

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 669**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/385** (2006.01)

**A61K 39/002** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2005 E 05790464 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 1768696**

54 Título: **Propiedades de coadyuvancia y potenciación inmunitaria de productos naturales de Onchocerca volvulus**

30 Prioridad:

**15.06.2004 US 580254 P**

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

**30.10.2015**

73 Titular/es:

**THE NEW YORK BLOOD CENTER, INC. (100.0%)  
310 East 67th Street  
New York, NY 10021, US**

72 Inventor/es:

**MACDONALD, ANGUS, J. y  
LUSTIGMAN, SARA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 549 669 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

Propiedades de coadyuvancia y potenciación inmunitaria de productos naturales de *Onchocerca volvulus*

**Antecedentes de la invención**

5 El aumento de la amenaza de un ataque bioterrorista en los últimos años pone de manifiesto la necesidad crítica de desarrollo de formulaciones de vacunas potentes para proteger a la población susceptible. Las formulaciones de vacuna contienen antígenos que inducen inmunidad contra los agentes patógenos. Sin embargo, las respuestas inmunitarias a muchos antígenos, si bien son detectables, son con frecuencia de magnitud insuficiente para ofrecer protección contra un proceso de enfermedad mediado por los agentes que expresan estos antígenos. En tales situaciones, es necesario incluir un coadyuvante junto con el antígeno en la formulación de vacuna.

10 Un coadyuvante es un compuesto que, cuando se utiliza combinado con antígenos de vacuna específicos, potencia la respuesta inmunitaria resultante. El mecanismo de acción de los coadyuvantes no es precisamente conocido, y puede no ser el mismo para todos los coadyuvantes. Sin embargo, se cree que los coadyuvantes prolongan la biodisponibilidad de un antígeno. Los coadyuvantes también parecen aumentar el tamaño del antígeno, aumentando así la probabilidad de fagocitosis. Además, la mayoría de los coadyuvantes tienen un efecto estimulador sobre la rama mediada por células del sistema inmunitario, es decir, sobre los linfocitos T (células T).

15 Existen dos subpoblaciones bien definidas de células T: células T citotóxicas (Tc) y células T coadyuvantes (Th). Las células T citotóxicas destruyen patógenos intracelulares. Por otro lado, las células Th ejercen la mayoría de sus funciones a través de citoquinas secretadas. Las células T coadyuvantes se dividen además en los tipos celulares Th1 y Th2. Las diferencias en los patrones de secreción de citoquinas de los tipos celulares Th determinan el tipo de respuesta inmunitaria elaborada contra una sensibilización con antígeno concreta.

20 En general, las células Th1 estimulan respuestas citotóxicas contra virus, bacterias y protozoos intracelulares a través de la secreción de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) y otras citoquinas pro-inflamatorias. Las respuestas citotóxicas incluyen la activación de las células Tc. En contraste, las células Th2 son inducidas por alérgenos y parásitos helmínticos, y se caracterizan por la secreción de interleuquinas, p. ej., IL-4, IL-5, etc. Ambos tipos de células Th estimulan la rama humoral del sistema inmunitario, es decir, los linfocitos B.

25 Diferentes agentes patógenos provocan diferentes tipos de respuestas inmunitarias mediadas por células. Por ejemplo, infectando ratones con un parásito helmíntico se polariza la respuesta inmunitaria a la activación de Th2. En algunos casos, la polarización es tan potente que se puede inhibir una respuesta dominante para Th1 a un patógeno infeccioso mediante la introducción de un parásito helmíntico. (Brady et al. "*Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*" *Infect. Immun.* 67: 5372-5378 (1999)). Del mismo modo, se puede suprimir una enfermedad autoinmunitaria en ratón mediada por Th1 mediante la introducción de un parásito helmíntico en ratones (Cooke et al. "Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice" *Parasite Immunol.* 21:169-176 (1999)).

30 Adicionalmente, se ha demostrado que las propiedades antiinflamatorias de los productos de dos parásitos helmínticos son capaces de modular a la baja las respuestas inflamatorias de Th1 en ratones. En particular, el fluido corporal del parásito lombriz intestinal del cerdo, *Ascaris suum*, estimula potentemente citoquinas características de las células Th2. (Paterson et al., "Modulation of a Heterologous Immune Response by the Products of *Ascaris suum*" *Infect. Immunol.* 70:6058-67 (2002)). Asimismo, se ha encontrado que un producto de glicoproteína secretado, ES-62, de un parásito de roedores tiene propiedades anti-inflamatorias generales que inhiben la producción de citoquinas Th1 en la artritis inducida experimentalmente en ratones (McInnes et al., "A Novel Therapeutic Approach Targeting Articular Inflammation Using the Filarial Nematode-Derived Phosphorylcholine-Containing Glycoprotein ES-62" *J. Immunol.* 171:2127-33 (2003)). Este producto está siendo desarrollado actualmente como producto terapéutico antiinflamatorio novedoso.

35 Recientemente, se han mencionado dos productos de helmintos por actuar como coadyuvantes. Ambos son fuertes inductores de respuestas Th2 a proteínas espectadoras en una vacuna. En particular, se encontró que las proteínas secretadas por *Nippostrongylus brasiliensis* adulto (un parásito de los roedores) eran fuertes inductores de respuestas Th2 en ratones inmunizados con una proteína no relacionada (Holland et al., "Proteins secreted by the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis* act as adjuvants for Th2 responses" *Eur. J. Immunol.* 30 (7):1977-1987 (2000)). Del mismo modo, la lacto-N-fucopentosa III, un carbohidrato que se encuentra en la superficie de los huevos de un parásito humano, *Schistosoma mansoni*, actuó como un coadyuvante de Th2 para una proteína espectadora cuando se inyectó a ratones (Okano et al., "Lacto-N-fucopentaose III Found on *Schistosoma mansoni* Egg Antigens Functions as Adjuvant for Proteins by Inducing Th2-Type Response" *J. Immunol.* 167:442-450 (2001)).

40 Hasta la presente invención, se ha encontrado que los productos de helmintos son potentemente dominantes de Th2. Por consiguiente, su uso como coadyuvantes ha sido para inducir respuestas en tipos de células Th2. Aunque la activación del tipo celular Th2 es importante, la activación del tipo celular Th1 es crítica para la eficacia de ciertas vacunas. Además de proporcionar un perfil de citoquinas diferente al proporcionado por las células Th2, las células Th1 activan mecanismos efectores citotóxicos que las células Th2 no activan.

Por otra parte, otros coadyuvantes utilizados actualmente en vacunas humanas tampoco son eficaces en la estimulación de respuestas citotóxicas a patógenos intracelulares. Estos coadyuvantes incluyen sales de aluminio, p. ej., sulfato de aluminio y potasio, fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio. Sin la capacidad de estimular las respuestas citotóxicas a patógenos intracelulares, el uso de tales coadyuvantes es limitado.

- 5 **[0010]** Además de la protección contra enfermedades infecciosas, la vacunación se está volviendo significativa en otras tecnologías en desarrollo. Estas tecnologías incluyen, por ejemplo, la vacunación contra tumores singénicos. En tales nuevos enfoques, es importante ser capaz de inducir diferentes tipos de respuestas inmunitarias.

Por consiguiente, existe una necesidad crítica de coadyuvantes y agentes terapéuticos seguros y eficaces capaces de potenciar las respuestas inmunitarias frente a una amplia variedad de agentes patógenos y contra tumores. Existe una necesidad concreta de coadyuvantes que refuercen respuestas de tipo celular Th1.

10 MacDonald AJ et al, *Parasite Immunology* (2004), 26, 53 - 62 describe que Ov-ASP-1, el homólogo de *Onchocerca volvulus* de la familia de proteínas secretadas por activación es inmunoestimuladora y puede inducir inmunidad protectora anti-larvaria.

15 Paterson JCM et al, *Infection and Immunity* (2002), 6058-6067 describe la modulación de una respuesta inmunitaria heteróloga por los productos de *Ascaris suum*.

### Compendio de la invención

En una realización, la presente invención se refiere a una composición de vacuna o composición inmunogénica que comprende un radical antigénico; y un coadyuvante que comprende una cantidad eficaz de Ov-ASP, o de al menos una subunidad de Ov-ASP. Ov-ASP incluye Ov-ASP-1, Ov-ASP-2 y Ov-ASP-3.

- 20 En otra realización, la presente invención se refiere a un método para potenciar una respuesta inmunitaria específica a un antígeno en un mamífero que lo necesite. El método comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de Ov-ASP, o al menos una subunidad de Ov-ASP; y un radical antigénico.

25 En una realización adicional, la presente invención se refiere a un método para estimular una respuesta celular con la secreción de citoquinas en un mamífero que lo necesite. El método comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de Ov-ASP, o al menos una subunidad de estas proteínas, en donde se estimula la secreción de citoquinas.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un método para generar una respuesta inmunitaria o la vacunación de un mamífero que lo necesite contra la oncocercosis. El método comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de OvASP, o fragmentos antigénicos de OvASP, y un portador farmacéuticamente aceptable.

- 30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para prevenir el SARS en un mamífero que lo necesite. El método comprende administrar al mamífero una composición de vacuna que comprende un poliaminoácido de SARS-CoV, y una cantidad eficaz de Ov-ASP, o al menos una subunidad de Ov-ASP. En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para prevenir el VIH en un mamífero que lo necesite. El método comprende administrar al mamífero una composición de vacuna que comprende un poliaminoácido de VIH-1, y una cantidad eficaz de Ov-ASP, o al menos una subunidad de Ov-ASP.

35

### Breve descripción de los dibujos

40 Figura 1. Secreción de citoquinas inducida por rOv-ASP-1 (5 µg/ml) a partir de PBMC obtenidas de individuos (n = 14) nunca expuestos a *Onchocerca volvulus*. Las células se incubaron con rOv-ASP-1 (+) o medio de cultivo solo (-). \* = P <0,05 frente a células en medio de cultivo solo. Los valores son la media ± DT.

Figura 2. La inhibición de la actividad de LPS utilizando polimixina B (5 y 20 µg/ml) no tiene efecto sobre la bioactividad de rOv-ASP-1 (5 µg/ml) en PBMC humanas (3 donantes). rOv-ASP-1 se pre-incubó con polimixina B durante 1 hora a temperatura ambiente antes de añadir a PBMC. Los valores son la media ± DT.

45 Figura 3. Citoquinas producidas por células de bazo de ratones inmunizados con PBS o rOv-ASP-1 sin coadyuvantes y estimuladas in vitro con rOv-ASP-1 de 5 µg/mL. Los valores se obtuvieron a partir de células de bazo agrupadas dentro de cada grupo de tratamiento y representan la media de cultivos por triplicado.

50 Figura 4. Media de IgG1 e IgG2a anti-OVA en ratones (n = 5/grupo) inmunizados con los tratamientos de control (PBS, OVA, alumbre, MPL + TDM, rOv-ASP-1) u OVA combinado con alumbre o MPL + TDM o el coadyuvante de ensayo, rOv-ASP-1. Las cantidades de anticuerpos se expresan como densidad óptica (DO) en el análisis ELISA.

Figura 5. Títulos medios de IgG1 e IgG2a anti-OVA en ratones (n = 5/grupo) de los que se tomaron

muestras de sangre pre-inmunización (Pre) o después de la inmunización con los tratamientos de control (PBS, OVA) u OVA combinado con el coadyuvante de ensayo, rOv-ASP-1 (25 µg/ratón), que fue o bien tratado (LPS-) o no tratado (LPS+) con gel de eliminación de LPS. Los mismos símbolos se aplican en ambos gráficos. El título de IgG1 anti-OVA final fue de 512.000 y el título de IgG2a anti-OVA final fue de 128.000.

Figura 6. Citoquinas producidas por las células de bazo de ratones inmunizados con OVA con o sin coadyuvantes o tratamientos de control relevantes y re-estimulados *in vitro* con 5 µg/ml de OVA. Los valores se obtuvieron a partir de células de bazo agrupadas dentro de cada grupo de tratamiento y representan la media de cultivos por triplicado.

Figura 7. Cantidades medias de IgG anti-SC-1 total en el suero de ratón ( $n= 5$ /grupo) después de la inmunización con tratamientos de control (antígenos o coadyuvantes solos) o antígenos formulados con MPL + TDM o coadyuvante rOv-ASP-1 de ensayo. Las cantidades de anticuerpos se expresan como densidades ópticas (DO) en los análisis ELISA. Las diluciones recíprocas de suero se indican en el eje x. Se indican los puntos finales T; 250.000 en presencia de rOv-ASP-1 y 64.000 en presencia de MPL + TDM.

Figura 8. Cantidades medias de IgG anti-FLSC total en suero de ratón ( $n= 5$ /grupo) después de la inmunización con tratamientos de control (antígenos o coadyuvantes solos) o antígenos formulados con MPL + TDM o coadyuvante rOv-ASP-1 de ensayo. Las cantidades de anticuerpos se expresan como densidades ópticas (DO) en los análisis ELISA. Las diluciones recíprocas de suero se indican en el eje x. Se indican los puntos finales T; 1.024.000, en presencia de rOv-ASP-1 y 1.024.000 en presencia de MPL + TDM.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención comprende composiciones farmacéuticas y métodos para estimular, *es decir*, inducir y/o potenciar, la respuesta inmunitaria en mamíferos. La invención incluye el descubrimiento inesperado de que las proteínas de un parásito helmíntico, *Onchocerca volvulus*, pueden estimular varios aspectos de la respuesta inmunitaria de los mamíferos.

Las proteínas utilizadas en las composiciones farmacéuticas y métodos de la invención son miembros de la familia Ov-ASP (proteína secretada asociada con la activación de *Onchocerca volvulus*). Las Ov-ASP nativas se encuentran en los gránulos secretores del esófago glandular y la superficie de las larvas de la tercera fase infectiva del helminto *Onchocerca volvulus*.

Los miembros de la Familia Ov-ASP incluyen Ov-ASP-1, Ov-ASP-2 y Ov-ASP-3. La secuencia de Ov-ASP-1 se muestra en SEQ ID NO: 1. La secuencia de Ov-ASP-2 se muestra en el SEQ ID NO: 2. La secuencia de Ov-ASP-3 se muestra en SEQ ID NO: 3. La Ov-ASP utilizada en las composiciones y métodos de la invención no tiene que ser 100% idéntica a los SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, siempre y cuando la proteína conserve las propiedades estimuladoras del sistema inmunitario de los SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, la Ov-ASP, para los fines de esta memoria descriptiva, es idéntica en aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% a los SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

Se pueden utilizar una o más subunidades (es decir, fragmentos) de Ov-ASP en las composiciones y métodos de esta invención. Una subunidad puede ser de cualquier longitud que produzca la estimulación deseada de una respuesta inmunitaria (es decir, una subunidad activa). El número mínimo de aminoácidos de una subunidad incluye, por ejemplo, al menos aproximadamente veinte; treinta, cuarenta, cincuenta, sesenta, setenta, ochenta, y noventa aminoácidos. El número máximo de aminoácidos de una subunidad incluye, por ejemplo, a lo sumo aproximadamente doscientos cincuenta y tres, doscientos cincuenta, doscientos cuarenta, doscientos treinta y, doscientos veinte, doscientos diez, doscientos, ciento noventa, ciento ochenta, ciento setenta, ciento sesenta, ciento cincuenta, ciento cuarenta, ciento treinta, ciento veinte, ciento diez y cien aminoácidos. Un intervalo adecuado de los aminoácidos incluye cualquier número desde el mínimo y cualquier número desde el máximo.

Para los fines de esta memoria descriptiva, "Ov-ASP" incluye una Ov-ASP-1 completa, o una o más subunidades de una Ov-ASP-1 completa; una Ov-ASP-2 completa, o una o más subunidades de una Ov-ASP-2 completa; o una Ov-ASP-3 completa, o una o más subunidades de una Ov-ASP-3 completa.

Las Ov-ASP, y subunidades de estas proteínas, se pueden preparar por medio de métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, las proteínas son producidas de forma recombinante. Por ejemplo, la proteína recombinante, rOv-ASP-1, se expresó en *E. coli* utilizando ADNc que codificaba Ov-ASP-1 (Ov-ASP-1: número de acceso de GenBank AF020586). Esta proteína recombinante tiene un peso molecular de 24.871 Da. La proteína recombinante, rOv-ASP-2, se expresó en *E. coli* utilizando ADNc que codificaba Ov-ASP-2 (Ov-ASP-2: número de acceso GenBank H39490). Esta proteína recombinante tiene un peso molecular de 29.047 Da. La proteína recombinante, rOv-ASP-3, se expresó en *E. coli* utilizando ADNc que codificaba Ov-ASP-3 (Ov-ASP-3: número de acceso GenBank AA917267). Esta proteína recombinante tiene un peso molecular de 24.744 Da. Véase Tawe et al., Angiogenic activity of *Onchocerca volvulus* recombinant proteins similar to vespidual antigen 5" *Mol. Biochem. Parasitol.* 109: 91-99 (2000). Las secuencias y métodos para proporcionar Ov-ASP se describen en la Patente de los Estados

Unidos Núm. 6.723.322 (Lustigman et al.)

La Ov-ASP también se puede obtener aislando la proteína directamente de *Onchocerca volvulus* por medio de métodos convencionales. Algunos métodos adecuados incluyen precipitación y protocolos de cromatografía líquida, tales como intercambio iónico, interacción hidrofóba y filtración en gel. (Methods Enzymol. 182 (Guide to Protein Chemistry, Deutscher, Ed. Sec. VII) 309 (1990); and Scopes, Protein Purification. Springer-Verlag, N.Y. (1987)). La Ov-ASP también se puede obtener mediante la separación de la proteína en geles de SDS-PAGE preparativa, cortando la banda de interés y electroeluyendo la proteína de la matriz de poliacrilamida.

La Ov-ASP también se puede obtener sintetizando la proteína a partir de residuos de aminoácidos individuales, como se conoce en la técnica. (Stuart and Young "Solid Phase Peptide Synthesis", 2ª Ed., Pierce Chemical Co. (1984)).

La administración de Ov-ASP en los métodos de la invención se puede efectuar mediante la administración de la propia proteína, o mediante la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de manera que permita la expresión de la proteína. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico está en forma de un vector de expresión recombinante, tal como, por ejemplo, un plásmido purificado. Después de la administración del vector de expresión a una célula de mamífero, la Ov-ASP es expresada intracelularmente.

Los vectores recombinantes también pueden contener una secuencia de nucleótidos que codifica elementos reguladores adecuados con el fin de efectuar la expresión del constructo vector en una célula anfitriona adecuada. Los expertos en la técnica apreciarán que una variedad de potenciadores y promotores son adecuados para su uso en los constructos de la invención, y que los constructos contendrán las secuencias de inicio, terminación y de control necesarias para la transcripción y el procesamiento adecuados de la secuencia de ácido nucleico que codifica una Ov-ASP cuando el constructo del vector recombinante se introduce en un sujeto.

Composiciones de vacuna o composiciones inmunogénicas que comprenden Ov-ASP como coadyuvante

En una realización, la invención se refiere a composiciones de vacuna o composiciones inmunogénicas que comprenden Ov-ASP y un radical antigénico. La Ov-ASP se utiliza como coadyuvante en estas composiciones. Como coadyuvante, la Ov-ASP potencia una respuesta inmunitaria a antígenos que no están relacionados con Ov-ASP.

En esta realización, se proporcionan composiciones de vacuna o composiciones inmunogénicas que comprenden al menos un radical antigénico y una cantidad eficaz de Ov-ASP. Las vacunas de la invención pueden ser vacunas profilácticas o vacunas terapéuticas. Una vacuna profiláctica impide que una enfermedad se produzca cebando el sistema inmunitario para responder a un antígeno. Se administra una vacuna terapéutica después de la infección para reducir o detener la progresión de la enfermedad mediante la producción o el refuerzo de una respuesta inmunitaria.

La razón en peso de la fracción antigénica de Ov-ASP en las composiciones de vacuna o composiciones inmunogénicas puede ser cualquier razón que permita la potenciación de una respuesta inmunitaria específica. La cantidad de Ov-ASP que se añade a un radical antigénico concreto depende de varios factores, como sería conocido por un experto en la técnica. Los factores incluyen, por ejemplo, la edad y el peso del sujeto mamífero, el modo de administración de la composición, la inmunogenicidad inherente del antígeno concreto, la forma deseada de la respuesta (elevación de título, prolongación de la respuesta, o ambos), la presencia de portadores, y otras consideraciones que serán evidentes para los expertos en la técnica. La cantidad puede ser determinada por experimentación rutinaria. Por ejemplo, la razón en peso de un radical antigénico para Ov-ASP puede variar de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:1, o de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4.

El radical antigénico de la presente invención puede ser un antígeno o una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno. Un antígeno es una sustancia contra la que se puede inducir una respuesta inmunitaria específica en un mamífero. Es decir, un antígeno es inmunogénico. Una respuesta inmunitaria específica incluye una respuesta humoral y/o inmunitaria mediada por células dirigida específicamente contra el antígeno. Para los fines de esta memoria, un antígeno incluye sustancias que son capaces de provocar respuestas inmunitarias cuando se administran a un mamífero por sí mismas, y sustancias que son capaces de provocar respuestas inmunitarias solo cuando se administran a un mamífero junto con Ov-ASP.

Los antígenos pueden ser, por ejemplo, poliaminoácidos inmunogénicos. Los poliaminoácidos incluyen oligopéptidos, polipéptidos, péptidos, proteínas y glicoproteínas. El poliaminoácido puede ser un producto aislado de origen natural, un producto sintético, o un poliaminoácido modificado mediante ingeniería genética.

La longitud de un poliaminoácido no es crítica siempre y cuando el poliaminoácido sea inmunogénico cuando se administra junto con Ov-ASP. Por lo tanto, el poliaminoácido contiene un número suficiente de residuos de aminoácidos para definir al menos un epítipo de un antígeno. Los métodos para aislar e identificar fragmentos inmunogénicos de proteínas inmunogénicas conocidas son descritos por Salfeld et al. en *J. Virol.* 63: 798-808 (1989) y por Isola et al. en *J. Virol.* 63: 2325-2334 (1989).

Si un poliaminoácido define un epítipo, pero es demasiado corto para ser inmunogénico, puede ser conjugado con una molécula portadora. Algunas moléculas portadoras adecuadas incluyen hemocianina de lapa californiana, secuencias de Ig, TrpE, y albúmina de suero humano o bovino. La conjugación se puede llevar a cabo por medio de métodos conocidos en la técnica. Uno de tales métodos es la combinación de un residuo de cisteína del fragmento con un residuo de cisteína de la molécula portadora.

Los antígenos también pueden ser un lípido, un lipopolisacárido (glicolípido) o un polisacárido. La longitud de estos compuestos no es crítica siempre y cuando el compuesto induzca una respuesta inmunitaria. Estos compuestos también pueden ser conectados químicamente a moléculas portadoras de proteínas con el fin de potenciar la inmunogenicidad. Por ejemplo, un antígeno polisacárido, tal como un polisacárido capsular bacteriano o fragmento del mismo, se puede conectar a una molécula portadora de proteína para formar un producto glicoconjugado. Los métodos para preparar productos conjugados de polisacáridos capsulares y moléculas portadoras de proteínas bacterianas son bien conocidos en la técnica, y se pueden encontrar, por ejemplo, en Dick y Burret, *Contrib Microbiol Immunol.* 10: 48-114 (Cruse JM, Lewis RE Jr., eds; Basilea Kruger (1989)).

Los antígenos pueden derivarse de diversas fuentes. Los antígenos están disponibles comercialmente o se pueden producir como es conocido por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, los antígenos pueden ser producidos a partir de o derivados de microorganismos patógenos. Los ejemplos de microorganismos que incluyen virus, por ejemplo, virus del polioma; bacterias; micoplasmas; hongos; protozoos; y otros agentes infecciosos. Un antígeno puede ser un microorganismo completo. Por ejemplo, un antígeno puede ser un microorganismo modificado vivo (es decir, atenuado) o un microorganismo muerto. Un antígeno también puede ser un componente inmunogénico de un microorganismo, o un producto de un microorganismo. Por ejemplo, el antígeno puede ser la totalidad o parte de una proteína, glicoproteína, glicolípido, polisacárido o lipopolisacárido que están asociados con el microorganismo.

Los microorganismos patógenos a partir de los cuales se pueden producir o derivar los antígenos para usos de vacuna son bien conocidos en el campo de las enfermedades infecciosas. Los microorganismos patógenos adecuados se enumeran, por ejemplo, en *Medical Microbiology*, Second Edition, (1990) J. C. Sherris (ed.), Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, y *Zinsser Microbiology*, 20<sup>a</sup> Edición (1992), W. K. Joklik et al. (eds.), Appleton & Lange Publishing Division of Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.

Los ejemplos de microorganismos de interés particular para las vacunas humanas incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), coronavirus que causan el síndrome respiratorio agudo severo (SARS), *Chlamidia*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, virus del herpes simple, un rhabdovirus, virus del papiloma humano, gripe, sarampión, virus sincitial respiratorio, rotavirus, virus de Norwalk, virus de hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, *Mycobacterium* que causan tuberculosis, virus de la polio y virus de la viruela.

Un ejemplo de uno de los antígenos preferidos que se pueden utilizar en las composiciones farmacéuticas de la presente invención es un poliaminoácido SARS-CoV. Un ejemplo de un poliaminoácido SARS-CoV es el péptido SC-1 de SARS-CoV (también conocido como CP-1, número de acceso GenBank: AY274119). Otro ejemplo de uno de los antígenos preferidos es un poliaminoácido de CD4 de VIH-1. Un ejemplo de un poliaminoácido de CD4 de VIH-1 es el polipéptido FLSC de CD4 de VIH-1. (Fouts et al. "Expression and characterization of a single-chain polypeptide analogue of the human immunodeficiency virus type 1 gp120-CD4 receptor complex" *J. Virol.* 74: 11427-11436 (2000)). Un ejemplo de otro antígeno preferido deriva de las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH), en particular de VPH-16.

Los antígenos para su uso en la presente invención también pueden derivar de alérgenos. La mayoría de los alérgenos son proteínas pequeñas o sustancias unidas a proteínas que son capaces de producir hipersensibilidad. Los ejemplos de alérgenos incluyen caspa de animales; plantas, por ejemplo, ballico, artemisa, fleo de los prados, abedul, etc.; productos de insectos, p. ej., veneno, ácaros del polvo, etc.; alimentos; albúmina de huevo; y varias otras fuentes ambientales.

Los antígenos también incluyen poliaminoácidos nativos del mamífero que está siendo tratado. Dichos auto-poliaminoácidos incluyen, por ejemplo, antígenos asociados a tumores. Los ejemplos de tales antígenos incluyen proteínas derivadas de factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento y proteínas codificadas por oncogenes. Los ejemplos de receptores de factores de crecimiento incluyen receptores de EGF (HER1, HER2, HER3 y HER4), incluyendo la proteína Neu asociada con tumores de mama, y el factor de crecimiento de transferrina, es decir, p97. Los ejemplos de proteínas codificadas por oncogenes incluyen antígenos tumorales oncofetales, p. ej., alfa-fetoproteína y antígeno carcinoembrionario. Los antígenos oncofetales asociados con melanoma incluyen MACE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, y GAGE-2.

Además, se pueden utilizar células tumorales lisadas completas produciendo de este modo vacunas que comprenden una colección de antígenos. Los ejemplos incluyen células lisadas de las líneas celulares de melanoma humanas y de las líneas celulares de próstata humanas. Las células completas pueden derivarse del sujeto mamífero a tratar, o pueden derivarse de otro sujeto.

Para los fines de esta memoria descriptiva, el radical antigénico también incluye moléculas de ácido nucleico que codifican un antígeno. La molécula de ácido nucleico está preferiblemente en la forma de un vector de expresión recombinante, tal como, por ejemplo, un plásmido purificado. Después de la administración del vector de expresión a una célula de mamífero, el antígeno es expresado intracelularmente.

5 Los vectores recombinantes también pueden contener una secuencia de nucleótidos que codifica elementos reguladores adecuados con el fin de efectuar la expresión del constructo vector en una célula anfitriona adecuada. Los expertos en la técnica apreciarán que una variedad de potenciadores y promotores son adecuados para su uso en los constructos de la invención, y que los constructos contendrán secuencias de inicio, terminación y control necesarias para la transcripción y el procesamiento adecuados de la secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno cuando el constructo vector recombinante es introducido en un sujeto.

10 El radical antigénico y *Ov*-ASP pueden estar ambos en forma de proteína, o pueden estar ambos en forma de ácido nucleico. Si el radical antigénico y *Ov*-ASP son ambos ácidos nucleicos, ambos pueden estar en el mismo vector, o en diferentes vectores. Alternativamente, el radical antigénico puede ser un antígeno de proteína y *Ov*-ASP puede estar en forma de ácido nucleico; o el radical antigénico puede estar en forma de ácido nucleico y *Ov*-ASP puede ser una proteína.

#### Métodos para potenciar respuestas inmunitarias específicas

La presente invención incluye métodos para potenciar una respuesta inmunitaria específica a un antígeno en un mamífero que lo necesite. Los métodos comprenden administrar al mamífero una cantidad eficaz de *Ov*-ASP, o al menos una subunidad de la misma; y un radical antigénico. *Ov*-ASP, sus subunidades, y los radicales antigénicos adecuados para su uso en los métodos de la invención se han descrito anteriormente.

20 *Ov*-ASP, o sus subunidades; y los radicales antigénicos se pueden administrar simultáneamente por separado, o como una composición de vacuna o composición inmunogénica, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente.

Las respuestas inmunitarias específicas incluyen respuestas humorales y mediadas por células. Las respuestas humorales están mediadas por linfocitos B. Las respuestas mediadas por células incluyen la activación de las células T, incluyendo las células Th1, Th2 y Tc.

25 *Ov*-ASP puede potenciar las respuestas tanto humoral como mediada por células, incluyendo las respuestas Th1 y Th2. *Ov*-ASP es particularmente eficaz en la potenciación de las respuestas Th1, que a su vez potencian las respuestas Tc. La potenciación de las respuestas Th1 es particularmente eficaz para antígenos asociados a tumores ya que la mayoría de tales antígenos son capaces de inducir solamente respuestas de células T transitorias, de baja frecuencia, de baja avidéz, que están sesgadas hacia células de tipo Th2.

30 Una cantidad eficaz de *Ov*-ASP es una cantidad que potencia una respuesta inmunitaria específica en un mamífero. Una potenciación de una respuesta inmunitaria específica es un aumento en la magnitud de la respuesta inmunitaria. La cantidad mínima de *Ov*-ASP es la cantidad más baja que potencia una respuesta inmunitaria específica en el sujeto mamífero. La cantidad máxima de *Ov*-ASP es la cantidad más alta que no causa efectos secundarios indeseables o intolerables en el sujeto mamífero.

35 La potenciación de una respuesta humoral puede ser determinada por la medición de la producción de anticuerpos específicos contra el antígeno. Por ejemplo, se pueden tomar alícuotas de suero de un sujeto mamífero y se pueden someter a ensayo los títulos de anticuerpo durante el curso de un programa de inmunización. Del mismo modo, se pueden verificar la presencia de células T, sus mecanismos efectores y/o sus productos de citoquinas. Por ejemplo, la potenciación de la respuesta Th1 se puede determinar midiendo el nivel de citoquinas IFN-gamma. La potenciación de la respuesta Th2 se puede determinar mediante la medición de los niveles de citoquinas IL-4 e IL-5. Además, se pueden verificar las condiciones clínicas del sujeto mamífero para determinar el efecto deseado, p. ej., una inhibición o prevención o tratamiento de un proceso de enfermedad.

40 La magnitud de una respuesta inmunitaria específica se manifiesta por el título de anticuerpos producido, la duración de la respuesta, y/o la calidad de la respuesta. La magnitud de la respuesta inmunitaria provocada por un radical antigénico administrado junto con *Ov*-ASP es mayor que la respuesta inmunitaria provocada por el radical antigénico administrado solo.

45 La prevención de una enfermedad significa que o bien el mamífero no adquiere los síntomas de una enfermedad, o bien que el mamífero adquiere menos síntomas o síntomas menos graves que los que el mamífero adquiriría de otra manera sin la composición de vacuna. El tratamiento de una enfermedad significa que el mamífero deja de sufrir de los síntomas de la enfermedad, o que la gravedad del sufrimiento se alivia al menos parcialmente.

Los ejemplos de las enfermedades infecciosas para las que los métodos de la invención son eficaces son aquellas enfermedades causadas por los microorganismos mencionados anteriormente. Los ejemplos de las enfermedades para las que los métodos de la invención son particularmente eficaces incluyen SARS y VIH.

55 Los ejemplos de las enfermedades asociadas a tumores que los métodos de la invención pueden tratar y/o prevenir

5 incluyen cánceres de cavidad oral y faringe (es decir, lengua, boca, faringe), sistema digestivo (p. ej., esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto, ano, hígado, vesícula biliar, páncreas), sistema respiratorio (p. ej., laringe, pulmón), huesos, articulaciones, tejidos blandos, piel, melanoma, mama, órganos reproductores (p. ej., cérvix, endometrio, ovario, próstata, testículos), sistema urinario (p. ej., vejiga urinaria, riñón, uréter y otros órganos urinarios), ojo, cerebro, sistema endocrino (p. ej., tiroides y otro órgano endocrino), linfoma (p. ej., enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin), mieloma múltiple, leucemia (p. ej., leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica).

10 Los parámetros de vacunación o administración de un antígeno concreto, p. ej., la cantidad de Ov-ASP que se añade al antígeno concreto, el programa de dosificación, etc., pueden ser determinados mediante experimentación rutinaria. Por ejemplo, la cantidad total de una composición de vacuna o composición inmunogénica y las cantidades relativas de un antígeno y Ov-ASP dentro de una composición se pueden determinar sometiendo a ensayo las composiciones en sujetos mamíferos. A un sujeto mamífero se le puede administrar inicialmente una dosis baja de la composición y a continuación, la dosis y/o se pueden variar las cantidades relativas del coadyuvante de proteína y el antígeno durante el seguimiento de la respuesta inmunitaria.

15 Si se logran una vacunación o una respuesta inmunitaria inadecuadas, en ese caso, los parámetros de vacunación o de administración pueden ser modificados de una manera esperada para potenciar la respuesta inmunitaria, por ejemplo, mediante el aumento de la cantidad de antígeno y/o de Ov-ASP, formando complejos de antígeno con un portador, conjugando el antígeno con una proteína inmunogénica, o variando la ruta de administración, como es conocido en la técnica.

20 Métodos para estimular una respuesta celular con la secreción de citoquinas

Otra realización de la presente invención incluye un método para estimular una respuesta celular con la secreción de citoquinas en un mamífero que lo necesite. El método comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de Ov-ASP, o al menos una subunidad de Ov-ASP. Ov-ASP se puede administrar en forma de una composición farmacéutica.

25 La respuesta celular es estimulada en los mamíferos hayan o no hayan sido expuestos previamente al parásito del cual deriva Ov-ASP. Este descubrimiento inesperado demuestra que la estimulación de una respuesta celular por Ov-ASP no es una respuesta inmunitaria adaptativa (es decir, no es manifestada por la memoria inmunológica). En su lugar, la respuesta celular es debida a la estimulación de la respuesta inmunitaria innata.

30 Una cantidad eficaz de Ov-ASP es cualquier cantidad que regula al alza los aspectos de infección-aclarado de la respuesta inmunitaria innata. La regulación al alza de los aspectos de infección-aclarado de la respuesta inmunitaria innata incluye la inducción de la respuesta inflamatoria, la regulación de la hematopoyesis, el control de la proliferación y la diferenciación celular y la cicatrización de heridas. La cantidad mínima de Ov-ASP es cualquier cantidad que regule al alza estos procesos. La cantidad máxima de Ov-ASP es una cantidad que no causa efectos proinflamatorios excesivos.

35 La administración de Ov-ASP se puede efectuar mediante la administración de la propia proteína, o mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica la proteína de una manera que permita la expresión de la proteína, como se ha descrito anteriormente.

40 La cantidad concreta de Ov-ASP administrada depende del mamífero sujeto que se vaya a tratar, la ruta de administración, y la patología para la que está siendo tratado el mamífero. Por ejemplo, Ov-ASP podría inyectarse en un tumor o aplicarse al sitio de una infección por el virus del herpes para estimular respuestas celulares citotóxicas que disminuyan el tumor o ayuden a eliminar la infección viral.

Ov-ASP estimula células Th1, Th2, y Th reguladoras a través de respuestas celulares IL-10. Sin embargo, la proteína estimula predominantemente respuestas Th1.

45 Las respuestas Th1 son especialmente eficaces para la inducción de respuestas antitumorales. Por ejemplo, las respuestas Th2 polarizadas son provocadas en pacientes con cáncer activo. Se ha encontrado que la terapia satisfactoria en algunos pacientes con cáncer está acompañada de un desplazamiento de una polarización Th2 a una polarización Th1. Además, dado que los alérgenos inducen respuestas Th2, la administración de Ov-ASP se puede utilizar para inhibir las respuestas alérgicas sesgando las respuestas hacia Th1.

50 Las citoquinas que son estimuladas por Ov-ASP incluyen interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), factor de crecimiento tumoral-beta (TGF- $\beta$ ), interleuquina-10 (IL-10), o combinaciones de los mismos.

Métodos de vacunación o generación de una respuesta inmunitaria contra la oncocercosis

55 Otra realización de la presente invención incluye un método de vacunación o generación de una respuesta inmunitaria contra la oncocercosis en un mamífero. El método comprende administrar a un mamífero, que lo necesite, una cantidad eficaz de Ov-ASP, o fragmentos inmunogénicos de Ov-ASP. Ov-ASP se puede administrar tal

cual o con un coadyuvante.

5 La oncocercosis o ceguera de los ríos, se produce principalmente como resultado de una respuesta inflamatoria del anfitrión a la infección por el nematodo filarial *Onchocerca volvulus*. Transmitida por la picadura de la mosca negra de la familia Simuliidae, el parásito invade la piel, tejidos subcutáneos, y otros tejidos, produciendo nódulos fibrosos. La respuesta inflamatoria del anfitrión a la infección con *Onchocerca volvulus* puede manifestarse en enfermedades cutáneas y lesiones oculares crónicas.

10 Una cantidad eficaz de Ov-ASP es una cantidad que previene o inhibe la Oncocercosis. Para este propósito, es necesario que la proteína produzca anticuerpos citofílicos. Los anticuerpos citofílicos son anticuerpos que en asociación con las células efectoras tales como neutrófilos, macrófagos y/o eosinófilos, por ejemplo, pueden inhibir significativamente el crecimiento de y/o destruir el parásito. El crecimiento es inhibido significativamente si la inhibición es suficiente para prevenir o reducir los síntomas de la enfermedad en un mamífero infectado.

La administración de Ov-ASP puede efectuarse mediante la administración de la propia proteína, o mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica la proteína de una manera que permita la expresión de la proteína, como se ha descrito anteriormente.

### 15 Métodos generales

20 Un mamífero que puede beneficiarse de los métodos de la presente invención puede ser cualquier mamífero. Las categorías de mamíferos incluyen seres humanos, primates no humanos, ganado, mamíferos domésticos, mamíferos de laboratorio, etc. Algunos ejemplos de ganado incluyen vacas, cerdos, caballos, cabras, ganado vacuno, etc. Algunos ejemplos de los mamíferos domésticos incluyen perros, gatos, etc. Algunos ejemplos de mamíferos de laboratorio incluyen ratas, ratones, conejos, cobayas, etc.

Los mamíferos que necesitan los métodos de esta invención incluyen mamíferos en los que se desea la prevención o el tratamiento de una enfermedad. La enfermedad puede ser una enfermedad infecciosa; una alergia; una enfermedad asociada a tumores, tal como el cáncer; y/o una enfermedad autoinmunitaria.

25 Las composiciones farmacéuticas y vacunas de la presente invención se pueden administrar mediante cualquier medio siempre y cuando la administración de como resultado la respuesta inmunitaria deseada. Preferiblemente, las composiciones se administran por vía intramuscular, subcutánea, transdérmica, intranasal, transmucosa, intraocular, intraperitoneal, oral o intravenosa. Otras rutas adecuadas de administración incluyen por inhalación, por vía intratraqueal, vaginal, rectal, e intrainestinal.

30 Los medios de administración de las composiciones incluyen, pero no se limitan a, inyección con aguja, infusión con catéter, inyectores biolísticos, aceleradores de partículas (*es decir*, "pistolas génicas" o inyectores neumáticos "sin aguja" - por ejemplo, Med-E-Jet (Vahlsing, H., et al., J. Immunol. Methods 171,11-22 (1994)), Pigjet (Schrijver, R., et al., Vaccine 15, 1908/16 (1997)), Biojector (Davis, H., et al., Vaccine 12, 1503-1509 (1994)); Gramzinski, R., et al., Mol. Med. 4, 109-118 (1998)), AdvantaJet, Medijector, depósitos de esponja de espuma de gel, otros materiales de depósito disponibles en el mercado (p. ej., hidrogeles), bombas osmóticas (p. ej., minibombas Alza), formulaciones farmacéuticas sólidas (comprimidos o píldoras) orales o para supositorio, cremas para la piel de uso tópico, y decantación, uso de sutura recubierta de polinucleótido (Qin et al., Life Sciences 65, 2193-2203 (1999)) o aplicaciones tópicas durante la cirugía.

40 Las composiciones farmacéuticas y de vacuna de la presente invención se pueden formular de acuerdo con métodos conocidos. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender un portador adecuado. Los portadores adecuados incluyen cualquiera de los portadores farmacéuticamente aceptables convencionales, tales como agua, solución salina tamponada con fosfato, e hidróxido de aluminio, partículas de látex, bentonita, liposomas y micropartículas. Los portadores adecuados se describen, por ejemplo, en Remington Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol A., ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1980), y Remington Pharmaceutical Sciences, 19ª edición, AR Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1.995). La composición farmacéutica se puede formular como una emulsión, gel, solución, suspensión, forma liofilizada, o cualquier otra forma conocida en la técnica.

45 Las composiciones de vacuna o composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden comprender coadyuvantes. En la realización en donde Ov-ASP se utiliza como un coadyuvante, se pueden incluir otros coadyuvantes adicionales. Los ejemplos de los coadyuvantes incluyen muramilpéptidos y análogos; linfoquinas, tales como interferón, interleuquina-1 e interleuquina-6; saponinas, fracciones de saponinas; componentes sintetizados de saponinas; polioles pluriónicos; dimicolato de trehalosa; compuestos que contienen amina; citoquinas; y derivados de lipopolisacáridos.

Además, la vacuna y la composición farmacéutica también pueden contener aditivos farmacéuticamente aceptables, incluyendo, por ejemplo, diluyentes, aglutinantes, estabilizantes, y conservantes.

55 Las composiciones de vacuna y farmacéuticas también pueden comprender ingredientes terapéuticos. Por ejemplo, las formulaciones adecuadas para inyección o infusión incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener opcionalmente antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que vuelven las

formulaciones isotónicas con la sangre del receptor pretendido, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes suspensores y agentes espesantes.

- 5 Las composiciones de vacuna y farmacéuticas se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere sólo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, agua para inyectables, inmediatamente antes de su uso.

La invención se comprenderá más completamente a la luz de los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

- 10 Los ejemplos demuestran que rOv-ASP-1 actúa como un potente inmunoestimulador, así como un coadyuvante. Los ejemplos también demuestran que rOv-ASP-1 es un potente estimulador de la secreción de citoquinas en los seres humanos, hayan sido expuestos o no al parásito del que se clonó la proteína. Se ha demostrado que las propiedades coadyuvantes de rOv-ASP-1 en ratones y la actividad inmunoestimuladora en los leucocitos humanos no es debida a los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) contaminantes, también conocidos como endotoxinas.

#### Ejemplo 1

- 15 Respuestas de citoquinas humanas a rOv-ASP-1.

Se llevaron a cabo experimentos que investigaban las respuestas inmunitarias a rOv-ASP-1 en seres humanos que viven en zonas endémicas de África para *Onchocerca volvulus*. Durante estos estudios, se observó que la proteína recombinante estimulaba respuestas de citoquinas potentes en sujetos de control que residían en el área metropolitana de Nueva York y que nunca fueron expuestos al parásito (Figura 1). La proteína recombinante estimuló la producción significativa ( $P < 0,05$ ) de citoquinas de tipo Th1 (es decir IFN- $\gamma$ , GM-CSF y TNF- $\alpha$ ), y una citoquina de células T Th2/reguladora (IL-10).

20 Una preocupación era que el LPS (endotoxina) residual derivado de la bacteria *E. coli* en la que se clonó rOv-ASP-1 podría estar contribuyendo al efecto estimulador de citoquinas. A pesar de que la concentración óptima inductora de citoquinas de Ov-ASP-1 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) dio negativo para la actividad de LPS en el ensayo del producto lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) (Sigma, St. Louis, MO), se tomaron nuevas medidas para garantizar que los resultados no se debían a ningún LPS residual en la preparación de antígeno. Los datos presentados en la Figura 2 muestran que la bioactividad de rOv-ASP-1 no era debida a ninguna posible contaminación por LPS ya que la producción de citoquinas por PBMC humana no se vio afectada por la presencia de polimixina B (Sigma), un inhibidor de la actividad de LPS.

- 30 Unión de rOv-ASP-1 a células mononucleares de sangre periférica humana.

Las células en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que se unían a la proteína recombinante se identificaron utilizando rOv-ASP-1 marcada con biotina. Como se muestra en la Tabla 1, rOv-ASP-1 se unió a la mayoría de las células B y monocitos (> 94,5%). Además, 14,5% de las células T CD8 + y 28,7% de las células NK se unieron a la proteína. Las células T CD8+ y las células NK son las fuentes probables de la secreción de IFN- $\gamma$  inducida por rOv-ASP-1.

35

Población celular	CD marcador	% de células positivas para rOv-ASP-1		
		Donante Núm. 1	Donante Núm. 2	Promedio
Células T	CD4	3,8	2,3	3,0
Células T	CD8	16,7	12,4	14,5
Células B	CD19	96,1	93,0	94,5
Células NK	CD56	30,9	26,5	28,7
monocitos	CD14	98,6	97,9	98,3

Tabla 1. Análisis FACS de la unión de rOv-ASP-1 biotinilado marcado con FITC a subconjuntos de leucocitos

humanos en PBMC. Las muestras 1 y 2 se obtuvieron de donantes separados y se contaron 10.000 eventos. Los valores representan el % de células totales seleccionadas para un marcador CD concreto que también se unía a FITCbiotina-rOv-ASP-1.

Anticuerpos de ratón y respuestas de citoquinas a rOv-ASP-1.

5 Si bien se llevaron a cabo experimentos diseñados para evaluar rOv-ASP-1 como un posible candidato a vacuna contra la oncocercosis en seres humanos, los ratones Balbc/cByJ fueron vacunados con la proteína recombinante sola o con coadyuvantes. Se midieron los isotipos IgG1 e IgG2a que están asociadas con respuestas de células T coadyuvantes Th1 y Th2, respectivamente, en ratones. En términos generales, las respuestas inmunitarias Th2 son activas contra patógenos extracelulares en los fluidos de los tejidos y las respuestas Th1 son más eficaces contra los patógenos que infectan células.

10 Incluso sin coadyuvantes, rOv-ASP-1 fue capaz de estimular altos títulos de anticuerpos contra sí misma en ratones vacunados (Tabla 2). La proteína estimula anticuerpos tanto Th2 (IgG1) como Th1 (IgG2a), con un ligero predominio de Th1.

15 Se obtuvieron de estos ratones células de bazo para evaluar las respuestas celulares inducidas por rOv-ASP-1 a la proteína. Las células del bazo se cultivaron y se re-estimularon *in vitro* con rOv-ASP-1. Se midió el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) como un marcador para una respuesta Th1. La interleuquina-5 (IL-5) se midió para indicar la actividad Th2. La IL-10 se midió como un producto de células T Th2 y/o regulador. La proteína recombinante estimula altos niveles de secreción de IFN- $\gamma$  a partir de células de bazo obtenidas de ratones a los que se había inyectado PBS o rOv-ASP-1 (Figura 3), lo que implica la inducción directa de estas citoquinas *in vitro*. También se produjo una liberación similar no específica de antígeno de IL-10. En contraste, IL-5 fue producida solamente por células de bazo de los ratones previamente expuestos a rOv-ASP-1, en particular por el grupo que recibió 2,5  $\mu$ g de rOv-ASP-1, lo que indica especificidad de antígeno de la respuesta de IL-5.

	IgG1	IgG2a
PBS	0	0
rOv-ASP-1 en PBS	293.000	656.000

25 Tabla 2. Títulos de punto final recíprocos de anticuerpos IgG1 e IgG2a contra rOv-ASP-1 en ratones vacunados con la proteína en PBS o PBS solo. Los títulos se obtuvieron utilizando muestras de suero reunidas (6 ratones por grupo).

**Estudios con coadyuvante en ratones.**

30 Puesto que rOv-ASP-1 fue capaz de estimular respuestas de anticuerpos de alto título contra ella misma sin coadyuvante añadido, se investigó la cuestión de si la proteína podría actuar como un coadyuvante para respuestas de anticuerpos contra proteínas no relacionadas. La albúmina de huevo de pollo, también conocida como ovoalbúmina (OVA), se utilizó como un modelo de antígeno que no estimula respuestas de anticuerpos apreciables cuando se inyecta en ratones sin coadyuvantes. La OVA se mezcló con los coadyuvantes preparados comercialmente, alumbre (Sigma) o MPL + TDM (Sigma) o con el coadyuvante de ensayo, rOv-ASP-1. A cinco grupos de ratones se les inyectaron por vía subcutánea los coadyuvantes preparados comercialmente o, para fines de control, OVA o los coadyuvantes solos.

35 Cada animal recibió 50  $\mu$ g de OVA por inmunización. La OVA y rOv-ASP-1 se diluyeron en solución salina estéril, libre de LPS tamponada con fosfato (PBS).

Los ratones recibieron una inmunización de refuerzo después de 14 días. Diez días más tarde, el suero se recogió de los ratones. Las cantidades de anticuerpos IgG en el suero se cuantificaron mediante ELISA.

40 Cuando rOv-ASP-1 se utilizó a 25  $\mu$ g/ratón, la proteína (Figura 4, cuadrados de color negro) superó en potencia a los coadyuvantes de alumbre y MPL + TDM preparados comercialmente. El título de punto final de IgG1 anti-OVA utilizando rOv-ASP-1 como coadyuvante a 25  $\mu$ g/ratón fue de 102.400. Los títulos obtenidos utilizando coadyuvantes de MPL + TDM o alumbre fueron de 18.000 y 15.000, respectivamente. A la concentración más baja de rOv-ASP-1 (2,5  $\mu$ g), el título antiOVA fue de 8.000. Los títulos de IgG2a fueron considerablemente inferiores a los de IgG1 y solo la rOv-ASP-1 a 25  $\mu$ g indujo un título anti-OVA apreciable (25.600).

45 Para excluir cualquier posibilidad de LPS residuales en rOv-ASP-1 que contribuyeran a sus efectos coadyuvantes, los LPS fueron retirados de la solución de partida concentrada (2,5 mg/ml) de rOv-ASP-1 utilizando un sistema Detoxi-gel™ (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Se comparó la adyuvancia de diluciones de trabajo de lotes libres de LPS y que contenían LPS de rOv-ASP-1. En la Figura 5, los cuadrados abiertos muestran que la rOv-ASP-1 libre

de LPS obtuvo mejores resultados que la misma proteína preparada a partir de la provisión de partida que contenía LPS (Figura 5, círculos sólidos) al aumentar las respuestas de anticuerpos a OVA en ratones inmunizados. El título de anticuerpo de punto final no se obtuvo, pero las diferencias son claras, especialmente con el isotipo IgG2a. Por lo tanto, los LPS como factor que contribuye a las propiedades coadyuvantes de la proteína *Ov*-ASP-1 recombinante fueron descartados.

Las respuestas celulares al antígeno inmunizante, OVA, se evaluaron mediante la medición de la secreción de citoquinas por las células de bazo de los grupos de ratones representados en la Figura 4 y estos resultados se muestra en la Figura 6.

La producción de IFN- $\gamma$  específica de OVA se observó sólo en ratones que recibieron el coadyuvante de ensayo de r*Ov*-ASP-1 a ambas concentraciones y también el coadyuvante MPL + TDM. IL-5 fue inducida en respuesta a OVA solamente con alumbre como coadyuvante y la liberación de IL-10 se estimuló utilizando solo los coadyuvantes comerciales pero no el coadyuvante de ensayo. La carencia de IL-5 e IL-10 sugiere un sesgo predominantemente Th1 a la respuesta inmunitaria antiOVA guiada por la r*Ov*-ASP-1.

Ejemplo 2

Evaluación de la capacidad coadyuvante de r*Ov*-ASP-1 para los antígenos de patógenos

La proteína r*Ov*-ASP-1 se sometió a ensayo para determinar si la proteína tenía una potencia coadyuvante similar para antígenos derivados de patógenos humanos, a saber, SARS-CoV y VIH-1.

Se inmunizaron ratones Balbc/cByJ utilizando el mismo lote de r*Ov*-ASP-1 negativa para LPS como se muestra en el Ejemplo 1, pero mezclada con 50  $\mu$ g de péptido CP-1 de SARS-CoV (SC-1) o polipéptido FLSC (FLSC) de CD4 de VIH-1 en lugar de OVA. A todos los ratones inmunizados se les proporcionaron 2 refuerzos en este momento para optimizar la respuesta, es decir, un total de 3 inyecciones de SC-1 o FLSC con r*Ov*-ASP-1 como coadyuvante de ensayo o MPL + TDM como control.

Utilizando OVA como antígeno de control, los títulos de punto final fueron aproximadamente 2.096.000 y 1.024.000 cuando r-*Ov*-ASP-1 y MPL + TDM fueron utilizados como coadyuvantes, respectivamente. Estos títulos totales de IgG fueron aproximadamente 10 veces mayores que en el Ejemplo 1, lo que sugiere que un refuerzo adicional mejora significativamente la producción de anticuerpos. La capacidad coadyuvante de r*Ov*-ASP-1 para el péptido SC-1 superó la de MPL + TDM a juzgar por los títulos de IgG de punto final de 256.000 vs. 64.000, respectivamente (Figura 7). Los títulos de IgG de punto final anti-FLSC alcanzados con los dos coadyuvantes fueron equivalentes (aproximadamente 1.024.000; Figura 8).

Las respuestas de isotipo IgG contra el péptido SC-1 y el polipéptido FLSC se resumen en la Tabla 1. La proteína r*Ov*-ASP-1 estimuló títulos más altos de IgG1, IgG2a e IgG2b que MPL + TDM. Los títulos de IgG3 fueron igualmente bajos con los dos coadyuvantes. Los títulos de IgG1 contra el polipéptido FLSC fueron considerablemente inferiores a los del péptido SC-1. MPL + TDM indujeron un mayor título de IgG2b contra FLSC que r*Ov*-ASP-1, mientras que los títulos de IgG1 e IgG3 fueron los mismos utilizando ambos coadyuvantes.

Las diferencias más notables entre las respuestas inducidas por r*Ov*-ASP-1 y MPL + TDM fueron la carencia de una respuesta IgG2a (Th1) contra SC-1 utilizando MPL + TDM, y la respuesta de IgG2a cuatro veces superior contra FLSC coadyuvada por r*Ov*-ASP-1 en comparación con MPL + TDM. En contraste con los antígenos SC-1 y FLSC, los anticuerpos IgG2b e IgG3 para OVA no fueron detectables utilizando coadyuvantes r*Ov*-ASP-1 o MPL + TDM (datos no mostrados).

Cada modelo de antígeno tenía un comportamiento diferente dependiendo del antígeno, pero la respuesta Th1 (IgG2a) fue siempre mayor cuando se utilizó r*Ov*-ASP-1 como coadyuvante. Con FLSC como inmunógeno, se produjo un desplazamiento en los anticuerpos IgG2a e IgG2b entre coadyuvantes ASP-1 y Ribi. ASP-1 favoreció IgG2a y Ribi potenció IgG2b. No se detectó IgE utilizando r*Ov*-ASP-1 como coadyuvante. IgM e IgA no se sometieron a ensayo.

	Anti-FLSC		Anti-SC-1	
	Coadyuvantes		Coadyuvantes	
Isotipos de IgG	r <i>Ov</i> -ASP-1	MPL + TDM	r <i>Ov</i> -ASP-1	MPL + TDM
IgG1	3.600	3.600	115.200	14.400
IgG2a	28.800	7.200	7.200	0

	Anti-FLSC		Anti-SC-1	
	<i>Coadyuvantes</i>		<i>Coadyuvantes</i>	
Isotipos de IgG	rOv-ASP-1	MPL + TDM	rOv-ASP-1	MPL + TDM
IgG2b	3.200	25.600	1.067	334
IgG3	6.400	6.400	320	320

Tabla 3: Títulos de punto final recíprocos de isotipos IgG de ratón contra antígenos FLSC o CP-1 formulados ya sea con coadyuvante de ensayo rOv-ASP-1 o el coadyuvante MPL + TDM. rOv-ASP-1 indujo anticuerpos IgG2a mucho más altos (Th1) contra ambos antígenos y sesgó IgG1 (Th2) hacia el péptido SC-1.

LISTA DE SECUENCIAS

<160> NÚMERO DE SECUENCIA ID NOS: 3

5

<210> SEC ID NO 1

<211> LONGITUD: 223

<212> TIPO: PRT

<213> ORGANISMO: Onchocerca volvulus

10

<400> SECUENCIA: 1

```

Met Ile Leu Phe Ile Ile Phe Pro Ala Ile Val Val Ala Val Thr Gly
1           5           10           15
Tyr Asn Cys Pro Gly Gly Lys Leu Thr Ala Leu Glu Arg Lys Lys Ile
           20           25           30
Val Gly Gln Asn Asn Lys Tyr Arg Ser Asp Leu Ile Asn Gly Lys Leu
           35           40           45
Lys Asn Arg Asn Gly Thr Tyr Met Pro Arg Gly Lys Asn Met Leu Glu
           50           55           60
Leu Arg Trp Asp Cys Lys Leu Glu Ser Ser Ala Gln Arg Trp Ala Asn
           65           70           75           80
Gln Cys Ile Phe Gly His Ser Pro Arg Gln Gln Arg Glu Gly Val Gly
           85           90           95
Glu Asn Val Tyr Ala Tyr Trp Ser Ser Val Ser Val Glu Gly Leu Lys
           100          105          110
Lys Thr Ala Gly Thr Asp Ala Gly Lys Ser Trp Trp Ser Glu Leu Pro
           115          120          125
Lys Leu Tyr Glu Asn Asn Pro Ser Asn Asn Met Thr Trp Lys Val Ala
           130          135          140
Gly Gln Gly Val Leu His Phe Thr Gln Met Ala Trp Gly Lys Thr Tyr
           145          150          155          160
Lys Ile Gly Cys Gly Val Ala Thr Gln Cys Asp Gly Gly Arg Thr Leu
           165          170          175
Ile Val Ile Cys His Tyr Ser Pro Gly Gly Asn Met Val Gly Glu Val
           180          185          190
Ile Tyr Gln Arg Gly Asn Pro Cys Asn Pro Cys Lys Val Asp Lys Asp
           195          200          205
Cys Tyr Thr Lys Lys Cys Leu Ser Lys Ser Gly Leu Cys Arg Lys
           210          215          220

```

15

<210> SEC ID NO 2

<211> LONGITUD: 253

<212> TIPO: PRT

<213> ORGANISMO: Onchocerca volvulus

20

<400> SECUENCIA: 2

ES 2 549 669 T3

Met Ile Leu Phe Leu Ile Phe Pro Ala Ile Ile Val Ala Val Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Tyr Asp Cys Tyr Arg Gly Lys Leu Thr Pro Gln Tyr Arg Glu Lys Ile  
 20 25 30  
 Val Arg Glu His Asn Arg Leu Arg Ser Lys Leu Ala Lys Gly Thr Tyr  
 35 40 45  
 Lys Asn Ser Ala Gly Lys Trp Met Pro Lys Gly Lys Asn Met Met Glu  
 50 55 60  
 Met Lys Trp Asp Cys Glu Leu Glu Leu Met Ala Gln Arg Trp Ala Asp  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Val Ser Gly Asn Ser Pro Lys Asp Arg Arg Gly Arg Ile Gly  
 85 90 95  
 Glu Asn Val Tyr Thr Gln Arg Ser Asp Thr Ser Val Ala Val Tyr Gly  
 100 105 110  
 Thr Ser Gly Ile Met Ile Ala Leu Glu Ser Trp Trp Val Glu Leu Thr  
 115 120 125  
 Arg Ser Tyr Lys Asn Asn Pro Ser Asn Lys Tyr Thr Ser Ile Val Ala  
 130 135 140  
 Asn Arg Gly Val Ser Asn Phe Thr Gln Leu Ala Trp Gly Lys Thr Tyr  
 145 150 155 160  
 Lys Val Gly Cys Gly Ile Ala Thr His Cys Asp Gly Gly Lys Ala Phe  
 165 170 175  
 Val Ala Val Cys Gln Tyr Asn Pro Gly Gly Asn Thr Met Gly Glu Ser  
 180 185 190  
 Ile Tyr Glu Lys Gly Arg Pro Cys Lys Thr Asp Arg Asp Cys Ser Ser  
 195 200 205  
 Arg Lys Cys Cys Lys Arg Ile Trp Ile Val Gln Ile Glu Phe Leu His  
 210 215 220  
 Leu Ile Phe Gly Phe Ala Met His Pro Tyr Ile Tyr Phe Ser Ala Lys  
 225 230 235 240  
 Lys Leu Lys Lys Ile Phe Ile Ile Lys Tyr Glu Tyr Ile  
 245 250

<210> SEC ID NO 3  
 <211> LONGITUD: 220  
 <212> TIPO: PRT  
 <213> ORGANISMO: Onchocerca volvulus  
 <400> SECUENCIA: 3

5

ES 2 549 669 T3

Met Ile Leu Phe Ile Ile Phe Pro Ala Ile Ile Val Ala Val Thr Gly  
1 5 10 15

His Asp Cys His Arg Gly Lys Leu Thr Ser Leu Gln Arg Asp Ile Ile  
20 25 30

Tyr Asp Glu His Asn Lys Tyr Arg Ser Arg Leu Val Lys Gly Asn Phe  
35 40 45

Ala Asn Lys Asp Gly Asn Ser Met Pro Lys Gly Lys Asn Met Met Glu  
50 55 60

Met Glu Trp Asp Cys Glu Leu Glu Ile Ser Ala Gln Asn Trp Ala Asp  
65 70 75 80

Gln Cys Ile Phe Gly Tyr Ser Pro Glu Asn Gln Arg Glu Gly Val Gly  
85 90 95

Glu Asn Ile Tyr Ala Leu Gly Leu Pro Lys Asp Val Glu Val Phe Asn  
100 105 110

Thr Ser Ala Ala Leu Phe Ala Ile Glu Ser Trp Trp Thr Glu Leu Ile  
115 120 125

Arg Ser Tyr Arg Asn Asn Pro Ser Asn Lys Leu Thr Ser Ser Val Ala  
130 135 140

Ser Gln Asp Val Leu His Phe Thr Gln Met Ala Trp Gly Lys Thr His  
145 150 155 160

Lys Val Gly Cys Gly Ile Ala Met His Cys Asp Asp Gly Glu Ala Phe  
165 170 175

Ile Val Val Cys His Tyr Ala Pro Arg Gly Asn Thr Ile Gly Glu Leu  
180 185 190

Ile Tyr Glu Gln Gly Ser Pro Cys Lys Val Asn Lys His Cys Arg Thr  
195 200 205

Lys Lys Cys Ser Arg Lys Ser Gly Leu Cys Lys Lys  
210 215 220

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición inmunogénica para potenciar una respuesta inmunitaria específica a un radical antigénico en un mamífero que necesita de tal respuesta inmunitaria, comprendiendo la composición:
  - 5 un radical antigénico, en donde el radical antigénico es un poliaminoácido, y en donde el radical antigénico no es una proteína secretada asociada a la activación de *Onchocerca volvulus* (*Ov-ASP*); y
    - un coadyuvante que comprende una cantidad eficaz de *Ov-ASP*.
  2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de *Ov-ASP* es idéntica en al menos 90% al SEQ ID NO: 1.
  3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de *Ov-ASP* es idéntica en al menos 90% al SEQ ID NO: 2.
  4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de *Ov-ASP* es idéntica en al menos 90% al SEQ ID NO: 3.
  5. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición es una vacuna profiláctica.
  6. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición es una vacuna terapéutica.
  7. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la respuesta inmunitaria es una respuesta humoral.
  8. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la respuesta inmunitaria es una respuesta mediada por células.
  9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la respuesta mediada por células es una respuesta Th1.
  10. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la respuesta mediada por células es una respuesta Th2.
  11. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la respuesta mediada por células es una respuesta tanto Th1 como Th2.
  12. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la razón en peso del radical antigénico de *Ov-ASP* es de 4:1 a 1:1.
  13. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la razón en peso del radical antigénico de *Ov-ASP* es de 4:1 a 1:4.
  14. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el radical antigénico es un poliaminoácido de SARS-CoV.
  15. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el poliaminoácido de SARS-CoV es el péptido SC-1 de SARS-CoV.
  16. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el radical antigénico es un poliaminoácido de VIH-1.
  17. La composición de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el poliaminoácido de VIH-1 es el polipéptido FLSC CD4 de VIH-1.
  18. Una composición inmunogénica para su uso en la potenciación de una respuesta inmunitaria específica a un radical antigénico en un mamífero que lo necesite, en donde la composición comprende una cantidad eficaz de *Ov-ASP* y un radical antigénico,
    - en donde el radical antigénico es un poliaminoácido, y
    - en donde el radical antigénico no es una *Ov-ASP*.
  19. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 18, en donde la secuencia de *Ov-ASP* es idéntica en al menos 90% al SEQ ID NO: 1.
  20. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 18, en donde la secuencia de *Ov-ASP* es idéntica en al menos 90% al SEQ ID NO: 2.
  21. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 18, en donde la secuencia de *Ov-ASP* es

- idéntica en al menos 90% al SEQ ID NO: 3.
22. La composición inmunogénica para uso de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la respuesta inmunitaria es una respuesta humoral.
- 5 23. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 18, en donde la respuesta inmunitaria es una respuesta mediada por células.
24. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 23, en donde la respuesta mediada por células es una respuesta Th1.
25. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 23, en donde la respuesta mediada por células es una respuesta Th2.
- 10 26. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 23, en donde la respuesta mediada por células es una respuesta tanto Th1 como Th2.
27. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 18, en donde el radical antigénico es un poliaminoácido de SARS-CoV.
- 15 28. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 27, en donde el poliaminoácido de SARS-CoV es el péptido SC-1 de SARS-CoV.
29. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 18, en donde el radical antigénico es un poliaminoácido de VIH-1.
30. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 29, en donde el poliaminoácido de VIH-1 es el polipéptido FLSC de CD4 de VIH-1.
- 20 31. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 18, en donde la razón en peso del radical antigénico de *Ov*-ASP es de 4:1 a 1:1.
32. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 18, en donde la razón en peso del radical antigénico de *Ov*-ASP es de 4:1 a 1:4.
- 25 33. Una composición inmunogénica para su uso en la prevención del SARS en un mamífero que lo necesite, en donde la composición comprende una cantidad eficaz de *Ov*-ASP y un poliaminoácido de SARS-CoV.
34. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 33, en donde el poliaminoácido de SARS-CoV es el péptido SC-1 de SARS-CoV.
35. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 33, en donde la secuencia de la *Ov*-ASP es idéntica en al menos 90% al SEQ ID NO: 1.
- 30 36. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 33, en donde la secuencia de *Ov*-ASP es idéntica en al menos 90% al SEQ ID NO: 2.
37. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 33, en donde la secuencia de *Ov*-ASP es idéntica en al menos 90% al SEQ ID NO: 3.
- 35 38. Una composición inmunogénica para su uso en la prevención de la infección por VIH en un mamífero que lo necesite, en donde la composición comprende una cantidad eficaz de *Ov*-ASP y un poliaminoácido de VIH-1.
39. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 38, en donde el poliaminoácido de VIH-1 es el polipéptido FLSC de CD4 de VIH-1.
40. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 38, en donde la secuencia de la *Ov*-ASP es idéntica en al menos 90% al SEQ ID NO: 1.
- 40 41. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 38, en donde la secuencia de *Ov*-ASP es idéntica en al menos 90% al SEQ ID NO: 2.
42. La composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 38, en donde la secuencia de *Ov*-ASP es idéntica en al menos 90% al SEQ ID NO: 3.

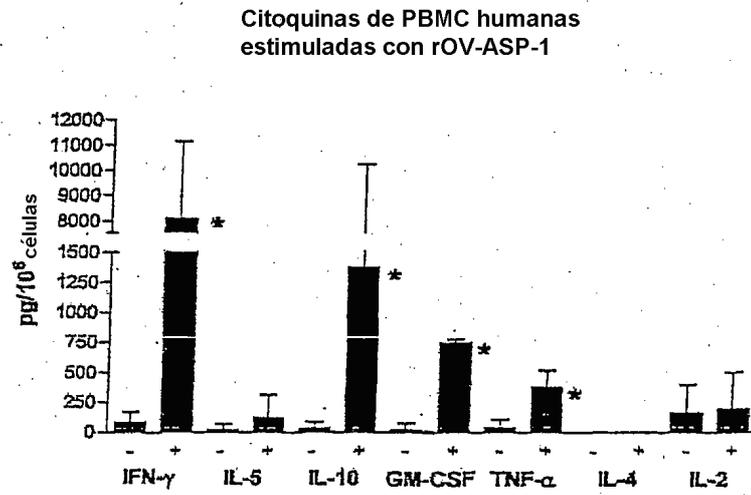


Figura 1. Secreción de citoquinas inducida por rOv-ASP-1 (5  $\mu$ g/mL) a partir de PBMC obtenidas de individuos (n = 14) nunca expuestos a *Onchocerca volvulus*. Las células se incubaron con rOv-ASP-1 (+) o medio de cultivo solo (-). \* =  $P < 0,05$  frente a células en medio de cultivo solo. Los valores son la media  $\pm$  DT.

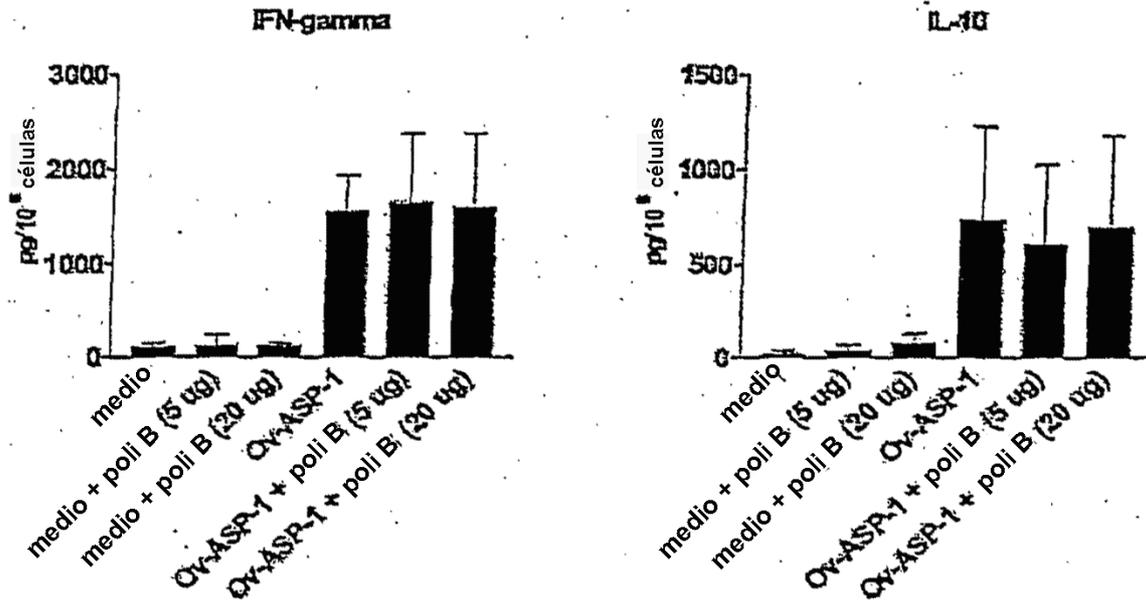


Figura 2. La inhibición de la actividad LPS utilizando polimixina B (5 y 20 µg/mL) no tiene efecto sobre la actividad biológica de rOv-ASP-1 (5 µg/mL) sobre PBMC humanas (3 donantes). Se preincubó rOv-ASP-1 con polimixina B durante 1 hora a temperatura ambiente antes de añadir a PBMC. Los valores son la media ± DT.

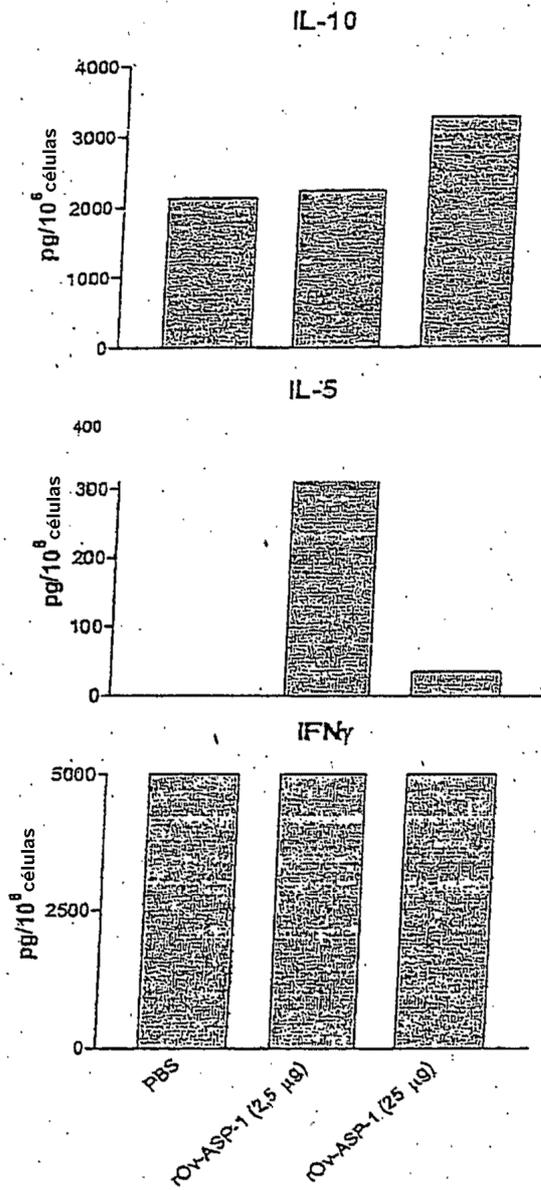


Figura 3. Citoquinas producidas por células de bazo de ratones inmunizados con PBS o rOv-ASP-1 sin coadyuvantes y estimuladas *in vitro* con 5  $\mu$ g/mL de rOv-ASP-1. Los valores se obtienen de células de bazo reunidas dentro de cada grupo de tratamiento y representan la media de cultivos por triplicado.

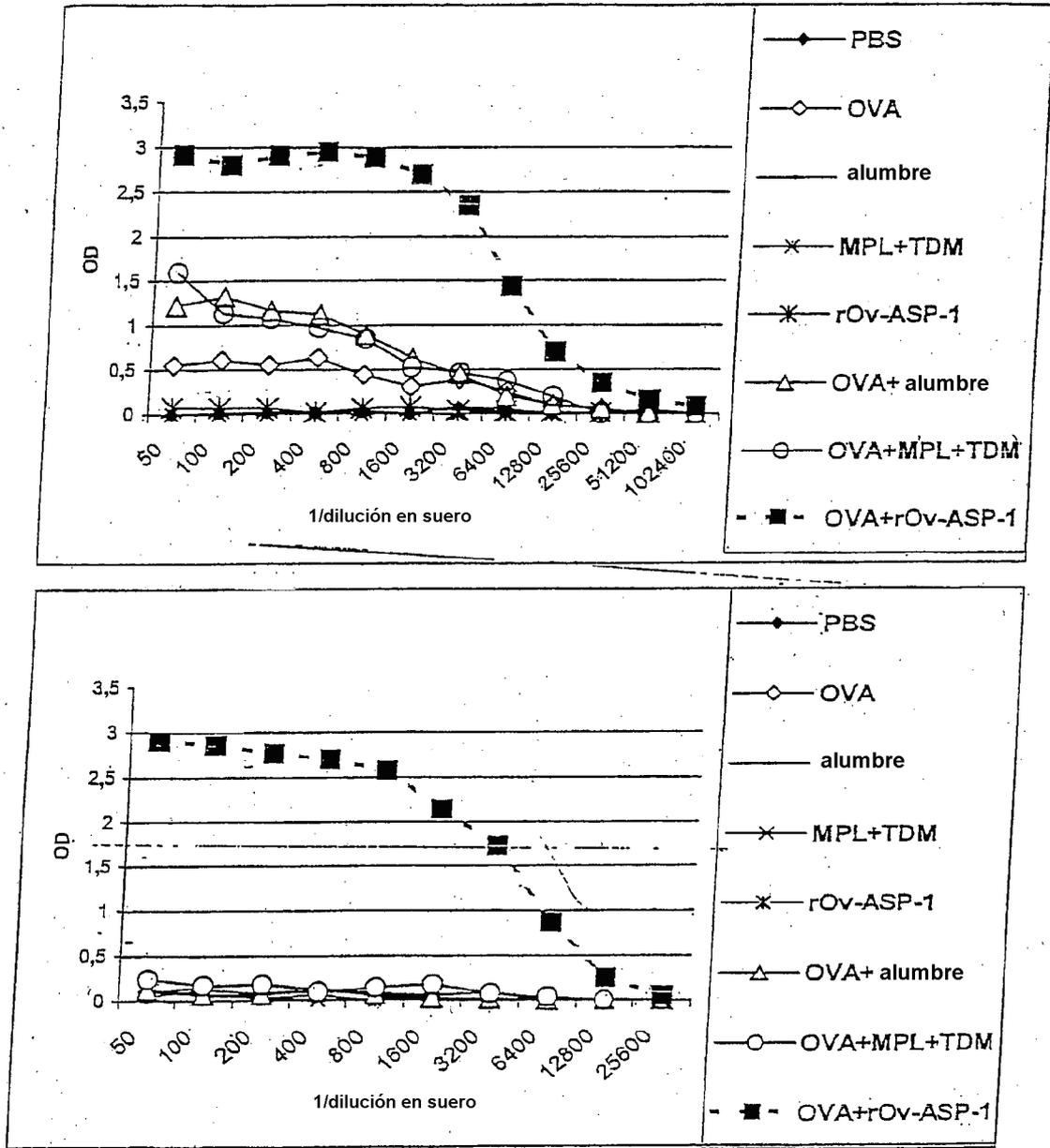


Figura 4. IgG1 e IgG2 anti-OVA medias en ratones (n=5/grupo) inmunizados con tratamientos de control (PBS, OVA, alumbre, MLP+TDM, rOv-ASP1) u OVA combinada con alumbre o MPL+TDM o el coadyuvante de ensayo, rOv-ASP-1. Las cantidades de anticuerpo se expresan como densidad óptica (DO) en el análisis ELISA.

Figura 5. Títulos medios de IgG1 e IgG2 anti-OVA en ratones (n=5/grupo) de los que se habían tomado muestras de sangre preinmunización (Pre) o después de la inmunización con tratamientos de control (PBS, OVA) u OVA combinados con el coadyuvante de ensayo, rOv-ASP-1 (25 µg/ratón), que fue o bien tratado (LPS-) o no tratado (LPS+) con gel de eliminación de LPS. Los mismos símbolos se aplican en ambos gráficos. El título de IgG1 anti-OVA final fue de 512.000 y el título de IgG2a anti-OVA final fue de 128.000.

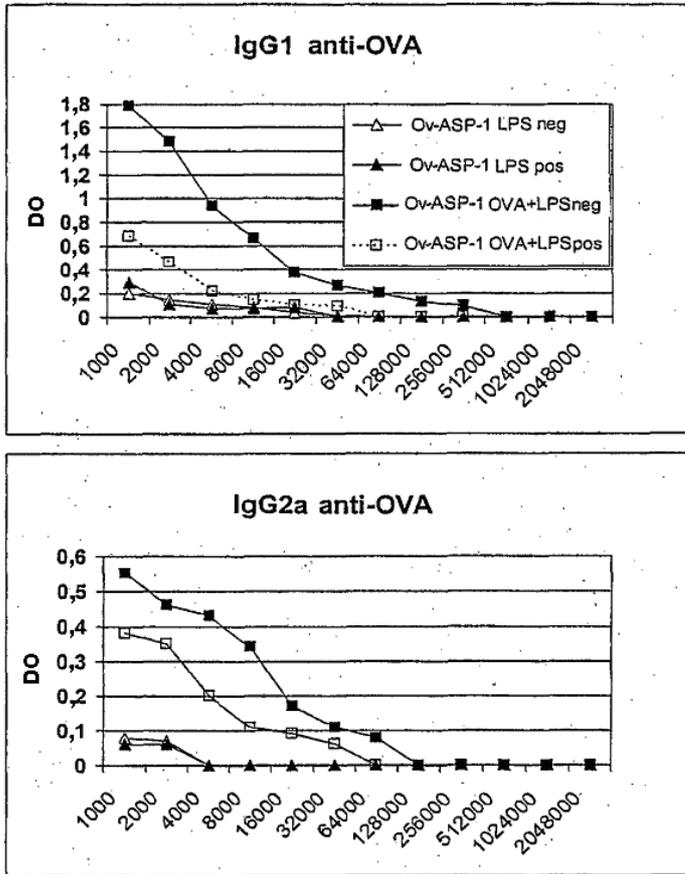




Figura 6. Citoquinas producidas por las células de bazo de ratones inmunizados con OVA con o sin coadyuvantes o tratamientos de control relevantes y re-estimulados *in vitro* con 5  $\mu$ g/ml de OVA. Los valores se obtuvieron a partir de células de bazo reunidas dentro de cada grupo de tratamiento y representan la media de cultivos por triplicado.

Figura 7.

Cantidades medias de IgG anti-SC-1 total en el suero de ratón ( $n= 5$ /grupo) después de la inmunización con tratamientos de control (antígenos o coadyuvantes solos) o antígenos formulados con MPL + TDM o coadyuvante rOv-ASP-1 de ensayo. Las cantidades de anticuerpos se expresan como densidades ópticas (DO) en los análisis ELISA. Las diluciones recíprocas de suero se indican en el eje x. Se indican los puntos finales T; 250.000 en presencia de rOv-ASP-1 y 64.000 en presencia de MPL + TDM.

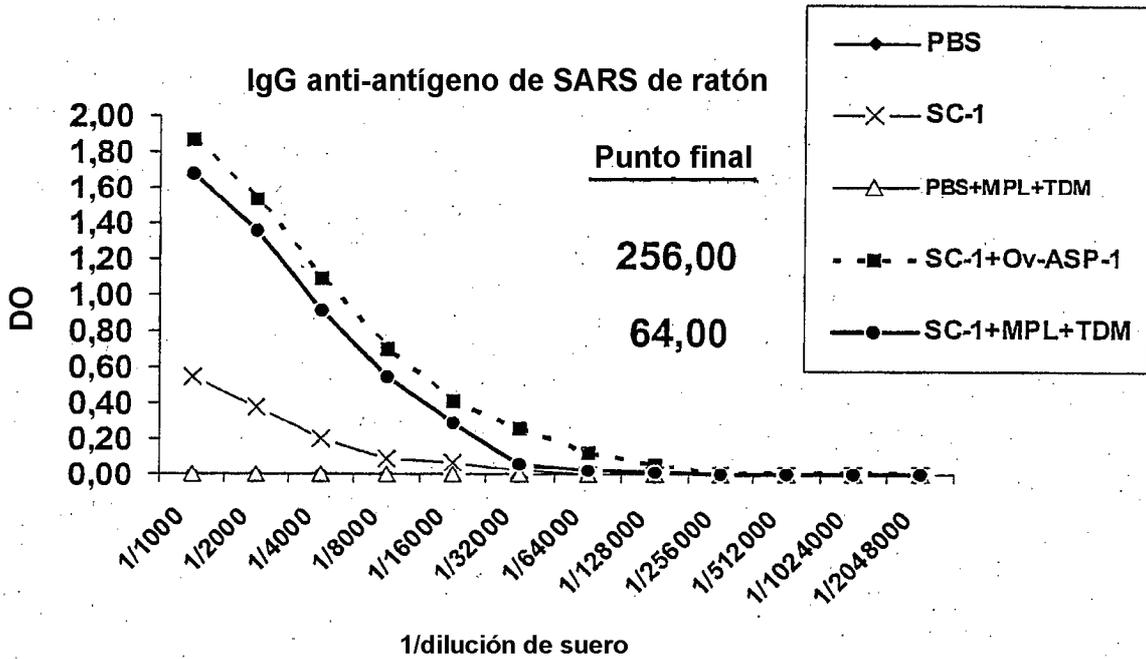


Figura 8.

Cantidades medias de IgG anti-FLSC total en suero de ratón ( $n= 5/\text{grupo}$ ) después de la inmunización con tratamientos de control (antígenos o coadyuvantes solos) o antígenos formulados con MPL + TDM o coadyuvante rOv-ASP-1 de ensayo. Las cantidades de anticuerpos se expresan como densidades ópticas (DO) en los análisis ELISA. Las diluciones recíprocas de suero se indican en el eje x. Se indican los puntos finales T; 1.024.000, en presencia de rOv-ASP-1 y 1.024.000 en presencia de MPL + TDM.

