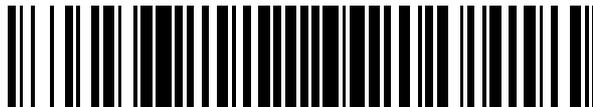


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 892**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2006 E 06775036 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 1942934**

54 Título: **Complejo inmunógeno formado por antígenos de vacuna encapsulados con sílice mesoporosa nanoestructurada**

30 Prioridad:

**12.09.2005 BR PI0503817**

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

**25.09.2013**

73 Titular/es:

**CRISTÁLIA PRODUTOS QUÍMICOS  
FARMACÉUTICOS LTDA. (50.0%)**

**Rodovia Itapira/lindoia, Km 14  
13970-000 Itapira, BR y  
FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO  
ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PACHECO, OGARI;  
SANT'ANNA, OSVALDO AUGUSTO;  
MERCURI, LUCILDES;  
MATOS, JIVALDO y  
FANTINI, MÁRCIA**

74 Agente/Representante:

**DE JUSTO BAILEY, Mario**

**ES 2 423 892 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**

Complejo inmunógeno formado por antígenos de vacuna encapsulados con sílice mesoporosa nanoestructurada

5 La presente invención se refiere al sector inmunológico.

La presente invención se refiere a un producto denominado "complejo inmunógeno", eficaz para aumentar la inmunogenicidad, constituido por antígenos de vacuna encapsulados con partículas sólidas de sílice mesoporosa nanoestructurada muy ordenada que actúa como coadyuvante, tal como se muestra en la presente invención. La encapsulación con sílices mesoporosos protege los antígenos de la degradación por macrófagos y amplía su exposición a linfocitos, promoviendo una respuesta inmunitaria mejorada eficaz para la inducción de la producción de anticuerpos, tanto en individuos de respuesta alta como en individuos de respuesta baja. El complejo inmunógeno de la presente invención puede acarrear beneficios para la actividad inmunológica general a antígenos de distintos tipos: péptidos biológicamente activos, toxinas, vacunas víricas y bacterianas.

15 La respuesta inmunitaria de seres humanos a antígenos de vacuna varía debido a factores particulares. Diversos individuos vacunados con el mismo antígeno, en las mismas condiciones, producen respuestas que varían en intensidad y en duración. Dicha variación es un factor determinante de la intensidad y la duración del efecto protector de las vacunas.

20 Después de la estimulación antigénica estandarizada, los individuos que responden produciendo valoraciones protectoras de anticuerpos se denominan individuos de respuesta alta y los que no producen valoraciones protectoras se denominan individuos de respuesta baja o incluso individuos que no responden.

25 El desarrollo de estrategias seguras y eficaces para mejorar la respuesta inmunitaria, bien en individuos de respuesta alta o bien en individuos de respuesta baja es del máximo interés. En el primer caso, mediante la producción de respuestas protectoras con cantidades reducidas de antígeno, o respuestas de larga duración sin una nueva exposición al antígeno. En el segundo caso, mediante la producción de una respuesta protectora con estímulos que, de otro modo, serían insuficientes.

30 Actualmente, este problema solo se ha solucionado parcialmente mediante el uso de coadyuvantes que se definen como materiales que amplían la respuesta inmunitaria específica del organismo a determinado antígeno [Edelman, R.; Tacket, C.O.; Adjuvants Intern. Ver. Immunol., 7 (1990) 51], modificando la forma con la que los epítopes (determinantes antigénicos) se presentan a las células del sistema inmunitario o aumentando la inmunogenicidad de los mismos. Otras características deseables para un coadyuvante son: mantener el periodo del estímulo, aumentar el tiempo de presentación del antígeno y retrasar el catabolismo del mismo.

35 Aparentemente, muchos coadyuvantes ejercen su actividad mediante acciones tóxicas contra los macrófagos. Existen también coadyuvantes que modulan la respuesta inmunitaria a determinado antígeno induciendo, por ejemplo, la expresión predominante de un isótopo de inmunoglobulina, por ejemplo, una IgG. [Hadjipetrou-Kourounakis, L.; Möller, E.; Scand. J. Immunol., 19 (1984) 219].

45 Los coadyuvantes autorizados y que se usan ampliamente en vacunas para seres humanos son los derivados de sales de aluminio, tales como hidróxido o fosfato de aluminio. Sin embargo, estos no inducen una respuesta inmunológica sustancialmente alta y de larga duración o cualitativamente selectiva con relación a la subclase deseada de anticuerpos IgG y a las citocinas implicadas.

50 Existen otros coadyuvantes usados en veterinaria tales como el coadyuvante incompleto de Freund [IFA] y el coadyuvante completo de Freund [CFA] que promueven la formación no deseada de nódulos, abscesos y granulomas en el sitio de administración. Otros coadyuvantes son: lípido A, microesferas y liposomas, ninguno de los cuales está destinado para uso en seres humanos.

55 Por lo tanto, el interés en el desarrollo de estrategias seguras y eficaces para mejorar la respuesta inmunitaria permanece presente, tanto para individuos de respuesta alta como para individuos de respuesta baja. De este modo, los avances en el sector de las ciencias de materiales está permitiendo la preparación de nuevos compuestos con propiedades mejoradas y una aplicación potencial en diversos sectores.

60 Los sólidos porosos inorgánicos presentan aplicaciones industriales importantes en procedimientos catalíticos y de separación. Estos materiales, debido a las propiedades estructurales y de superficie de los mismos, permiten el acceso de moléculas a sus nanoestructuras, aumentando de este modo la actividad catalítica y de absorción de las mismas.

65 Los materiales porosos usados actualmente pueden clasificarse en tres clases en base a su microestructura particular: soportes amorfos paracrystalinos, materiales con capas modificadas y tamices moleculares cristalinos. Las diferencias en microestructura y mesoestructura de estos materiales son importantes, tanto por su comportamiento absorbente y catalítico, como en las propiedades usadas para su caracterización, tales como: área superficial,

tamaño de poros y distribución de los mismos, la presencia o ausencia de patrones de difracción de rayos X (XRD) y los detalles de dichos patrones, y el aspecto de los materiales cuando se estudia su microestructura mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) y procedimientos de difracción de electrones.

- 5 Los materiales amorfos y paracristalinos representan una clase importante de sólidos inorgánicos porosos que se ha usado durante muchos años en aplicaciones industriales. Los ejemplos típicos de estos materiales son la sílice amorfa, usada habitualmente en formulación de catalizadores, y la alúmina paracristalina de transición, usada como soporte para catalizadores sólidos ácidos y catalizadores modificados de petróleo. El término amorfo se usa en este contexto para indicar un material que no presenta un orden amplio, aunque casi todos los materiales están
- 10 ordenados en una medida determinada, al menos a escala local. Un término alternativo que se usa para describir estos materiales es: "indiferente a los rayos X". La microestructura de sílice consiste en partículas de 10-25 nm de sílice amorfa densa, con una porosidad resultante de la presencia de espacios vacíos entre partículas. Debido a que no existe un orden amplio en estos materiales, el tamaño de poro tiende a estar distribuido dentro de un intervalo amplio. La falta de orden también se manifiesta en el patrón de difracción de rayos X (XRD), que habitualmente
- 15 aparece sin los picos característicos.

Los materiales paracristalinos, tales como alúmina de transición, han presentado una distribución del tamaño de poros amplia, pero bien definida a partir del patrón de difracción de rayos X, que habitualmente consiste en algunas bandas amplias. La microestructura de estos materiales consiste en regiones cristalinas pequeñas de fases de

20 alúmina condensadas y la porosidad de los materiales es consecuencia de espacios vacíos irregulares entre estas regiones. Considerando que en el caso de un material o de otro, no existe un orden amplio que controle el tamaño de los poros en el material, la variabilidad de dichos tamaños es típicamente muy alta. El tamaño de poro en estos materiales comprende una banda denominada mesoporos que varía de 1,3 a 20 nm.

25 A diferencia de estos sólidos, estructuralmente poco definidos, se encuentran los materiales cuya distribución de tamaños de poro es muy estrecha, ya que está controlada por la naturaleza cristalina de los materiales, repetida con precisión, denominada microestructura. Estos materiales se denomina "tamices moleculares" y los ejemplos más importantes son las zeolitas.

30 Dichos tamices moleculares, naturales o sintéticos, incluyen una amplia diversidad de silicatos cristalinos que contienen iones positivos.

En general, las sustancias porosas se dividen por el tamaño de poro, por ejemplo, las sustancias con un tamaño de poro inferior a 2 nm se clasifican como microporosas, entre 2 y 50 nm como sustancias mesoporosas y con más de

35 50 nm se clasifican como sustancias macroporosas.

Una serie de tamices moleculares, incluidos MCM-41 y MCM-48, se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.057.296 y 5.102.643. Estos tamices moleculares muestran una estructura en la que los mesoporos, uniformes en tamaño, están dispuestos regularmente. El MCM-41 tiene una estructura uniforme que muestra una disposición

40 hexagonal de mesoporos directos, como un panel, y tiene un área superficial de 1000 m<sup>2</sup>/g obtenida mediante el procedimiento BET.

Los tamices moleculares se han producido usando cationes inorgánicos u orgánicos como molde. Estos tamices moleculares mesoporosos se sintetizan mediante un mecanismo de cristal líquido que usa tensioactivos como molde y tienen la ventaja de que el tamaño de los poros puede ajustarse en el intervalo de 1,6 a 10 nm mediante el control

45 del tipo de tensioactivo o las condiciones de síntesis usadas durante el procedimiento de producción.

Los tamices moleculares denominados SBA-1, SBA-2 y SBA-3 se describieron en Science (1995) 268:1324. Sus canales están dispuestos regularmente, mientras que los átomos constituyentes muestran una disposición similar a la de la sílice amorfa. Los tamices moleculares mesoporosos tienen canales organizados de forma regular, más grandes que los existentes en zeolitas, capacitando de este modo su aplicación en la adsorción, el aislamiento o

50 reacciones de conversión catalítica de moléculas relativamente grandes.

La patente de EE.UU. nº 6.592.764 ha hallado una familia de sílices mesoporosas de alta calidad, estabilidad hidrotérmica y de tamaño de poros ultraextenso, mediante la síntesis con el uso de un copolímero de bloque anfífilico en medio ácido. Un miembro de la familia, la SBA-15, tiene una mesoestructura muy ordenada, hexagonal en dos dimensiones (p6mm) similar a un panel. También pueden formarse otras estructuras, como la cúbica, en forma de jaula, o la hexagonal tridimensional. Un procedimiento de calcinación a 500 °C proporciona estructuras porosas con un área superficial BET alta de 690 a 1040 m<sup>2</sup>/g, y volúmenes de poro superiores a 2,5 cm<sup>3</sup>/g,

60 distancias entre planos grandes d(100) de 7,45 a 45 nm, tamaño de poros de 4,6 a 50 nm y un espesor de la pared de sílice de 3,1 a 6,4 nm. La SBA-15 puede prepararse con un intervalo extenso de tamaño de poros y espesor de la pared del poro a baja temperatura (35 a 80 °C), usando una diversidad de copolímeros de bloque anfífilicos biodegradables y no tóxicos comercialmente disponibles, incluidos compuestos polioxialcalinos de tres bloques.

65 Las propiedades únicas de la SBA-15 hacen que sea un material atractivo para diversas aplicaciones, incluidas bioaplicaciones, por ejemplo fijación de especies biológicamente activas. Sin embargo, no se ha identificado ningún

documento que informe sobre la influencia de estos materiales sobre la respuesta inmunitaria; por el contrario, la literatura sugeriría su no exploración para estos fines.

Se han llevado ya a cabo experimentos con respecto a la influencia de sílice amorfa en la respuesta inmunitaria, específicamente en macrófagos; no obstante, en ese momento no implicaron el papel de la sílice como coadyuvante [Allison, A.C.; Harington, J.S.; Birbeck, M.; J. Exp. Med., 124 (1966) 141; Kampschmidt, R.F.; Worthington, M.L.; Mesecher, M.I.; J. Leukocyte Biol., 39 (1986) 123; Lotzova, E.; Cudkowicz, G.; J. Immunol., 113 (1974) 798; Lotzova, E.; Gallagher, M.T.; Trentin, J.J. Biomedicine, 22(5) 387 1975; Vogel, S.N.; English, K.E.; O'Brien, A.D.; Infect. Immun., 38 (1982) 681].

En otro experimento [Gennari, M.; Bolthillier, Y.; Ibanez, O.M.; Ferreira, V.C.A.; Mevel, J.C.; Reis, M.A.; Piatti, R.M.; Ribeiro, O.G.; Biozzi, G.; Ann. Inst. Pasteur Immunol., 138 (1987) 359.], se usaron ratones genéticamente modificados según la producción de anticuerpo alta o baja, y a los que se administraron las suspensiones de sílice coloidal durante 4 días consecutivos, antes de la inmunización con antígeno en partículas, es decir, eritrocitos heterólogos. Estos estudios mostraron que existe un aumento significativo en la producción de anticuerpos en animales de respuesta baja, y esta mejora estaría relacionada directamente con la acción de la sílice sobre macrófagos, que afecta a algunas de sus funciones, cambia la viabilidad de estas células y causa la reducción del catabolismo del antígeno, favoreciendo de este modo la presentación del antígeno a los linfocitos.

De este modo, estos efectos se analizaron comparando las respuestas de cepas de ratones que expresan características distintas con respecto a la funcionalidad de sus macrófagos. Se logró usando un modelo experimental que selecciona las cepas de ratones con los fenotipos de respuesta máxima y mínima de anticuerpos. Dichas cepas se obtuvieron después de cruces entre individuos con fenotipos extremos durante generaciones consecutivas. Después de aproximadamente 15 generaciones, los animales que presentaban fenotipos para el nivel de anticuerpos lograron la homocigosis de los alelos relevantes que controlan la respuesta contra determinados antígenos. Con este modelo fue posible obtener las líneas de individuos de respuesta alta [H] o baja [L] a anticuerpos de selección IVA [Cabrera, W.H.; Ibanez, O.M.; Oliveira, S.L.; Sant'Anna, O.A.; Siqueira, M.; Mouton, D.; Biozzi, G.; Immunogenetics, 16 (1982) 583]. Las diferencias de respuestas en estos animales están relacionadas con la actividad catabólica de macrófagos más elevada (línea de ratones L<sub>IVA</sub>) o más baja (línea de ratones H<sub>IVA</sub>), que perjudican o favorecen, respectivamente, la presentación eficaz de antígenos.

Los estudios mencionados anteriormente mostraron que cuando los ratones L<sub>IVA</sub> se tratan previamente con suspensiones de sílice amorfa y después se inmunizan con un antígeno, tenían una producción de anticuerpos aumentada, que se aproximaba a las respuestas de ratones H<sub>IVA</sub>. Por otra parte, [Biozzi, G.; Mouton, D.; Sant'Anna, O.A.; Passos, H.C.; Gennari, M.; Reis, M.H.; Ferreira, V.C.A.; Heumann, A.M.; Bouthillier, Y.; Ibanez, O.M.; Stiffel, C.; Siqueira, M.; Current Topics In Microbiology Immunology, 85 (1979) 31.], en otro modelo experimental similar, en el que se usaron ratones H<sub>III</sub> y L<sub>III</sub> obtenidos mediante una selección genética independiente III, no se observó la modulación de la producción de anticuerpos de los ratones de respuesta baja después del tratamiento con la misma suspensión de sílice amorfa. Debe subrayarse que en estos animales H<sub>III</sub> y L<sub>III</sub> los niveles altos o bajos de producción de anticuerpos no se correlacionan con la funcionalidad de sus macrófagos, sino con la potencialidad de sus linfocitos.

Estos estudios fueron fundamentales para ayudar a entender el papel *in vivo* de macrófagos en procesos de inmunización, además de mostrar que para un coadyuvante eficaz usado en la inducción de inmunidad se debería proteger el antígeno administrado frente a la actividad altamente catabólica de macrófagos y presentar adecuadamente los determinantes antigénicos a linfocitos.

En campañas de vacunación amplias, se adoptan generalmente productos y procedimientos de inmunización uniformes para un grupo grande y heterogéneo de individuos. En estas condiciones puede observarse la producción de valoraciones viables de anticuerpos, algunas no protectoras. Ello impide la inmunización eficaz de parte de los individuos.

Dicho factor se explica mediante los mecanismos mostrados en los experimentos mencionados anteriormente y se origina a partir de la variabilidad fenotípica de los individuos de la misma especie, lo que puede interpretarse mediante la forma eficaz o no de presentación del epítopo a los linfocitos.

Por ejemplo, individuos con actividad efectora de linfocitos que podría clasificarse de normal a muy alta, o actividad de macrófagos de reducida a normal, tienen una tendencia a reaccionar más rápidamente, con respecto a la producción de anticuerpos, debido a que la probabilidad de que el antígeno sea identificado más eficazmente por los linfocitos es grande. Estos serían individuos "de respuesta alta" en una población natural.

Por el contrario, los individuos que presentan una actividad de linfocitos de normal a reducida y una actividad de macrófagos muy alta tienen tendencia a catabolizar más rápidamente el antígeno administrado. Esto conduce a una exposición más reducida del antígeno a linfocitos y a una respuesta inmunitaria no eficaz. Estos serían individuos "de respuesta baja" en una población natural. Esta situación favorece una selección natural de patógenos más resistentes.

5 Es necesario desarrollar vacunas más eficaces que favorezcan y promuevan la producción de valoraciones de anticuerpos protectoras, incluso en individuos de respuesta baja a las formulaciones de vacuna actuales. Por lo tanto, es importante que este comportamiento celular diferenciado deba tenerse en cuenta en la selección del coadyuvante, buscando minimizar la influencia de los factores diferenciadores.

La aplicación de este concepto no existe todavía, y echamos en falta productos y/ vacunas producidas según el mismo.

10 Un objetivo de la presente invención es mostrar que los antígenos incorporados a, o encapsulados con, sílice mesoporosa nanoestructurada forman un complejo inmunógeno muy eficaz que es eficaz en la inducción de una respuesta inmunitaria y que dicha sílice mesoporosa nanoestructurada no afecta a la viabilidad y capacidad fagocítica de macrófagos en cultivo.

15 La presente invención se refiere a un complejo inmunógeno nuevo constituido por al menos un antígeno, encapsulado con sílice mesoporosa nanoestructurada muy ordenada que actúa como coadyuvante mejorando la inducción de inmunidad y la producción de anticuerpos a antígenos, lo que implica distintas naturalezas, estructuras y complejidades.

20 El complejo inmunógeno según la presente invención se refiere al producto resultante de la combinación de un antígeno y partículas de sílice mesoporosa nanoestructurada en proporciones específicas.

25 El complejo inmunógeno de la presente invención permite la inmunización eficaz de los individuos de respuesta baja a productos y procedimientos que se usan actualmente. Se produce a partir de una presentación más segura y eficaz del antígeno a los linfocitos.

30 El complejo inmunógeno de la presente invención está constituido por al menos un antígeno que está incorporado a, o encapsulado con, las partículas de sílice mesoporosa nanoestructurada. Además de actuar de forma eficaz como coadyuvante de inmunización, las partículas de sílice también sirven como soporte o matriz para especies biológicas, en este caso, inmunógenos.

Los antígenos que pueden usarse en la formación del complejo inmunógeno de la presente invención incluyen péptidos biológicamente activos, toxinas y vacunas víricas y bacterianas.

35 Aunque puede usarse una amplia serie de sílices mesoporosas nanoestructuradas como coadyuvante en la preparación del complejo inmunógeno de la presente invención, preferentemente se usa la sílice denominada SBA-15.

40 La sílice mesoporosa nanoestructurada muy ordenada, SBA-15, está compuesta por partículas de óxido de silicio con cavidades regulares y uniformes en tamaño de 2 a 50 nanómetros. El antígeno se introduce en estas nanocavidades para su encapsulación. Al mismo tiempo, este protege la degradación por parte de macrófagos y lo conduce a una presentación gradual y más eficaz a los linfocitos, aumentando la eficacia del procedimiento inmunitario.

45 En artículos científicos se describen procedimientos de preparación de sílice SBA-15 y materiales mesoporosos similares (Zhao y col., Science (1998) 279:548; J. Am. Chem. Soc. (1998) 120:6024; Matos y col., Chem. Mater. (2001) 13:1726), y en la patente US 6.592.764.

50 El objetivo de la presente invención también es presentar un proceso de incorporación o encapsulación del antígeno en la sílice mesoporosa nanoestructurada, para la preparación del complejo inmunógeno.

55 La encapsulación de los antígenos en la sílice tiene lugar, en general, por medio de un procedimiento que comprende una mezcla de una solución previamente preparada que contiene el antígeno con una suspensión de sílice, ambos diluidos en solución fisiológica con un pH de 7,4. La proporción en peso del antígeno con respecto a la sílice puede variar de 1:5 a 1:50, siendo preferentemente 1:25. Esta proporción preferente puede leerse como 1 µg de antígeno para 25 µg de sílice. Las preparaciones se llevan a cabo preferentemente a temperatura ambiente y se mantienen con agitación ocasional hasta aproximadamente dos horas antes del tiempo de inoculación.

60 Otro objetivo de la presente invención es presentar el uso del complejo inmunógeno en la preparación de composiciones de vacuna para uso preventivo.

Las composiciones farmacéuticas, que contienen el complejo inmunógeno de la presente invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, son apropiadas para uso médico y veterinario.

65 Una ventaja de la presente invención consiste en el uso del complejo inmunógeno para promover la inducción de una respuesta inmunitaria idéntica tanto en individuos de respuesta alta con en individuos de respuesta baja con

cantidades más reducidas de antígenos. Este aspecto tiene una importancia relevante económica y social para la salud pública.

5 El antígeno es el material bruto con costes más altos para la producción de vacunas. La reducción de la cantidad necesaria para la inducción de respuesta inmunitaria eficaz puede conducir a una reducción sustancial en costes de producción de muchas vacunas.

10 Por otra parte, la producción de cantidades más grandes de dosis con la misma cantidad de antígeno tiene implicaciones que sobrepasan simples aspectos económicos. Existen antígenos cuya velocidad de producción está limitada incluso en ausencia de factores limitantes económicos. Durante epidemias, la optimización y la maximización del potencial de inmunización de cantidades más reducidas de antígenos puede ser esencial para salvar millones de vidas.

15 Otro aspecto muy importante de la presente invención consiste en la ampliación del periodo de estímulos, mediante el aumento del tiempo de presentación del antígeno. Esto tiene como consecuencia la inducción de una memoria inmunológica más eficaz, garantizando la protección con un número más reducido de dosis. Varias vacunas necesitan la administración de 3 o más dosis y refuerzos periódicos para inducir la protección eficaz. La presentación mantenida del antígeno puede causar una reducción en el número de revacunaciones en algunos casos.

20 Esta posibilidad tiene un gran impacto en la salud pública, ya que existe una adhesión reducida de muchos padres a programas de vacunación regulares, vacunando a sus hijos principalmente durante campañas amplias publicadas por los medios. La posibilidad de inducir inmunidad protectora con un número más reducido de dosis minimizaría el problema de falta de adhesión, aprovechando mejor las campañas e inmunizando eficazmente millones de niños, sin necesidad de que vuelvan.

#### Descripción de figuras

30 Figura 1. Difracción de rayos X de ángulo bajo de sílice SBA-15 (NC) (calcinada natural) y SBA-15 (GC) (calcinada triturada).

Figura 2. Isotherma de adsorción de nitrógeno a 77 K y la distribución de tamaño de poro (PSD) correspondiente de sílice SBA-15 calcinada.

35 Figura 3. Imágenes de microscopía de transmisión electrónica (TEM) de sílice SBA-15 calcinada.

Figura 4. Determinación de anticuerpos de ratón del isotipo de IgG anti-intimina 1 $\beta$  de *Escherichia coli*, cuando se compara la propiedad de coadyuvante de SBA-15 con otros coadyuvantes después de administración por vía oral, intraperitoneal y subcutánea.

40 Los siguientes ejemplos se describen como ilustración y no se pretende usarlos para limitar el alcance de la presente invención.

#### 45 Ejemplo 1 - Preparación y caracterización del componente de sílice SBA-15 del complejo inmunógeno como coadyuvante de inmunización.

En un reactor, se dispersaron 4 g de copolímero de tres bloques Pluronic P123, con agitación magnética a 40 °C, en 28 g de agua desionizada y 122 g de solución 2 M de HCl. Después, se añaden 8,6 g de TEOS para obtener una solución homogénea y se agita mecánica y magnéticamente a 40 °C. Aproximadamente 15 minutos después de la adición de TEOS puede observarse la formación de un precipitado de tipo gelatinoso. El gel se mantiene con agitación a 40 °C durante 24 horas y, después, se transfiere a un autoclave envuelto con teflón y se dispone en un esterilizador a una temperatura controlada de 100 °C durante 2 días. Después, el producto sólido se retira por filtración, se lava con agua desionizada y se seca al aire a temperatura ambiente. Finalmente, la muestra sintetizada se calcina bajo un flujo de N<sub>2</sub> seco a un caudal de 100 mlmin<sup>-1</sup> a 540 °C, usando una velocidad de calentamiento de 1 °Cmin<sup>-1</sup>. Después de calentar durante 5 horas a 540 °C, el flujo de gas nitrógeno se cambia por aire, sin interrupción del procedimiento, y se continúa con la calcinación durante 3 horas más.

60 La estructura bidimensional ordenada de SBA-15, en forma de canales en simetría hexagonal, se evaluó mediante difracción de rayos X de ángulo bajo (SAXRD) y medidas de adsorción de N<sub>2</sub> (para definir las propiedades estructurales y de superficie, con respecto al contenido de polímero presente en la preparación del material) y mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM). Los resultados de la caracterización del material se resumen en la tabla 1 y se ilustran mediante las figuras 1, 2 y 3 de la presente invención. Dichas características son apropiadas para considerar el material como una matriz excelente para diversos huéspedes moleculares.

Tabla 1 - Resultados de la caracterización de SBA-15.

Parámetro	Resultado
Difracción de rayos X de ángulo bajo (SAXRD)	12,7 nm (127 Å)
Área superficial específica (a)	900 m <sup>2</sup> /g
Volumen total de poros	1,39 cm <sup>3</sup> /g
Tamaño máximo de poro (w)*	11,6 nm (116 Å)
Espesor de la pared de sílice (b)**	1,1 nm (11 Å)

\* Obtenido mediante la distribución del tamaño de poro (PSD); \*\* b = a-w

5 La figura 1 muestra el resultado de la difracción de rayos X de ángulo bajo (SAXRD) obtenido para la muestra de SBA-15 de tipo hexagonal calcinado, en estado natural (NC) y triturado (GC). Los resultados evidencian que la estructura de los materiales mesoporosos ordenados (picos de difracción) no cambia después de triturar los polvos en el mortero de ágata. El análisis y la indexación de los picos se realizan después de eliminar el fondo extendido no estructurado.

10 La figura 2 muestra la isoterma de adsorción de nitrógeno para sílice SBA-15 calcinada, que presentaba un grado alto de ordenación, como puede deducirse del declive de la isoterma de adsorción en la etapa de condensación capilar.

15 La figura 3 muestra la microscopía de transmisión electrónica (TEM), que se usó para caracterizar el orden estructural de sílice SBA-15 calcinada, en la que puede observarse el orden de canales paralelos, particular de dicho tipo de material.

#### Ejemplo 2 - Determinación del porcentaje de adsorción del antígeno modelo mediante SBA-15.

20 Usando albúmina de suero bovino [BSA] como antígeno, se prepararon mezclas con SBA-15 en diferentes proporciones y, después, se realizó la determinación del porcentaje de adsorción de antígeno mediante la sílice para cada proporción. Según los resultados presentados en la tabla 2, la proporción de 1 µg de BSA para 25 µg de SBA-15 mostró el mayor porcentaje de adsorción de BSA mediante SBA-15.

25 Tabla 2 - Determinación de la mejor proporción para la adsorción de albúmina de suero bovino [66 kDa] en Sílice SBA-15.

BSA: SBA-15	% de adsorción
1:5	27,5
1:10	65,5
1:25	91

30 No obstante, es importante mencionar que debido a la diversidad de antígenos que pueden componer el complejo inmunogénico de la presente invención, la optimización de la proporción entre el antígeno y SBA-15 debería reconsiderarse en función de la complejidad del antígeno.

#### Ejemplo 3 - Demostración de efectos de SBA-15 en macrófagos.

35 Los experimentos *in vitro* mostraron que la sílice nanoestructurada SBA-15 no afecta a la viabilidad ni interfiere en la capacidad fagocítica de macrófagos que se origina en la médula, mantenida en cultivo durante un periodo de hasta 30 horas. Por el contrario, indica que potencia la fagocitosis mediante estas células. La tabla 3 muestra que el tratamiento o no con SBA-15 no interfiere sustancialmente en el proceso de fagocitosis de células de levadura en cepas: seleccionadas genéticamente para una respuesta baja [L<sub>IVA</sub>], genéticamente heterogéneas [SWISS] o isogénicas [BALB/c].

40

Tabla 3 - Experimentos *in vitro* con macrófagos de diferentes cepas de ratones.

CEPA L <sub>IVA</sub>	INFECTADA Presencia de levaduras	Nº DE LEVADURAS
20 µg de SBA-15 + levadura 2 h	68,2 %	496
20 µg de SBA-15 + levadura 17 h	61,8 %	350
10 µg de SBA-15 + levadura 2 h	78,9 %	474
10 µg de SBA-15 + levadura 17 h	65,2 %	326
2,5 µg de SBA-15 + levadura 2 h	79,5 %	503
2,5 µg de SBA-15 + levadura 17 h	67,8 %	379
Levadura 2 h	53,9 %	217
Levadura 6 h	59,2 %	230
Levadura 17 h	82,8 %	472
Levadura 21 h	59,9 %	224
Levadura 30 h	50,2 %	164
CEPA SWISS	INFECTADA Presencia de levaduras	Nº DE LEVADURAS
20 µg de SBA-15 + levadura 2 h	84,9 %	591
10 µg de SBA-15 + levadura 2 h	81,7 %	528
10 µg de SBA-15 + levadura 17 h	70,8 %	325
2,5 µg de SBA-15 + levadura 2 h	81,9 %	468
2,5 µg de SBA-15 + levadura 17 h	74,7 %	448
Levadura 2 h	78,2 %	479
Levadura 6 h	73,3 %	437
Levadura 17 h	54,1 %	284
Levadura 21 h	56,2 %	218
Levadura 30 h	53,9 %	195
CEPA BALB/c	INFECTADA Presencia de levaduras	Nº DE LEVADURAS
Levadura 2 h	82 %	622
Levadura 6 h	76,8 %	438
Levadura 21 h	68,5 %	424
Levadura 30 h	51,5 %	209

**Ejemplo 4 - Efecto de coadyuvante del complejo inmunógeno (antígeno:SBA-15) en anticuerpos *Intβ* y *Micrurus ibiboca* antiveneno en comparación con los coadyuvantes usados regularmente en cepas de ratones.**

Se analizaron grupos de 4-5 ratones seleccionados genéticamente de una producción alta de anticuerpos [línea H<sub>III</sub>], o de una respuesta baja [línea L<sub>IVA</sub>], y ratones de línea isogénica [animales genéticamente idénticos] BALB/c en distintos experimentos. El efecto potencial de SBA-15 se evaluó con la medición y la comparación de respuesta a la proteína recombinante β-intimina [*Int1β*] de 16,5 kDa de la bacteria *Escherichia coli*, adsorbida en SBA-15 [1:10 *Int1β*:SBA-15] o mezclada con coadyuvante incompleto de Freund (IFA). También se evaluó la respuesta a la formación de anticuerpos para el veneno completo de la familia de serpientes Elapidae, género *Micrurus ibiboboca*, compuesto por al menos 20 proteínas con una variación de peso molecular de 84 a 7 kDa, adsorbido en SBA-15 [1:10 *Micru*:SBA-15], en comparación con la respuesta a este veneno mezclado con IFA. Todos estos experimentos se llevaron a cabo siguiendo inmunizaciones por vía subcutánea. Los datos presentados en las tablas 4 y 5 [media ± desviación típica (log<sub>2</sub>)] confirman que SBA-15 es tan eficaz como IFA, promoviendo valoraciones de anticuerpo altas y siendo eficaz en la inducción de memoria inmunológica.

Tabla 4 - Valoración anti-*Int1β* [ $\log_2$ ] 15 días después de la inmunización.

Cepa de ratones	SBA-15		IFA	
	N	$\bar{x} \pm \sigma$	n	$\bar{x} \pm \sigma$
L <sub>IVA</sub>	4	11,3 ± 0,5	4	4,5 ± 0,5
H <sub>111</sub>	4	11,3 ± 0,4	3	13,3 ± 0,5
BALB/c	4	6,2 ± 3,2	5	9,8 ± 2,3

Tabla 5 - Valoración anti-*Micrurus* [ $\log_2$ ] 14 días después de la inmunización.

Cepa de ratones	SBA-15		IFA	
	n	$\bar{x} \pm \sigma$	n	$\bar{x} \pm \sigma$
L <sub>IVA</sub>	4	8,1 ± 0,5	3	5,2 ± 0,3
BALB/c	4	9,2 ± 1,3	4	6,4 ± 0,8

5 Además, la SBA-15, al contrario que lo que ocurre después de la administración de IFA, no conduce a la formación de un granuloma evidente y la respuesta inflamatoria local es reducida y cuando se mide a 24-48 horas después de la inoculación del inmunógeno a SBA-15 por vía subcutánea presenta niveles muy reducidos de monocitos y de polimorfismo nuclear.

10 No hay ningún cambio evidente en el comportamiento y la vitalidad de ratones que recibieron SBA-15 con respecto a los animales de control y, después de un seguimiento durante 11 meses, no se observó ningún cambio morfológico en animales tratados.

15 **Ejemplo 5 - Efecto de coadyuvante del complejo inmunógeno (antígeno:SBA-15) en anticuerpos anti-*Intβ* en función del tiempo en comparación con los coadyuvantes que se usan normalmente.**

20 En otra serie de ensayos, se inmunizaron ratones BALB/c con *Int1β* (de *Escherichia coli*) en SBA-15, Al(OH)<sub>3</sub> por vía oral, o *Int1β* en SBA-15, Al(OH)<sub>3</sub> y IFA por vía subcutánea e intraperitoneal. Se realizó un seguimiento de las respuestas anti-*Int1β* durante un periodo largo. La figura 4 presenta las respuestas a la proteína Intimin 1β de *Escherichia coli* según las distintas vías de inmunización. Se realizó un seguimiento de hasta 199 días [d] durante las respuestas primarias [PR] de las medias y desviaciones típicas de cepas isogénicas de ratones BALB/c inmunizados con los coadyuvantes conocidos Al(OH)<sub>3</sub>, coadyuvante incompleto de Freund (IFA) y la sílice nanoestructurada SBA-15 original. Puede observarse que los niveles de anticuerpos permanecieron altos durante

25 todo el periodo de análisis, especialmente en el grupo que recibió el antígeno en SBA-15. Además, los resultados muestran claramente que SBA-15 es un vehículo no inmunógeno, no tóxico y eficaz que promueve tanto una respuesta alta a anticuerpos como una memoria inmunológica eficaz.

30 Las sílices mesoporosas nanoestructuradas muy ordenadas, ilustradas en la presente invención por la sílice SBA-15, proporcionan sistemas prometedores para preparaciones o composiciones de vacuna.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Complejo inmunógeno para la inducción de inmunidad, caracterizado porque comprende partículas de sílice mesoporosa nanoestructurada muy ordenada que tiene cavidades regulares y uniformes de un tamaño de poro de entre 2 y 50 nm y al menos un antígeno, estando el antígeno incorporado a, o encapsulado con, las partículas de la sílice mesoporosa nanoestructurada, actuando la sílice mesoporosa como coadyuvante de inmunización.
- 10 2. Complejo inmunógeno según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en proteínas, péptidos biológicamente activos, toxinas y vacunas víricas o bacterianas.
3. Complejo inmunógeno según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la sílice mesoporosa nanoestructurada muy ordenada es una sílice mesoporosa SBA-15.
- 15 4. Complejo inmunógeno según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el antígeno y el coadyuvante se usan en una proporción en peso de 1:5 a 1:50.
5. Complejo inmunógeno según la reivindicación 4, caracterizado por el hecho de que el antígeno y el coadyuvante se usan en una proporción en peso de 1:25.
- 20 6. Uso de un complejo inmunógeno según la reivindicación 1 para la producción de composiciones farmacéuticas de vacuna para permitir la presentación del antígeno que lo compone a los linfocitos de un modo seguro, gradual y mantenido que conduzca a una memoria inmunológica más eficaz.
- 25 7. Uso de un complejo inmunógeno según la reivindicación 1 para la producción de composiciones farmacéuticas de vacuna para aumentar la inmunogenicidad del antígeno que lo compone.
8. Uso de un complejo inmunógeno según la reivindicación 1 para la producción de composiciones farmacéuticas de vacuna para asegurar la protección inmunológica con cantidades más reducidas de antígenos y/o menos repeticiones de las dosis de vacuna.
- 30 9. Uso de un complejo inmunógeno según la reivindicación 1 para la producción de composiciones farmacéuticas de vacuna para la inducción eficaz de inmunidad en individuos con respuesta elevada y baja de un modo homogéneo.
- 35 10. Uso de un complejo inmunógeno según la reivindicación 1 para la producción de composiciones farmacéuticas de vacuna para inmunizaciones y/o vacunaciones en medicina y veterinaria.
11. Composición farmacéutica de vacuna, caracterizada por contener un complejo inmunógeno según la reivindicación 1 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

FIGURA 1

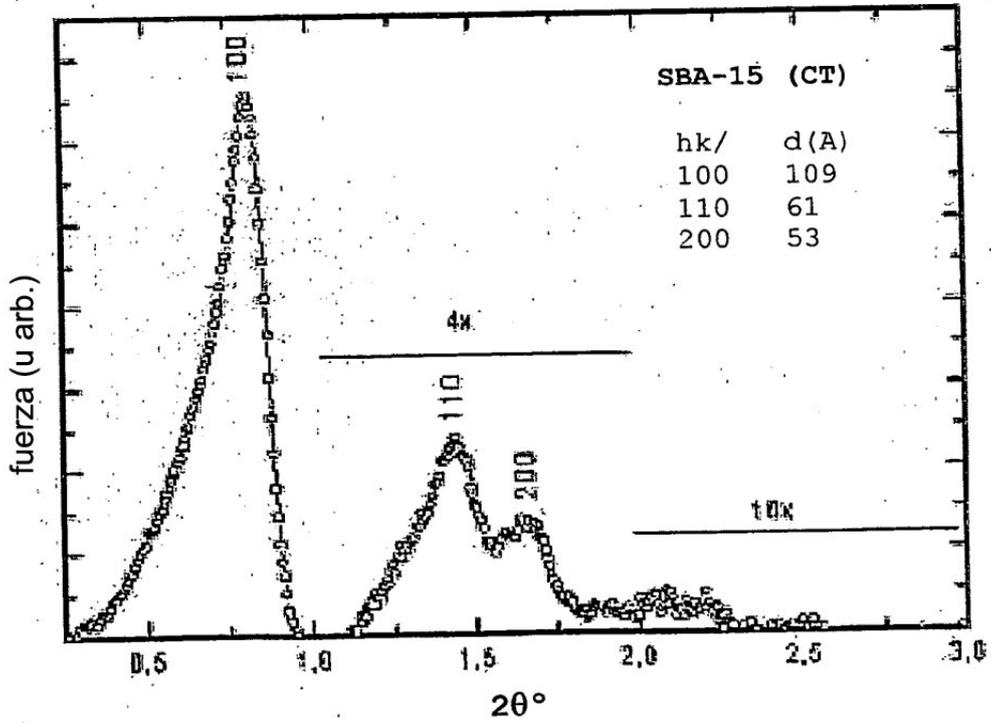
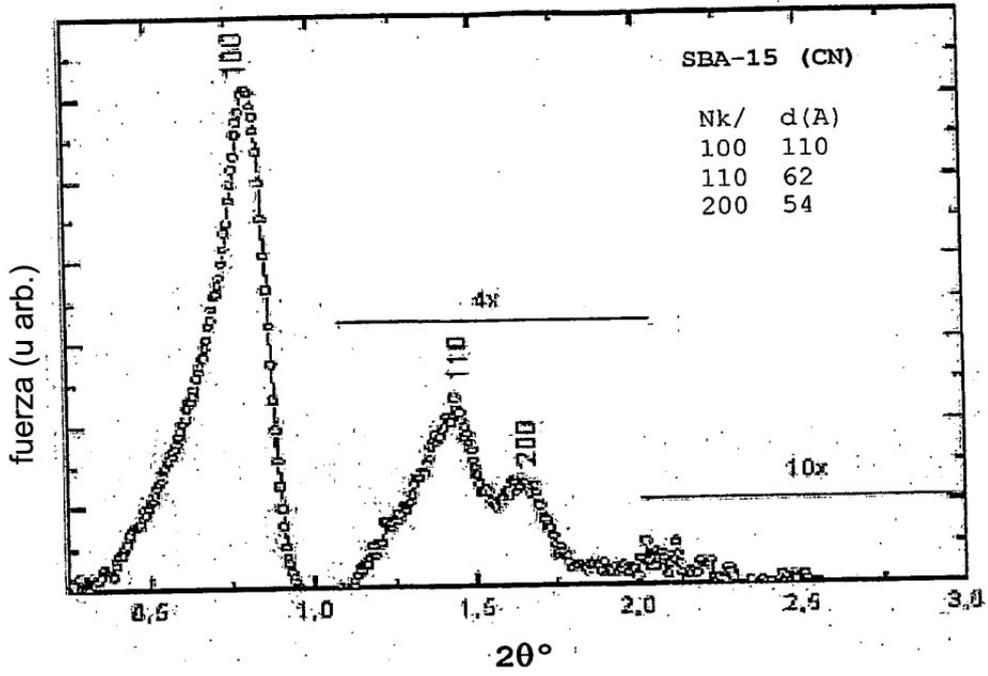


FIGURA 2

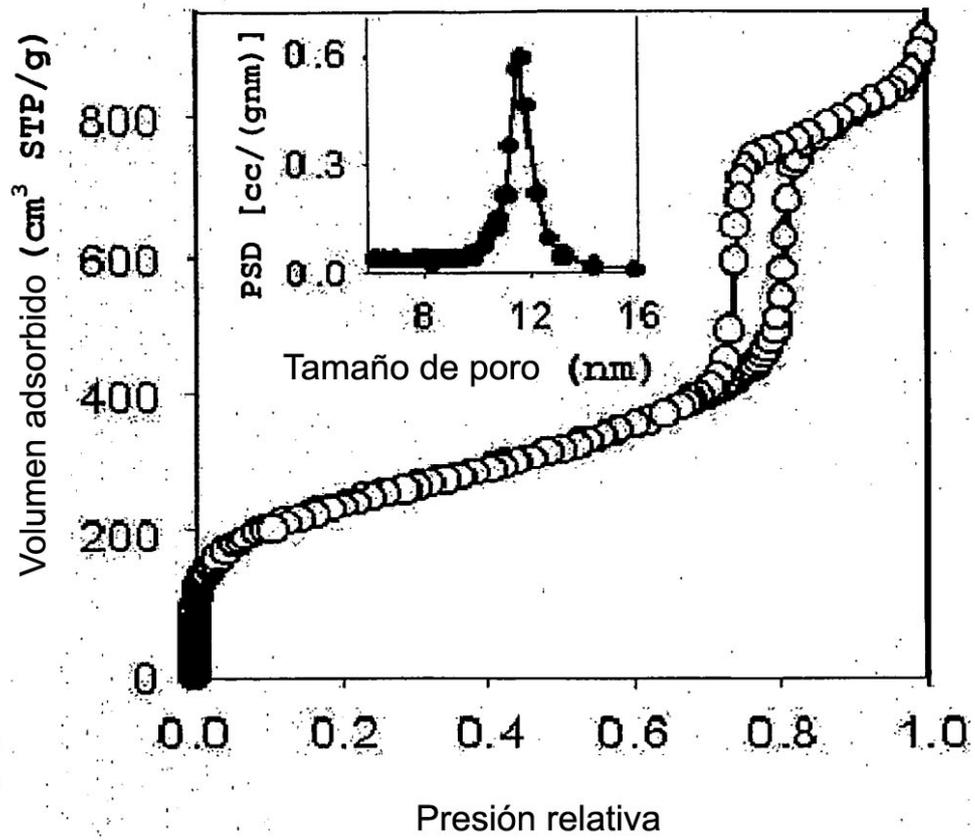


FIGURA 3

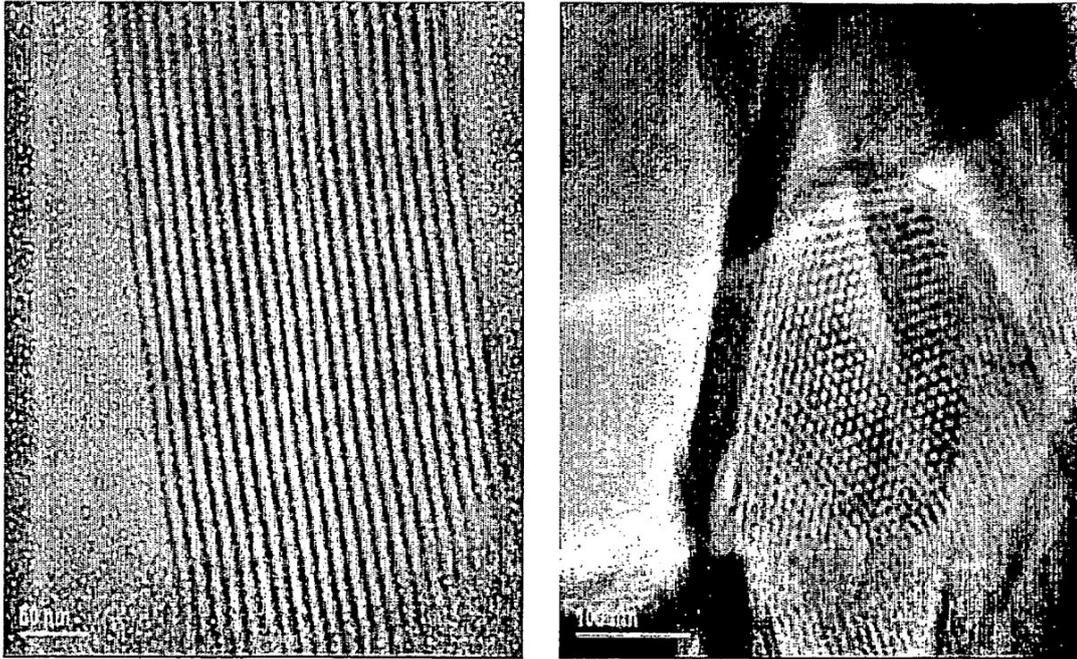


FIGURA 4-A

Intimina/1 $\beta$  - vía oral

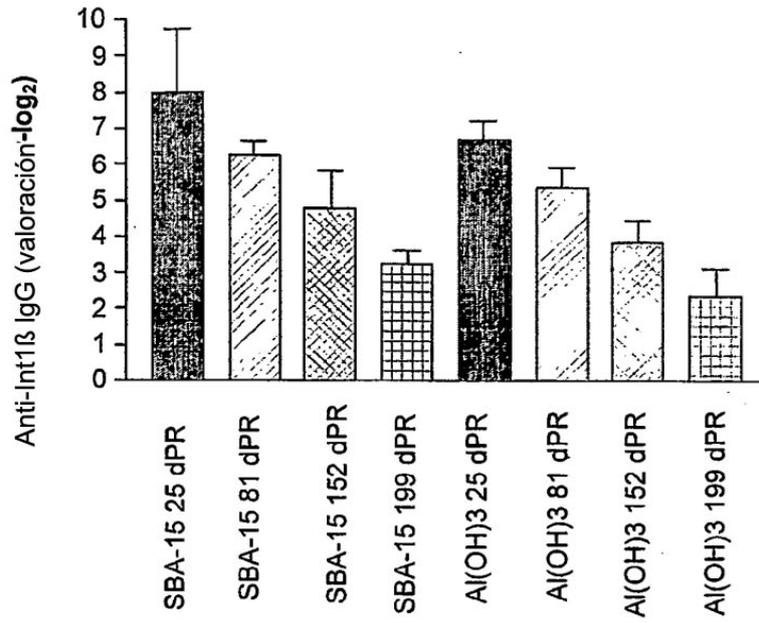


FIGURA 4-B

Intimina/1 $\beta$  - vía subcutánea

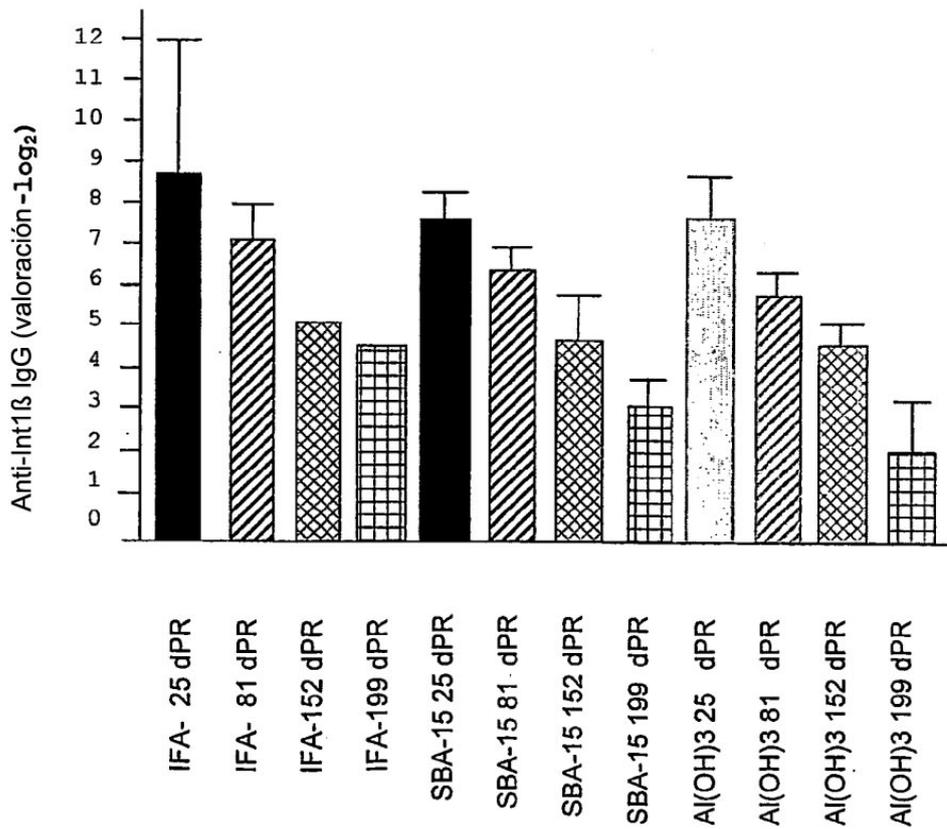


FIGURA 4-C

intimina/1 $\beta$  - vía intraperitoneal

