

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 855**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
A61K 39/08 (2006.01)
A61K 39/112 (2006.01)
A61K 39/118 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2007 E 07800235 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2066341**

54 Título: **Procedimiento de desencadenamiento o inducción de una respuesta inmunitaria**

30 Prioridad:

01.09.2006 AU 2006904796 P

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

09.10.2015

73 Titular/es:

CSL LIMITED (50.0%)
45 Poplar Road
Parkville, VIC 3052, AU y
THE UNIVERSITY OF MELBOURNE (50.0%)

72 Inventor/es:

EDWARDS, STIRLING JOHN;
PEARSE, MARTIN JOHN;
SCHEERLINCK, JEAN-PIERRE YVES y
SUTTON, PHIL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 547 855 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de desencadenamiento o inducción de una respuesta inmunitaria

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones para su uso en un procedimiento de desencadenamiento de una respuesta inmunitaria en un sujeto, en particular de un sujeto humano. Más en particular, la invención se refiere a composiciones para su uso en un procedimiento que emplea una vía de administración sin agujas, de modo que proporciona una alternativa a las vías de administración de vacunas por inyección más tradicionales, tales como las vías subcutánea e intramuscular.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Durante muchos años se han realizado diversos intentos de utilizar las vías respiratorias como medio para administrar antígenos de vacuna inactivados. Se consideraba que esta vía confería ventajas en cuanto a la aceptación de la vacuna (al evitar la "fobia a las agujas"), la oportunidad de inducir respuestas inmunitarias locales y la posibilidad de inducir respuestas en zonas de mucosa alejadas, dada la supuesta unidad del sistema inmunitario mucoso. Se ha prestado mucha atención a la administración de vacunas por vía intranasal en seres humanos y animales. Los resultados hasta la fecha indican que esta vía requiere dosis de antígeno muy altas y/o el uso de tecnologías de administración especializadas para garantizar la captación del antígeno y la inducción inmunitaria.

20 De forma similar, en el pasado, la administración de vacunas por vía intrapulmonar o pulmonar requería técnicas de administración especializadas, tales como el microencapsulado (véase, por ejemplo, Oya Alfa y cols., 2005), para optimizar las respuestas inmunitarias.

El documento WO 99/52547 se refiere a composiciones inmunógenas o de vacuna que comprenden un antígeno CD1 o lipídico y un compuesto estimulador de linfocitos T (por ejemplo, un adyuvante). Se describen procedimientos de administración de las composiciones inmunógenas o de vacuna.

30 En el documento WO 01/75096 se informa de antígenos no peptídicos aislados y purificados a partir de *Mycobacterium tuberculosis*. Los antígenos se usaron en composiciones de vacuna, composiciones farmacéuticas y procedimientos para desencadenar una respuesta inmunitaria frente a *Mycobacterium tuberculosis* en un mamífero.

35 El documento WO 02/20045 se refiere a vacunas que comprenden un patógeno microbiano en las que el patógeno microbiano está sometido a un estímulo inductor de estrés. El estímulo inductor de estrés puede ser calor o estrés osmótico.

40 En el documento US 2003/0190333 se describen composiciones farmacéuticas, en particular composiciones de vacuna, que emplean un sistema adyuvante que comprende al menos un compuesto de fosfato de glucosaminida de aminoalquilo y al menos un compuesto de saponina. Las composiciones de este tipo potencian de forma sinérgica la respuesta inmunitaria en un mamífero frente a un antígeno coadministrado. También se proporcionan procedimientos de uso de las composiciones en el tratamiento de diversas enfermedades humanas, incluidos el cáncer, infecciones microbianas y trastornos autoinmunitarios.

45 Coulter y cols., Vaccine 21, 946-949, 2003 informan de la vacunación intranasal de ratones y ovejas con la vacuna de la gripe con ISCOMATRIX™ como adyuvante. Se observaron respuestas mejores en comparación con las obtenidas con la vacuna sin adyuvante administrada por vía subcutánea.

50 En el documento WO 2005/070415 se desvela una composición adyuvante que comprende un alcaloide activador de Th1, que opcionalmente comprende además un adyuvante auxiliar seleccionado de entre un adyuvante de tipo 2 (por ejemplo, alumbre y/o MF59), un adyuvante de tipo 1 y/o un adyuvante equilibrado.

55 Durante el trabajo que ha dado lugar a la presente invención, los inventores han observado que la administración de vacunas por vía intranasal es muy ineficaz, ya que induce una inmunidad local escasa incluso a dosis de antígeno elevadas. En consecuencia, los inventores han estudiado una vía alternativa de administración de vacunas que mantiene la ventaja de evitar la "fobia a las agujas".

60 Sorprendentemente, los inventores han demostrado la superioridad de la administración de vacunas en los pulmones con respecto a la administración por vía intranasal como medio de inducción de respuestas inmunitarias. También han demostrado que se pueden inducir respuestas inmunitarias sistémicas intensas con cantidades muy pequeñas de antígeno cuando se administran con adyuvante a través de los pulmones. En particular, los inventores han demostrado que una composición de vacuna sencilla que combina antígeno y adyuvante induce respuestas inmunitarias sistémicas intensas con administración intrapulmonar sin necesidad de tecnologías de captación especializadas. De forma significativa, se ha demostrado que la administración intrapulmonar da lugar a respuestas inmunitarias mucosas que pueden ser hasta cien veces (100x) mayores que las inducidas por inmunización

parenteral convencional, incluso cuando se administran cantidades muy pequeñas de antígeno con adyuvante a través de los pulmones.

5 Griffith y cols. (1997) describen la administración intratraqueal del toxoide de la ricina formulado en liposomas, con hidróxido de aluminio o en PBS. El grupo con formulación en liposomas mostró una protección mejor; el hidróxido de aluminio no mejoró la protección con respecto al PBS. En el documento WO 2005/110379 se describe la administración pulmonar de una vacuna de partículas contra la malaria. La formulación se administró como una formulación de partículas y permitió la liberación mantenida del antígeno.

10 La referencia en la presente memoria descriptiva a cualquier publicación anterior (o información derivada de ella) o a cualquier materia conocida, no es, y no debería considerarse como un reconocimiento o admisión o cualquier forma de sugerencia de que dicha publicación anterior (o información derivada de ella) o materia conocida forman parte del conocimiento general en el campo de trabajo al que se refiere la presente memoria descriptiva.

15 A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones que figuran a continuación, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprende" y variaciones tales como "comprenden" o "que comprende" implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicados pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

20 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una composición que comprende un antígeno y el adyuvante ISCOMATRIX™ para su uso en un procedimiento para desencadenar una respuesta inmunitaria en un sujeto humano o animal, que comprende administrar a dicho sujeto la composición por vía intrapulmonar (pulmonar).

25 Por tanto, la composición se formula para que sea adecuada para la administración intrapulmonar. Preferentemente, la composición se administra a) al sujeto por inhalación oral; o b) en la parte inferior de los pulmones del sujeto.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una composición que comprende un antígeno y el adyuvante ISCOMATRIX™ en la fabricación de un medicamento para su administración por vía intrapulmonar a un sujeto humano o animal para desencadenar una respuesta inmunitaria en el sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 En las figuras 2, 3, 4, 6, 9 y 10:

Barra horizontal = valor de la mediana
Barra blanca = 50 % intermedio de los valores
Línea vertical = percentiles 10 y 90.

40 La figura 1 es un diagrama de un pulmón de oveja que ilustra las regiones que corresponden a las partes superior e inferior (o profunda) del pulmón (diagrama del pulmón modificado de Nickel y cols., 1979).

45 Las figuras 2 y 3 son representaciones gráficas de los resultados obtenidos en experimentos iniciales. Se inmunizaron grupos de ovejas por vía subcutánea (s/c) o intrapulmonar (pulmonar) con tres dosis a intervalos de tres semanas de antígeno del virus de la gripe (antígeno de la gripe) solo o de antígeno formulado con 100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™ (IMX = adyuvante ISCOMATRIX™). Se extrajeron muestras de sangre (suero) y pulmón (lavado broncoalveolar - LBA) una semana antes de la primera dosis, dos semanas después de la primera y una semana después de la segunda y la tercera dosis.

50 La figura 2 muestra respuestas de anticuerpos [valores de los criterios de evaluación específicos para la gripe] de un inmunoensayo enzimático (IEE) después de una, dos y tres dosis (1^0 , 2^0 y 3^0) de formulaciones que consisten en 15 µg de antígeno del virus de la gripe solo (equivalente a una dosis monovalente de las vacunas contra la gripe disponibles actualmente) y cantidades decrecientes de antígeno de la gripe formuladas con 100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™. Se llevaron a cabo ensayos tanto para IgG como para IgA en muestras de suero y LBA (pulmón).
(* diferencias significativas con el análisis de Mann-Whitney)

60 La figura 3 muestra respuestas de anticuerpos con el mismo calendario de inmunización y toma de muestras y el procedimiento de ensayo que en la figura 2, donde la inmunización por vía subcutánea e intrapulmonar se llevó a cabo con una dosis muy baja de antígeno de la gripe de 0,04 µg con y sin adyuvante ISCOMATRIX™.
(#, *, ^, §, √ diferencias significativas con el análisis de Mann-Whitney)

65 Para las figuras 4, 6, 7, 9, 10, se llevó a cabo un análisis estadístico después de la transformación logarítmica de los datos y se compararon los grupos mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con un análisis de Dunnett *a posteriori* con el programa informático SPSS, versión 13.

La figura 4 muestra respuestas de anticuerpos en grupos de ovejas después de la inmunización con tres dosis de 0,04 µg de antígeno de la gripe formuladas con 100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™ administradas en la parte superior o inferior del pulmón (figura 1). Se tomaron muestras de suero y LBA (pulmón) una semana después de la tercera dosis.

La figura 5 es un gel de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) con tinción de Coomassie de la proteína ΔgB del citomegalovirus (CMV) purificada, después de purificar la proteína en una columna de afinidad del anticuerpo monoclonal 58-15 específico de gB acoplada a una columna HP activada con NHS. Los carriles 1 a 4 muestran ΔgB purificada en cuatro ciclos de purificación por afinidad diferentes.

La figura 6 muestra respuestas de anticuerpos específicos frente a ΔgB del CMV en grupos de 8 ovejas después de tres dosis de ΔgB del CMV formuladas con 100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™ administradas por vía subcutánea o intrapulmonar. Se sometieron a ensayo las respuestas de anticuerpos en muestras de suero y LBA y se determinaron los valores de los criterios de evaluación de IgG e IgA con un IEE específico para ΔgB. Las gráficas muestran las respuestas de anticuerpos dos semanas después de la primera dosis (postprimaria) y una semana después de la segunda (postsecundaria) y la tercera (postterciaria) dosis.
(* diferencias significativas con ANOVA)

La figura 7 muestra valores cuantitativos del porcentaje de neutralización individuales contra el CMV de ovejas individuales de los mismos grupos de ovejas que en la figura 6. Se sometieron a ensayo muestras de suero de extracciones de sangre realizadas una semana antes de la primera dosis (preinmunización), dos semanas después de la primera dosis (secundaria) y una semana después de la segunda (secundaria) y la tercera (terciaria) dosis de ΔgB del CMV formuladas con 100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™ para determinar la actividad neutralizadora del CMV. Cada punto circular es el porcentaje de neutralización para el suero de una oveja individual tomada en el punto de dosis indicado. Los valores de neutralización del CMV en suero después de dos y tres dosis de la formulación fueron significativamente mayores que para los sueros antes de la inmunización tanto para la administración intrapulmonar como para la subcutánea.
(* diferencias significativas con ANOVA)

La figura 8 muestra los resultados de la reestimulación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) después de la incubación con la proteína ΔgB. Las CMSP se obtuvieron de la sangre periférica de las mismas ovejas que en el ejemplo 7, una semana después de la administración de la tercera dosis de ΔgB del CMV formulada con 100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™. Después de la estimulación con ΔgB, se determinó la proliferación celular con un ensayo de timidina tritiada incorporada en las células. Se calculó el índice de estimulación (IE) como la proporción entre el tritio incorporado en las células estimuladas con ΔgB y el tritio incorporado en las células de control sin estimular. Se consideró como respuesta proliferativa positiva un IR ≥ 4.

La figura 9 muestra respuestas de anticuerpos en grupos de ovejas (4 ovejas en el grupo de gripe sin adyuvante; 7 ovejas en cada uno de los grupos con adyuvante) inmunizadas con antígeno de la gripe formulado con una variedad de adyuvantes. Los calendarios de inmunización y toma de muestras y el procedimiento de ensayo fueron los mismos que en la figura 1.
(* diferencias significativas con ANOVA)

La figura 10 muestra los resultados del ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IHA) para los mismos grupos de ovejas que en la figura 9. Se determinó el valor cuantitativo de IHA para cada muestra mediante la inhibición máxima en eritrocitos de pavo. (* diferencias significativas con ANOVA)

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un antígeno y el adyuvante ISCOMATRIX™ para su uso en un procedimiento de desencadenamiento de una respuesta inmunitaria en un sujeto humano o animal, que comprende administrar a dicho sujeto la composición por vía intrapulmonar.

Preferentemente, el sujeto es un ser humano. Sin embargo, la invención también se extiende al desencadenamiento de una respuesta inmunitaria en un sujeto animal tal como animal de ganadería (por ejemplo, una oveja, una vaca o un caballo), animales de experimentación (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo o una cobaya), un animal de compañía (por ejemplo, un perro o un gato) o un animal salvaje.

Tal como se usan en el presente documento, las referencias a la administración "intrapulmonar" o "pulmonar" de una composición se refieren a la administración de la composición en las superficies mucosas del pulmón donde los componentes activos de la composición (es decir, el antígeno y el adyuvante) pueden entrar en contacto con el sistema de capilares del pulmón y/o con el sistema inmunitario mucoso. Estos términos incluyen la administración de la composición "en la parte inferior del pulmón" o "en la parte profunda del pulmón", que es la administración de la composición en los bronquios profundos, los bronquiolos y/o los alvéolos del pulmón.

Preferentemente, según la presente invención, la composición que comprende antígeno y adyuvante se administra en el pulmón (o los pulmones) del sujeto como un aerosol o en forma de polvo seco, aerosol o polvo seco que se administran con un nebulizador o un dispositivo similar. Los dispositivos o productos convencionales para la administración intrapulmonar o pulmonar de productos farmacéuticamente activos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Como se indica anteriormente, en otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una composición que comprende un antígeno y el adyuvante ISCOMATRIX™ en la fabricación de un medicamento para su administración por vía intrapulmonar a un sujeto humano o animal para desencadenar una respuesta inmunitaria en el sujeto.

Preferentemente, el antígeno que se administra según la presente invención es el antígeno que desencadenará una respuesta inmunitaria contra un patógeno pulmonar tal como el virus de la gripe, *Chlamydia pneumoniae*, el virus respiratorio sincicial, neumococos, etc. No obstante, se entenderá que también se puede seleccionar un antígeno que desencadene una respuesta inmunitaria contra otros patógenos, incluidos patógenos de otras zonas de mucosa, por ejemplo, *Helicobacter pylori*, *Salmonella*, *E. coli*, cólera, VIH, organismos de enfermedades de transmisión sexual, etc. El antígeno administrado según la presente invención tiene la ventaja de una gran aceptación por el receptor (se evita la "fobia a las agujas" y su administración es sencilla). En particular, da lugar a una respuesta inmunitaria intensa tanto mucosa como sistémica, lo que indica que será útil para todas las vacunaciones, incluidas las que dependen de una respuesta inmunitaria sistémica.

El antígeno también puede ser un antígeno específico del tumor o asociado al tumor. Preferentemente, el tumor es un tumor asociado a una zona de mucosa. Los tumores asociados a zonas de mucosa incluyen, pero sin limitación, tumores pulmonares, tumores del tubo gastrointestinal y tumores del aparato genital.

El antígeno puede ser cualquier entidad química que puede desencadenar una respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal, incluidos, pero sin limitación, una células bacteriana completa inactivada o una subunidad de la misma, un virus completo inactivado o una subunidad del mismo, una proteína o un péptido, una glucoproteína, un hidrato de carbono, un gangliósido, un polisacárido, un lipopolisacárido o un lipopéptido; o puede ser una combinación de cualquiera de estos.

El adyuvante ISCOMATRIX™ es un adyuvante inmunoestimulante. Es un adyuvante a base de saponina. La presente invención también engloba su uso en combinación con otro adyuvante tal como un complejo inmunoestimulante, incluidos, por ejemplo, liposomas, adyuvantes de aceite en agua tales como MF59, adyuvantes de sales de aluminio tales como el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio, adyuvantes de lipopolisacáridos tales como el lípido A y el monofosforil lípido A (MPL), adyuvantes oligonucleotídicos tales como el adyuvante de oligonucleótidos CpG y adyuvantes de mucosa tales como la toxina del cólera. Se describen adyuvantes inmunoestimulantes adecuados a modo de ejemplo por Cox y Coulter, 1997.

La composición de la invención se puede administrar en los pulmones mediante una cualquiera de una serie de tecnologías existentes, así como las que están en desarrollo. Existen numerosos ejemplos de dispositivos mecánicos que pueden administrar preparaciones de fármacos o proteínas en el pulmón y se han usado dispositivos nebulizadores y de aerosol durante décadas en el tratamiento del asma (véase Gonda, 2000). Típicamente, los dispositivos están destinados a administrar material en los pulmones por inhalación oral. Los avances recientes en este campo (véase Edwards y Dunbar, 2002) incluyen los realizados por 3M Corporation (Shoyele y Slowey, 2006) e Inhale Therapeutics Systems, Inc. (Kuo y Lechuga-Ballesteros, 2003).

Según la presente invención, se administra la composición al sujeto humano o animal en una cantidad inmunológicamente eficaz. Tal como se usa en el presente documento, una cantidad inmunológicamente eficaz significa la cantidad necesaria para lograr al menos parcialmente la respuesta inmunitaria deseada, o para retrasar la aparición, inhibir la progresión o detener por completo la aparición o la progresión de la afección en particular que se está tratando. Esta cantidad varía en función del estado de salud y físico del individuo que se va a tratar, la categoría taxonómica del individuo que se va a tratar, la capacidad inmunitaria del individuo, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté en intervalo relativamente amplio que se puede determinar a través de ensayos rutinarios.

Sin embargo, cabe destacar que las ventajas particularmente importantes de la presente invención incluyen el hecho de que se ha descubierto que la administración intrapulmonar de la composición de vacuna que comprende un antígeno y adyuvante ISCOMATRIX™ no sólo da lugar a una respuesta de anticuerpos sistémica frente al antígeno y a una respuesta mucosa, sino también a la posibilidad de una reducción considerable de la dosis de antígeno necesaria para desencadenar estas respuestas sistémica y mucosa. Además, la administración intrapulmonar eficaz de la composición de vacuna según la presente invención evita la necesidad de sistemas de administración complejos tales como el microencapsulado o mucoadhesivos u otras tecnologías para potenciar la captación de la vacuna en las zonas de mucosa.

Además, la inducción de respuestas de anticuerpos enormemente mejoradas indica que la inmunización intrapulmonar puede potenciar la eficacia de la vacuna contra infecciones mucosas y, potencialmente, reducir la transmisión de patógenos desde una persona inmunizada/infectada.

5 En particular, los anticuerpos de la mucosa pueden tener un gran valor para mejorar la inmunidad protectora contra la exposición a la gripe. En un informe de consulta de la OMS reciente (Cassetti y cols., 2006) se afirmaba: "En modelos de ratón, las IgA de la mucosa se asocian a la protección contra la exposición y en estudios con vacunas de la gripe vivas atenuadas en el hombre, la presencia de IgA de la mucosa se correlaciona con la reducción de la diseminación del virus y la resistencia a la infección experimental. Se concluyó que parece que la IgA de la mucosa desempeña un papel en la protección contra la infección por el virus de la gripe y se debería evaluar en más estudios la capacidad de las vacunas de inducir respuestas inmunitarias mucosas".

10 En consecuencia, la vía de administración intrapulmonar de la presente invención tiene un valor potencial para las vacunas contra otras infecciones y proporciona una vía de administración alternativa para vacunas que requieren una respuesta de anticuerpos principalmente sistémica.

15 Además, el antígeno que se administra según con la presente invención induce respuestas inmunitarias celulares intensas. El antígeno con adyuvante administrado por vía intrapulmonar estimula la producción de células de sangre periférica, que proliferan específicamente en respuesta al antígeno. Estas células pertenecen a las clases de linfocitos T tanto CD4+ como CD8+, que tienen funciones de potenciación de las respuestas de anticuerpos y de llevar a cabo funciones efectoras, tales como la destrucción de células infectadas por virus. La capacidad de inducir respuestas inmunitarias celulares además de respuestas inmunitarias de anticuerpos tiene un valor potencial en la vacunación contra agentes infecciosos, en particular el VIH, herpesvirus y bacterias que incluyen una fase intracelular en su ciclo vital, tales como micobacterias, clamidia y listeria.

20 Se describen más características de la presente invención con más detalle en los siguientes ejemplos. Se ha de entender, no obstante, que esta descripción detallada se incluye únicamente con el fin de ejemplificar la presente invención y no se deben interpretar en modo alguno como una restricción de la descripción amplia de la invención expuesta anteriormente.

30 EJEMPLOS

Ejemplo 1

35 Antecedentes

A modo de antecedentes de la presente invención, los investigadores estudiaron modo de administración de vacunas en el modelo de oveja canulada. La canulación permite la salida del ganglio linfático drenante local que se va a estudiar con cierto detalle. Este trabajo se realizó en ovejas con la vacuna del virus de la gripe con adyuvante ISCOMATRIX™ como el modelo de vacuna. Uno de los principales descubrimientos de este trabajo fue que la administración intranasal era muy ineficaz, por lo que induce una inmunidad local escasa incluso a dosis de antígeno altas.

40 Estos descubrimientos motivaron un cambio de dirección para que en el proyecto se estudiaran los resultados de la administración de vacunas en ovejas sin canular por vía intrapulmonar, mediante la administración de la vacuna en la profundidad de un lóbulo del pulmón.

Procedimientos experimentales:

50 Extracción de sangre

Se refrenó a las ovejas y se les extrajeron 10 ml de sangre de la vena yugular con una jeringa de 10 ml y una aguja del calibre 18.

55 Inmunizaciones

El antígeno de la gripe usado en estos estudios era el virus H1N1 A/New Caledonia/20/99 purificado en un gradiente de sacarosa, que se había inactivado y se disgregó con detergente (Coulter y cols., 1998). La concentración de antígeno se basó en el contenido en hemaglutinina y se determinó por inmunodifusión radial simple. CSL Limited preparó adyuvante ISCOMATRIX™ de calidad BPF según un procedimiento descrito anteriormente (Pearse y Drane, 2005). Antes de la inmunización, se prepararon formulaciones de vacuna mediante la mezcla de una cantidad apropiada de antígeno con adyuvante ISCOMATRIX™.

65 Para las inmunizaciones intrapulmonares, se refrenó con cuidado a las ovejas con un arnés y se les insertó un broncoscopio por la nariz izquierda hacia el lóbulo caudal del pulmón izquierdo. Después, se infundieron las

formulaciones de vacuna en un volumen total de 5 ml, seguido de 10 ml de aire, para garantizar la administración completa.

5 Para las inmunizaciones subcutáneas, se administraron formulaciones de vacuna en un volumen total de 200 µl en la cara interior del muslo con una jeringuilla de 1 ml y una aguja del calibre 25.

Extracción de lavado broncoalveolar (LBA)

10 Para la extracción de muestras de lavado broncoalveolar (LBA) se insertó un broncoscopio en ovejas refrenadas como para las vacunaciones y se administraron 10 ml de PBS (solución salina tamponada con fosfato a pH 7,2) en el lóbulo pulmonar con una jeringuilla unida al broncoscopio. Después, se usó la misma jeringuilla para extraer líquido de LBA por el broncoscopio.

Evaluación de las respuestas de anticuerpos por IEE

15 Se evaluaron los anticuerpos anti-virus de la gripe en las muestras de suero y LBA por duplicado por IEE (inmunoensayo enzimático). Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos de fondo plano Maxisorp (NUNC, Roskilde, Dinamarca) durante la noche con 50 µl de antígeno de la gripe a 10 µg/ml en tampón carbonato a pH 9,6. Después, se bloquearon las placas con caseína sódica al 1 % antes de añadir 100 µl de 1 de 5 diluciones seriadas de las muestras por duplicado. Se detectó la unión de anticuerpos anti-virus de la gripe específicos con una Ig total de conejo anti-oveja conjugada con peroxidasa de rábano picante (Dako, Dinamarca) o IgA anti-bovina/ovina (Serotec, Oxford) seguido de conejo anti-ratón con peroxidasa de rábano picante (Dako). Se reveló el color por la adición de sustrato TMB (Zymed, San Francisco) y se detuvo con la adición de H₂SO₄ 2 M. Se determinó la densidad óptica a 450 nm en un lector de placas ELx800 de BioTek y se calcularon los valores de los criterios de evaluación de anticuerpos.

Evaluación de la actividad de inhibición de la hemaglutinación

30 También se estudió la actividad de inhibición de la hemaglutinación (IHA) de las muestras de suero y LBA que dieron una respuesta de anticuerpos específica de antígeno por ELISA. Este ensayo determina el valor cuantitativo de anticuerpos funcionales con la medida de la inhibición de la aglutinación de eritrocitos por el virus de la gripe. Se estudió la IHA de las muestras contra el virus A/New Caledonia/20/99 (H1N1) cultivado en huevos, para lo que se utilizaron eritrocitos de pavo. Se determinó el valor cuantitativo de IHA como la dilución máxima que inhibió la aglutinación de los eritrocitos por el virus de la gripe. Los ensayos de IHA se realizaron en el Centro Colaborador de la OMS de Referencia e Investigación sobre la Gripe de Melbourne, Australia.

Reestimulación antigénica *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica

40 Se dispusieron muestras de sangre (50 ml) extraídas de la vena yugular con una jeringuilla y una aguja del calibre 18 en un tubo de 50 ml que contenía 100 de heparina a 5.000 U/ml. Después, se centrifugaron las células a 800 g durante 20 minutos sin freno, se recogió la capa leucocitaria en un tubo de 15 ml y se diluyeron a 8 ml con PBS. Con una pipeta de transferencia, se añadieron 3,5 ml de Ficoll-paque al fondo de la suspensión celular y se centrifugaron las muestras a 1.000 g durante 30 minutos sin freno. Después, se recogieron las células mononucleares de sangre periférica de la interfase de Ficoll-PBS, se lavaron en PBS y se resuspendieron a 5x10⁶/ml en medio completo (medio Eagle modificado de Dulbecco complementado con FCS al 10 %, L-glutamina, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y 2-mercaptoetanol 50 µM).

50 Para el ensayo de reestimulación antigénica, se repartieron 100 µl de células (5x10⁵/pocillo) en alícuotas en placas de cultivo tisular de 96 pocillos, a las que se les añadieron por triplicado 100 µl de medio solo o de medio con un contenido de 10 o 20 µg/ml de antígeno de la gripe A/New Caledonia (concentración final de 5 o 10 µg/ml de antígeno). Después de 5 días de cultivo a 37 °C en una incubadora humidificada, se pulsaron todos los pocillos con 20 µl de timidina tritiada con 1 µCi durante 24 horas. Después, se recogieron las células sobre filtros de fibra de vidrio con un Packard Harvester, se dispusieron en recipientes con líquido de centelleo Microscint y se midió la radiación β con un contador de centelleo de microplacas automático.

Evaluación de la inmunización en la parte superior e inferior del pulmón

60 Se llevó a cabo el estudio de la eficacia de la inmunización por administración en la parte superior del pulmón, como alternativa a la administración en la parte inferior del pulmón, como se describe a continuación. La figura 1 (de Nickel y cols., 1979) ilustra las zonas del pulmón de la oveja usadas para la administración en la parte superior e inferior del pulmón.

65 La vacuna administrada en la "parte superior del pulmón" - se administró en la parte superior del pulmón con un broncoscopio de fibra óptica. Se introdujo la vacuna en los bronquios principales, 1 cm más allá de la bifurcación traqueal principal.

La vacuna administrada en la "parte inferior del pulmón" - se administró en la parte inferior del pulmón con un broncoscopio de fibra óptica. Se introdujo la vacuna donde el bronquio inferior se une a los bronquios segmentarios inferiores, 10 cm más allá de la bifurcación traqueal principal.

5 Las inmunizaciones, las extracciones de sangre, la extracción de LBA y los ensayos ELISA se llevaron a cabo como se describe para los demás experimentos. Las ovejas recibieron tres dosis de 0,04 µg de antígeno de la gripe con 100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™.

Resultados:

10 Inducción de anticuerpos por inmunización a través de la vía intrapulmonar

Se inmunizaron ovejas por vía intrapulmonar en 3 experimentos independientes. Se realizaron extracciones de sangre 2 semanas después de la 1ª dosis y una semana después de la 2ª y la 3ª dosis.

15 *Experimento 1* se inmunizaron ovejas con 1, 5 o 15 µg de antígeno más 100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™. Se administraron tres inmunizaciones separadas 3 semanas. Se extrajeron muestras de suero antes del comienzo y después de cada vacunación.

20 Después del sorprendente descubrimiento de que 1 µg de antígeno de la gripe con adyuvante administrado por vía intrapulmonar era tan eficaz como 15 µg, se estudiaron reducciones adicionales de la dosis de antígeno en un segundo experimento.

25 *Experimento 2* se inmunizaron ovejas con 0,04, 0,2, 1, 5 o 15 µg de antígeno más 100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™. Se administraron tres inmunizaciones separadas 3 semanas. Se extrajeron muestras de suero antes del comienzo y después de cada inmunización.

30 Estos experimentos demostraron que todas las dosis de antígeno inducían respuestas de anticuerpos en los animales receptores (incluso la de tan solo 0,04 µg de antígeno). Las dosis más bajas de antígeno indujeron muy pocos anticuerpos después de una dosis. Sin embargo, la inmunidad de los animales receptores fue equivalente a la de las dosis de antígeno más altas después de 2 y 3 dosis. Estas respuestas de anticuerpos incluían la inhibición funcional de la hemaglutinación (IHA).

35 Las concentraciones séricas de IgG e IgA en ovejas inmunizadas por vía intrapulmonar con 0,04 µg de antígeno y 100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™ fueron equivalentes a las obtenidas después de la inmunización subcutánea con 15 µg de antígeno solo (dosis de vacuna actual). Las inmunizaciones de dosis baja por vía intrapulmonar produjo muy buenas concentraciones de IgA e IgG específicas en el pulmón (LBA - lavado broncoalveolar), superiores a las inducidas por las dosis mayores inyectadas por vía subcutánea.

40 *Experimento 3* El tercer experimento evaluó (i) la necesidad de adyuvante para inducir una inmunidad significativa con una dosis de antígeno baja, (ii) comparó directamente una dosis de antígeno baja (0,04 µg) administrada por vía intrapulmonar con una dosis baja administrada por vía subcutánea, (iii) estudió dosis de antígeno aún más bajas (0,008 µg de antígeno).

45 En el tercer experimento:

(a) se repitieron las observaciones realizadas en los dos primeros;

50 (b) se demostró que el adyuvante era esencial para la inducción de la inmunidad contra dosis muy bajas de antígeno;

55 (c) se descubrió que el antígeno en dosis bajas con adyuvante administrado por vía intrapulmonar inducía cantidades similares de anticuerpos séricos y superiores de anticuerpos pulmonares en comparación con la vacuna con la misma dosis de antígeno baja o la dosis de la vacuna actual, administradas por vía subcutánea;

(d) se descubrió que más de 2 dosis de antígeno en dosis muy bajas con adyuvante inyectadas por vía subcutánea parecían inducir una tolerancia o un efecto inhibitor, ya que disminuían los anticuerpos séricos después de la 3ª dosis. Esta inhibición no se produjo después de la administración pulmonar;

60 (e) se descubrió que la inmunización intrapulmonar incluso con 0,008 µg de antígeno administrado con 100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™ inducía una inducción de anticuerpos significativa, aunque menor que la inducida por 0,04 µg de antígeno con adyuvante ISCOMATRIX™.

Los datos combinados de los experimentos 1 a 3 se resumen en la figura 2 y en la tabla 1.

65

Tabla 1 Actividad de inhibición de la hemaglutinación (IHA) inducida por inmunización intrapulmonar con dosis decrecientes de antígeno de la gripe y adyuvante ISCOMATRIX™

Vía		Mediana del valor cuantitativo de IHA (intervalo intercuartil)					
		Suero			Lavado broncoalveolar		
		Primaria	Secundaria	Terciaria	Primaria	Secundaria	Terciaria
S/C	15 µg de ant. gripe	5 (0-18)	30 (20-100)	100 (20-440)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Pulmonar	15 µg ant. gripe + IMX	10 (10)	330 (20-640)	60 (35-400)	0 (0)	10* (10-20)	10* (10-20)
Pulmonar	5 µg ant. gripe + IMX	0 (0)	160 (120-160)	240 (70-400)	0 (0)	0 (0-10)	40* (8-50)
Pulmonar	1 µg ant. gripe + IMX	0 (0)	30 (15-40)	160 (140-320)	0 (0)	0 (0)	5 (0-10)
Pulmonar	0,2 µg ant. gripe + IMX	0 (0)	15 (0-40)	160 (65-200)	0 (0)	0 (0)	5 (0-13)
Pulmonar	0,04 µg ant. gripe + IMX	0	10	160	0	0	30*
Pulmonar	0,08 µg ant. gripe + IMX	0	0	20	0	0	0

Leyenda de la tabla 1: Se combinan datos de 3 experimentos independientes. Se inmunizaron grupos de ovejas (n=8 por grupo, excepto el grupo con 15 µg de ant. de gripe (n=12) y el de 0,04 µg de ant. de gripe +IMX (n=16)) en el pulmón izquierdo con dosis decrecientes de antígeno de la gripe de virión degradado más 100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™ (IMX). Se inmunizó un grupo de ovejas de control de vacuna por vía subcutánea (S/C) con una dosis equivalente de una cepa de la vacuna actual contra la gripe humana (15 µg de antígeno de la gripe solo). Las ovejas recibieron 3 inmunizaciones espaciadas 3 semanas. Se extrajeron suero y lavados del pulmón izquierdo (LBA) de todas las ovejas una semana antes y dos semanas después de la dosis primaria y una semana después de las dosis secundaria y terciaria. Después, se determinaron los valores cuantitativos de estas muestras que inhibieron la hemaglutinación mediada por la gripe. Todas las muestras anteriores a la inmunización resultaron negativas para la actividad de IHA (no mostrado).
* Valor cuantitativo de IHA significativamente mayor en comparación con el control inmunizado por vía subcutánea (Mann Whitney; p<0,004).

5 Los datos del experimento 3 se muestran en la tabla 2 y en la figura 3.

Tabla 2 Necesidad de adyuvantes y vía de administración en la actividad de inhibición de la hemaglutinación inducida por inmunización con dosis extremadamente bajas de antígeno de la gripe

Vía		Mediana del valor cuantitativo de IHA (intervalo intercuartil)					
		Suero			Lavado broncoalveolar		
		Primaria	Secundaria	Terciaria	Primaria	Secundaria	Terciaria
S/C	15 µg de ant. gripe	0 (0-3)	30 (20-100)	30 (18-160)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
S/C	0,04 µg de ant. gripe	0 (0)	10 (0-40)	25 (8-50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
S/C	0,04 µg de ant. gripe + IMX	20 * ^ (8-20)	320 * ^ (280-400)	160 ^ (80-320)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Pulmonar	0,04 µg de ant. gripe	0 (0)	0# (0)	0# (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Pulmonar	0,04 µg de ant. gripe + IMX	0 (0)	5 (0-18)	160 ^ (80-200)	0 (0)	0 (0)	60 * ^ (30-100)

Leyenda de la tabla 2: Se inmunizaron grupos de ovejas (n=8) en el pulmón izquierdo con una dosis extremadamente baja (0,04 µg) de antígeno de la gripe de virión degradado con o sin 100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™ (IMX). Otros grupos recibieron las mismas vacunas inyectadas por vía subcutánea (S/C). Se inmunizó un grupo de ovejas de control de vacuna por vía subcutánea con una dosis de antígeno equivalente de una cepa de la vacuna actual contra la gripe humana (15 µg de antígeno de la gripe solo). Las ovejas recibieron 3 inmunizaciones espaciadas 3 semanas. Se extrajeron suero y lavados del pulmón izquierdo (LBA) de todas las ovejas una semana antes y dos semanas después de la inmunización primaria y una semana después de las dosis secundaria y terciaria. Después, se determinaron los valores cuantitativos de estas muestras que inhibieron la hemaglutinación mediada por la gripe. Todas las muestras anteriores a la inmunización resultaron negativas para la actividad de IHA (no mostrado).
 # Valor cuantitativo de IHA significativamente menor en comparación con el control inmunizado por vía subcutánea (Mann Whitney; p<0,002).
 * Valor cuantitativo de IHA significativamente mayor en comparación con el control inmunizado por vía subcutánea (Mann Whitney; p<0,028).
 ^ Valor cuantitativo de IHA significativamente mayor en comparación con el grupo sin adyuvante (Mann Whitney; p<0,01).

En las figuras 1 y 2:

Barra horizontal	= valor de la mediana
Barra blanca	= 50 % intermedio de los valores
Línea vertical	= percentiles 10 y 90.
IMX	= adyuvante ISCOMATRIX™

5 Las barras muestran el valor del criterio de evaluación de anticuerpos específico para la gripe después de la primera (1^o), la segunda (2^o) y la tercera (3^o) inmunización como se describe anteriormente.

En la figura 1: * Significativamente mayor que el grupo de 15 µg s/c (Mann-Whitney; p<0,03).

10 En la figura 2

Significativamente menos que el grupo de 15 µg s/c (Mann-Whitney; p<0,01).

* Significativamente mayor que el grupo de 15 µg s/c (Mann-Whitney; p<0,038).

^ Significativamente mayor que la vacuna sin adyuvante administrada por la misma vía (Mann-Whitney; p<0,038).

15 § Vía subcutánea, significativamente mayor que la misma vacuna administrada por vía intrapulmonar (Mann-Whitney; p<0,028).

∩ Vía intrapulmonar, significativamente mayor que la misma vacuna administrada por vía subcutánea (Mann-Whitney; p<0,021).

20 *Experimento 4* En este experimento se evaluó la eficacia de la administración de antígeno de la gripe con adyuvante en la parte superior del pulmón, en comparación con la administración en la parte inferior del pulmón utilizada en experimentos previos. Dos grupos de 8 ovejas recibieron una formulación que contenía 0,04 µg de antígeno de la gripe y 100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™ en la parte superior o inferior del pulmón tres veces y se estudiaron las respuestas de anticuerpos en el suero y el LBA por IEE (figura 4).

25

Estos resultados indicaron que, después de tres dosis, aunque la administración en la parte superior del pulmón inducía respuestas séricas y en el LBA, la administración en la parte inferior del pulmón inducía respuestas significativamente mejores tanto en el suero como en el LBA para IgG e IgA.

30 Sumario:

La inmunización intrapulmonar con antígeno del virus de la gripe con 100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™ demostró ser muy eficaz en la inducción de respuestas de anticuerpos tanto sistémicas como mucosas (LBA) con actividad IHA.

35

Se observaron respuestas de anticuerpos séricas intensas incluso a concentraciones extremadamente bajas de antígeno (0,04 µg de antígeno de la gripe con adyuvante ISCOMATRIX™). Estas respuestas fueron mucho más intensas que las inducidas por inyección subcutánea (s/c) de 15 µg de antígeno de la gripe solo (según la vacuna actual) y coincidían con las inducidas por 0,04 µg de antígeno de la gripe con adyuvante ISCOMATRIX™ por vía subcutánea.

40

La respuesta de anticuerpos mucosa inducida por la administración intrapulmonar de 0,04 µg de antígeno de la gripe con adyuvante ISCOMATRIX™ fue enormemente elevada en comparación con la subcutánea de 15 µg de antígeno

de la gripe o la subcutánea de 0,04 µg de antígeno de la gripe con adyuvante ISCOMATRIX™. Ninguna de estas últimas indujo respuestas mucosas (pulmonares) detectables.

Ejemplo 2.

Inducción de inmunidad celular por vacunación a través de la vía intrapulmonar

Las ovejas recibieron 4 inmunizaciones intrapulmonares con 0,04 µg de antígeno de la gripe solo o 0,04 µg de ant. de la gripe + 100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™. Una semana después de la última inmunización, se extrajo sangre periférica y se cultivaron células mononucleares en placas de 96 pocillos con medio solo (control negativo) o con 5 o 10 µg de antígeno de la gripe (reestimuladas). Después de cinco días, se pulsaron los pocillos con timidina tritiada durante 24 horas. Después, se midió la radioactividad para determinar la proliferación celular. Se calcularon los índices de estimulación mediante la división de la media de las cuentas por minuto (cpm) para el grupo reestimulado entre las cpm medias para el grupo de control con medio solo.

Los resultados de un estudio de proliferación celular se muestran en la tabla 3. Cuando se vacunó a las ovejas por vía intrapulmonar con antígeno solo no se pudieron detectar respuestas proliferativas en la sangre periférica. Sin embargo, se detectó una respuesta de este tipo en ovejas que recibieron antígeno con adyuvante ISCOMATRIX™. Estos datos demuestran la necesidad de adyuvante, después de la administración pulmonar de la vacuna, para inducir una respuesta de memoria de proliferación celular en la circulación periférica.

Tabla 3 Respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con virus de la gripe de ovejas inmunizadas por vía intrapulmonar con dosis bajas de antígeno, con o sin adyuvante ISCOMATRIX™

Vacunación intrapulmonar		Índice de estimulación medio (intervalo intercuartil) después de la reestimulación con	
Vacuna	Tamaño del grupo	5 µg de antígeno de la gripe	10 µg de antígeno de la gripe
0,04 µg de ant. de la gripe	n=8	1 (1-2)	1 (1-3)
0,04 µg de ant. de la gripe +100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™	n=8	6 (2-16)	10 (3-25)

Ejemplo 3.

Formulación de antígeno con adyuvante de aceite en agua microfluidizado para su administración por vía intrapulmonar.

Se mezcla antígeno a una concentración apropiada (para dar lugar a una concentración final de antígeno que proporciona una dosis individual en el intervalo de 0,01 a 500 µg) con escualeno al 5 % v/v, Tween 80 al 0,5 % v/v, Span 85 al 0,5 % v/v en PBS al pH 7,2 y azida de sodio al 0,05 %. Después, se somete esta mezcla a microfluidización a alta presión a una presión de 131-138 x 10³ kPa (19-20.000 psi). Se repite la microfluidización siete veces más. Se administra la formulación por vía intrapulmonar por los procedimientos descritos anteriormente.

Ejemplo 4.

Inmunidad sistémica y mucosa inducida por inmunización por vía intrapulmonar con antígeno gB recombinante del citomegalovirus formulado con adyuvante ISCOMATRIX™

Para confirmar y ampliar las observaciones realizadas con antígeno de la gripe y adyuvante ISCOMATRIX™, se realizaron estudios en ovejas para examinar las respuestas inmunitarias inducidas por la administración intrapulmonar de un antígeno vírico recombinante. Se administró por vía subcutánea y por vía subcutánea una forma truncada de glucoproteína gB del citomegalovirus (gB del CMV) formulada con adyuvante ISCOMATRIX™ y se evaluaron las respuestas de anticuerpos en suero y pulmón por IEE. Además, se evaluó la inducción de anticuerpos funcionales mediante el análisis de anticuerpos neutralizadores del CMV en el suero. También se estudió la capacidad de las formulaciones administradas por vía intrapulmonar de inducir respuestas de linfocitos T mediante al evaluación de la proliferación celular específica de gB de células mononucleares de sangre periférica.

Procedimientos experimentales

Producción de proteína gB del CMV humana recombinante truncada

1. Generación de un plásmido que contiene ADN que codifica la proteína ΔgB.

El ADN que codifica una forma truncada de gB del CMV que se había genomanipulado para eliminar la región transmembranaria de la proteína lo proporcionó el profesor titular Rajiv Khanna, del Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia. Este ADN codificaba una proteína que contenía la secuencia señal del activador

5 tisular del plasminógeno (ATP) con los dominios ecto y citoplásmico (NCBI P06473) de gB fusionado en marco. Asimismo, el ADN contenía una mutación puntual en los nucleótidos que codifican la región circundante a los aminoácidos 460/461 para evitar la escisión de la proteína expresada. Se clonó el ADN en el vector pCEP4 (Invitrogen) como un fragmento *KpnI/NotI*. Se amplificó el plásmido resultante (pCEP4ΔgB) en *E. coli* y se preparó el plásmido purificado con Qiagen Maxi Kit.

2. Expresión de la proteína ΔgB en células de mamífero

10 Se transfectaron cultivos de células 293-F FreeStyle™ en medio de expresión FreeStyle™ (Invitrogen) en matraces de agitación a 37 °C con pCEP4ΔgB usando el reactivo de transfección 293fectin (Invitrogen). Se determinó la expresión secretada de la proteína ΔgB sometida a selección con higromicina B en los cultivos mediante el análisis en gel de SDS-PAGE de muestras de sobrenadante celular. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular y se aclararon por centrifugación a 2.500 rpm y después se pasaron por un filtro de 0,45 μm antes de la cromatografía.

15 3. Purificación de la proteína ΔgB

20 Se purificó la proteína ΔgB por cromatografía de afinidad por captura con el anticuerpo monoclonal específico de gB 58-15 (Singh y Compton, 2000). Se purificó el anticuerpo en una columna de proteína A Prosep-A (Millipore). Para la purificación de la proteína ΔgB, se acopló el anticuerpo purificado a una columna HP activada con NHS HiTrap (Pharmacia-Amersham) en tampón de equilibrado (NaHCO₃ 0,2 M/NaCl 0,5 M, a pH 8,3). Se diluyó el sobrenadante de cultivo celular aclarado 1:1 con borato 100 mM/NaCl 150 mM a pH 8,5. Se aplicó el sobrenadante diluido en la columna HiTrap, se equilibró con tampón de equilibrado y se eluyó en primer lugar con glicina 0,1 M-HCl a pH 2,5, seguido de tampón de equilibrado y una nueva elución, esta vez con hidróxido de amonio 0,15 M a pH 10,5. Se neutralizaron las fracciones eluidas con Tris 3 M a pH 8 o con glicina 1 M a pH 2,5. Se estudió la pureza proteínica por electroforesis en gel de SDS-PAGE con tinción de Coomassie (figura 5). Se calculó la concentración de proteína mediante la determinación de la DO a 280 nm.

Inmunización de ovejas con ΔgB

30 Extracción de sangre

Los procedimientos fueron los mismos que los descritos en el ejemplo 1.

Inmunizaciones

35 Se inmunizaron grupos de ovejas con proteína ΔgB formulada con adyuvante ISCOMATRIX™ (Tabla 4). La proteína ΔgB del citomegalovirus se preparó como se ha descrito.

40 Todas las ovejas recibieron tres dosis de vacuna; los detalles, incluido el calendario de extracción de sangre, se describen en el ejemplo 1.

Tabla 4. Se inmunizaron grupos de ovejas por las vía indicada con proteína ΔgB formulada con adyuvante ISCOMATRIX™.

Grupo	Tamaño	Vía de administración	Antígeno	Adyuvante
1	n=8	Subcutánea	15 μg de ΔgB del CMV	100 μg de adyuvante ISCOMATRIX™
2	n=8	Intrapulmonar	15 μg de ΔgB del CMV	Adyuvante ISCOMATRIX™

Extracción de LBA

La extracción de muestras de LBA se realizó como describe en el ejemplo 1.

50 Evaluación de las respuestas de anticuerpos por IEE

55 Los procedimientos para detectar IgG e IgA de oveja fueron similares a los del ejemplo 1, con las siguientes excepciones. Se recubrieron las placas (de 96 pocillos) durante la noche con 100 μl por pocillo de 2 μg/ml de proteína ΔgB purificada en PBS. Se detectó la IgG de oveja unida con una IgG de conejo anti-oveja (H+L) conjugada con peroxidasa de rábano picante (Southern Biotech). Tanto en el caso de IgG como en el de IgA, el sustrato de peroxidasa TMB lo suministraron KPL Kirkegaard y Perry Laboratories, respectivamente. Se detuvo la reacción por la adición de 50 μl por pocillo de H₂SO₄ 0,5 M.

Evaluación de actividad funcional contra el CMV

Se evaluó la capacidad de las vacunas de inducir anticuerpos séricos funcionales mediante un ensayo de neutralización basado en la infección de células MRC-5 por citomegalovirus humano recombinante. Los ensayos los realizaron el profesor titular Rajiv Khanna y sus colaboradores, del Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia, y utilizaron CMV recombinante Ad169wt86-EGFP que expresa proteína verde fluorescente (Marschall y cols., 2000; Wang y cols., 2004). Después de la exposición de Ad169wt86-EGFP a diluciones de suero, se evaluó la capacidad del virus de infectar fibroblastos humanos (células MRC-5) mediante la cuantificación del porcentaje de núcleos celulares fluorescentes por citometría de flujo (FACS). El procedimiento se describe a continuación:

1. Se incubaron sueros de oveja a 56 °C durante 30 minutos.
2. Se dispusieron los sueros de oveja (puro y diluido 2 y 4 veces en 100 µl de DMEM) en una bandeja de 96 pocillos.
3. Se añadieron 25 µl (2,5 x 10⁴ UFP) de virus Ad169wt86-EGFP a cada muestra de suero.
4. Se incubaron las muestras de suero/virus a 37 °C durante 2 horas en CO₂ al 7 % en aire.
5. Previamente, se habían preparado bandejas de fondo plano de 48 pocillos que contenían células MRC-5 cultivadas en DMEM con suero bovino fetal al 10 % (DMEM-10) por incubación a 37 °C en CO₂ al 7 % en aire que, en el momento de su uso, se encontraban en una confluencia del 80-90 %.
6. Se retiró el medio de cultivo celular de las células MRC-5. Después, se transfirieron 50 µl de cada muestra de virus/suero a los pocillos correspondientes de las bandejas de fondo plano de 48 pocillos que contenían células MRC-5, se añadieron 50 µl de DMEM y se incubaron las bandejas de 48 pocillos a 37 °C durante 2 horas en CO₂ al 7 % en aire con un balanceo suave.
7. Se aspiró el inóculo de las bandejas de 48 pocillos, se lavaron los pocillos tres veces con DMEM-10 y después se añadieron 500 µl de DMEM-10 a cada pocillo y se incubaron a 37 °C en CO₂ al 7 % en aire durante la noche.
8. Al día siguiente, se recogió el medio celular y las células (se usó tripsina) de las bandejas de 48 pocillos y se sedimentaron las células por centrifugación.
9. Se resuspendieron los sedimentos en PBS y se sedimentaron de nuevo por centrifugación.
10. Se resuspendieron enérgicamente los sedimentos en 100 µl de tampón hipotónico (citrato de sodio al 0,1 %, Triton X-100 al 0,1 % (v/v)) que contenía 0,2 µl de 7-aminoactinomicina D 1 mg/ml y se dejaron 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
11. Se transfirieron muestras de cada sedimento a tubos adecuados para un análisis de FACS y se añadieron 100 µl de PBS con un contenido del 1 % en paraformaldehído. Se dejó la mezcla en hielo 30 minutos antes del análisis de FACS.
12. Se analizaron las muestras en un FACSCanto de Becton Dickinson y se cuantificó el porcentaje de núcleos fluorescentes de las muestras.
13. Se calculó el porcentaje de neutralización para cada muestra con la fórmula:

$$\% \text{ de neutralización} = \frac{[\text{porcentaje de núcleos fluorescentes (sin suero añadido)} - \text{porcentaje de núcleos fluorescentes (muestra de suero)}]}{\text{porcentaje de núcleos fluorescentes (sin suero añadido)}} \times 100.$$

Reestimulación antigénica *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica

Se dispusieron muestras de sangre (50 ml) extraídas de la vena yugular con una jeringuilla y una aguja del calibre 18 en un tubo de 50 ml que contenía 100 de heparina a 5.000 U/ml. Después, se centrifugaron las células a 800 g durante 20 minutos sin freno, se recogió la capa leucocitaria en un tubo de 15 ml y se diluyeron a 8 ml con PBS. Con una pipeta de transferencia, se añadieron 3,5 ml de Ficoll-paque al fondo de la suspensión celular y se centrifugaron las muestras a 1.000 g durante 30 minutos sin freno. Después, se recogieron las células mononucleares de sangre periférica de la interfase de Ficoll-PBS, se lavaron en PBS y se resuspendieron a 5x10⁶/ml en medio completo (medio Eagle modificado de Dulbecco complementado con FCS al 10 %, L-glutamina, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y 2-mercaptoetanol 50 µM).

Para el ensayo de reestimulación antigénica, se repartieron 100 µl de células (5x10⁵/pocillo) en alícuotas en placas de cultivo tisular de 96 pocillos, a las que se les añadieron por triplicado 100 µl de medio solo o de medio con un

5 contenido de 5, 10, 20 o 40 µg/ml de proteína gB (concentración final de 2,5, 5, 10 o 20 µg/ml). Después de 5 días de cultivo a 37 °C en una incubadora humidificada, se pulsaron todos los pocillos con 20 µl de timidina tritiada con 1 µCi durante 24 horas. Después, se recogieron las células sobre filtros de fibra de vidrio con un Packard Harvester, se dispusieron en recipientes con líquido de centelleo Microscint y se midió la radiación β con un contador de centelleo de microplacas automático.

Resultados

10 Respuestas inmunitarias después de la inmunización intrapulmonar y subcutánea con antígeno ΔgB del CMV recombinante formulado con adyuvante ISCOMATRIX™

15 Las ovejas recibieron tres dosis por vía subcutánea o intrapulmonar a intervalos de 3 semanas del antígeno ΔgB del CMV formulado con adyuvante ISCOMATRIX™. Se extrajeron muestras de suero y LBA una semana antes de la primera dosis, 2 semanas después de la primera dosis y 1 semana después de la segunda y la tercera dosis. Para los datos de IEE de anticuerpos, se restaron los valores cuantitativos de anticuerpos antes de la inmunización.

20 Los resultados de estos experimentos con ΔgB formulado con adyuvante ISCOMATRIX™ (figura 6) fueron similares en gran medida a los mostrados en el ejemplo 2 con una dosis baja de antígeno de la gripe (0,04 µg) formulado con adyuvante ISCOMATRIX™, donde las respuestas séricas de IgG e IgA después de la administración intrapulmonar fueron equivalente a las de la administración por vía subcutánea después de tres dosis. Sin embargo, en contraste con los resultados obtenidos con formulaciones de antígeno de la gripe, ΔgB formulado con adyuvante ISCOMATRIX™ administrado por vía intrapulmonar indujo IgG e IgA séricas equivalentes a las de la administración subcutánea después de tan solo dos dosis e IgG séricas significativamente más altas al estudiar las respuestas después de una dosis (figuras 6a y b).

25 En el caso de las respuestas de anticuerpos en el pulmón, las respuestas después de la inmunización con ΔgB formulado con adyuvante ISCOMATRIX™ fueron de nuevo paralelas a las observaciones realizadas con dosis baja de antígeno de la gripe formulado con adyuvante ISCOMATRIX™. ΔgB formulado con adyuvante ISCOMATRIX™ indujo respuestas de anticuerpos significativamente superiores en el pulmón después de tres dosis al administrarlo por vía intrapulmonar en comparación con la administración subcutánea de la misma formulación (figuras 6c y d).

30 En el caso de la inducción de anticuerpos funcionales, los resultados de los ensayos de neutralización del CMV en suero fueron acordes con los obtenidos en el IEE de las respuestas de IgG séricas (figura 7). Las respuestas de anticuerpos neutralizadores inducidas por administración tanto intrapulmonar como subcutánea de ΔgB formulado con adyuvante ISCOMATRIX™ fueron significativamente mayores que en los sueros antes de la inmunización. Las respuestas de neutralización aumentaron más después de tres dosis. Los resultados indican una inducción equivalente de anticuerpos neutralizadores en el suero al administrar antígeno formulado con adyuvante ISCOMATRIX™ por vía intrapulmonar y subcutánea.

35 Los resultados del ensayo de reestimulación de células mononucleares de sangre periférica con ΔgB (figura 8), indican que el antígeno formulado con adyuvante ISCOMATRIX™ administrado pro vía intrapulmonar o subcutánea inducía respuestas de linfocitos T después de dos o tres dosis (índice de estimulación de 4 o superior). Las dos vías de administración indujeron respuestas de linfocitos T equivalentes.

45 Ejemplo 5

Inmunidad sistémica y mucosa inducida por vacunación por vía intrapulmonar con diferentes tecnologías adyuvantes

50 Estos estudios se realizaron para averiguar si los adyuvantes distintos del adyuvante ISCOMATRIX™ podían inducir respuestas de anticuerpos sistémicas y mucosas específicas de antígeno al administrarlos por vía intrapulmonar. Se inmunizaron grupos de ovejas por vía intrapulmonar con antígeno de la gripe formulado con varios adyuvantes alternativos y se compararon las respuestas con la de una formulación con adyuvante ISCOMATRIX™ (tabla 5).

55 Tabla 5 Grupos de ovejas inmunizadas por vía intrapulmonar con antígeno de la gripe formulado con diversas formulaciones de adyuvante

Grupo	Tamaño	Dosis de antígeno de la gripe (µg)	Adyuvante
1	n=4	15	-
2	n=7	15	100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™
3	n=7	15	100 µg de adyuvante ISCOMATRIX™ + 50 µg de MPL
4	n=7	15	1 µg de liposomas + 50 µg de MPL
5	n=7	15	1 µg de liposomas + 750 µg de CpG

Procedimientos experimentales

Preparación de formulaciones de adyuvante

5 A. Se prepararon liposomas por el siguiente procedimiento:

Soluciones tamponadoras:

Tampón IR: NaCl 0,14 M, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, CaCl₂·2H₂O 0,05 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM a pH 7,2

10

Tampón IVD: NaCl 0,14 M, Na₂HPO₄ 3,5 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 1,4 mM a pH 7,2

1. Se preparó una solución de 11,4 mg/ml de colesterol, 12,4 mg/ml dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y Mega10 en tampón IR (Col/DPPC).
- 15 2. Se diluyó 1/40 la Col/DPPC gradualmente durante 30 minutos por la adición de tampón IVD.
3. Se concentró la solución diluida por ultrafiltración a 40 °C con un cartucho de diafiltración ST 200 (Nephral) a 1/40 del volumen diluido original.
4. Se lavó la solución concentrada por ultrafiltración con 25 volúmenes de tampón IVD.
5. Se concentró la solución de Col/DPPC 2 veces por una ultrafiltración adicional.
- 20 6. Antes de la extrusión de lípidos, se incubó la Col/DPPC a 40 °C durante al menos 1 hora.
7. Se extrudieron los liposomas de la Col/DPPC con una extrusora de lípidos (T.001 Northern Lipids Inc., Canadá) equipada con una cuba térmica de 10 ml mantenida a 42 °C durante todo el procedimiento.
8. La extrusión se llevó a cabo en lotes de 10 ml de Col/DPPC con una presión de 1.400-2.000 kPa a través de un filtro de disco de PC de 0,1 µm.
- 25 9. Se repitió el procedimiento hasta someter toda la solución de Col/DPPC a 10 ciclos a través del sistema.
10. Se analizó el contenido en colesterol y DPPC de los liposomas resultantes y se observaron al microscopio electrónico con una tinción negativa para evaluar el tamaño y la homogeneidad.

30 B. Preparación de MPL

Se resuspendió monofosforil lípido A (MPL) (Sigma L6895) en DMSO (Sigma D2650) a 2 mg/ml y se mantuvo a 4 °C hasta su uso.

35 C. Preparación de CpG

Se resuspendió CpG (Sigma-Genosys 1062 4856-011) en Tris 10 mM/EDTA 1 mM a pH 8 y se mantuvo a 4 °C hasta su uso.

40 D. Preparación de formulaciones de adyuvante

Todas las formulaciones de adyuvante se prepararon por la mezcla de los componentes pertinentes con PBS como diluyente antes de la adición del antígeno de la gripe (tabla 5). Después de esto, se sometieron las formulaciones que contenían liposomas a sonicación en un sonicador VirSonic a potencia 4 con una sonda de 0.32 cm (1/8 pulgadas). Las formulaciones recibieron dos sonicaciones de 5 segundos separadas por 30 segundos, todas realizadas en hielo.

Inmunizaciones

50 Se inmunizaron grupos de ovejas con el antígeno de la gripe y las formulaciones de adyuvante descritas en la tabla 5 y se le extrajo sangre con los procedimientos descritos en el ejemplo 1.

Extracción de LBA

55 La extracción de muestras de LBA se realizó como describe en el ejemplo 1.

Evaluación de las respuestas de anticuerpos por ELISA

60 Se realizaron análisis de respuestas de anticuerpos frente al antígeno de la gripe en muestras de suero y LBA como se describe en el ejemplo 1.

Evaluación de la actividad de inhibición de la hemaglutinación

65 Se realizó un análisis de la actividad IHA en muestras de suero y LBA como se describe en el ejemplo 1.

Resultados

Evaluación de respuestas inmunitarias después de la vacunación intrapulmonar con formulaciones de antígeno de la gripe con una variedad de adyuvantes.

5 Las ovejas recibieron tres dosis a intervalos de 3 semanas. Se extrajeron muestras de suero y pulmonares (LBA) antes de la primera dosis y 2 semanas después y 1 semana después de la segunda y la tercera dosis. Para los datos de ELISA de anticuerpos, se restaron los valores cuantitativos de anticuerpos antes de la inmunización.

10 Los resultados de estos experimentos demostraron que las diferentes formulaciones de adyuvante presentaban distintas capacidades de inducir respuestas de anticuerpos al combinarlas con el antígeno y administrarlas por vía intrapulmonar (figuras 9 10).

15 Todos los adyuvantes confirieron algo de beneficio en comparación con el antígeno solo en la inducción de anticuerpos en el suero. Las formulaciones que contenían adyuvante ISCOMATRIX™ indujeron respuestas significativamente mejores que el antígeno solo después de tres dosis tanto en el suero como en el LBA y, en el caso de las IgG séricas, indujeron respuestas mejores después de dos dosis. Cabe destacar en particular los datos que demuestran la inducción de anticuerpos funcionales (IHA) por las formulaciones con adyuvante ISCOMATRIX™ tanto en el suero después de dos dosis como en el LBA después de tres dosis (figura 10).

20 Los datos (figura 9) también apuntan a un afecto de la adición de MPL a las formulaciones con adyuvante ISCOMATRIX™, en cuanto que se produjeron aumentos significativos con respecto al adyuvante solo en anticuerpos IgG e IgA en el suero después de una y dos dosis, respectivamente, en ovejas inmunizadas con la formulación que contenía antígeno y adyuvante ISCOMATRIX™ más MPL.

25 REFERENCIAS:

Casetti, M.C., y cols. Report of a consultation on role of immunological assays to evaluate efficacy of influenza vaccines. Initiative for Vaccine Research and Global Influenza Programme, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza, 25 de enero de 2005. *Vaccine* (2006), 24(5):541-543.

30 Coulter, A. y cols. Studies on experimental adjuvanted influenza vaccines: comparison of immune stimulating complexes (Iscoms™) and oil-in-water vaccines. *Vaccine* (1998), 16 (11/12): 1243-1253.

Cox, J.C. y Coulter, A.R. Adjuvants - a classification and review of their modes of action. *Vaccine* (1997), 15(3):248-256.

35 Edwards, D.A. y Dunbar, C. Bioengineering of therapeutic aerosols. *Annu Rev Biomed Eng* (2002), 4:93-107.

Gonda, I. The ascent of pulmonary drug delivery. *J Pharm Sci* (2000), 89:940-5

Griffith, G.D., y cols. Liposomally-encapsulated ricin toxoid vaccine delivered intratracheally elicits a good immune response and protects against a lethal pulmonary dose of ricin toxin. *Vaccine* (1997), 15 (17/18): 1933-1939.

40 Kuo, M. y Lechuga-Bellesteros, D. Patente de EE. UU. n.º 6518239.

Marschall, M., y cols. Recombinant green fluorescent protein-expressing human cytomegalovirus as a tool for screening antiviral agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2000), 44 (6): 1588-1597.

Nickel, R., Schummer A. y Seiferle E. Eds. *The Viscera of the Domestic Animals*. 2ª edición. Verlag Paul Parey, Berlín (1979).

45 Pearse, M.J. y Drane, D. ISCOMATRIX™ adjuvant for antigen delivery. *Adv. Drug. Del. Rev.* (2005), 57:465-474.

Oya Alpa, H., y cols. Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2005), 57:411-430.

Shoyele, S.A. y Slovey, A. Prospects for formulating proteins/peptides as aerosols for pulmonary drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* (2006), 314:1-8.

50 Singh J. y Compton T. Characterisation of a panel of insertion mutants in human cytomegalovirus glycoprotein B. *Journal of Virology* (2000) 74: 1383-1392.

Wang, Z., y cols. Development of an efficient fluorescence-based microneutralisation assay using recombinant human cytomegalovirus strains expressing green fluorescent protein. *Journal of Virological Methods* (2004), 120: 207-215.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende un antígeno y el adyuvante ISCOMATRIX™ para su uso en un procedimiento para desencadenar una respuesta inmunitaria en un sujeto humano o animal, que comprende administrar a dicho sujeto la composición por vía intrapulmonar.
- 10 2. Uso de una composición que comprende un antígeno y el adyuvante ISCOMATRIX™ en la fabricación de un medicamento para su administración por vía intrapulmonar a un sujeto humano o animal para desencadenar una respuesta inmunitaria en el sujeto.
- 15 3. La composición para su uso como se reivindica en la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en los que la composición es un aerosol o está en forma de polvo seco.
4. La composición para su uso como se reivindica en la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en los que la composición se administra a) al sujeto por inhalación oral; o b) en la parte inferior del pulmón del sujeto.
- 20 5. La composición para su uso como se reivindica en la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en los que la composición comprende un complejo inmunoestimulante en combinación con el adyuvante ISCOMATRIX™.
6. La composición para su uso como se reivindica en la reivindicación 5 o el uso de la reivindicación 5, en los que la composición comprende un adyuvante ISCOMATRIX™ en combinación con un adyuvante de lipopolisacárido.
- 25 7. La composición para su uso como se reivindica en la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en los que el antígeno es un antígeno que desencadena una respuesta inmunitaria contra un patógeno pulmonar.
- 30 8. La composición para su uso como se reivindica en la reivindicación 7 o el uso de la reivindicación 7, en los que el patógeno pulmonar es el virus de la gripe, *Chlamydia pneumonia*, el virus respiratorio sincicial o neumococos.
9. La composición para su uso como se reivindica en la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en los que el antígeno es un antígeno que desencadena una respuesta inmunitaria contra un patógeno de zonas de mucosa no pulmonares.
- 35 10. La composición para su uso como se reivindica en la reivindicación 9 o el uso de la reivindicación 9, en los que el patógeno es *Helicobacter pylori*, *Salmonella*, *E. coli*, cólera o el VIH.
- 40 11. La composición para su uso como se reivindica en la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en lo que el antígeno es un antígeno específico de tumor o un antígeno de un tumor asociado a una zona de mucosa.
12. La composición para su uso como se reivindica en la reivindicación 11 o el uso de la reivindicación 11, en los que el tumor es un tumor pulmonar, un tumor del tubo gastrointestinal o un tumor del aparato genital.

FIGURA 1

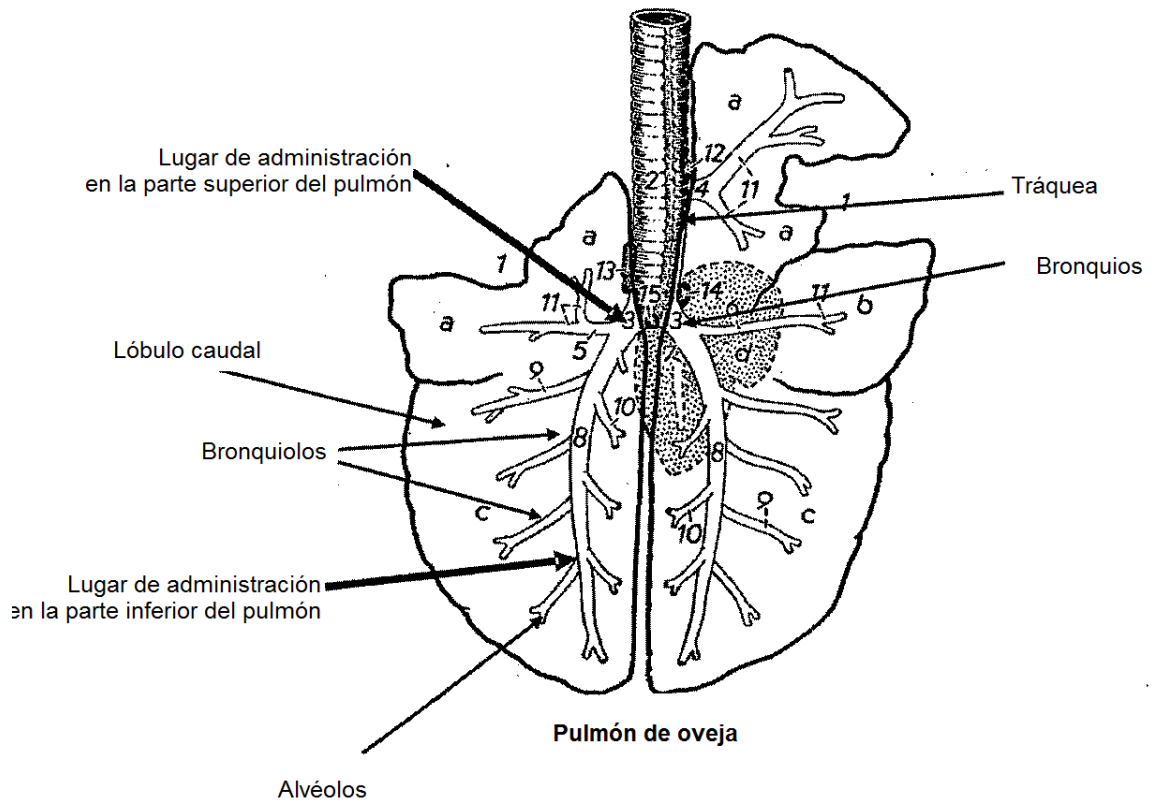
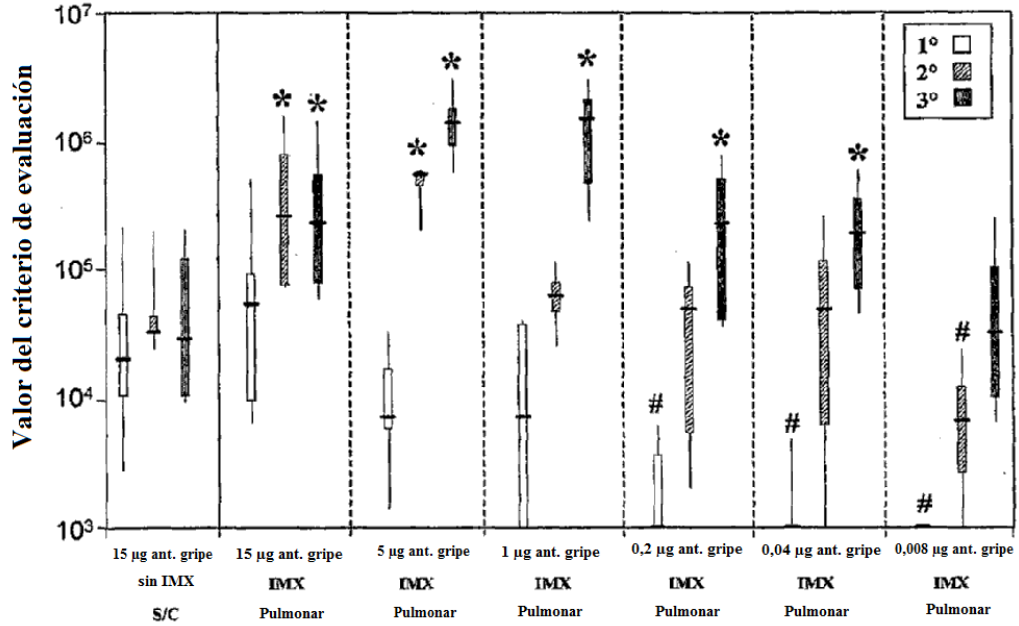


FIGURA 2

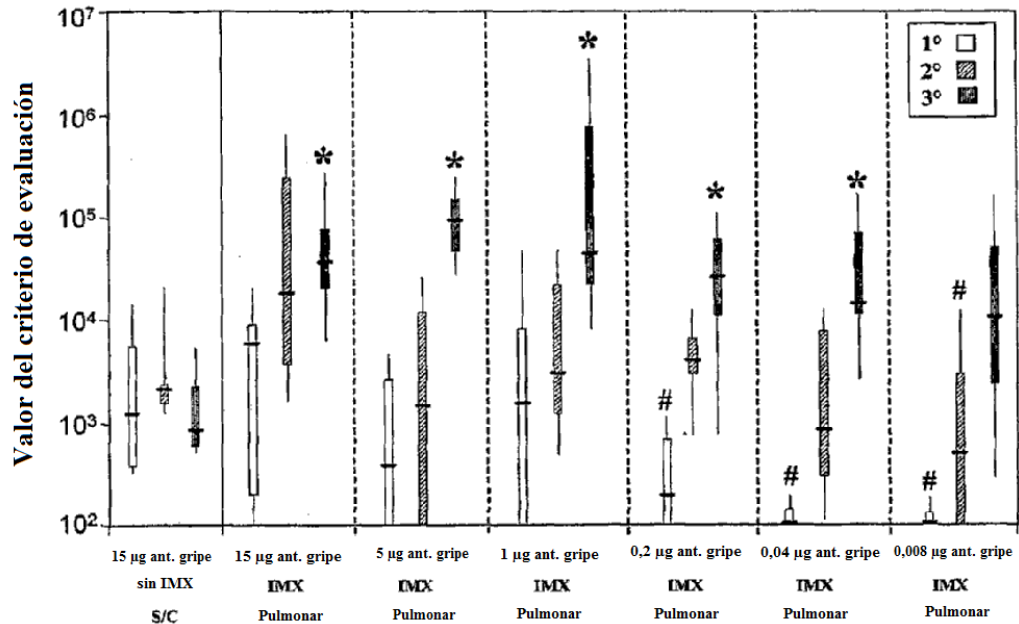
2a

IgG séricas específicas de ant. de la gripe



2b

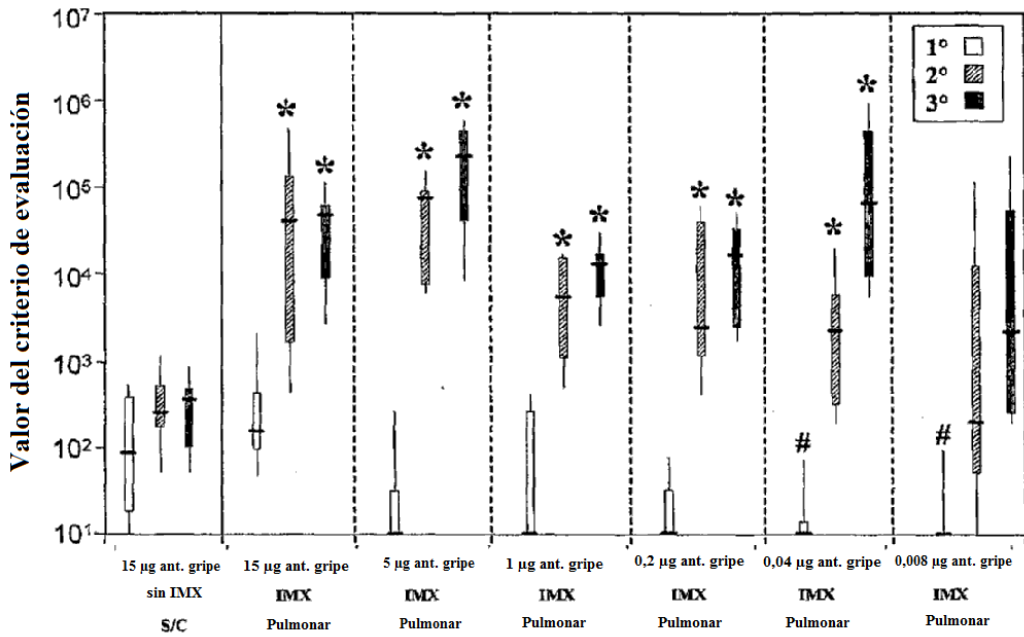
IgA séricas específicas de ant. de la gripe



IMX = adyuvante ISCOMATRIX™

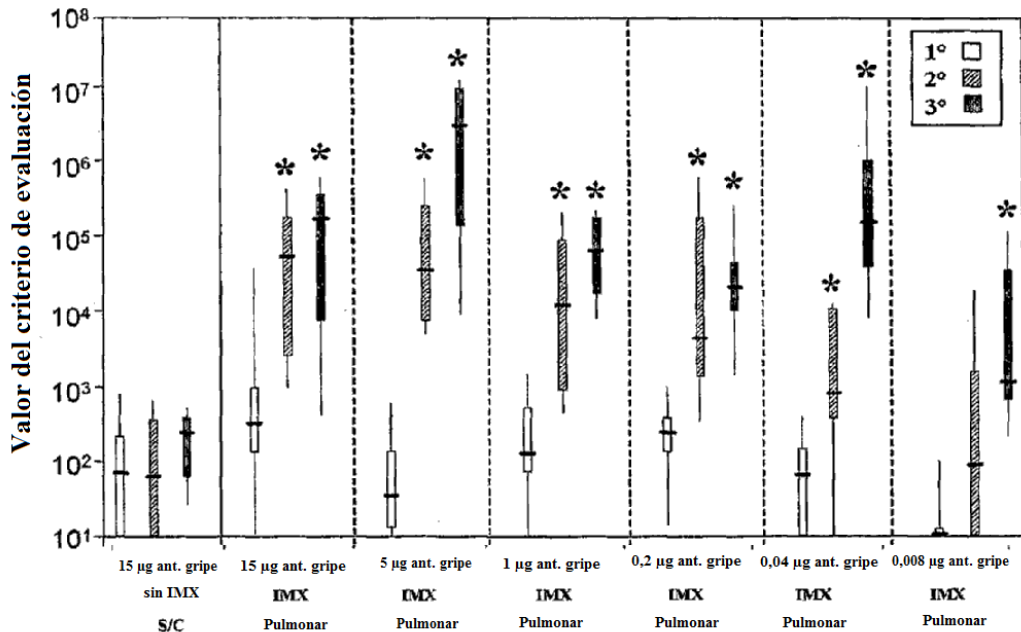
2c

IgG en LBA específicas de ant. de la gripe



2d

IgA en LBA específicas de ant. de la gripe

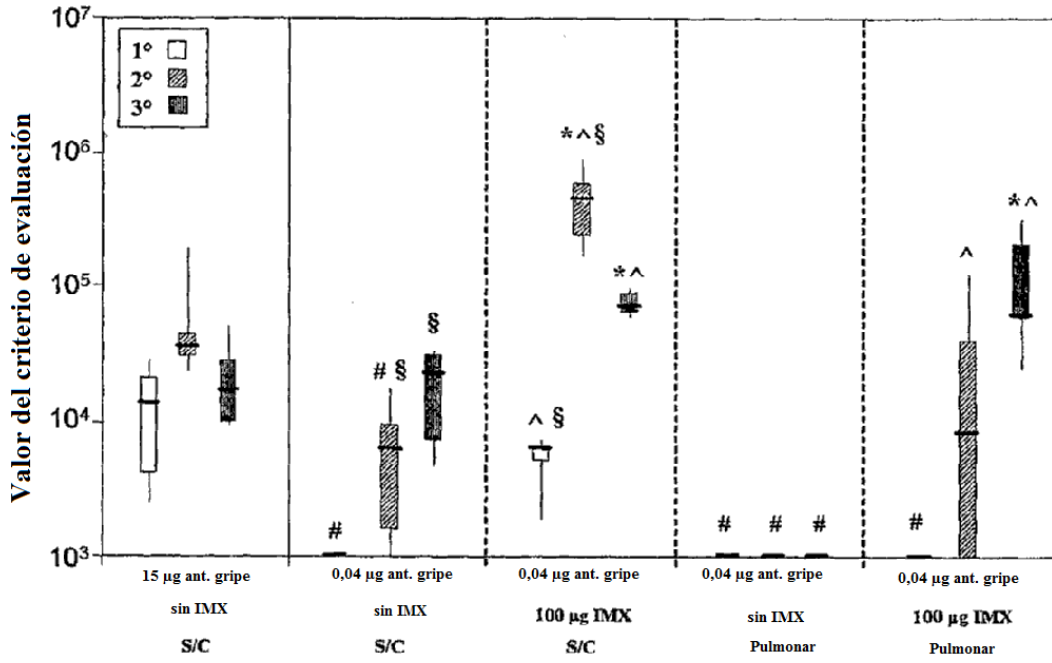


IMX = adyuvante ISCOMATRIX™

FIGURA 3

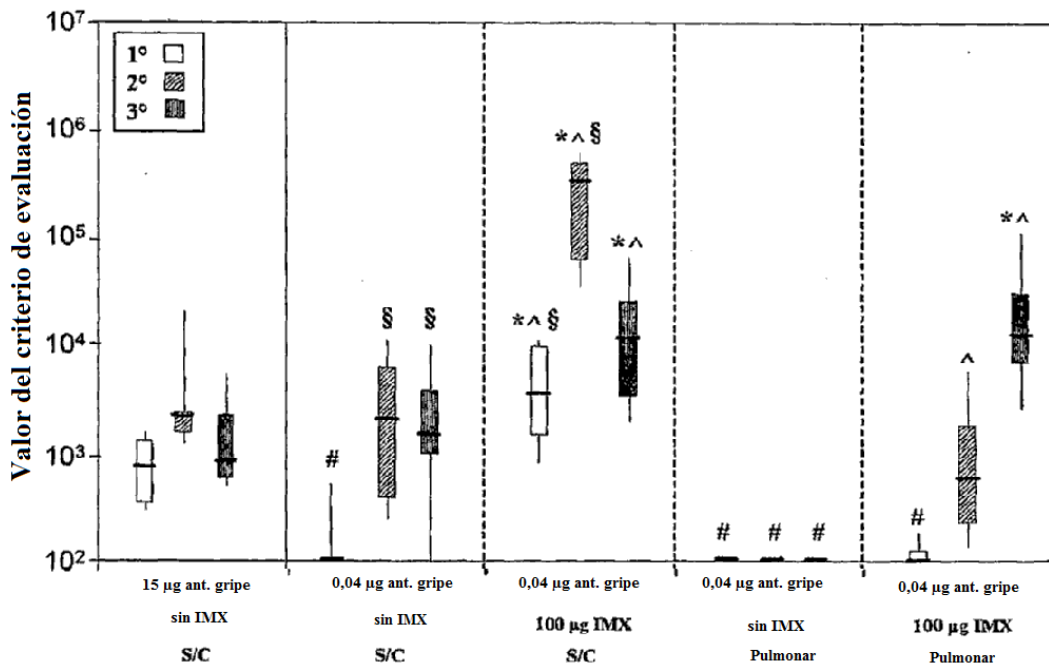
3a

IgG séricas específicas de ant. de la gripe



3b

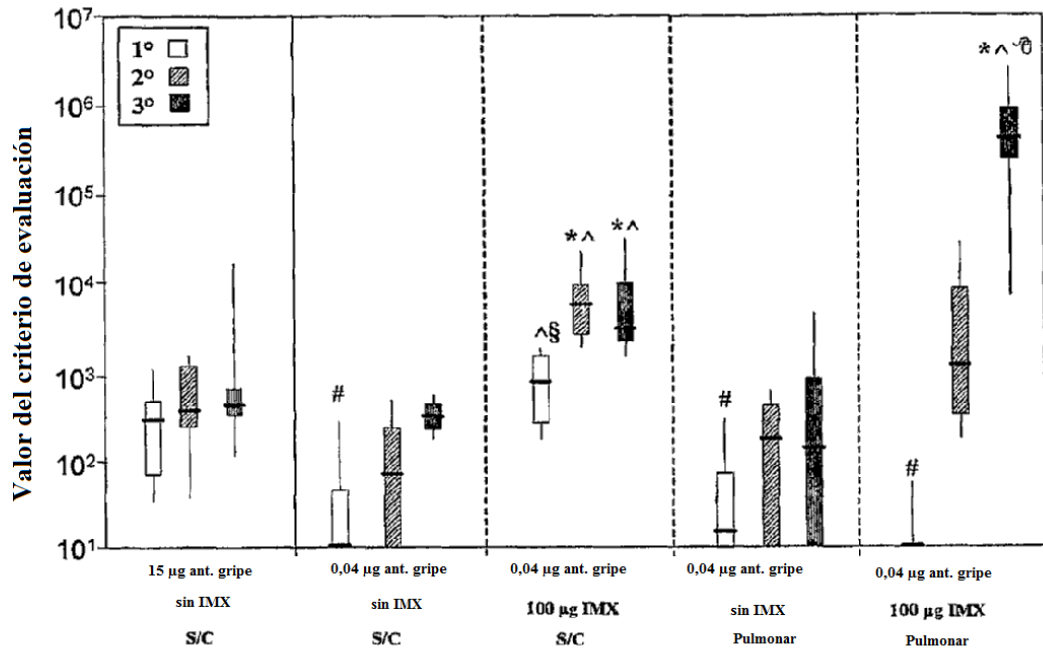
IgA séricas específicas de ant. de la gripe



IMX = adyuvante ISCOMATRIX™

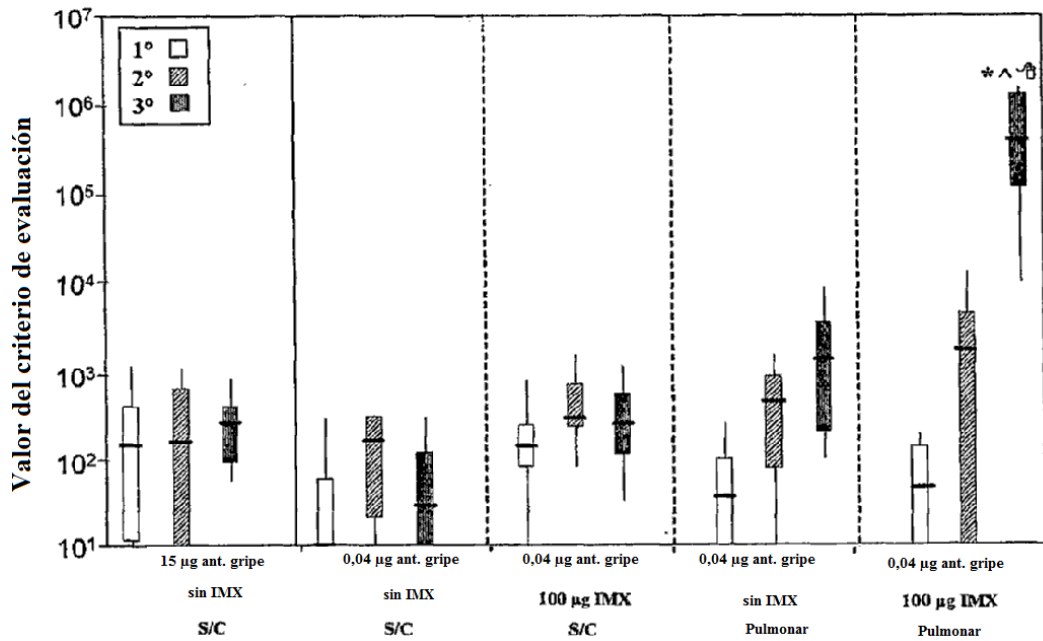
3c

IgG en LBA del pulmón izquierdo específicas de ant. de la gripe



3d

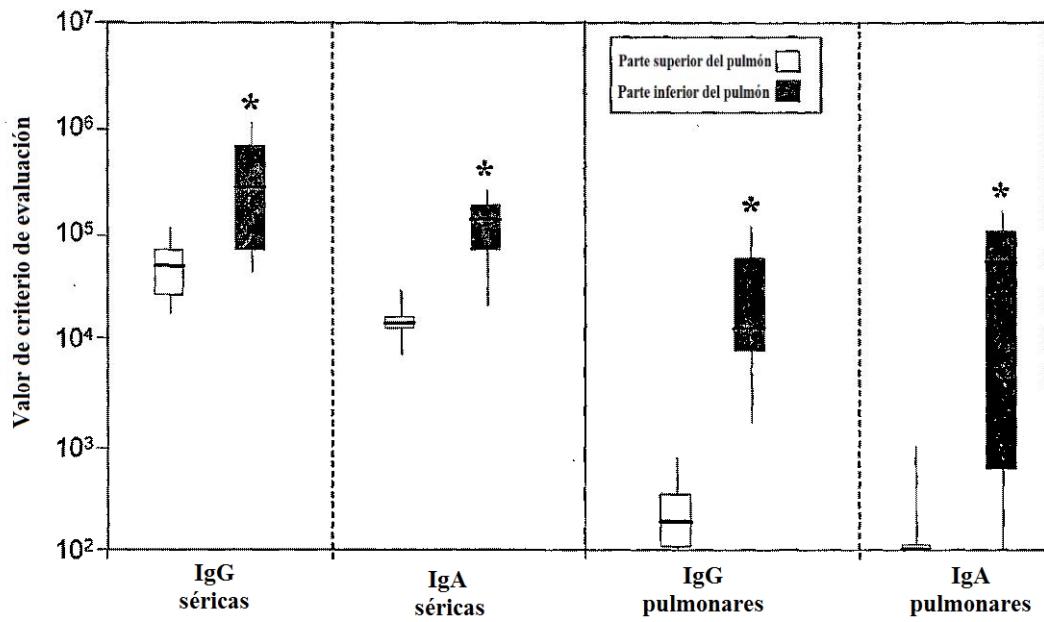
IgA en LBA del pulmón izquierdo específicas de ant. de la gripe



IMX = adyuvante ISCOMATRIX™

FIGURA 4

Respuesta de anticuerpos 3º frente a la gripe



*Significativamente mayor que con la vacunación en la parte superior del pulmón; p<0,05

FIGURA 5

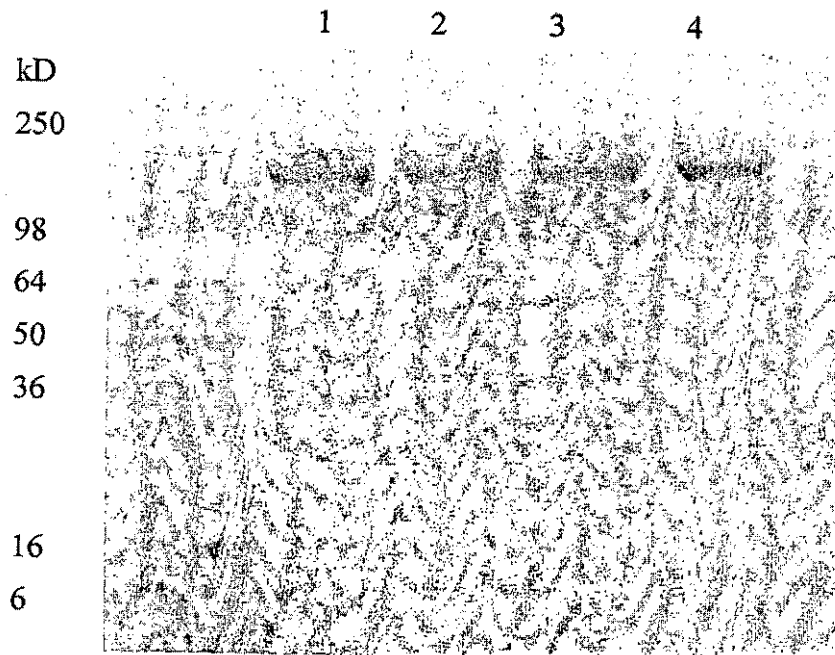
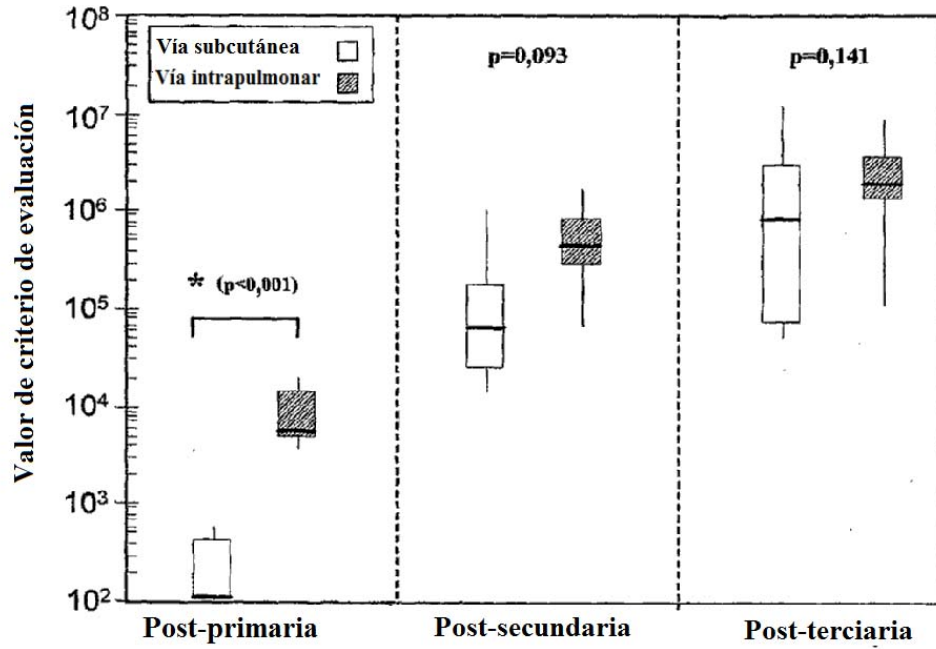


FIGURA 6

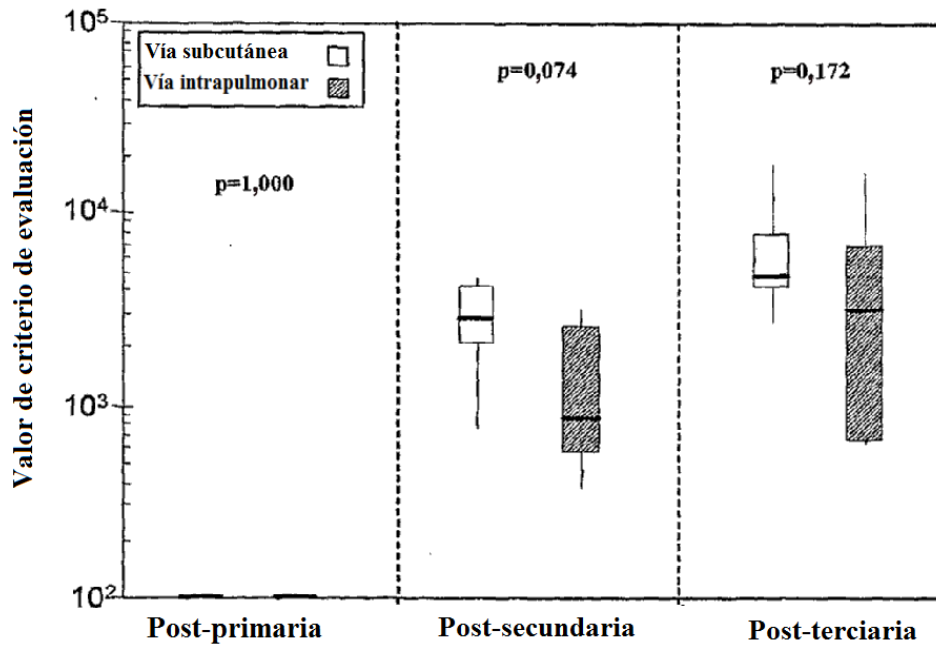
IgG séricas específicas de gB del CMV

6a



IgA séricas específicas de gB del CMV

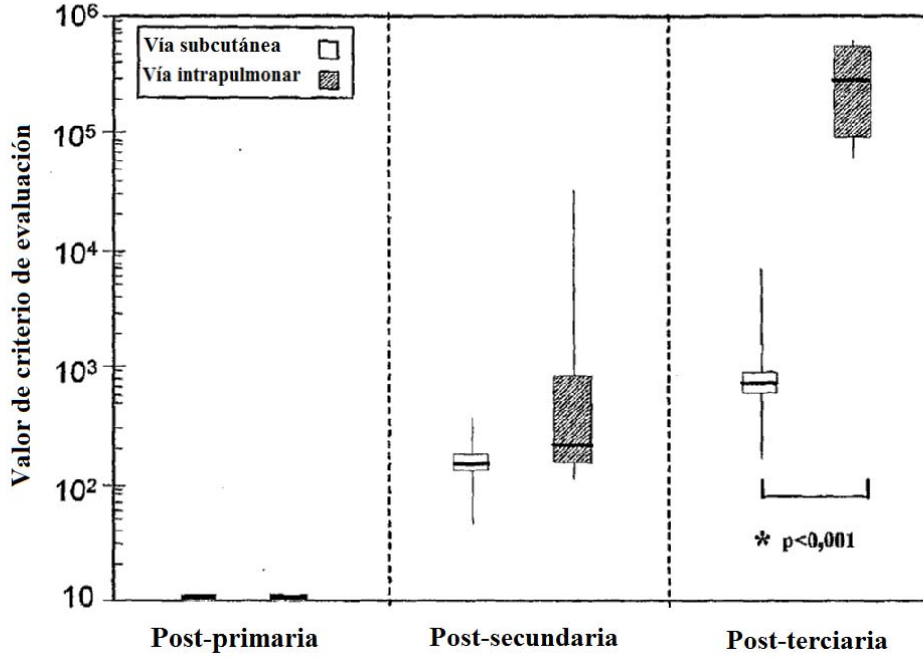
6b



Sin diferencias significativas entre la vía subcutánea y la intrapulmonar

6c

IgG en LBA específicas de gB del CMV



6d

IgA en LBA específicas de gB del CMV

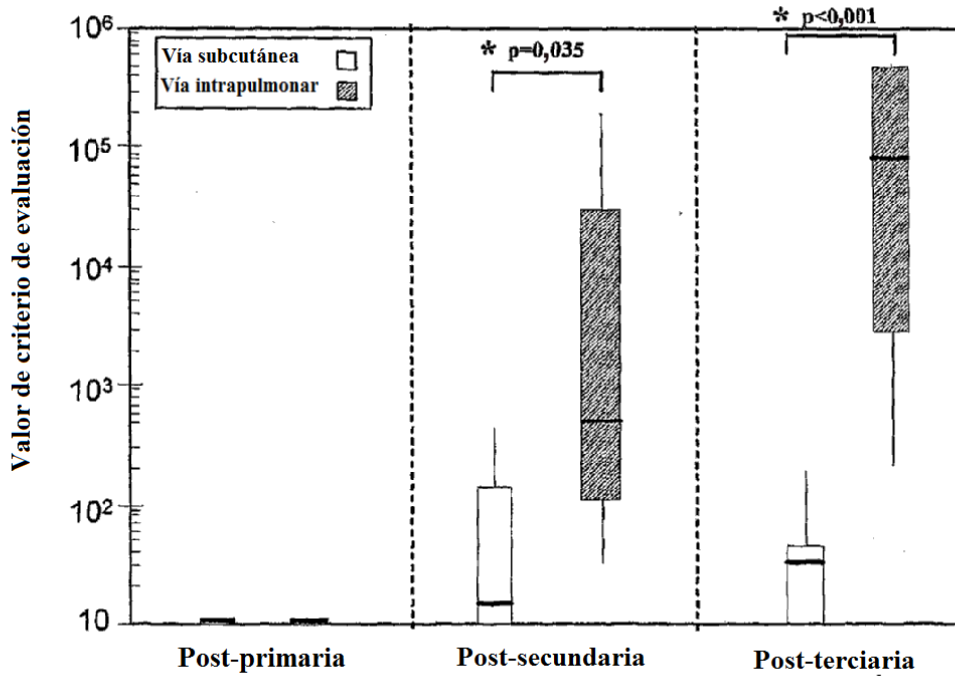


Figura 7

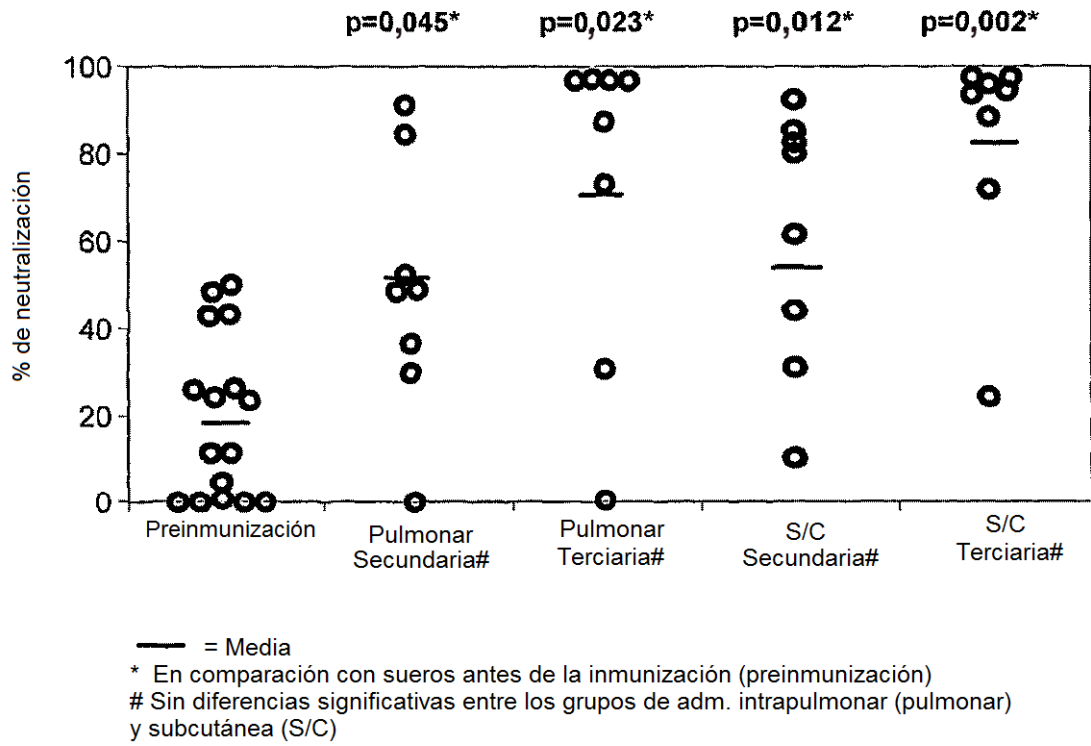


Figura 8

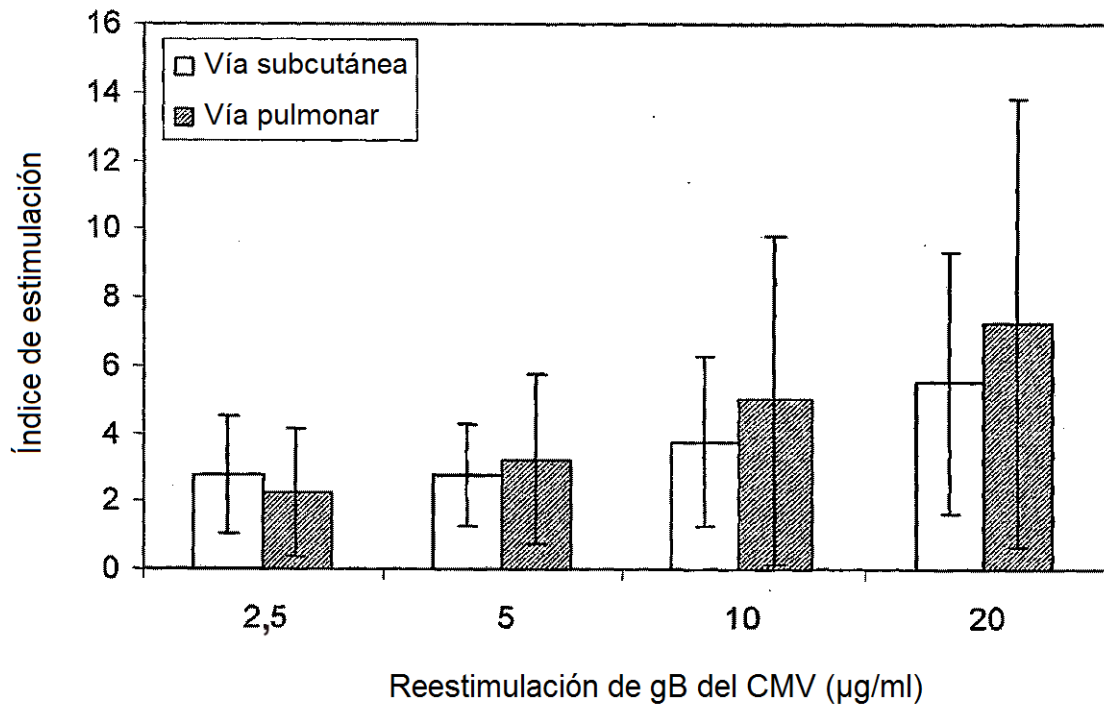
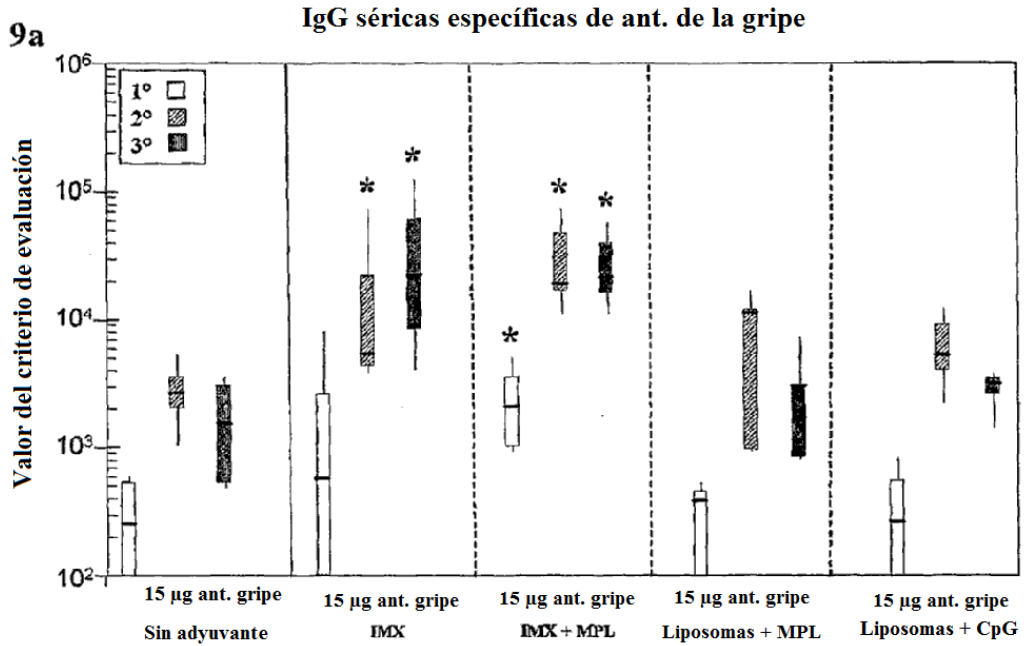
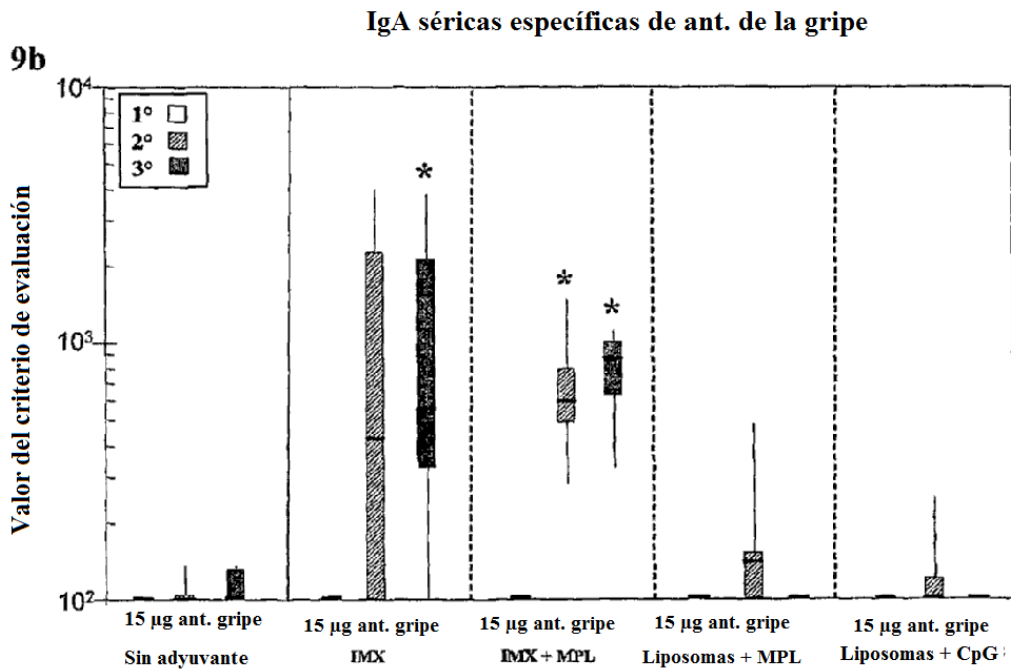


Figura 9



* Diferencia significativa respecto a "sin adyuvante" ($p < 0,05$)

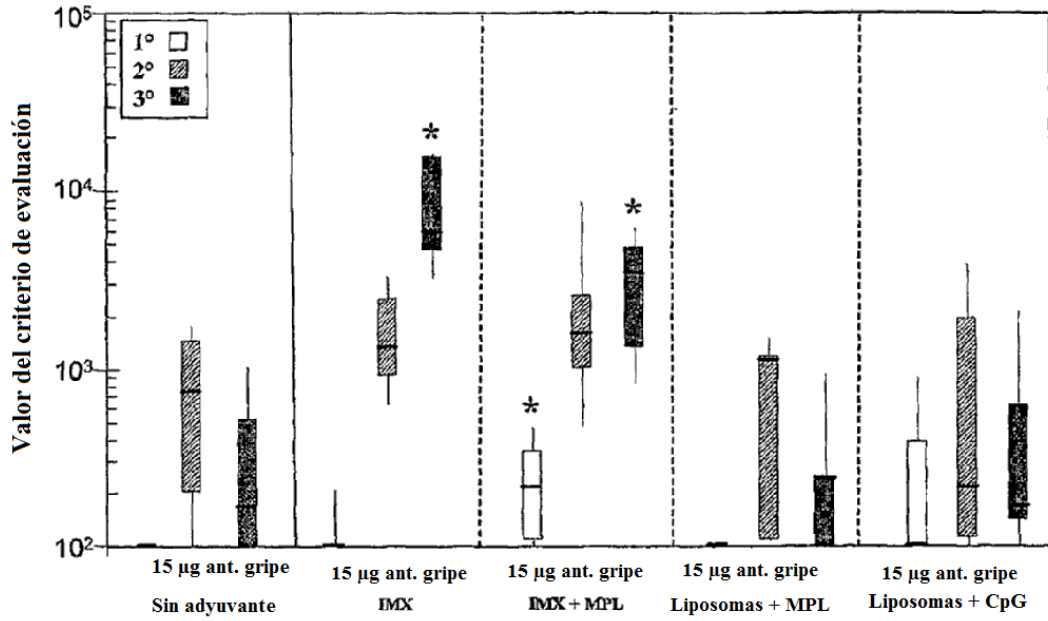


* Diferencia significativa respecto a "sin adyuvante" ($p < 0,032$)

IMX = adyuvante ISCOMATRIX™

IgG en LBA específicas de ant. de la gripe

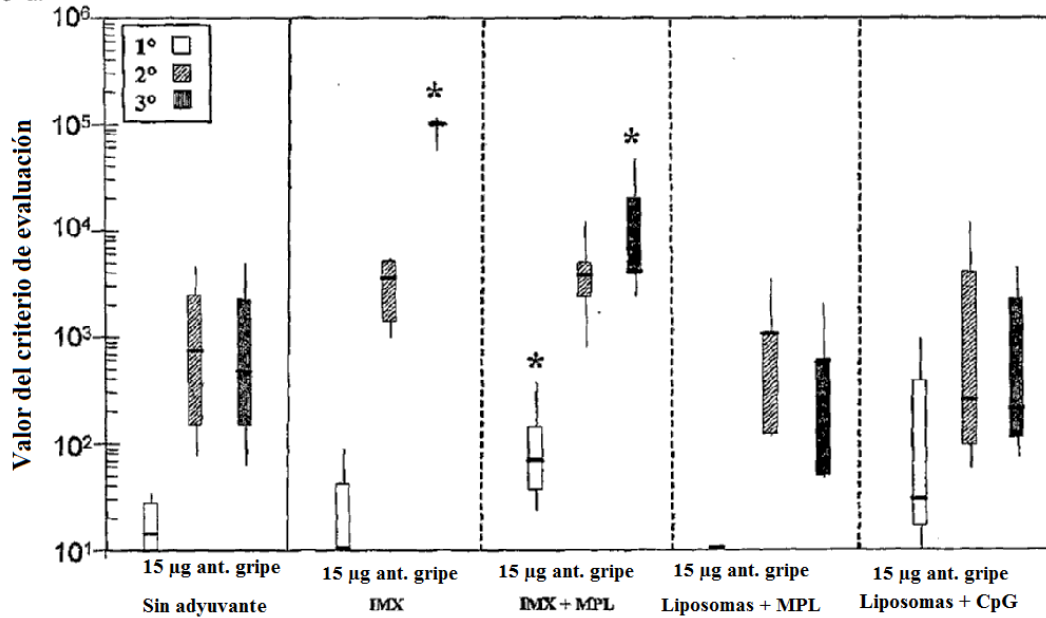
9c



* Diferencia significativa respecto a "sin adyuvante" (p<0,008)

IgA en LBA específicas de ant. de la gripe

9d



* Diferencia significativa respecto a "sin adyuvante" (p<0,05)

IMX = adyuvante ISCOMATRIX™

Figura 10

