

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 973**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

C07K 14/23 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2010** **E 10824502 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015** **EP 2491946**

54 Título: **Adyuvante para vacunas, vacunas que comprenden dicho adyuvante y sus usos**

30 Prioridad:

19.10.2009 AR P090104015

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.08.2015

73 Titular/es:

**CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS Y TECNICAS (CONICET) (50.0%)
Av. Rivadavia 1906 3 "F"
Buenos Aires C1033 AAJ, AR y
INIS BIOTECH LLC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CORIA, MIRTA L.;
PASQUEVICH, KARINA A.;
IBÁÑEZ, ANDRÉS E.;
GIAMBARTOLOMEI, GUILLERMO H.;
CASSATARO, JULIANA y
DELPINO, MARIA VICTORIA**

74 Agente/Representante:

ZEА CHECA, Bernabé

ES 2 542 973 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).

Adyuvante para vacunas, vacunas que comprenden dicho adyuvante y sus usos

Descripción

- 5 **[0001]** La presente solicitud se refiere a un adyuvante para vacunas que comprende un polipéptido no lipidado de la membrana externa (Omp) de bacterias, en donde las bacterias pueden ser del género *Brucella*. El adyuvante puede ser un polipéptido modificado, puede ser por ejemplo el polipéptido Omp19S o partes del mismo, el polipéptido Omp16S o partes del mismo, o mezclas de ambos. En una realización preferida el adyuvante es el polipéptido no lipidado comprendido en la SEQ ID N° 1 o partes de la misma. En otra realización
10 preferida el adyuvante es el polipéptido no lipidado comprendido en la SEQ ID N° 2 o partes de la misma.

ANTECEDENTES

- [0002]** Los adyuvantes inmunológicos son sustancias que, incorporados al antígeno (Ag) o administrados simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune contra el mismo. Pueden utilizarse para
15 mejorar la respuesta inmune hacia un Ag en varios sentidos: pueden mejorar la magnitud de la respuesta inmune contra un Ag débil; pueden usarse para aumentar la velocidad y duración de la respuesta inmune, pueden modular la avidéz de los anticuerpos (Acs), isotipos o distribución de subclases; pueden estimular y modular la respuesta inmune celular; pueden promover la inducción de respuesta inmune local (ej.: mucosas); disminuir la cantidad de Ag necesaria y reducir el costo de una vacuna; o pueden ayudar a impedir la competencia de Ag que
20 existe en las vacunas combinadas (Singh and O'Hagan. *Advances in vaccine adjuvants*. Nat Biotechnol. 17 (11):1075-81. 1999).

- [0003]** A lo largo de la historia de las vacunas, y desde el adyuvante de Freund completo (CFA) basado en una emulsión de micobacterias con agua y aceite, son muchos los preparados que se han ensayado con más o menos éxito. El más utilizado y permitido de uso humano es el aluminio, en sales de hidróxido o de fosfato. Otros
25 adyuvantes consisten en componentes bacterianos como endotoxinas, partículas como liposomas, emulsiones oleosas como saponinas, y otras diferentes moléculas (Petrovsky and Aguilar. *Vaccine adjuvants: current state and future trends*. Immunol Cell Biol. 82 (5):488-96. 2004). La mayoría de los adyuvantes históricamente empleados, como las sales de aluminio, estimulan preferentemente la respuesta linfocitaria de tipo T helper (Th) 2 (Liljeqvist and Stahl. *Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines*. J Biotechnol. 73 (1):1-33. 1999), incrementando la producción de Acs. Sin embargo, también hay otras, como la vacuna de la BCG y los adyuvantes que incorporan compuestos oleosos, que estimulan la respuesta Th1 (Victoratos, Yiangou, Avramidis and Hadjipetrou. *Regulation of cytokine gene expression by adjuvants in vivo*. Clin Exp Immunol. 109 (3):569-78. 1997). La elección del adyuvante de una
30 vacuna deberá sopesarse cuidadosamente en el futuro, y no sólo en función de la cantidad de respuesta, sino de dirigirla cualitativamente. Por otro lado, la metodología utilizada tradicionalmente (vacuna por vía intramuscular o intradérmica en hidróxido de aluminio) ha sido útil para inducir respuestas inmunes humores sistémicas pero generalmente fallan en inducir respuestas inmunes celulares y locales como en mucosas (Moyle, McGeary, Blanchfield and Toth. *Mucosal immunisation: adjuvants and delivery systems*. Curr Drug Deliv. 1 (4):385-96. 2004). Hay una mayor necesidad en el diseño de vacunas capaces de inducir fuertes respuestas inmunes
40 celulares del tipo Th1 y células T citotóxicas (CTL) que puedan prevenir infecciones crónicas virales, infecciones relacionadas con patógenos intracelulares o el cáncer (vacunas terapéuticas) (Seder and Hill. *Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity*. Nature. 406 (6797):793-8. 2000).

- [0004]** Otras consideraciones importantes, (además de promover una respuesta inmune específica eficaz contra el antígeno) están relacionadas con aquellas características importantes para que la sustancia pueda ser
45 empleada en la práctica clínica. Las formulaciones óptimas deben ser seguras, estables, biodegradables, inertes, y de bajos costos de producción. Es corta la lista de sustancias que cumplen con todos estos requisitos, hasta el momento los adyuvantes aprobados para empleo en humanos se restringen a las sales de aluminio, MF59 (una emulsión de aceite en agua), MLP (monofosforil-glicolípido), partículas virales (HBV y HPV), IRIV (proteoliposoma compuesto por fosfolípidos, hemaglutinina del virus de la influenza y un antígeno blanco
50 determinado); y la subunidad B de la toxina cólera (Reed, Bertholet, Coler and Friede. *New horizons in adjuvants for vaccine development*. Trends Immunol. 30 (1):23-32. 2009). Los adyuvantes no deben inducir reacciones adversas cuando son empleados en vacunas profilácticas, aunque en las terapéuticas se aceptan ciertas reacciones. En el campo de la salud veterinaria, la eficacia es un elemento de gran importancia y se toleran ciertos niveles de efectos colaterales (Sesardic. *Regulatory considerations on new adjuvants and delivery systems*. Vaccine. 24 Suppl 2 S2-86-7. 2006).
55

- [0005]** Como la puerta de entrada de la mayoría de las infecciones son las mucosas, la habilidad de generar inmunidad de mucosas luego de la administración de un Ag podría proveer una defensa temprana contra estos patógenos. Lamentablemente luego de la administración de Acs por vía oral hay degradación en el tracto
60 gastrointestinal, poca absorción y baja eficacia a largo plazo, necesitándose administraciones repetidas y en grandes cantidades de Ag para estimular y mantener la respuesta inmune. Además se ha observado tolerancia inmunológica a aquellos Acs solubles administrados por vía oral (Moyle *et al.* *Mucosal immunisation: adjuvants and delivery systems*. Curr Drug Deliv. 1 (4):385-96. 2004). Los adyuvantes orales empleados hasta el momento como la toxina cólera (TC), por ej., tienen serios riesgos luego de la administración (Fujihashi, Koga, van

Ginkel, Hagiwara and McGhee. A dilemma for mucosal vaccination: efficacy versus toxicity using enterotoxin-based adjuvants. *Vaccine*. 20 (19-20):2431-8. 2002), de manera que es muy importante en este campo, desarrollar adyuvantes más seguros que permitan la entrada eficiente de Ags a las superficies de mucosas, con la subsecuente inducción de respuesta inmune en mucosas.

[0006] En el nivel internacional, la lista de productos con propiedades adyuvantes, es cada vez mayor; sin embargo, sólo un reducido número se utiliza en la formulación de vacunas veterinarias y humanas (Aucouturier, Dupuis and Ganne. *Adjuvants designed for veterinary and human vaccines*. *Vaccine*. 19 (17-19):2666-72. 2001; Petrovsky *et al.* *Vaccine adjuvants: current state and future trends*. *Immunol Cell Biol*. 82 (5):488-96. 2004). Por tal razón, es importante desarrollar adyuvantes eficaces y a la vez seguros para vacunas humanas y animales.

[0007] WO 200240518 A1 (PF MEDICAMENT GOETSCH LILIANE; HAEUW JEAN FRANCOIS) 23 de mayo de 2002.

[0008] WO 200240518 se refiere a una composición farmacéutica que comprende, en un medio farmacéuticamente aceptable, al menos un péptido derivado a partir de un dominio periplásmico de una proteína Omp de enterobacteria o un constructo nucleico que codifica para dicho péptido, así como también el uso de tal péptido o de tal constructo, para preparar una vacuna para tratamiento profiláctico o terapéutico de infecciones virales, bacterianas, parasíticas o fúngicas, o para preparar una vacuna diseñada para tratamiento profiláctico o terapéutico de cánceres.

[0009] Karina A. Pasquevich *et al.*; "Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection".

Infection and Immunity, American society for microbiology, USA; vol. 77, no. 1, January 2009 (2009-01), pages 436-445, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.01151-08.

[0010] KARINA A PASQUEVICH ET AL divulga la respuesta inmunogénica de *Brucella abortus* Omp16 y Omp19 no lipídificada en ratones. D2 divulga la producción de *Brucella* Omp16 y Omp19 recombinante no lipídada como vacuna. El artículo además muestra que Omp16 no lipídada y Omp19 no lipídada dan lugar a una respuesta inmune superior.

[0011] En la actualidad la mayoría de los adyuvantes capaces de inducir fuertes respuestas Th1 son aquellos basados en emulsiones oleosas, como el adyuvante de Freund Incompleto (IFA), sin embargo estos traen aparejado reacciones adversas en el sitio de inyección, como abscesos estériles y granulomas. Por todo lo dicho anteriormente el desarrollo de adyuvantes parenterales y de mucosas que induzcan respuestas Th1 y CTL es muy relevante.

[0012] En la presente invención se proveen dos nuevos adyuvantes: Omp16S y Omp19S. Estas sustancias aumentan y/o modulan las respuestas inmunes frente a los Ags con los que son co-administradas favoreciendo el desarrollo de respuestas inmunes de tipo Th1 o Th17 o CTL.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0013] Se describe un adyuvante para vacunas que comprende un polipéptido no lipidado de la membrana externa (Omp) de bacterias, en donde las bacterias pueden ser del género *Brucella*. El adyuvante puede ser un polipéptido modificado o puede ser por ejemplo el polipéptido Omp19S o partes del mismo, o el polipéptido Omp16S o partes del mismo, o mezclas de ambos. En una realización preferida el adyuvante es el polipéptido no lipidado comprendido en la SEQ ID N° 1 o partes de la misma. En otra realización preferida el adyuvante es el polipéptido no lipidado comprendido en la SEQ ID N° 2 o partes de la misma.

[0014] Se provee además una vacuna que comprende el adyuvante, al menos un polipéptido no lipidado de la membrana externa (Omp) de bacterias y al menos un antígeno, en donde la bacteria puede ser del género *Brucella* y en donde dicha vacuna puede ser de aplicación mucosal o parenteral. El adyuvante de la vacuna puede ser un polipéptido modificado o puede ser por ejemplo el polipéptido Omp19S o partes del mismo, o el polipéptido Omp16S o partes del mismo, o mezclas de ambos. En una realización preferida el adyuvante es el polipéptido no lipidado comprendido en la SEQ ID N° 1 o partes de la misma. En otra realización preferida el adyuvante es el polipéptido no lipidado comprendido en la SEQ ID N° 2 o partes de la misma.

[0015] Se provee el uso del adyuvante para preparar una vacuna contra un patógeno.

[0016] Se provee el uso del adyuvante para preparar una vacuna antitumoral o una composición inmunomoduladora.

[0017] Se proveen vectores de expresión en eucariotas que comprenden las secuencias SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2.

[0018] Se proveen células eucariotas modificadas que expresan las secuencias SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0019]

La Figura 1 muestra: Gel de poliacrilamida 15% teñido con Coomassie Blue en el que se sembraron Omp19S y Omp16S purificadas y depletadas de lipopolisacárido (LPS). En todas las calles se sembraron

20µg de proteínas totales. Se corrió también en el mismo gel Omp19S degradada con proteinasa K (Omp19SPK) que fue usado como control en algunos experimentos.

La Figura 2 muestra que la expresión de la proteína $\alpha 4\beta 7$ aumenta en linfocitos de ganglios mesentéricos de animales BALB/c inmunizados por vía oral con Omp19S como adyuvante. Los animales fueron inmunizados por vía oral con: i) ovalbúmina bovina (OVA), ii) Omp19S +OVA o iii) Toxina colérica (TC) +OVA. 2×10^6 células de ganglios mesentéricos correspondientes a cada grupo de inmunización fueron marcadas con anticuerpos anti-CD4 (FITC), anti-CD8 (PE-Cy5.5) y anti- $\alpha 4\beta 7$ (PE). Los números en el cuadrante superior derecho representan los porcentajes de células T CD8⁺ (A) y CD4⁺ (B) que expresan la proteína $\alpha 4\beta 7$. En todos los casos se restó el porcentaje del control de isotipo. n/grupo=5. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La Figura 3 muestra que Omp19S, al ser administrada como adyuvante oral, induce una respuesta inmune celular T *in vivo*. Se determinó la reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) en respuesta a la inoculación de 20 µg OVA en la almohadilla plantar de los animales inmunizados como fuera descrito en la figura 2. Las barras representan la media del incremento del pliegue cutáneo plantar entre la pata derecha y la izquierda $\pm$ error estándar de la media (SEM) a las 48hs (A) y 72hs (B), n/grupo=5. Representativo de 2 experimentos con similares resultados.

La Figura 4 muestra que Omp19S, al ser administrada como adyuvante oral, induce un aumento en la capacidad proliferativa de los esplenocitos en respuesta al estímulo antigénico. Los esplenocitos de los animales inmunizados como fuera descrito en la figura 2 fueron estimulados con OVA 100µg/ml o sin antígeno. Las células fueron marcadas con ³H timidina por 18hs y se midió la radioactividad incorporada. Los resultados se muestran como índice de estimulación (S.I.) que representa las cpm de los esplenocitos estimulados con OVA/cpm de los esplenocitos sin estimular. Se considera como positivo un S.I. > 2. Los valores representan la media de determinaciones hechas por triplicado para los 5 animales/grupo $\pm$ SEM.

La Figura 5 muestra que Omp19S, al ser administrada como adyuvante oral, induce una respuesta inmune celular con producción de citoquinas (IFN- γ e IL-17) en respuesta al antígeno. Los esplenocitos de bazo de cada grupo inmunizado como fuera descrito en la figura 2 (n/grupo = 5) fueron estimulados *in vitro* con diferentes concentraciones de OVA (100µg/ml y 1000µg/ml) o medio completo (RPMI). Los sobrenadantes de cultivo fueron colectados 72hs luego de la estimulación. Las concentraciones de las citoquinas (A) interferón (IFN)- γ , (B) IL-4, (C) IL-2, (D) IL-10 y (E) IL-17 (pg/ml) en los sobrenadantes de cultivo fueron determinadas por ELISA. Los valores representan la media de determinaciones hechas por duplicado para cada ratón $\pm$ SEM. Representativo de 2 experimentos con similares resultados.

La Figura 6 muestra que Omp19S al ser administrada como adyuvante oral, estimula la inducción de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas que producen IFN- γ . Los esplenocitos de los animales inmunizados por vía oral con i) OVA, ii) Omp19S+OVA o iii) TC+OVA, se estimularon con OVA₃₂₃+A20J+OVA 500µg/ml o con medio de cultivo completo (sin estimular) por 18hs y con Brefeldin A durante las últimas 4hs de cultivo.

Posteriormente las células fueron marcadas con Acs específicos anti-CD4 (PE/Cy5) y anti-CD8 (Alexa Fluor 647). Seguidamente fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con un Ac anti-IFN- γ (PE) o control de isotipo (PE). Los números en el cuadrante superior derecho representan los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ (A) o CD8⁺ (B) que expresan IFN- γ . En todos los casos se restó el porcentaje del control de isotipo y la producción de IFN- γ del mismo grupo sin estimular, de esta manera el porcentaje indicado corresponde a la producción de IFN- γ OVA específica. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes.

La Figura 7 muestra que la expresión de la proteína $\alpha 4\beta 7$ aumenta en linfocitos de ganglios mesentéricos de animales BALB/c inmunizados por vía oral con Omp16S como adyuvante. Los grupos de animales fueron inmunizados por vía oral con: i) OVA, ii) Omp16S+OVA o iii) TC+OVA. 2×10^6 células de ganglios mesentéricos correspondientes a cada grupo de inmunización fueron marcadas con anti-CD8 (PE-Cy5.5) y anti- $\alpha 4\beta 7$ (PE). Los números en el cuadrante superior derecho representan los porcentajes de células T CD8⁺ que expresan el marcador $\alpha 4\beta 7$. En todos los casos se restó el porcentaje del control de isotipo. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La Figura 8 muestra que Omp16S, al ser administrada como adyuvante oral, induce una respuesta inmune celular T *in vivo*. Se determinó la reacción DTH en respuesta a la inoculación de 20 µg OVA en la almohadilla plantar derecha de los animales inmunizados por vía oral como en la fig. 7. Las barras representan la media del incremento del pliegue cutáneo plantar entre la pata derecha y la izquierda $\pm$ SEM a las 48hs (A) y 72hs (B), n/grupo=5. Representativo de 2 experimentos con similares resultados.

La Figura 9 muestra que Omp19S al ser administrada como adyuvante nasal induce una respuesta inmune celular con producción de citoquinas (IFN- γ) en respuesta al antígeno. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados por vía nasal con: i) OVA, ii) Omp19S+OVA o iii) TC+OVA. Los esplenocitos de bazo de cada grupo (n/grupo = 5) inmunizado como se describe en la figura 7 fueron estimulados *in vitro* con una concentración de OVA 500 µg/ml o medio completo (RPMI). Los sobrenadantes de cultivo fueron colectados 5 días luego de la estimulación. Las concentraciones de las citoquinas (A) IFN- γ , (B) IL-4 y (C) IL-10 (pg/ml) en los sobrenadantes de cultivo fueron determinadas por ELISA. n/grupo=5. Los valores representan la media de determinaciones hechas por duplicado para cada ratón $\pm$ SEM. Representativo de 2 experimentos con similares resultados.

La Figura 10 muestra que Omp19S al ser administrada como adyuvante nasal, estimula la inducción de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas que producen IFN- γ . Los esplenocitos de los animales inmunizados como fuera descrito en la figura 9 se cultivaron con OVA₂₅₇+ MO5+OVA 500 μ g/ml o con medio completo (sin estimular, RPMI) por 18hs. Luego fueron tratados con Brefeldina A durante las últimas 4 hs. de cultivo. Posteriormente las células fueron marcadas con Acs específicos anti-CD4 (PE/Cy5) y anti-CD8 (Alexa Fluor 647). Seguidamente fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con un Ac anti-IFN- γ (PE). Los números en el cuadrante superior derecho representan los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ (A) o CD8⁺ (B) que expresan IFN- γ . En todos los casos se restó el porcentaje del control de isotipo y la producción de IFN- γ del mismo grupo sin estimular, de esta manera el porcentaje indicado corresponde a la producción de IFN- γ OVA específica. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes.

La Figura 11 muestra que Omp16S induce una respuesta inmune celular con producción de citoquinas al ser administrado como adyuvante nasal. Animales fueron inmunizados por vía nasal con: i) OVA, ii) Omp16S+OVA o iii) TC+OVA. Los esplenocitos de cada grupo inmunizado (n/grupo = 5) fueron estimulados *in vitro* con una concentración de OVA 500 μ g/ml o medio completo (RPMI). Los sobrenadantes de cultivo fueron colectados 5 días luego de la estimulación. Las concentraciones de las citoquinas (A) IFN- γ , (B) IL-4 y (C) IL-10 (pg/ml) en los sobrenadantes de cultivo fueron determinadas por ELISA. Los valores representan la media de determinaciones hechas por duplicado para cada ratón $\pm$ SEM. Representativo de 2 experimentos con similares resultados.

La Figura 12 muestra que Omp16S al ser administrada como adyuvante nasal, estimula la inducción de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas que producen IFN- γ . Los esplenocitos de los animales inmunizados como fuera descrito en la fig. 11 se cultivaron con OVA₂₅₇+ MO5+OVA 500 μ g/ml o medio completo (RPMI) por 18hs. Luego fueron tratadas con Brefeldina A durante las últimas 4 hs. de cultivo. Posteriormente las células fueron marcadas con Acs específicos anti-CD4 (PE/Cy5) y anti-CD8 (Alexa Fluor 647). Seguidamente fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con un Ac anti-IFN- γ (PE). Los números en el cuadrante superior derecho representan los porcentajes de LT CD4⁺ (A) o CD8⁺ (B) que expresan IFN- γ . En todos los casos se restó el porcentaje del control de isotipo y la producción de IFN- γ del mismo grupo sin estimular, de esta manera el porcentaje indicado corresponde a la producción de IFN- γ OVA específica. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes.

La Figura 13 muestra que la administración de Omp19S como adyuvante parenteral no tiene un efecto sobre la magnitud de la respuesta humoral. Los títulos de IgG total anti-OVA se determinaron en los sueros de ratones BALB/c inmunizados por vía subcutánea con i) OVA, ii) OVA+Omp19S y iii) OVA+CFA y fueron determinados por ELISA. n/grupo=5, los valores representan la media de determinaciones hechas para cada ratón $\pm$ SEM, representando 2 experimentos con similares resultados.

La Figura 14 muestra que la administración de Omp19S como adyuvante parenteral tiene un efecto sobre el perfil de isotipos de Acs inducidos. La relación de isotipos IgG1/IgG2a anti-OVA se determinó en los sueros de los animales inmunizados como fuera descrito en la fig. 13. Los valores representan la media de determinaciones hechas para cada ratón $\pm$ SEM. n/grupo=5, representando 2 experimentos con similares resultados.

La Figura 15 muestra que Omp19S como adyuvante por vía parenteral no induce toxicidad local en el tejido subcutáneo de ratones BALB/c luego de las inmunizaciones como fuera descrito en la fig. 13. Se observa un granuloma en el sitio de inyección (recuadro) en el ratón inmunizado con CFA como adyuvante (A). A la derecha se observa la misma zona en un ratón inmunizado con Omp19S como adyuvante por vía subcutánea, sin signos de alteraciones en el tejido (B).

La Figura 16 muestra que Omp16S y Omp19S, al ser administradas como adyuvantes por vía parenteral, inducen una respuesta inmune celular T contra el antígeno *in vivo*. Se determinó la reacción DTH en respuesta a la inoculación de 20 μ g OVA en la almohadilla plantar derecha de los animales inmunizados por vía subcutánea con i) OVA, ii) OVA+Omp16S, iii) OVA+Omp19S o iv) OVA+CFA como fuera descrito en la fig. 13. Las barras representan la media del incremento del pliegue cutáneo plantar entre la pata derecha y la izquierda $\pm$ SEM a las 48hs (A) y 72hs (B). n/grupo=5, representando 3 experimentos con similares resultados.

La Figura 17 muestra que Omp19S, al ser administrada como adyuvante por vía parenteral, induce un aumento en la capacidad proliferativa de los esplenocitos en respuesta al Ag. Se estudió la proliferación *in vitro* en respuesta a diferentes dosis de OVA en los esplenocitos de los ratones inmunizados como fuera descrito en la fig. 13. Los resultados fueron expresados como índice de estimulación SI (cpm OVA/cpm RPMI). n/grupo=5. Los valores representan la media de determinaciones hechas por triplicado para cada ratón $\pm$ SEM, representando 2 experimentos con similares resultados.

La Figura 18 muestra que Omp19S al ser administrada como adyuvante parenteral induce una respuesta inmune celular con producción de citoquinas (IFN- γ) en respuesta al antígeno. Se determinó la producción de IFN- γ por los esplenocitos de los ratones inmunizados como fuera descrito en la fig. 13 estimulados *in vitro* durante 72 hs. con distintas concentraciones de OVA o medio completo. n/grupo=5. Los valores representan la media de determinaciones hechas por duplicado para cada ratón $\pm$ SEM, representando 2 experimentos con similares resultados.

La Figura 19 muestra que Omp19S al ser administrada como adyuvante parenteral no induce un aumento en la producción de IL-4 ni de IL-10 en respuesta al antígeno. Se estudió la producción de IL-4 (A) e IL-10 (B) por los esplenocitos de los ratones inmunizados como fuera descrito en la fig. 13 estimulados *in vitro* durante 72 hs. con distintas concentraciones de OVA o medio completo (RPMI). n/grupo=5. Los valores representan la media de determinaciones hechas por duplicado para cada ratón $\pm$ SEM, representando 2 experimentos con similares resultados.

La Figura 20 muestra que Omp19S al ser administrada como adyuvante parenteral induce una respuesta inmune celular con producción de IL-17 en respuesta al antígeno. Se determinó la producción de IL-17 por los esplenocitos de los ratones inmunizados como fuera descrito en la fig. 13 estimulados *in vitro* durante 72 hs. con distintas concentraciones de OVA o medio completo (RPMI). n/grupo = 5. Los valores representan la media de determinaciones hechas por duplicado para cada ratón $\pm$ SEM, representando 1 experimento.

La Figura 21 muestra que la utilización de Omp19S como adyuvante por vía parenteral aumenta la proliferación de células CD8⁺ específicas para OVA₂₅₇₋₂₆₄. Células provenientes de ratones OT-1 fueron marcadas con carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) y transferidas por vía intravenosa (i.v) (10×10^6 células/ratón) a ratones C57BL/6. Un día después los ratones receptores C57BL/6 fueron inmunizados con: i) OVA, ii) OVA+Omp19S, iii) OVA+Omp19S degradada con proteinasa K (Omp19SPK) o iv) OVA+LPS por vía subcutánea (s.c). La proliferación de las células de los OT-1 CFSE⁺ en los bazo y ganglios linfáticos fue determinada 5 días después de la inmunización por citometría de flujo analizando los niveles de fluorescencia de CFSE. Se muestra el porcentaje de células CD8⁺ que sufrieron más de una división, representando resultados de 3 experimentos.

La Figura 22 muestra que la utilización de Omp19S como adyuvante por vía parenteral aumenta la producción intracelular de IFN- γ en la población de células CD8⁺ específicas para OVA₂₅₇₋₂₆₄. Esplenocitos de los animales inmunizados como fuera descrito en la Figura 22 fueron estimulados durante 18hs con: medio completo (RPMI), OVA 500 μ g/ml + péptido SIINFEKL 5 μ g/ml + MO5 y luego tratadas con Brefeldina A durante 6hs. Posteriormente las células fueron marcadas con anticuerpos anti-CD8 Alexa Fluor y anti-IFN- γ PE. Los valores del cuadrante superior derecho representan los porcentajes de células CD8⁺ (B) productoras de IFN- γ .

La Figura 23 muestra que la inmunización con Omp16S u Omp19S como adyuvantes inducen una respuesta inmune citotóxica capaz de lisar células tumorales que expresan el Ag. Se determinó la actividad citotóxica de los esplenocitos de los ratones C57BL/6 inmunizados con: i) OVA, ii) Omp16S+OVA iii) Omp19S+OVA o iv) CFA+OVA. Las células blanco (MO5 que expresan OVA o B16 que no expresan OVA) marcadas con ⁵¹Cr fueron incubadas con los esplenocitos en una relación 50 esplenocitos: 1 célula blanco. Luego de 6hs se midió las cpm en los sobrenadantes y los resultados se analizaron según el porcentaje de lisis específica.

La Figura 24 muestra que el porcentaje de células T CD4⁺ y CD8⁺ que expresan $\alpha 4\beta 7$ aumenta en ganglios mesentéricos de ratones BALB/c inmunizados por vía oral con Omp19S como adyuvante. Los animales fueron inmunizados por vía oral con: i) toxoide tetánico (TT), ii) TT+Omp19S o iii) TT+TC. 2×10^6 células de ganglios mesentéricos correspondientes a cada grupo de inmunización fueron marcadas con anticuerpos anti-CD4 (FITC), anti-CD8 (PE-Cy5.5) y anti- $\alpha 4\beta 7$ (PE). Los números en el cuadrante superior derecho representan los porcentajes de células T CD8⁺ (A) y CD4⁺ (B) que expresan el marcador $\alpha 4\beta 7$. En todos los casos se restó el porcentaje del control de isotipo. n/grupo=5.

La figura 25 muestra en geles que las proteínas Omp16S y Omp19S se expresan correctamente en células eucariotas transfectadas con los plásmidos de expresión en eucariotes pCI-Omp16S o pCI-Omp19S respectivamente. Se estudió la expresión de (A) Omp16S u (B) Omp19S en células eucariotas (COS-7) transfectadas transitoriamente con los plásmidos pCI-Omp16S o pCI-Omp19S respectivamente o con el plásmido pCI como control. Luego de 24 o 48hs de cultivo se evaluó la expresión de Omp16 u Omp19 por Western Blot en extractos proteicos provenientes de las células transfectadas utilizando anticuerpos específicos anti-Omp16 o anti-Omp19 respectivamente.

La figura 26 muestra que Omp19S inhibe las proteasas del estómago de ratones Balb/c. Los sobrenadantes de los extractos de estómago fueron incubados con BSA (proteína irrelevante), Omp19S, cóctel inhibidor de proteasas de mamíferos (como control de que la actividad enzimática del estómago puede ser inhibida). La actividad enzimática fue medida usando BODIPY FL caseína o BODIPY FL OVA como sustratos. El gráfico representa el porcentaje de actividad enzimática remanente luego de cada tratamiento calculado tomando como máxima actividad la del sobrenadante del extracto de estómago sobre el sustrato BODIPY FL caseína o BODIPY FL OVA una vez degradados fue chequeada tratando estos sustratos con PK (proteínasa K).

La Figura 27 muestra que Omp19S es capaz de inhibir la degradación de antígenos eucariotas (BAS, OVA) y bacterianos (BLS, SurA, DnaK) por proteasas del estómago de ratones Balb/c. Cada antígeno se trató con: i) sobrenadante de extracto de estómago, ii) sobrenadante de extracto de estómago y Omp19S; iii) sobrenadante de extracto de estómago y cóctel inhibidor de proteasas de mamíferos (como control de que la actividad enzimática del estómago puede ser inhibida). Estas mezclas de reacción se sometieron a una

electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) y posterior tinción con *Coomassie blue*.

La figura 28 muestra la capacidad de Omp19S de inhibir la degradación de antígenos por parte de las proteasas del estómago in vivo usando como modelo de antígeno BODIPY FL caseína. Los ratones Balb/c fueron inoculados por vía oral con: i) buffer de NaHCO₃ (1M, Ph8) (Vehículo), ii) BODIPY FL CASEÍNA CON Omp19S, iii) BODIPY FL caseína con aprotinina (un inhibidor de proteasas conocido), iv) BODIPY FL caseína. El gráfico representa el porcentaje de actividad enzimática remanente luego de cada tratamiento calculado tomando como máxima actividad la del sobrenadante del extracto de estómago de los ratones inmunizados con BODIPY FL caseína.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0020] A los efectos de la presente solicitud las frases “polipéptido Omp19S”, “proteína Omp19S” y “Omp19S” tienen el mismo significado y corresponde al polipéptido Omp19S no lipidado.

[0021] El término Omp19S o Omp16S se refiere al polipéptido cuya secuencia puede corresponderse con la SEQ N°1 o la SEQ N°2 respectivamente obtenido por purificación a partir de células, tejidos u organismos que lo expresan, o por síntesis química.

[0022] A los efectos de la presente solicitud las frases “polipéptido Omp16S”, “proteína Omp16S” y “Omp16S” tienen el mismo significado y corresponde al péptido Omp16S no lipidado.

[0023] En la presente solicitud el término “inmunógeno” y “antígeno” tienen el mismo significado y se definen como cualquier sustancia frente a la cual, en un organismo inmunocompetente, se puede inducir una respuesta inmune humoral o celular. En esta acepción, antígeno es sinónimo de inmunógeno.

[0024] En una realización preferida se clonó al polipéptido Omp19S sin la secuencia consenso de lipidación en un vector plasmídico. A partir de esta construcción se transformaron células competentes de *E. coli* de manera de expresar y purificar al polipéptido no lipidado. La purificación se llevó a cabo utilizando una resina de níquel – agarosa. Los eluidos correspondientes fueron sembrados en un gel de poliacrilamida con SDS (Figura 1). Seguidamente se juntaron en distintas fracciones los eluidos de concentración similar. En estas fracciones se corroboró la identidad del polipéptido purificado, para ello se realizó un Western Blot utilizando un anticuerpo monoclonal contra Omp19.

[0025] El polipéptido clonado fue secuenciado y su secuencia se muestra en SEQ ID N° 1. Es evidente que pueden existir variaciones de dicha secuencia estando todas ellas dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo fragmentos de la misma, o adiciones, o delecciones de fragmentos o aminoácidos. Caen dentro del alcance de la presente invención los polipéptidos de Omp19S no lipidados obtenidos a partir de cualquier especie de *Brucella*.

[0026] En otra realización preferida se clonó al polipéptido Omp16S sin la secuencia consenso de lipidación en un vector plasmídico. A partir de esta construcción se transformaron células competentes de *E. coli* de manera de expresar y purificar al polipéptido no lipidado. La purificación se llevó a cabo utilizando una resina de níquel – agarosa. Los eluidos correspondientes fueron sembrados en un gel de poliacrilamida con SDS (Figura 1). Seguidamente se juntaron en distintas fracciones los eluidos de concentración similar. En estas fracciones se corroboró la identidad del polipéptido purificado, para ello se realizó un Western Blot utilizando un anticuerpo monoclonal contra Omp16. El polipéptido clonado fue secuenciado y su secuencia se muestra en SEQ ID N° 2. Es evidente que pueden existir variaciones de dicha secuencia estando todas ellas dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo fragmentos de la misma, o adiciones, o delecciones de fragmentos o aminoácidos. Caen dentro del alcance de la presente invención los polipéptidos de Omp16S no lipidados obtenidos a partir de cualquier especie de *Brucella*.

[0027] A partir de lo divulgado en la presente solicitud resulta obvio que otros polipéptidos Omp de *Brucella* podrían ser utilizados como adyuvantes siempre y cuando los mismos se encuentren en una forma no lipidada. La forma no lipidada puede obtenerse mediante modificaciones en el esqueleto peptídico, como por otros métodos conocidos. Cualquier polipéptido Omp no lipidado se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

Estudios utilizando Omp19S u Omp16S por vía mucosal:

[0028] Se estudió la expresión de $\alpha 4\beta 7$ en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de ganglios mesentéricos obtenidos de animales inmunizados por vía oral con i) OVA (ovoalbúmina), ii) Omp19S+OVA o iii) toxina colérica (TC)+OVA.

[0029] Los resultados indican que hubo un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ que expresan el marcador de migración a mucosas (lámina gastrointestinal propia) $\alpha 4\beta 7$ en los ganglios mesentéricos de aquellos animales inoculados por vía oral con Omp19S+OVA (7,7%; 12,16%) y TC+OVA (7,15%; 16,43%) como adyuvantes, en comparación con la administración del antígeno sin adyuvante OVA (0,74%; 1,64%) (Figura 2A y B). Por lo tanto se puede decir que Omp19S administrada por vía oral induciría la migración de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ efectores hacia la mucosa intestinal.

[0030] La respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) está mediada por células T que llegan al lugar de la inyección del antígeno, reconocen péptidos derivados de ese antígeno en las células presentadoras de Ag (APCs) y liberan citoquinas como el IFN- γ , el cual estimula el reclutamiento de células de la inmunidad innata provocando edema e hinchazón. Entonces para analizar la respuesta T *in vivo* se evaluó en los ratones

inmunizados por vía oral con los adyuvantes de la invención la respuesta DTH inducida por la inyección de OVA. Para ello se inyectó 20 µg de OVA en la almohadilla plantar en una de las patas de los ratones inmunizados y en la otra se inyectó solución fisiológica como control. Aquellos animales inmunizados por vía oral con OVA co-administrada con Omp19S presentaron un incremento en el pliegue cutáneo plantar con respecto a aquellos animales inmunizados con OVA sin adyuvante a las 48hs y a las 72hs post-inyección de OVA (Figura 3 A y B). Este incremento fue levemente mayor al inducido por la toxina colérica como adyuvante administrada por la misma vía (Figura 3 A y B).

[0031] Estos resultados demuestran que el adyuvante Omp19S administrado por vía oral sería capaz de inducir una respuesta celular *in vivo* similar o superior a la generada con un adyuvante mucosal experimental conocido como es la toxina colérica. Omp19S como adyuvante de mucosas induciría una respuesta T anti-el antígeno (OVA) *in vivo*.

[0032] Para caracterizar la respuesta inmune celular inducida se determinó la capacidad de los esplenocitos de los animales inmunizados de proliferar *in vitro* en respuesta al antígeno. Se cultivaron las células en presencia de distintas concentraciones de OVA o medio completo y luego de 5 días se les dio un pulso de ³H-timidina por 18 hs. y se midió la radioactividad incorporada. Los resultados obtenidos demuestran que la coadministración de OVA con el adyuvante Omp19S administrados por vía oral genera un aumento de la respuesta proliferativa antígeno específica en las células de estos ratones con respecto a las de los animales inmunizados solo con OVA (Figura 4). La estimulación con Concanavalina A (ConA, mitógeno control) produjo un aumento significativo en la proliferación celular. Por el contrario la utilización de toxina colérica como adyuvante no indujo un aumento en la capacidad proliferativa de los esplenocitos en respuesta al Ag. Estos resultados indicarían que la utilización del adyuvante Omp19S por vía oral tendría un efecto sobre la generación de una eficiente respuesta adaptativa evidenciada por un incremento en la capacidad proliferativa de las células T antígeno específicas.

[0033] En base a los resultados de DTH y proliferación se evidenció una respuesta celular desarrollada en respuesta a la estimulación con el antígeno.

[0034] Posteriormente se caracterizó el perfil de respuesta T que se desarrolla en los animales cuando son inmunizados con el adyuvante de la invención por vía oral.

[0035] Para la determinación del tipo de respuesta T helper (Th) anti-OVA que se induce con Omp19S como adyuvante se cultivaron los esplenocitos de los ratones inmunizados en presencia de distintas concentraciones de OVA o medio completo durante 72 hs. y luego se analizó el patrón de citoquinas producidas en los sobrenadantes de estas células. Se realizó un ELISA de captura empleando anticuerpos monoclonales específicos para la detección de IFN-γ, IL-2, IL-10, IL-4 e IL-17 en los sobrenadantes de cultivo de los esplenocitos estimulados y control.

[0036] Los resultados indican que las células de los animales inmunizados por vía oral con OVA+Omp19S produjeron niveles mayores de IFN-γ, IL-2 e IL-17 respecto de los animales control (OVA) y respecto de los animales inmunizados con OVA+TC (Figura 5), y la secreción de estas citoquinas fue antígeno específica y dosis dependiente.

[0037] Por el contrario, los niveles de citoquinas del perfil Th2 como IL-4 e IL-10 resultaron ser similares a los niveles basales. De esta manera el uso de Omp19S como adyuvante por vía oral generaría una respuesta de tipo Th1 y Th17.

[0038] No solo es importante la cantidad de respuesta inducida por un adyuvante sino también la calidad de dicha respuesta. Dado que los linfocitos de los ratones co-inmunizados con Omp19S + OVA liberaban IFN-γ, se estudió la subpoblación T CD4⁺ o CD8⁺ que produce esta citoquina. Para ello se determinó la producción intracelular de IFN-γ por las células T CD4⁺ y CD8⁺.

[0039] Para esto, se siguió el protocolo de 16 horas de incubación con diferentes estímulos. Para estimular los linfocitos extraídos de bazo de ratón, se utilizó un péptido de OVA restringido a MHC clase II en BALB/c (OVA³²³), células presentadoras A20J y OVA (500µg/ml). Los otros estímulos consistieron en medio completo (RPMI) como control negativo y Pma/ionomicina (un activador policlonal de células T) como control positivo. En la Figura 6 se muestra la producción de IFN-γ en células T CD4⁺ por los grupos de ratones inmunizados con OVA, OVA+Omp19S y OVA+TC por vía oral.

[0040] La inmunización con Omp19S como adyuvante por vía oral indujo la producción de células T CD4⁺ productoras de IFN-γ antígeno específicas (2,13%) mientras que en el grupo inmunizado con TC como adyuvante no hubo una producción diferente al grupo inmunizado con OVA sin adyuvante (OVA+TC 0,45% vs OVA 0,41%) (Figura 6 A). En cuanto a los linfocitos T CD8⁺ productores de IFN-γ, se puede observar un leve aumento en el grupo OVA+Omp19S (0,77%) pero significativo en relación al grupo inmunizado con OVA (0,37%) o con OVA+TC (0,55%) (Fig. 6B).

[0041] En resumen, el uso de Omp19S como adyuvante por vía oral, induce i) la migración de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ a la mucosa gastrointestinal, ii) una respuesta celular T antígeno específica *in vivo*, iii) la liberación de citoquinas Th1, Th17 como también la proliferación de los linfocitos en respuesta al Ag y iv) linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ productores de IFN-γ de memoria. Estas células productoras de IFN-γ son indispensables en la generación de respuestas inmunes eficientes contra infecciones por patógenos con una fase de su ciclo de vida intracelular como virus, bacterias, parásitos y hongos; o tumores. El hecho de que el adyuvante induzca la producción de esta citoquina por parte de los linfocitos T podría ser beneficioso para el desarrollo de vacunas contra este tipo de enfermedades. Todas estas son cualidades muy requeridas en el campo de los adyuvantes mucosales.

[0042] Se estudió también la expresión de $\alpha\beta 7$ en los linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ de ganglios mesentéricos obtenidos de animales inmunizados por vía oral con i) OVA, ii) OVA+Omp16S o iii) OVA+TC (Figura 7). Los resultados indican que hubo un aumento en el porcentaje de linfocitos T $CD8^+$ que expresan el marcador de migración a mucosas $\alpha\beta 7$ en los ganglios mesentéricos de aquellos animales inoculados por vía oral con OVA+Omp16S (4,35%) y OVA+TC (16,43%), en comparación con la administración del antígeno sin adyuvante (OVA, 1,64%). Estos resultados sugieren que Omp16S administrada por vía oral induce la migración de los linfocitos T $CD8^+$ efectores hacia la mucosa intestinal.

[0043] Para analizar la respuesta T *in vivo* se evaluó en los ratones inmunizados por vía oral la respuesta de hipersensibilidad retardada inducida por la inyección de OVA. Aquellos animales inmunizados por vía oral con OVA co-administrada con Omp16S como adyuvante presentaron un incremento en el pliegue cutáneo plantar con respecto a aquellos animales inmunizados con OVA sin adyuvante a las 48hs y a las 72hs post-inmunización con OVA (Figura 8 A y B). Este incremento fue levemente mayor al inducido por la toxina colérica administrada como adyuvante por la misma vía a las 48hs (Figura 8 A y B). Entonces, Omp16S como adyuvante de mucosas induce una respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) al antígeno (OVA). Omp16S administrado por vía oral es capaz de inducir una respuesta celular T *in vivo* similar a la generada con un adyuvante mucosal experimental conocido como es la toxina colérica.

[0044] El uso de Omp16S como adyuvante por vía oral, induciría i) la migración de linfocitos T $CD8^+$ a la mucosa gastrointestinal, ii) una respuesta celular T antígeno específica *in vivo*.

[0045] La administración nasal de Omp19S genera la producción de citoquinas específicas para OVA en cultivos de esplenocitos de bazo. Los esplenocitos de los animales inmunizados por vía nasal con OVA+Omp19S produjeron niveles mayores de IFN- γ con respecto a los animales inmunizados con OVA sin adyuvante (Figura 9A) en respuesta al antígeno OVA. La administración de OVA+TC por vía nasal indujo niveles superiores de IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo de los esplenocitos estimulados con OVA. Por el contrario la estimulación con OVA no indujo la secreción de IL-4 en los esplenocitos de ninguno de los grupos estudiados (Figura 9B). En cuanto a IL-10, se detectó un leve aumento respecto del control negativo, solo en el grupo inmunizado con OVA+TC (Figura 9C). Entonces, la administración de Omp19S como adyuvante por vía nasal induce una respuesta inmune celular Th1 con producción de IFN- γ .

[0046] Considerando el perfil de citoquinas liberado por los esplenocitos, se estudió si eran las células T $CD4^+$ o las $CD8^+$ las encargadas de dicha producción. Para esto se realizó una medición de IFN- γ intracelular luego de 3 semanas de la última inmunización.

[0047] La inmunización con Omp19S como adyuvante nasal (Omp 19S+OVA) indujo la producción de células T $CD4^+$ productoras de IFN- γ antígeno específicas (0,43%) mientras que en el grupo inmunizado con TC como adyuvante no indujo una producción diferente al grupo inmunizado con OVA sin adyuvante (OVA+TC 0,28% vs OVA 0,23%) (Figura 10A). En cuanto a los linfocitos T $CD8^+$ productores de IFN- γ , se puede observar un leve aumento en el grupo OVA+Omp19S (0,72%) pero significativo en relación al grupo inmunizado con OVA (0,47%) o con OVA+TC (0,22%) (Figura 10B).

[0048] Estos resultados en su conjunto demuestran que los ratones inmunizados con Omp19S+OVA por vía nasal mostraron un aumento en el porcentaje de linfocitos T $CD4^+$ pero mayormente de linfocitos T $CD8^+$ que producen IFN- γ anti-OVA. Esta producción fue mayor al grupo control OVA inmunizado por la misma vía sin adyuvante e inclusive mayor al grupo control con un adyuvante conocido como es la toxina colérica.

[0049] La co-administración nasal de Omp16S induce la producción de citoquinas en respuesta al Ag en cultivos de células de bazo. Los resultados indican que los esplenocitos de los animales inmunizados por vía nasal con OVA+Omp16S produjeron niveles mayores de IFN- γ con respecto a los animales control (OVA) en respuesta al antígeno OVA (Figura 11A). La co-administración de TC por vía nasal indujo niveles inferiores de IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo de los esplenocitos estimulados con OVA respecto al grupo inmunizado con OVA+Omp16S. Por el contrario la estimulación con OVA no indujo la secreción de IL-4 en los esplenocitos de ninguno de los grupos estudiados en respuesta al antígeno (Figura 11B).

[0050] En cuanto a IL-10 se detectó un leve aumento respecto del control negativo, solo en el grupo inmunizado con OVA+TC (Figura 11C). Entonces, Omp16S como adyuvante administrado por vía nasal genera una respuesta de tipo Th1.

[0051] En los ratones inmunizados con OVA+Omp16S por vía nasal hubo un aumento en el porcentaje de linfocitos T $CD4^+$ pero también de linfocitos T $CD8^+$ anti-OVA que producen IFN- γ a las 3 semanas post-última inmunización. Esta producción fue mayor al grupo control OVA inmunizado por la misma vía sin adyuvante e inclusive mayor al grupo control OVA+TC (Figuras 12 A y B).

[0052] La inmunización con Omp16S como adyuvante nasal indujo la producción de células T $CD4^+$ productoras de IFN- γ antígeno específicas (0,97%) mientras que el grupo inmunizado con TC como adyuvante no indujo una producción diferente al grupo inmunizado con OVA sin adyuvante (OVA+TC 0,23% vs OVA 0,28%). Sin embargo, la inducción en los linfocitos T $CD8^+$ fue aún mayor. Se puede observar un aumento en el grupo OVA+Omp16S (1,08%) significativo en relación al grupo inmunizado con OVA (0,47%) o con OVA+TC (0,22%) (Figuras 12 A y B). Finalmente, estos resultados indican que Omp16S como adyuvante por vía nasal induce la producción de células T de memoria $CD4^+$ y $CD8^+$ productoras de IFN- γ en respuesta al antígeno (OVA).

[0053] El uso de Omp19S y Omp16S como adyuvantes por vía nasal, inducen i) la liberación de citoquinas Th1 en respuesta al antígeno y ii) inducen linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ productores de IFN- γ de memoria antígeno específicos.

[0054] Estas células T productoras de IFN- γ son indispensables en la generación de respuestas inmunes eficientes contra infecciones por patógenos con una fase de su ciclo de vida intracelular (o cuando el patógeno es internalizado por los macrófagos), como virus, bacterias, parásitos y hongos; o tumores. El hecho de que los adyuvantes de la invención induzcan la producción de esta citoquina por parte de los linfocitos T podría ser beneficioso para el desarrollo de vacunas contra este tipo de enfermedades.

[0055] Estos resultados en su conjunto demuestran que la administración de Omp19S u Omp16S como adyuvantes por vía oral o nasal induce la producción de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria que al encuentro con su Ag específico producirían IFN- γ , cualidad muy relevante para un adyuvante o inmunomodulador mucosal.

Estudios utilizando Omp19S u Omp16S por vía parenteral:

[0056] Se estudió la respuesta humoral determinando el título de inmunoglobulinas IgG totales y el perfil de isotipos inducidos (IgG1 e IgG2a) contra OVA cuando es co-inmunizada con Omp19S en comparación con la inmunización de OVA en solución fisiológica (SF) u OVA en CFA. A partir de un ELISA indirecto se determinaron los títulos de IgG total en los sueros de los animales obtenidos 3 semanas luego de la última inmunización en los distintos grupos. En los resultados obtenidos no se observa un aumento significativo de anticuerpos específicos respecto de la inmunización con OVA sin adyuvante (Figura 13), lo que indicaría que Omp19S no tiene un efecto sobre la magnitud de la respuesta humoral desencadenada, mientras que la inmunización con el control positivo Adyuvante de Freund Completo (CFA) genera un incremento en la producción de anticuerpos específicos como era esperable. Omp19S como adyuvante no tiene un efecto sobre la magnitud de la respuesta humoral.

[0057] Al analizar el perfil de isotipos IgG anti-OVA en los animales inmunizados se aprecia que la inoculación con OVA sola o utilizando CFA como adyuvante induce una clara predominancia de anticuerpos IgG1, mientras que utilizando Omp19S como adyuvante esto no sucede (relación IgG1/IgG2a cercana a uno) (Figura 14). Se sabe que una respuesta inmune de tipo Th1 está asociada con una predominancia de anticuerpos IgG2a sobre IgG1, mientras que en el caso de una respuesta Th2 esta relación se invierte (Cramer and Rhyner. Novel vaccines and adjuvants for allergen-specific immunotherapy. Curr Opin Immunol. 18 (6):761-8. 2006).

[0058] Por lo tanto, a pesar de que la inmunización con Omp19S como adyuvante no parece tener un efecto en la magnitud de la respuesta humoral, sí se observa un efecto en el perfil de isotipos específicos inducidos observándose una baja en la relación IgG1/IgG2a, la cual está asociada a una disminución de los anticuerpos IgG1 característicos de una respuesta Th2. Esta reversión en la predominancia IgG1 nos muestra que al utilizar Omp19S como adyuvante se disminuye la producción de anticuerpos de tipo Th2 generada por la inmunización con OVA, estos resultados nos indican que los adyuvantes de la invención pueden ser utilizados para reorientar respuestas linfocitarias de tipo Th2 hacia una de tipo Th1, efecto que podría servir para revertir los cuadros asociados a procesos alérgicos re-direccionando una respuesta Th2 alérgeno-específica hacia una Th1 moduladora.

[0059] Se analizó la reacción local que se genera cuando los ratones Balb/c son inoculados por vía subcutánea con OVA en conjunto con Omp19S o CFA. La toxicidad local fue determinada por alteraciones macroscópicas del tejido subcutáneo. En los animales inoculados con Omp19S junto al antígeno OVA no existen signos tisulares de toxicidad en el sitio de administración, ya que no se observaron alteraciones en el tejido comparado con una zona no inyectada.

[0060] Mientras que en los animales inoculados con el adyuvante de Freund completo hubo una reacción granulomatosa en el sitio de inoculación, dada por la formación de granulomas macrofágicos característicos del empleo de este adyuvante (Figura 15). El CFA posee un mecanismo de acción tipo depósito, insolubilizando el antígeno en el sitio de inyección, lo cual propicia la acumulación de macrófagos junto con otras células, que forman los granulomas macrofágicos característicos evidenciando signos de toxicidad. La preparación de Omp19S con la que se realizan las inmunizaciones es soluble, por lo que no origina la formación de granulomas, lo cual sugiere un mecanismo de acción adyuvante distinto al del CFA. La inmunización con Omp19S como adyuvante no genera reacciones locales adversas en el tejido subcutáneo.

[0061] Para analizar la respuesta celular T *in vivo* se evaluó en los ratones inmunizados por vía subcutánea con : i) OVA, ii) OVA+Omp19S, iii) OVA+Omp16S, iv) OVA+CFA o v) solución fisiológica (SF) la respuesta DTH inducida por la inyección de OVA. Para ello se inyectó OVA (20 μ g) en la almohadilla plantar en una de las patas de los ratones inmunizados y en la otra se inyectó SF como control. Aquellos animales inmunizados con OVA + Omp19S o + Omp16S presentaron un incremento en el pliegue cutáneo plantar con respecto a aquellos animales inmunizados con OVA sin adyuvante a las 48hs. y 72hs. post-inyección de OVA (Figura 16). En conjunto, estos resultados demuestran que Omp19S y Omp16S son capaces de inducir una respuesta celular T *in vivo* similar a la generada con un adyuvante experimental conocido como es el CFA pero sin los efectos adversos que tiene ese poderoso adyuvante.

[0062] Para evaluar la respuesta inmune celular inducida se determinó la capacidad de los esplenocitos de los animales inmunizados de proliferar *in vitro* en respuesta al antígeno. Se cultivaron los esplenocitos en presencia de distintas concentraciones de OVA o medio completo y luego de 5 días se les dio un pulso de ³H-timidina por 18 hs. y se midió la radioactividad incorporada. Los resultados demuestran que la coadministración de OVA con

Omp19S genera un aumento de la respuesta proliferativa en las células de estos ratones con respecto a las de los animales inmunizados solo con OVA (Figura 17). Tanto la estimulación con ConA (resultados no mostrados) como con el control positivo (CFA) produjeron un aumento significativo en la proliferación celular. Estos resultados indican que la utilización de Omp19S como adyuvante tiene un efecto sobre la generación de una eficiente respuesta adaptativa evidenciada por un incremento en la capacidad proliferativa de las células T específicas.

[0063] Para la determinación del tipo de respuesta T helper anti-OVA que se induce con Omp19S como adyuvante por vía parenteral se cultivaron los esplenocitos de los ratones inmunizados en presencia de distintas concentraciones de OVA o medio completo durante 72 hs. y luego se analizó el patrón de citoquinas producidas en los sobrenadantes de estas células. Se realizó un ELISA de captura empleando anticuerpos monoclonales específicos para la detección de IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-17 en los sobrenadantes de cultivo de los esplenocitos estimulados y control.

[0064] Los resultados indican que las células de los animales inmunizados con OVA+Omp19S produjeron niveles significativos de IFN- γ con respecto a los animales control (SF) y a los inmunizados con OVA sin adyuvante (Figura 18), y la secreción de esta citoquina fue antígeno específica y dosis dependiente. El control positivo (CFA) también indujo la producción de niveles de esta citoquina. Omp19S como adyuvante parenteral genera una respuesta de tipo Th1.

[0065] En contraposición a esto, los niveles de IL-4 producidos no presentaron diferencias significativas en los distintos grupos, si bien hubo un aumento de esta citoquina en respuesta al estímulo con OVA comparada con las células del grupo SF, los niveles fueron similares en los animales inoculados solo con OVA, OVA+Omp19S y OVA+CFA (Figura 19A). De modo similar, la producción de IL-10 en las células de bazo no presenta diferencias entre los diferentes grupos, si bien existe un incremento respecto del grupo SF en todos los casos (Figura 19B). Lo que nos indicaría que la producción antígeno específica de IL-4 e IL-10 no es un efecto de los adyuvantes sino que es característica de este antígeno. La estimulación con mitógeno control (ConA) produjo niveles significativos de todas las citoquinas analizadas. En vistas de estos resultados, el patrón de citoquinas presentado nos sugiere que la respuesta desencadenada con la inmunización con Omp19S como adyuvante se corresponde con un perfil Th1, en la que existe un incremento de la producción de IFN- γ y no así de IL-4 e IL-10.

[0066] Estas células T productoras de IFN- γ antígeno específicas son indispensables en la generación de respuestas inmunes eficientes contra infecciones por patógenos con alguna fase de su ciclo de vida intracelular (o cuando el patógeno es internalizado por los macrófagos), como virus, bacterias, parásitos y hongos; o tumores. El hecho de que el adyuvante induzca la producción de estas citoquinas por parte de los linfocitos T podría ser beneficioso para el desarrollo de vacunas contra este tipo de enfermedades. Dado que los adyuvantes de la invención inducen respuestas Th1 podrían utilizarse en preparaciones vacunales contra dichos patógenos.

[0067] Luego de analizar la respuesta de los linfocitos Th1 y Th2 y para continuar caracterizando el tipo de respuesta inmune se evaluó la contribución de la población de células Th17 en la respuesta desencadenada. Para ello, se midió en los sobrenadantes de los cultivos los niveles de IL-17 producidos en respuesta al estímulo (Figura 20). Los resultados indicaron que luego de la inmunización con Omp19S + OVA se genera una respuesta Th17 dosis dependiente ante la estimulación *in vitro* con el antígeno.

[0068] El análisis de las respuestas inmunes de las células T CD8⁺ en animales normales está restringido por la baja frecuencia de estas células que responden a un epítopo en particular. Los ratones transgénicos para el receptor T han sido usados experimentalmente como una fuente de células T con una especificidad definida. Uno de los modelos más ampliamente usados son los ratones transgénicos OT-1, cuyas células T CD8⁺ expresan el receptor T específico para el péptido SIINFEKL de OVA presentado en el contexto de moléculas coestimuladoras MHC I (H-2K^b) (Harmala, Ingulli, Curtsinger, Lucido, Schmidt, Weigel, Blazar, Mescher and Pennell. The adjuvant effects of Mycobacterium tuberculosis heat shock protein 70 result from the rapid and prolonged activation of antigen-specific CD8⁺ T cells in vivo. J Immunol. 169 (10):5622-9. 2002).

[0069] Se utilizaron estos ratones para el análisis *in vivo* de la respuesta inmune adaptativa T CD8⁺ frente al antígeno.

[0070] Para caracterizar la respuesta T CD8⁺ específica en presencia o ausencia de los adyuvantes de la invención, se realizó una transferencia adoptiva a ratones C57BL/6 por vía endovenosa con células de bazo y ganglios linfáticos marcados con CFSE de ratones OT-1. Al día siguiente se los inoculó por vía s.c. con OVA con los adyuvantes Omp19S, Omp19S PK (Omp19S tratado con proteinasa K), lipopolisacárido (LPS) o SF. Cinco días después se midió en bazo y ganglios linfáticos drenantes de ratones inmunizados el número de células OT-1 marcadas con CFSE por citometría de flujo.

[0071] En los animales control inoculados con SF se observaron porcentajes menores de división celular de las células CD8⁺ específicas marcadas con CFSE. En los animales inmunizados con OVA más el adyuvante Omp19S se observó una mayor proporción de células que sufrieron más de una división que en los ratones inmunizados con OVA sin adyuvante tanto en bazo (Figura 21) como en ganglios linfáticos (Figura 21).

[0072] En bazo, el grupo inmunizado con SF presentó un valor de proliferación de (21,79%), mientras que en el grupo inmunizado con OVA sin adyuvante el porcentaje de células que se dividieron (75,01%) fue menor que al ser inoculada con Omp19S como adyuvante (86,44%). Lo mismo ocurrió con las células de los ganglios linfáticos drenantes. Como control de que el efecto en la respuesta esta dado efectivamente por el adyuvante y no por algún contaminante no proteico como el LPS, se inmunizó a los animales con dicho adyuvante degradado. Se

observó que la inmunización con el adyuvante degradado con proteinasa K indujo niveles de proliferación comparables a los de la inoculación de OVA sin adyuvante. Las células OT-1 de los animales inmunizados con el control positivo (LPS) presentaron niveles de proliferación comparables a los del grupo inmunizado con Omp19S como adyuvante.

[0073] Estos resultados indican que la inmunización con Omp19S como adyuvante induce una mayor activación de las células T CD8⁺ específicas para OVA aumentando la capacidad proliferativa de estas células, evidenciando la generación de una eficiente respuesta inmune adaptativa T CD8⁺ frente al antígeno.

[0074] Luego de observar que existía una eficiente respuesta celular T CD8⁺ antígeno específica inducida por el adyuvante de la invención se evaluó si las células CD8⁺ eran capaces de inducir niveles significativos de IFN- γ , característico de una respuesta de tipo T helper 1. Para ello, ratones C57BL/6 fueron inmunizados con: i) OVA ii) OVA+Omp19S, u iii) OVA+Omp19S PK por vía s.c. Siete días después se extrajeron los bazo de los animales, posteriormente los esplenocitos fueron estimulados con medio de cultivo, OVA 500 μ g/ml+Péptido SIINFEKL 5 μ g/ml+APC MO5 o Pma-Ionomicina y se midió la producción de IFN- γ intracelular mediante citometría de flujo.

[0075] Las población de células CD8⁺ productora de IFN- γ es mayor en los ratones inmunizados utilizando Omp19S como adyuvante de OVA (0.73%) ante la estimulación *in vitro* con OVA en comparación a las células provenientes de los animales inmunizados con OVA sola, cuyo porcentaje (0.14%) es similar al isotipo. Estos resultados indican que el polipéptido utilizado como adyuvante induce la diferenciación de células T CD8⁺ capaces de producir IFN- γ en respuesta a la estimulación con el antígeno (Figura 22). Efectivamente, se observó que al inmunizar ratones con la proteína degradada (Omp19S PK), la proporción de células que expresan esta citoquina es similar a la del grupo inmunizado con OVA sin adyuvante (0.15%); este resultado confirma que el efecto adyuvante se encuentra en el polipéptido adyuvante. En todos los casos los isotipos presentaron valores similares.

[0076] Estos resultados indican que Omp19S es capaz de inducir la producción de linfocitos T CD8⁺ que secretan IFN- γ en respuesta al antígeno. Estas células CD8⁺ productoras de IFN- γ son indispensables en la generación de respuestas inmunes eficientes contra infecciones por patógenos con alguna fase de su ciclo de vida intracelular como virus, bacterias, parásitos y hongos; o tumores. El hecho de que el adyuvante induzca la producción de esta citoquina por parte de los linfocitos T podría ser beneficioso para el desarrollo de vacunas contra este tipo de enfermedades.

[0077] Dado que se detectó activación y producción de IFN- γ por parte de las células CD8⁺ en respuesta al antígeno OVA en los ratones inmunizados con los adyuvantes de la invención, se investigó también si luego de la inmunización de animales con los adyuvantes de la invención se inducían células citotóxicas Ag específicas. Para ello, se inmunizaron ratones C57BL/6 por vía s.c. y 3 semanas después se llevo a cabo un ensayo de citotoxicidad *in vitro*, en el cual las células blanco (MO5 que expresa OVA o B16 que no expresa OVA) fueron marcadas con ⁵¹Cr y luego incubadas con los esplenocitos de los ratones inmunizados (células efectoras) y se midió en los sobrenadantes la liberación de ⁵¹Cr por parte de las células blanco. Se muestra en la figura 23 que los esplenocitos provenientes de los animales inmunizados con Omp19S u Omp16S como adyuvantes produjeron un mayor porcentaje de lisis respecto de aquellas células provenientes del grupo inmunizado con OVA sin adyuvante. Se utilizó el adyuvante de Freund completo (CFA) como control positivo. Omp19S y Omp16S como adyuvantes inducen una respuesta citotóxica en los esplenocitos de los ratones inmunizados mayor a la inducida por el adyuvante CFA y sin signos de alteraciones en el tejido inmunizado ni otros efectos adversos.

[0078] Se ha demostrado que los polipéptidos Omp19S y Omp16S son de utilidad en formulaciones de vacunas que comprenden cualquier inmunógeno o antígeno cuyo adyuvante es al menos Omp19S y/o Omp16S. Los polipéptidos de la invención son buenos adyuvantes para la generación de respuestas Th1, Th17 y citotóxicas en mucosas mediante su uso tanto por vía nasal como oral y a nivel sistémico luego de la administración parenteral.

[0079] Las respuestas inmunes de células T son consideradas protectivas contra patógenos y tumores. Los adyuvantes de la invención inducen respuestas T productoras de IFN- γ administrados por vía parenteral y de mucosas (nasal y oral) por lo que podrían ser útiles en preparaciones vacunales contra infecciones por patógenos con alguna fase de su ciclo de vida intracelular (o cuando el patógeno es internalizado por los macrófagos) como virus, bacterias, parásitos y hongos; o tumores. También inducen citotoxicidad contra una línea celular tumoral que expresa el antígeno (MO5), por lo cual podrían ser utilizados en vacunas contra tumores.

[0080] Además, dado que por lo general las citoquinas Th1 inhiben a las Th2, se pretende inducir respuestas Th1 contra un alérgeno en vacunas anti-alérgicas, de manera de re-direccionar una respuesta Th2 alérgeno-específica hacia una respuesta Th1 moduladora. Los adyuvantes de la invención pueden ser de utilidad en la modulación de la respuesta a alérgenos.

[0081] Evidencia reciente ha demostrado un rol crítico de las células T productoras de IL-17 en la protección inducida por vacunas en infecciones por patógenos intra y extracelulares. Se ha reportado la generación de respuestas Th1 y Th17 en vacunas contra *Bordetella pertusis*, en donde la población de células Th17 es importante para la eficacia de la protección. Así también, se ha demostrado que IL-17 posee un rol importante en la protección contra *Streptococcus pneumoniae* y *Mycobacterium tuberculosis*. El mecanismo propuesto para la eficacia de las vacunas que inducen la activación de células Th17 es a través de la regulación de quemoquinas.

En este sentido, el empleo de un adyuvante que sea capaz de inducir la producción de esta citoquina sería beneficioso en las vacunas contra este tipo de patógenos. Finalmente, los adyuvantes de la invención podrían utilizarse como inmunomoduladores o activadores de la respuesta inmune en diferentes patologías donde la respuesta inmune esté involucrada.

[0082] Tal como se muestra en la Figura 24 y dado que la expresión de $\alpha 4\beta 7$ dirige a los linfocitos hacia las mucosas efectoras (lámina propia del intestino), estos resultados muestran que Omp19S administrada por vía oral como adyuvante del toxoide tetánico (TT) en una formulación de vacuna induce la migración de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ efectores hacia la mucosa intestinal (lámina propia del intestino delgado).

[0083] Los polipéptidos adyuvantes Omp16S y Omp19S también podrían expresarse *in situ*, siendo administrados como vectores a ADN o ARN. Tal como se muestra en la figura 25, las proteínas Omp16 y Omp19 se expresan correctamente luego de la transfección de células eucariotas con los plásmidos pCI-Omp16S o pCI-Omp19S respectivamente. Este resultado indica que es posible la producción de las proteínas por células eucariotas, pudiendo administrarse vectores de expresión a células eucariotas u a organismos superiores (vertebrados o mamíferos) de tal manera que el adyuvante se exprese *in situ* y ejerza su efecto.

[0084] Continuando con la caracterización del mecanismo por el cual se lleva a cabo el efecto de las adyuvantes de la presente invención, se realizaron ensayos en los que se coincidieron sobrenadantes del extracto estomacal con polipéptidos Omp19S y luego se adicionó BODIPY FL caseína o BODIPY FLOVA (antígenos marcados intramolecularmente de manera tal que no fluorescen cuando están íntegros, pero sí cuando son degradados) en 100 μ l de un buffer de NaHCO₃. Se observó que la presencia del polipéptido Omp19S reduce la degradación del antígeno, efecto similar al observado cuando se emplea un cóctel inhibidor de proteasas de mamíferos (como control de que la actividad enzimática estomacal puede ser inhibida). Tal como se mencionó anteriormente, se observa que la acción del adyuvante de la presente invención comprende, además, un mecanismo inhibitorio de la acción de proteasas, lo que llevaría a un incremento en la vida media del antígeno (Figura 26).

[0085] Estos resultados indican que la inmunización empleando como adyuvante a Omp19S, además de inducir a una mayor respuesta inmunológica, disminuye la degradación del antígeno, de esta manera se podría disminuir la cantidad de Ag que se administra en vacunas para estimular y mantener la respuesta inmune.

[0086] Se realizaron ensayos adicionales con el fin de analizar la acción inhibitoria de proteasas por medio de polipéptidos adyuvantes de la presente invención, con el objetivo de evaluar si el polipéptido Omp19S es capaz de inhibir la degradación por medio de proteasas del estómago de ratones BALB/c de diversos antígenos, tanto eucariotas (BSA, OVA) como bacterianos (BLS, SurA, DnaK), sin limitar el alcance de la presente invención. Cada antígeno se trató con: (i) sobrenadante de extracto de estómago; (ii) sobrenadante de extracto de estómago y Omp19S; (iii) sobrenadante de extracto de estómago y cóctel inhibidor de proteasas de mamíferos (como control de que la actividad enzimática del estómago puede ser inhibida). Estas mezclas de reacción se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) y posterior tinción con Coomassie blue (Figura 27). Estos ensayos demuestran que los polipéptidos adyuvantes de la presente invención tienen actividad de inhibición de la degradación de antígenos, tanto de origen eucariota como bacteriano.

[0087] Con el objeto de ensayar la acción de inhibición de la degradación de los antígenos por parte de las proteasas del estómago se llevó adelante un ensayo *in vivo*, usando como modelo de antígeno a BODIPY FL caseína. Los ratones BALB/c fueron inoculados por vía oral con: (i) buffer de NaHCO₃ (1M, pH8) (Vehículo), (ii) BODIPY FL caseína con Omp19S, (iii) BODIPY FL caseína con aprotinina (un inhibidor de proteasas conocido), (iv) BODIPY FL caseína. Luego de un tiempo de reacción se sacrificaron los ratones y se analizaron los extractos por emisión de fluorescencia observándose una inhibición de la degradación de antígenos por proteasas del estómago *in vivo* (Figura 28).

[0088] A partir de los diferentes ensayos en los cuales se determinó la capacidad de inhibición de la degradación de los antígenos por parte de las proteasas del estómago, se observa un efecto de inhibición de la acción de dichas proteasas de al menos un 30%, preferentemente de al menos un 50%. Entre las proteasas que son inhibidas por la acción de los adyuvantes de la presente invención se encuentran serin proteasas, aspartil proteasas, metaloproteasas y cistein-proteasas.

[0089] Los polipéptidos adyuvantes de la presente invención resultan ser ideales debido a que la capacidad de inhibir la destrucción del Ag por proteasas aumenta su vida media y mejora la inducción de una respuesta inmune. Esto podría significar que se requiera una menor cantidad de Ag para inducir la misma respuesta inmune lo que reduciría los costos de las vacunas.

[0090] Resulta por lo tanto sorprendente que Omp16S y Omp19S actúen como adyuvantes altamente eficiente para antígenos no relacionados con los antígenos de *Brucella*.

[0091] Esta invención se encuentra mejor ilustrada según los siguientes ejemplos, los cuales no deben ser interpretados como una limitación impuesta al alcance de la misma.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Clonado, expresión y caracterización de los polipéptidos Omp19S y Omp16S de *Brucella abortus*

[0092] El polipéptido Omp19S fue clonado sin la secuencia consenso de lipidación en el vector pET22+ con el agregado de una cola de histidinas en el extremo carboxilo terminal (Novagen, Madison, WI, USA), como fue

descrito en (Giambartolomei, Zwerdling, Cassataro, Bruno, Fossati and Philipp. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. J Immunol. 173 (7):4635-42. 2004). Más detalladamente, se diseñaron oligonucleótidos específicos conteniendo los sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *XhoI* en el extremo 5', y región 3' del gen de Omp19 sin el extremo aminoterminal correspondiente a la secuencia del péptido señal y la cisteína aminoterminal:

Omp19

Sentido: 5'CTGGCCATATGCAGAGCTCCCG3' (SEQ ID N° 3)

Antisentido: 5'AAACTCGAGGCGCGACAGCGTCAC3' (SEQ ID N° 4)

[0093] En la reacción de PCR, se utilizó como templado el ADN genómico de *B. abortus* 544. El producto de la reacción de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes de la cepa JM109 y se purificó el ADN plasmídico con un kit comercial (Promega).

[0094] Con esta construcción se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) y se indujo la expresión de la proteína con isopropil-β-D-thiogalactopiranosido (IPTG). El extracto bacteriano se sonicó y la proteína se purificó por cromatografía de afinidad utilizando columnas de níquel (Quiagen, Alemania). Así se obtuvo el polipéptido no lipidado (Omp19S) purificado (SEQ ID N° 1).

[0095] El polipéptido Omp16S fue clonado sin la secuencia consenso de lipidación en el vector pET22+ con el agregado de una cola de histidinas en el extremo carboxilo terminal (Novagen, Madison, WI, USA), como fue descrito en (Giambartolomei *et al.* Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. J Immunol. 173 (7):4635-42. 2004). Más detalladamente, se diseñaron oligonucleótidos específicos conteniendo los sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *XhoI* en el extremo 5', y región 3' del gen de Omp16 sin el extremo aminoterminal correspondiente a la secuencia del péptido señal y la cisteína aminoterminal:

Omp16

Sentido: 5'GTTGCCATATGGCGTCAAAGAA3' (SEQ ID N° 5)

Antisentido: 5'TTGCCGCTCGAGCCGTCGGGCCCC3' (SEQ ID N° 6)

[0096] En la reacción de PCR se utilizó como templado el ADN genómico de *B. abortus* 544. El producto de la reacción de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes de la cepa JM109 y se purificó el ADN plasmídico con un kit comercial (Promega).

[0097] Con esta construcción se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) y se indujo la expresión de la proteína con isopropil-β-D-thiogalactopiranosido (IPTG). El extracto bacteriano se sonicó y la proteína se purificó por cromatografía de afinidad utilizando columnas de níquel (Quiagen, Alemania). Así se obtuvo el polipéptido no lipidado (Omp16S) purificado (SEQ ID N° 2).

[0098] Los polipéptidos no lipidados Omp19S y Omp16S fueron sometidos a una electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS- PAGE), seguido de una tinción con Coomassie blue para monitorear las distintas etapas de purificación. La identidad de los mismos se confirmó mediante un Western Blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-Omp19 y otro anti-Omp16.

[0099] Las posibles trazas de LPS que pudieran contaminar a los polipéptidos purificados se eliminaron utilizando una resina de Polimixina B sepharosa (Sigma-Aldrich). Luego se realizó un ensayo de Limulus Amebocyte Kit (Associates of Cape Cod, Woods Hole, MA) para determinar la cantidad de LPS presente. En todos los experimentos descritos en esta solicitud se utilizaron preparaciones de los polipéptidos recombinantes purificados que contienen <0.25 U de endotoxina/μg de polipéptido.

[0100] La concentración de Omp19S y Omp16S se evaluó mediante el método de ácido bicinconínico (Pierce, Rockford, IL) usando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. Los polipéptidos purificados fueron alicuotados y almacenados a -70°C hasta su uso.

Ejemplo 2: Ensayos de inmunización de animales empleando como adyuvante a Omp19S y Omp16S:

[0101] Se utilizó como antígeno modelo Ovoalbúmina bovina (OVA) purificada y libre de LPS (Sigma-Aldrich).

[0102] Se emplearon ratones hembras de 6 a 8 semanas de edad de la cepa BALB/c (H-2^d) o de la cepa C57BL/6 (H-2^b). Los mismos fueron adquiridos en el bioterio de la Universidad Nacional de La Plata y fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU). Recibieron agua y alimento *ad libitum*.

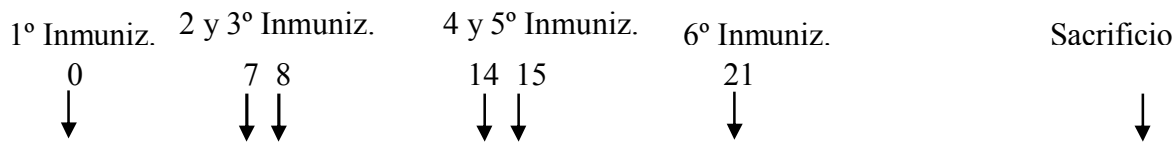
[0103] Se realizaron tres tipos de inmunizaciones: oral, nasal y parenteral.

- Inmunización oral:

[0104] Para la inmunización por vía oral se siguieron dos protocolos, en los cuales se varió la rutina de inyección de los diferentes grupos de ratones. Las dos rutinas de inmunización ensayadas dieron resultados similares.

Rutina 1:

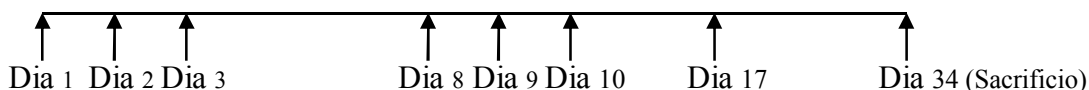
[0105]



[0106] En esta primera rutina los ratones BALB/c fueron inmunizados por vía oral seis veces en los días 0, 7, 8, 14, 15 y 21 con i) 100µg de OVA, ii) 100µg de OVA + 100µg de Omp19S, iii) 100µg de OVA+ 100µg de Omp16S, iv) 100µg de OVA + 10µg de toxina colérica (CT, Sigma) embebidos en un buffer de NaHCO₃ (1M, pH8). Dos semanas después (día 35) de la última inmunización los ratones fueron sacrificados para evaluar la respuesta celular.

Rutina 2:

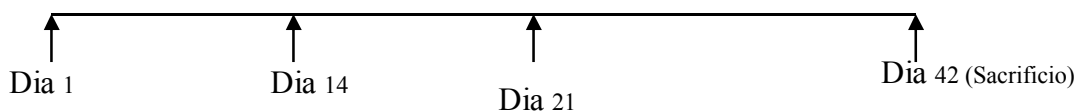
[0107]



[0108] Los ratones BALB/c fueron inmunizados por vía oral seis veces en los días 1, 2, 3, 8, 9 y 10 con i) 100µg de OVA, ii) 100µg de OVA + 150µg de Omp19S, iii) 100µg de OVA+ 150µg de Omp16S, iv) 100µg de OVA + 5µg de toxina colérica (TC, Sigma) embebidos en un buffer de NaHCO₃ (1M, pH8). Una semana después de la última inmunización se les realizó un estudio de respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) (día 17), y tres semanas después de la última inmunización (día 34) los animales fueron sacrificados para evaluar la respuesta celular.

- Inmunización nasal:

[0109]



Los ratones C57BL/6 fueron inmunizados por vía nasal en tres ocasiones cada 7 días con i) 50µg de OVA, ii) 50µg de OVA + 10µg de Omp19S, iii) 50µg de OVA+ 10µg de Omp16S, iv) 50µg de OVA + 1µg de toxina colérica (TC, Sigma). Se inyectaron 12.5 µl por fosa nasal. Tres semanas después de la última inmunización los animales fueron sacrificados para evaluar la respuesta celular.

[0110] Los animales fueron sangrados por vía retroorbital y los sueros fueron guardados a -20°C para la detección de Acs específicos.

- Inmunización parenteral:

[0111] Los animales fueron inmunizados por vía subcutánea (s.c.) en tres ocasiones cada 7 días con i) 100µg de OVA, ii) 100µg de OVA + 100µg de Omp19S, iii) 100µg de OVA+ 100µl de CFA (Sigma–Aldrich) o iv) SF. Tres semanas después de la última inmunización los animales fueron sangrados para obtener los sueros, algunos (5 por grupo) fueron sacrificados para evaluar la respuesta celular y a otros se les realizó DTH (5 por grupo).

Ejemplo 3: Ensayo de evaluación de la actividad de Omp19S y Omp16S:

Respuesta de hipersensibilidad de tipo demorada (DTH):

[0112] Siete días después de la última inmunización los ratones fueron inoculados por vía intradérmica en la almohadilla plantar derecha con 20µg de OVA y con solución fisiológica (SF) en la almohadilla plantar izquierda. Se evaluó la respuesta midiendo el incremento en el pliegue cutáneo plantar derecho respecto al izquierdo, utilizando un calibre digital de 0,01mm de precisión a las 48 hs y 72 hs luego de la inoculación.

Obtención de esplenocitos de ratones:

[0113] Los ratones anestesiados con éter se sangraron a blanco por el plexo retroorbital y fueron sacrificados por dislocación cervical. Se practicó una incisión adecuada, abriendo la cavidad peritoneal, para poner en descubierto el bazo, el cual se extrajo con pinzas y tijeras en condiciones asépticas. Se trituró el bazo en fragmentos pequeños usando una tijera de punta curva. Se agregaron 3 ml de RPMI 1640 (Gibco) y se homogeneizó. La suspensión se llevó a 8 ml y se filtró en malla de acero para retener los detritos celulares y restos de tejidos. Luego se realizó un lavado con RPMI 1640, y las células se resuspendieron en medio de cultivo completo (RPMI 1640 con el agregado de 10 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco), 2mM de L–glutamina y piruvato, 25 mM de HEPES, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin).

Obtención de linfocitos de ganglios mesentéricos de ratones:

[0114] Los ratones anestesiados con éter se sangraron a blanco por el plexo retroorbital y fueron sacrificados por dislocación cervical. Se practicó una incisión adecuada, abriendo la cavidad peritoneal, para poner en descubierto los ganglios mesentéricos, los cuales se extrajeron con pinzas y tijeras en condiciones asépticas. Luego se incubaron con colagenasa (2.5mg/ml) durante 30 minutos. A continuación se retiró la colagenasa y se trituraron los ganglios en fragmentos pequeños usando una tijera de punta curva. Se agregaron 3 ml de RPMI 1640 (Gibco) y se homogeneizó. La suspensión se llevó a 8 ml y se filtró en malla de acero para retener los detritos celulares y restos de tejidos. Luego se realizó un lavado con RPMI 1640, y las células se resuspendieron

en medio de cultivo completo (RPMI 1640 con el agregado de 10 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco), 2mM de L-glutamina y piruvato, 25 mM de HEPES, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin).

Recuento de células viables:

[0115] Para determinar el número de células viables se utilizó el método de exclusión de Azul de Tripán. Se preparó una solución de Azul de Tripán 0.2% en PBS. Se tomaron 50 µl de la suspensión a contar y se agregaron 50 µl de Azul de Tripán. Se cargó en una cámara de Neubauer y se determinó el número de células viables al microscopio óptico.

Estimulación celular:

[0116] Se cultivaron esplenocitos (4×10^6 células/ml) de los ratones inmunizados en presencia de OVA (100 y 1000 µg /ml), medio completo, o mitógeno control (Concanavalina A, 5 µg /ml) en placas de 48 pocillos. Los cultivos se realizaron en una estufa a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 72hs para los ratones BALB/c y 5 días para los C57BL/6. Los sobrenadantes de estas células fueron utilizados para determinación de citoquinas secretadas por ELISA.

ELISA de captura para la detección de citoquinas:

[0117] Se realizó un ELISA de captura empleando Acs monoclonales específicos para la detección de IFN-γ, IL-2, IL-10, IL-4 (OptEIA™, PharMingen, San Diego, USA) e IL-17 (Mouse IL-17 Quantikine, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) en los sobrenadantes de cultivo de los esplenocitos estimulados y control. El protocolo se realizó según las instrucciones del fabricante.

Ensayo de proliferación in vitro:

[0118] Los esplenocitos de los ratones inmunizados (2×10^5 células/ml) fueron cultivados por triplicado en presencia de OVA (100 y 1000 µg /ml), medio completo o mitógeno control (Concanavalina A, 5 µg /ml) en placas de 96 pocillos. Los cultivos se realizaron en una estufa a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. A los 5 días se les dio un pulso de timidina tritiada (1 µCi/well) y 18 hs. después se cosecharon las células y se midió la incorporación de timidina radioactiva con un contador beta expresada en cuentas por minuto. Los resultados fueron expresados en índice de estimulación SI (cpmOVA/cpmRPMI). Se considera significativo un SI >2.

Determinación de IFN-γ intracelular en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺:

Células presentadoras de antígeno (APC) A20J y MO5

[0119] Se crecieron células A20J (linfoma B de ratón, singénico con BALB/c, ATCC TIB208) en medio de cultivo completo (RPMI 1640 con el agregado de 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco), 2mM de L-glutamina y piruvato, 25 mM de HEPES, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin) durante dos días. Estas células fueron estimuladas con OVA 10 µg/ml un día antes del ensayo, las llamaremos A20JOVA. De la misma manera se crecieron células MO5 (células de melanoma B16 singeneicas con C57BL/6 y transfectadas en forma estable con un plásmido que expresa OVA) para ser utilizadas como células presentadoras de OVA, en medio completo suplementado con 1mg/ml de geneticina.

[0120] Mediante microscopía se observó que el estado y el número de las células sea óptimo para su utilización. Estas células fueron tratadas con Mitomicina C (25 µg/ml, Sigma) a 37°C durante 30 min., lavadas con RPMI en 3 ocasiones y resuspendidas en medio de cultivo completo.

- Esplenocitos de bazo de ratón

[0121] Se cultivaron en botellas T25 pools de esplenocitos de ratón correspondientes a cada grupo de inmunización, en medio de cultivo completo. Al día siguiente se cultivaron en una placa de 6 wells 8×10^6 células/ml, en 1ml medio completo suplementado con IL-2 recombinante (10 U/ml). Posteriormente, fueron agregados los estímulos enumerados a continuación.

- Estímulos

[0122] Para cada grupo de ratones inmunizados, se realizaron los siguientes estímulos:

(a) Control negativo: medio de cultivo completo con el agregado de IL-2 de ratón recombinante (10 U/ml) (PeproTech. Inc., Rocky Hill, USA)

(b) Estímulo antigénico

i- En el caso de los animales BALB/c se utilizó OVA 500µg/ml + péptido de OVA ₃₂₃₋₃₃₉ KISQAVHAAHAEINEAGOVA restringido a MHC-II (1µg/ml) + células A20JOVA tratadas con mitomicina en relación 25 esplenocitos:1 APC, todo resuspendido en 1ml de medio de cultivo completo suplementado con IL-2 recombinante.

ii- En el caso de los animales C57BL/6 se utilizó OVA 500µg/ml + péptido de OVA ₂₅₇₋₂₆₄ SIINFEKL restringido a MHC-I (0.5µg/ml) + células presentadoras MO5 en relación 25 esplenocitos:1 APC, todo resuspendido en 1ml de medio de cultivo completo suplementado con IL-2 recombinante.

c) Control positivo, estímulo mitogénico. PMA 20ng/ml + Iono 0.75µg/ml, ambos resuspendidos en 1ml de medio de cultivo completo suplementado con IL-2 recombinante.

[0123] Luego de incubar 18hs con los diferentes estímulos, se agregó a cada uno de los estímulos 10 µg/ml de Brefeldina A (Sigma) y se incubaron 6 hs. Luego del período de incubación se levantaron los esplenocitos y se separaron en dos tubos (uno para isotipo y otro para la marcación con IFN-γ) para la posterior marcación con anticuerpos para realizar estudios de citometría.

Marcación de subtipos celulares e IFN-γ

[0124] Los esplenocitos estimulados y control fueron incubados durante 30 min. a 4 °C con Acs monoclonales específicos anti-CD4 de ratón marcado con PE-Cy5.5 y anti-CD8 de ratón marcado con Alexa fluor 647 (BD Biosciences, San José, CA). Luego fueron lavados con PBS y seguidamente fijados mediante el tratamiento durante 20 min. a temperatura ambiente con una solución de paraformaldehído al 4%. Luego de un lavado con PBS fueron permeabilizados por tratamiento con buffer de permeabilización (saponina 2%, SFB 10% en PBS) durante 30 min. Las células así permeabilizadas, fueron centrifugadas a 600g por 5 min., y tratadas con un Ac específico anti-IFN-γ de ratón marcado con PE durante 30 min. Para todos los tratamientos se realizaron marcaciones en paralelo con Acs marcados con los mismos fluorocromos pero de especificidad irrelevante como controles de isotipo. Luego de lavadas, las células fueron resuspendidas en PBS y finalmente analizadas mediante un citómetro de flujo (BD FACSCalibur) y los resultados se analizaron utilizando el programa FlowJo (Versión 5.7.2).

Determinación del marcador α4β7 en linfocitos de ganglios mesentéricos:

[0125] Luego de obtener las células de este órgano según el protocolo comentado anteriormente, se armaron pooles según el grupo de inmunización. De cada uno de ellos, se tomaron 2×10^6 células, y se marcaron con anti-CD4 de ratón marcado con FITC, anti-CD8 de ratón marcado con PE-Cy5.5 y anti-α4β7 de ratón marcado con PE (BD Biosciences, San Jose, CA). Posteriormente, las células fueron fijadas con 100 µl de paraformaldehído al 4%, y seguidamente fueron analizadas por citómetro de flujo (BD FACSCalibur) y los resultados se analizaron utilizando el programa FlowJo (Versión 5.7.2).

"Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" (ELISA) indirecto para la detección de Acs específicos:

[0126] Para realizar el ELISA se utilizaron placas de poliestireno (Maxisorp, NUNC, Dinamarca). Las placas fueron sensibilizadas con 1 µg de OVA por pocillo y bloqueadas con 200 ml de leche descremada (Molico) al 3% en buffer PBS. Luego las placas se incubaron con diluciones seriadas de los sueros y se revelaron con anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados a HRP. Para la determinación de los isotipos específicos se incubaron las placas con anticuerpos específicos para los isotipos de Ig de ratón, IgG1 e IgG2a, conjugados a HRP (Santa Cruz). Las incubaciones se realizaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Como diluyente de sueros y conjugados se empleó leche descremada en polvo al 1%, Tween 0.05% en PBS. Luego de cada incubación la placa fue lavada 3 veces con PBS-Tween 0.05%. El ELISA se reveló con 2 mg/ml de orto fenilendiamina y 0.03% de H₂O₂ en buffer fosfato/citrato 0.1M. La reacción se detuvo entre los 15 y 30 minutos de incubación con 50 ml de H₂SO₄ 4N. Las densidades ópticas desarrolladas se determinaron a 492 nm en un lector de microplacas Metertech Σ 960. Para determinar el título de anticuerpos se ensayaron 20 sueros de ratones normales a una dilución 1/100, determinándose el valor de corte (cut-off) como el valor promedio de sus absorbancias más tres desvíos estándar. El título de anticuerpos se calculó como la última dilución que resultó ser mayor que el valor de "cut-off".

Ensayo de Citotoxicidad

Células blanco:

[0127] Se utilizaron como blanco células MO5 (células de melanoma B16 singeneicas con C57BL6 y transfectadas en forma estable con un plásmido que expresa OVA) cultivadas en medio completo + suplementado con 1mg/ml de geneticina. Como control se usaron células B16 (células de melanoma no transfectadas con plásmido de OVA).

Células estimuladoras:

[0128] Se utilizaron como estímulo células MO5 cultivadas en medio completo + suplementado con 1mg/ml de geneticina, las cuales fueron preincubadas con 10 µg de OVA durante 18 hs y luego tratadas con mitomicina C (25 µg/ml) a 37°C durante 30 min, lavadas con RPMI en 23 ocasiones y resuspendidas en medio completo.

Células efectoras:

[0129] Las células efectoras fueron los esplenocitos de los ratones inmunizados y control (2.5×10^7 células totales) previamente estimulados durante 5 días con las células estimuladoras descriptas (0.5×10^6 células) en medio completo + 10U/ml de IL-2 recombinante.

Marcación de las células blanco:

[0130] Se incubaron las células blanco con cromato de sodio radioactivo en solución acuosa (Cr51, Amersham Biosciences) a razón de 0.1mCi/ 1×10^6 células, durante 1 h en baño de agua a 37°C y luego se lavaron 3 veces con RPMI.

Ensayo:

[0131] Se incubaron las células blanco con distintas cantidades de células efectoras (relación 100:1, 50:1) durante 6 hs en estufa a 37°C. Posteriormente se cosecharon 100 µl de los sobrenadantes de cultivo y se cuantificó la radiación en un contador γ (Clinigamma, LKB, Wallac, Turku, Finland). Los resultados obtenidos fueron transformados en % lisis utilizando la fórmula:

$$\% \text{ de lisis} = \frac{\text{cpm}_x + \text{cpm}_{LE}}{\text{cpm}_{\text{max}} - \text{cpm}_{LE}}$$

Donde:

×: muestra

LE: liberación espontánea de las células blanco al ser incubadas sin células efectoras

max: liberación máxima, que se determinó incubando las células blanco con Triton X-100 1%.

Ejemplo 4: Experimentos que muestran la actividad adyuvante de Omp19S realizados en ratones transgénicos:

[0132] Ratones de las cepas OT-1, cuyas células T CD8⁺ expresan el receptor T específico para el péptido SIINFEKL de Ovoalbúmina bovina (OVA), fueron utilizados como donantes de células T CD8⁺ antígeno específicas. Estos ratones fueron comprados al Jackson Laboratory y traídos al país por el Dr. Fernando Goldbaum, quien gentilmente nos ha ofrecido esta cepa. Ratones C57BL/6 singeneicos adquiridos en el bioterio de la Universidad Nacional de La Plata fueron utilizados como receptores de las células provenientes de los animales OT-1. Todos los ratones recibieron agua y alimento *ad libitum* y fueron mantenidos bajo condiciones libres de patógenos.

[0133] Se utilizó como antígeno modelo Ovoalbúmina bovina (OVA) purificada y libre de LPS (Sigma-Aldrich) tal como se describió en el Ejemplo 1. En todos los experimentos descriptos se utilizaron preparaciones de los polipéptidos recombinantes purificados que contienen <0.25 U de endotoxina/μg de polipéptido.

[0134] En algunos experimentos se digirió el polipéptido con proteinasa K como control. Para ello, Omp19S fue tratada con proteinasa K-agarosa de *trichirachium album* (Sigma Aldrich) durante 2hs a 37°C siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, la resina fue centrifugada y los sobrenadantes fueron incubados por 1h a 60°C con el fin de inactivar cualquier traza de enzima que se pudiera haber solubilizado. Luego se chequeó la digestión por SDS-PAGE y posterior tinción con Coomassie blue. El polipéptido así tratado (Omp19S PK) se utilizó como control de que el efecto adyuvante es inducido por dicho polipéptido.

Transferencia adoptiva de células de ratones OT1 e inmunización:

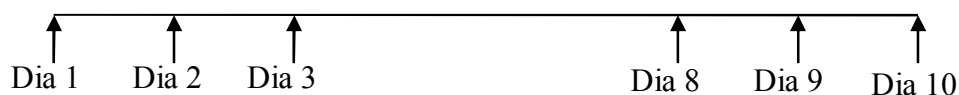
[0135] Se obtuvieron células CD8⁺ específicas para OVA a partir de bazo y ganglios linfáticos de los ratones OT-1 las cuales fueron purificadas por selección negativa utilizando el kit de enriquecimiento de linfocitos T CD8⁺ de ratón (BD Imag) y luego marcadas con 5μM de CFSE a 37°C durante 15 minutos. El carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE) (Molecular Probes) libre fue templado adicionando buffer fosfato salino (PBS) 10% SFB. Posteriormente las células marcadas fueron lavadas con PBS y resuspendidas en un volumen de 0.1 ml. Luego las células fueron inyectadas vía intravenosa (i.v.) en las venas laterales de la cola de los animales. Un día después, los animales fueron inoculados por vía subcutánea (s.c.) con: i) OVA 60μg, ii) OVA 60μg + Omp19S 100μg, iii) OVA 60 μg + Omp19S PK 100μg, iv) OVA + LPS (Sigma Aldrich) 10μg como control, o v) PBS.

Ensayo de proliferación *in vivo*:

[0136] Cinco días después de la inmunización los animales que recibieron las células provenientes de los OT-1 fueron sacrificados. Se extrajeron los bazos y ganglios linfáticos drenantes (inguinales y axilares) y se determinó el número de células T CD8⁺ antígeno específicas marcadas con CFSE por citometría de flujo (BD FACSArialII). Los resultados se analizaron utilizando el programa FlowJow (Versión 5.7.2).

Ejemplo 5: Omp19S como adyuvante en formulaciones de vacunas:

[0137] Se realizaron 6 inmunizaciones por vía oral con i) TT (toxoides tetánico) 100 Lf, ii) TT 100 Lf + Omp19S 150μg, o iii) TT 100 Lf + TC 5μg según el siguiente esquema:



[0138] Los ratones fueron sacrificados a las tres semanas luego de la última inmunización y se analizó en ganglios mesentéricos el porcentaje de células T que expresan el marcador α4β7.

Ejemplo 6: Clonado de los genes codificantes para Omp16S y Omp19S en un vector de expresión eucariota:

Diseño de los cebadores:

[0139] Los oligonucleótidos cebadores fueron diseñados a partir de la secuencia nucleotídica de Omp16 y Omp19 (Genbank Omp16: ACCESSION L27996. Omp19: ACCESSION L27997). Los cebadores contienen sitios de restricción XhoI y XbaI (en negrita). A todos los "primers" se les agregó la secuencia Kozak de conocida eficacia para la transcripción en eucariotas (subrayado en la secuencia).

Omp16S:

"Sentido": 5' **CTC CTC** GAG ACC ACC ATG GCG TCA AAG AA 3' (SEQ ID N° 7)

"Antisentido": 5' TTG **TCT AGA** TTA CCG TCC GGC CCC GTT GA 3' (SEQ ID N° 8)

Omp19S:

"Sentido": 5' GGC ATT **CTC GAG** ACC ACC ATG CAG AGC TCC 3' (SEQ ID N° 9).

"Antisentido": 5' TTT **TCT AGA** TCA GCG CGA CAG CGT CAC 3' (SEQ ID N° 10).

Clonado:

[0140] Se amplificaron los genes de interés por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los "primers" correspondientes con una temperatura de "annealing" de 55° C y usando como templado el ADN

genómico de *Brucella*. Para clonar Omp16S y Omp19S se utilizó el vector pCI-Neo (Promega). Este vector fue digerido con XhoI y XbaI y luego repurificado por el método de fenol: cloroformo. Los productos de amplificación de las PCRs fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes. Todos los productos de amplificación de las PCRs fueron repurificados por Wizard PCR Preps (Promega, Madison, WI, USA). Las reacciones de ligación fueron realizadas a 4°C durante toda la noche en presencia de la enzima ligasa de DNA T4 (Promega), 1 µl del plásmido digerido (pCI) y 2 µl del inserto correspondiente digerido. Luego se transformaron células competentes *E. coli* JM109 (Promega), empleando el método de $CaCl_2$ con 5 µl de la reacción de ligación. Las bacterias transformadas se seleccionaron, creciéndolas a 37°C en placas de LB con ampicilina (25 µg/ml). Para determinar que colonias contenían el plásmido con el inserto adecuado, se realizó un "screening" por el método de "colony PCR".

Expresión *in vitro*:

Transfección transiente de células COS-7

[0141] Para evaluar la expresión *in vitro* de los plásmidos en células eucariotes se transfectaron células COS-7 (ATCC, CRL1651, Rockville, MD, USA) por el método de liposomas con 2 µg de las siguientes construcciones: pCI-Omp16S, pCI-Omp19S, o el vector pCI (como control) y 20 µl de Lipofectamina (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) siguiendo el protocolo del proveedor.

Expresión de Omp16S y Omp19S en células COS-7

[0142] La expresión de los plásmidos fue estudiada a las 24 y 48 horas luego de la transfección (expresión transitoria) en extractos proteicos totales. Se analizó por Western Blot, utilizando distintos anticuerpos monoclonales: anti-Omp16 o anti-Omp19 y se reveló empleando un kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham Pharmacia, Uppsala, Suecia).

Ejemplo 7: Inhibición de la actividad enzimática del estómago *in vitro*.

Ensayo fluorométrico:

Sustratos:

[0143] Se utilizaron como antígenos modelo BODIPY FL Ovoalbúmina bovina (OVA) y BODIPY FL Caseína. Ambos antígenos están marcados intramolecularmente de modo que no fluorescen cuando están íntegros, pero sí cuando son degradados (EnzChek® Protease Assay Kit "green fluorescence", Molecular probes).

[0144] Se emplearon ratones hembras de 6 a 8 semanas de edad de la cepa BALB/c (H-2d). Los mismos fueron adquiridos en el bioterio de la Universidad Nacional de la Plata y fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU). Recibieron agua y alimento *ad libitum*.

Obtención de los estómagos de ratón

[0145] Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se practicó una incisión adecuada, abriendo la cavidad peritoneal, para poner en descubierto el estómago que se extrajo con pinzas y tijeras en condiciones asépticas.

Procesamiento de los estómagos de ratón

[0146] Los estómagos fueron disgregados primero con pinzas y tijeras y los trozos obtenidos se transfirieron a un pote y se embebieron en un buffer de $NaHCO_3$ (1M, pH8) para completar la disgregación. Los extractos obtenidos fueron centrifugados a 10.000xg y los sobrenadantes utilizados para realizar el ensayo.

Ensayo:

[0147] Control negativo: BODIPY FL Caseína o BODIPY FL OVA (10 µg/ml) en un buffer de $NaHCO_3$ (1M, pH8).

[0148] Evaluación de la actividad inhibitoria de Omp19S: se coincubaron los estómagos con Omp19S (100 µg/ml) durante 30 min y luego con BODIPY FL Caseína o BODIPY FL OVA en 100 µl de un buffer de $NaHCO_3$.

Otros controles:

[0149] Autofluorescencia del estómago: estómago en 100 µl de un buffer de $NaHCO_3$.

[0150] Determinación de que la actividad enzimática del estómago puede degradar Caseína u OVA: se coincubaron los estómagos con BODIPY FL Caseína o BODIPY FL OVA (10 µg/ml en 100 µl de un buffer de $NaHCO_3$.

[0151] Determinación de que la actividad enzimática del estómago puede ser inhibida: se coincubaron los estómagos con un cóctel inhibidor de proteasas de mamíferos (Sigma) durante 30 min y luego con BODIPY FL Caseína o BODIPY FL OVA (10 µg/ml) en 100 µl de un buffer de $NaHCO_3$.

[0152] Control positivo: BODIPY FL Caseína o BODIPY FL OVA (10 µg/ml) en un buffer de $NaHCO_3$ (1M, pH8) tratadas con proteinasa K (Sigma).

[0153] Para evaluar los niveles de fluorescencia las mezclas de reacción fueron transferidas a placas de 96 pocillos opacas negras (baja autofluorescencia) (Costar). La emisión de fluorescencia fue realizada en un lector de placas Victor3, Perkin Elmer, Waltham, MA

Ejemplo 8: Inhibición de la degradación de diferentes antígenos eucariotas o bacterianos por enzimas del estómago.

[0154] Antígenos eucariotas: Ovoalbúmina bovina (OVA), Albúmina bovina sérica (BSA).

[0155] Antígenos bacterianos: Lumazina sintética de *Brucella* recombinante (BLS), Chaperona de *Brucella* recombinante (DnaK) y la peptidil proil cis trans isomerasa de *Brucella* recombinante (SurA).

Ensayo:

[0156] Se realizaron las siguientes mezclas de reacción y se incubaron durante 1 hora a 37°C:

- (i) 5 µg de cada antígeno (OVA, BSA, BLS, DnaK o SurA)
- (ii) 5 µg de cada antígeno (OVA, BSA, BLS, DnaK o SurA) con 0,1 µg de sobrenadante de extracto de estómago.
- (iii) 5 µg de cada antígeno (OVA, BSA, BLS, DnaK o SurA) con 0,1 µg de sobrenadante de extracto de estómago y 0,3 µg de Omp19S.
- (iv) 5 µg de cada antígeno (OVA, BSA, BLS, DnaK o SurA) con 0,1 µg de sobrenadante de extracto de estómago y cóctel inhibidor de proteasas de mamífero (Sigma).

[0157] Luego de la incubación, cada mezcla de reacción fue sometida a una electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) y posterior tinción con Coomassie blue.

Ejemplo 9: La coadministración de Omp19S inhibe la degradación de antígenos por proteasas del estómago *in vivo*

[0158] Se utilizó como antígeno modelo BODIPY FL Caseína (EnzChek® Protease Assay Kit "green fluorescence", Molecular probes).

[0159] Se emplearon ratones hembras de 6 a 8 semanas de edad de la cepa BALB/c (H-2d). Los mismos fueron adquiridos en el bioterio de la Univesidad Nacional de la Plata y fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU). Recibieron agua y alimento *ad libitum*.

[0160] Se realizaron las siguientes inoculaciones por vía oral:

- i) Vehículo: 200 µg buffer de NaHCO₃ (1M, pH8).
- ii) 100 µg de BODIPY FL Caseína com 100 µg de Omp19S.
- iii) 100 µg de BODIPY FL Caseína con 100 µg de aprotinina.
- iv) BODIPY FL Caseína.

[0161] Transcurridos 15 min. de la inoculación los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajeron y procesaron los estómagos.

[0162] Los sobrenadantes de los extractos de los estómagos obtenidos fueron transferidos a placas de 96 pocillos opacas negras (baja autofluorescencia) (Costar). La emisión de fluorescencia fue realizada en un lector de placas Victor3, Perkin Elmer, Walthman, MA.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0163]

<110> CONICET
 CONICET, CONICET
 5 <120> Adyuvante para vacunas, vacunas que lo comprenden y usos
 <130> CONICET
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 10 <211> 157
 <212> PRT
 <213> *Brucella abortus*
 <400> 1

 15 Met Gln Ser Ser Arg Leu Gly Asn Leu Asp Asn Val Ser Pro Pro Pro
 1 5 10 15

 Pro Pro Ala Pro Val Asn Ala Val Pro Ala Gly Thr Val Gln Lys Gly
 20 20 25 30

 Asn Leu Asp Ser Pro Thr Gln Phe Pro Asn Ala Pro Ser Thr Asp Met
 35 40 45

 Ser Ala Gln Ser Gly Thr Gln Val Ala Ser Leu Pro Pro Ala Ser Ala
 25 50 55 60

 Pro Asp Leu Thr Pro Gly Ala Val Ala Gly Val Trp Asn Ala Ser Leu
 65 70 75 80

 30 Gly Gly Gln Ser Cys Lys Ile Ala Thr Pro Gln Thr Lys Tyr Gly Gln
 85 90 95

 Gly Tyr Arg Ala Gly Pro Leu Arg Cys Pro Gly Glu Leu Ala Asn Leu
 100 105 110
 35

 Ala Ser Trp Ala Val Asn Gly Lys Gln Leu Val Leu Tyr Asp Ala Asn
 115 120 125

 40 Gly Gly Thr Val Ala Ser Leu Tyr Ser Ser Gly Gln Gly Arg Phe Asp
 130 135 140

 Gly Gln Thr Thr Gly Gly Gln Ala Val Thr Leu Ser Arg
 145 150 155
 45
 <210> 2
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> *Brucella abortus*
 50 <400> 2
 Met Ala Ser Lys Lys Asn Leu Pro Asn Asn Ala Gly Asp Leu Gly Leu
 1 5 10 15

 Gly Ala Gly Ala Ala Thr Pro Gly Ser Ser Gln Asp Phe Thr Val Asn
 55 20 25 30

 Val Gly Asp Arg Ile Phe Phe Asp Leu Asp Ser Ser Leu Ile Arg Ala
 35 40 45

ES 2 542 973 T3

	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Leu	Ser	Lys	Gln	Ala	Gln	Trp	Leu	Gln	Arg	Tyr	
	50						55					60					
5	Pro	Gln	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ile	Glu	Gly	His	Ala	Asp	Glu	Arg	Gly	Thr	
	65					70					75					80	
	Arg	Glu	Tyr	Asn	Leu	Ala	Leu	Gly	Gln	Arg	Arg	Ala	Ala	Ala	Thr	Arg	
				85						90					95		
10	Asp	Phe	Leu	Ala	Ser	Arg	Gly	Val	Pro	Thr	Asn	Arg	Met	Arg	Thr	Ile	
				100					105					110			
15	Ser	Tyr	Gly	Asn	Glu	Arg	Pro	Val	Ala	Val	Cys	Asp	Ala	Asp	Thr	Cys	
			115					120					125				
	Trp	Ser	Gln	Asn	Arg	Arg	Ala	Val	Thr	Val	Leu	Asn	Gly	Ala	Gly	Arg	
		130					135					140					
20	<210> 3																
	<211> 22																
	<212> ADN																
	<213> Secuencia Artificial																
	<220>																
25	<223> cebador sentido Omp19																
	<400> 3																
	ctggccatat gcagagctcc cg																22
30	<210> 4																
	<211> 24																
	<212> ADN																
	<213> Secuencia Artificial																
	<220>																
	<223> cebador antisentido Omp19																
35	<400> 4																
	aaactcgagg cgcgacagcg tcac																24
40	<210> 5																
	<211> 22																
	<212> ADN																
	<213> Secuencia Artificial																
	<220>																
	<223> cebador sentido Omp16																
45	<400> 5																
	gttgccatat ggcgtcaaag aa																22
50	<210> 6																
	<211> 24																
	<212> ADN																
	<213> Secuencia Artificial																
	<220>																
	<223> cebador antisentido Omp16																
55	<400> 6																
	ttgccgctcg agccgtccgg cccc																24
60	<210> 7																
	<211> 29																
	<212> ADN																
	<213> Secuencia Artificial																
	<220>																
	<223> cebador sentido clonado eucariotas Omp16																
	<400> 7																

ES 2 542 973 T3

ctcctcgaga ccacatggc gtcaaagaa 29

5 <210> 8
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador antisentido de clonado en eucariotas Omp16
 <400> 8

10 ttgtctagat taccgtccgg ccccggtga 29

15 <210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador sentido de clonado en eucariotas Omp19
 <400> 9

20 ggattctcg agaccacat gcagagctcc 30

25 <210> 10
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador antisentido de clonado en eucariotas Omp19
 <400> 10

30 tttctagat cagcgcgaca gcgtcac 27

Reivindicaciones

1. Adyuvante para vacunas, **caracterizado porque** el adyuvante comprende un polipéptido no lipidado de la membrana externa (Omp) de bacterias del género *Brucella*, seleccionado del polipéptido no lipidado Omp19S y el polipéptido no lipidado Omp16S.
- 5 2. El adyuvante de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el polipéptido no lipidado comprende la SEQ ID N° 1.
3. El adyuvante de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el polipéptido no lipidado comprende la SEQ ID N° 2.
- 10 4. Una vacuna, **caracterizada porque** comprende un adyuvante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y al menos un antígeno.
5. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizada porque** la vacuna es una vacuna seleccionada del grupo que consiste en vacunas mucosales y parenterales.
6. El adyuvante de la reivindicación 1 para uso como adyuvante para vacunas contra un patógeno.
- 15 7. El adyuvante de la reivindicación 6, en donde el patógeno tiene al menos una fase intracelular en su ciclo de vida.
8. El adyuvante de la reivindicación 6, en donde la vacuna es una vacuna antitumoral.
9. El adyuvante de la reivindicación 1 para uso como adyuvante en una composición inmunomoduladora.

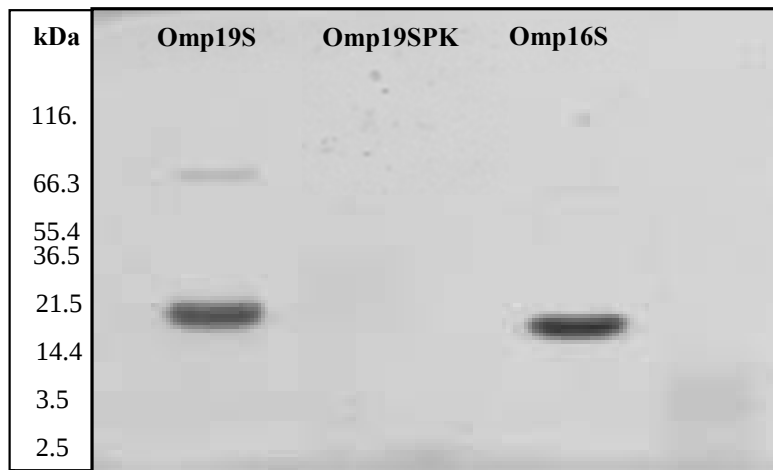


Fig. 1

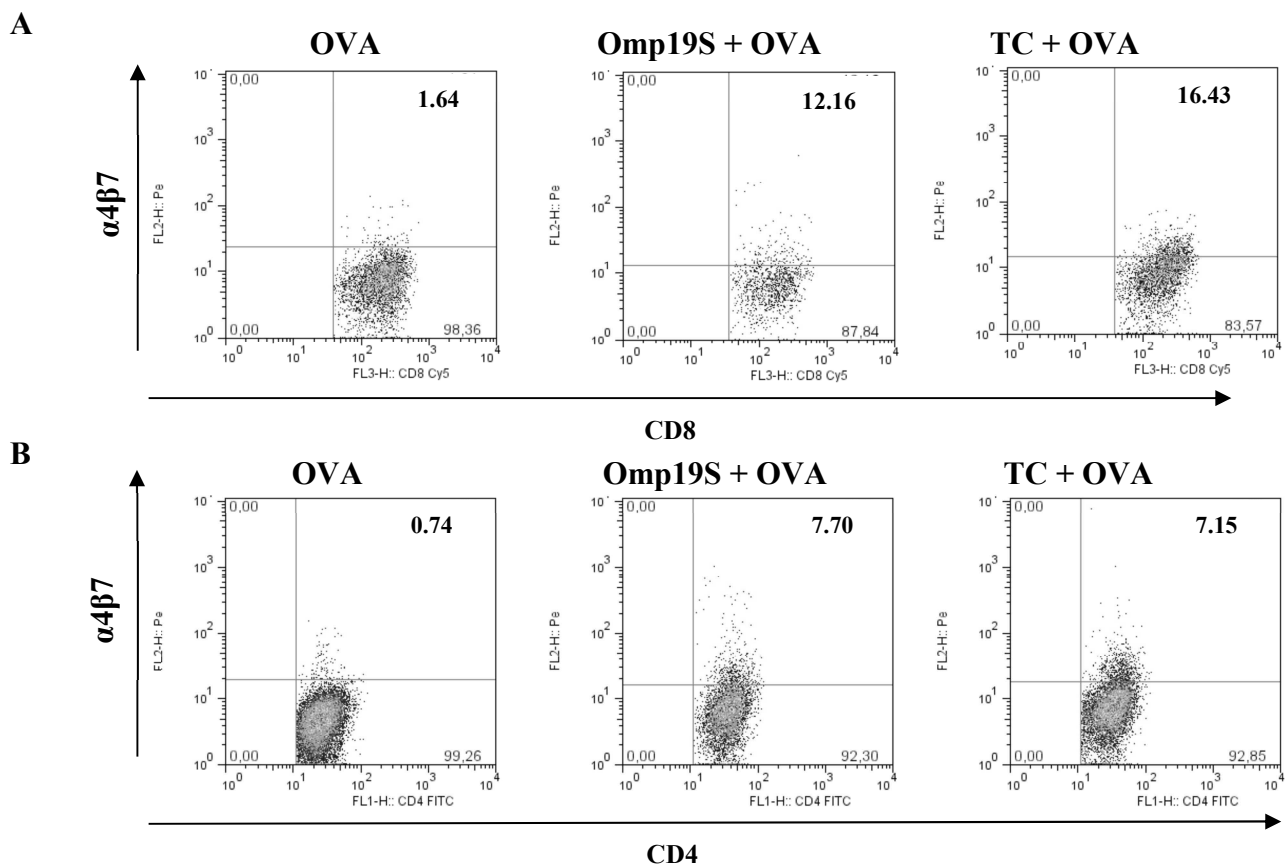


Fig. 2

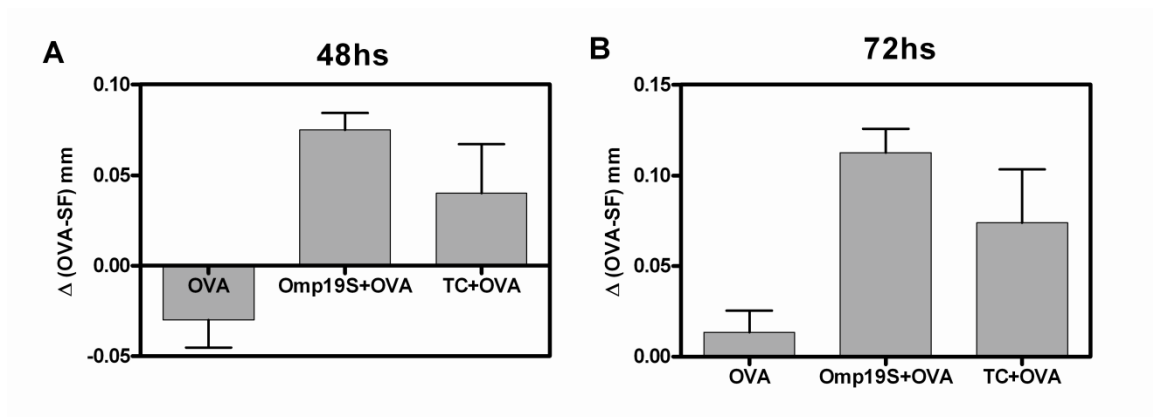


Fig. 3

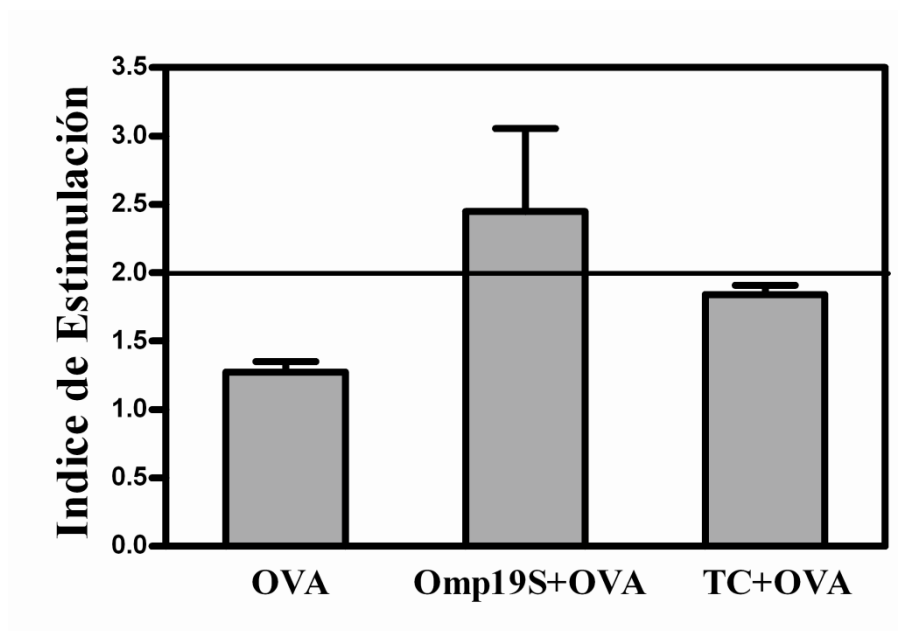


Fig. 4

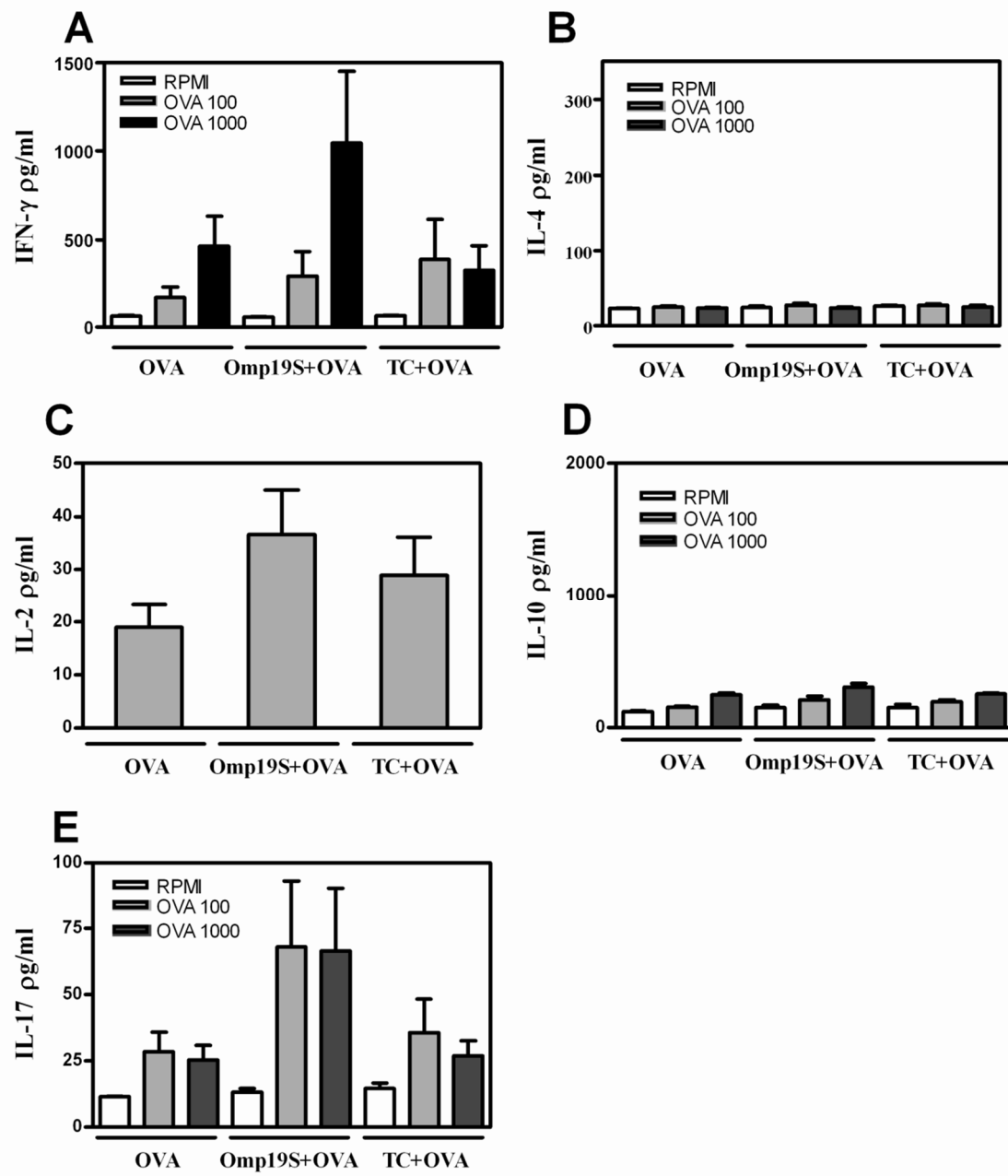


Fig. 5

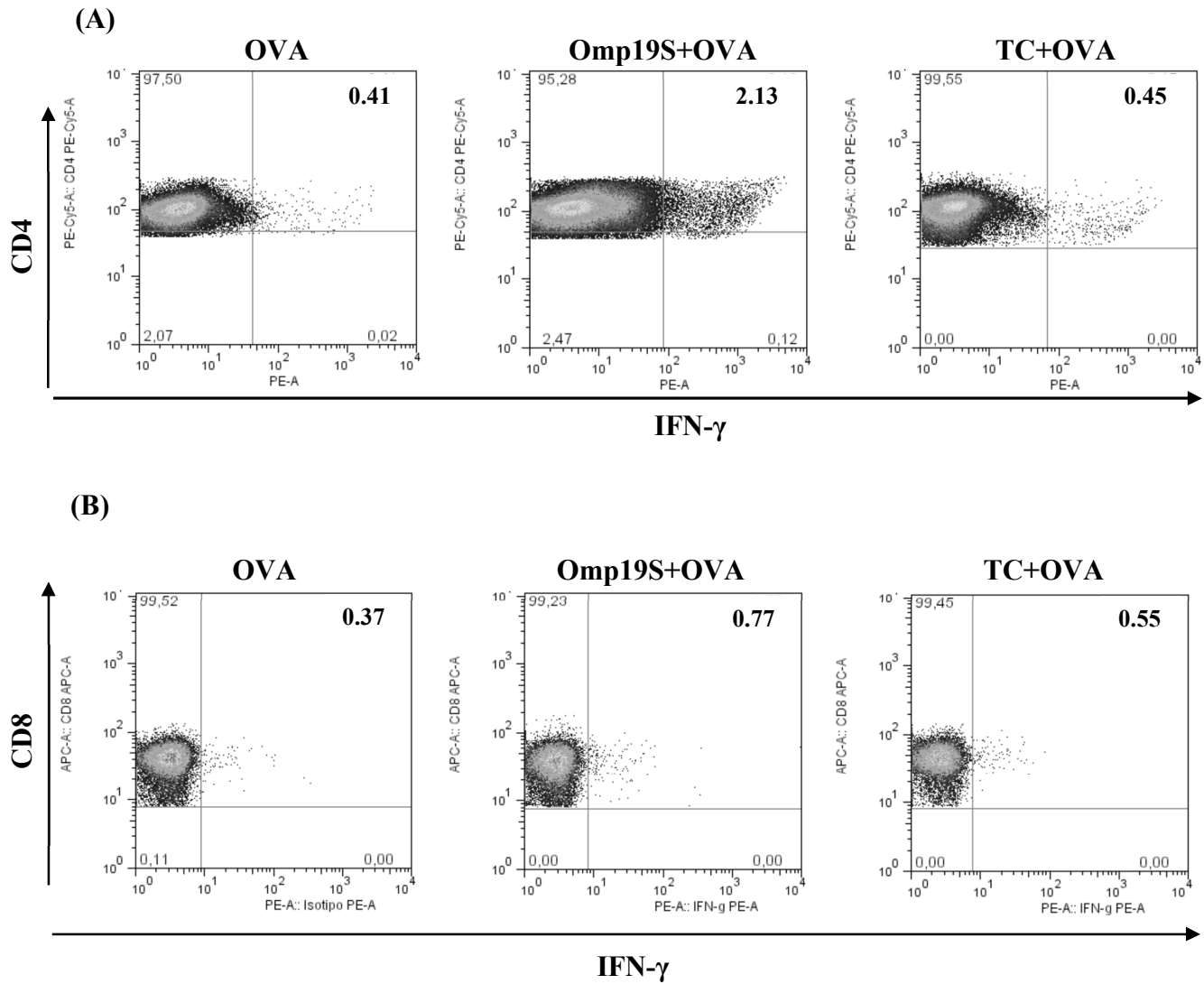


Fig. 6

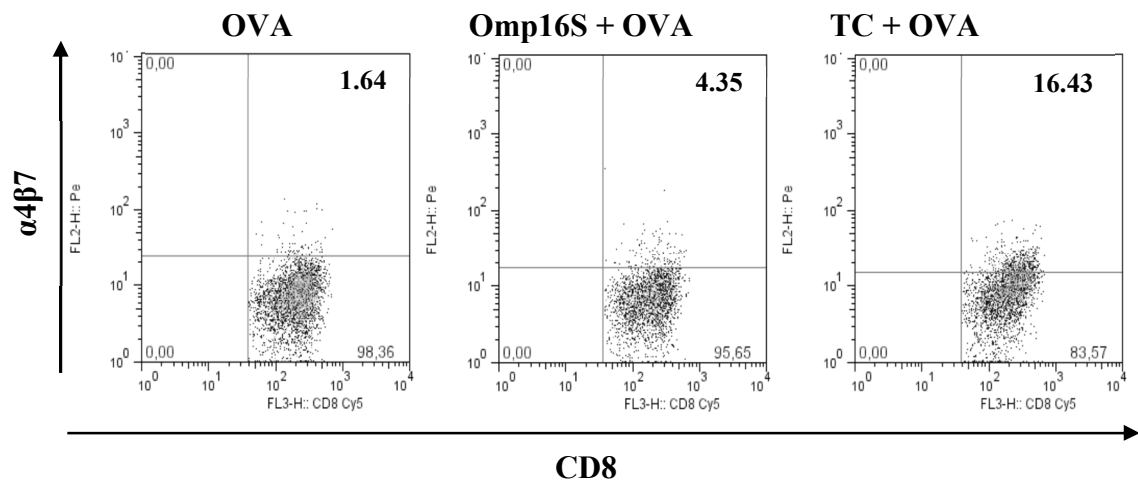


Fig. 7

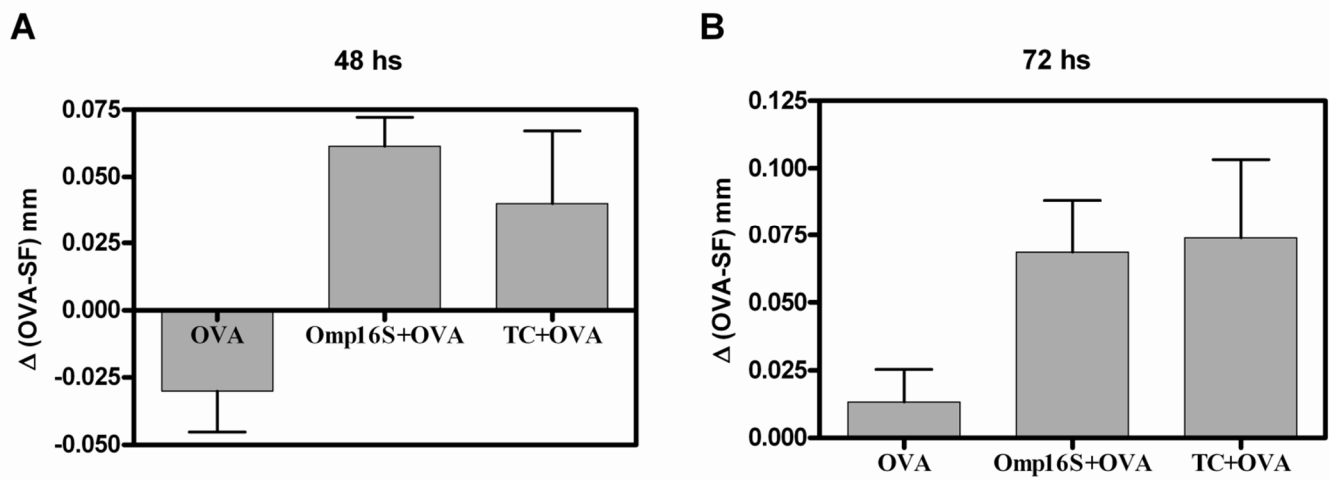


Fig. 8

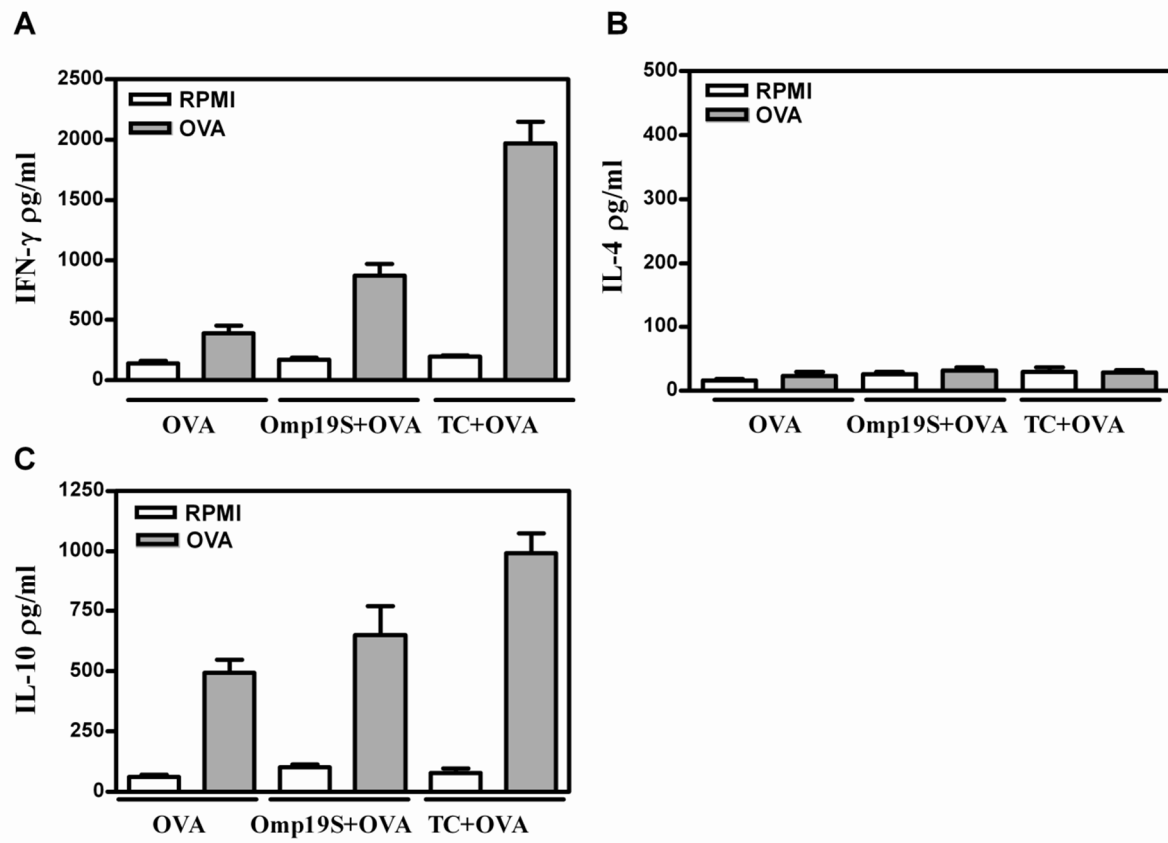


Fig. 9

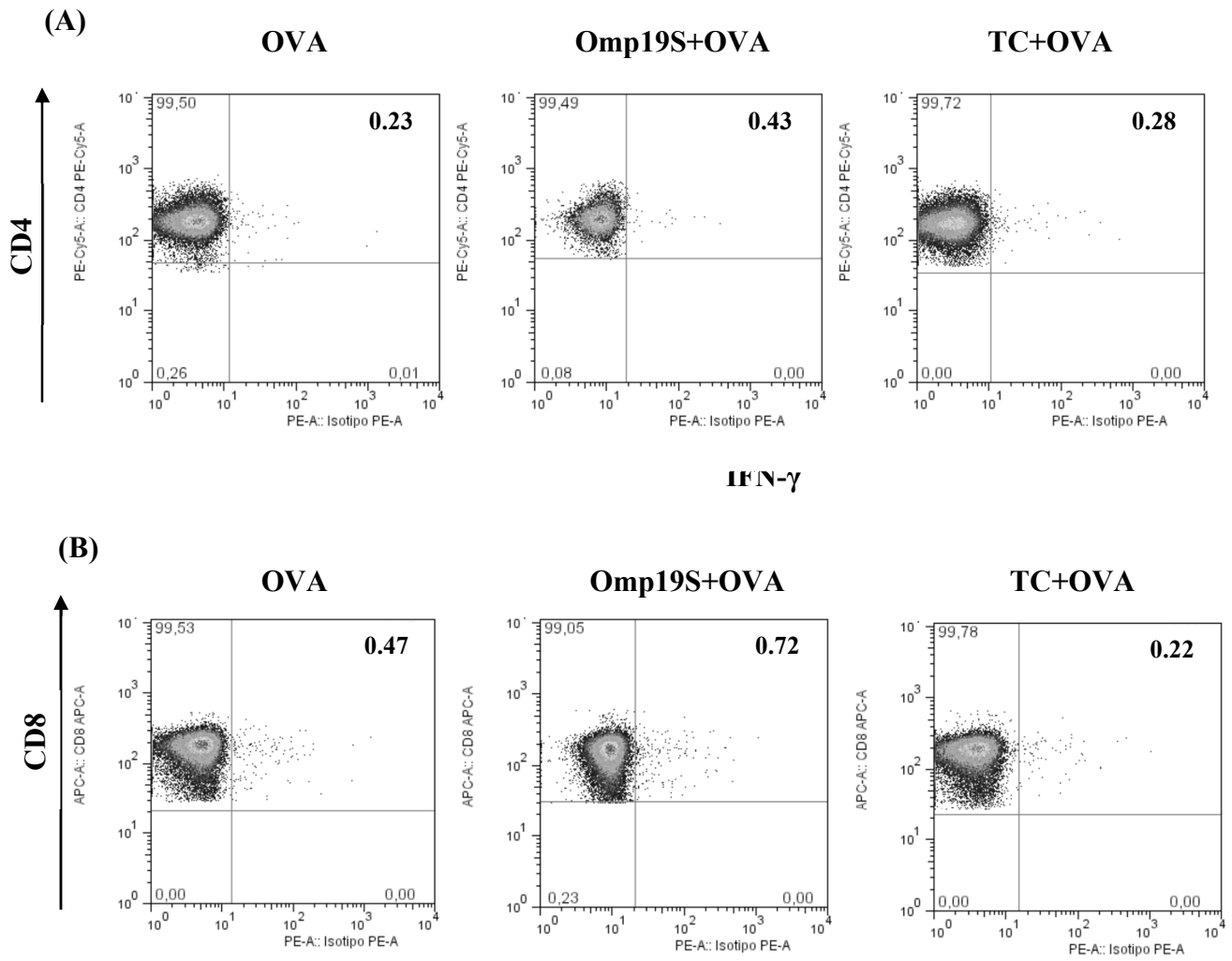


Fig. 10

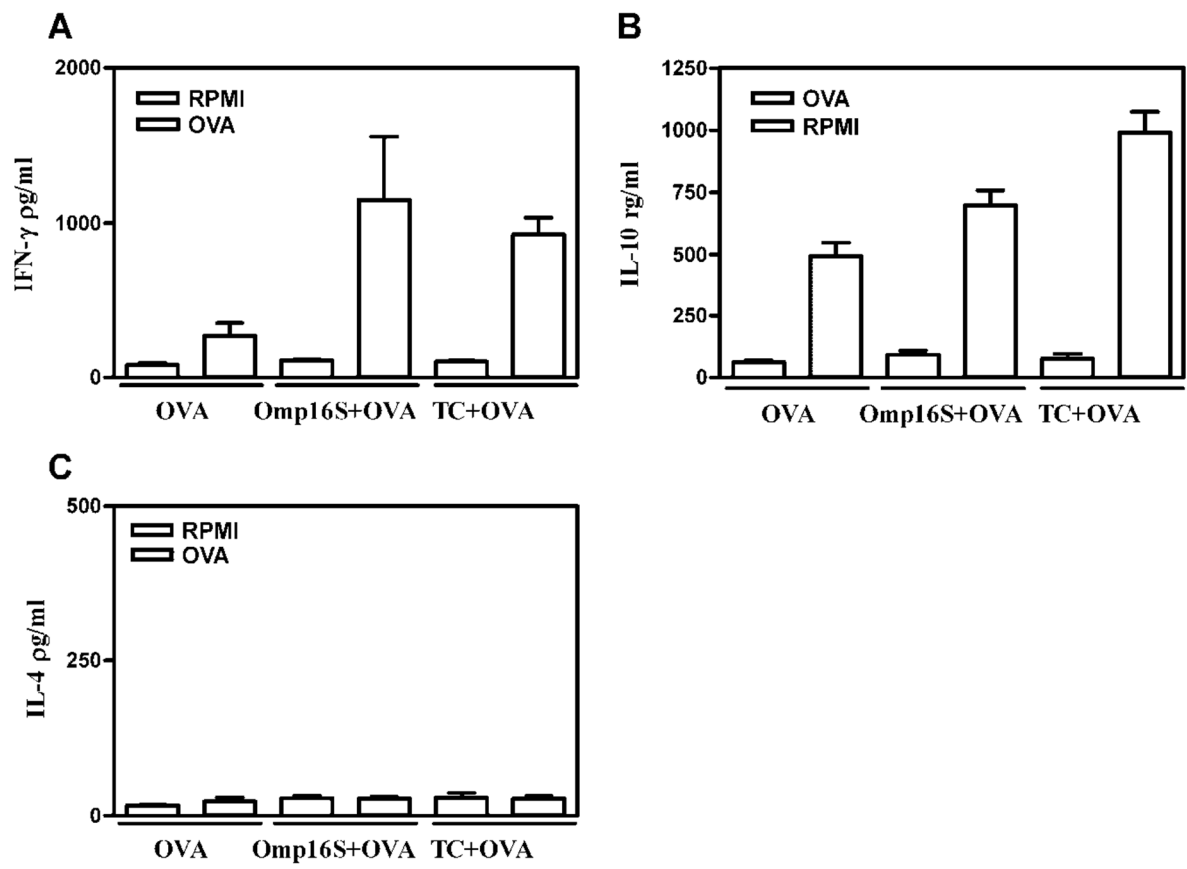


Fig. 11

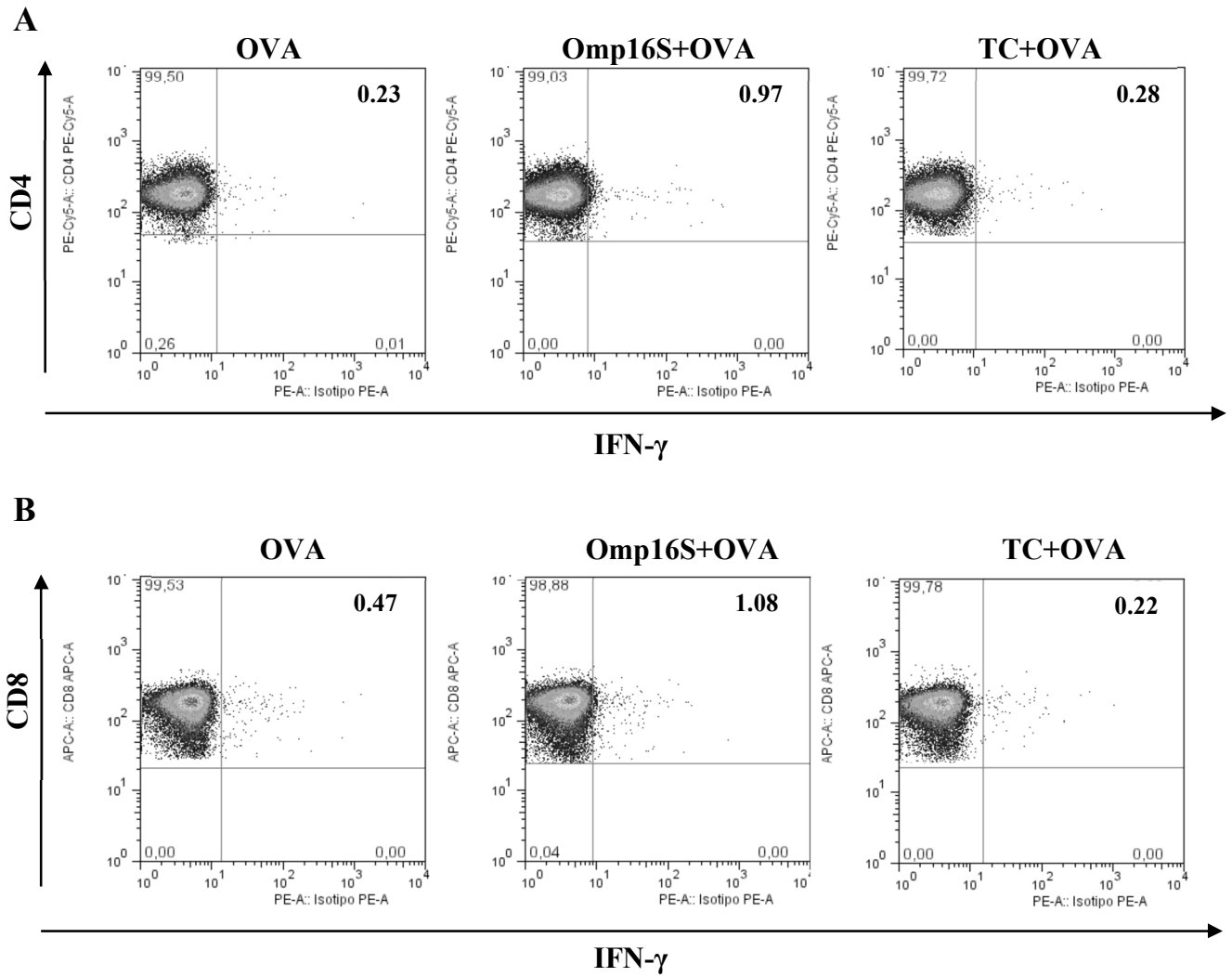


Fig. 12

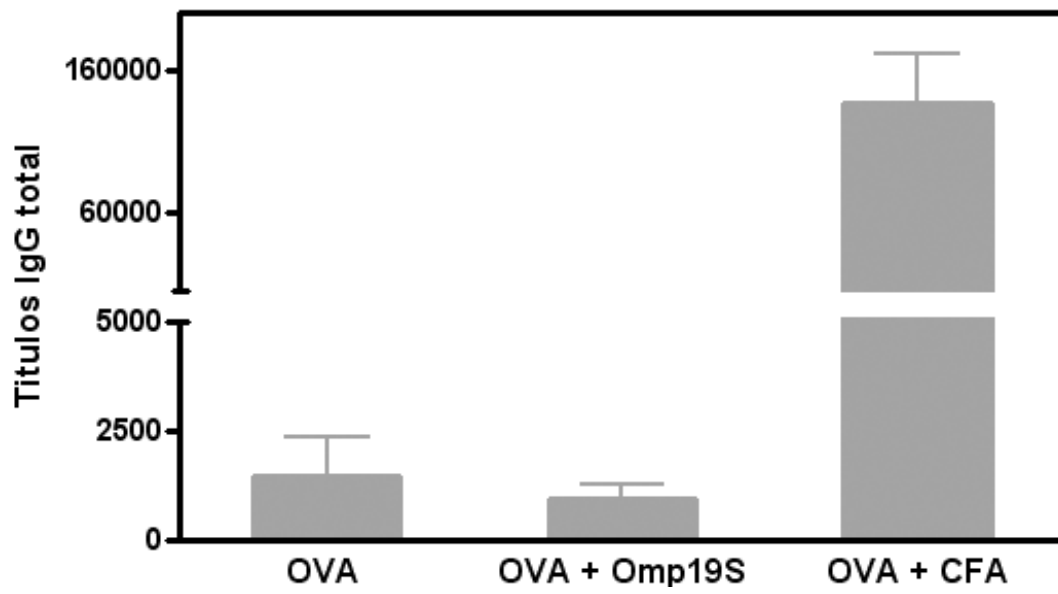


Fig. 13

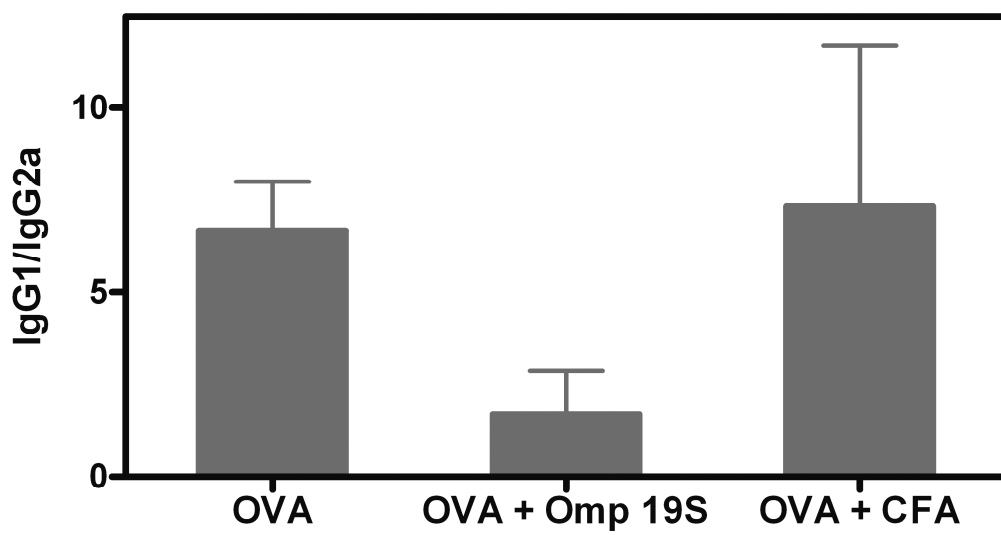


Fig. 14

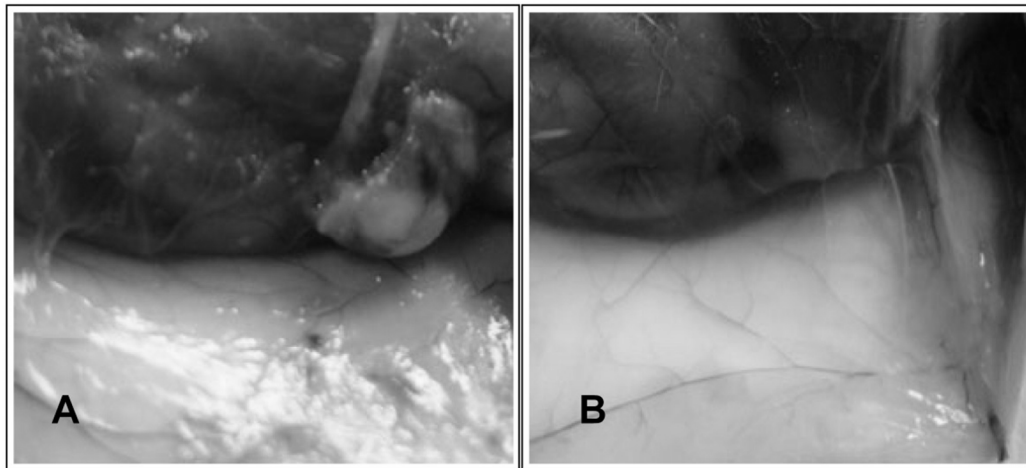


Fig. 15

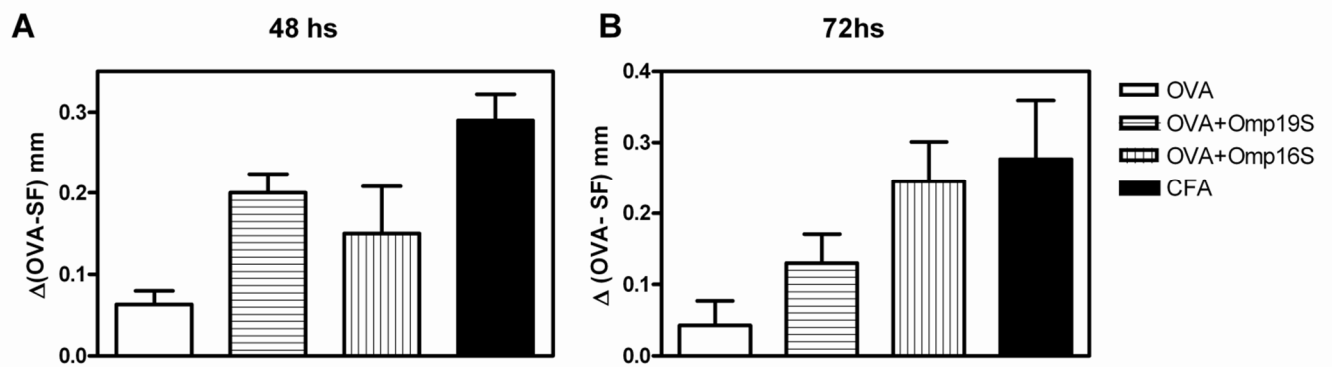


Fig. 16

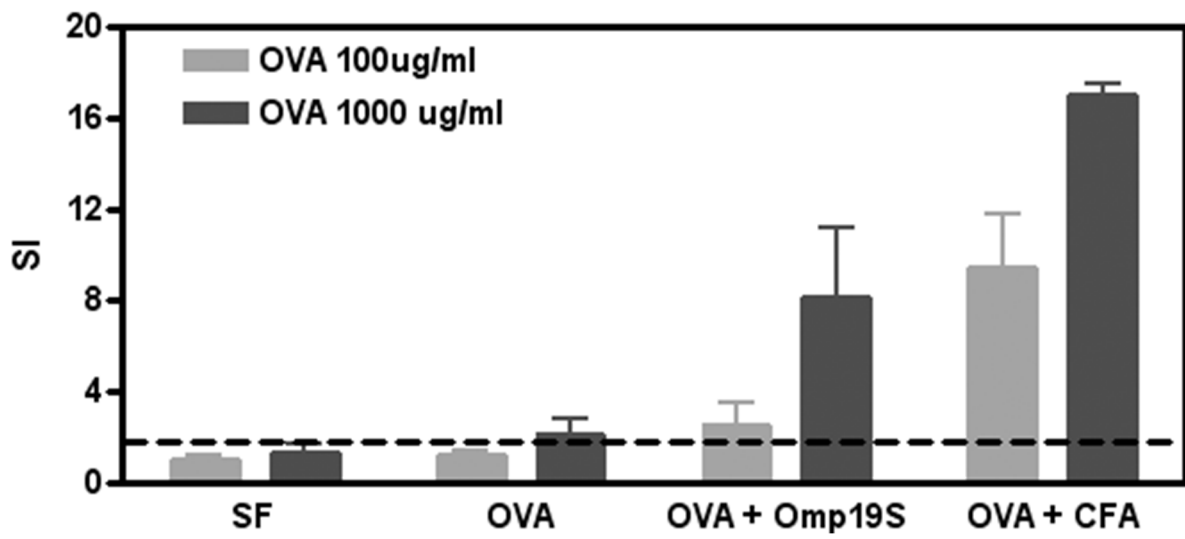


Fig. 17

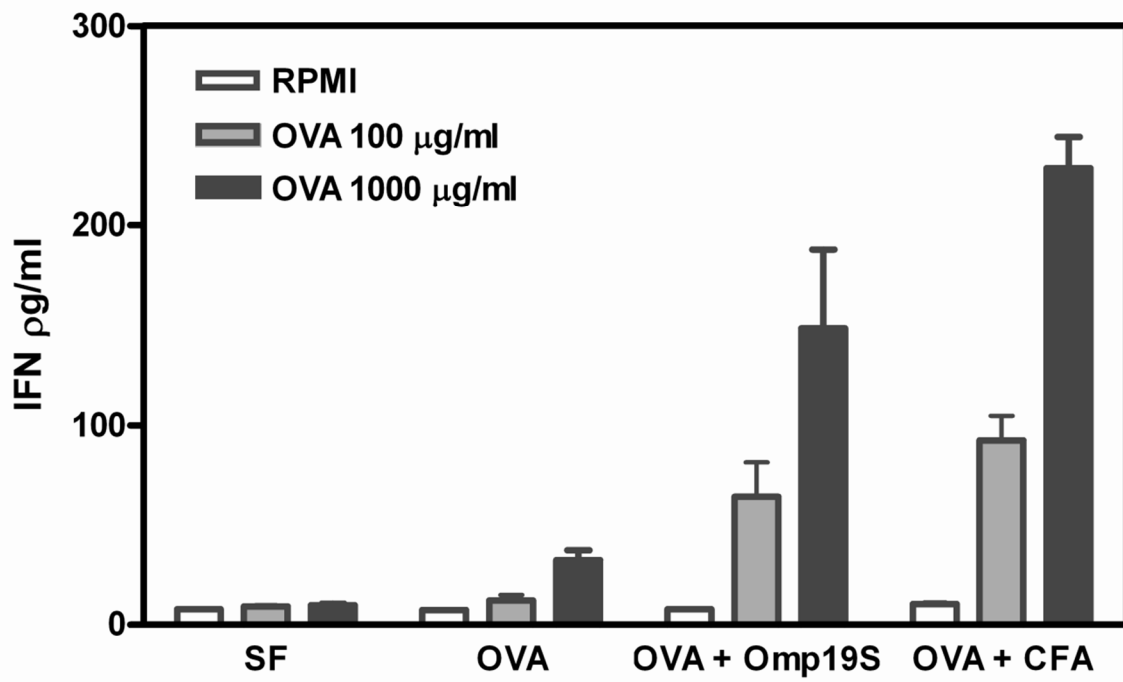


Fig. 18

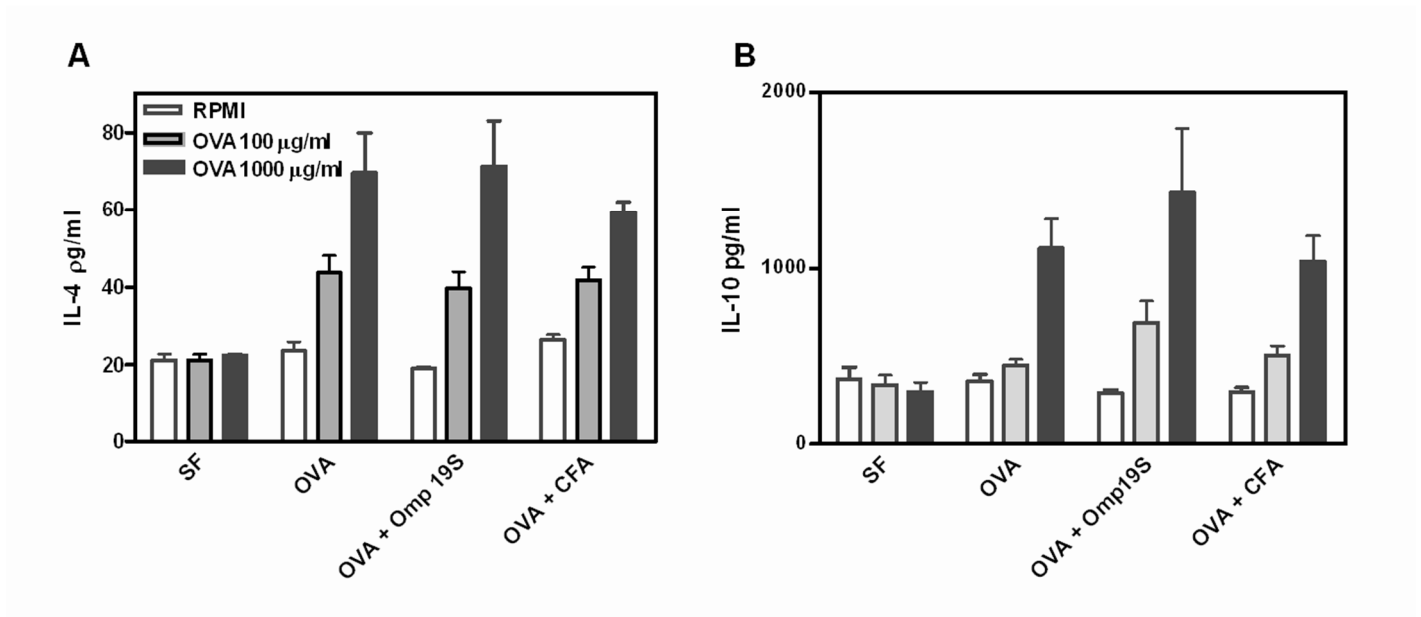


Fig. 19

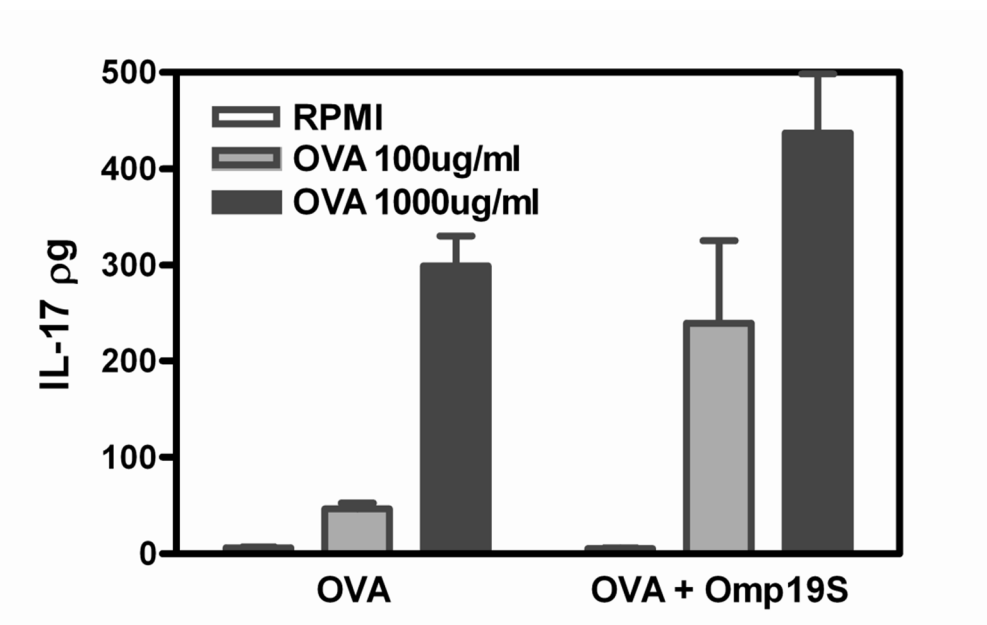


Fig. 20

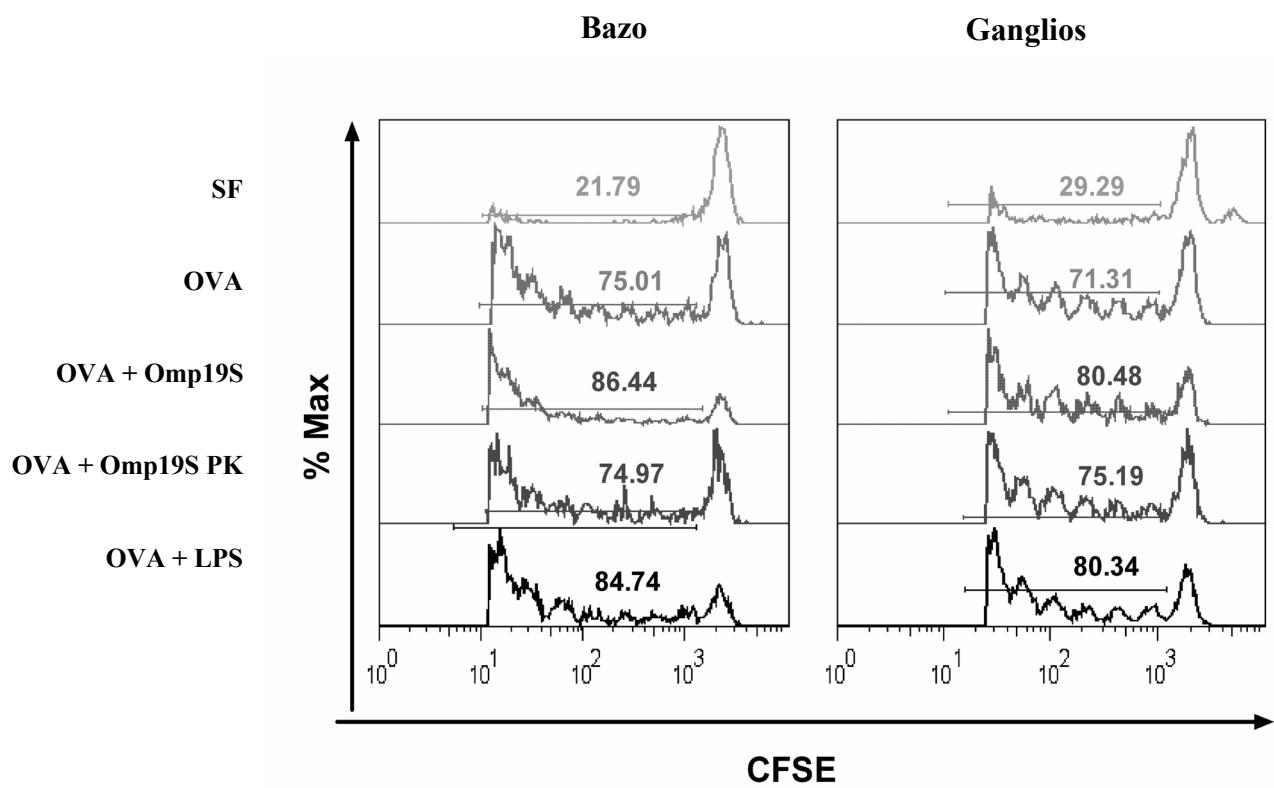


Fig. 21

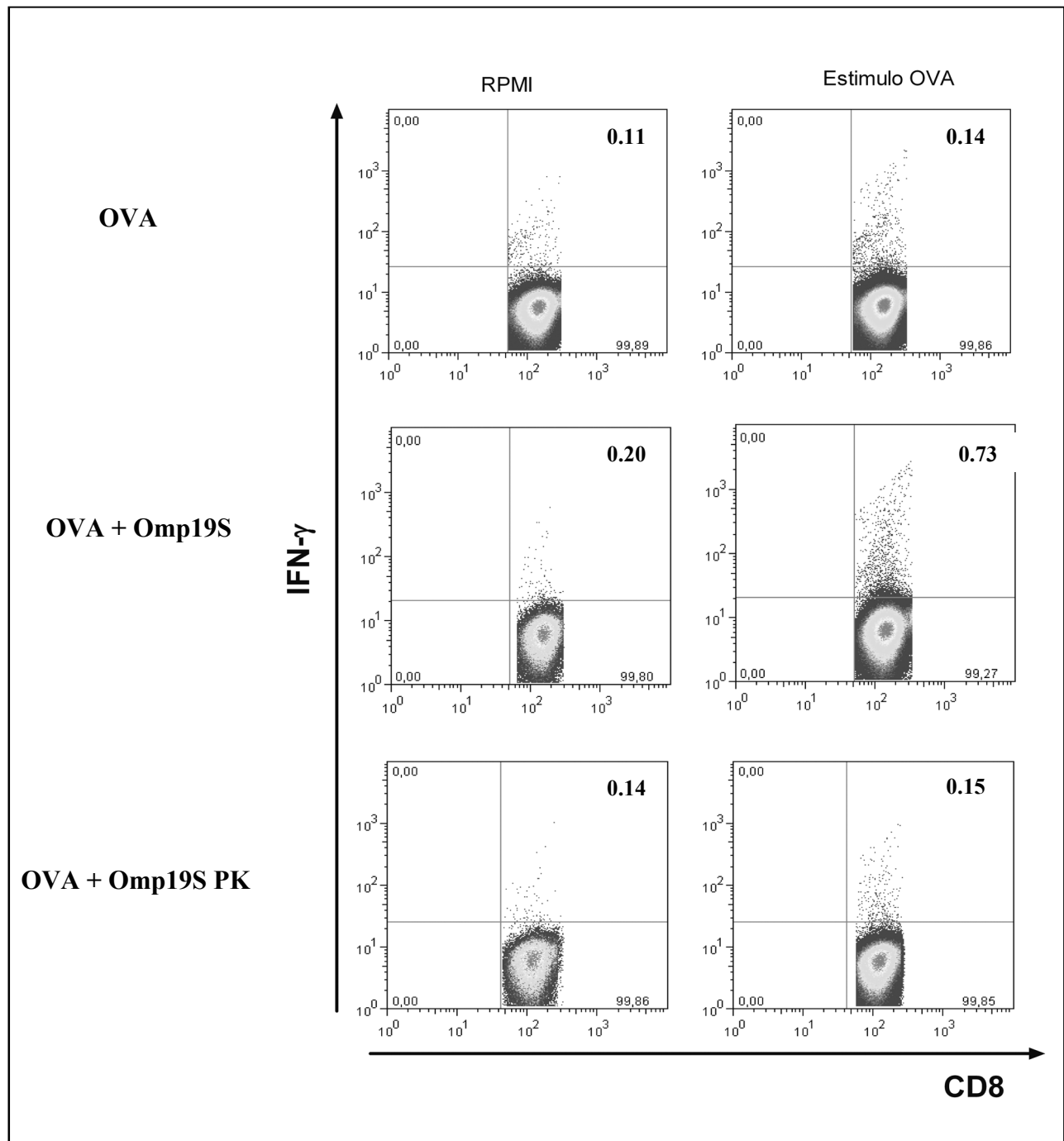


Fig. 22

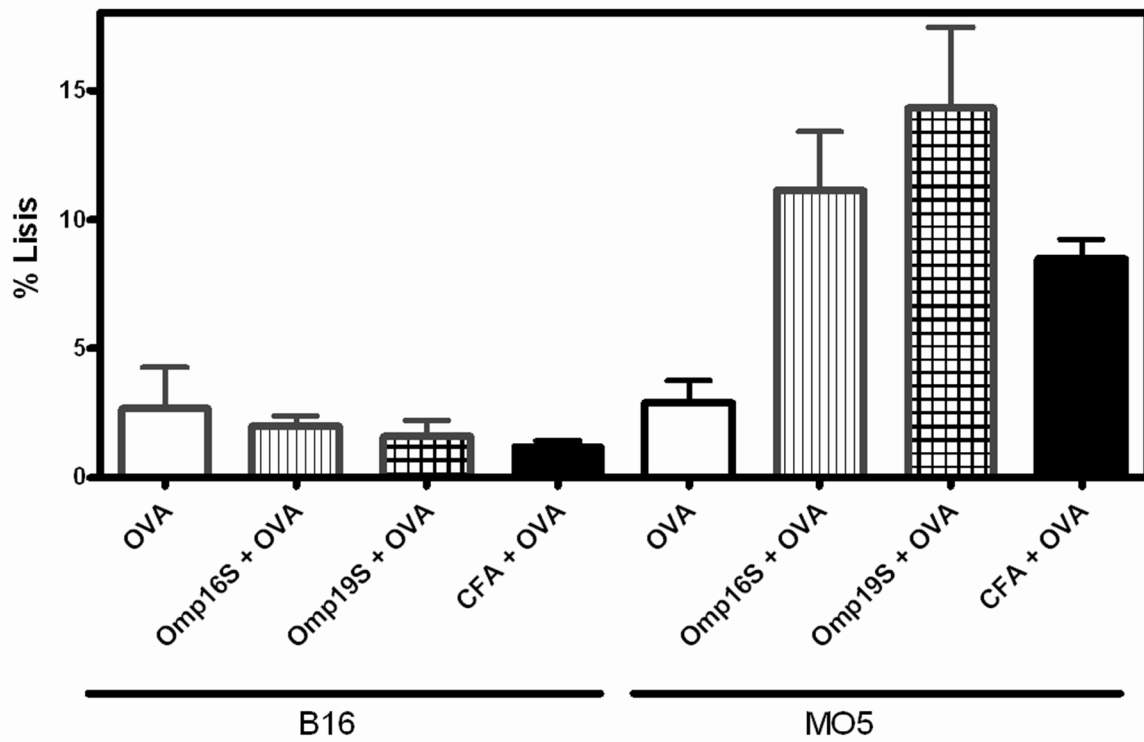


Fig. 23

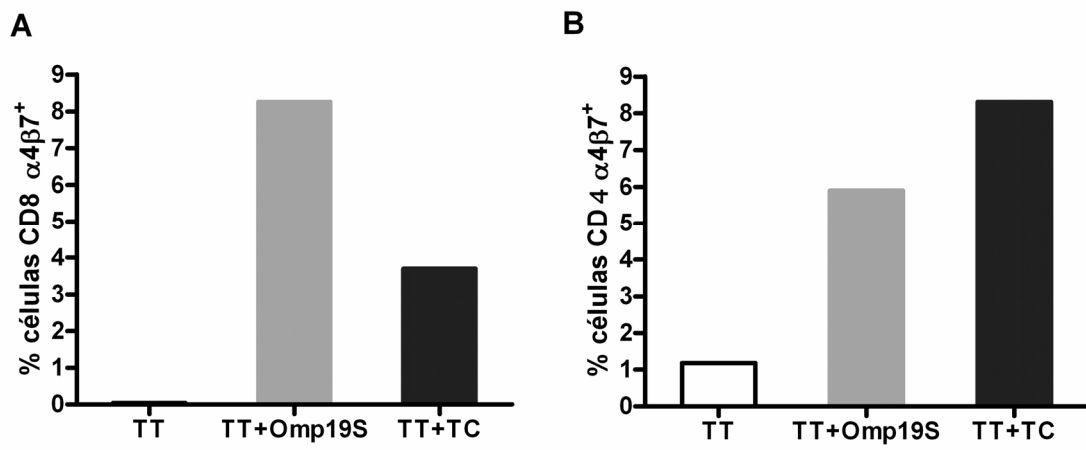


Fig. 24

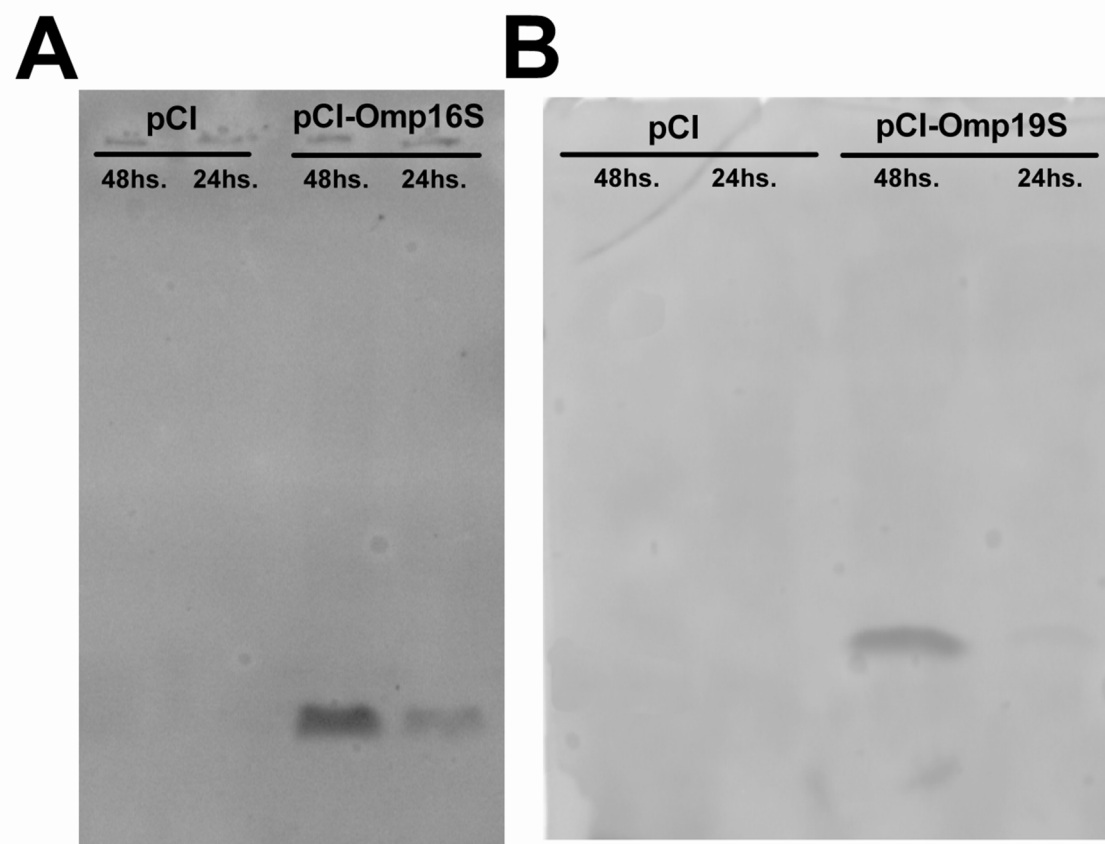


Fig. 25

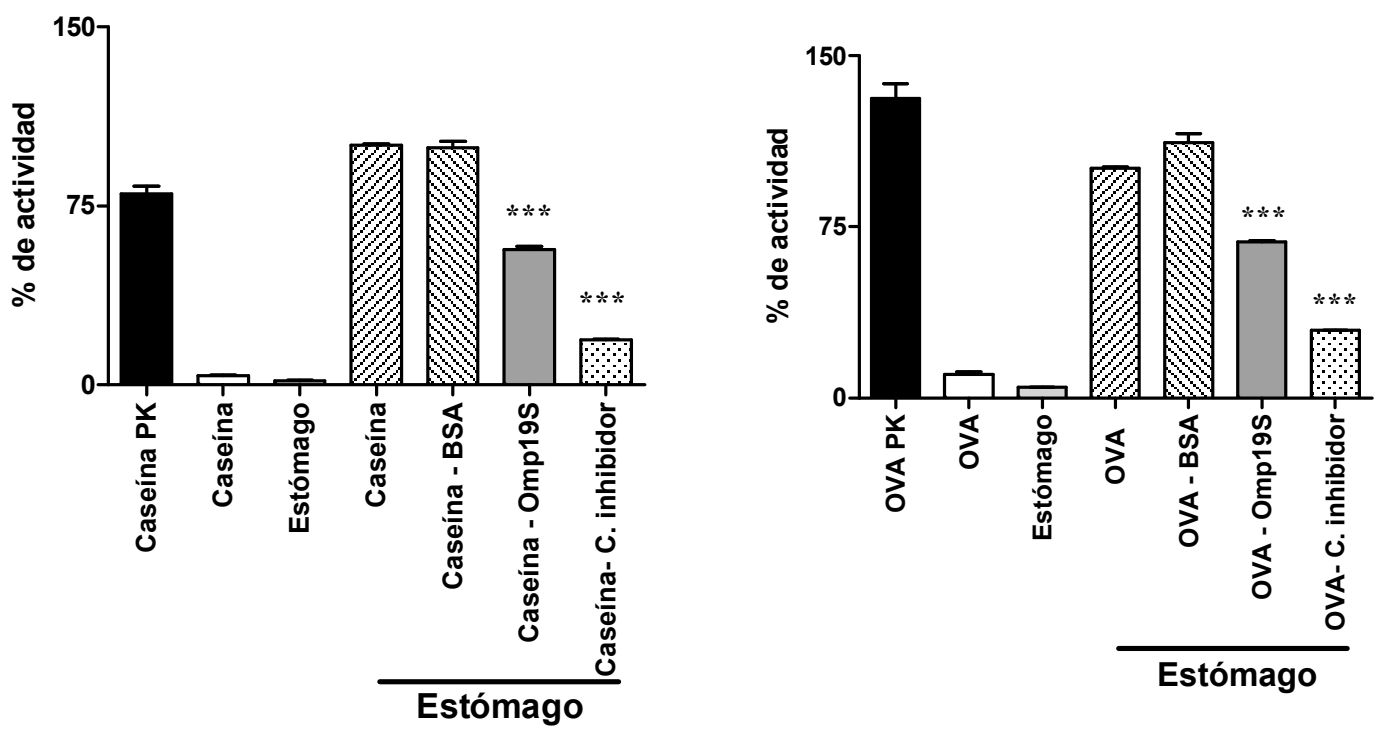


Fig. 26

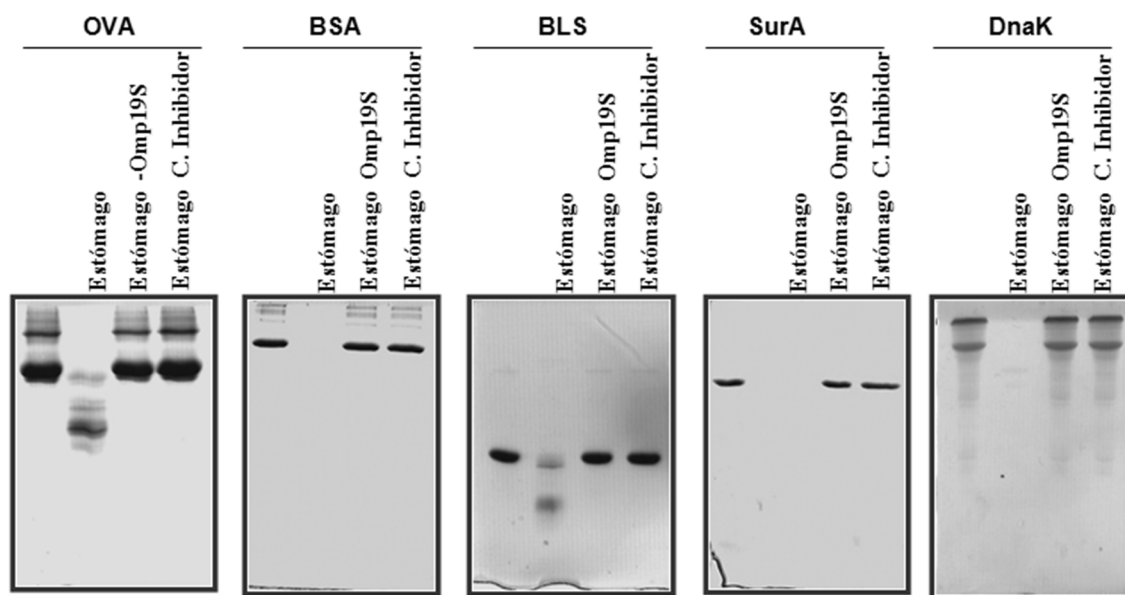


Fig. 27

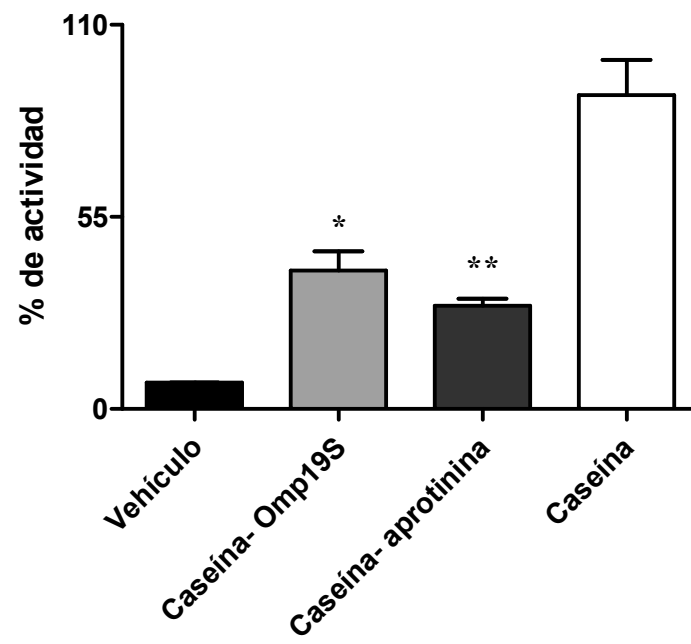


Fig. 28

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es para la conveniencia del lector solamente. No forma parte del documento de patente Europeo. Aun cuando se ha tomado un gran cuidado en compilar las referencias, no pueden ser excluidos errores u omisiones y la OEP se exime de toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 200240518 A1 [0007]
- WO 200240518 [0008]

Literatura no patente citada en la descripción

- **SINGH ; O'HAGAN.** Advances in vaccine adjuvants. *Nat Biotechnol.*, 1999, vol. 17 (11), 1075-81 [0002]
- **PETROVSKY ; AGUILAR.** Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol.*, 2004, vol. 82 (5), 488-96 [0003]
- **LILJEQVIST ; STAHL.** Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J Biotechnol.*, 1999, vol. 73 (1), 1-33 [0003]
- **VICTORATOS ; YIANGOU ; AVRAMIDIS ; HADJI-PETROU.** Regulation of cytokine gene expression by adjuvants in vivo. *Clin Exp Immunol.*, 1997, vol. 109 (3), 569-78 [0003]
- **MOYLE, MCGEARY.** Blanchfield and Toth. Mucosal immunization: adjuvants and delivery systems. *Curr Drug Deliv.*, 2004, vol. 1 (4), 385-96 [0003]
- **SEDER ; HILL.** Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature*, 2000, vol. 406 (6797), 793-8 [0003]
- **REED ; BERTHOLET ; COLER ; FRIEDE.** New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.*, 2009, vol. 30 (1), 23-32 [0004]
- **SESARDIC.** Regulatory considerations on new adjuvants and delivery systems. *Vaccine*, 2006, vol. 24 (2), 2-86, 7 [0004]
- **MOYLE et al.** Mucosal immunization: adjuvants and delivery systems. *Curr Drug Deliv.*, 2004, vol. 1 (4), 385-96 [0005]
- **FUJIHASHI ; KOGA ; VAN GINKEL ; HAGIWARA ; MCGHEE.** A dilemma for mucosal vaccination: efficacy versus toxicity using enterotoxin-based adjuvants. *Vaccine*, 2002, vol. 20 (19-20), 2431-8 [0005]
- **AUCOUTURIER ; DUPUIS ; GANNE.** Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*, 2001, vol. 19 (17-19), 2666-72 [0006]
- **PETROVSKY et al.** Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol.*, 2004, vol. 82 (5), 488-96 [0006]
- *Infection and Immunity, American society for microbiology, USA*, January 2009, vol. 77 (1), ISSN 0019-9567, 436-445 [0009]
- **CRAMERI ; RHYNER.** Novel vaccines and adjuvants for allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Immunol.*, 2006, vol. 18 (6), 761-8 [0057]
- **HARMALA ; INGULLI ; CURTSINGER ; LUCIDO ; SCHMIDT ; WEIGEL ; BLAZAR ; MESCHER ; PENNELL.** The adjuvant effects of Mycobacterium tuberculosis heat shock protein 70 result from the rapid and prolonged activation of antigen-specific CD8+ T cells in vivo. *J Immunol.*, 2002, vol. 169 (10), 5622-9 [0068]
- **GIAMBARTOLOMEI ; ZWERDLING ; CASSATARO ; BRUNO ; FOSSATI ; PHILIPP.** Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key Mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed Brucella abortus. *J Immunol.*, 2004, vol. 173 (7), 4635-42 [0092]
- **GIAMBARTOLOMEI et al.** Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key Mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed Brucella abortus. *J Immunol.*, 2004, vol. 173 (7), 4635-42 [0095]