgA contra las vesículas usando el procedimiento IN (figura 10).

**Ejemplo 8. Subclases de IgG reactivas contra vesículas de membranas externas en suero inducidas mediante inmunización con estructuras cocleares**

Ratones Balb/c se inmunizaron por vía intranasal (IN), por vía intragástrica (IG) o por vía intramuscular (IM). En el caso del procedimiento IN, se administró una concentración de 100 pg de proteínas por ratón de las estructuras

cocleares, mientras que se usó una concentración de 12 pg en el resto de los casos. Las dosis estaban separadas por un periodo de 21 días en todos los casos. La vacuna VA-MENGOC-BC® se empleó como control positivo, administrándose por vía intramuscular a una concentración de 12 pg. Se tomaron muestras de sangre de los animales 21 días después de que se administró la segunda dosis y mediante un ensayo ELISA se determinaron los valores cuantitativos de IgG1 e IgG2a presentes en el suero. En todos los casos considerados (con la excepción de los casos de control negativo), se obtuvieron valores cuantitativos significativos para IgG2a ( $p < 0,05$ ). Estos estaban en su valor más alto cuando las estructuras cocleares se administraban por vía intranasal. Esto indica la inducción de un patrón de IgG, anticuerpos de tipo Th1 celular, especialmente favorecido por inoculación nasal (figura 11).

**Ejemplo 9. Subclases de IgG en suero inducidas por inmunización con vesículas de la membrana externa (OMV)**

Ratones Balb/c se inmunizaron por vía intranasal (IN) y por vía intramuscular (IM) con 12 pg de proteínas por ratón de vesículas de la membrana externa, en dos dosis separadas por 21 días. La vacuna VA-MENGOC-BC® se administró a la misma concentración como control positivo. Se tomaron muestras de sangre 21 días después de que se administró la segunda dosis y los valores cuantitativos de IgG1 e IgG2a anti OMV presentes en el suero se analizaron mediante un ensayo ELISA. En todos los casos considerados, se indujeron valores cuantitativos significativos de IgG2a por las vesículas de la membrana externa, lo que indicaba la inducción de un patrón de anticuerpos IgG de tipo Th1 celular. Éste no era el caso con los controles negativos IM o IN. Se observó una completa inversión del patrón en el caso de inoculación IN, donde la respuesta era casi exclusivamente la de IgG2a (figura 12).

**Ejemplo 10. Resistencia térmica y a los ácidos de las estructuras cocleares obtenidas de vesículas de la membrana externa**

La resistencia térmica de las estructuras cocleares se evaluó exponiendo a las 5 muestras a una temperatura de 60 °C durante un periodo de 7 días. La resistencia al ácido se evaluó exponiendo a las muestras a un medio con un valor de pH de 1 durante un periodo de 45 minutos. Después de esto, las muestras tratadas y de control se usaron para inocular por vía intramuscular a ratones Balb/c con dos dosis de una concentración de 12 pg por ratón, separadas por 14 días. Se tomaron muestras de sangre de los ratones después de 28 días desde el comienzo del experimento y los sueros se almacenaron individualmente a -20 °C hasta el momento de su uso. Como puede observarse, no había diferencias significativas ( $p < 0,5$ ) entre las respuestas de IgG anti-vesícula inducidas en cada uno de los animales y grupos.

**Ejemplo 11. Producción de IL12 en la línea celular U937 estimulada exclusivamente con estructuras cocleares.**

Se cultivaron células U937 en RPMI 1640 completado con gentamicina a una concentración de 50 µg/ml, L-glutamina (a 2 mM), piruvato sódico (a 1mM), HEPES (a 15 mM) y suero fetal bovino (Sigma) al 10 %. Éstas se diferenciaron en macrófagos mediante un tratamiento con PMA y se colocaron en placas de cultivo de 24 pocillos de fondo plano,  $5 \times 10^5$  células por pocillo. Después de 24 horas, se les añadieron las estructuras cocleares a una concentración de 250 ng/ml en el medio de cultivo. Después de 24 horas de estímulos, las células supervivientes se reunieron y la presencia de IL12 se determinó mediante un ensayo ELISA de tipo sándwich. Se observó la producción de IL12 por las células U937 estimuladas por las estructuras cocleares (figura 14).

**Ejemplo 12. Producción de IL12 en la línea celular U937 estimulada exclusivamente con vesículas de la membrana externa (OMV)**

Se cultivaron células U937 en RPMI 1640 completado con gentamicina a una concentración de 50 µg/ml, L-glutamina (a 2 mM), piruvato sódico (a 1mM), HEPES (a 15 mM) y suero fetal bovino (Sigma) al 10 %. Éstas se diferenciaron en macrófagos mediante un tratamiento con PMA y se colocaron en placas de cultivo de 24 pocillos de fondo plano,  $5 \times 10^5$  células por pocillo. Después de 24 horas, las vesículas de la membrana externa se les añadieron a una concentración de 250 ng/ml en el medio de cultivo. Después de 24 horas de estímulos se reunieron las células supervivientes y la presencia de IL12 se determinó mediante un enlace ELISA de tipo sándwich. Se observó la producción de IL12 por las células U937 estimuladas por las vesículas de la membrana externa (figura 15).

**Ejemplo 13. Producción de óxido nítrico por la línea celular macrofágica murina J774 estimulada exclusivamente con estructuras cocleares**

Se cultivaron células J774 en un medio DMEN completado con gentamicina a una concentración de 50 µg/ml, L-glutamina (a 2 mM), piruvato sódico (a 1mM), HEPES (a 15 mM) y suero fetal bovino (Sigma) al 10 %, previamente inactivado a 56 °C durante 30 minutos. Se colocaron en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano, a una concentración de  $1 \times 10^5$  células por pocillo y se incubaron durante un periodo de 24 horas a 37 °C y el 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de esto, las células adherentes se incubaron con 200 l de DMEN junto con las estructuras cocleares a una concentración de 250 ng/ml. También se incluyeron otras variantes incubadas con L-NMMA (a 1 µM), un inhibidor de la producción de óxido nítrico. Las células supervivientes se recogieron después de 24 y 48 horas y se analizaron

en busca del contenido nítrico usando la reacción de Greiss (Rockett, KA et al., Infect. Immun. 1992, 60: 3725-3730). Se observó una producción significativa de óxido nítrico por las células incubadas con las estructuras cocleares. Esta producción se inhibía mediante el uso de L-NMMA (figura 16).

5 **Ejemplo 14. Producción de óxido nítrico por la línea celular macrofágica murina J774 estimulada exclusivamente con vesículas de la membrana externa (OMV)**

Se cultivaron células J774 en un medio DMEN completado con gentamicina a una concentración de 50 µg/ml, L-glutamina (a 2 mM), piruvato sódico (a 1mM), HEPES (a 15 mM) y suero fetal bovino (Sigma) al 10 %, previamente inactivado a 56 °C durante 30 minutos. Se colocaron en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano, a una concentración de  $1 \times 10^5$  células por pocillo y se incubaron durante un periodo de 24 horas a 37 °C y el 5 % de CO<sub>2</sub>.  
10 Después de esto, las células adherentes se incubaron con 200 l de DMEN junto con las vesículas de la membrana externa a una concentración de 250 ng/ml. También se incluyeron otras variantes incubadas con L-NMMA (a 1 µM), un inhibidor de la producción de óxido nítrico. Las células supervivientes se recogieron después de 24 y 48 horas y se analizaron en busca del contenido nítrico usando la reacción de Greiss (Rockett, KA et al., Infect. Immun. 1992, 60: 3725-3730). Se observó una producción significativa de óxido nítrico por las células incubadas con las vesículas de la membrana externa, mayor que la inducida por los LPS usados como control. Esta producción se inhibía mediante el uso de L-NMMA (figura 17).  
15

**Ejemplo 15. Estimulación de células dendríticas humanas por las estructuras cocleares**

Se extrajo sangre y las células mononucleares periféricas se purificaron usando ficoll. Las células se cultivaron a  $10 \times 10^6$  células por ml en presencia de LPS o estructuras cocleares y la activación de células dendríticas se determinó mediante citometría de flujo. Como puede observarse en la figura 18, las células dendríticas se activaron (determinado mediante la expresión de moléculas co-estimulantes, tales como CD40, CD80 y CD86), y la expresión de moléculas MHC aumentó. Esto demuestra la naturaleza adyuvante de estas estructuras.  
20

**Ejemplo 16. Reducción de induraciones en ratones Balb/c inmunizados con estructuras cocleares que contienen amastigotos de *Leishmania major* y estimulados con el mismo organismo protozoo**

La inclusión de amastigotos obtenidos de *L. major* se consiguió incluyendo los antígenos semi-purificados en las primeras etapas de la formación de las estructuras cocleares. La cantidad de detergente usada se ajustó al contenido total de proteínas y la concentración total de proteínas se mantuvo en un intervalo de 5-6 mg/ml. La proporción de proteínas vesiculares con respecto a los nuevos antígenos incluidos era de 12:1. La formación de estructuras cocleares se verificó mediante microscopía óptica y electrónica. La inclusión de proteínas de *L. major* también se verificó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con Azul de Coomassie. Ratones Balb/c se inmunizaron por vía intramuscular con 12 pg de las estructuras cocleares en 2 dosis separadas por 21 días. Las estructuras cocleares se inocularon en la extremidad posterior izquierda. Después de 21 días desde la segunda dosis, los ratones se infectaron con  $3 \times 10^6$  promastigotos en la misma extremidad inoculada. Los promastigotos se obtuvieron de la fase estacionaria de los cultivos cultivados en un medio DMEN sobre un medio de hemocultivo en agar sólido. El volumen de lesiones se estimuló semanalmente a partir de la cuarta semana después de la infección. Se observó una reducción significativa del tamaño de las lesiones en el grupo inmunizado con las estructuras cocleares que contenían antígenos de *L. major*. Esto demuestra el carácter adyuvante de esta estructura (figura 19).  
25  
30  
35

**Ejemplo 17. Inclusión de ADN plasmídico con una proteína verde fluorescente.**

Plásmidos purificados que contienen el gen de la proteína verde fluorescente en un promotor de CMV se incluyeron en la solución inicial usada para obtener las estructuras cocleares, siguiendo las mismas etapas para obtener dichas estructuras descritas en el Ejemplo 1. La proporción de plásmidos con respecto a proteínas vesiculares se ajustó a 1:100. La inclusión de los 5 plásmidos se comprobó usando electroforesis en gel de agar a una concentración del 1 % de las estructuras cocleares incubadas previamente a 37 °C durante 30 minutos, después de añadir EDTA a una cantidad de 2 mM para provocar la liberación de plásmidos en su interior. Los geles se tiñeron con etidio y se observaron a la luz ultravioleta. La presencia de plásmidos se detectó solamente en las estructuras cocleares que los contenían después de tratarlas con EDTA. Después de esto, se realizó un ensayo de transfección en la línea celular J774 usando estas estructuras. Después de 2 horas de incubación, las estructuras cocleares se eliminaron del medio de cultivo. La inspección de las células en fluorescencia 24 horas después revelaba la presencia de numerosas células con señales fluorescentes en el citoplasma.  
40  
45  
50

**Ejemplo 18. Refuerzo de la respuesta celular mediante la conjugación de vesículas de la membrana externa**

El polisacárido (PsC) del serogrupo C de *Neisseria meningitidis* se conjugó con el toxoide tetánico (TT) o con vesículas de la membrana externa (OMV) del serogrupo B de *N. meningitidis*. A ratones Balb/c se les administraron tres inoculaciones intraperitoneales (los días 0, 14 y 28) que contenían 10 µg de PsC combinado. Se tomaron muestras de sangre de los animales antes y 42 días después de la inmunización. Se determinaron las respuestas de IgG y sus subclases en el suero. La respuesta más fuerte de IgG2a que se encuentra en el grupo conjugado con vesículas de la membrana externa es indicativa de una mejor respuesta celular obtenida en comparación con la inducida en el grupo conjugado con el toxoide tetánico (TT) (figura 20).  
55

**Ejemplo 19. Refuerzo de la respuesta de anticuerpos anti-polisacárido Vi mediante conjugación**

El polisacárido Vi de *Salmonella tiphy* se conjugó con vesículas de la membrana externa (OMV) de *S. tiphy*. Ratones Balb/c se inmunizaron por vía intraperitoneal con dos dosis (administradas el día 0 y 28) que contenían 10 µg del Vi. Se tomaron muestras de sangre de los animales antes y 42 días después de la inoculación. Se determinaron las respuestas de IgG y sus subclases en el suero. La conjugación aumenta y positiviza la respuesta contra el polisacárido Vi y se detecta una respuesta ofrecida por IgG2a (figura 21).

**Ejemplo 20. La posibilidad de incluir diferentes concentraciones de estructuras moleculares asociadas a patógenos en estructuras cocleares**

Se experimentó con diferentes cantidades de LPS obtenido de *Neisseria meningitidis* B para la inclusión de diferentes concentraciones de estructuras moleculares asociadas a patógenos en las estructuras cocleares. Las proporciones de concentración de LPS con respecto a la concentración de proteína usada para la inmunización de los ratones eran: 0,05:12, 0,5:12, 1:12 y 2:12. La formación de estructuras cocleares se verificó a través de microscopía óptica, que determinó una proporción de 1:12 como la proporción máxima en la que el LPS puede introducirse sin afectar a la formación de las estructuras cocleares. Cantidades más grandes afectan visiblemente a la formación de las estructuras, dando como resultado la formación de agregados. Todas las variantes obtenidas se administraron a ratones Balb/c en dos dosis, separadas por 21 días, de 12 µg de proteínas por ratón. Se determinaron los valores cuantitativos de IgG anti-vesícula. No se observaron diferencias entre los valores cuantitativos resultantes del uso de diferentes variantes. Sin embargo, el experimento garantiza la posibilidad de incorporar diferentes LPS en estas estructuras (figura 22).

**Ejemplo 21. Eficacia del procedimiento propuesto en las etapas finales de la producción de estructuras cocleares**

Se emplearon estructuras cocleares tratadas con sonicación suave (Tto) en un baño de agua durante 45 minutos a 20 °C, así como estructuras no tratadas. Ratones Balb/c se inmunizaron por vía intranasal con 100 µg de proteínas por ratón en dos dosis separadas por 21 días. Se tomaron muestras de saliva 9 días después de que se administrara la última dosis y las respuestas de IgG contra vesículas de la membrana externa (OMV) se evaluaron mediante un ensayo ELISA. Las respuestas inmunológicas tuvieron lugar significativamente más pronto o se accionaron durante un periodo de tiempo más largo en aquellos animales tratados con las estructuras, como se muestra en la figura 23.

**Ejemplo 22. Respuesta de IgA frente a vesículas de la membrana externa en el suero, la saliva y la vagina, inducida por inmunización perenteral y mucosal y evaluada mediante un ensayo ELISA**

Ratones Balb/c se inmunizaron por vía intranasal (IN) con 2 ó 3 dosis de vesículas de la membrana externa (OMV), 3 dosis administradas por vía intramuscular de la vacuna VA-MENGOC-BC® como control, y una combinación de 1 y 2 dosis de las vacunas administradas usando los procedimientos IM e IN, respectivamente. A cada ratón se le administraron 12 µg de proteína en los tiempos 0, 21 y 42. Los sueros se tomaron después de 15 días y la saliva y el fluido vaginal después de 9 tras la última dosis. Los resultados se evaluaron mediante un ensayo ELISA. Como puede observarse, la inmunización nasal induce un pequeño aumento de la IgA a nivel del suero, mientras que la inmunización con la vacuna usando el procedimiento IM no lo hace. La respuesta mucosal dependía del número de dosis: dos dosis no inducían una respuesta, mientras que 3 dosis daban como resultado una respuesta de IgA anti-vesícula. Finalmente, 2 dosis administradas por vía nasal demostraron ser eficaces en animales que recibieron un estímulo (una dosis) de la vacuna administrada por vía intramuscular (figura 24).

**Ventajas de la solución propuesta:**

1. Las vesículas de la membrana externa se extraen de organismos vivos, permitiendo la selección de constituyentes durante el proceso de extracción de las membranas externas, que constituye la primera barrera defensiva en el contacto entre huésped y patógeno, haciendo a estos constituyentes adecuados para la protección tanto de animales como de seres humanos;
2. durante el proceso de extracción, pueden incluirse otras proteínas de interés, ya sean naturales o recombinantes;
3. vesículas de la membrana externa extraídas de organismos vivos son más estables que los liposomas contruidos artificialmente, y pueden permanecer intactos durante una serie de meses, incluso años, sin sufrir alteraciones significativas que puedan afectar a la formación de futuras estructuras cocleares;
4. la respuesta celular Th1 inducida en animales y seres humanos hace a estos adyuvantes eficaces, no solamente en adultos y niños, sino también durante la lactancia;
5. las estructuras cocleares formadas son termorresistentes, algo que puede resultar ser útil en la solución de los problemas asociados con la cadena del frío de una serie de vacunas, ya sea mediante su formulación como adyuvante o su desarrollo a partir de vesículas de la membrana externa y estructuras cocleares;

6. las estructuras cocleares formadas son resistentes tanto a bases como a ácidos, algo a tener en cuenta cuando se consideran vacunas administradas por vía oral;
7. los antígenos se incorporan en las estructuras durante el proceso de producción, haciendo al producto final termorresistente, y resistente a ácidos y bases;
- 5 8. la versatilidad de los antígenos que pueden incluirse, ya sean solubles o particulados, incluyendo ácidos nucleicos, permite la producción de muchas vacunas, incluyendo vacunas múltiples;
9. las estructuras cocleares contienen estructuras moleculares asociadas a patógenos, y pueden incorporarse otras a voluntad para aumentar su eficacia adyuvante e inmunológica, permitiendo reducir la toxicidad potencial de algunas de estas estructuras y, por lo tanto, sus efectos inflamatorios;
- 10 10. las estructuras cocleares inducen reacciones in vivo más tempranas, más potentes y de mayor duración;
11. las estructuras cocleares inducen, *in vitro*, mejores respuestas a nivel de citoquinas, que inducen patrones de respuestas inmunitarias celulares;
12. las estructuras conservan las propiedades de cocleatos artificiales (la incorporación eficaz de antígenos hidrófobos, sistema de liberación lenta, el contenido de calcio como mineral esencial, la reducción de oxidación lipídica, liofilización, etc.), pero es superior a estos en inmunogenicidad, su inclusión de estructuras moleculares asociadas a patógenos y en su capacidad para inducir un patrón de Th1, incluyendo una respuesta T citotóxica y el se evita uso de lípidos y colesterol, obtenidos de suero animal.
- 15

### **Breve descripción de las figuras**

- 20 Figura 1. Procedimiento para producir cocleatos descrito en el documento Gould-Fogerite et al. Patente de Estados Unidos N° 5.643.574, 1 de julio de 1997.
- Figura 2. Procedimiento simplificado para obtener estructuras cocleares, objeto de la presente invención.
- Figura 3. Microscopía electrónica de una estructura coclear.
- Figura 4. A: Electroforesis en gel de acrilamida al 12,5 % teñido con Azul de Coomassie de las proteínas presentes en las vesículas de la membrana externa. B: Transferencia de Western de las proteínas presentes en vesículas de la membrana externa y las estructuras cocleares, usando un suero humano de un alto valor cuantitativo de anticuerpos reactivos contra vesículas de la membrana externa.
- 25
- Figure 5. Respuestas séricas de IgG contra vesículas de la membrana externa en ratones inmunizados por vía parenteral con VA-MENGOC-BC® o estructuras cocleares, evaluadas mediante un ensayo ELISA.
- Figura 6. Respuestas séricas de IgG contra vesículas de la membrana externa en ratones inmunizados por vía intramuscular con VA-MENGOC-BC® o vesículas de la membrana externa, evaluadas mediante un ensayo ELISA.
- 30
- Figura 7. Respuestas séricas de IgG contra vesículas de la membrana externa en ratones inmunizados por vía intragástrica (IG) o por vía intranasal (IN) con vesículas de la membrana externa, evaluadas mediante un ensayo ELISA.
- Figura 8. Respuestas séricas de IgG contra vesículas de la membrana externa en ratones inmunizados por vía intranasal (IN) con vesículas de la membrana externa, evaluadas mediante un ensayo ELISA.
- 35
- Figura 9. Respuesta de IgA en saliva contra vesículas de la membrana externa en ratones inmunizados por vía intragástrica o por vía intranasal con estructuras cocleares, evaluadas mediante un ensayo ELISA.
- Figura 10. Respuesta de IgA en saliva contra vesículas de la membrana externa en ratones inmunizados por vía intranasal con vesículas de la membrana externa, evaluadas mediante un ensayo ELISA.
- 40
- Figura 11. Resultados de las subclases de IgG reactivas contra vesículas de la membrana externa en animales inmunizados con estructuras cocleares, evaluados mediante un ensayo ELISA.
- Figura 12. Resultados de las subclases de IgG reactivas contra vesículas de la membrana externa en animales inmunizados con vesículas de la membrana externa, evaluados mediante un ensayo ELISA.
- 45
- Figura 13. Resultados de termorresistencia y resistencia al ácido de las estructuras cocleares, evaluados mediante un ensayo ELISA.
- Figura 14. Evaluación de la producción de IL12 por células U937 estimuladas con las estructuras cocleares.
- Figura 15. Evaluación de la producción de IL12 por células U937 estimuladas con vesículas de la membrana

externa obtenidas de *Neisseria meningitidis*.

Figura 16. Producción de óxido nítrico por células J774 incubadas con estructuras cocleares.

Figura 17. Producción de óxido nítrico por células J774 incubadas con vesículas de la membrana externa obtenidas de *Neisseria meningitidis*.

5 Figura 18. Estimulación de células dendríticas humanas con estructuras cocleares.

Figura 19. Resultados de las induraciones en animales inmunizados con estructuras cocleares que contienen amastigotos y estimulados con *Leishmania major*.

Figura 20. Resultados del efecto adyuvante de la conjugación de polisacárido con vesículas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*.

10 Figura 21. Resultados del efecto adyuvante de la conjugación de polisacárido con vesículas de la membrana externa de *Salmonella tiphy*.

Figura 22. Resultados de la incorporación de estructuras moleculares asociadas a patógenos.

Figura 23. Resultados del efecto de sonicación sobre la respuesta inducida por estructuras cocleares.

15 Figura 24. Resultados del refuerzo de la respuesta mucosal después de la inoculación IN después de un estímulo intramuscular inicial.

Figura 25. Cinética de la respuesta de IgG anti-OMV potenciada mediante la estructura coclear (AFCo1). La respuesta de IgG anti-OMV se determinó en los sueros de ratones inmunizados por vía intramuscular con OMV, AFCo1 o la vacuna VA-MENGOC-BC™. AFCo1 inducía una respuesta de IgG significativamente mayor y duradera.

20 Figura 26. Las células dendríticas pueden procesar péptidos OVA de OVA incluido en las vesículas de la membrana externa (OMV) (OMV-Ova) para presentaciones en el MHC-II. La producción de IL-2 a partir de las células de hibridoma OT4H T después de la co-incubación con OMV-Ova se cuantificó mediante incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina por la línea celular CTLL dependiente de IL-2. Los datos se presentan como la media + Desviación Estándar de tres experimentos diferentes.

25 \*diferente de forma significativa de otros grupos.

Figura 27. Respuesta de IgG anti-Ova en ratones inmunizados con OMV-Ova. Ratones C3H/HeN se inmunizaron con dos dosis de OMV-Ova 5 mg/ml, solución de tampón fosfato o emulsión de Titermax-Ova (control positivo). Se recogieron sueros 21 días después de la primera dosis y se evaluaron mediante ELISA. Los datos muestran la concentración de IgG promedio de cinco ratones por grupo ± la desviación estándar y son representativos de tres ensayos diferentes.

30 Figura 28. Respuesta de subclases de IgG anti-Ova en ratones inmunizados con OMV-Ova. Ratones C3H/HeN se inmunizaron con dos dosis de OMV-Ova 5 mg/ml, solución de tampón fosfato o emulsión de Titermax-Ova (control positivo). Se recogieron sueros 21 días después de la primera dosis y se evaluaron mediante ELISA. Los datos muestran los valores cuantitativos de IgG1 e IgG2a en sueros reunidos de cinco ratones por grupo y son representativos de tres ensayos diferentes.

35 Figura 29. Respuesta de IgG contra la proteína del núcleo del Virus de la Hepatitis C (VHC) inducida por inmunización intramuscular de animales, evaluada mediante ELISA. El IgG anti proteína del núcleo se determinó en los sueros de animales inmunizados por vía intramuscular con tres dosis (0, 3 y 7 semanas) y las muestras se tomaron dos semanas después de la última dosis. Como se muestra, la incorporación de los dos antígenos (proteínas del núcleo y de la cápsida) en AFCo1 inducía respuestas significativamente más elevadas.

40

**REIVINDICACIONES**

1. Composición de vacuna que contiene estructuras cocleares proteolípídicas obtenidas de vesículas que se encuentran en las membranas externas de organismos vivos, así como un excipiente adecuado, en la que dichas estructuras cocleares comprenden proteínas, lípidos y patrones moleculares asociados a patógenos.
- 5 2. Composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, completada con uno o más antígenos.
3. Composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 2, con dichos patrones moleculares asociados a patógenos añadidos a una concentración entre el 1 % y el 30 % del peso de la proteína de la estructura coclear.
4. Composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 3, con dichos patrones moleculares asociados a patógenos seleccionados entre el grupo constituido por lipopolisacáridos, peptidoglicano, lipoproteína, ácido teicoico, flagelina y lipofosfoglicano.
- 10 5. Composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** el organismo vivo que suministra las vesículas de la membrana externa es un organismo bacteriano, un protozoo o un organismo celular animal.
6. Composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada por** el hecho de que dicha bacteria puede ser Gram negativa o Gram positiva.
- 15 7. Composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada por** el hecho de que dicha bacteria Gram negativa puede ser del género *Neisseria*, *Haemophilus*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Pseudomonas* o *Shigella*.
8. Composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada por** el hecho de que dicha bacteria Gram positiva puede ser del género *Streptococcus* o *Staphylococcus*.
- 20 9. Composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada por** el hecho de que dicho organismo vivo es el protozoo del género *Leishmania*.
10. Composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada por** el hecho de que las estructuras cocleares se extraen de una célula tumoral.
11. Composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 2, encontrándose los antígenos incluidos adicionalmente en una proporción con respecto a las proteínas presentes en la estructura coclear de 0,2 a 2,7 µg a de 3 a 9 µg de proteína.
- 25 12. Composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 2, con los antígenos a incluir adicionalmente seleccionados entre el grupo constituido por: proteínas naturales o recombinantes, péptidos, sacáridos, ácidos nucleicos, conjugados o alérgenos.
- 30 13. Composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 12, siendo el antígeno añadido una proteína del virus de la hepatitis C.
14. Composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 12, siendo el antígeno añadido el epítipo T o B.
15. Adyuvante de vacuna que contiene estructuras cocleares proteolípídicas obtenidas de vesículas que se encuentran en las membranas externas de organismos vivos, en el que dichas estructuras cocleares comprenden proteínas, lípidos y patrones moleculares asociados a patógenos.
- 35 16. Adyuvante de vacuna de acuerdo con la reivindicación 15, encontrándose dichos patrones moleculares asociados a patógenos en una concentración entre el 1 % y el 30 % del peso de la proteína de la estructura.
17. Adyuvante de vacuna de acuerdo con la reivindicación 15, con dichos patrones moleculares asociados a patógenos seleccionados entre el grupo constituido por lipopolisacárido, peptidoglicano, lipoproteína, ácido teicoico, flagelina y lipofosfoglicano.
- 40 18. Adyuvante de vacuna de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizado por** el hecho de que el organismo vivo que suministra las vesículas de la membrana externa usadas para formar las estructuras cocleares es una bacteria, un protozoo o una célula animal.
19. Adyuvante de vacuna de acuerdo con la reivindicación 18, **caracterizado por** el hecho de que dicha bacteria es una Gram negativa o una Gram positiva.
- 45 20. Adyuvante de vacuna de acuerdo con la reivindicación 19, **caracterizado por** el hecho de que dicha bacteria Gram negativa es del género *Neisseria*, *Haemophilus*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Pseudomonas* o *Shigella*.
21. Adyuvante de vacuna de acuerdo con la reivindicación 19, **caracterizado por** el hecho de que dicha bacteria Gram positiva es del género *Streptococcus* o *Staphylococcus*.

22. Adyuvante de vacuna de acuerdo con la reivindicación 18, **caracterizado por** el hecho de que dicho organismo vivo es un organismo protozoo del género *Leishmania*.
23. Adyuvante de vacuna de acuerdo con la reivindicación 18, derivando las estructuras cocleares de una célula tumoral.
- 5 24. Composición de vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 14, para su uso en una vacunación mucosal o parenteral o una combinación de éstas.
25. El adyuvante de acuerdo con las reivindicaciones 15 a 24, para su uso en una vacunación mucosal o parenteral o una combinación de éstas.

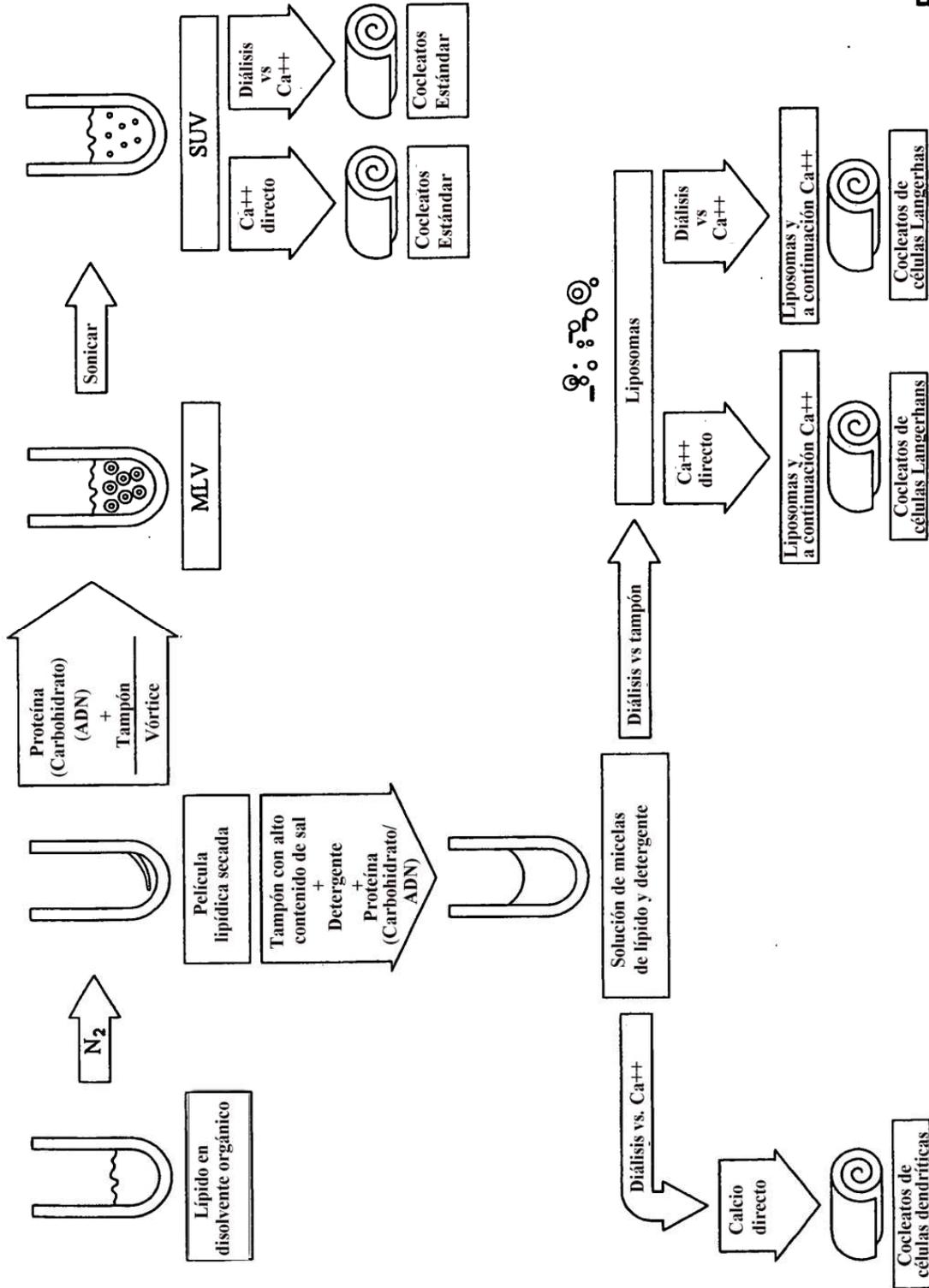


Fig. 1

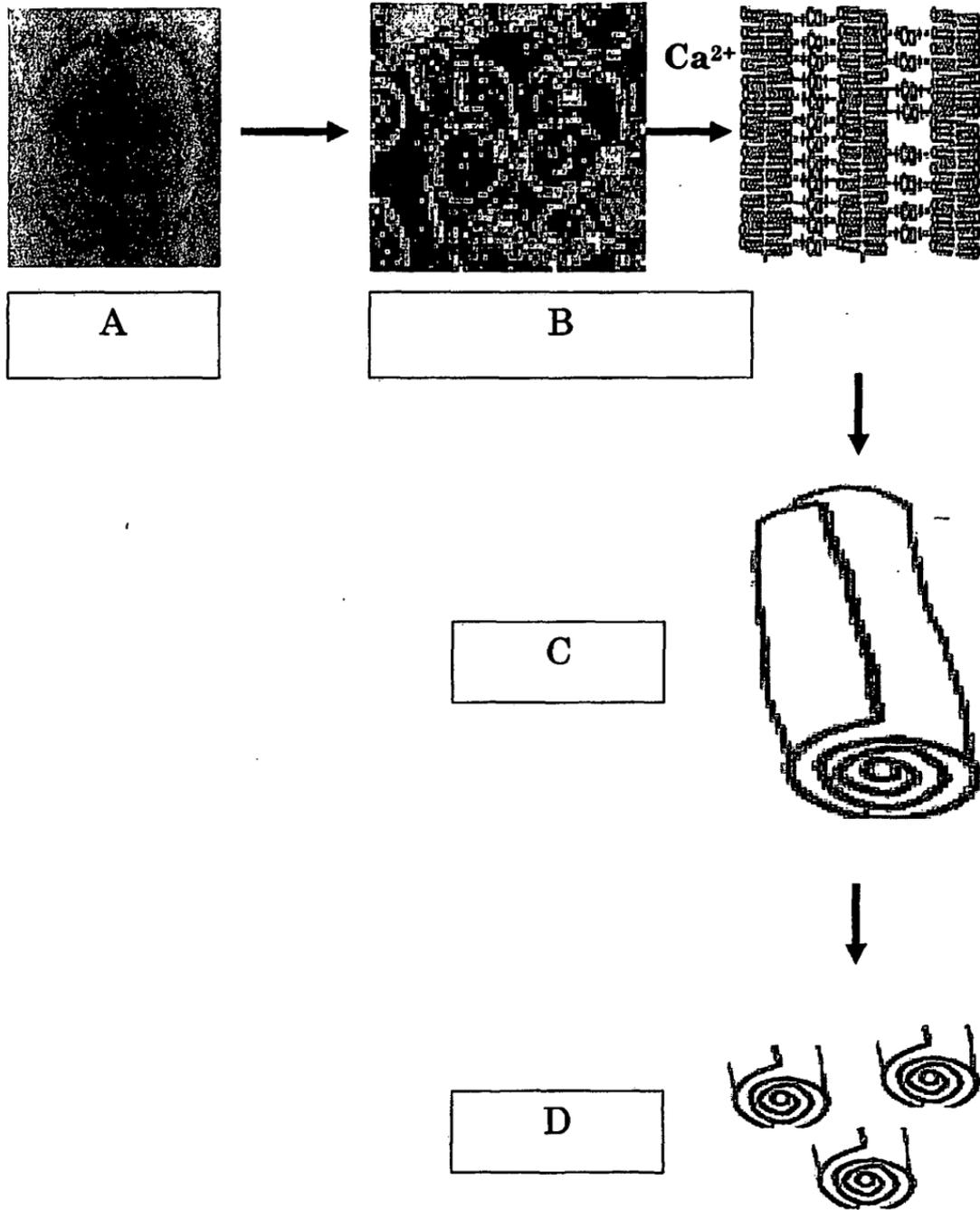


Fig. 2



Fig. 3

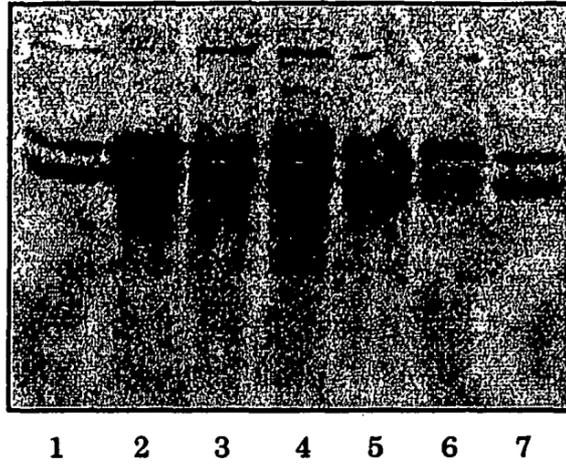


Fig. 4A



Fig. 4B

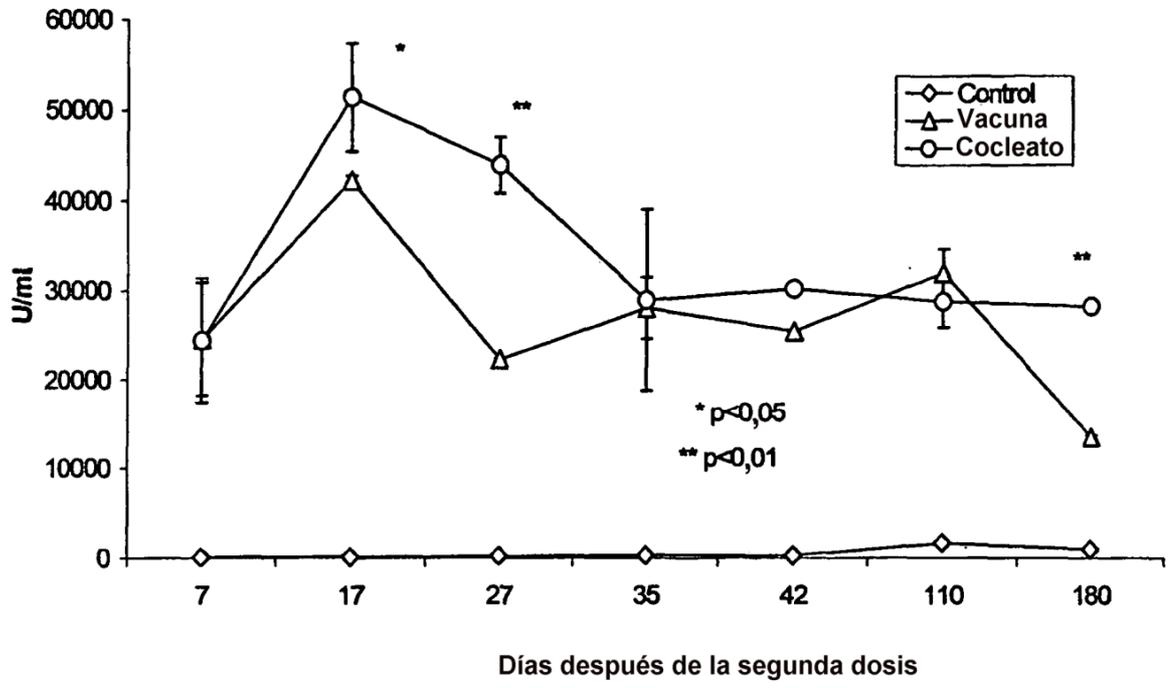


Fig. 5

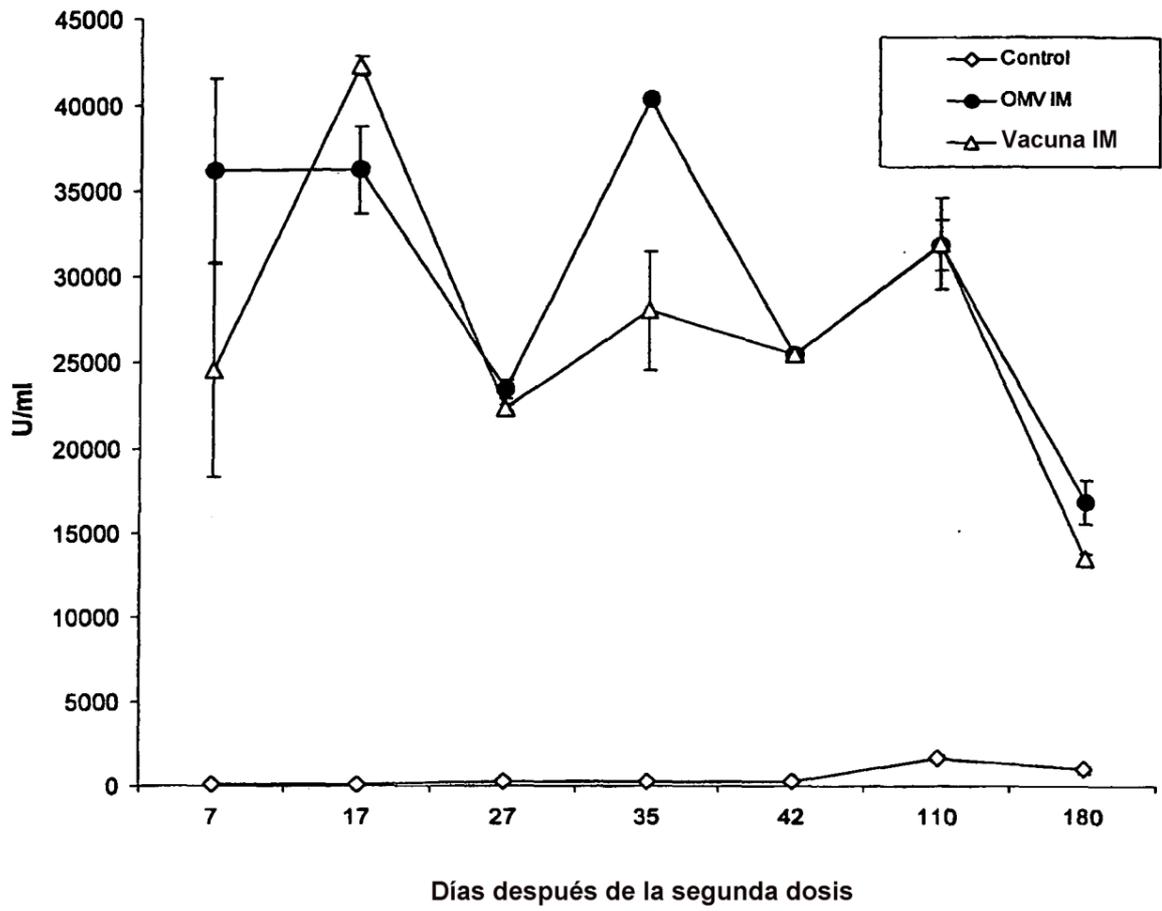


Fig. 6

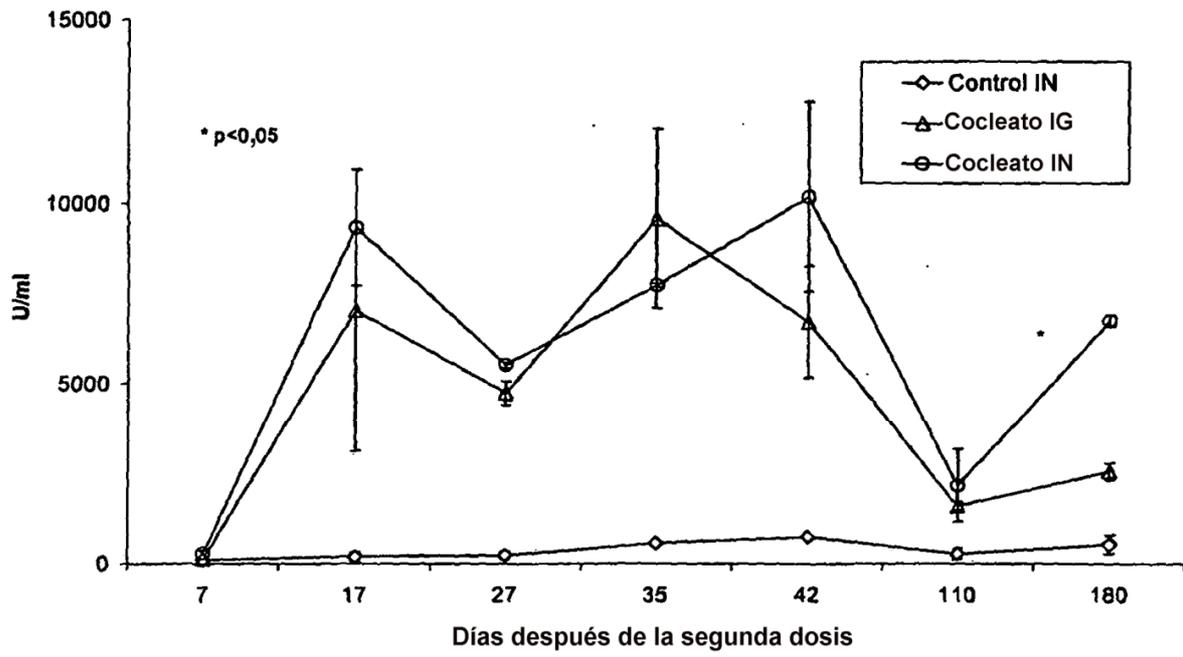


Fig. 7

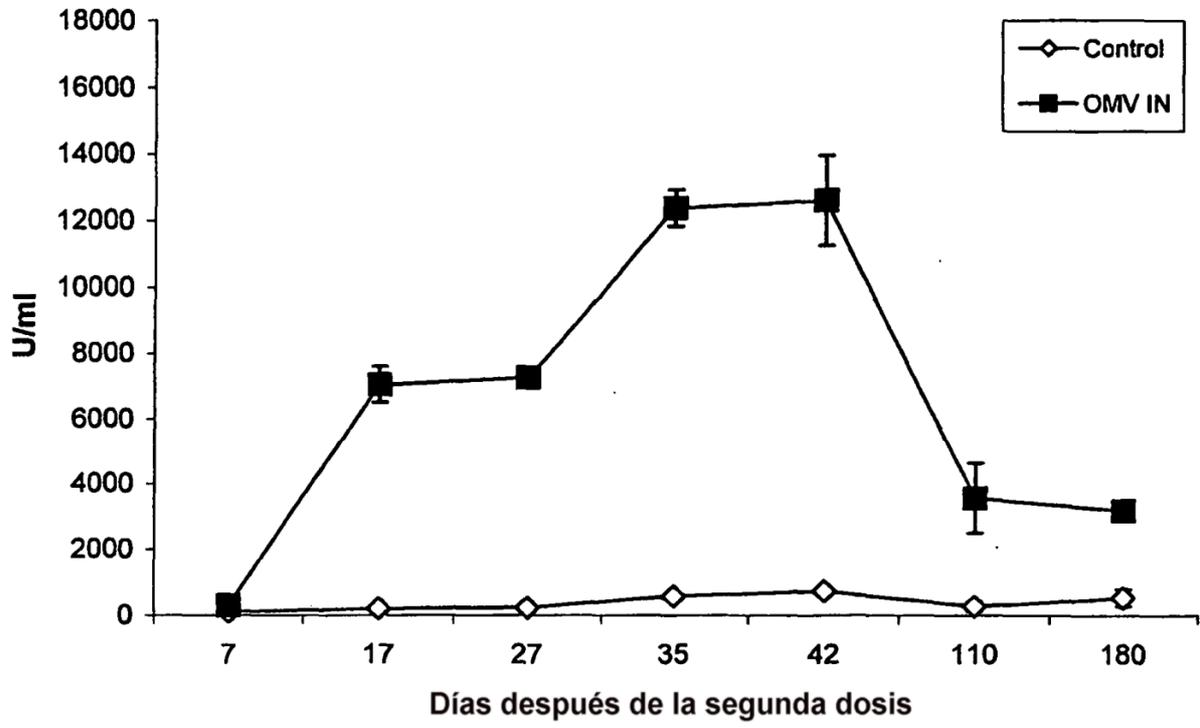


Fig. 8

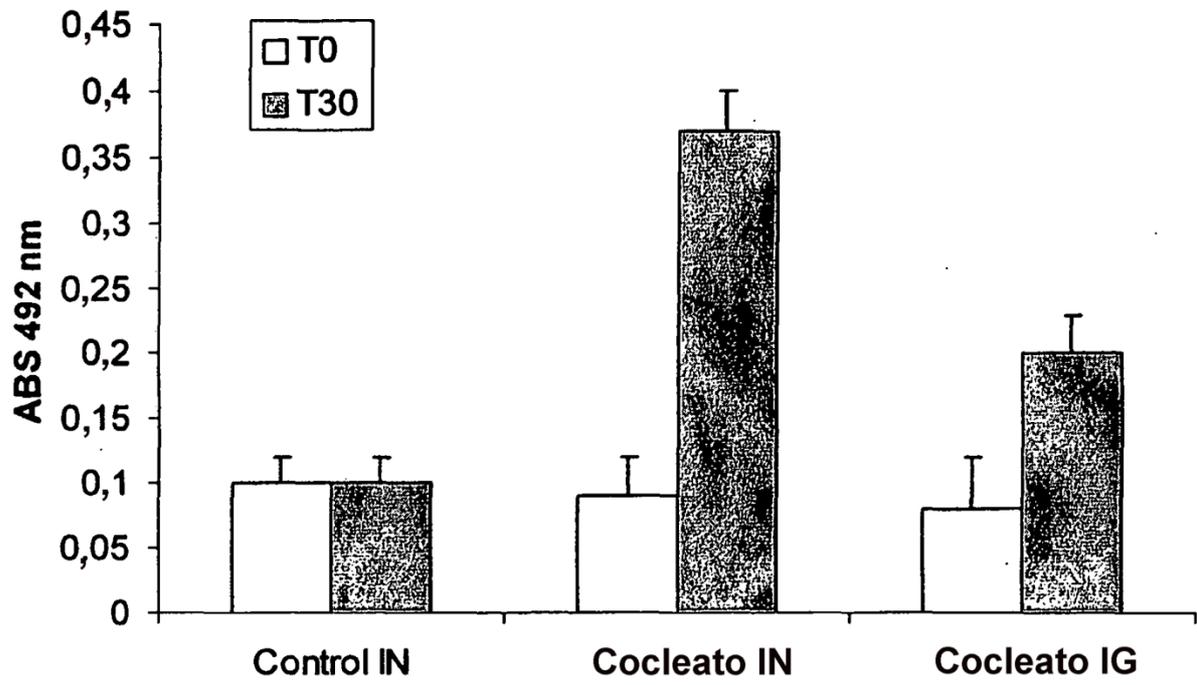


Fig. 9

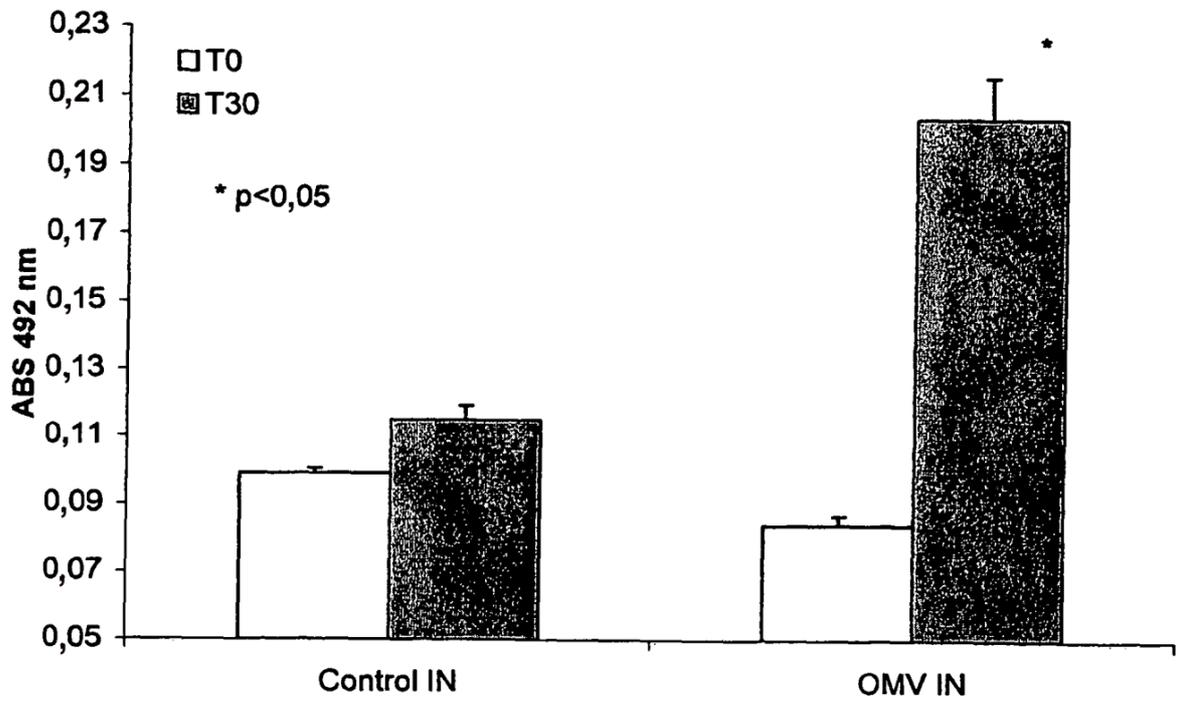


Fig. 10

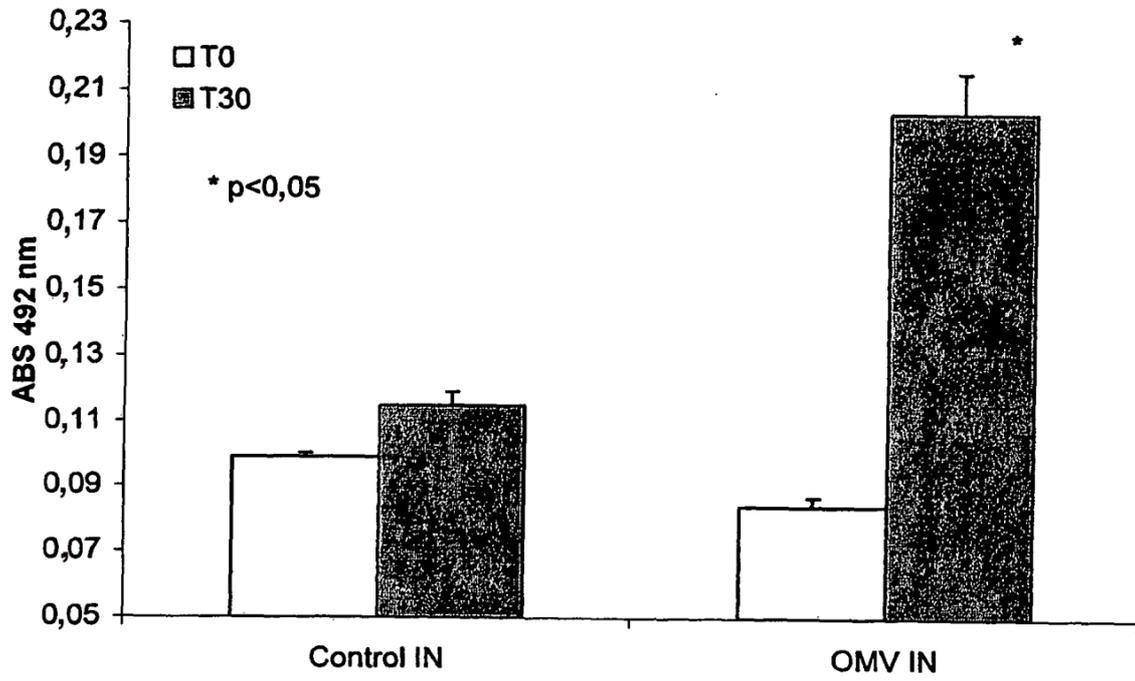


Fig. 11

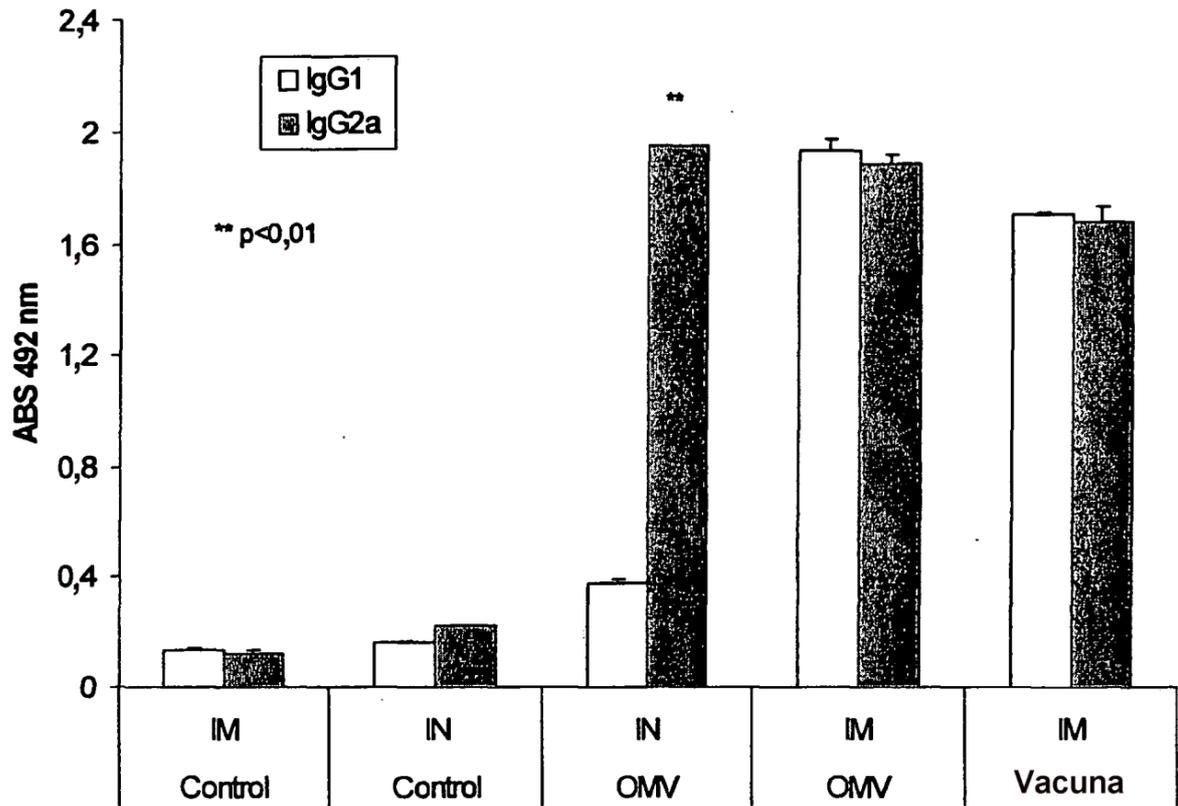


Fig. 12

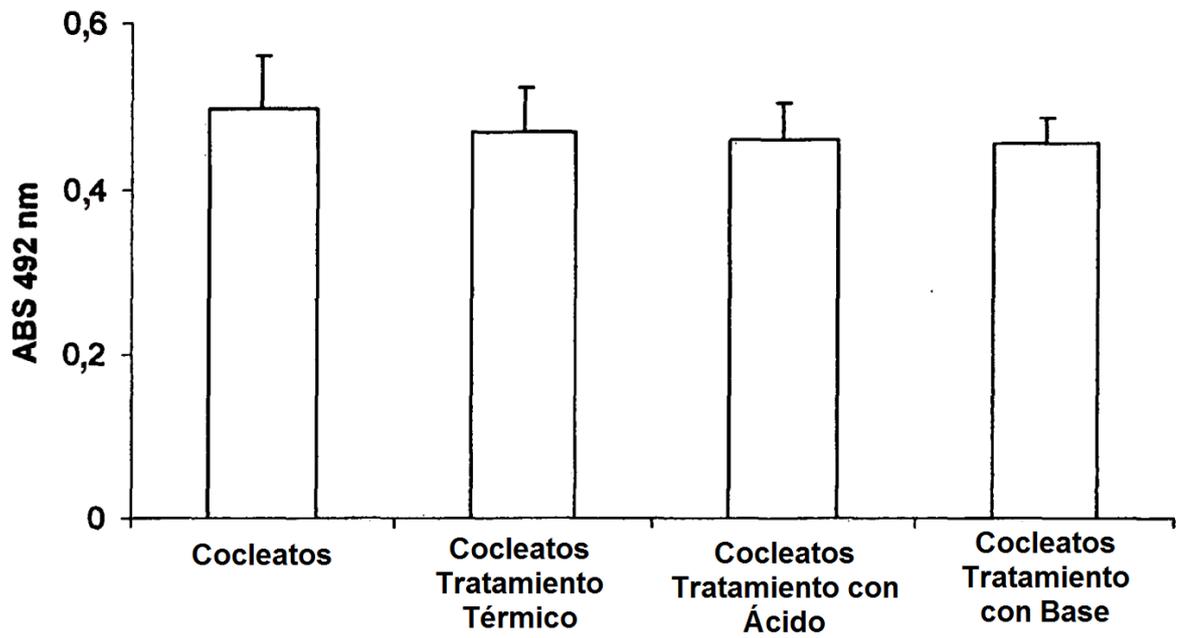


Fig. 13

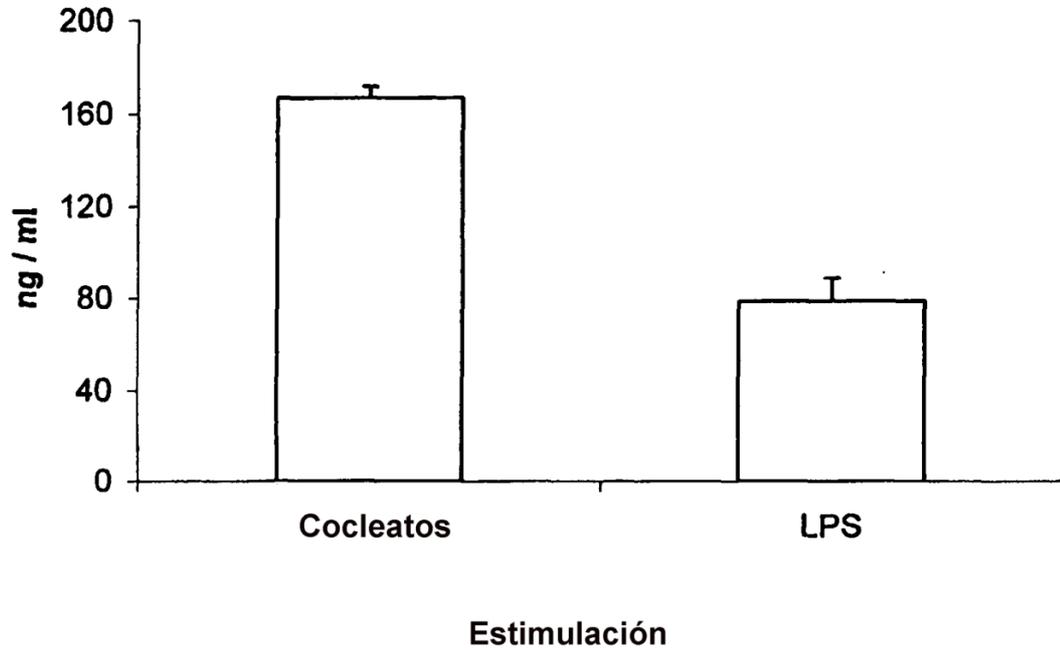


Fig. 14

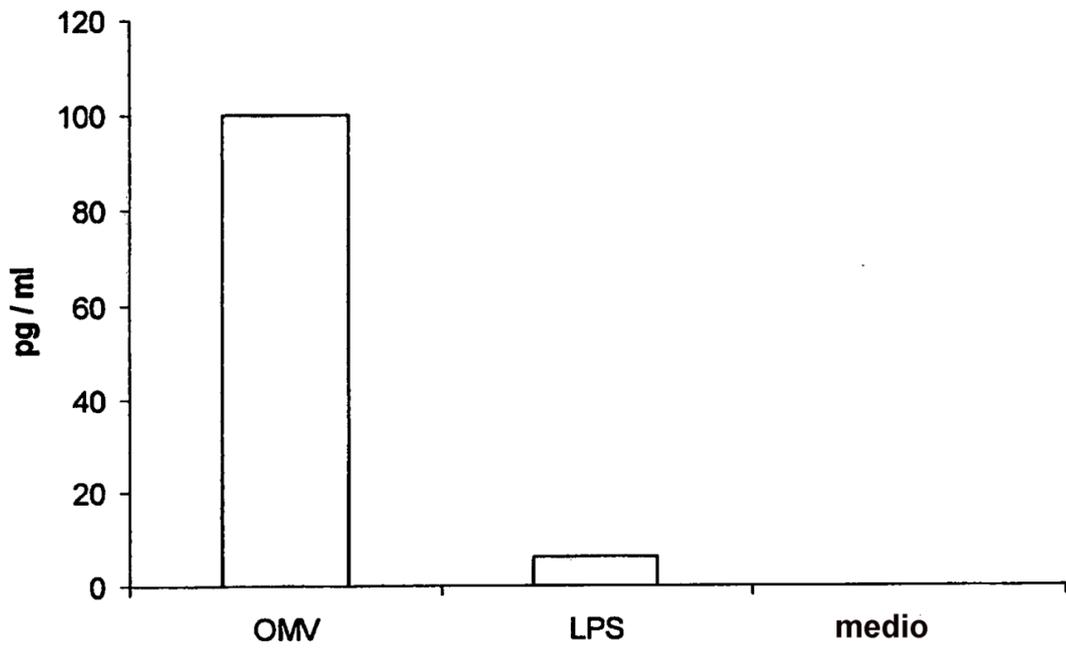


Fig. 15

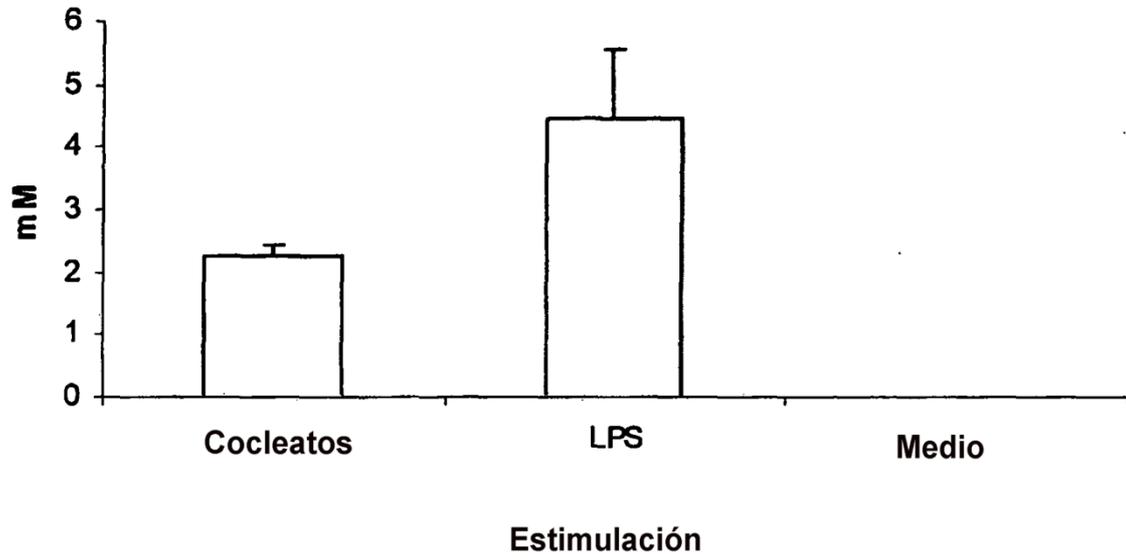


Fig. 16

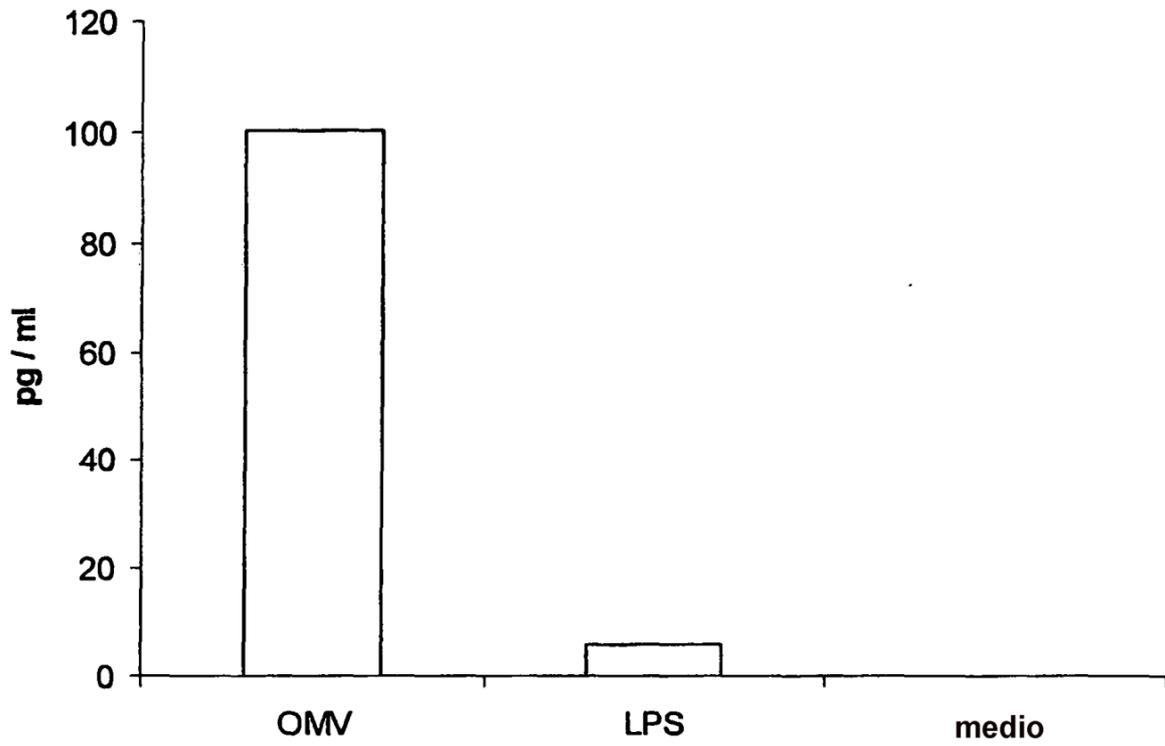


Fig. 17

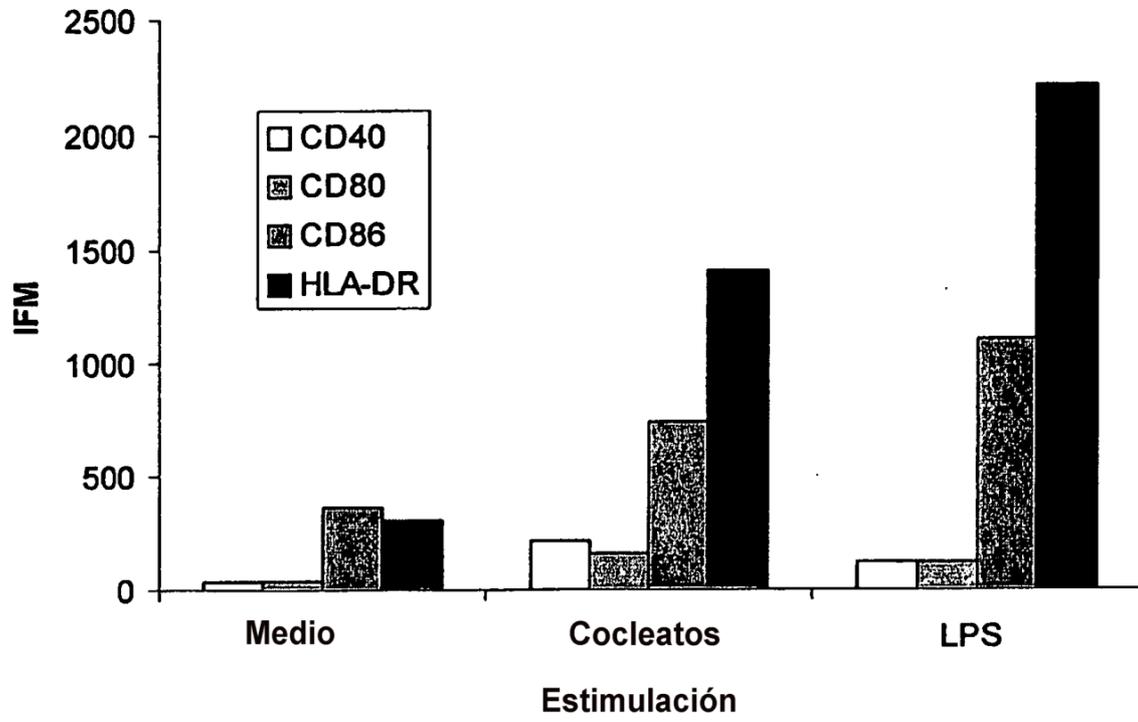


Fig. 18

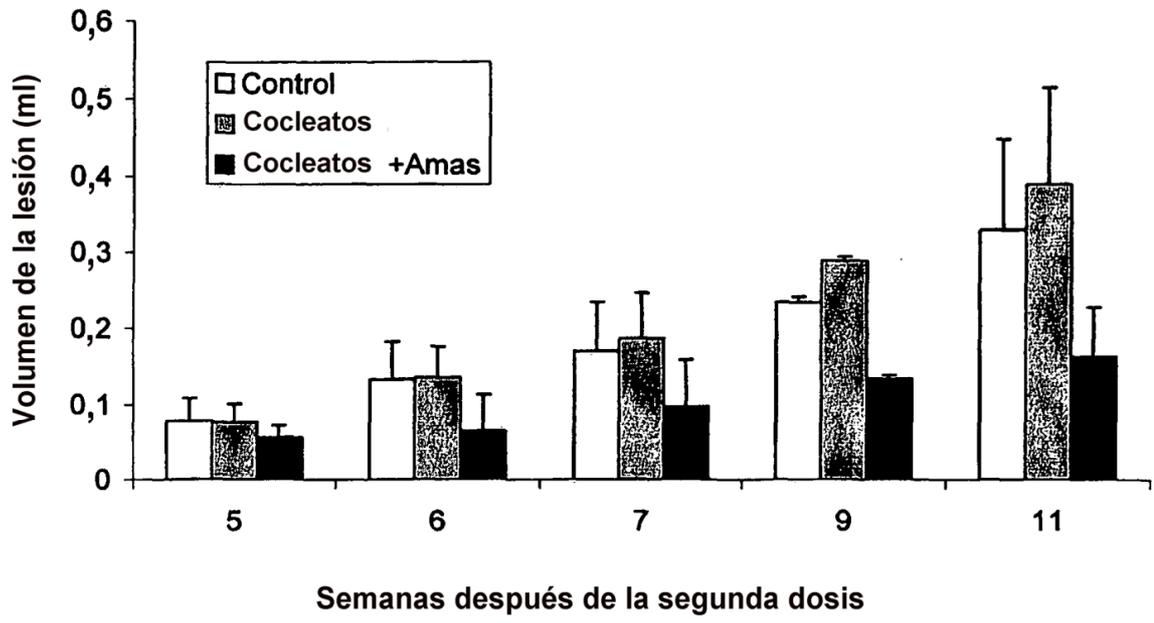


Fig. 19

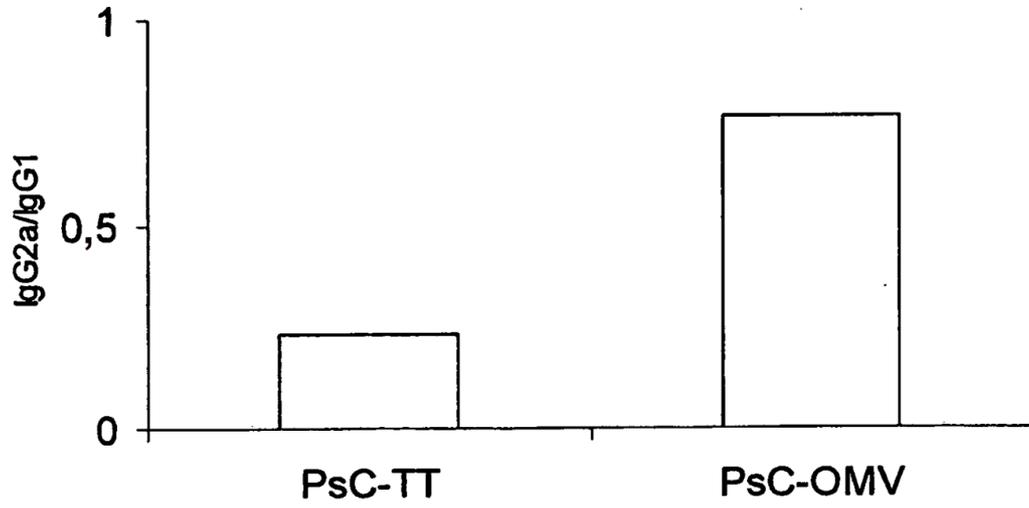


Fig. 20

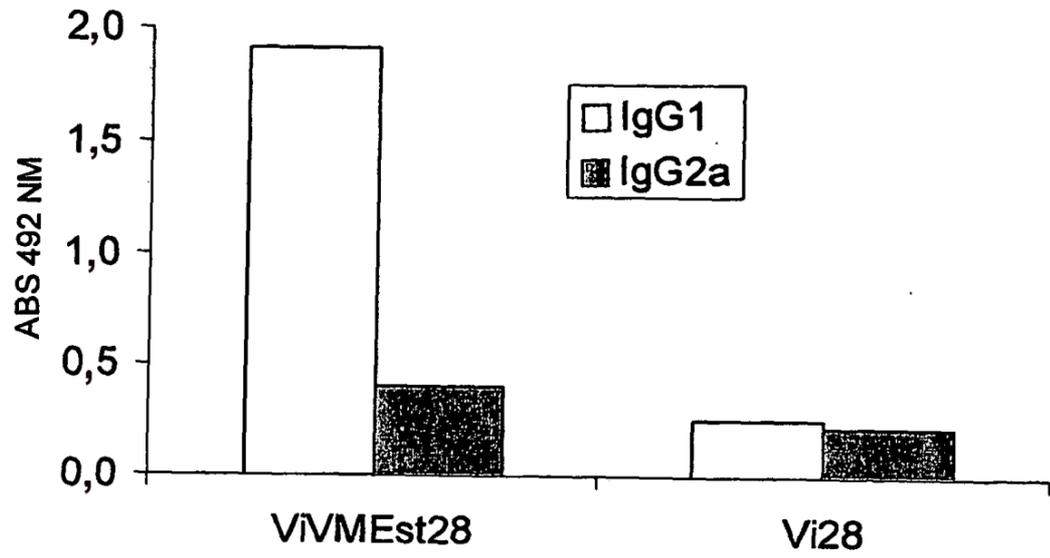


Fig. 21

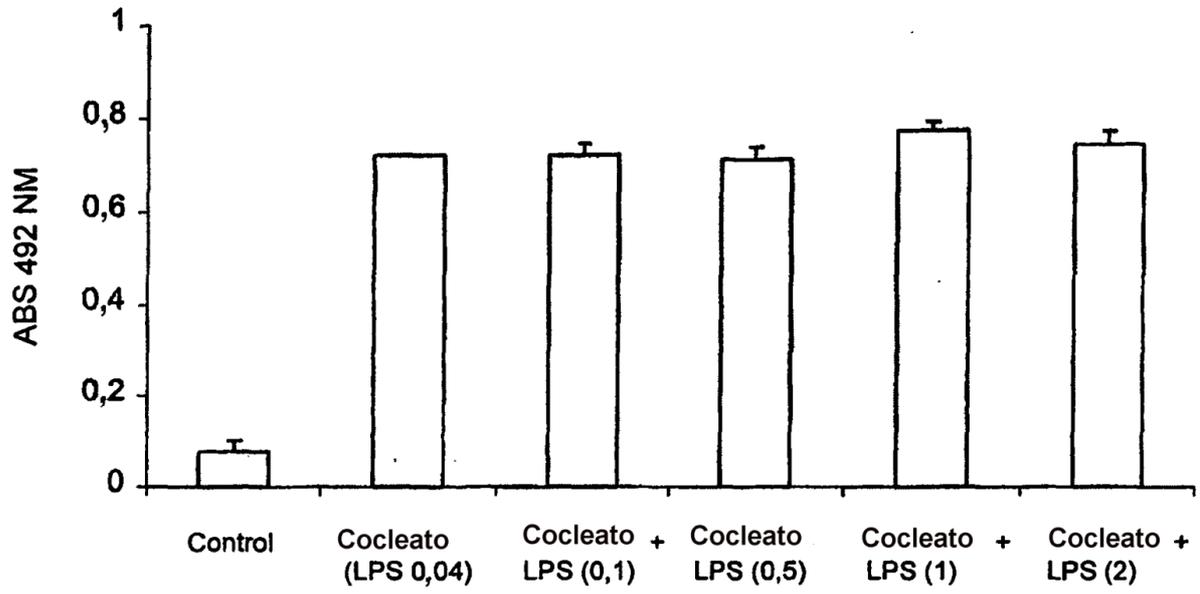


Fig. 22

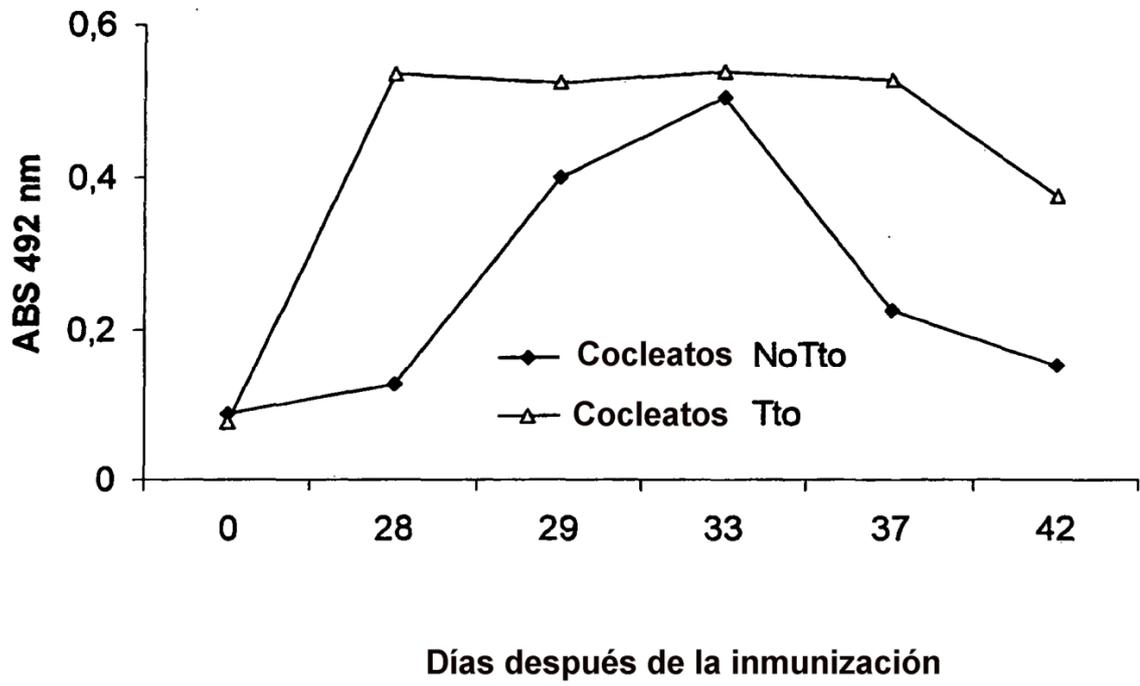


Fig. 23

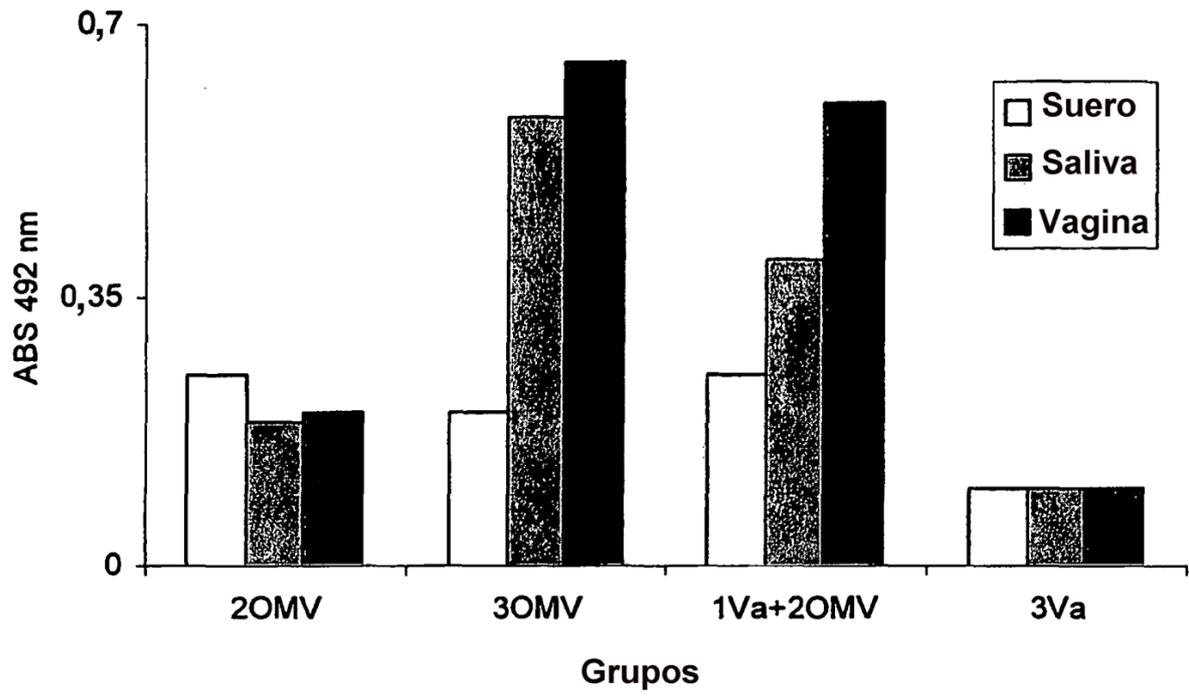


Fig. 24

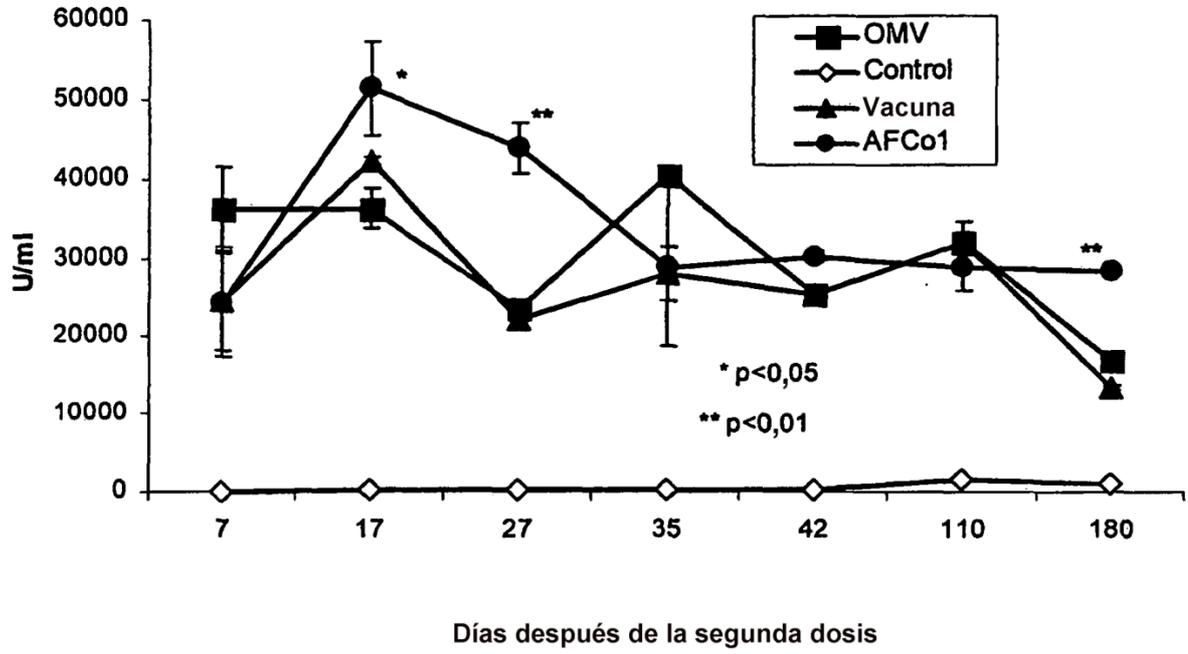


Fig. 25

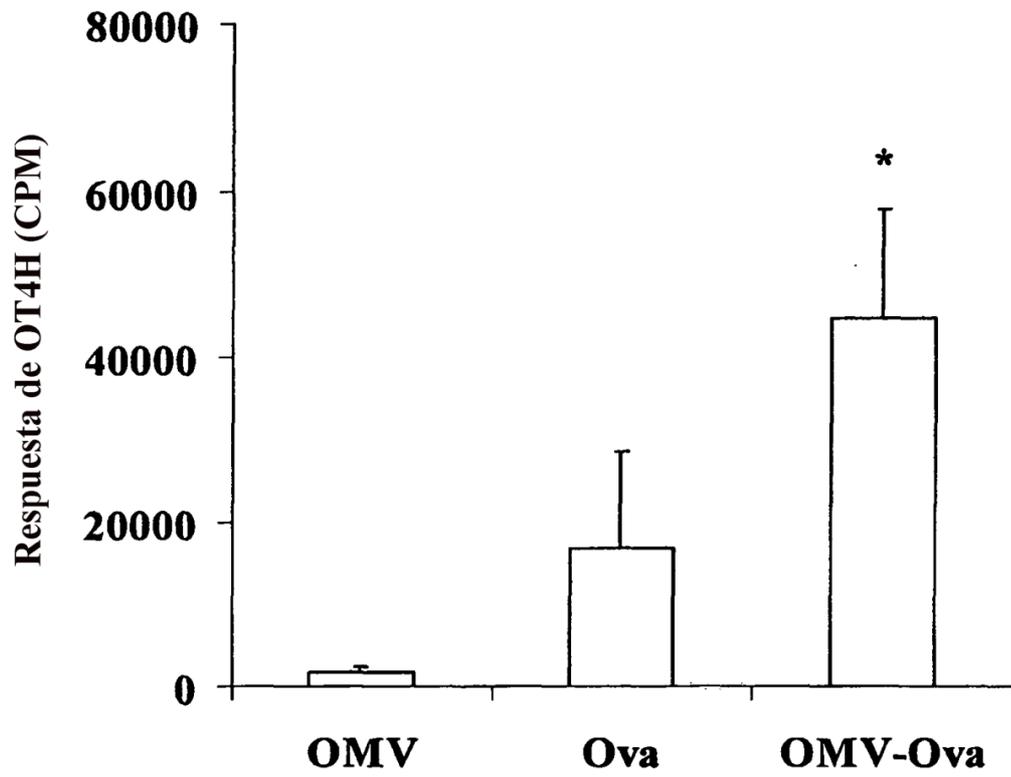


Fig. 26

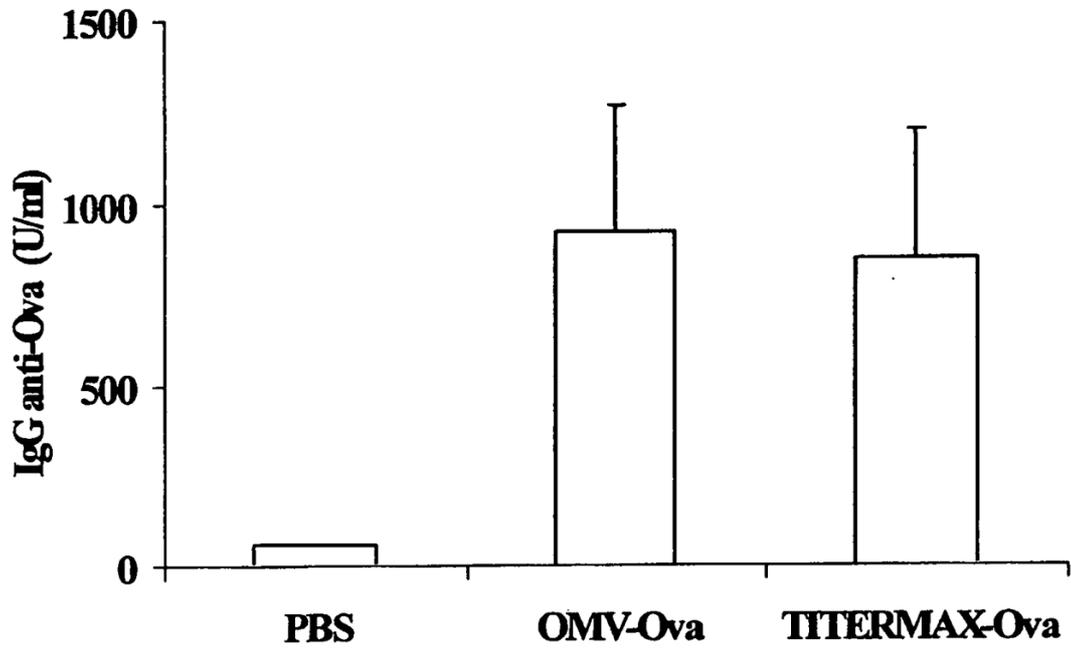


Fig. 27

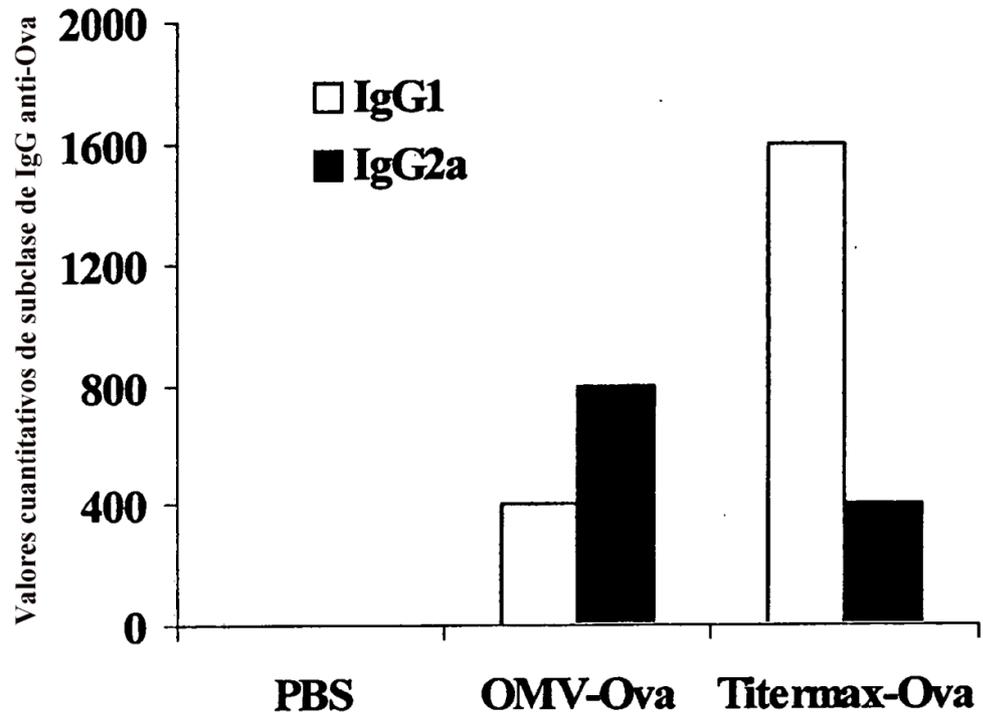


Fig.28

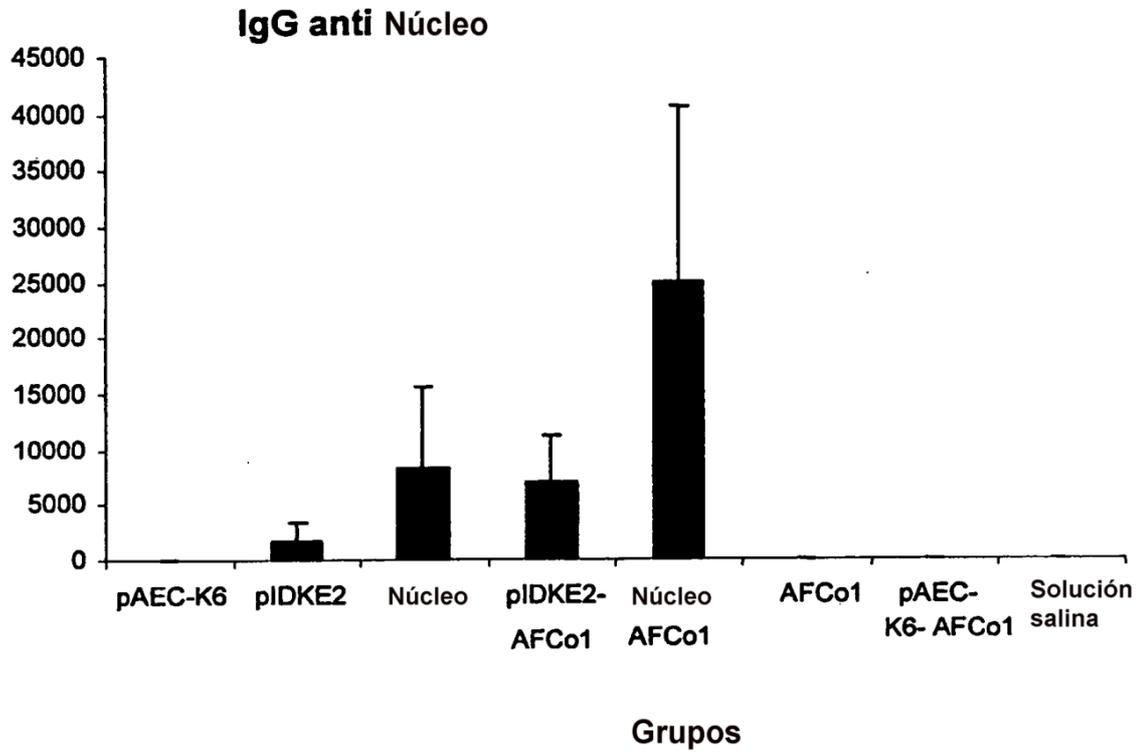


Fig. 29