

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 171**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
A61K 39/07 (2006.01)
C12N 9/54 (2006.01)
C07H 19/00 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2005 E 05758632 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1735338**

54 Título: **Antígenos de carbunco y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

11.02.2004 US 544130 P
12.02.2004 US 544848 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.09.2013

73 Titular/es:

TAKEDA VACCINES (MONTANA), INC. (100.0%)
2155 Analysis Drive
Bozeman, MT 59718-6831, US

72 Inventor/es:

WIMER-MACKIN, SUSAN

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 422 171 T3

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

DESCRIPCIÓN

Antígenos de carbunco y procedimientos de uso

5 **Introducción**

El carbunco es una enfermedad infecciosa letal provocada por *Bacillus anthracis*, una bacteria gram-positiva, formadora de esporas. En su forma más contagiosa y letal, carbunco pulmonar o por inhalación, se inhalan las esporas del carbunco (endoesporas) y germinan en macrófagos alveolares. Los macrófagos transportan la bacteria desde los pulmones al sistema circulatorio del huésped. Una vez se libera desde los macrófagos, *B. anthracis* se replica extracelularmente, lo que provoca síntomas similares a la gripe seguidos de hipotensión masiva y edema pulmonar. (Demicheli *et al.* Vaccine 16:880-884 (1998); Friedlander. J. Appl. Microbiol. 87:303 (1999); Hambleton *et al.* 1984. Vaccine 2:125-132 (1984); Jernigan *et al.* Emerg. Infect. Dis. 7:933-944 (2001))

15 Dos factores principales de la virulencia de *B. anthracis* son los plásmidos, pXO1 y pXO2. (Okinaka *et al.* Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes J. Bacteriol. 181 (20):6509-6515 (1999); Okinaka *et al.* Sequence, assembly and analysis of pXO1 and pXO2. J. Appl. Microbiol. 87(2):261-262 (1999)) El pXO2 codifica el ácido poli(ácido γ -D-glutámico) (PGA), que es el componente principal de la cápsula de la bacteria. El PGA es débilmente inmunógeno y posee propiedades antifagocíticas, es decir, las cepas no encapsuladas se fagocitan fácilmente y prácticamente no son virulentas. El pXO1 codifica las subunidades de proteínas de las exotoxinas secretadas, toxina letal (LeTx) y toxina de edema (EdTx). Cada exotoxina contiene las subunidades A y B. La subunidad A de la EdTx es el factor de edema (EFa), una adenilciclase. La subunidad A de la LeTx es un factor letal (LFa), una metaloproteinasa. La subunidad B de ambas exotoxinas es un antígeno protector (PA), que es un compañero de unión del receptor celular de las toxinas. En presencia de proteasas similares a furina, se retira una parte de 20 kDa de la molécula de PA de longitud completa (83 kDa), formando el PA₆₃ (63 kDa). El PA₆₃ interacciona con otras moléculas de PA₆₃ para formar heptámero(s) (PA₇) y además, interacciona con LFa y/o EFa para formar LeTx y EdTx, respectivamente.

30 Ivins *et al.*, (Vaccine 13; 18 1779-1784; 1995) estudiaron la eficacia en cobayas de varios candidatos a vacuna para el carbunco que comprenden PA en combinación con varios coadyuvantes. Uno de estos candidatos incluía PA y monofosforil lípido A (MPL), presentado en una formulación líquida con una emulsión de escualeno lecitina/Tween 80 ("SLT").

35 La actual vacuna del carbunco humano es un sobrenadante adsorbido en hidróxido de aluminio de cultivos fermentadores de una cepa no encapsulada, toxigénica de *B. anthracis*, V770-NPI-R (vacuna adsorbida del carbunco (AVA)). La vacuna es cara de producir, requiere inmunizaciones repetidas, y provoca dolor localizado con edema y eritema. El ciclo de inmunización consiste en tres inyecciones por vía subcutánea con 2 semanas de separación, tres inyecciones con 6 meses de separación, y una inyección anual mientras el sujeto permanezca en situación de riesgo. Acontecimientos recientes han demostrado el potencial del carbunco como arma biológica y la susceptibilidad de grandes sectores de la población civil. (Friedlander *et al.* J. Infect. Dis. 167:1239-1243 (1993)). Las desventajas de la actual vacuna hacen que sea inviable para una administración generalizada antes o después de un ataque bioterrorista. (Institute of Medicine. 2002. The Anthrax Vaccine. Is It safe? Does It Work? National Academy Press, Washington, D.C.)

45 Por tanto, existe una necesidad de obtener una vacuna del carbunco eficaz que sea adecuada terapéutica y profilácticamente. Para este fin, la presente invención proporciona vacunas del carbunco que se dirigen a uno o más factores de virulencia principales de la bacteria, factores de anulación inmunitaria, y otros objetivos relacionados con la patogenicidad. Se pueden formular las vacunas para su administración en una superficie mucosa para proporcionar inmunidad en las rutas de entrada de las formas más letales y contagiosas de la enfermedad.

50 **Sumario**

En general, la presente invención se refiere a péptidos del carbunco que inducen una respuesta inmunitaria al carbunco cuando se administran a un sujeto. La presente memoria descriptiva divulga procedimientos de inducción de una respuesta inmunitaria al carbunco administrando uno o más péptidos del carbunco formulados con un coadyuvante a una superficie mucosa de un sujeto. La respuesta inmunitaria inducida por péptidos del carbunco puede mejorar y/o evitar al menos un síntoma de la enfermedad del carbunco. En algunos modos de realización, la respuesta inmunitaria inducida por péptidos del carbunco puede mejorar y/o evitar la enfermedad del carbunco. Por lo tanto, las composiciones divulgadas en el presente documento encuentran su uso como inmunógenos, incluyendo pero sin limitarse a, vacunas y agentes terapéuticos.

65 La invención proporciona una composición en polvo seco que comprende un péptido del carbunco y un coadyuvante de MPL, de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 4 de las reivindicaciones adjuntas al presente documento.

La invención proporciona la composición que comprende un PA, o fragmentos inmunógenos del mismo. En un modo

de realización, la composición comprende además un péptido del carbunco del PGA. En un modo de realización, la composición comprende una combinación de dos o más péptidos del carbunco y/o fragmentos inmunógenos del mismo. En un modo de realización preferente, coadyuvante de mucosa puede estimular la inmunidad innata. En un modo de realización preferente, un coadyuvante de mucosa puede ser monofosforil lípido A (MPL). En un modo de realización preferente, un coadyuvante de mucosa puede ser dicorinomicolato de trehalosa (TDM) sintético. En un modo de realización, el coadyuvante de mucosa puede comprender además, quitosano, que se deriva del caparazón de los crustáceos y es adecuado para actuar como depósito. En un modo de realización, el coadyuvante puede ser una combinación de MPL y quitosano.

10 La memoria descriptiva divulga procedimientos de inducción de una respuesta inmunitaria a la bacteria del carbunco que comprende administrar una composición a un sujeto. Se puede inducir una respuesta inmunitaria a la bacteria del carbunco administrando un péptido del carbunco a un sujeto. La respuesta inmunitaria puede ser a LeTx, EdTx, BclA y/o PGA y/o fragmentos inmunógenos de los mismos. La respuesta inmunitaria que se puede inducir protege y/o mejora la enfermedad del carbunco en un sujeto y por lo tanto no provoca la enfermedad del carbunco ni agrava un síntoma de la enfermedad. Por tanto, la memoria descriptiva divulga procedimientos de protección de un sujeto contra la enfermedad del carbunco. La memoria descriptiva divulga procedimientos para evitar que la bacteria del carbunco produzca al menos un síntoma de enfermedad en un sujeto y procedimientos de mejora de al menos un síntoma de la enfermedad del carbunco en un sujeto.

20 La memoria descriptiva también divulga anticuerpos que encuentran su uso como agentes inmunoterapéuticos del carbunco.

Estas y otras características de la presente divulgación se exponen en el presente documento.

25 **Breve descripción de los dibujos**

El experto en la técnica apreciará que los dibujos y las descripciones adjuntas, a continuación, son sólo con fines de ilustración y por lo tanto, no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación en modo alguno.

30 La figura 1 muestra resultados de ELISA para sueros recogidos 4 semanas (izquierda) y 8 semanas (derecha) después de la vacunación inicial (ejemplo 1). El valor de cada ratón individual está indicado por un círculo. Los valores medios para cada tratamiento \pm error estándar de la media están indicados por barras. El contenido en PA de las inmunizaciones está indicado en las etiquetas del eje horizontal.

35 La figura 2 muestra la supervivencia de una LeTx intravenosa letal por ratones inmunizados (ejemplo 1). El cambio de la supervivencia con el tiempo está indicado en horas después de la exposición.

40 La figura 3 muestra resultados de ELISA para sueros recogidos 4 semanas (izquierda) y 8 semanas (derecha) después de la vacunación inicial (ejemplo 2). El valor de cada ratón individual está indicado por un círculo. Los valores medios para cada tratamiento \pm error estándar de la media están indicados por barras. El contenido en PA de las inmunizaciones está indicado en las etiquetas del eje horizontal.

45 La figura 4 muestra la supervivencia de una LeTx intravenosa letal por ratones inmunizados (ejemplo 2). El cambio de la supervivencia con el tiempo está indicado en horas postexposición. Para grupos de inmunización que contienen PA, n=5. Para grupos no inmunizados y de IPX, n=3.

La figura 5 muestra la respuesta de IgG anti-PA medida en la semana 3 (ejemplo 3).

50 La figura 6 muestra la respuesta de IgG anti-PA medida en la semana 8 (ejemplo 3).

La figura 7 muestra la respuesta de IgG anti-PA medida en la semana 8 (ejemplo 4).

La figura 8 muestra la respuesta de IgG anti-cápsula medida en la semana 8 (ejemplo 4).

55 La figura 9 muestra las repuestas de anticuerpos de suero específicos para PA en conejos 4 semanas (A) y 8 semanas (B) después de la inmunización inicial (ejemplo 4). Obsérvese la escala diferentes para el eje Y en los diferentes puntos temporales. Cada conejo individual está indicado por un círculo, y los valores medios para cada tratamiento están indicados por barras. Los valores reales de IgG anti-PA se calcularon en base a una curva estándar creada a partir del suero de conejo calibrado que es hiper-inmunitario al PA, y por tanto, reflejan los $\mu\text{g/ml}$ reales de la IgG anti-PA.

65 La figura 10 muestra respuestas de IgG anti-cápsula de suero en conejos 8 semanas después de la inmunización inicial (4 semanas después del refuerzo). Cada conejo individual está indicado por un círculo. Los valores medios para cada tratamiento están indicados por barras. El antígeno de captura era de x $\mu\text{g/pocillo}$ péptido 10-mero no conjugado de poli(ácido γ -D-glutámico) (enlazador-(γ -D-Glu)₉-D-Glu- OH) (SEQ ID NO:1). Los valores de respuesta

se interpolaron a partir de una curva estándar generada con IgG de conejo, y los valores están expresado como unidades/ml. Una unidad (U) se aproxima a 1 µg.

5 La figura 11 muestra respuestas de IgG de anti-factor letal de suero de en fase de convalecencia en conejos supervivientes 14 días después de la exposición. Cada conejo individual está indicado por un círculo. Los valores de respuesta se interpolaron a partir de una curva estándar generada con IgG de conejo, y los valores están expresado como unidades/ml. Una unidad (U) se aproxima a 1 µg.

10 La figura 12 muestra las respuestas específicas para péptidos de la cápsula *in vitro* de ratones BALB/c inmunizados con el conjugado 10-mero PA-péptido. Los cultivos se reestimularon con el péptido 10-mero de la cápsula conjugado con BSA para garantizar que los efectos medidos eran debidos al péptido de la cápsula. El panel A muestra la proliferación medida por la incorporación de BrdU. El panel B muestra la secreción de IL-2 en el medio de cultivo.

15 La figura 13 muestra las respuestas específicas de LF en el suero de conejos inmunizados por vía intranasal con plásmidos que codifican fragmentos de PA y LF. El suero se recogió a las 12 semanas (día 84), lo que era 4 semanas después de la inmunización final. Cada conejo individual está indicado por un símbolo, y los valores medios para cada tratamiento están indicados por barras. La curva estándar se creó a partir de IgG de conejo, por tanto, las respuestas están indicadas en U/ml, aproximándose 1 U a 1 µg.

20 La figura 14 muestra las respuestas específicas de PA en el suero de conejos inmunizados por vía intranasal con plásmidos que codifican fragmentos de PA y LF. El suero se recogió a las 12 semanas (día 84), lo que era 4 semanas después de la inmunización final. Cada conejo individual está indicado por un símbolo, y los valores medios para cada tratamiento están indicados por barras. La curva estándar se creó a partir de IgG de conejo, por tanto, las respuestas están indicadas en U/ml, aproximándose 1 U a 1 µg.

25 La figura 15 muestra antisueros de BclA que potencian la destrucción de esporas de carbunco por macrófagos de ratón. Las barras negras muestran la proporción de unidades formadoras de colonias (CFU) de *B. anthracis* en comparación con el número de CFU añadidas a las células como esporas. Las barras blancas indican la proporción de CFU de partida recuperadas como bacilos germinados, vegetativos (sensibles al calor).

30 La figura 16 muestra respuestas de IgG específicas de antígeno de suero en ratones inmunizados por vía intranasal dos veces con BclA con un intervalo de 21 días. Las dosis de BclA están indicadas. Las dosificaciones de PA fueron de 10 µg. Todas las formulaciones excepto la solución salina incluyeron 1 µg de toxina del cólera como coadyuvante.

35 La figura 17 muestra los niveles de anticuerpos de IgG en suero específicos de la cápsula 2 semanas después de la inmunización de refuerzo con las formulaciones de vacuna mostradas en la tabla 17.

40 Figura 18 figura 2. Pendientes medias de los grupos de vacuna calculadas representando valores de DO₄₀₅ de IgG en suero anti-cápsula de sangrados temporales y de sueros preinmunitarios.

La figura 19 muestra niveles de anticuerpos de IgG en suero específicos de la cápsula 2 semanas después de la inmunización de refuerzo con las formulaciones de vacuna mostradas en la tabla 19.

45 Descripción detallada de diversos modos de realización

En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural, a menos que se establezca específicamente de otro modo. Los encabezados de sección usados en el presente documento sólo son por motivos de organización y no deben entenderse como limitantes de la materia objeto descrita en modo alguno. Aunque las presentes enseñanzas se describen junto con diversos modos de realización, no se pretende que las presentes enseñanzas limiten dichos modos de realización. Por el contrario, las presentes enseñanzas engloban varias alternativas, modificaciones, y equivalentes, como se apreciará por los expertos en la técnica.

55 La presente invención se refiere al descubrimiento de que ciertos antígenos del carbunco administrados a una superficie mucosa de un sujeto inducen una respuesta inmunitaria al carbunco y sustancialmente no inducen, provocan, ni/o agravan la enfermedad del carbunco. Por tanto, los antígenos del carbunco divulgados en el presente documento encuentran su uso como tratamientos terapéuticos y preventivos de la enfermedad del carbunco.

60 Además de las composiciones, la presente memoria descriptiva divulga procedimientos de inducción de una respuesta inmunitaria al carbunco induciendo una respuesta inmunitaria a antígenos del carbunco. La respuesta inmunitaria inducida por los antígenos del carbunco reacciona con el agente etiológico de la enfermedad del carbunco y/o un factor de virulencia del carbunco, tratando o previniendo de este modo uno o más síntomas de la enfermedad.

65 En algunos casos, los procedimientos comprenden inducir una respuesta inmunitaria para un péptido del carbunco, que como se divulga en el presente documento incluye fragmentos inmunógenos del mismo. La respuesta

inmunitaria se puede inducir administrando un péptido del carbunco y/o fragmentos inmunógenos formulados con un coadyuvante de mucosa a una superficie mucosa de un sujeto. Preferentemente, el péptido del carbunco puede ser un péptido de LeTx, EdTx, PGA, o BcIA, fragmentos inmunógenos del péptido o combinaciones de los mismos. Preferentemente, la respuesta inmunitaria protege al sujeto de la enfermedad del carbunco o mejora un síntoma de la enfermedad.

En consecuencia, la presente memoria descriptiva divulga composiciones que comprenden uno o más péptidos del carbunco y un coadyuvante que puede inducir una respuesta inmunitaria al carbunco. Por "respuesta inmunitaria al carbunco" y equivalentes gramaticales como se usa en el presente documento, se refiere a una respuesta inmunitaria que puede hacer reaccionar con al menos un factor de virulencia de la enfermedad del carbunco y/o un organismo que produce o que puede producir al menos un factor de virulencia de la enfermedad del carbunco. Por tanto, "carbunco" como se usa en el presente documento se refiere a un factor de virulencia de la enfermedad del carbunco y al organismo causante de la enfermedad del carbunco. "Que puede producir al menos un factor de virulencia de la enfermedad del carbunco" como se usa en el presente documento se refiere a un organismo que puede producir o que se puede modificar para producir al menos un factor de virulencia de la enfermedad del carbunco. Un organismo que puede producir o que se puede modificar para producir al menos un factor de virulencia de la enfermedad del carbunco incluye pero no se limita a un organismo "natural" o un organismo alterado genéticamente que puede producir uno o más factores de virulencia del carbunco. Por ejemplo, en algunos modos de realización, un organismo se puede alterar genéticamente por la introducción y la expresión de secuencias de pXO1 y/o pXO2.

Por lo tanto, en algunos casos, "respuesta inmunitaria al carbunco" puede ser una respuesta inmunitaria a una bacteria con forma de barra, gram-positiva, vegetativa, *B. anthracis*. En algunos casos, una "respuesta inmunitaria a un carbunco" puede ser una respuesta inmunitaria a una espora, no vegetativa, de *B. anthracis*. En algunos casos, una "respuesta inmunitaria a un carbunco" puede ser una respuesta inmunitaria a un factor de virulencia del carbunco, incluyendo pero sin limitarse a LeTx, EdTx, y/o PGA. En algunos casos, una respuesta inmunitaria puede conferir inmunidad a un sujeto.

"Sistema inmunitario" y equivalentes gramaticales en el presente documento, se refiere a un sistema de componentes celulares y moleculares que pueden funcionar para distinguir lo propio de lo ajeno y funcionar como una defensa contra células transformadas (por ejemplo, tumores benignos y malignos, células cancerosas y similares), organismos y sustancias exógenos. Los componentes del sistema inmunitario pueden incluir células, tales como, leucocitos, linfocitos (por ejemplo, linfocitos T (por ejemplo linfocitos Th1, Th2, TR1, T_H, NK), linfocitos B), macrófagos, células presentadoras de antígeno (APC), granulocitos (por ejemplo, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos), monocitos, células dendríticas, células M, epitelio (por ejemplo, epitelio de superficie), y similares. Los componentes del sistema inmunitario pueden incluir moléculas secretadas, tales como, inmunoglobulina (anticuerpo, por ejemplo, IgA, IgA secretora, IgM, IgG, IgE y similares), citocinas (por ejemplo, citocinas de tipo I, interferones (citocinas de tipo II), interleucinas, quimiocinas, y similares), factores de necrosis tumoral (por ejemplo TNF 1-19), el sistema de complemento, lisozima, quitinasas, fosfolipasa (por ejemplo, fosfolipasa A2), proteína que incrementa la permeabilidad bactericida (BPI), defensinas, catelicidinas, serprocedinas, lactoferrina y similares (véase, por ejemplo, Fundamental Immunology 1-1701 (Paul ed, 5^a ed, Lippincott Williams & Wilkins 2003 (ISBN 0-7817-3514-9))). Otros componentes del sistema inmunitario pueden incluir, pero no se limitan a, antígenos de histocompatibilidad principal, receptores de linfocitos T, receptores de linfocitos B, antígenos CD, receptores de reconocimiento de patrones (PRR), receptores de reconocimiento de patrones secretados (PRM), receptores de tipo Toll (TLR, por ejemplo, TLR1, 2, 3,4, 5, 6, 7, 8, 9,10), y similares. (Fundamental Immunology 1-1701 (Paul ed, 5^a ed, Lippincott Williams & Willdns 2003 (ISBN 0-7817-3514-9)); Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 1463-1486 (Hardman *et al.*, ed., 10^a ed., McGraw-Hill 2001 (ISBN 0-07-112432-2))).

El experto en la técnica apreciará que, en general el sistema inmunitario puede producir una respuesta inmunitaria innata y una respuesta inmunitaria adaptiva. (Fundamental Immunology 497-523, 561-565, 816-819 (Paul ed., 5^a ed., Lippincott Williams & Willdns 2003 (ISBN 0-7817-3514-9)); Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 1463-1486(Hardman *et al.*, ed., 10^a ed., McGraw-Hill2001 (ISBN 0-07-112432-2)); Roittetal. Immunology 1.1-1.10, 2.8, 9.1-9.13, 13.3, 15.1-15.9, 18.6-18.8, 16.2-16.5 (2^a ed. Gower Medical Publishing 1989)) En general, una respuesta inmunitaria innata se puede caracterizar porque no es sustancialmente específica de antígeno y/o no genera memoria inmunitaria. (Fundamental Immunology 497-518 (Paul, ed., 5^a ed., Lippincott Williams & Wilkins 2003 (ISBN 0-7817-3514-9)); Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 1463-1486 (Hardman *et al.*, ed., 10^a ed., McGraw-Hill 2001 (ISBN 0-07-112432-2)); Roitt *et al.* Immunology 1.1-1.10 (2^a ed. Gower Medical Publishing 1989)) En contraste, una respuesta inmunitaria adaptativa se puede caracterizar porque es sustancialmente específica de antígeno, se desarrolla con el tiempo (por ejemplo, incrementa su afinidad y/o aidez por el antígeno), y en general puede producir memoria inmunológica. Aunque se pueden discernir estas y otras distinciones funcionales entre la inmunidad innata y adaptiva, el experto en la técnica apreciará que los sistemas inmunitarios innato y adaptivo pueden estar integrados y por lo tanto, pueden actuar de manera concertada. (Fundamental Immunology 512-513 (Paul, ed., 5^a ed., Lippincott Williams & Wilkins 2003 (ISBN 0-7817-3514-9)); Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 1463-1486 (Hardman *et al.*, ed., 10^a ed., McGraw-Hill 2001 (ISBN 0-07-112432-2)); Roittetal. Immunology 1,10 (2^a ed. Gower Medical Publishing 1989)) Por lo tanto, la inducción de una respuesta inmunitaria innata puede dar lugar a una respuesta inmunitaria adaptiva y

viceversa.

"Respuesta inmunitaria" como se usa en el presente documento se refiere a una respuesta del sistema inmunitario a uno o más antígenos del carbunco. En varios casos, una respuesta inmunitaria a un antígeno del carbunco puede ser una respuesta innata y/o adaptiva. En algunos casos, una respuesta inmunitaria adaptiva puede ser una "respuesta inmunitaria primaria" que, como se usa en el presente documento, se refiere a una respuesta inmunitaria que se produce en la primera exposición de un sujeto "no inmunizado" a un antígeno. Por ejemplo, en el caso de una respuesta de anticuerpo primaria, después de un periodo de retraso o latencia de desde aproximadamente 3 a 14 días dependiendo de, por ejemplo, el antígeno, la dosis, y el sujeto, se pueden producir anticuerpos para un antígeno del carbunco. En general, la producción de IgM dura varios días seguida de la producción de IgG y la respuesta de IgM puede disminuir. La producción de anticuerpos puede terminar después de varias semanas pero se pueden producir células de memoria. En algunos casos, una respuesta inmunitaria adaptiva puede ser una "respuesta inmunitaria secundaria", "respuesta anamnésica", o "respuesta de refuerzo" que, como se usa en el presente documento, se refiere a la respuesta inmunitaria que se produce en una segunda y posterior exposición de un sujeto a un antígeno. En general, en una respuesta inmunitaria secundaria, las células de memoria responden al antígeno y por lo tanto, la respuesta inmunitaria secundaria se puede diferenciar de una respuesta inmunitaria primaria cualitativa y/o cuantitativamente. Por ejemplo, en comparación con una respuesta de anticuerpo primaria, el periodo de retraso de una respuesta de anticuerpo secundaria puede ser más corto, la valoración de anticuerpo máxima puede ser mayor, se puede producir un anticuerpo de afinidad mayor, y/o el anticuerpo puede persistir durante un periodo de tiempo más largo.

En algunos casos, una respuesta inmunitaria a un antígeno del carbunco puede reaccionar con el carbunco. Por tanto, el experto en la técnica apreciará que en algunos casos, una respuesta inmunitaria a un antígeno del carbunco puede reaccionar con el agente causante de la enfermedad del carbunco y/o un factor de virulencia de la enfermedad del carbunco. En varios casos, una respuesta inmunitaria a un antígeno del carbunco puede evitar, reducir, inhibir, neutralizar y/o inactivar sustancialmente un síntoma de la enfermedad del carbunco. Por lo tanto, en algunos casos, una respuesta inmunitaria a un antígeno del carbunco puede mejorar la enfermedad del carbunco. En casos, una respuesta inmunitaria a un antígeno del carbunco puede ser una respuesta inmunitaria protectora. "Respuesta inmunitaria protectora" como se usa en el presente documento es una respuesta que proporciona inmunidad para el carbunco.

"Antígeno del carbunco" como se usa en el presente documento se refiere a un antígeno adecuado para inducir una respuesta inmunitaria al carbunco que no induce ni agrava un síntoma de la enfermedad del carbunco en un sujeto. Por tanto, los antígenos del carbunco encuentran su uso en el tratamiento de carbunco. En varios casos, un antígeno del carbunco puede ser un antígeno de una espora del carbunco (por ejemplo, BcIA), un antígeno de una bacteria vegetativa (por ejemplo, un antígeno de pared celular, antígeno de la cápsula (por ejemplo, PGA), antígeno secretado (por ejemplo, exotoxina). En algunos casos, un antígeno del carbunco puede ser un péptido del carbunco, incluyendo fragmentos inmunógenos del mismo. En varios casos, un péptido del carbunco puede ser un péptido exotoxina del carbunco (por ejemplo, EF, LF, LF_n, PA, PA₆₃), PGA, BcIA, fragmentos de péptido, y combinaciones de los mismos. "Péptido", "polipéptido", "oligopéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un polímero de al menos dos residuos de aminoácidos unidos de forma covalente. "Aminoácido" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que contiene grupos amino y ácido carboxílico y por lo tanto incluye pero no se limita a α -, β -, γ -aminoácidos, etc., iminoácidos (por ejemplo, prolina, hidroxiprolina, histidina) y similares. "Residuo aminoacídico" y "residuo peptídico" como se usa en el presente documento se refiere a lo que queda de un aminoácido después de que un aminoácido se una de forma covalente por medio de un enlace peptídico.

"Aminoácido", "residuo aminoacídico", y "residuo peptídico" como se usa en el presente documento incluyen moléculas que tienen estructuras naturales y sintéticas (por ejemplo, aminoácidos naturales, análogos de aminoácidos, enlaces peptídicos, estructuras peptidomiméticas sintéticas (por ejemplo, "peptoides" (véase Simon *et al.*, PNAS USA 89(20):9367 (1992)), uniones γ , homofenilalanina, citrulina, noreleucina). Una o más cadenas laterales pueden estar en la configuración (R) o la (S). En un modo de realización preferente, todas las cadenas laterales están en la configuración (S) o L. En un modo de realización preferente, las cadenas laterales están en una configuración adecuada para inducir una respuesta inmunitaria que reacciona con el carbunco. En algunos modos de realización, los sustituyentes no aminoacídicos se pueden unir a un péptido, por ejemplo, para evitar o retrasar la degradación *in vivo*. Un péptido que incluye una cadena lateral no natural y/u otra estructura se puede sintetizar o, en algunos casos, preparar de forma recombinante. (Hest *et al.* FEBS Lett. 428(1-2):68-70 (1998), Tang *et al.*, Abstr. Pap. Am. Chem. S218:U138, parte 2, 22 de agosto de 1999)

"Péptido del carbunco" incluye pero no se limita a péptidos que comprenden la secuencia de longitud completa del péptido natural y péptidos que pueden ser más cortos o más largos que las secuencias de aminoácidos naturales codificadas por una bacteria del carbunco o sus plásmidos, pXO1 o pXO2. En varios modos de realización ejemplares, un péptido del carbunco comprende una o más de las siguientes: a) la capacidad para bloquear la unión de un anticuerpo al carbunco; b) la capacidad para bloquear la unión de un péptido del carbunco a una célula huésped o a otro péptido del carbunco; c) la capacidad para inducir una reacción cruzada de anticuerpo con carbunco; d) al menos una actividad biológica de un péptido natural del carbunco; e) al menos la homología descrita

en el presente documento; f) la capacidad para inducir una respuesta inmunitaria para el carbunco; o g) la capacidad para inducir una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica para la enfermedad del carbunco. En algunos modos de realización, un péptido del carbunco presenta dos o más de estas características. En algunos modos de realización, un péptido del carbunco que comparte al menos un epítipo antigénico con una proteína natural.

5 Por tanto, "péptido del carbunco" como se usa en el presente documento incluye un péptido que tiene una secuencia homóloga o idéntica a una secuencia de aminoácidos de un péptido natural del carbunco. Por tanto, péptido del carbunco incluye péptidos expresados de forma recombinante, y/o aislados y/o purificados, y/o sintéticos. Un péptido del carbunco puede ser un péptido de longitud completa producido por una bacteria del carbunco o un péptido del
10 carbunco puede ser un fragmento de péptido de longitud completa en particular para PA, LF, EF, PGA y BclA. Por "fragmento" y equivalentes gramaticales en el presente documento se quiere decir un péptido que es al menos un residuo aminoacídico más corto en comparación con un péptido de longitud completa. En varios casos, un péptido del carbunco puede ser de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, desde aproximadamente 5 hasta
15 aproximadamente 15 aminoácidos de longitud, y desde 5 hasta aproximadamente 10 aminoácidos de longitud. En algunos casos, un péptido del carbunco puede comprender aproximadamente un 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o un 100 % del número de aminoácidos que comprende un péptido de longitud completa.

20 En varios casos, un péptido del carbunco puede comprender una secuencia homóloga a cualquiera de los péptidos PA, LF, EF, PGA, y/o BclA, (véanse las secuencias mostradas en Okinaka *et al.* J. Bacteriol. 181(20):6509-6515 (1999); Okinaka *et al.* J. Appl. Microbiol. 87(2):261-262 (1999); y NCBI: AJ516947, AJ516946, AJ516945, AJ516944, AJ516943. En varios casos, la homología de una secuencia de péptido del carbunco y la correspondiente secuencia de una bacteria del carbunco puede ser mayor de aproximadamente un 75 %, mayor de aproximadamente un 80 %,
25 mayor de aproximadamente un 85 %, mayor de aproximadamente un 90 %, mayor de aproximadamente un 95 %, o mayor de aproximadamente un 98 %. En algunos casos, la homología puede ser de desde aproximadamente un 93 hasta aproximadamente un 95 hasta aproximadamente un 98 % hasta aproximadamente un 100 %. "Homología" como se usa en el presente documento se refiere a la similitud o identidad de secuencia, siendo preferente la identidad. La homología se puede determinar usando técnicas estándar conocidas en la técnica y descritas a
30 continuación.

En algunos casos, un "péptido del carbunco" incluye un péptido que induce un anticuerpo que se une a una secuencia de aminoácidos deducida de un ácido nucleico del carbunco. Por lo tanto, un péptido del carbunco puede comprender un epítipo que induce un anticuerpo en un sujeto que se une a una secuencia de aminoácidos deducida
35 de un ácido nucleico del carbunco. Como se conoce en la técnica, los anticuerpos reconocen epítipos lineales o bien conformacionales. Por "epítipo", "determinante antigénico", y equivalentes gramaticales en el presente documento se quiere decir una región de un antígeno o inmunógeno que se puede reconocer específicamente por (es decir, se une a) un componente molecular de una respuesta inmunitaria que funciona en el reconocimiento inmunitario (por ejemplo, anticuerpo, receptor de linfocitos T, receptor de linfocitos B). "Epítipo lineal" en el presente documento se
40 refiere a un epítipo que comprende una secuencia de al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o aproximadamente 20 aminoácidos conectados de forma lineal, aminoácidos que, por sí mismos o como parte de una secuencia más grande, pueden inducir una respuesta inmunitaria y/o se pueden reconocer por el sistema inmunitario, incluyendo mecanismos efectores inmunitarios, como se conoce en la técnica. "Epítipo conformacional" en el presente documento se refiere a un epítipo que comprende aminoácidos con una estructura
45 tridimensional o terciaria que, sola o como parte de una secuencia más grande, puede inducir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, anticuerpo) y/o se puede reconocer por (por ejemplo, se une a) el sistema inmunitario. El experto en la técnica apreciará que, en general, pero no de forma uniforme, los aminoácidos que comprenden un epítipo conformacional no comprenden una secuencia lineal, continua, de residuos aminoacídicos dentro de la estructura primaria de una proteína. En algunos casos, un epítipo conformacional puede comprender residuos
50 aminoacídicos de dos péptidos más. Por lo tanto, en algunos casos, un epítipo conformacional se puede formar como resultado de las interacciones moleculares que dan como resultado la formación de homo o heterodímeros y trímeros y similares.

55 En algunos casos, un epítipo puede ser sustancialmente único, por ejemplo, un epítipo puede inducir una respuesta inmunitaria caracterizada por una reactividad cruzada estadísticamente no significativa o no detectable con otros epítipos y/o péptidos.

60 En algunos casos, un epítipo puede inducir una respuesta inmunitaria caracterizada por una reactividad cruzada estadísticamente significativa con otro epítipo y/o péptido. Por lo tanto, en algunos casos, un epítipo se puede compartir por péptidos que tienen una homología estadísticamente no significativa en sus secuencias de aminoácidos lineales. Por tanto, en algunos casos, un epítipo conformacional se puede compartir por péptidos que tienen secuencias de aminoácidos no homólogas debido a la estructura terciaria de los péptidos y un epítipo conformacional contenido en ella puede ser sustancialmente similar.

65 Cuando se usa un péptido del carbunco para generar anticuerpos que reconocen el carbunco, el péptido del carbunco comparte al menos un epítipo con una proteína del carbunco de longitud completa. Por tanto, en algunos

casos, los anticuerpos para un péptido del carbunco que tiene una secuencia de aminoácidos que es más corta que el péptido de longitud completa se pueden unir al péptido de longitud completa.

5 También se incluyen dentro de la definición de péptidos del carbunco variantes de secuencias de aminoácidos. Las variantes de péptido del carbunco pueden entrar dentro de una o más clases, tales como variantes de sustitución, de inserción o de delección. Habitualmente, estas variantes se pueden preparar por mutagénesis específica de sitio de nucleótidos en un ADN que codifica un péptido del carbunco, usando mutagénesis de casete o de PCR u otras técnicas bien conocidas en la técnica, para producir ADN que codifique la variante, y después de esto expresar el ADN en un cultivo de células recombinantes o técnicas de expresión *in vitro* como se conoce en la técnica. Sin embargo, se pueden preparar péptidos del carbunco variantes que tienen hasta aproximadamente 100-150 residuos por síntesis *in vitro* usando técnicas establecidas. Las variantes de secuencias de aminoácidos se caracterizan por la naturaleza predeterminada de la variación, una característica que las distingue de la variación natural de una secuencia de aminoácidos del péptido del carbunco. Típicamente, las variantes presentan la misma actividad biológica cualitativa que el análogo natural, aunque también se pueden seleccionar variantes que tengan características modificadas como se indica de forma más detallada a continuación.

15 Aunque el sitio o región para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la mutación en sí no está necesariamente predeterminada. Por ejemplo, para optimizar el funcionamiento de una mutación en un sitio dado, se puede realizar una mutagénesis aleatoria en la región o el codón diana y cribar las variantes del péptido del carbunco expresadas para detectar la combinación óptima de actividad deseada. Las técnicas para realizar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en ADN que tiene una secuencia conocida son bien conocidas, por ejemplo, mutagénesis de cebador M13 y mutagénesis de PCR. El cribado de los mutantes se realiza usando ensayos de las actividades de péptido del carbunco, como se conoce en la técnica.

20 Típicamente, las sustituciones de aminoácidos pueden ser residuos individuales; normalmente, las inserciones serán del orden de desde aproximadamente 1 a 20 aminoácidos, aunque se pueden tolerar inserciones considerablemente más grandes. Las delecciones varían desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 residuos, aunque en algunos casos las delecciones pueden ser mucho más grandes.

25 Se pueden usar sustituciones, delecciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas para obtener una variante final. En general, estos cambios se pueden realizar en unos pocos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula. Sin embargo, en determinadas circunstancias se pueden tolerar cambios más grandes. Cuando se deseen alteraciones pequeñas en las características del péptido del carbunco, en general, las sustituciones se realizan de acuerdo con el siguiente gráfico:

35

Gráfico I

Residuo original	Sustituciones ejemplares
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe

Val Ile, Leu

Se pueden realizar cambios sustanciales en la función o identidad inmunológica que sean menos conservadores que los mostrados en el gráfico I. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones que afecten más significativamente a: la estructura del esqueleto peptídico en el área de alteración, por ejemplo, la estructura alfa-helicoidal o de lámina beta; la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo; o la masa de la cadena lateral. Las sustituciones que, en general, se espera que produzcan los cambios más grandes en las propiedades del polipéptido son en las que (a) un residuo hidrófilo, por ejemplo serilo o treonilo, se puede sustituir con (o por) un residuo hidrófobo, por ejemplo leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina se puede sustituir con (o por) cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo lisilo, arginilo, o histidilo, se puede sustituir con (o por) un residuo electronegativo, por ejemplo glutamilo o aspartilo; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo fenilalanina, se puede sustituir con (o por) uno que no tenga una cadena lateral, por ejemplo glicina.

Típicamente, las variantes presentan la misma actividad biológica cualitativa y provocan una respuesta inmunitaria sustancialmente similar al análogo natural, aunque se pueden seleccionar variantes para modificar las características de un péptido del carhunco según sea necesario. De forma alternativa, se puede diseñar una variante de modo que se altere la actividad biológica del péptido del carhunco.

Las modificaciones covalentes de péptidos del carhunco están incluidas dentro del alcance de la presente invención, en particular para usos terapéuticos o profilácticos. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar residuos de aminoácidos dirigidos de un péptido del carhunco con un agente de derivatización orgánico que puede reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los residuos N o C terminales de un péptido del carhunco. La derivatización con agentes bifuncionales puede ser útil, por ejemplo, para reticular el péptido del carhunco con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su uso en los procedimientos descritos a continuación, o para la estabilidad *in vivo*. Los agentes de reticulación usados comúnmente incluyen pero no se limitan a, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluyen ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(propionato de succinimidilo), maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como 3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato de metilo, y clorhidrato de 1-etil-3-(-3-dimetilamino-propil)carbodiimida.

Otras modificaciones incluyen desamidación de residuos de glutaminilo y asparaginilo con los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos amino de las cadenas laterales de lisina, arginina, y histidina (véase, por ejemplo, T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, p. 79-86 (1983)), acetilación de la amina N terminal, y amidación del grupo carboxilo C terminal.

Además, también se incluyen modificaciones tales como la derivatización con polietilenglicoles (y otros glicoles) para incrementar la semivida y estabilidad *in vivo*.

En algunos modos de realización, un péptido del carhunco se puede unir a coadyuvantes u otras moléculas para incrementar la respuesta inmunitaria para el péptido del carhunco. En algunos modos de realización, una molécula química comprende una fusión de un péptido del carhunco con un polipéptido de etiqueta que, en algunos modos de realización, puede proporcionar un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. En general, la etiqueta del epítipo se puede situar en el extremo amino o carboxilo terminal del péptido del carhunco. Sin embargo, en algunos modos de realización, se puede situar una etiqueta de epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos de un péptido del carhunco. En algunos modos de realización, se puede usar una etiqueta de epítipo como enlazador para unir un péptido del carhunco con otro péptido u otro tipo de molécula. En algunos modos de realización, un enlazador puede ser Ac-Cys-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:3). La presencia de dichas formas etiquetadas con epítipo de un péptido del carhunco se puede detectar usando un anticuerpo contra la etiqueta de epítipo. Además, la provisión de la etiqueta de epítipo permite que el péptido del carhunco se purifique fácilmente con purificación por afinidad usando una anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se una a la etiqueta de epítipo; esto también puede ser útil para unir el péptido del carhunco a un soporte para procedimientos de cribado heterogéneo. Varios polipéptidos de etiqueta y sus anticuerpos respectivos son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido de etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la misma [Evan *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de glucoproteína D (gD) del virus del herpes simple y su anticuerpo [Paborsky *et al.*, *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos de etiqueta incluyen el péptido Flag [Hopp *et al.*, *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]; el péptido de epítipo KT3 [Martin *et al.*, *Science*, 255:192-194 (1992)]; el péptido de epítipo de tubulina [Skinner *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]; y la etiqueta del péptido proteína de gen 10 del T7 [Lutz-Freyermuth *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)].

Por "ácido nucleico", "oligonucleótido", "polinucleótido", y equivalentes gramaticales en el presente documento se quiere decir al menos dos nucleótidos unidos juntos de forma covalente. En general, un ácido nucleico de la

presente invención contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, se incluyen análogos de ácido nucleico que pueden tener esqueletos alternativos, que comprenden, por ejemplo, fosforamida (Beaucage *et al.*, Tetrahedron 49(10):1925 (1993) y referencias del mismo; Letsinger, J. Org. Chem. 35:3800(1970); Sprinzl *et al.*, Eur. J. Biochem. 81:579 (1977); Letsinger *et al.*, Nucl. Acids Res. 14:3487(1986); Sawai *et al.*, Chem. Lett. 805(1984), Letsinger *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 110:4470 (1988); and Pauwels *et al.*, Chemica Scripta 26:141 91986)), fosforotioato (Mag *et al.*, Nucleic Acids Res. 19:1437 (1991); y la patente de los EE.UU. n.º 5.44.048), fosforoditioato (Briu *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 111:2321 (1989), enlaces O-metilfosforoamidita (véase Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press), y enlaces y esqueletos de ácido péptidonucleico (véase Egholm, J. Am. Chem. Soc. 114:1895 (1992); Meier *et al.*, Chem. Int. Ed. Engl. 31:1008 (1992); Nielsen, Nature, 365:566 (1993); Carlsson *et al.*, Nature 380:207 (1996). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen los que tienen esqueletos positivos (Denpcy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097 (1995); esqueletos no iónicos (patentes de los EE.UU. n.º 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; Kiedrowski *et al.*, Angew. Chem. Intl. Ed. English 30:423 (1991); Letsinger *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 110:4470 (1988); Letsinger *et al.*, Nucleoside & Nucleotide 13:1597 (1994); capítulos 2 y 3, ASC Symposium Serie 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook; Mesmaeker *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4:395 (1994); Jeffs *et al.*, J. Biomolecular NMR 34:17 (1994); Tetrahedron Lett. 37:743 (1996)) y esqueletos sin ribosa, que incluyen los descritos en las patentes de los EE.UU. n.º 5.235.033 y 5.034.506, y capítulos 6 y 7, ASC Symposium Serie 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también están incluidos dentro de la definición de ácidos nucleicos (véase Jenkins *et al.*, Chem. Soc. Rev. (1995) p. 169-176). Varios análogos de ácidos nucleicos se describen en Rawls, C & E News, 2 de junio de 1997, página 35. Estas modificaciones del esqueleto ribosa-fosfato se pueden realizar para facilitar la adición de restos adicionales tales como marcas, o para incrementar la estabilidad y la semivida de dichas moléculas en entornos fisiológicos. La determinación del tipo de nucleótidos y su posición dentro de un ácido nucleico depende al menos en parte del uso destinado del ácido nucleico y está dentro de las capacidades del experto en la técnica.

Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, según se especifique, o contener partes de secuencia tanto bicatenaria como monocatenaria. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN o un híbrido, en el que el ácido nucleico contiene cualquier combinación de desoxirribo- y ribonucleótidos, y cualquier combinación de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc. como se usa en el presente documento, el término "nucleósido" incluye nucleótidos y nucleósidos y análogos de nucleósidos, y nucleósidos modificados tales como nucleósidos modificados con amino. Además, "nucleósido" incluye estructuras análogas no naturales. Por tanto, por ejemplo, las unidades individuales de un ácido péptidonucleico, que contienen cada una una base, se denominan en el presente documento como nucleósido.

Por "ácido nucleico del carbunco" y equivalentes gramaticales en el presente documento se quiere decir un ácido nucleico recombinante, aislado y/o sintético que comprende una secuencia homóloga o idéntica a toda la parte del genoma de la bacteria del carbunco, elemento extracromosómico (por ejemplo, pXO1, pXO2), y ARNm, en particular que incluye fragmentos. En varios casos, un "ácido nucleico del carbunco" puede tener una homología global con las secuencias de nucleótidos del carbunco que es mayor de aproximadamente un 75 %, mayor de aproximadamente un 80 %, mayor de aproximadamente un 85 % y mayor de un 90 %. En algunos modos de realización, la homología puede ser de hasta aproximadamente un 93 a un 95 a un 98 % a un 100 %. Homología en este contexto quiere decir una similitud o identidad de secuencia, siendo preferente la identidad. En algunos casos, un ácido nucleico del carbunco puede codificar un péptido del carbunco. En varios casos, un ácido nucleico del carbunco puede ser de aproximadamente 8-100 nucleótidos de longitud, aproximadamente 8-40 nucleótidos de longitud, o aproximadamente de 8 a 20 nucleótidos de longitud. En algunos casos, un ácido nucleico del carbunco puede comprender desde aproximadamente un 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, hasta aproximadamente un 100 % del número de ácidos nucleicos del ácido nucleico del carbunco de longitud completa o un ORF del carbunco de longitud completa.

En algunos casos, un ácido nucleico del carbunco puede expresar un péptido del carbunco. Por lo tanto, en algunos casos un ácido nucleico del carbunco puede incluir un promotor (por ejemplo, inducible o constitutivo), secuencias potenciadoras (por ejemplo, potenciador IE1), secuencias de intrones, elementos reguladores transcripcionales, secuencias de poliadenilación (por ejemplo, secuencia de poliadenilación de BGH) y similares adecuados para la expresión de un péptido del carbunco en un organismo eucariota o procariota o para la expresión *in vitro*. Los vectores adecuados para la expresión incluyen pero no se limitan a plásmidos (por ejemplo, pUC18, VR1012), vectores de baculovirus, vectores de retrovirus, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados, vectores de virus del herpes, vectores de virus vaccinia, SV50, M13, cromosomas artificiales de levadura, y similares. En algunos casos, se puede usar un ácido nucleico del carbunco como vacuna de ácido nucleico. Por lo tanto, en algunos casos, se puede usar un ácido nucleico del carbunco para tratar el carbunco en un sujeto.

Como se conoce en la técnica, se pueden usar varios programas diferentes para identificar si un péptido o ácido nucleico tiene una identidad o similitud de secuencia con una secuencia conocida. La identidad y/o similitud de secuencia se puede determinar usando técnicas estándar conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, el algoritmo de identidad de secuencia local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de

alineación de identidad de secuencia de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete informático de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), el programa para secuencias Best Fit descrito por Devereux *et al.*, Nucl. Acid Res. 12:387-395 (1984), preferentemente usando los ajustes predeterminados, o por inspección. Preferentemente, la identidad de secuencia se puede calcular por FastDB basado en los siguientes parámetros: penalización por emparejamiento erróneo de 1; penalización por hueco de 1; penalización por tamaño de hueco de 0,33; y penalización por unión de 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis" en Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, p. 127-149, Alan R. Liss, Inc. (1988).

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencias múltiples a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones progresivas, por parejas. También representa una línea que muestra las relaciones de agrupación usadas para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del procedimiento de alineación progresivo de Feng y Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 (1987); el procedimiento es similar al descrito por Higgins y Sharp CABIOS 5:151 -153 (1989). Los parámetros de PILEUP útiles incluyen una ponderación de hueco por defecto de 3,00, una ponderación de longitud de hueco por defecto de 0,10, y huecos finales ponderados.

Otro ejemplo de algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito en Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215, 403-410, (1990) y Karlin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993). Un programa BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 que se obtuvo de Altschul *et al.*, Methods in Enzymology, 266: 460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>. WU-BLAST-2 usa varios parámetros de búsqueda, de los que la mayoría se establecen como los valores predeterminados. Los parámetros ajustables se establecen con los siguientes valores: intervalo de solapamiento = 1, fracción de de solapamiento = 0.125, valor umbral de palabra (T) = 11. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y están establecidos por el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia particular y de la composición de la base de datos particular frente a la que se está buscando la secuencia de interés; sin embargo, los valores se pueden ajustar para incrementar la sensibilidad.

Un algoritmo útil adicional es Gapped BLAST como se informa por Altschul *et al.* Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Gaped BLAST usa puntuaciones de sustitución BLOSUM-62; el parámetro T umbral fijado a 9; el procedimiento de dos aciertos para desencadenar extensiones sin huecos; cargas de longitudes de hueco de k a un coste de 10+k; Xu fijado a 16, y Xg fijado a 40 para una fase de búsqueda en base de datos y a 67 para la fase de salida de los algoritmos. Los alineamientos con huecos se desencadenan por una puntuación correspondiente a ~22 bits.

Se puede determinar un valor de identidad de secuencia de aminoácidos y ácidos nucleicos por el número de posiciones de secuencia idénticas coincidentes dividido entre el número total de posiciones de la secuencia "más larga" en la región alineada. La secuencia "más larga" es la que tiene la mayoría de los residuos reales en la región alineada (se pueden ignorar los huecos introducidos por WU-Blast-2 para maximizar la puntuación de alineamiento).

Un alineamiento puede incluir la introducción de huecos en las secuencias que se van a alinear. Además, el experto en la técnica apreciará que el porcentaje de identidad de secuencia se puede determinar en base al número de posiciones de secuencia idénticas con relación al número total de posiciones de secuencia. Por tanto, por ejemplo, la identidad de secuencia se puede determinar usando el número de posiciones en la secuencia más corta.

En los cálculos de la identidad en porcentaje, la ponderación relativa no se asigna a varias manifestaciones de variación de secuencia, tales como, inserciones, deleciones, sustituciones, etc. Por lo tanto, en las determinaciones de la identidad de secuencia, sólo las identidades se puntúan positivamente (+1) y todas las formas de variación de secuencia incluyendo huecos se asignan a un valor de "0", lo que evita la necesidad de una escala ponderada o de parámetros para los cálculos de similitud de secuencia. La identidad de secuencia en porcentaje se puede calcular, por ejemplo, dividiendo el número de residuos idénticos coincidentes por el número total de residuos de la secuencia "más corta" en la región alineada y multiplicando por 100. La secuencia "más larga" es la que tiene la mayoría de los residuos reales en la región alineada.

Por "anticuerpo" y equivalentes gramaticales en el presente documento se quiere decir anticuerpo policlonal y monoclonal (mAb). Los procedimientos de preparación y purificación de anticuerpos monoclonales y policlonales son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988).

Por "anticuerpo del carbunco" y equivalentes gramaticales en el presente documento se refiere un anticuerpo policlonal o monoclonal que se puede inducir por un péptido del carbunco divulgado, de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento. En algunos casos, un anticuerpo del carbunco se puede unir a un péptido del carbunco divulgado. En algunos casos, un anticuerpo del carbunco evita la enfermedad del carbunco y/o mejora un síntoma de la enfermedad del carbunco en un sujeto. Por tanto, en algunos casos, un anticuerpo del carbunco se puede unir al carbunco (es decir, un agente etiológico de la enfermedad del carbunco o un factor de virulencia del carbunco). Sin quedar vinculado por la teoría, en algunos casos, la unión de un anticuerpo del

carbunco puede neutralizar o inactivar sustancialmente un agente etiológico de la enfermedad del carbunco o un factor de virulencia del carbunco. Por tanto, en un caso, los anticuerpos del carbunco pueden reducir o eliminar un efecto patológico del carbunco. Esto es, la unión de anticuerpos del anticuerpos a un agente etiológico del carbunco o un factor de virulencia del carbunco pueden disminuir o eliminar la infectividad y/o la actividad del factor de virulencia del carbunco, que incluyendo pero sin limitarse a, replicación, síntesis del factor de virulencia, toxicidad del factor de virulencia, resistencia a mecanismos efectores inmunitarios (por ejemplo, fagocitosis), y similares. En general, es preferente una disminución de al menos aproximadamente un 25 %, siendo particularmente preferente al menos aproximadamente un 50 % y siendo especialmente preferente una disminución de al menos aproximadamente un 95-100 %.

Los anticuerpos del carbunco se pueden generar en un sujeto por inmunización con un péptido del carbunco, tal como, PA, LF, EF, PGA, BcIA, incluyendo fragmentos como se muestra en el presente documento.

Los términos "anticuerpo" y "anticuerpo del carbunco", incluyen fragmentos de anticuerpos y derivados, como se conocen en la técnica, tales como Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno, tales como, anticuerpos monocatenarios (Fv por ejemplo), anticuerpos quiméricos, etc., producidos por la modificación de los anticuerpos completos o bien los sintetizados de nuevo usando tecnologías de ADN recombinante. El término anticuerpos comprende además anticuerpos policlonales y mAb que pueden ser anticuerpos agonistas o antagonistas así como anticuerpos que se han derivatizado, por ejemplo, con PEG como se conoce en la técnica o variantes como se describe en el presente documento.

Los anticuerpos del carbunco se pueden unir específicamente a péptidos del carbunco. Por "unir específicamente" en el presente documento se quiere decir que los anticuerpos del carbunco tienen una constante de unión en el intervalo de al menos aproximadamente 10^4 hasta aproximadamente 10^6 M⁻¹, siendo un intervalo preferente de al menos aproximadamente 10^7 hasta al menos aproximadamente 10^9 M⁻¹. Por tanto, en algunos casos, los anticuerpos del carbunco pueden bloquear la unión de un segundo anticuerpo al carbunco y/o pueden bloquear la unión de un péptido del carbunco a una célula huésped. En algunos casos, los anticuerpos del carbunco pueden funcionar como opsoninas para facilitar la fagocitosis de una bacteria del carbunco. Por "opsonina" y equivalentes gramaticales en el presente documento se quiere decir cualquier sustancia que se une a antígenos particulados y facilita su fagocitosis por células fagocíticas que portan el receptor Fc. En un caso, los anticuerpos opsonizantes pueden ser IgM o IgG. Estos y otros isotipos y subtipos de anticuerpos, dependiendo del sujeto, pueden activar el sistema de complemento lo que da como resultado el depósito de fragmentos de péptidos de complemento (por ejemplo, C3b, C3d, y C4b) lo que puede promover adicionalmente la fagocitosis por la unión a receptores específicos (por ejemplo, receptores C3b o receptores C3d) en células fagocíticas.

Una vez estén preparadas, las composiciones del carbunco (por ejemplo anticuerpos del carbunco y péptidos del carbunco) encuentran su uso en varias aplicaciones. Son particularmente preferentes los tratamientos terapéuticos y profilácticos como se indica a continuación.

En un caso, las composiciones del carbunco (por ejemplo, péptidos del carbunco y anticuerpos del carbunco) encuentran su uso en el tratamiento de la enfermedad del carbunco. "Tratamientos" se refiere a tanto a tratamiento terapéutico como a tratamiento profiláctico o a medidas preventivas, en las que el objetivo es evitar o ralentizar (atenuar) una afección o trastorno patológico dirigido. Por "huésped", "sujeto", "paciente", "individuo" y equivalentes gramaticales en el presente documento se quiere decir los que necesitan tratamiento, tales como, los que tienen el trastorno, así como los propensos a tener el trastorno, o en los que se debe evitar el trastorno. Por tanto, un sujeto puede ser un sujeto humano y herbívoros salvajes o domésticos, y similares, siendo preferentes los sujetos humanos.

El anticuerpo del carbunco se puede administrar a un sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. Por lo tanto, en algunos casos, el anticuerpo del carbunco se puede usar para proporcionar inmunidad pasiva a un sujeto. (Goodman y Gilman's, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 1463-1486 (Hardman *et al.*, ed., 10^a ed., McGraw-Hill 2001 (ISBN 0-07-112432-2)) Por "cantidad terapéuticamente eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz", y equivalentes gramaticales en el presente documento se quiere decir una cantidad suficiente para producir el efecto fisiológico deseado o una cantidad que puede lograr el resultado deseado, en particular para el tratamiento de un trastorno o afección de enfermedad, incluyendo reducir o eliminar uno o más síntomas del trastorno o enfermedad o la prevención o el retraso en la aparición de al menos un síntoma de la enfermedad.

Por lo tanto, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo del carbunco se refiere a una cantidad suficiente para el tratamiento del carbunco. La cantidad puede ser diferente dependiendo de si se desea un tratamiento profiláctico o terapéutico. La determinación de las dosificaciones y los tiempos de administración para una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo son bien conocidos dentro de la experiencia del experto en la técnica. Por lo tanto, el experto en la técnica apreciará que estas cantidades se pueden ajustar dependiendo de la gravedad de la enfermedad, la susceptibilidad del sujeto, la edad, el peso, y el tipo de sujeto, y similares.

Los péptidos del carbunco encuentran su uso como compuestos y vacunas antibacterianos. Los péptidos del carbunco se pueden usar solos o en varias combinaciones de 2, 3, 4, o más péptidos y formulaciones. En un caso,

las combinaciones de péptidos del carbunco pueden ser sustancialmente únicas para los diversas etapas de vida de la bacteria del carbunco (espora, bacteria vegetativa). Por lo tanto, las composiciones divulgadas en el presente documento pueden comprender un péptido de espora del carbunco y un péptido de una bacteria vegetativa, un péptido de espora del carbunco y un péptido exotoxina carbunco, un péptido exotoxina del carbunco y un péptido de una bacteria del carbunco vegetativa.

Por "vacuna" en el presente documento se quiere decir un tratamiento que incrementa la inmunidad de un sujeto para una enfermedad particular. Por lo tanto, como se usa en el presente documento "vacuna del carbunco" se refiere a un tratamiento que incrementa la inmunidad de un sujeto para la enfermedad del carbunco. Por lo tanto, en algunos modos de realización, una vacuna se puede administrar de forma profiláctica, por ejemplo a un sujeto que no está inmunizado inmunológicamente (es decir, sin exposición previa ni experiencia con una enfermedad). En algunos casos, una vacuna se puede administrar de forma terapéutica a un sujeto que ha estado expuesto al carbunco o que se ha infectado previamente con el carbunco o que está experimentando al menos un síntoma de la enfermedad. Por tanto, se puede usar una vacuna para mejorar un síntoma asociado con una enfermedad. En un caso, una vacuna del carbunco es una composición terapéuticamente eficaz que comprende uno o más péptidos del carbunco incluyendo fragmentos del mismo que inducen una respuesta inmunitaria para el carbunco.

Se pueden formular varios péptidos del carbunco de varias formas. Los péptidos del carbunco se pueden formular solos o en varias combinaciones con otros péptidos del carbunco. En algunos casos, los péptidos del carbunco se pueden formular como una mezcla. En algunos casos, los péptidos del carbunco se pueden modificar de modo que se formen moléculas químicas que comprenden un péptido del carbunco condensado con uno o más péptidos del carbunco o péptidos distintos del carbunco homólogos o heterólogos. En varios casos, una condensación puede ser una condensación lineal o ramificada. En algunos casos, un péptido del carbunco se puede conjugar o reticular con uno o más péptidos del carbunco o péptidos distintos del carbunco homólogos o heterólogos, como se describe a continuación. La administración de un péptido del carbunco como vacuna se puede lograr por varios procedimientos como se conoce en la técnica. (Goodman y Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 1-30 (Hardman *et al.*, ed., 10^a ed., McGraw-Hill 2001 (ISBN 0-07-112432-2)). En un caso, los péptidos del carbunco están en contacto con una o más membranas mucosas de un sujeto, incluyendo pero sin limitarse a, la nasofaringe, bucofaringe, fosas nasales, cavidad bucal u oral, vagina y colon. En general, los péptidos del carbunco se pueden formular de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, en las que las cantidades terapéuticamente eficaces del péptido del carbunco se combinan en mezcla con un vehículo de soporte farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados y su formulación son bien conocidos en la técnica. Dichas composiciones contendrán una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido del carbunco junto con una cantidad adecuada de vehículo para preparar composiciones farmacéuticamente aceptables para su administración eficaz a un paciente. La composición puede incluir sales, tampones, proteínas portadoras tales como seroalbúmina, moléculas dirigidas para localizar péptidos del carbunco en el sitio o tejido apropiado dentro del paciente, y otras moléculas. La composición también puede incluir coadyuvantes. La formulación se elige según el criterio del profesional y depende de la ruta de inmunización, la edad y el estado inmunitario del paciente, y de la gravedad de la enfermedad.

En un caso, las vacunas de péptido del carbunco comprenden un coadyuvante. "Coadyuvante" como se usa en el presente documento se refiere a un agente no tóxico que puede estimular el sistema inmunitario, potenciando de este modo, cuantitativa y/o bien cualitativamente, la respuesta para un péptido del carbunco. Por "coadyuvante de mucosa" y equivalentes gramaticales en el presente documento se quiere decir un coadyuvante adecuado para su administración en una membrana mucosa. En un caso, un coadyuvante de mucosa estimula una respuesta inmunitaria de mucosa. Un coadyuvante de mucosa puede ser un extracto aislado que comprende una proteína o lípido de la capa externa o pared celular de una bacteria gram-negativa, tal como, una proteína o lípido A de invasina. En un caso, un coadyuvante de mucosa puede ser un agonista de un receptor de tipo Toll (por ejemplo, TLR4). En un caso, un coadyuvante de mucosa puede ser un receptor transductor de señalización de lipopolisacárido (LPS). En un caso, un coadyuvante de mucosa puede estimular la inmunidad innata. En la invención, un coadyuvante de mucosa incluye monofosforil lípido A (MPL). (Patentes de los EE.UU. n.º 4436727, 4436728, 4912094; Baldrige *et al.* *Expert Opin. Biol. Ther.* 4:1129-1138; Persing *et al.* 2002. *Trends Microbiol.* 10:S32-37; Baldrige *et al.* 2000. *Vaccine* 18:2416-2425; Yang *et al.* 2002. *Infect. Immun.* 70:3557-3565; Baldrick *et al.* 2002. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 35:398-413). En un caso, un coadyuvante de mucosa puede ser dicorinomicolato de trehalosa (TDM) sintético. En un modo de realización preferente, un coadyuvante de mucosa incluye, quitosano (por ejemplo, glutamato de quitosano), que se deriva de los caparzones de crustáceos y es adecuado para actuar como depósito (patente de los EE.UU. n.º 6.391.318; documento US 6.391.318 B1, publicación de solicitud de patente de los EE.UU. n.º US 2003/0039665, documentos EP 0865297, WO 9720576; Bacon *et al.* 2000. *Infect. Immun.* 68:5764-5770; Ilium. 2003. *J. Control. Release.* 87:187-198; Ilium *et al.* 2001. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 51:81-96; Davis. 1999. *Pharm. Sci. Technol. Today* 2:450456; Jabbal-Gill *et al.* 1998. *Vaccine* 16: 2039-2046; Lim *et al.* 2001. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2:20; van der Lubben *et al.* 2001. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52:139-144; van der Lubben *et al.* 2001. *Eur. J. Pharm. Sci.* 14:201-207; McNeela *et al.* 2004. *Vaccine* 22:909-914; Mills *et al.* 2003. *Infect. Immun.* 71:726-732). En un modo de realización preferente, un coadyuvante de mucosa puede ser una combinación de dos o más coadyuvantes de mucosa. Invaplex y los procedimientos de uso se describen en las patentes de los EE.UU. n.º 6.245.892, 6.277.379, 6.680.374, y la publicación PCT n.º WO 02/094190. Preferentemente, Invaplex encuentra su uso como coadyuvante de mucosa para inducir una respuesta inmunitaria

de mucosa para los péptidos del carbunco, tal como, IgA. En otro modo de realización preferente, las vacunas de péptido del carbunco comprenden un ligando dirigido de células M. Por "ligando dirigido de células M" y equivalentes gramaticales en el presente documento se quiere decir un compuesto que se une a un receptor en las células M. En este modo de realización, preferentemente, el ligando dirigido de células M se selecciona del grupo que consiste en la proteína $\sigma 1$ de un reovirus, o es (o se deriva de) una adhesina de Salmonella o un poliovirus. En un modo de realización más preferente, el ligando dirigido de células M es una proteína $\sigma 1$. Los ligandos de células M dirigen los péptidos del carbunco al epitelio asociado a folículo o células M por endocitosis mediada por receptor para inducir inmunidad de la mucosa. Los ligandos dirigidos de células M y los procedimientos de uso se describen en las publicaciones PCT n.º WO 01/49867 y WO 02/072015.

Cuando se desea una administración de liberación sostenida de un péptido del carbunco en una formulación con características de liberación adecuadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que requiere la administración del péptido del carbunco, se contempla la microencapsulación del polipéptido. La microencapsulación de proteínas recombinantes para liberación sostenida se ha realizado con éxito con la hormona de crecimiento humana (rhGH), interferón- (rhIFN-), interleucina-2, y MN rgp120. Johnson *et al.*, Nat. Med., 2:795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27:1221-1223 (1993); Hora *et al.*, Bio/Technology, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), p. 439-462; documentos WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; y patente de los EE.UU. n.º 5.654.010. Las formulaciones de liberación sostenida de polipéptidos se desarrollaron usando el polímero de ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y amplia gama de propiedades biodegradables. Los productos de la degradación de PLGA, ácidos láctico y glicólico, se pueden retirar rápidamente dentro del cuerpo humano. Además, la degradabilidad de este polímero se puede ajustar de meses a años dependiendo de su peso molecular y composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," en: M. Chasin y R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), p. 1-41.

Los péptidos del carbunco se pueden administrar en varias formulaciones y en varias cantidades dependiendo de factores que incluyen pero sin limitarse a la edad, masa, estado inmunitario, ruta de inmunización, y salud de un sujeto. En algunos casos, un péptido del carbunco se puede administrar a un sujeto humano en un intervalo de desde aproximadamente 40 hasta aproximadamente 200 μg péptido/dosis. En varios casos, la dosis administrada a un sujeto puede ser de desde aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, hasta aproximadamente 250 μg péptido/dosis, pudiéndose contemplar dosis mayores o menores. En algunos casos, una dosis administrada a un sujeto puede ser de desde aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hasta aproximadamente 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, hasta aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masa corporal, pudiéndose contemplar dosis mayores o menores. El número de dosis que se pueden administrar en función del tiempo puede ser de desde aproximadamente 1, 2, o aproximadamente 3 dosis durante 1, 2, 3, o aproximadamente 4 semanas, pero se puede incrementar o disminuir dependiendo al menos en parte del estado inmunitario de un sujeto.

"Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de un compuesto que está preparada con contraiones se entiende en la técnica que es, en general, aceptable para usos farmacéuticos y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. Dichas sales incluyen: (1) sales de adición de ácido, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glucólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido terc-butilacético, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares; o (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto original se reemplaza por un ión metálico, por ejemplo, un ión de metal alcalino, un ión de metal alcalinotérreo, o un ión de aluminio; o coordinadas con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina, morfina, piperidina, dimetilamina, dietilamina y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácidos glucurónico o galacturónico y similares (véase, por ejemplo, Berge *et al.*, J. Pharm. Sci. 66:1-19 (1977)).

"Vehículo farmacéuticamente aceptable" y equivalentes gramaticales se refieren a un diluyente, coadyuvante, excipiente, tensioactivo, conservante, estabilizante, agente quelante, o similares con el que se puede administrar un compuesto (por ejemplo, péptido del carbunco o anticuerpo del carbunco), como se apreciará por los expertos en la técnica de formulaciones farmacéuticas. (Patente de los EE.UU. n.º 6.403.597) Se describen una amplia variedad de composiciones farmacéuticas, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª ed, 2001.

Las composiciones de la invención son composiciones anti-carbunco. Por "anti-carbunco" y equivalentes

gramaticales en el presente documento se quiere decir un compuesto que inhibe la replicación de la bacteria del carbunco, inhibe la exotoxina del carbunco, o reduce un síntoma de la enfermedad del carbunco. Por tanto, un péptido del carbunco se puede administrar de forma profiláctica, por ejemplo a un paciente que nunca ha estado previamente expuesto a la bacteria del carbunco, de modo que se evita la infección posterior por carbunco. De forma alternativa, el péptido del carbunco se puede administrar de forma terapéutica a un paciente que ha estado expuesto o se ha infectado previamente por el carbunco. Los compuestos de péptidos del carbunco se pueden administrar por sí mismos, pero típicamente se formulan y se administran en forma de una composición farmacéutica. La composición exacta dependerá, entre otras cosas, del procedimiento de administración, tal como por vía oral o parenteral, y será evidente para los expertos en la técnica.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden consistir en (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del compuesto activo suspendido en diluyentes, tales como agua, solución salina o PEG 400; (b) cápsulas, sobres o comprimidos, que contiene cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo, como líquidos, sólidos, gránulos o gelatina; (c) suspensiones en un líquido apropiado; y (d) emulsiones adecuadas. Las formas de comprimido pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos de calcio, almidón de maíz, almidón de patata, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico, y otros excipientes, colorantes, cargas, aglutinantes, diluyentes, agentes de tamponación, agentes humectantes, conservantes, agentes saborizantes, tintes, agentes disgregantes, y vehículos farmacéuticamente compatibles. Las formas de pastilla para chupar pueden comprender el ingrediente activo en un sabor, por ejemplo, sacarosa, así como pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte, tal como emulsiones de gelatina y glicerina o sacarosa y acacia, geles, y similares que contiene, además del ingrediente activo, vehículos conocidos en la técnica.

Las formulaciones adecuadas para la administración por vía rectal o vaginal incluyen, por ejemplo, supositorios, que consisten en el ácido nucleico envasado con una base de supositorio. Las bases de supositorio adecuadas incluyen triglicéridos naturales o sintéticos o hidrocarburos de parafina. Además, también es posible el uso de cápsulas rectales de gelatina que consisten en una combinación del compuesto de elección con una base, incluyendo, por ejemplo, triglicéridos líquidos, polietilenglicoles, e hidrocarburos de parafina.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral, tales como, por ejemplo, por vías intraarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, y subcutánea, incluyen soluciones de inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacterioestáticos, y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor destinado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. Las composiciones se pueden administrar, por ejemplo, por infusión intravenosa, por vía oral, tópica, intraperitoneal, intravesical o intratecal. La administración parenteral, administración oral, administración subcutánea y administración intravenosa son procedimientos de administración.

Un ejemplo específico de una formulación de suspensión puede incluir desde aproximadamente 0,5-30 mg/ml de compuesto y uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en: aproximadamente 200 mg/ml de etanol, aproximadamente 1000 mg/ml de aceite vegetal (por ejemplo, aceite de maíz), aproximadamente 600-1000 mg/ml de zumo de fruta (por ejemplo, zumo de pomelo), aproximadamente 400-800 mg/ml de leche, aproximadamente 0,1 mg/ml de carboximetilcelulosa (o celulosa microcristalina), aproximadamente 0,5 mg/ml de alcohol bencílico (o una combinación de alcohol bencílico y cloruro de benzalconio) y aproximadamente tampón 40-50 mM, pH 7 (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato o tampón citrato o, de forma alternativa, se puede usar dextrosa al 5 % en lugar del tampón) en agua.

Un ejemplo específico de una formulación de suspensión de liposomas puede comprender desde aproximadamente 0,5-30 mg/ml de compuesto, aproximadamente 100-200 mg/ml de lecitina (u otro fosfolípido o mezcla de fosfolípidos) y opcionalmente aproximadamente 5 mg/ml de colesterol en agua. Para la administración subcutánea de determinados compuestos de PBI, una formulación de suspensión de liposomas que incluye 5 mg/ml de compuesto en agua con 100 mg/ml de lecitina y 5 mg/ml de compuesto en agua con 100 mg/ml de lecitina y 5 mg/ml de colesterol proporciona buenos resultados.

Las formulaciones de compuestos se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitarias o múltiples, tales como ampollas y viales. Las soluciones y suspensiones de inyección se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito previamente. En algunos casos, las composiciones (por ejemplo, péptidos del carbunco, vacunas, y anticuerpos del carbunco) y formulaciones divulgadas se pueden envasar en kits para su administración a un sujeto, por ejemplo, un recipiente, preferentemente sellado, para el almacenamiento antes de su uso e instrucciones para llevar a cabo la administración adecuada para el tratamiento del carbunco. Por ejemplo, en algunos casos, puede ser adecuada una formulación para la administración a una superficie mucosa y por lo tanto puede contener una o más dosis unitarias de una vacuna del carbunco. En algunos casos, puede ser adecuada una formulación para administración parenteral y por lo tanto, puede contener una o más dosis unitarias de una vacuna del carbunco o anticuerpo del carbunco. En algunos casos, un kit puede incluir un dispositivo adecuado para administrar una o más de las composiciones divulgadas, incluyendo dosis unitarias. Un kit puede contener múltiples formulaciones de varios péptidos y anticuerpos del carbunco para su administración por medio de varios dispositivos,

incluyendo pero sin limitarse a, cuentagotas, torundas, aerosoles, insufladores, nebulizadores, inhaladores, jeringuillas, agujas, parches dérmicos, y similares (por ejemplo, dispositivo de administración nasal Monopowder de Valois, dispositivo de administración Monopowder).

- 5 Preferentemente, la preparación farmacéutica está en forma de dosificación unitaria. En dicha forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de preparación, tales como comprimidos, cápsulas y polvos envasados en viales, insufladores o ampollas. Además, la forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, comprimido, sello o pastilla en sí misma, o puede ser el número apropiado de cualquiera de ellos en forma envasada. Si se desea, la composición también puede contener otros agentes terapéuticos compatibles, analizados con más detalle, a continuación.

15 En un uso terapéutico para el tratamiento del carbunco, las composiciones del carbunco (por ejemplo, anticuerpos y péptidos) se pueden utilizar en procedimientos farmacéuticos para lograr un beneficio terapéutico. por "beneficio terapéutico" se quiere decir que la administración del compuesto da lugar a un efecto beneficioso en el paciente con el tiempo. Por ejemplo, se puede lograr un beneficio terapéutico cuando el título o carga de bacteria del carbunco en el paciente se reduce o bien se deja de incrementarse o un síntoma o una exotoxina del carbunco se reduce o deja de incrementarse. También se logra un beneficio terapéutico si la administración del compuesto ralentiza o detiene en conjunto el inicio de síntomas adversos que típicamente acompañan a las infecciones del carbunco o la exposición de un factor de virulencia del carbunco (por ejemplo, una exotoxina del carbunco), independientemente del título o carga de exotoxina del carbunco o bacteria del carbunco en el paciente.

20 Los péptidos del carbunco y/o anticuerpos del carbunco también se pueden administrar de forma profiláctica en pacientes que están en riesgo de desarrollar una infección del carbunco, o que han estado expuestos a la bacteria del carbunco, para evitar el desarrollo de la infección o enfermedad del carbunco. Por ejemplo, los péptidos del carbunco y/o composiciones de los mismos se pueden administrar a un paciente que es probable que haya estado expuesto a la bacteria del carbunco.

25 Aunque las presentes enseñanzas se describen junto con diversos modos de realización, no se pretende que las presentes enseñanzas limiten dichos modos de realización. Por el contrario, las presentes enseñanzas engloban varias alternativas, modificaciones, y equivalentes, como se apreciará por los expertos en la técnica.

30 Los aspectos de la presente divulgación se pueden entender además en vista de los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos del alcance de la presente divulgación en modo alguno. Si una referencia difiere o contradice la presente solicitud, incluyendo pero sin limitarse a términos definidos, uso de términos, técnicas descritas, o similares, domina esta solicitud.

Ejemplos

40 Ejemplo 1: Vacunación intranasal con antígeno protector

Protocolo: Se inmunizaron ratones Balb/c hembras, de 8 semanas de edad los días 0, 14, y el día 28 con 10 µl de volumen total de vacuna por animal. Antes de la inmunización, los ratones se anestesiaron ligeramente con isoflurano hasta hacer efecto (2-4 %), y se suministró un bolo de 5 µl/narina a cada fosa nasal. La retención de la vacuna dentro de las fosas nasales fue, en general, buena, pero se anotó cuando se produjeron estornudos.

50 Formulación de vacuna: se inmunizaron ratones con dosis de 5 µg ó 20 µg de PA. Se obtuvo PA liofilizado de List Biochemical (n.º Cat. 171B, n.º Lot. 1712B) y se reconstituyó en agua de inmediato antes de su uso, lo que llevó el contenido en sal a HEPES 5 mM/NaCl 50 mM. Se calentó MPL+TDM (MPL) (Sigma n.º M-6536, n.º Lot. 072K1313) hasta 40 °C y se resuspendió en 1 ml de NaCl 150 mM de inmediato antes de su uso. Se almacenó Invaplex 50 (IPX50) (n.º Lot. GNGO), obtenido de Edwin V. Oaks (Walter Reed Army Institute de Research (WRATR)), a -80 °C y se descongeló en hielo de inmediato antes de su uso. Se añadieron coadyuvantes a PA a 5 µl/dosis justo antes de su uso.

55 Coadyuvantes IPX50 es una fracción de cromatografía de intercambio de iones de un extracto de agua aislado de bacterias Shigella que contiene el complejo de invasión de Shigella (patentes de los EE.UU. n.º 6.680.374, 6.277.379, 6.245.892). MPL es monofosforil lípido A y dicorinomicolato de trehalosa sintético en escualeno y Tween 80.

60 Grupos de tratamiento: Véase la tabla 1.

Tabla 1
Grupos de tratamiento

N.º de grupo	Tratamiento	Nombre corto	N.º ratones
1	MPL	MPL	3
2	Invaplex 50	IPX	3
3	5 µg PA/Invaplex 50	PA5/IPX	5
4	20 µg PA/Invaplex 50	PA20/IPX	5
5	5 µg PA/MPL + TDM	PA5/MPL	5
6	20 µg PA/MPL + TDM	PA20/MPL	5
7	No inmunizado	No inmunizado	3

5 Muestra: Se recogieron muestras de heces y de sangre de ratones antes de la vacunación inicial (día 0) y los días 27 y 56 (antes de los refuerzos).

10 Exposición a la toxina letal del carbunco: Una semana después de la recogida de muestras finales, ratones se sometieron a una exposición intravenosa con aproximadamente 6 DL₅₀ de la toxina letal (LeTx) de *B. anthracis*. Se inyectaron PA (60 µg) y LF (30 µg) (List Biochemical; PA n.º 171B, n.º Lot. 1712B; LF n.º 172B, n.º Lot. 1721B) por medio de la vena de la cola en un volumen total de 100 µl de PBS. Los ratones se observaron cada 15 minutos durante 16 horas postinfección, y cada hora para las horas de 20 a 36. Después de esto, los ratones se inspeccionaron cada 6-8 horas hasta el día 7 (168 horas). Se registró el tiempo hasta la muerte (TTD) para cada ratón que murió. Los ratones vivos a las 168 horas fueron supervivientes (S).

15 Respuestas de IgG en suero: Se midió la IgG anti-PA en suero por ELISA (tabla 2). Se recubrieron seis filas de pocillos en una placa de 96 pocillos (filas C-G) con 1 µg/ml de PA en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,2. Se recubrieron las filas A y B con diluciones en serie (1:2) de IgG de ratón (Sigma 1-5381), comenzando a 1 µg/ml en PBS, y continuando con ~2 ng/ml en la columna 10, para servir como estándares. Se usaron las absorbancias de estos pocillos para representar una curva estándar usando el programa informático SoftMax Pro.
20 Los pocillos A11, A12, B11 y B12 eran los blancos. Se diluyeron las muestras de suero de 1:100 a 1:3200 (a menos que se indique de otro modo) en PBS con Tween 20 0,05 % suero fetal bovino al 3 % (FBS). La detección fue por medio del anticuerpo conjugado con HRP (Southern Biotech) y ABTS (Pierce n.º Cat. 37615). Se pasó cada replicado de muestra en placas separadas, realizándose al menos 2 análisis por muestra. Se usaron las absorbancias de las muestras para interpolar la concentración de anticuerpo a partir de las curvas estándar. A
25 continuación se exportaron los datos a Excel (Microsoft®) para el análisis posterior. Si el CV (coeficiente de variación, o 100*desviación estándar/Media) para los replicados era mayor de 25, se realizó otro replicado. La excepción de esta regla se produjo cuando los resultados medios eran menores de 10 µg/ml, caso en el que se toleró un CV de 150. Las lecturas de resultados de muestra por encima del intervalo de curva estándar se consideraron como fuera del intervalo, y se volvieron a analizar usando una dilución de partida de 1:1000.

30

Tabla 2
ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IgG 1:100	IgG 1:200	IgG 1:400	IgG 1:800	IgG 1:1600	IgG 1:3200	IgG 1:6400	IgG 1: 12.800	IgG 1: 25.600	IgG 1: 51.200	Blanco	Blanco
B	IgG 1:100	IgG 1:200	IgG 1:400	IgG 1:800	IgG 1:1600	IgG 1:3200	IgG 1:6400	IgG 1: 12.800	IgG 1: 25.600	IgG 1: 51.200	Blanco	Blanco
C	Mouse1 1:100	Mouse2 1:100	Mouse3 1:100	Ratón4 1:100	Ratón5 1:100	Ratón6 1:100	Ratón7 1:100	Ratón8 1:100	Ratón9 1:100	Ratón1 1:100	Ratón1 1:100	Ratón1 1:100
D	Mouse1 1:200	Mouse2 1:200	Mouse3 1:200	Ratón4 1:200	Ratón5 1:200	Ratón6 1:200	Ratón7 1:200	Ratón8 1:200	Ratón9 1:200	Ratón1 1:200	Ratón1 1:200	Ratón1 1:200
E	Ratón1 1:400	Ratón2 1:400	Ratón3 1:400	Ratón4 1:400	Ratón5 1:400	Ratón6 1:400	Ratón7 1:400	Ratón8 1:400	Ratón9 1:400	Ratón1 1:400	Ratón1 1:400	Ratón1 1:400
F	Ratón1 1:800	Ratón2 1:800	Ratón3 1:800	Ratón4 1:800	Ratón5 1:800	Ratón6 1:800	Ratón7 1:800	Ratón8 1:800	Ratón9 1:800	Ratón1 1:800	Ratón1 1:800	Ratón1 1:800
G	Ratón1 1:1600	Ratón2 1:1600	Ratón3 1:1600	Ratón4 1:1600	Ratón5 1:1600	Ratón6 1:1600	Ratón7 1:1600	Ratón8 1:1600	Ratón9 1:1600	Ratón1 1:1600	Ratón1 1:1600	Ratón1 1:1600
H	Ratón1 1:3200	Ratón2 1:3200	Ratón3 1:3200	Ratón4 1:3200	Ratón5 1:3200	Ratón6 1:3200	Ratón7 1:3200	Ratón8 1:3200	Ratón9 1:3200	Ratón1 1:3200	Ratón1 1:3200	Ratón1 1:3200

- 5 ELISA en suero: Se midió la IgG anti-PA en suero por ELISA. Como se muestra en la tabla 2, se recubrieron dos filas de una placa de 96 pocillos dos veces con diluciones en serie de IgG de ratón (Sigma 1-5381), comenzando a 1 µg/ml en PBS, y continuando con 2 ng/ml en la columna 10, para servir como estándares. Cada fila sirvió como replicado. Los cuatro pocillos restantes en las dos filas sirvieron de blancos. Se recubrieron los pocillos restantes de la placa con 1 µg/ml de PA en PBS pH 7,2. El recubrimiento continuó toda la noche a 4 °C bajo humedad alta. Se lavaron tres veces los pocillos con PBS/Tween 20 al 0,05 % (PBST), se bloquearon 1 hora a temperatura ambiente con PBST + FBS al 3 %. Se diluyeron en serie dos veces muestras de suero en PBST/FBS de 1:100 a 1:3.200. Se incubaron diluciones en suero en placas a 4 °C durante la noche bajo humedad alta. Después de lavar de nuevo tres veces los pocillos con PBST, se detectaron los anticuerpos de ratón unidos a PA por medio de una dilución 1:1000 de IgG anti-ratón de cabra conjugada con HRP (Southern Biotech, n.º 1030.05, n.º Lot. D240-N742G) se diluyó en PBST/FBS, y se incubó sobre pocillos durante 1,5 hora a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces los pocillos con PBST, y se desarrolló la placa con ABTS (Pierce n.º Cat. 37615) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron lecturas de DO₄₀₅ y se representaron los valores de los estándar en una curva estándar usando el programa informático SoftMax Pro. Se usaron las absorbancias de las muestras para interpolar la concentración de anticuerpo a partir de las curvas estándar. Se exportaron los datos a Excel (Microsoft®) para el análisis posterior. Si el CV (coeficiente de variación, o 100*desviación estándar/Media) para los replicados era mayor de 25, se realizó otro replicado. La excepción de esta regla se produjo cuando los resultados medios eran menores de 10 µg/ml, caso en el que se toleró un CV de 150. Las lecturas de resultados de muestra por encima del intervalo de curva estándar se consideraron como fuera del intervalo, y se volvieron a analizar usando una dilución de partida de 1:1000. Se pasaron los sueros de 12 ratones en cada placa (uno por columna), y se replicó cada muestra en una placa separada. Se realizaron al menos 2 análisis en cada muestra.

IgG en suero: El suero extraído antes de la vacunación inicial no mostró un reconocimiento medible de PA (datos no mostrados). También se midieron las respuestas de IgG anti-PA en suero a las 4 y 8 semanas (figura 1). Las muestras de 4 semanas reflejaron respuestas de animales 2 semanas después del primer refuerzo. En ese punto temporal, un ratón (de cinco) inmunizado con PA5/IPX50 incrementó una respuesta de IgG medible de 10 µg/ml, sin embargo, ninguno de los ratones que recibieron PA5/MPL respondió positivamente. Cuatro de cinco ratones que recibieron PA20/IPX50 también tuvieron niveles de IgG específicos de antígeno medibles (5-40 µg/ml, media de 13 µg/ml para los cinco ratones). Tres de cinco ratones que recibieron PA20/MPL respondieron (9-15 µg/ml, media de 7

µg/ml para el grupo de cinco ratones). Las dos vacunas que contenían 20 µg de PA no fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,44$).

5 A las 8 semanas, los ratones inmunizados con PA20/IPX respondieron de forma bastante variable (29, 92, 96, 216 y 321 µg/ml), pero todos tuvieron valores positivos (media de tratamiento 150 µg/ml). Se observaron resultados similares con los ratones inmunizados con PA20/MPL, ya que las respuestas fueron variables (19, 82, 104, 162 y 221 µg/ml), y la media de tratamiento (118 µg/ml), aunque numéricamente menor, fue estadísticamente similar a la de PA20/IPX ($p < 0,61$). Todos los ratones inmunizados con PA5/IPX tuvieron respuestas positivas a las 8 semanas
10 inmunizados con PA5/MPL tubo niveles de IgG anti-PA medibles. Sin embargo, la variabilidad en las respuestas para la inmunización con PA5/IPX fue demasiado grande para mostrar una diferencia significativa del grupo de PA5/MPL ($p < 0,17$).

15 Exposición a LeTx: Todos los ratones se mantuvieron en reposos durante una semana después de la muestra final a las ocho semanas. Una semana después, el 2/5/03, cada ratón recibió aproximadamente 6 DL₅₀ de LeTx. El TTD se muestra en la tabla 3 y se presenta gráficamente en la figura 2, con la excepción de que sólo se excluyó un ratón inmunizado con MPL, ya que la LeTx entró por vía subcutánea en lugar de por vía intravenosa. Los ratones estaban protegidos completamente, o bien no lo estaban, ya que el TTD no se amplió significativamente en los ratones no supervivientes con niveles positivos de IgG anti-PA sobre los TTD de los ratones de control. Todos los ratones que
20 recibieron inmunizaciones que contenían 20 µg de PA sobrevivieron, tanto si la inmunización se coadyuvó con IPX o MPL.

Tabla 3
Exposición a LeTx

Grupo	Vacuna	TTD, horas	Mediana de TTD, horas	Porcentaje de supervivencia
1	MPL	33, S*, 29	37	33
2	IPX	45, 26, 27	27	0
3	PA5/IPX	20, 20, 33, S, S	29	40
4	PA20/IPX	S, S, S, S, S	no definido	100
5	PA5/MPL	24,45, S, 45, 30	45	20
6	PA20/MPL	S, S, S, S, S	no definido	100
7	No inmunizado	27, 44, 30	30	0

25 TTD = Tiempo hasta la muerte

*Dosis de exposición recibida por vía subcutánea en lugar de por vía intravenosa.

S=Supervivientes >168 h (7 días)

30 La supervivencia de los ratones no se correlacionó estrictamente con el nivel de IgG en suero que reconoce PA, ya que un ratón inmunizado con PA20/MPL sobrevivió con 18 µg/ml de IgG, mientras que dos ratones inmunizados con PA5/IPX50 con el mismo nivel de IgG no sobrevivieron. Es bien conocido en la literatura que la protección frente al carbunco no siempre se correlaciona con el título. Aunque no se indicaron dificultades en la administración de LeTx con el bajo nivel que respondió a PA20/MPL, no se pudo excluir que parte de la toxina no entrara en el sistema circulatorio.

35 Este estudio sometió a prueba IPX50 y MPL como coadyuvantes de mucosa para la inmunización intranasal (IN) con PA. La inmunización intranasal de ratones con 20 µg de PA se coadyuvó con ratones protegidos con IPX50 o bien MPL de una exposición intravenosa a LeTx.

40 Ejemplo 2: Vacunación intranasal con antígeno protector

Protocolo: Se inmunizaron ratones Balb/c hembras, de 17 semanas de edad los días 0,13 y 27 con 10 µl de volumen total de vacuna por animal. Antes de la inmunización, los ratones se anestesiaron ligeramente con isoflurano hasta hacer efecto (2-4 %), y se suministró un bolo de 5 µl/narina a cada fosa nasal. La retención de la vacuna dentro de
45 las fosas nasales fue, en general, buena, pero se anotó cuando se produjeron estornudos.

Formulación de vacuna: se inmunizaron ratones con 5 µg, 10 µg, o bien 20 µg de PA. Se obtuvo PA liofilizado de List Biochemical (n.º Cat. 171B, n.º Lot. 1714B) y se reconstituyó en agua de inmediato antes de su uso, lo que llevó el contenido en sal a HEPES 5 mM/NaCl 50 mM. Se almacenó Invaplex 50 a -80 °C hasta inmediatamente antes de su uso, momento en el que se descongeló en hielo. Se calentó MPL+TDM (MPL) (Sigma n.º M-6536, n.º Lot. 072X1313) hasta 40 °C y se resuspendió en 1 ml de NaCl 150 mM de inmediato antes de su uso. Se obtuvo Invaplex 50 (n.º Lot. GNGO) de Edwin V. Oaks (Walter Reed Army Institute de Research (WRAIR)) Se almacenó Invaplex 50 a -80 °C. Inmediatamente antes de su uso, Invaplex 50 se descongeló en hielo. Se añadieron
50

coadyuvantes a PA a 5 µl/dosis inmediatamente antes de su uso.

Coadyuvantes Invaplex 50 es una fracción de cromatografía de intercambio de iones de un extracto de agua aislado de bacterias *Shigella* que contiene el complejo de invasión de *Shigella* (patentes de los EE.UU. n.º 6.680.374, 6.277.379, 6.245.892. MPL+TDM es monofosforil lípido A y dicorinomicolato de trehalosa sintético en escualeno y Tween 80.

Grupos de tratamiento: Véase la Tabla 4.

Tabla 4
Grupos de tratamiento

N.º de grupo	Tratamiento	Nombre corto	N.º ratones
1	MPL+TDM	MPL	3
2	Invaplex 50	IPX	3
3	5 µg PA/Invaplex 50	PA5/IPX	5
4	10 µg PA/Invaplex 50	PA10/IPX	5
5	20 µg PA/Invaplex 50	PA20/IPX	5
6	5 µg PA/MPL+TDM	PA5/MPL	5
7	10 µg PA/MPL+TDM	PA10/MPL	5
8	20 µg PA/MPL+TDM	PA20/MPL	5
9	No inmunizado	No inmunizado	3

Muestra: Se recogieron muestras de heces y de sangre de los ratones antes de la vacunación inicial (día 0) y los días 27 y 56 (antes de los refuerzos).

Exposición a la toxina letal del carbunco: Una semana después de la recogida de muestras finales, ratones recibieron una exposición intravenosa con aproximadamente 6 DL₅₀ de la toxina letal (LeTx) de *B. anthracis*. Se inyectaron PA (60 µg) y LF (30 µg) (List Biochemical; PA n.º 171B, n.º Lot. 1712B; LF n.º 172B, n.º Lot. 1721B) por medio de la vena de la cola en un volumen total de 100 µl de PBS. Los ratones se observaron cada 15 minutos durante 16 horas postinfección, y cada hora para las horas de 20 a 36. Después de esto, los ratones se inspeccionaron cada 6-8 horas durante 7 días (168 horas). Se registró el tiempo hasta la muerte para cada ratón que murió. Los ratones que aún estaban vivos a las 168 horas se definieron como supervivientes.

ELISA en suero: Se midió la IgG anti-PA en suero por ELISA. La distribución de las placas se muestra en la tabla 5. La plantilla Softmax Pro se diseñó originalmente por Susan Wimer-Mackin y se actualizó por Sarah J. Warwood. Se recubrieron dos filas de una placa de 96 pocillos dos veces con diluciones en serie de IgG de ratón (Sigma 1-5381), comenzando a 1 µg/ml en PBS, y continuando con 2 ng/ml en la columna 10, para servir como estándares. Cada fila sirvió como replicado. Los cuatro pocillos restantes en las dos filas sirvieron de blancos. Se recubrieron los pocillos restantes de la placa con 1 µg/ml de PA en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,2. El recubrimiento continuó toda la noche a 4 °C bajo humedad alta. Se lavaron tres veces los pocillos con PBS/Tween 20 al 0,05 % (PBST), se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con PBST + suero fetal bovino (FBS) al 3 %. Se diluyeron en serie dos veces muestras de suero en PBST/FBS comenzando a de 1:100 a 1:3.200. Se incubaron diluciones en suero en placas a 4 °C durante la noche bajo humedad alta. Después de lavar tres veces los pocillos con PBST, se detectaron los anticuerpos de ratón unidos a PA por medio de una dilución 1:1000 de IgG anti-ratón de cabra conjugada con HRP (Southern Biotech, n.º 1030.05, n.º Lot. D240-N742G) se diluyó en PBST/FBS, y se incubó sobre pocillos durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Se lavaron de nuevo tres veces los pocillos con PBST, y se desarrolló la placa con ABTS (Pierce n.º Cat. 37615) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron lecturas de DO₄₀₅ y se representaron los valores de los estándar en una curva estándar usando el programa informático SoftMax Pro. Se usaron las absorbancias de las muestras para interpolar la concentración de anticuerpo a partir de las curvas estándar. Se exportaron los datos a Excel (Microsoft®) para el análisis posterior. Si el CV (coeficiente de variación, o 100*desviación estándar/Media) para los replicados era mayor de 25, se realizó otro replicado. La excepción de esta regla se produjo cuando los resultados medios eran menores de 10 µg/ml, caso en el que se toleró un CV de 150. Las lecturas de resultados de muestra por encima del intervalo de curva estándar se consideraron como fuera del intervalo, y se volvieron a analizar usando una dilución de partida de 1:1000. Se pasaron los sueros de 12 ratones en cada placa (uno por columna), y se replicó cada muestra en una placa separada. Se realizaron al menos 2 análisis en cada muestra.

Tabla 5
ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IgG 1.100	IgG 1.200	IgG 1.400	IgG 1.800	IgG 1.1600	IgG 1.3200	IgG 1.6400	IgG 1: 12.800	IgG 1: 25.600	IgG 1: 51.200	Blanco	Blanco
B	IgG 1.100	IgG 1.200	IgG 1.400	IgG 1.800	IgG 1.1600	IgG 1.3200	IgG 1.6400	IgG 1: 12.800	IgG 1: 25.600	IgG 1: 51.200	Blanco	Blanco
C	Ratón 1 1.100	Ratón 2 1.100	Ratón 3 1.100	Ratón 4 1.100	Ratón 5 1.100	Ratón 6 1.100	Ratón 7 1.100	Ratón 8 1.100	Ratón 9 1.100	Ratón 1 1.100	Ratón 1 1.100	Ratón 1 1.100
D	Ratón 1 1.200	Ratón 2 1.200	Ratón 3 1.200	Ratón 4 1.200	Ratón 5 1.200	Ratón 6 1.200	Ratón 7 1.200	Ratón 8 1.200	Ratón 9 1.200	Ratón 10 1.200	Ratón 11 1.200	Ratón 12 1.200
E	Ratón 1 1.400	Ratón 2 1.400	Ratón 3 1.400	Ratón 4 1.400	Ratón 5 1.400	Ratón 6 1.400	Ratón 7 1.400	Ratón 8 1.400	Ratón 9 1.400	Ratón 10 1.400	Ratón 11 1.400	Ratón 12 1.400
F	Ratón 1 1.800	Ratón 2 1.800	Ratón 3 1.800	Ratón 4 1.800	Ratón 5 1.800	Ratón 6 1.800	Ratón 7 1.800	Ratón 8 1.800	Ratón 9 1.800	Ratón 10 1.800	Ratón 11 1.800	Ratón 12 1.800
G	Ratón 1 1.1600	Ratón 2 1.1600	Ratón 3 1.1600	Ratón 4 1.1600	Ratón 5 1.1600	Ratón 6 1.1600	Ratón 7 1.1600	Ratón 8 1.1600	Ratón 9 1.1600	Ratón 10	Ratón 11	Ratón 12
H	Ratón 1 1.3200	Ratón 2 1.3200	Ratón 3 1.3200	Ratón 4 1.3200	Ratón 5 1.3200	Ratón 6 1.3200	Ratón 7 1.3200	Ratón 8 1.3200	Ratón 9 1.3200	Ratón 10	Ratón 11	Ratón 12

5 IgG en suero: El suero extraído antes de la vacunación inicial no mostró un reconocimiento medible de PA (datos no mostrados). También se midieron las respuestas de IgG anti-PA en suero a las 4 y 8 semanas (figura 3). Las muestras de 4 semanas reflejaron respuestas de animales 2 semanas después del primer refuerzo. En este punto temporal, cuatro de los cinco ratones inmunizados con PA5/IPX incrementaron respuestas de IgG medibles (intervalo de 3-12 µg/ml, media para todo el grupo de 5 µg/ml). Los cinco ratones inmunizados con PA10/IPX
10 tuvieron respuestas medibles, registrando un ratón una muy significativa de 82 µg/ml (intervalo de 9-82 µg/ml, media de 28 µg/ml). Cuatro de cinco ratones que recibieron PA20/IPX también tuvieron niveles de IgG específicos de antígeno medibles (intervalo de 9-22 µg/ml, media de 12 µg/ml para los cinco ratones).

15 Los ratones inmunizados con PA20/IPX respondieron a las 8 semanas (27, 204, 32, 62 y 143 µg/ml; media de tratamiento de 93 µg/ml). Los resultados de ratones inmunizados con PA10/IPX (145, 315, 117, 89 y 50 µg/ml) (media de tratamiento de 143 µg/ml) fueron estadísticamente similares a los ratones inmunizados con PA20/IPX (p<0,41). Todos los ratones inmunizados con PA5/IPX tuvieron respuestas positivas a las 8 semanas (61, 60, 33, 59 y 4 µg/ml, media para el grupo de tratamiento (43 µg/ml). Dos ratones inmunizados con PA + MPL incrementaron respuestas de IgG anti-PA medibles. Uno de esos ratones se inmunizó con PA10/MPL, tuvo 17 µg/ml de IgG anti-PA, y el otro se inmunizó con PA20/MPL, tuvo 3 µg/ml.
20

Exposición a LeTx: Todos los ratones se mantuvieron en reposos durante una semana después de la muestra final a las ocho semanas. Cada ratón recibió aproximadamente 6 DL₅₀ de LeTx. El tiempo hasta la muerte (TTD) se muestra en la tabla 6 y se presenta gráficamente en la figura 4. Los ratones estaban protegidos completamente, o bien no lo estaban, ya que el TTD no se amplió significativamente en los ratones no supervivientes con niveles positivos de IgG anti-PA sobre los TTD de los ratones de control. Todos los ratones que recibieron PA10/IPX50, cuatro de los cinco ratones que recibieron PA20/IPX50 y tres de los cinco ratones que recibieron PA5/IPX50 sobrevivieron a la exposición. El ratón con PA20/IPX50 que murió tenía una IgG anti-PA relativamente baja (32 µg/ml), al igual que uno de los ratones con PA5/IPX50 que murieron (4 µg/ml). El otro ratón con PA5/IPX50 que murió tenía 60 µg/ml de IgG anti-PA lo que da idea de que los títulos anti-PA no se correlacionan necesariamente con los títulos de neutralización de la toxina. Sólo un animal que recibió PA coadyuvado con MPL sobrevivió, y por lo que se cuestiona si en el momento de la exposición toda la LeTx para el ratón se suministró por vía intravenosa. Este ratón tuvo una respuesta de IgG anti-PA IgG apenas medible en su suero (<1 µg/ml), lo que sugiere que, de
25
30

hecho, la exposición se suministró de forma incompleta.

Tabla 6
Exposición a LeTx

Grupo	Tratamiento	TTD* (h)	Mediana de TTD (h)	Número de supervivientes
1	MPL	27, 33, 25	27	0/3
2	IPX50	33, 33, 26	33	0/3
3	PA5/IPX50	S, 33, S, S, 24	no definido	3/5
4	PA10/IPX50	S, S, S, S, S,	no definido	5/5
5	PA20/IPX50	S, S, 35, S, S,	no definido	4/5
6	PA5/MPL	29,33,27,33, S*	33	1/5
7	PA10/MPL	30,18/33,34/22	30	0/5
8	PA20/MPL	35,29/57,36/26	35	0/5
9	No inmunizado	35, 24, 71	35	0/3

5 TTD=Tiempo hasta la muerte

*Dosis de exposición en el último paso recibida por vía subcutánea en lugar de por vía intravenosa

S=Supervivientes >168 h (7 días) después de 6 DL₅₀ de LeTx i.v.

10 La supervivencia de los ratones no se correlacionó estrictamente con el nivel de IgG en suero que reconocía PA. Es bien conocido en la literatura que la protección frente al carbunco no siempre se correlaciona con el título.

La media de las respuestas de IgG anti-PA en suero para el ejemplo 1 y el ejemplo 2 se muestran en la tabla 7. No se detectaron diferencias estadísticas entre los dos estudios para los tratamientos PA/IPX50.

15

Tabla 7
Media de IgG anti-PA ejemplos 1 y 2

Estudio	4 semanas		8 semanas	
	Ej. 1	Ej. 2	Ej. 1	Ej. 2
MPL	0	0	0	0
IPX	0,0	0,0	0,0	0,0
PA5/IPX50	2,0	5,2	51,0	43,2
PA10/IPX50	-	27,7	-	143,3
PA20/IPX50	13,4	12,2	150,7	93,6
PA5/MPL	0,0	0,0	0,0	0,1
PA10/MPL	-	0,0	-	3,4
PA20/MPL	7,2	0,0	117,5	0,6
No inmunizado	0,0	0,0	0,0	0,0

Ejemplo 3: Vacunación intranasal e intraperitoneal con antígeno protector

20 Protocolo: Se inmunizaron ratones C57B1 hembras, de 16 semanas de edad, los días 0 y 21 con 23 µg de PA. Se realizaron inmunizaciones intraperitoneales (IP) en un volumen total de 100 µl que contenía 5 µl de MPL siguiendo las directrices del fabricante. Se realizaron inmunizaciones IN en un volumen total de 10 µl, y cada una contenía 5 µg de IPX50. Para las inmunizaciones IN, se suministró un bolo de 5 µl/narina a cada fosa nasal después de anestesiarse ligeramente al ratón por medio de isoflurina hasta hacer efecto.

25

Nanopartículas: Las nanopartículas (NP) fueron quelato de níquel al 20 %, EAPDA al 32 %, PCDA Na al 48 %. Se purificó el PA en forma de una proteína recombinante etiquetada con histidina (etiquetada con His) por medio de IMAC (lote 4, 5/17/02). Se usó PA etiquetado con His en las vacunas en las que el PA se unió a NP (designado como PA*NP) y en vacunas de PA que no contenían NP. Las demás vacunas que contenían PA utilizaron PA no etiquetado con His natural.

30

Formulación de vacuna: El PA etiquetado con His se unió a NP con mezcla suave a 4 °C durante la noche inmediatamente antes de la inmunización. Las NP no conjugadas se trataron de forma similar, sólo que el PA no

estaba etiquetado con His, y por tanto no era adecuado para unirse a las NP. Se añadieron coadyuvantes a las vacunas a 5 µl/dosis inmediatamente antes de su uso. Las vacunas que contenían PA tenían 23 µg/dosis. Se diluyeron las vacunas parenterales hasta 100 µl cada una con NaCl 150 mM. Se calentó MPL (Sigma n.º M-6536, n.º Lot. 42K1185) hasta 40 °C y se resuspendió en 1 ml de NaCl 150 mM justo antes de su uso. Se obtuvo IPX50 (n.º lot. GNGO) de Edwin V. Oaks (WRAIR). Se almacenó IPX50 a -80 °C hasta inmediatamente antes de su uso y se descongeló en hielo. Se añadieron coadyuvantes a PA a 5 µl/dosis inmediatamente antes de su uso.

Coadyuvantes IPX50 es una fracción de cromatografía de intercambio de iones de un extracto de agua aislado de bacterias *Shigella* que contiene el complejo de invasión de *Shigella*. MPL está compuesto de monofosforil lípido A y dicorinomicolato de trehalosa sintético en escualeno y Tween 80.

Grupos de tratamiento: Los grupos de tratamiento se muestran en la tabla 8. Los controles negativos fueron ratones no inmunizados, y ratones recibieron nanopartículas y MPL (IP), nanopartículas e Invaplex (IN) o bien Invaplex (IN) solo sin la adición de PA. PA/MPL se incluyó como control positivo.

Tabla 8
Grupos de tratamiento

N.º de grupo	Tratamiento	Nombre corto	Vía	N.º ratones
1	NP/MPL	NP/MPL	IP	3
2	NP/Invaplex 50	NP/IPX	IN	3
3	PA/MPL	PA/MPL	IP	5
4	PA/Invaplex 50	PA/IPX	IN	5
5	PA unido a NP/MPL	PA*NP/MPL	IP	5
6	PA unido a NP/Invaplex 50	PA* NP/IPX	IN	5
7	No inmunizado	No inmunizado	-	3
8	PA no unido a NP/MPL	PA/NP/MPL	IP	5
9	PA no unido a NP/Invaplex 50	PA/NP/IPX	IN	5
10	Invaplex solo	IPX	IN	3

Muestra: Se recogieron muestras de heces y de sangre de los ratones antes de la vacunación inicial (día 0) y los días 21 y 56. Los ratones se reforzaron con una repetición de la vacunación inicial después de que se recogieran las muestras del día 21. Los animales se sacrificaron al final de este estudio y el suero se recogió y se almacenó.

ELISA en suero: Se midió la IgG anti-PA en suero por ELISA (tabla 9). Se recubrieron dos filas de una placa de 96 pocillos dos veces con diluciones en serie de IgG de ratón (Sigma 1-5381), de 1 µg/ml en PBS, a 2 ng/ml en la columna 10, para servir como estándares. Cada fila sirvió como replicado. Los cuatro pocillos restantes en las dos filas sirvieron de blancos. Se recubrieron los pocillos restantes de la placa con 1 µg/ml de PA en PBS pH 7,2. El recubrimiento continuó toda la noche a 4 °C bajo humedad alta. Se lavaron tres veces los pocillos con PBS/Tween 20 al 0,05 % (PBST), se bloquearon 1 hora a temperatura ambiente con PBST + FBS al 3 %. Se diluyeron en serie dos veces muestras de suero en PBST/FBS de 1:100 a 1:3.200. Se incubaron diluciones en suero en placas a 4 °C durante la noche bajo humedad alta. Después de lavar de nuevo tres veces los pocillos con PBST, se detectaron los anticuerpos de ratón unidos a PA por medio de una dilución 1:1000 de IgG anti-ratón de cabra conjugada con HRP (Southern Biotech, n.º 1030.05, n.º Lot. D240-N742G) se diluyó en PBST/FBS, y se incubó sobre pocillos durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces los pocillos con PBST, y se desarrolló la placa con ABTS (Pierce n.º Cat. 37615) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron lecturas de DO₄₀₅ y se representaron los valores de los estándar en una curva estándar usando el programa informático SoftMax Pro. Se usaron las absorbancias de las muestras para interpolar la concentración de anticuerpo a partir de las curvas estándar. Se exportaron los datos a Excel para el análisis posterior. Se pasaron los sueros de 12 ratones en cada placa (uno por columna), y se replicó cada muestra en una placa separada. Se realizaron al menos 2 análisis en cada muestra.

Tabla 9
ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IgG 1.100	IgG 1.200	IgG 1.400	IgG 1.800	IgG 1.1600	IgG 1.3200	IgG 1.6400	IgG 1: 12.800	IgG 1: 25.600	IgG 1: 51.200	Blanco	Blanco
B	IgG 1.100	IgG 1.200	IgG 1.400	IgG 1.800	IgG 1.1600	IgG 1.3200	IgG 1.6400	IgG 1: 12.800	IgG 1: 25.600	IgG 1: 51.200	Blanco	Blanco
C	Ratón 1 1.100	Ratón 2 1.100	Ratón 3 1.100	Ratón 4 1.100	Ratón 5 1.100	Ratón 6 1.100	Ratón 7 1.100	Ratón 8 1.100	Ratón 9 1.100	Ratón 10 1.100	Ratón 11 1.100	Ratón 12 1.100
D	Ratón 1 1.200	Ratón 2 1.200	Ratón 3 1.200	Ratón 4 1.200	Ratón 5 1.200	Ratón 6 1.200	Ratón 7 1.200	Ratón 8 1.200	Ratón 9 1.200	Ratón 10 1.200	Ratón 11 1.200	Ratón 12 1.200
E	Ratón 1 1.400	Ratón 2 1.400	Ratón 3 1.400	Ratón 4 1.400	Ratón 5 1.400	Ratón 6 1.400	Ratón 7 1.400	Ratón 8 1.400	Ratón 9 1.400	Ratón 10 1.400	Ratón 11 1.400	Ratón 12 1.400
F	Ratón 1 1.800	Ratón 2 1.800	Ratón 3 1.800	Ratón 4 1.800	Ratón 5 1.800	Ratón 6 1.800	Ratón 7 1.800	Ratón 8 1.800	Ratón 9 1.800	Ratón 10 1.800	Ratón 11 1.800	Ratón 12 1.800
G	Ratón 1 1.1600	Ratón 2 1.1600	Ratón 3 1.1600	Ratón 4 1.1600	Ratón 5 1.1600	Ratón 6 1.1600	Ratón 7 1.1600	Ratón 8 1.1600	Ratón 9 1.1600	Ratón 10 1.1600	Ratón 11 1.1600	Ratón 12 1.1600
H	Ratón 1 1.3200	Ratón 2 1.3200	Ratón 3 1.3200	Ratón 4 1.3200	Ratón 5 1.3200	Ratón 6 1.3200	Ratón 7 1.3200	Ratón 8 1.3200	Ratón 9 1.3200	Ratón 10 1.3200	Ratón 11 1.3200	Ratón 12 1.3200

- 5 Respuestas de anticuerpos: El suero extraído antes de la vacunación inicial no mostró un reconocimiento medible de PA (datos no mostrados). Se midieron las respuestas anti-PA en suero en ratones tres semanas postinmunización, inmediatamente antes del refuerzo. Los ratones que recibieron PA/MPL (suministro IP, no NP) tuvieron las mayores respuestas anti-PA medias en sus sueros a 31 $\mu\text{g/ml}$, con valores que variaban de 22 a 44 $\mu\text{g/ml}$. La respuesta media de ratones con PA/NP/MPL (PA libre mezclado con pero no unido a NP, administración IP) fue estadísticamente similar a 26 $\mu\text{g/ml}$ (prueba t independiente, $p>0,05$), con valores que varían de 9-51 $\mu\text{g/ml}$. Cuatro de los cinco ratones que recibieron PA*NP/MPL (PA unido a NP suministrado IP) tuvieron niveles de IgG anti-PA medibles (intervalo de 0 a 14 $\mu\text{g/ml}$), pero la respuesta media del grupo fue de 6 $\mu\text{g/ml}$ de IgG, lo que fue significativamente menor que las otras dos vacunas que contenían PA suministradas IP ($p<0,05$, figura 5). Dos de los cinco ratones que recibieron PA/IPX por vía intranasal respondieron al PA suministrado por vía nasal. Ninguno de los ratones de control (no inmunizados, tratamientos NP/MPL, NP/IPX o IPX) tuvo respuestas anti-PA medibles, como se esperaba.

Los resultados de muestras de suero de ocho semanas (cinco semanas después del refuerzo) se muestran en la figura 6. Los ratones que recibieron PA/MPL (no NP, administración IP) tuvieron las mayores respuestas de IgG anti-PA séricas (intervalo de 58-284 $\mu\text{g/ml}$, media de 175 $\mu\text{g/ml}$). El incremento en la respuesta media por ratones con PA/MPL en comparación con ratones con PA/NP/MPL se aproximó a la significación estadística ($p<0,08$). Los ratones PA/NP/MPL respondieron con valores que variaban desde 8-172 $\mu\text{g/ml}$ de IgG anti-PA, con una media de tratamiento de 82 $\mu\text{g/ml}$. Los ratones que recibieron PA unido a NP por medio de administración IP (PA*NP/MPL) tuvieron respuestas menores que las de los ratones PA/MPL ($p<0,05$), pero similares a las que recibieron las mismas NP, pero con PA no unido ($p>0,05$). Los valores para los ratones PA*NP/MPL variaban desde 3 $\mu\text{g/ml}$ a 132 $\mu\text{g/ml}$ con un valor medio de 70 $\mu\text{g/ml}$.

A las ocho semanas, los ratones que recibieron PA/IPX por vía intranasal tuvieron una respuesta de IgG anti-PA en suero media de 37 $\mu\text{g/ml}$ (intervalo de 4-49 $\mu\text{g/ml}$). Esta respuesta fue estadísticamente similar para ambos tratamientos con PA/NP, pero menor que con PA/MPL ($p<0,05$). Un ratón que recibió PA/NP/IPX tuvo una respuesta medible en suero de 13 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo, ninguno de los otros con ese tratamiento tuvo respuestas positivas.

Efectos de las nanopartículas en las respuestas inmunitarias: El enfoque de NO con unión a His de la administración

de un antígeno no pareció ventajoso. De hecho, las NP inhibieron la IgG en suero anti-PA.

Ejemplo 4: Inmunización intranasal con múltiples péptidos del carbunco

5 Protocolo: Los ratones Balb/c hembras, de 8 semanas de edad, se inmunizaron el día 0, 14, y 28. Se recogieron muestras de suero los días 0, 28, y 56. Se realizaron inmunizaciones IN en un volumen total de 10 µl, y cada una contenía 5 µg de IPX50. Para las inmunizaciones IN, se suministró un bolo de 5 µl/narina a cada fosa nasal después de anestesiarse ligeramente al ratón por medio de isofluorina hasta hacer efecto.

10 Formulación de vacuna: Se añadieron coadyuvantes a las vacunas a 5 µl/dosis inmediatamente antes de su uso. Se administró el PA a 10 µg/dosis; 10-mero capsular a 10 µg/dosis; PGA en cápsula a 10 µg/dosis. Se obtuvo IPX50 de Edwin V. Oaks (WRAIR). Se almacenó IPX50 a -80 °C hasta inmediatamente antes de su uso y se descongeló en hielo. Se añadieron coadyuvantes a PA a 5 µl/dosis inmediatamente antes de su uso. Se realizaron conjugados de PA de acuerdo con el procedimiento de Schneerson *et al.* (Proc Natl Acad Sci USA. 2003, 22 de julio;100(15):8945-15 Epub 2003, 11 de julio). Las vacunas formuladas con toxina del cólera (CT) contenían 1 microgramo de CT.

Coadyuvantes IPX50 es una fracción de cromatografía de intercambio de iones de un extracto de agua aislado de bacterias Shigella que contiene el complejo de invasión de Shigella. CT es la toxina del cólera.

20 Grupos de tratamiento: Los grupos de tratamiento se muestran en la tablas 10 y 11.

Muestra: Se recogieron muestras de suero los días 0, 28, y 56.

25 ELISA en suero: La IgG anti-cápsula y anti-PA en suero se midieron por ELISA y la cantidad de IgG para cada antígeno se interpoló a partir de curvas estándar generadas en paralelo como se describe anteriormente.

Respuestas de anticuerpos: El suero extraído antes de la vacunación inicial no mostró un reconocimiento medible de PA (datos no mostrados).

30 Se midieron las respuestas anti-PA en suero en ratones 8 semanas postinmunización, (tabla 10, figura 7). Los ratones que recibieron PA con o sin cápsula o el 10-mero de cápsula con CT tuvieron respuestas de IgG anti-PA medias que variaban desde 340-428 U/ml. Los ratones que recibieron PA con IPX50 tuvieron una IgG anti-PA medible pero la media fueron respuestas que variaban desde 30-48 U/ml y algunos ratones en cada uno de estos grupos no tuvieron una respuesta medible. La presencia de la cápsula o 10-mero de cápsula en estos animales parecía no tener efecto sobre la respuesta anti-PA en ratones que recibieron formulaciones con IPX50 o CT.

Tabla 10
IgG Anti-PA

Grupo	Tratamiento	Media, U/ml	Desviación estándar
1	No inmunizado	0,0	0,0
2	PA	0,0	0,0
3	IPX	0,0	0,0
4	PA+IPX	48,1	59,2
5	10mero+IPX	0,0	0,0
6	PA+Caps+IPX	30,7	13,5
7	PAconj 10mero+IPX	0,5	1,0
8	PA+10mero+IPX	47,4	44,0
9	PA+CT	340,6	114,2
10	PA+Caps+CT	353,4	142,3
11	PA+10mero+CT	428,1	163,0

40 Por el contrario, las formulaciones con CT no potenciaron uniformemente la respuesta de IgG anti-cápsula (figura 8). Las respuestas más grandes se observaron en ratones que recibieron PA + Caps + CT pero la respuesta dentro del grupo fue variable. Y las respuestas de los ratones que recibieron PA + 10-mero + CT en promedio fueron similares a las de los ratones que recibieron PA + CT. La respuesta anti-cápsula más uniforme y consistente en comparación con los otros grupos se observó en ratones que recibieron PAconj 10-mero + IPX50. La media de 11,2 U/ml para este grupo excedió a PA + Caps + CT. Además, todos los ratones que recibieron PAconj 10-mero + IPX50 excedieron a las respuestas observadas en 4/5 ratones en el grupo de A + Caps + CT.

Tabla 11
IgG anti-cápsula

Grupo	Tratamiento	Media, U/ml	Desviación estándar
1	No inmunizado	1,1	0,3
2	PA	2,0	1,3
3	IPX	2,4	0,5
4	PA+IPX	2,8	1,9
5	10mero+IPX	2,0	0,9
6	PA+Caps+IPX	2,7	1,3
7	PAconj 10mero+IPX	11,2	1,7
8	PA+10mero+IPX	2,7	1,2
9	PA+CT	2,7	1,5
10	PA+Caps+CT	7,7	4,6
11	PA+10mero+CT	2,5	2,0

Ejemplo 5: La inmunización intranasal de conejos con antígenos de cápsula y PA provoca IgG en suero específica de antígeno y protege frente a la exposición a aerosol con carbunco virulento.

5

En este experimento, se sometieron a prueba las capacidades protectores de una vacuna en un modelo reconocido de carbunco humano por inhalación. Las formulaciones de vacuna sometidas a prueba se muestran en la tabla 12. El PA se obtuvo de List Biochemical, MPL-AF (monofosforil lípido A, fórmula acuosa) de Corixa, y glutamato de quitosano de West Pharmaceutical Services (Nottingham, Reino Unido). El quitosano se incluyó en algunas formulaciones ya que ha demostrado tener propiedades mucoadhesivas. El conjugado poli(ácido γ -D-glutámico) péptido/PA descrito anteriormente se usó aquí a una dosis de 90 μ g, lo que representó aproximadamente 18 μ g del péptido de cápsula. También se incluyó PA no conjugado en vacunas que contenían conjugado para garantizar que se pudieran estimular las respuestas de PA, ya que los resultados previos sugirieron que los epítomos de PA se podían alterar por el proceso de conjugación. Los experimentos previos han indicado que la inmunización intranasal de conejos con 90 μ g de PA en formulaciones líquidas dieron respuestas anti-PA medibles en la mayoría de los conejos, por tanto también se utilizaron aquí dosificaciones de 90 μ g de PA. Se incluyó MPL como coadyuvante a 25 μ g/dosis, y en algunas formulaciones se incluyó quitosano como mucoadhesivo. Las vacunas en polvo seco se formularon por West Pharmaceuticals Services y se cargaron en dispositivos de administración nasal de un solo uso Monopowder de Valois. Las vacunas en polvo seco se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Cada dispositivo contenía 11 mg de polvo, y se calculó que la administración era de 10 mg cuando se presionaba el émbolo, administrándose la mitad de la dosificación en los 10 mg. Se usaron dos dispositivos de administración nasal para cada conejo (uno para cada narina) que recibieron las formulaciones en polvo seco. Las formulaciones de vacuna líquida se formularon de inmediato antes de su uso, y se administraron por vía intranasal a los conejos usando pulverizadores MAD (dispositivo de administración mucosa) de Wolfe-Tory Medical, Inc. (sal Lake City, Utah) en un volumen total de 200 μ l, o por medio de una única inyección intramuscular de volumen 100 μ l. La vacunación intranasal se dividió por igual entre ambas narinas para cada conejo. Para todas las formulaciones de vacuna, los animales se inmunizaron los días 0 y 28 con sujeción firme, pero sin anestesia. Las muestras de suero se recogieron antes de la primera inmunización (día 0), y de nuevo el día 28 (semana 4, antes de la inmunización de refuerzo) y el día 56 (semana 8). Se analizó el suero por ELISA para respuestas de anticuerpos específicos de antígeno, y niveles de IgG específica de PA se calcularon a partir de una curva estándar generada con sueros de conejo inmunitarios calibrados. Los resultados de ELISA se analizaron estadísticamente por comparación de la prueba t de pares de medias de tratamiento, considerándose diferencias significativas si $p < 0,05$.

35

Tabla 12
Formulaciones de vacuna intranasales para el ejemplo 5

Grp.	Tratamiento	Nombre corto	Forma	Vía	N.º conejo
D1	Polvo seco control negativo	Neg	Polvo	intranasal	5
D3	PA+MPL+quitosano+conjugado	PA/MPL/Chito/Conj	Polvo	intranasal	10
D5	PA+MPL+quitosano+10-mero	PA/MPL/Chito/10-mero	Polvo	intranasal	10
D6	PA+MPL+conjugado	PA/MPL/Conj	Polvo	intranasal	10
L8	PA+MPL+conjugado	PA/MPL/Conj (L)	Fluido	intranasal	10

L10	PA+MPL	PA/MPL (L, i.m.)	Fluido	intramuscular	10
-----	--------	------------------	--------	---------------	----

Los niveles en suero de IgG específica de PA se muestran en la figura 9. Las muestras de suero de 4 semanas revelaron que la vacuna en polvo seco que contiene tanto PA como quitosano (D3, D5) así como la formulación líquida intramuscular (L10) pudieron provocar niveles de anticuerpos estadísticamente significativos 4 semanas después de una única inmunización intranasal ($p < 0,05$, tabla 13). Una segunda inmunización potenció las respuestas de IgG en suero frente a PA a niveles aún mayores, conteniendo todas las vacunas PA, excepto para la formulación líquida intranasal L8, induciendo niveles significativos de anticuerpos a las 8 semanas ($p < 0,05$). Los niveles de IgG específicos de PA medios en suero variaron entre los grupos que respondieron, midiéndose las respuestas más fuertes en conejos inmunizados con PA en combinación con MPL, quitosano, y el péptido 10-mero de cápsula libre ($p < 0,001$). D3 (103 $\mu\text{g/ml}$) y L10 (99 $\mu\text{g/ml}$) indujeron respuestas anti-PA menores, pero aún bastante impresionantes. Finalmente, la formulación en polvo seco que contenía PA y MPL, pero no quitosano, provocó respuestas anti-PA mucho menores, aunque notables (38 $\mu\text{g/ml}$), aunque la misma formulación en forma líquida administrada por vía intranasal no dio como resultado respuestas estadísticamente significativas.

15

Tabla 13
Niveles de IgG anti-PA en suero 4 y 8 semanas después de la inmunización inicial

Tratamiento	$\mu\text{g/ml} \pm \text{D.E.}$	
	4 semanas	8 semanas
Polvo seco control negativo	$1 \pm 0,7^a$	$0 + 0^a$
PA+MPL+quitosano+conjugado	26 ± 25^b	103 ± 73^b
PA+MPL+quitosano+10mero	$19 \pm 11^{b,c}$	230 ± 58^c
PA+MPL+ conjugado	$3 \pm 2^{a,c}$	38 ± 29^d
PA+MPL+ conjugado	3 ± 4^a	$13 \pm 31^a^d$
PA+MPL, intramuscular	$11 \pm 10^{b,c}$	99 ± 53^b

^{a,b,c} Letras diferentes en superíndice en un punto temporal indican una diferencia estadística, $p < 0,05$.

No se identificaron respuestas anti-cápsula en las muestras de suero de 4 semanas (datos no mostrados), aunque todas las vacunas que contenían el conjugado cápsula péptido indujeron niveles de IgG anti-cápsula similares, estadísticamente significativos en las muestras de suero de 8 semanas (figura 10). El péptido 10-mero libre se indujo en la formulación D5 bajo la hipótesis de que el quitosano con carga altamente positiva se podría unir al péptido cargado negativamente y presentarse en células efectoras inmunitarias de manera similar a la conjugación con una proteína. No se observaron respuestas de IgG anti-cápsula en ninguno de los conejos inmunizados con D5, la formulación que contenía el péptido libre, lo que significa que la conjugación del péptido cápsula con una proteína dirigida puede incrementar respuestas específicas de cápsula.

Se sometió a prueba la eficacia protectora de alguna de las vacunas. Se transportaron 6 o 7 conejos seleccionados de los grupos de tratamiento D3, D5, D6 y L8 junto con los 5 conejos de D1, al Battelle Medical Research & Evaluation Facility (West Jefferson, OH) 10 semanas después de la inmunización inicial (6 semanas después de la vacunación con refuerzo). Después de una semana de cuarentena, los conejos se sometieron a exposición con aerosol aproximadamente con 250 DL_{50} de esporas Ames de *B. anthracis* administradas por medio de una cámara de exposición a inhalación sólo por hocico. A continuación, se observaron los conejos dos veces al día para determinar la morbilidad (anorexia) y muerte. Las observaciones se registraron durante 14 días después de la exposición. A continuación, los conejos sobrevivientes se sometieron a eutanasia después de la recogida de una muestra de suero fase de convalecencia. Se analizaron las muestras de suero para determinar las respuestas de IgG que reconocen el PA, factor letal (LF) y cápsula y se compararon con las respuestas a las 8 semanas para determinar el grado de infección experimentado por conejos individuales.

Cuatro de los cinco conejos inmunizados con la formulación D1 de control negativo sucumbieron al carbunco durante el periodo posterior a la exposición, y el quinto conejo parecía enfermo y dejó de comer durante varios días antes de la finalización del experimento 14 días después de la exposición. Todos los conejos inmunizados con las otras formulaciones de vacuna estuvieron protegidos contra la muerte y parecían sanos a lo largo de todo el experimento. Todos los conejos inmunizados con vacunas D3, D5 o D6 sobrevivieron a la exposición con aerosol, pero se observaron diferencias en la morbilidad entre los grupos de vacuna (tabla 15). Sólo los conejos inmunizados con el PA+PA-Conj (D3) parecían normales a lo largo de todo el periodo de observación posterior a la exposición (14 d), mientras que todos los conejos que recibieron PA con péptido libre (D5) estuvieron enfermos en varias ocasiones, como se demuestra por una falta de alimentación normal. Puesto que los conejos de D5 tuvieron un nivel de IgG anti-PA en suero mucho mayor (236 $\mu\text{g/ml}$) que el grupo vacunado con D3 (127 $\mu\text{g/ml}$), la ausencia de morbilidad/anorexia no se relacionó con los niveles en suero de IgG anti-PA. El conejo de control negativo que sobrevivió a la exposición recibió una dosis de esporas inhalada menor (183 DL_{50} , tabla 15), lo que tal vez le permitió

sobrevivir. Sin embargo, sí presentó anorexia, lo que sugiere que tenía una infección.

Para examinar adicionalmente el grado de protección proporcionado por la vacunación, se midieron los niveles de IgG anti-factor letal (LF) en los conejos que sobrevivieron a la exposición. Se razonó que si los animales expuestos sí experimentaron una infección del carbunco real, aumentarían una respuesta en suero medible frente al LF secretado. Ninguno de los conejos superviviente tuvo niveles medibles de IgG anti-LF en su suero dos semanas antes de la exposición (datos no mostrados), por tanto, cualquiera de los anticuerpos de LF detectados en sueros en la fase convaleciente 14 días después de la exposición (figura 11, tabla 15) han tenido que surgir como resultado de una infección activa. El conejo de control negativo superviviente (D1) tuvo un nivel extremadamente alto de IgG anti-LF en su suero 14 días después de la exposición con relación a los otros superviviente (5400 U/ml), lo que indica que experimentó una infección por carbunco activa. Unos pocos individuos en los otros grupos de inmunización (2/7 para D3, 1/6 para D5, y 2/7 para D6) también tuvieron niveles de LF medibles después de la exposición (de 44 a 138 U/ml), lo que indica que también sufrieron una infección activa. Sin embargo, los niveles medidos fueron menores de un décimo de lo encontrado en el control negativo inmunizado con D1, lo que confirma que la inmunización intranasal con las formulaciones que contienen PA, en polvo seco, pudo conferir una protección sustancial, y a menudo inmunidad estéril, frente a la exposición a aerosol.

Ejemplo 6: La inmunización intranasal con PA y conjugados de cápsula provoca respuestas de linfocitos T específicos de antígeno

Se evaluó la capacidad de PA y del conjugado de péptido de cápsula-PA para aumentar los linfocitos específicos de antígeno. Se inmunizaron ratones BALB/c con el conjugado PA/péptido 10-mero formulado con toxina del cólera (CT) como coadyuvante. Se vacunó el primer grupo por vía intranasal con 10 mg de conjugado + 1 mg de CT, mientras que se vacunó el segundo grupo por vía intraperitoneal con 25 mg de conjugado + 1 mg de CT. Catorce días después de la inmunización, los ratones se sometieron a eutanasia, se recogieron los bazo de forma aséptica, se agruparon por grupos, y se preparó una suspensión de célula individual de esplenocitos en RPMI- 1640-10 % de FBS. Se plaquearon 2×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos para reestimulación *in vitro* y se añadieron los siguientes antígenos a los pocillos en concentraciones variables para la evaluación de la reactividad de los linfocitos T: péptido de cápsula 10-mero conjugado con seroalbúmina bovina (Pep10-BSA), BSA no conjugada como control, y antígeno protector (PA) de *B. anthracis*. A continuación, se incubaron las células durante 5 días a 37 °C, tiempo después del que se recogieron los sobrenadantes del cultivo para la evaluación de citocinas usando un ensayo multiplex (Luminex). El día 5, también se sometieron a ensayo los cultivos para determinar la proliferación de linfocitos midiendo la incorporación de BrdU en el ADN de las células en división (ELISA de proliferación celular, Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN)

La figura 12A muestra esta respuesta proliferativa *in vitro* al péptido de cápsula después de la inmunización *in vivo*. La reestimulación se llevó a cabo con el conjugado de péptido 10-mero en una molécula vehículo irrelevante (BSA) para garantizar que la respuesta sea específica de cápsula. Estos datos demuestran que los ratones inmunizados pueden aumentar una respuesta de linfocitos T específica para el péptido de cápsula después de una inmunización intranasal o bien intraperitoneal. No se observó respuesta a BSA no conjugada en los cultivos de control negativo, lo que demuestra que la estimulación no era debida a la presencia de BSA. También se detectó IL-2 en los sobrenadantes recogidos de los cultivos reestimulados con Pep10-BSA (figura 12B), aunque no en sobrenadantes de cultivos reestimulados con BSA no conjugada. Por tanto, los linfocitos T específicos de péptidos de cápsula se activaron realmente en estos cultivos. La ruta de inmunización, intranasal frente a intraperitoneal, no pareció realizar una diferencia significativa en términos de magnitud de respuesta. Adicionalmente, la presencia de linfocitos T reactivos de antígeno en el bazo después de una inmunización intranasal es una fuerte evidencia de que la imprimación intranasal puede dar como resultado finalmente una respuesta inmunitaria sistémica. La reestimulación *in vitro* usando PA no conjugado también demostró que los linfocitos T específicos de PA se generan después de la inmunización con el conjugado Pep10-PA, y que la reacción de conjugación no parece alterar la reactividad de los linfocitos T de PA (datos no mostrados).

Ejemplo 7: La inmunización intranasal de conejos con plásmidos que codifican antígenos de la toxina de *Bacillus anthracis* provoca respuestas específicas de antígeno en suero

Se inmunizaron conejos blancos de Nueva Zelanda hembras (de 12 semanas de edad) por vía intranasal los días 0, 28 y 56 con las formulaciones mostradas en la tabla 14. Se recogió suero antes del inicio del experimento y otra vez los días 28, 56 (antes de las inmunizaciones) y 84. Las formulaciones de vacuna se formularon de inmediato antes de su uso, y se administraron por vía intranasal a los conejos usando una micropipeta en un volumen total de 50 μ l (25 μ l/fosa nasal). La vacunación intranasal se dividió por igual entre ambas narinas para cada conejo.

Tabla 14
Formulaciones de vacuna de ADN intranasal.

Conejos por grupo	Plásmidos	Coadyuvante	Nombre corto	µg de ADN por conejo
5	Ninguna (solución salina)	Ninguno	Solución salina	0
5	pPA63+pLF4	Ninguna	ADN	100
7	pPAg3+pLF4	PCCE	ADN/PCCE	100
7	pPAe3+pLF4	IPX24	ADN/IPX24	100
7	pPA63+PLF4	IPX24+PCCE	ADN/IPX24/PCCE	100
7	pPA63+pLF4	IPX50	ADN/IPX50	100
7	pPAe3+pLF4	IPX50+PCCE	ADN/IPX50/PCCE	100

pPA63 = plásmido que codifica los residuos 175-764 (146-735 sin secuencia líder) de antígeno protector de *B. anthracis*

5 pLF4 = plásmido que codifica los residuos NH2-terminales 10-254 del factor letal de *B. anthracis* IPX24=Invaplex 24, un extracto de agua de *Shigella flexneri* con actividades de coadyuvante. 24 designa la fracción de elución durante la purificación

IPX50 = Invaplex 50, un extracto de agua de *Shigella flexneri* con actividades de coadyuvante. 50 designa la fracción de elución durante la purificación

10 PCCE = fosfatidilcolina de soja + colato de sodio + etanol, una mezcla que ha demostrado que aumenta las respuestas específicas de antígenos en vacunas intranasales

15 Para todas las formulaciones de vacuna, los animales se inmunizaron los días 0 y 28 con sujeción firme, pero sin anestesia. Se analizó el suero por ELISA para respuestas de anticuerpos específicos de antígeno, y niveles de IgG específica de LF o específica de PA se calcularon a partir de una curva estándar generada con IgG de conejo. Los resultados de ELISA se analizaron estadísticamente por comparación de la prueba t de pares de medias de tratamiento

20 Las respuestas específicas de LF se muestran en la figura 13. Las respuestas más altas se provocaron por el grupo que recibió los vectores de expresión del plásmido formulados con el coadyuvante de mucosa Invaplex 24 (ADN/IPX24). En este grupo de tratamiento, 5 de 7 animales produjeron niveles de IgG específicos de antígeno medibles con respuestas significativas 8 semanas después de sólo 2 vacunaciones (media de 6 U/ml, intervalo de 0-13 U/ml). El día 84 (después de la tercera inmunización el día 56) la media de los niveles de IgG en suero en conejos ADN/IPX24 fue de 12 U/ml (intervalo de 0-30 U/ml), lo que era significativamente diferente del grupo vacinado con solución salina ($p < 0,07$). Estos datos sugieren que Invaplex 24 potenció la eficacia de la vacunación de ADN nasal en conejos. En contraste, los conejos que recibieron Invaplex 50 (ADN/IPX50) no respondieron mejor (media de 1 U/ml a las 12 semanas, intervalo de 0-6 U/ml) que el grupo que se vacunó sólo con ADN (media de 3 u/ml a las 12 semanas, intervalo de 0-6 U/ml). El PCCE solo falló en reforzar los niveles de IgG (ADN/PCCE, media de 2 U/ml a las 12 semanas, intervalo de 0-6 U/ml), y cuando se administró conjuntamente con Invaplex 24 pareció contrarrestar los efectos impartidos por Invaplex 24 (ADN/IPX24/PCCE, media de 2 U/ml a las 12 semanas, intervalo de 0-3 U/ml). PCCE administrado conjuntamente con Invaplex 50 tuvo poco efecto sobre las respuestas de IgG, con la excepción de un único conejo (ADN/IPX50/PCCE, media de 2 U/ml a las 12 semanas, intervalo de 0-6 U/ml).

35 Las respuestas de IgG específica de PA en suero a las 12 semanas se muestran en la figura 14. Las respuestas promedio entre los grupos de tratamiento fueron relativamente uniformes, pero bajas. Los animales dentro del grupo vacunado con ADN/IPX24 tendían a tener respuestas más consistentes, produciendo 7 de 7 animales cantidades medibles de IgG en suero específica de PA (media de 3 U/ml, intervalo de 0-6 U/ml). La respuesta media para ADN/IPX24 fue diferente de la de los animales inmunizados sólo con solución salina ($p < 0,02$).

40 En resumen, se indujeron respuestas de anticuerpos en suero específicos de antígeno tanto para antígeno protector de *B. anthracis* como para el factor letal por inmunización intranasal con fragmentos que codificaban ADN de plásmido de estos componentes de toxina.

Ejemplo 8: La opsonización de esporas de *B. anthracis* con BcIA de reconocimiento de antisuero incrementa la captación de esporas y la destrucción por macrófagos

5 BcIA es una proteína glucosilada abundante que se encuentra en el exosporio de esporas de *Bacillus anthracis*. (Sylvestre *et al.* 2002. Mol Microbiol 45:169-178.). 382 residuos de aminoácidos se codifican por el gen, y la parte central de la proteína contiene una región de GXX motivos similar a los que se encuentra en las proteínas de colágeno de mamífero.

10 Se plaquearon 1×10^5 macrófagos J774 en cada pocillo de una placa de 6 pocillos y se cultivó toda la noche en medio modificado de Dulbecco (DMEM) con suero fetal bovino al 5 % (FBS). Al día siguiente, se incubaron esporas de cepa Sterne de *B. anthracis* (1×10^5 /ml) en antisueros de BcIA diluidos en medio de captación fagocítico (DMEM/FBS al 10 %/HEPES 10 mM, pH 7,4) como se indica en la tabla 20. Las esporas y el medio se incubaron a 37 °C durante 1 hora. El medio de cultivo en las células J774 se reemplazó a continuación con 1 ml de las soluciones de espora/sueros/medio de captación. Las esporas y las células se incubaron a 37 °C durante 1 hora y después, se colocó en hielo. Se recogió el medio de cada pocillo y se almacenó en hielo, y después las células se aclararon una vez con PBS a 37 °C (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4) y se lisaron en 1 ml/pocillo de saponina al 2,5 %. Se recogió el lisado celular de cada pocillo y se almacenó en hielo. Se plaquearon 100 µl de una dilución 1/100 de muestras del medio y muestras de lisado en placas de agar sangre y se incubó durante la noche a 37 °C. Se contaron las unidades formadoras de colonias (CFU) la mañana siguiente. Los resultados se muestran en la figura 15.

Tabla 20
Condiciones para determinar los efectos de antisuero de BcIA en fagocitosis de esporas del carbunco y destrucción por el la línea celular de macrófago del ratón, J774

Tratamiento	J774 células/pocillo	Esporas de Sterne de <i>B. anthracis</i> /pocillo	Dilución de antisuero de BcIA
1	10^5	10^5	ninguna
2	10^5	10^5	1/100
3	10^5	10^5	1/500
4	10^5	10^5	1/1000
5	10^5	10^5	1/5000

25 En todos los casos las esporas se tomaron muy eficazmente por los macrófagos, como se evidencia por los números muy bajos de CFU resistentes al calor recuperadas de las muestras del medio de cultivo después de 1 hora (≤ 2 %). Esencialmente, todas las esporas añadidas a macrófagos sin incubación con los antisueros de BcIA se recuperaron como bacilos germinados. Sin embargo, se permitió la destrucción de esporas por la incubación con los antisueros de BcIA de manera dependiente de la dosis. Puesto que la tasa de captación de esporas no pareció afectar a la ausencia o presencia de antisueros de BcIA, la disminución en los números de CFU viable recuperadas era probablemente debida a la destrucción de las esporas por los macrófagos. Durante algún tiempo se ha reconocido no todas las esporas del carbunco fagocitadas sufren la misma suerte. Está bien establecido que muchas de las esporas germinan después de que son tomadas por los macrófagos (Hanna *et al.* 1999. Trends Microbiol 7:180-182; Dixon *et al.* 1999. N Engl J Med 341:815-826), sin embargo, otros investigadores han demostrado una disminución en la viabilidad tras la fagocitosis. (Welkos *et al.* 1989. Microb Pathog 7:15-35; Guidi-Rontani *et al.* 1999. Molecular Microbiology 31:9-17) Los macrófagos tienen una variedad de receptores que se usan para fagocitosis, y el use de diferentes receptores puede dar lugar a diferencias en cómo el macrófago procede con el material recogido. (Aderem *et al.* 1999. Annu. Rev. Immunol. 17:593-623; Hellwig *et al.* 2001. J. Infect. Dis. 183:871-879). La opsonización de la espora del carbunco con anticuerpo permite la captación por los macrófagos por medio del receptor Fc. La captación por el receptor Fc, pero no por otras rutas, ha demostrado que potencia la destrucción en otros sistemas bacterianos. (Aderem *et al.* 1999. Annu. Rev. Immunol. 17:593-623)

Ejemplo 9: Inmunización intranasal con BcIA

45 Se inmunizaron ratones BALB/c hembras de ocho semanas de edad en este estudio por vía intranasal los días 0 y 21 con 10 µl/ratón de las formulaciones de vacuna mostradas en la tabla 16. Se recogió el suero antes de la inmunización los días 0 y 21, así como el día 42. Se sometió a ensayo la presencia de IgG específica de BcIA por ELISA. Los resultados para los sueros recogidos el día 42 se muestran en la figura 16. Más ratones en los grupos de vacuna que recibieron 30 µg BcIA/dosis aumentaron las respuestas de IgG en suero específica de antígeno medible (3 de 8 ratones para ambos grupos), mientras que sólo 1 ratón inmunizado con 10 µg de BcIA tuvo anticuerpos de IgG en suero anti-BcIA medibles el día 42 del experimento de inmunización. Estos resultados demuestran que las respuestas anti-BcIA se inducen por inmunización intranasal, aunque es necesario optimizar la dosificación.

Tabla 16
Tratamientos probados

Grupo	Nº de ratones	Tratamiento	amt de antígeno por ratón, por dosis	Coadyuvante
1	5	Ninguno (solución salina)	0	Ninguno
2	8	BclA	10 µg	CT 1 µg
3	8	BclA	30 µg	CT 1 µg
4	8	BclA/PA	10/10µg	CT 1 µg
5	8	BclA/PA	30/10 µg	CT 1 µg
6	8	PA	10 µg	CT 1 µg

Ejemplo 10: Inmunización con antígeno de cápsula

5 Se conjugó el antígeno de cápsula (poli (ácido (d) glutámico) de *B. anthracis* con NP (nanopartículas de liposomas polimerizadas) o KLH. Se usó MPL en las concentraciones recomendadas por el fabricante. Se conjugaron las nanopartículas (NP) con cápsula purificada de *B. anthracis* con diferentes concentraciones de nanopartículas que presentaban 1,6 mg de cápsula/dosis. Se realizaron conjugados de KLH-cápsula usando el kit de producción y purificación de anticuerpos Pierce EZ, reactivo de carboxilo, n.º cat. 77627. Los ratones A/J recibieron 20 µg
10 estimados de cápsula/ratón, con 100 µl de coadyuvante y 50 µl de antígeno para un total de 150 µl, por vía subcutánea. Los grupos de inmunización se muestran en la tabla 17.

Tabla 17
Grupos de tratamiento de conjugado de cápsula

Vacuna	Nombre corto	Dosis de cápsula	Dosis NP	Coadyuvante	n
Sólo coad.	Coad.	Ninguno	Ninguno	MPL	3
JN 6-142-5 ^a	NP	Ninguno	3 mg	MPL	3
<151> 6-142-1	NPa+Caps	20 µg	3 mg	MPL	5
<151> 6-142-2	NPb+Caps	20 µg	1,4 mg	MPL	5
<151> 6-142-3	NPc+Caps	20 µg	0,6 mg	MPL	
Caps/KLH	KLH+Caps	20 µg	Ninguno	MPL	5

^a números de lote

20 Los ratones se sangraron y se inmunizaron el día 0 y se reforzaron el día 7. Se tomaron dos sangrados el día 15 (1º sangrado) y el día 21 (2º sangrado). Se leyeron los datos de ELISA en un lector de placas Dynex Revelation. Los datos indicaron que las dosis más alta de NP conjugado con cápsula dieron el título más alto. Los resultados del análisis de suero recogido el día 21 se muestran en la figura 17. Las dosis de NP menores conjugadas con cápsula no inducen respuestas anti-cápsula diferentes de las de NP solo. La conjugación de la cápsula con KLH no dio como resultado una respuesta de anticuerpos significativa.

25 Se determinó si se pueden inducir respuestas de anticuerpos específicos de antígeno para un péptido 9-mero (Ac-Cys-Gly-Gly- Gly -(y-D-Glu)₈-D-Glu-OH) (SEQ ID NO:2) que representa la cápsula de *B. anthracis* cuando se presenta en una nanopartícula. El coadyuvante usado fue el coadyuvante Gerbu (Gerbu Biotechnik) en todas las dosis salvo en ratones naturales. Se conjugaron las nanopartículas (NP) con residuos de aminoácidos Glu individuales o péptidos de poli(ácido (D)-glutámico) 9-meros. Los grupos de inmunización se muestran en la tabla 18.
30 Los ratones se sangraron y se inmunizaron el día 0 y se reforzaron y se sangraron el día 14 (1º sangrado). Los ratones se sangraron el día 21 (2º sangrado), se reforzaron el día 28 y se sangraron el día 35 (3º sangrado).

35 Los cambios en la reactividad de IgG en suero específica de cápsula se representan en la figura 18 como la pendiente de la línea predicha por los cambios en DO₄₀₅ sobre el periodo que va desde el sangrado preinmunitario al 3º sangrado 35 días después. Esta pendiente representada permite que se visualice más fácilmente la tendencia en la reactividad. Cuanto mayor es la pendiente, más empinada es la línea, lo que indica incrementos mayores en la reactividad. Por tanto, la vacuna Hi NP+Q9+Coad indujo el mayor cambio en la reactividad de IgG en suero con la cápsula en el periodo de inmunización de 35 días.

Tabla 18
Grupos de tratamiento de péptido de cápsula

Vacuna	Nombre corto	Dosis Glu o Glu ₉	Dosis NP	Coadyuvante	n
No inmunizado	No inmunizado	Ninguno	Ninguno	Ninguno	3
Sólo coad.	Coad.	Ninguno	Ninguno	Gerbu	3
JN NP 6-161-3 Glu	NP+Q+Coad	20 µg	2,8 mg/ml	Gerbu	3
JN NP 6-161-1 Glu ₉	Lo NP+Q9+Coad	20 µg	0,8 mg/ml	Gerbu	5
JN NP6-161-2 Glu ₉	Hi NP+Q9+Coad	20 µg	2,8 mg/ml	Gerbu	5

5 El estudio expuesto anteriormente (tabla 18) se repitió usando el coadyuvante Qiagen Immuneasy CpG en todas las dosis salvo en los ratones no inmunizados. Se conjugaron las nanopartículas con residuos de aminoácidos Glu individuales o péptidos de poli(ácido (D)-glutámico) 9-meros. Los grupos de inmunización se muestran en la tabla 19. Los ratones se inmunizaron el día 0 y se reforzaron y se sangraron el día 14 (1º sangrado). Los ratones se sangraron el día 21 (2º sangrado), se reforzaron el día 28 y se sangraron el día 35 (3º sangrado).

10 Tabla 19
Grupos de tratamiento de péptido de cápsula

Vacuna	Nombre corto	Dosis Glu o Glu ₉	Dosis NP	Coadyuvante	n
No inmunizado	No inmunizado	Ninguno	Ninguno	Ninguno	3
Sólo coad.	Coad.	Ninguno	Ninguno	CpG	3
JN NP 6-161-3 Glu	NP+Q+Coad	20 µg	2,8 mg/ml	CpG	3
JN NP 6-161-1 Glu ₉	Lo NP+Q9+Coad	20 µg	0,8 mg/ml	CpG	5
JN NP6-161-2 Glu ₉	Hi NP+Q9+Coad	20 µg	2,8 mg/ml	CpG	5

15 Los cambios en la reactividad de IgG en suero específica de cápsula se representan en la figura 19 como la pendiente de la línea predicha por los cambios en DO₄₀₅ sobre el periodo que va desde el sangrado preinmunitario al 3º sangrado 35 días después. La pendiente representada permite que se visualice más fácilmente la tendencia en la reactividad. Cuanto mayor es la pendiente, más empinada es la línea, lo que indica incrementos mayores en la reactividad. En este experimento, no existió un incremento asociado en la reactividad de IgG en suero con la cápsula en el periodo de inmunización de 35 días. Esto es contrario al experimento previo expuesto en la tabla 18, donde la vacuna Hi NP+Q9+Coad parecía estar asociada con un incremento mayor en la reactividad que las otras formulaciones de vacuna. Esta diferencia aparente puede que sea debida a la diferencia en el coadyuvante usado en los dos experimentos, pero esto no se ha verificado.

Tabla 15
Exposiciones a aerosol, observaciones clínicas, y resultados de mortalidad

	ID n.º:	Equiv. de DL ₅₀ de Ames inhalado.	Observaciones clínicas ¹		suero de 8 semanas			lavado nasal 8 semanas	Suero postexposición	
					α-PA IgG U/ml	α-Caps IgG U/ml	Cl ₅₀ en TNA, dilución	α-PA IgA, U/µg total IgA	α-LF IgG, U/ml	α-PA IgG, µg/ml
Control neg.	1	183	Anorexia los días 6, 7, 8, 9, 10.	Vivió	0	0	0	BD ²	5.400	10.260
	2	288	Parecía normal hasta la muerte.	Murió el día 4	0	0	0	BD	-	-
	3	212	Letargo y anorexia el día 2.	Murió el día 3	0	0	0	BD	-	-
	4	200	Letargo y anorexia el día 2.	Murió el día 3	0	0	0	BD	-	-

ES 2 422 171 T3

	5	276	Anorexia los días 5, 6, y 7. Parecía tener convulsiones y no expulsó heces el día 6.	Murió el día 7	0	0	0	BD	-	-
PA+ MPL+ Chito+ Conj	6	289	Parecía normal en general.	Vivió	51	3	1019		0	3.552
	8	265	Parecía normal en general.	Vivió	66	4	844	BD	96	1.074
	10	285	Parecía normal en general.	Vivió	120	2	1793	BD	0	900
	11	256	Parecía normal en general.	Vivió	45	4	1112	BD	0	1.650
	12	271	Parecía normal en general.	Vivió	138	6	1936	BD	0	1.428
	13	229	Parecía normal en general.	Vivió	234	15	2332	BD	0	2.598
	14	216	Parecía normal en general.	Vivió	234	4	1044	BD	44	6.180
PA+ MPL+ Chito+ péptido libre	16	223	Anorexia los días 6 y 7.	Vivió	210	0	1687	BD	0	2.400
	17	282	Anorexia los días 6, 7, y 8.	Vivió	246	0	1842	BD	0	1.740
	18	266	Anorexia los días 0, 1, 2, 3, 6, 7, 8. No expulsó heces el día 6.	Vivió	252	0	1855	BD	138	4.200
	19	273	Anorexia el día 7.	Vivió	342	0	2488	55.229	0	1.740
	20	232	Anorexia los días 2, 6, 7, 8, y 10.	Vivió	234	0	2341	BD	0	2.034
	21	195	Anorexia los días 6, 7, y 8.	Vivió	234	0	2855	BD	0	1.008
PA+ MPL+ Conj	26	230	Anorexia el día 6.	Vivió	66	42	278	BD	102	11.040
	28	164	Parecía normal en general.	Vivió	78	5	327	BD	0	2.460
	29	263	Parecía normal en general.	Vivió	32	13	98	BD	0	1.368
	31	339	Parecía normal en general.	Vivió	15	12	286	BD	0	1.656
	32	344	Parecía normal en general.	Vivió	33	6	407	7.022	51	1.860
	34	295	1, 0,2, 5,6, 7, 8, 9, 10 y 13	Vivió	84	7	459	BD	0	1.860
	35	264	Anorexia los días 5, 6, y 7.	Vivió	0	17	0	6.888	0	3.720

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición en polvo seco adecuada para inducir una respuesta inmunitaria para el carbunco en un sujeto cuando se administra a una superficie mucosa del sujeto, que comprende antígeno protector (PA) o un fragmento inmunógeno del mismo y monofosforil lípido A (MPL), en la que parte del PA está presente como un péptido conjugado con un péptido poli(ácido γ -D-glutámico) (PGA), y en la que la respuesta inmunitaria puede mejorar o evitar al menos un síntoma de la enfermedad del carbunco.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que el péptido PGA es sintético.
3. La composición de la reivindicación 2, en la que el péptido PGA es un 10mero de poli (ácido γ -D-glutámico).
- 15 4. Una composición en polvo seco adecuada para inducir una respuesta inmunitaria para el carbunco en un sujeto cuando se administra a una superficie mucosa del sujeto, que comprende PA o un fragmento inmunógeno del mismo, MPL, y quitosano, en la que la respuesta inmunitaria puede mejorar o evitar al menos un síntoma de la enfermedad del carbunco.
- 20 5. Un kit que comprende la composición en polvo seco de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, y uno o más dispositivos para administrar una o más dosis de dicha composición.
6. El kit de la reivindicación 5, en el que dicha una o más dosis son dosis unitarias.
7. El kit de la reivindicación 5, en el que el dispositivo es un dispositivo de administración nasal de un solo uso.
- 25 8. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, para su uso como medicamento para inducir una respuesta inmunitaria para el carbunco en un sujeto, en la que dicho medicamento se administra al sujeto por medio de una ruta de administración mucosa y en la que dicho medicamento induce una respuesta inmunitaria que puede mejorar o evitar al menos un síntoma de la enfermedad del carbunco después de la administración del medicamento.
- 30 9. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 8, en la que se inhibe la replicación del carbunco en el sujeto.
- 35 10. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 8, en la que se neutraliza la exotoxina en el sujeto.
- 40 11. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, para su uso como medicamento de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora.
12. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la ruta de administración mucosa es oral o intranasal.
- 45 13. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el sujeto no ha estado expuesto al carbunco.
- 50 14. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el sujeto está infectado con el carbunco.
15. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el sujeto ha estado expuesto al carbunco.
- 55 16. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, para su uso como medicamento de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la respuesta inmunitaria comprende una respuesta inmunitaria primaria.
17. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, para su uso como medicamento de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la respuesta inmunitaria comprende una respuesta inmunitaria secundaria.
18. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, para su uso como medicamento de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la respuesta inmunitaria comprende provocar IgG en suero específica de antígeno.

FIG. 1

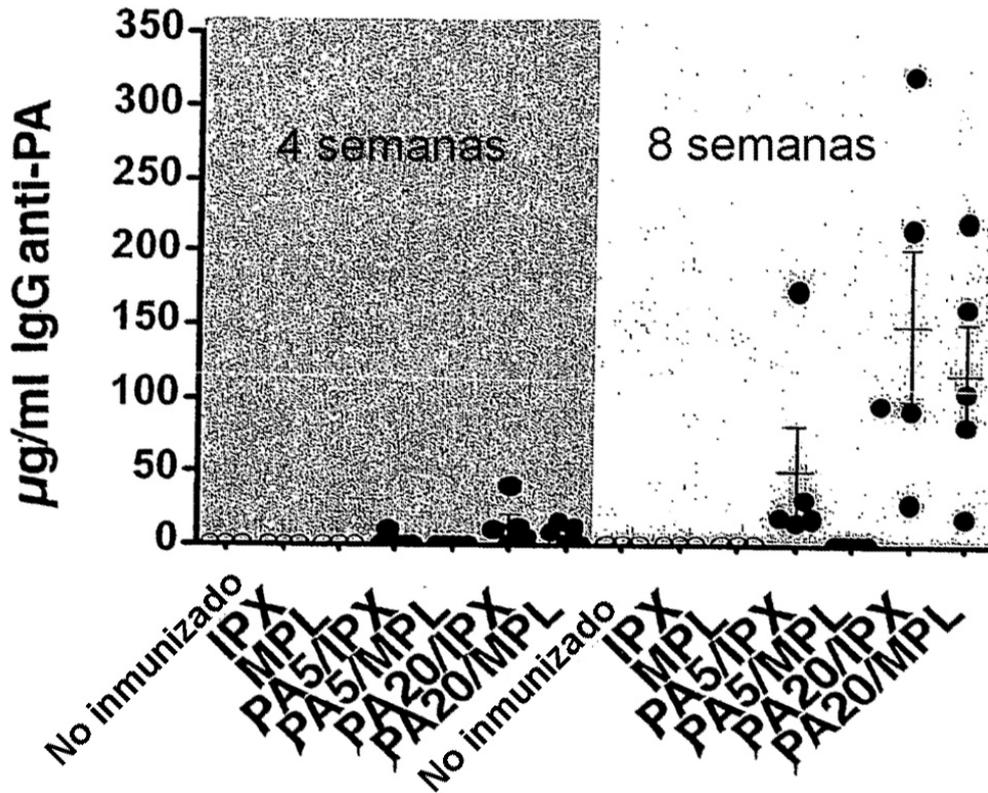


FIG. 2

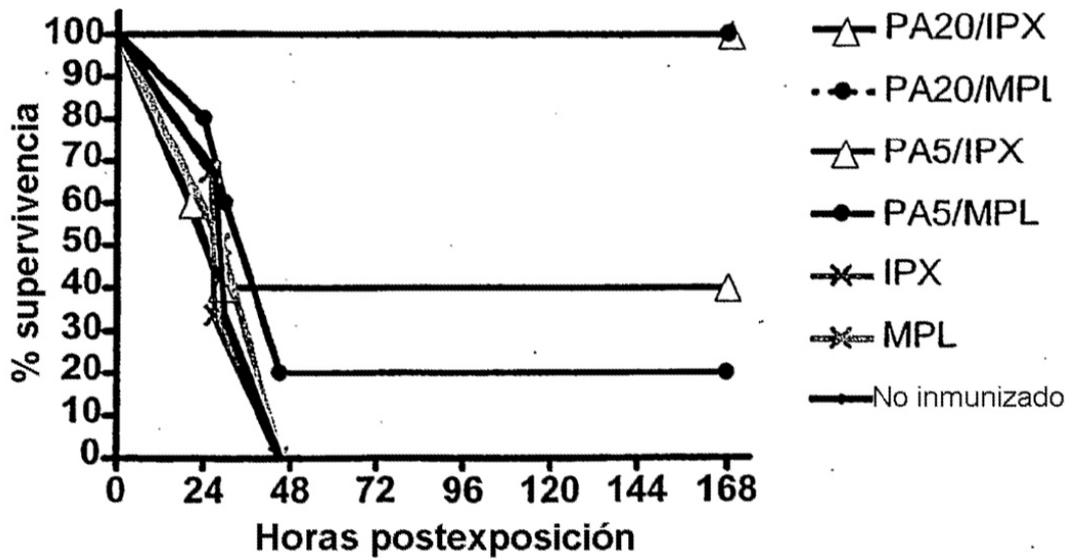


FIG. 3

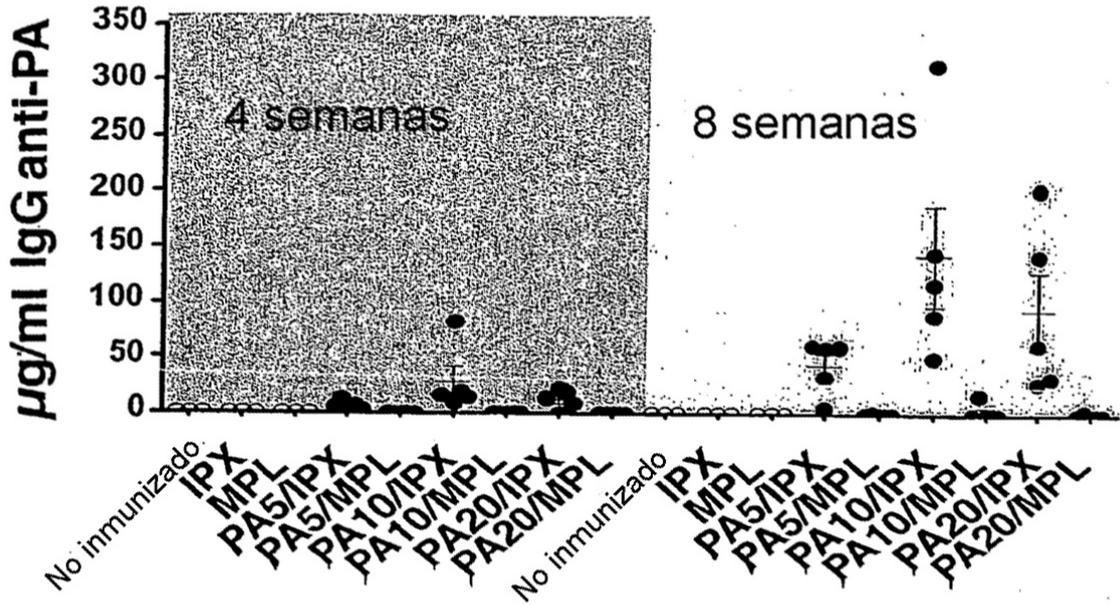


FIG. 4

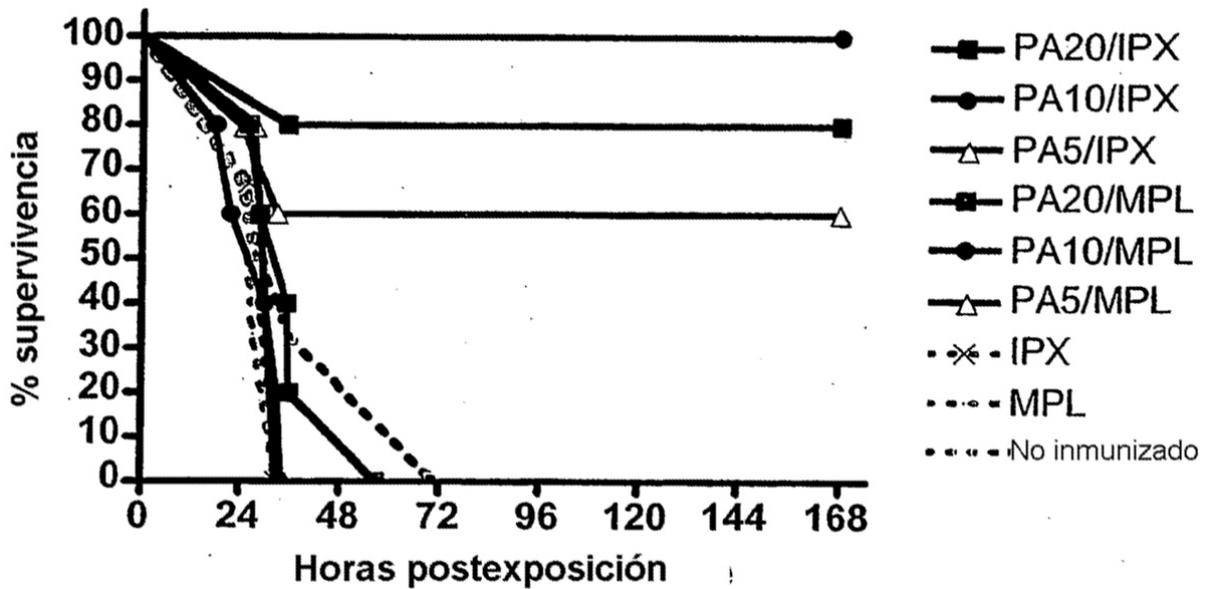


FIG. 5

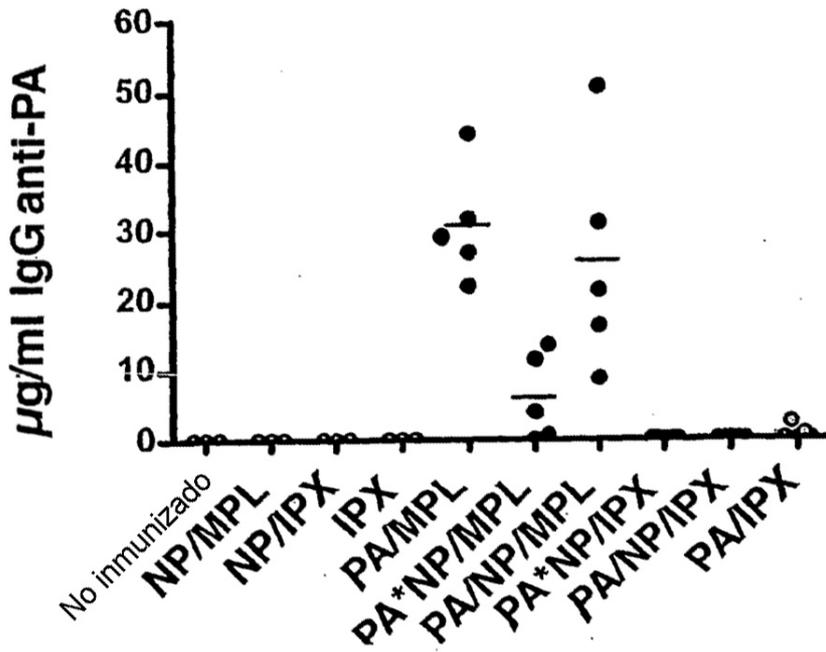


FIG. 6

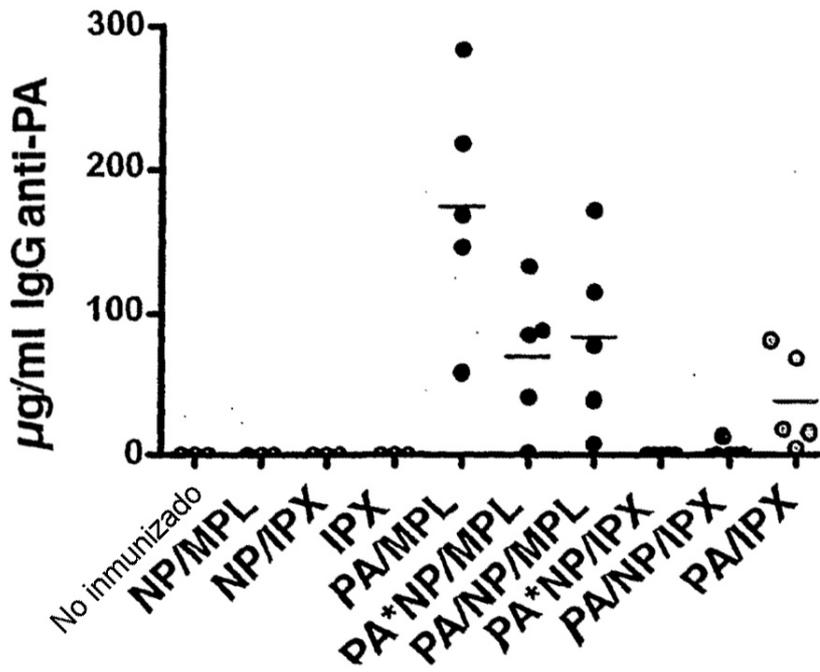


FIG. 7

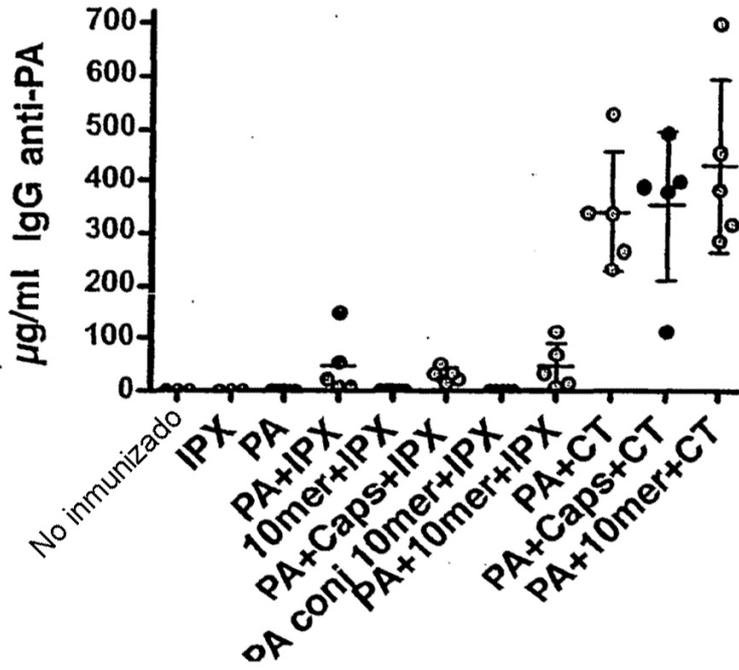


FIG. 8

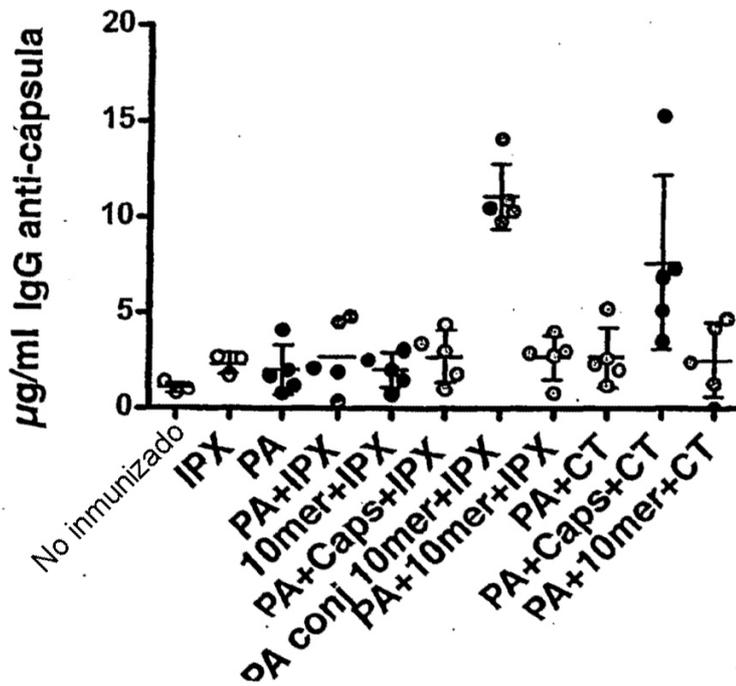


Figura 9

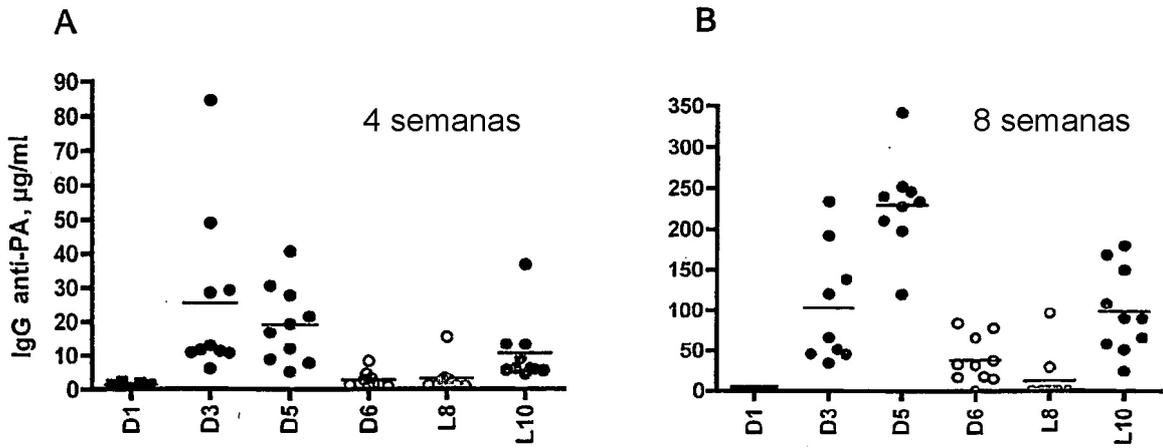


Figura 10

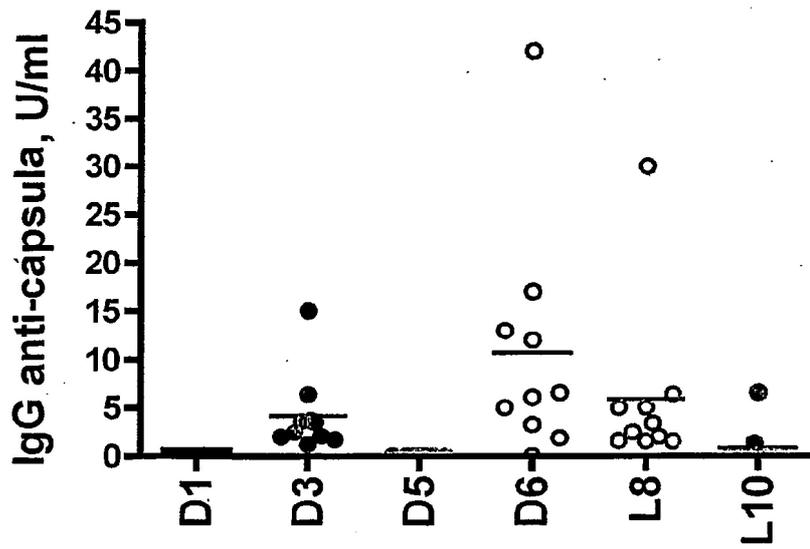


Figura 11

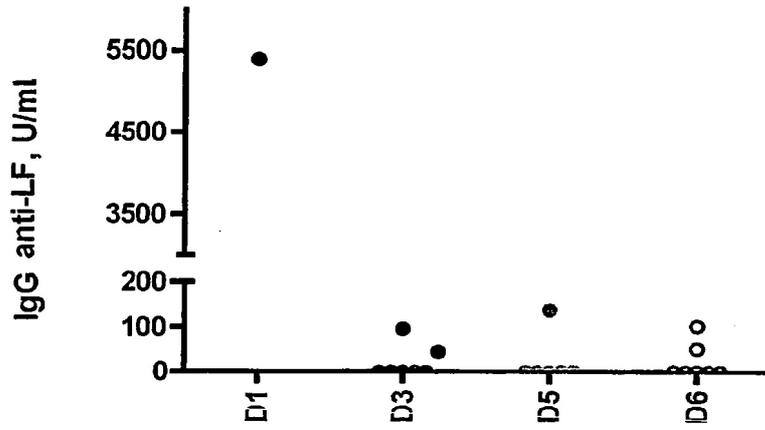


Figura 12

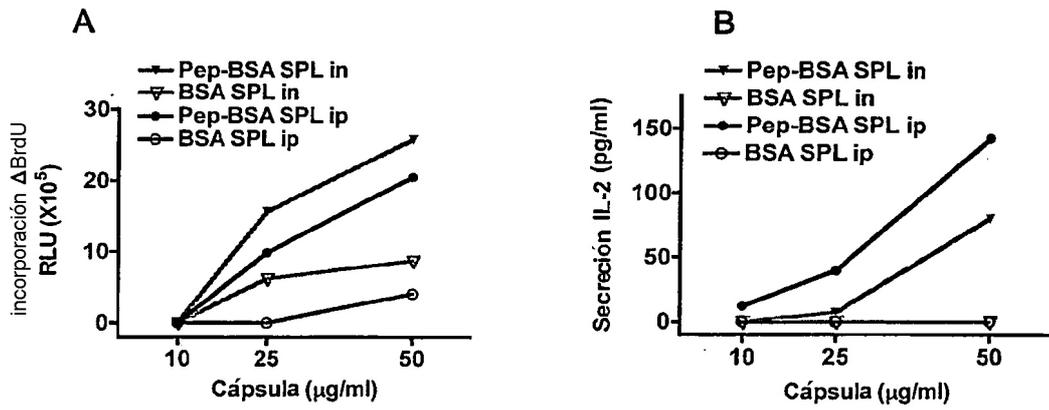


Figura 13

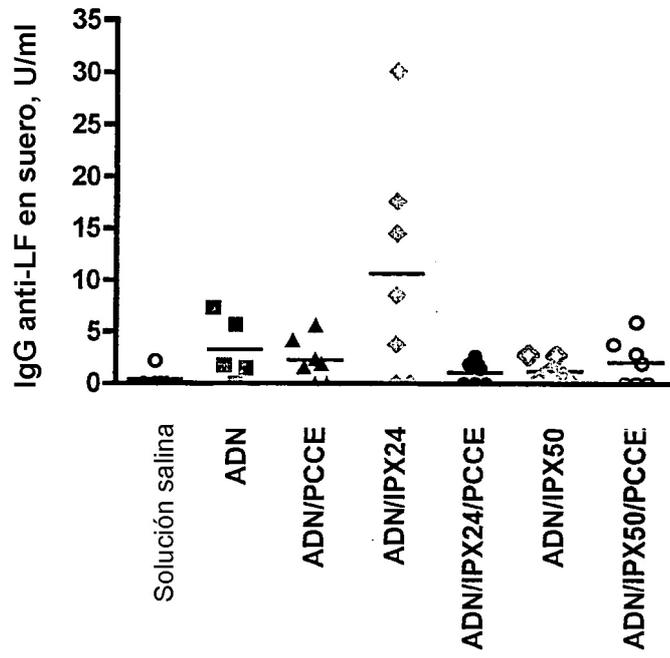


Figura 14

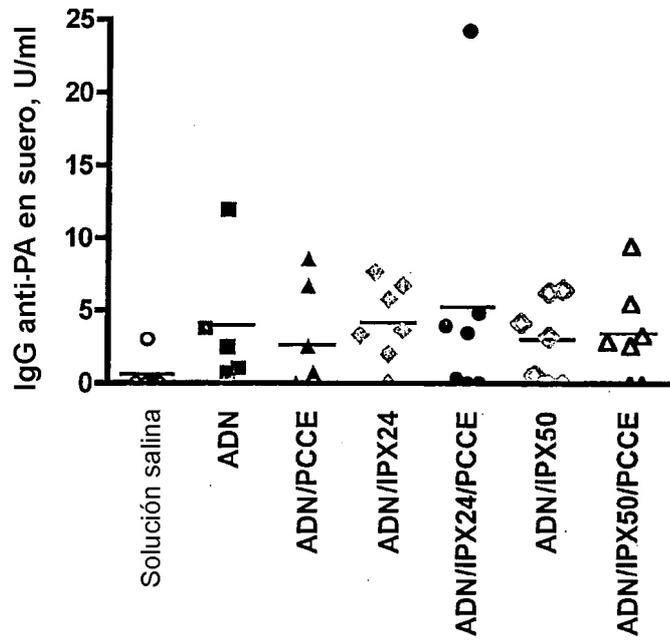


Figura 15

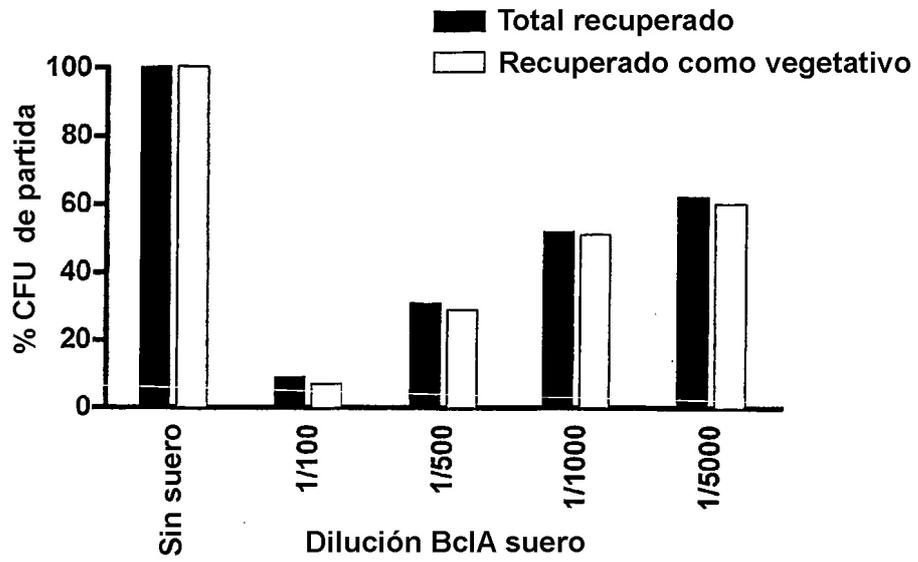


Figura 16

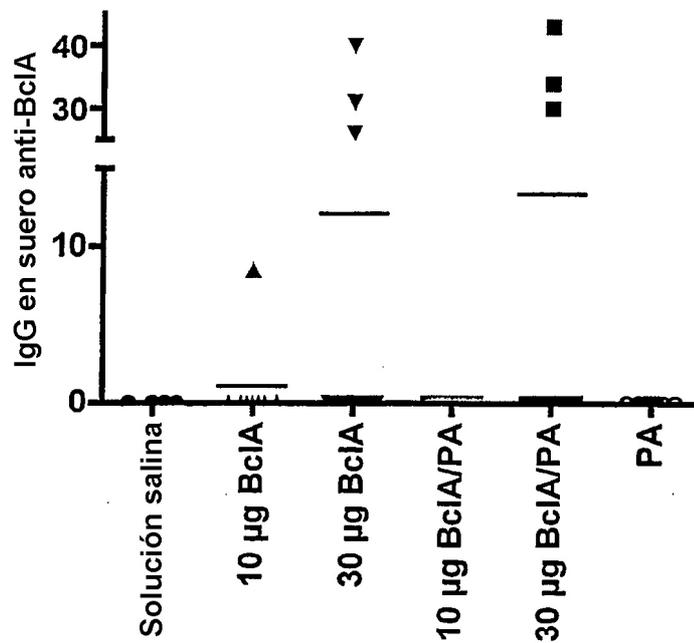


Figura 17

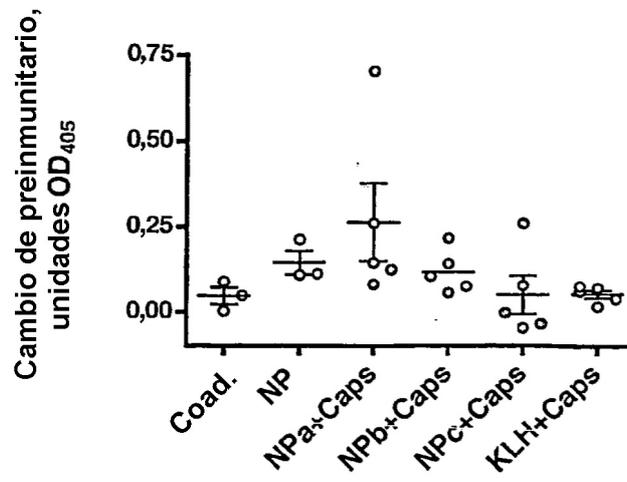


Figura 18

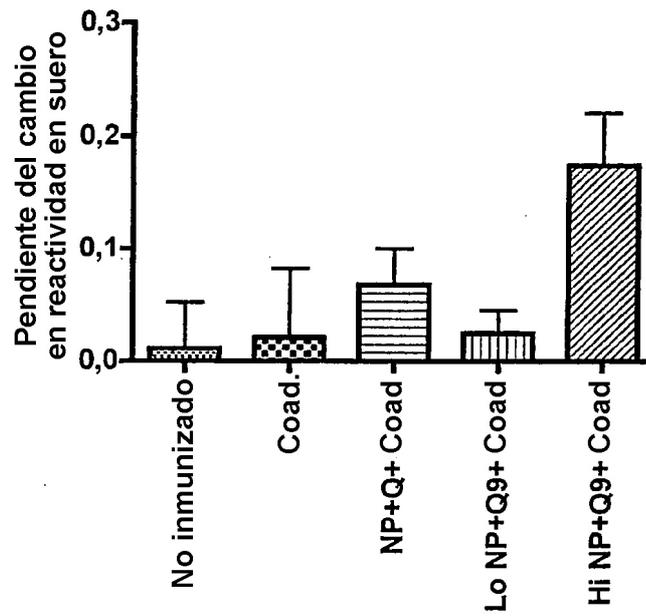


Figura 19

