

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 169**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2004 E 10001123 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2174665**

54 Título: **Composiciones y procedimientos de activación de la inmunidad innata y alérgica**

30 Prioridad:

22.10.2003 US 513614 P
06.04.2004 US 559842 P

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

05.06.2017

73 Titular/es:

ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC
(100.0%)
2323 Boul. du Parc Technologique, Ste Foy
Quebec G1P 4R8, CA

72 Inventor/es:

LOWELL, GEORGE H.;
BURT, DAVID S.;
JONES, DAVID H.;
ZIMMERMANN, JOSEPH J. y
RIOUX, CLEMENT

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 615 169 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

Composiciones y procedimientos de activación de la inmunidad innata y alérgica

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere generalmente a la inmunomodulación y, más específicamente, a los usos terapéuticos de composiciones inmunoestimuladoras con Proteosomas para inducir una respuesta inmune no específica (tal como una respuesta inmune innata) de manera que se potencie o aumente una respuesta inmune adaptativa o para inducir tanto una respuesta inmune no específica como una respuesta inmune adaptativa específica, de manera que la enfermedad infecciosa se trata o se previene o para modular una respuesta inmune para el tratamiento o prevención de una reacción inflamatoria, tal como asma alérgica.

Antecedentes de la invención

10 Algunos patógenos microbianos pueden causar infecciones fatales incluso cuando se enfrentan con una fuerte respuesta inmune del huésped. Sin embargo, el control de enfermedades infecciosas descontroladas han tenido éxito generalmente en la sociedad moderna usando medidas estrictas de salud pública, fármacos (tales como antibióticos), y vacunas. Típicamente las vacunas incluyen un microbio o un antígeno microbiano atenuado para activar una
15 respuesta inmune específica (adaptativa). La capacidad de un antígeno para inducir una respuesta inmune protectora en un huésped puede potenciarse formulando el antígeno con un inmunoestimulante o un adyuvante. Los adyuvantes basados en alumbre se usan casi exclusivamente para vacunas humanas inyectables certificadas. Sin embargo, la respuesta inmune adaptativa requiere señales que proporcionen información sobre el origen del antígeno (es decir, auto antígenos frente a no auto antígenos) y el tipo de respuesta a inducir (es decir, una respuesta a célula T y/o a célula B). Recientemente se han acumulado pruebas que indican que el sistema inmune innato puede proporcionar estas señales (véase, por ejemplo, Fearon y Locksley, Science 272:50, 1996; Medzhitov y Janeway, Curr. Opin. Immunol. 9:4, 1997).

25 La inmunidad innata es la primera línea de defensa independiente de anticuerpos contra infecciones y, en algunos casos, puede eliminar agentes infecciosos. Los componentes de la inmunidad innata reconocen estructuras que son características de los patógenos microbianos y no se encuentran presentes en las células de mamíferos. Las células efectoras principales de la inmunidad innata son neutrófilos, fagocitos mononucleares y linfocitos citolíticos naturales (NK). Los neutrófilos y los macrófagos expresan receptores superficiales que reconocen microbios en la sangre y tejidos y estimulan la ingestión (fagocitosis, por ejemplo, manosa o receptores de opsonina) o activan fagocitos no implicados en la ingestión (por ejemplo, receptores de tipo Toll, TLR). Los mecanismos efectores de la inmunidad
30 innata a menudo se usan para eliminar microbios, incluso en una respuesta inmune adaptativa. Por lo tanto, la respuesta inmune innata puede proporcionar señales que funcionan conjuntamente con antígenos para estimular la proliferación y diferenciación de los linfocitos T y B específicos de antígeno (adaptativo).

Una respuesta inmune eficaz depende de la comunicación entre las respuestas inmune innata y adaptativa. El linfocito T es importante para coordinar la respuesta inmune adaptativa controlando la liberación de moléculas efectoras. Por ejemplo, las células auxiliares T1 (Th) producen interleucina-2 (IL-2), el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), e interferón gamma (IFN- γ), que son importantes para el desarrollo de la inmunidad mediada por células (Mosmann y col., J. Immunol. 136: 2348, 1986; Street y Mosmann, FASEB J. 5: 171, 1991). En cambio, las células Th2 producen IL-4, IL-13, IL-5, IL-9, IL-6 e IL-10, que son importantes para la estimulación de la producción de IgE, mastocitosis y eosinofilia mucosa (Mosmann y col., Street y Mosmann). Aunque un cambio hacia un fenotipo Th1 o Th2 puede ser
40 importante para la defensa contra patógenos, un cambio en una dirección u otra también puede asociarse con la inducción de enfermedades autoinmunes (Th1) o enfermedades inflamatorias (Th2).

En las enfermedades inflamatorias, tales como alergia o asma, el equilibrio preciso entre las respuestas de citocinas reguladoras Th1, Th2 y T parece cambiar hacia un fenotipo Th2. Por ejemplo, el asma es una enfermedad pulmonar inflamatoria compleja caracterizada por la obstrucción variable del flujo del aire, hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR) e inflamación de las vías respiratorias. Aunque el asma es de origen multifactorial, se considera que el proceso inflamatorio (denominado asma extrínseco o alérgico, en la forma más común de asma) es el resultado de una respuesta inmune anómala contra alérgenos comúnmente inhalados. La presentación de los alérgenos inhalados a las células T CD4+ en los pulmones de individuos susceptibles da como resultado la producción de citocinas Th2, IL-4, IL-13 IL-5, que controlan la diferenciación, reclutamiento y activación de mastocitos y eosinófilos en la mucosa de las vías respiratorias. Estas células efectoras liberan una diversidad de mediadores inflamatorios (por ejemplo, histamina, secretagogos mucosos, proteínas básicas derivadas de eosinófilos, proteasas). Los mediadores ya sea individual o conjuntamente causan broncoconstricción aguda, rotura de la capa epitelial de las vías respiratorias, modificaciones en el control neural del tono de las vías respiratorias, producción de moco aumentada y masa celular del músculo liso aumentada. Cada una de estas consecuencias del proceso inflamatorio puede causar o producirse en
55 combinación con la hipersensibilidad de las vías respiratorias AHR. La incidencia, morbilidad y mortalidad del asma ha

aumentado en todo el mundo durante las dos últimas décadas y las medicaciones anti-inflamatorias existentes (tales como corticoides) tienen limitaciones ya que la enfermedad no se modifica (es decir, únicamente se tratan los síntomas, que volverán a presentarse si la medicación es discontinuada) y estas medicaciones están asociadas con posibles efectos secundarios significativos.

- 5 Mallet y col., (Infection and Immunity, American Society for Microbiology, 63(6), 1995, págs. 2382-2386) desvelan la inmunización con una composición de vacuna de proteosomas de *Neisseria meningitidis* combinados con lipopolisacáridos de *S. sonnei* o *S. flexneri*.

10 Por tanto, existe una necesidad para identificar y desarrollar composiciones inmunoestimuladoras que sean terapéuticamente eficaces contra infecciones microbianas y respuestas inmunopatológicas (por ejemplo, inflamatorias) contra dichas infecciones, particularmente composiciones que puedan potenciar o aumentar la inmunidad protectora y composiciones que puedan suprimir una respuesta inmunopatológica. La presente invención reúne dichas necesidades y proporciona adicionalmente otras ventajas asociadas.

Breve resumen de la invención

15 La invención proporciona una composición inmunoestimuladora que comprende Proteosomas y un lipopolisacárido para su uso en el tratamiento y en la prevención de una infección viral provocando una respuesta inmune innata en la que los Proteosomas se obtienen de especies de *Neisseria*.

20 La invención también proporciona una composición que comprende (a) una composición inmunoestimuladora que comprende Proteosomas y un liposacárido y (b) una composición inmunogénica que comprende Proteosomas, un liposacárido y un antígeno microbiano; como una preparación combinada para su uso simultáneo o secuencial en la terapia o prevención de una infección viral, en la que la composición inmunomoduladora (a) provoca una respuesta inmune innata y la composición inmunogénica (b) provoca una respuesta inmune adaptativa, en la que los Proteosomas se obtienen de especies de *Neisseria*.

25 En una realización de la divulgación se proporciona un procedimiento para provocar una respuesta inmune no específica, que comprende administrar a un sujeto una composición inmunoestimuladora en una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmune no específica, en el que la composición inmunoestimuladora comprende proteosomas y liposacáridos. En una realización, la respuesta inmune no específica es una respuesta inmune innata que previene o trata una infección microbiana, en el que la infección microbiana es una infección viral, parasitaria, fúngica o bacteriana. En una realización particular, la infección microbiana es una infección viral, en la que la infección viral es una infección por gripe. En una realización, la composición inmunoestimuladora se administra mediante una

30 vía seleccionada al menos entre una de la vía mucosa, enteral, parenteral, transdérmica, transmucosa, nasal y por inhalación. En una realización, el contenido final del liposacárido por peso como un porcentaje de proteína del Proteosoma varía de aproximadamente el 1 % al 500 %. En determinadas realizaciones, los proteosomas y liposacáridos se obtienen a partir de la misma especie bacteriana Gram-negativa o los proteosomas se obtienen a partir de una primera especie bacteriana Gram-negativa y el liposacárido se obtiene a partir de una segunda especie bacteriana Gram-negativa. En una realización particular, el liposacárido se obtiene a partir de una bacteria Gram-negativa seleccionada de al menos una de las especies de *Shigella*, especies de *Chlamydia*, especies de *Yersinia*, especies de *Pseudomonas*, especies de *Plesiomonas*, especies de *Escherichia*, especies de *Porphyromonas*, y especies de *Salmonella*. En una realización particular, los proteosomas se obtienen a partir de especies de *Neisseria* y en otra realización particular, los proteosomas se obtienen a partir de *Neisseria meningitidis* y el liposacárido se obtiene a partir de *Shigella flexneri*.

40

En otra realización, el procedimiento descrito comprende adicionalmente administrar al sujeto una composición inmunogénica después de administrar la composición inmunoestimuladora, en el que la composición inmunogénica comprende proteosomas, un liposacárido y un antígeno microbiano, en el que el antígeno microbiano es un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico o un antígeno parasitario. En una realización particular, el antígeno microbiano es recombinante. En otras realizaciones, el antígeno microbiano es un antígeno bacteriano obtenido de *Bacillus anthracis*, *Chlamydia trachomatis*, *Yersinia pestis* o *Escherichia coli* enteropatógena. En una realización particular, el antígeno bacteriano es un Antígeno Protector de *Bacillus anthracis*. En otra realización particular, el agente microbiano es un antígeno viral fragmentado, en el que el antígeno viral fragmentado es un antígeno fragmentado de la gripe. En determinadas realizaciones, la composición inmunogénica comprende al menos dos agentes microbianos, que pueden obtenerse a partir del mismo microorganismo, que es un virus, bacteria, hongo o protozoo o puede obtenerse a partir de diferentes microorganismos. La composición inmunogénica provoca una respuesta inmune adaptativa de acuerdo con determinadas realizaciones. De acuerdo con realizaciones particulares, la proporción en peso de proteosomas y liposacárido de la composición inmunogénica con respecto al peso del antígeno microbiano de la composición inmunogénica está en el intervalo de 4:1 a 1:4; 1:1 a 1:500 ó 1:1 a 1:200. En otras realizaciones, la

45

50

55 composición inmunogénica se administra aproximadamente de uno a aproximadamente diez días o aproximadamente de uno a once días después de la composición inmunoestimuladora y en otras determinadas realizaciones, al menos

una de la composición inmunoestimuladora y la composición inmunogénica comprende adicionalmente un transportador farmacéuticamente aceptable.

La divulgación también proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una infección microbiana, que comprende (a) administrar a un sujeto una composición inmunoestimuladora, en el que la composición inmunoestimuladora comprende proteosomas y liposacárido, en una cantidad y en condiciones suficientes para provocar una respuesta inmune innata y (b) administrar al sujeto una composición inmunogénica, en el que la composición inmunogénica comprende proteosomas, liposacárido y un agente microbiano, en una cantidad y en condiciones suficientes para provocar una respuesta inmune adaptativa, de manera que la infección microbiana se trata o se previene, en el que la infección microbiana es una infección viral, parasitaria, fúngica o bacteriana. En una realización particular, la infección microbiana es una infección viral, en el que la infección viral es una infección por gripe. En una realización particular, la composición inmunoestimuladora se administra aproximadamente de uno a aproximadamente diez días antes de la composición inmunogénica. En una realización, cada una de las composiciones inmunoestimuladora y la composición inmunogénica se administra mediante una vía seleccionada de al menos una vía mucosa, enteral, parenteral, transdérmica, transmucosa, nasal y por inhalación y en una realización particular las composiciones se administran por vía nasal. De acuerdo con una realización, el contenido final del liposacárido en peso como un porcentaje de proteína del proteosoma varía de aproximadamente el 1 % al 500 % en cada una de las composiciones inmunoestimuladora e inmunogénica. En realizaciones particulares, los proteosomas y liposacárido de la composición inmunoestimuladora se obtienen a partir de la misma especie bacteriana Gram-negativa o los proteosomas y liposacárido de la composición inmunoestimuladora se obtienen a partir de diferentes especies bacterianas Gram-negativa. En otra realización particular, los proteosomas y liposacárido de la composición inmunogénica se obtienen a partir de la misma especie bacteriana Gram-negativa o los proteosomas y liposacárido de la composición inmunogénica se obtienen a partir de diferentes especies bacterianas Gram-negativas. En otras realizaciones particulares, los proteosomas de las composiciones inmunoestimuladora e inmunogénica se obtienen de especies de *Neisseria* y al menos uno de los liposacáridos de las composiciones inmunoestimuladora e inmunogénica se obtienen de al menos una de las especies de *Shigella*, especies de *Chlamydia*, especies de *Yersinia*, especies de *Pseudomonas*, especies de *Plesiomonas*, especies de *Escherichia*, especies de *Porphyromonas* y especies de *Salmonella*. En otra realización específica, los proteosomas de cada una de las composiciones inmunoestimuladora e inmunogénica se obtienen de *Neisseria meningitidis* y el liposacárido de cada una de las composiciones inmunoestimuladora e inmunogénica es de *Sihella flexneri*. El antígeno microbiano es un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico o un antígeno parasitario. En una realización particular, el antígeno microbiano de la composición inmunogénica es recombinante. En otras realizaciones, el antígeno microbiano es un antígeno bacteriano obtenido de *Bacillus anthracis*, *Chlamydia trachomatis*, *Yersinia pestis* o *Escherichia coli* enteropatógena. En una realización particular, el antígeno bacteriano es un Antígeno Protector de *Bacillus anthracis*. En otra realización particular, el antígeno microbiano es un antígeno viral fragmentado, en el que el antígeno viral fragmentado es un antígeno fragmentado de la gripe. En determinadas realizaciones, la composición inmunogénica comprende al menos dos agentes microbianos, que pueden obtenerse a partir del mismo microorganismo, que es un virus, bacteria, hongo o protozoo o puede obtenerse a partir de diferentes microorganismos. La composición inmunogénica provoca una respuesta inmune adaptativa de acuerdo con determinadas realizaciones. De acuerdo con realizaciones particulares, la proporción del peso de Proteosomas y liposacárido de la composición inmunogénica con respecto al peso del antígeno microbiano de la composición inmunogénica está dentro del intervalo de 4:1 a 1:4; 1:1 a 1:500 ó 1:1 a 1:200. En otras realizaciones, la composición inmunogénica se administra de aproximadamente uno a siete días o de aproximadamente uno a aproximadamente diez días después de la composición inmunoestimuladora y en otras determinadas realizaciones, al menos una de la composición inmunoestimuladora y la composición inmunogénica comprende adicionalmente un transportador farmacéuticamente aceptable.

También se desvela un procedimiento para modificar una respuesta inmune inflamatoria, que comprende administrar a un sujeto una composición inmunomoduladora en una cantidad suficiente para modificar una respuesta inmune inflamatoria, en el que la composición inmunomoduladora comprende proteosomas y un liposacárido, en el que la composición inmunomoduladora se administra mediante una vía seleccionada de al menos una vía mucosa, enteral, parenteral, transdérmica, transmucosa, nasal y por inhalación. En una realización particular, el contenido final en peso del liposacárido como un porcentaje de proteína del proteosoma varía de aproximadamente el 1 % al 500 %. En una realización determinada, los proteosomas y liposacárido se obtienen a partir de la misma especie de bacterias Gram-negativas y en otra realización determinada, los proteosomas y liposacárido se obtienen a partir de diferentes especies de bacterias Gram-negativas. Las especies bacterianas Gram-negativas, de acuerdo con determinadas realizaciones, se seleccionan de al menos una de las especies de *Shigella*, especies de *Chlamydia*, especies de *Yersinia*, especies de *Pseudomonas*, especies de *Plesiomonas*, especies de *Escherichia*, *Porphyromonas sp.*, y especies de *Salmonella*. En una realización particular, los proteosomas se obtienen de especies de *Neisseria*. En otra realización particular, los proteosomas se obtienen de *Neisseria meningitidis* y el liposacárido se obtiene de *Sheigella flexneri*.

En una realización, el procedimiento desvelado para modificar una respuesta inmune inflamatoria comprende administrar a un sujeto una composición inmunomoduladora en una cantidad suficiente para modificar una respuesta

inmune inflamatoria, en el que la composición inmunomoduladora comprende proteosomas y un liposacárido que comprende adicionalmente administrar a un sujeto una composición inmunogénica después de administrar la composición inmunomoduladora, en el que la composición inmunogénica comprende proteosomas, un liposacárido y un antígeno. En una realización determinada, la composición inmunogénica comprende al menos un antígeno microbiano, en el que el al menos un antígeno microbiano es viral, bacteriano, fúngico o parasitario. De acuerdo con realizaciones particulares, la proporción en peso de los proteosomas y liposacárido de la composición inmunogénica con respecto al peso del antígeno microbiano de la composición inmunogénica está dentro de un intervalo de 4:1 a 1:4, 1:1 a 1:500 ó 1:1 a 1:200. En una realización particular, el antígeno de la composición inmunogénica es recombinante. En otra realización, el antígeno de la composición inmunogénica es bacteriano, en el que el antígeno bacteriano se obtiene de *Bacillus anthracis*, *Chlamydia trachomatis*, *Yersinia pestis* o *Escherichia coli* enteropatógena. En una realización determinada, el antígeno bacteriano es un Antígeno Protector de *Bacillus anthracis*. En otra realización determinada, el antígeno de la composición inmunogénica es un antígeno viral fragmentado y en una realización particular, el antígeno viral fragmentado es un antígeno fragmentado de gripe. En otra realización, la composición inmunogénica se administra aproximadamente de uno a aproximadamente diez días después de la composición inmunomoduladora y en otra realización particular, la composición inmunogénica provoca una respuesta inmune adaptativa. En determinadas realizaciones particulares, la respuesta inmune inflamatoria es asma o una reacción alérgica. De acuerdo con una realización particular, al menos una de la composición inmunomoduladora y la composición inmunogénica comprende adicionalmente un transportador farmacéuticamente aceptable.

También se desvela un procedimiento para tratar o prevenir una reacción alérgica, que comprende (a) administrar a un sujeto que lo necesita una composición inmunomoduladora, en el que la composición inmunomoduladora comprende proteosomas y un liposacárido, en una cantidad y en condiciones suficientes para modificar una respuesta inmune inflamatoria y (b) administrar al sujeto una composición inmunogénica, en el que la composición inmunogénica comprende proteosomas, liposacárido y un alérgeno, en una cantidad y en condiciones suficientes para provocar tolerancia al alérgeno, de manera que la reacción alérgica se trata o se previene, en el que cada una de la composición inmunomoduladora o la composición inmunogénica se administra mediante una vía seleccionada de al menos una vía mucosa, enteral, sublingual, parenteral, transdérmica, transmucosa, nasal y por inhalación. En una realización particular, la composición inmunomoduladora se administran aproximadamente de uno a aproximadamente diez días antes de la composición inmunogénica. En una realización particular, el contenido final en peso del liposacárido como un porcentaje de proteína de proteosoma varía de aproximadamente el 1 % al 500 % en cada una de las composiciones inmunomoduladora e inmunogénica. En una realización, los proteosomas y liposacárido de la composición inmunomoduladora se obtienen a partir de la misma especie bacteriana Gram-negativa y en otra realización, los proteosomas y liposacárido de la composición inmunomoduladora se obtienen a partir de diferentes especies bacterianas Gram-negativas. En otra realización particular, los proteosomas y liposacárido de la composición inmunogénica se obtienen a partir de la misma especie bacteriana Gram-negativa y aun en otra realización particular, los proteosomas y liposacárido de la composición inmunogénica se obtienen a partir de diferentes especies bacterianas Gram-negativas. En una realización particular, los proteosomas de cada una de las composiciones inmunomoduladora e inmunogénica se obtienen de especies de *Neisseria* y el liposacárido de al menos una de la composición inmunomoduladora y la composición inmunogénica se obtiene de al menos una de las especies de *Shigella*, especies de *Chlamydia*, especies de *Yersinia*, especies de *Pseudomonas*, especies de *Plesiomonas*, especies de *Escherichia*, especies de *Porphyromonas* y especies de *Salmonella*. En una realización particular determinada, los proteosomas de cada una de las composiciones inmunomoduladora e inmunogénica se obtienen de *Neisseria meningitidis* y el liposacárido de cada una de las composiciones inmunomoduladora e inmunogénica se obtiene a partir de *Sigella flexneri*. En otra realización, la composición inmunogénica comprende adicionalmente al menos dos alérgenos. En otra realización, el alérgeno es un antígeno microbiano. En realizaciones determinadas, la proporción en peso de proteosomas y liposacárido de la composición inmunogénica con respecto al peso del alérgeno de la composición inmunogénica está dentro del intervalo de 4:1 a 1:4, dentro de un intervalo de 1:1 a 1:500 ó dentro de un intervalo de 1:1 a 1:200. En realizaciones determinadas particulares, el alérgeno de la composición inmunogénica es recombinante y en otras realizaciones, el alérgeno es un antígeno bacteriano. En otra realización más, el alérgeno de la composición inmunogénica se selecciona al menos de una partícula inhalada, polen, vapor, gas, alimentos, bebidas, fármacos, toxinas, agentes microbianos, productos de descamación, compuestos derivados de animales, heces de ácaros del polvo, polipéptidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. En una realización particular, el alérgeno es polen de abedul. En otra realización, la composición inmunogénica se administra aproximadamente de uno a aproximadamente siete días o de aproximadamente uno a aproximadamente 10 días después de la composición inmunomoduladora. En otra realización, la reacción alérgica es al menos una de asma, alveolitis alérgica, aspergilosis alérgica broncopulmonar, conjuntivitis alérgica, coriza alérgica, dermatitis alérgica, vasculitis alérgica y rinitis alérgica. En una realización particular, al menos una de la composición inmunomoduladora y la composición inmunogénica comprende adicionalmente un transportador farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento también se desvela un procedimiento para tratar o prevenir una infección microbiana que comprende administrar a un sujeto una composición inmunoestimuladora en una cantidad suficiente para provocar una respuesta innata inmune en el que la composición inmunoestimuladora comprende proteosomas y liposacárido y en el

que la infección microbiana es una infección viral, bacteriana, parasitaria o fúngica. En una realización particular, la infección microbiana es una infección bacteriana, en el que la infección bacteriana es una infección por *Chlamydia trachomatis*. En otra realización, la infección microbiana es una infección viral, en el que la infección viral es una infección por gripe. En realizaciones determinadas, la composición inmunoestimuladora se administra mediante una vía seleccionada de al menos una de la vía mucosa, enteral, parenteral, transdérmica, transmucosa, nasal y por inhalación. En una realización, el contenido final en peso del liposacárido como un porcentaje de proteína de proteosoma varía de aproximadamente el 1 % al 500 %. En otras realizaciones, los proteosomas y liposacárido se obtienen a partir de la misma especie bacteriana Gram-negativa y en otra realización, los proteosomas se obtienen a partir de una primera especie bacteriana Gram-negativa y el liposacárido se obtiene a partir de una segunda especie bacteriana Gram-negativa. En determinadas realizaciones, el liposacárido se obtiene a partir de una bacteria Gram-negativa seleccionada de al menos una de las especies de *Shigella*, especies de *Chlamydia*, especies de *Yersinia*, especie de *Pseudomonas*, especies de *Plesiomonas*, especies de *Escherichia*, especies de *Porphyromonas* y *Salmonella*. En una realización particular, los proteosomas se obtienen a partir de especies de *Neisseria* y en otra realización particular, los proteosomas se obtienen de *Neisseria meningitidis*, y el liposacárido se obtiene de *Shigella flexneri*.

En una realización particular, se desvela un procedimiento para tratar o prevenir una infección por el virus de la gripe que comprende administrar a un sujeto una composición inmunoestimuladora en una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmune innata en el que la composición inmunoestimuladora comprende proteosomas y liposacárido, en el que los proteosomas se obtienen de *Neisseria meningitidis*, y el liposacárido se obtiene de *Shigella flexneri*.

Éstos y otros aspectos de la presente invención resultaran evidentes con respecto a la siguiente descripción detallada y a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A y 1B muestran dos procedimientos para fabricar material de Proteosoma a granel (Diagrama de Flujo 1A y Diagrama de Flujo 1B, respectivamente).

La Figura 2 representa un esquema para la fabricación de LPS de *Shigella Flexneri* 2a (Diagrama de Flujo 2).

La Figura 3 presenta un esquema para la fabricación del adyuvante Proteosoma IVX-908-LPS, que también se denomina Protollin™ (Diagrama de Flujo 3).

Las Figuras 4A-4C muestran titulaciones de IgG en suero, IgA en pulmón e IgG en pulmón, respectivamente, de ratones inmunizados dos veces por vía intranasal con 50 µg, 20 µg ó 5 µg de F1-V con Protollin (2,5, 1, ó 0,25 µg) o sin Protollin, o inyectado intramuscularmente con 20 µg de F1-V adsorbido sobre alumbre (Alhydrogel®). La mitad de los ratones se sacrificaron el día 35 después de la primera inmunización y el resto se sacrificó el día 55. Las titulaciones se expresan como la media geométrica de las concentraciones específicas de anticuerpos (µg/ml para IgG en suero, ng/ml para IgA e IgG en pulmón); se muestran los límites de confianza al 95 %.

Las Figuras 5A-5D muestran la supervivencia de los ratones después de la exposición con dosis letales de *Yersinia pestis* aerosolizada. Los ratones se inmunizaron dos veces con 20 µg de F1-V por vía intranasal con o sin Protollin o con 20 µg de F1-V por vía intramuscular adsorbido sobre Alhydrogel® y después se expusieron a una exposición total del cuerpo a una DL₅₀ de 169 de *Y. pestis* 35 días (Figura 5A) o 55 días (Figura 5B) después de la primera inmunización. En un segundo estudio, los ratones inmunizados con 50 µg de F1-V por vía intranasal con o sin 1 µg de Protollin o intramuscularmente adsorbido sobre Alhydrogel®, se expusieron a una exposición total del cuerpo a una DL₅₀ de 254 de *Y. pestis* 55 días después de la primera inmunización (Figura 5C). La Figura 5D muestra la supervivencia de los ratones contra la exposición el día 35 ó el día 55 con una DL₅₀ de 169 de *Y. pestis* aerosolizada. Los ratones se inmunizaron dos veces con 5 µg de F1-V por vía intranasal con Protollin a 2,5 µg, 1 µg ó 0,25 µg o sin Protollin. En todos los estudios, los animales en el grupo de control recibieron únicamente Protollin y murieron cuando se expusieron a *Y. pestis*.

La Figura 6A muestra los niveles de IgG en suero y la Figura 6B muestra los niveles de IgA en pulmón en ratones inmunizados por vía nasal los días 0 y 14 con 5 ó 25 µg de Antígeno Protector recombinante (APr) de *Bacillus anthracis* mezclado con Protollin (1 µg) o sin Protollin.

Las Figuras 7A y 7B ilustran la neutralización de la destrucción de macrófagos mediada por AP (Antígeno Protector) en suero y líquido de lavado pulmonar, respectivamente, obtenido de ratones que se inmunizaron con APr mezclado con Protollin (AP+ Protollin); sólo APr (AP); o APr administrado intramuscularmente (AP (IM)) (en la Fig.7B, la leyenda define los símbolos usados en la Fig. 7A y 7B).

La Figura 8A muestra la mortalidad y la Figura 8B ilustra la morbilidad (cambio del peso en porcentaje) de ratones que se inmunizaron con Protollin 1 día (d-1), 2 días (d-2) ó 3 días (d-3) antes de la exposición por administración por inhalación del virus de la gripe A/H3 adaptado para ratón. En la Figura 8B, IVX = Protollin.

Descripción detallada de la invención

El Protollin™ es un adyuvante de membrana externa (ME) - liposacárido (LPS) que incluye una preparación de proteínas de membrana externa denominada Proteosoma (o Proteosomas) (también denominado Proyuvant)

preparada a partir de bacterias Gram-negativas tales como *Neisseria meningitidis* y uno o más liposacáridos. Como se describe en el presente documento, el Protollin puede usarse para provocar una potente respuesta inmune innata que proporciona protección contra organismos patógenos. Por lo tanto, la presente invención se refiere generalmente al sorprendente descubrimiento de que una composición inmunoestimuladora que comprende Protollin puede estimular un amplio espectro de respuestas inmunes no específicas, independiente de antígenos, que puede proteger contra una amplia diversidad de agentes infecciosos que incluyen bacterias, virus, hongos y protozoos. Además, el Protollin puede usarse para modular o modificar una respuesta inmune perjudicial minimizando lesiones a partir de una respuesta inflamatoria excesivamente fuerte. Por lo tanto, la presente invención también se relaciona con el descubrimiento inesperado de que una composición inmunomoduladora que comprende Protollin puede usarse para suprimir una respuesta inflamatoria, tal como hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR) o para modificar una respuesta inmune, minimizando por lo tanto una respuesta inflamatoria perjudicial (por ejemplo, cambiando una respuesta Th2 hacia un fenotipo Th1). En el presente documento se describen con más detalle composiciones inmunoestimuladoras e inmunomoduladoras que comprenden Proteosoma:LPS o Proteosomas así como composiciones inmunogénicas que comprenden Proteosoma:LPS o Proteosomas formuladas con uno o más agentes microbianos. En determinadas realizaciones, las composiciones son adecuadas para usos terapéuticos tales como para tratar o prevenir una infección microbiana induciendo una respuesta inmune específica, una respuesta inmune no específica o ambos tipos de respuestas. En otras realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son adecuadas para el tratamiento o prevención de una respuesta inmune inflamatoria, tal como asma alérgica o complicaciones asociadas tales como AHR. La presente descripción también proporciona procedimientos para preparar cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento.

Un Proteosoma o Proyuvante se refiere a una preparación de proteínas de membrana externa (PME, conocidas también como porinas) de bacterias Gram-negativas, tales como especies de *Neisseria* (véase, por ejemplo Lowell y col., J. Exp. Med. 167:658, 1988; Lowell y col., Science 240:800, 1988; Lynch y col., Biophys. J. 45:104, 1984; Lowell, en "New Generation Vaccines" 2ª ed., Marcel Dekker, Inc., New York, Basil, Hong Kong, pág. 193 (1997); Patente de Estados Unidos N° 5.726.292; Patente de Estados Unidos N° 4.707.543), que es útil como un transportador o un adyuvante para inmunógenos, tales como uno o más antígenos bacterianos o virales. Los Proteosomas son hidrófobos y comparables en tamaño a determinados virus y son seguros para su uso en seres humanos. Los Proteosomas tienen la capacidad de auto-ensamblarse dentro de grupos de PME vesiculares o de tipo vesicular de 20-800 nm e incorporarse no-covalentemente, combinarse, asociarse o interactuar (por ejemplo, electrostáticamente o hidrofóticamente) o cooperar de otra manera con antígenos de proteínas (Ags), particularmente antígenos que tienen un resto hidrófobo. Un Proteosoma incluye el producto de cualquier procedimiento de preparación que proporcione un componente de proteína de membrana externa en forma vesicular o de tipo vesicular, incluyendo estructuras membranosas multimoleculares o composiciones PME de tipo globular líquidas de una o más de las PME. Los Proteosomas pueden prepararse fácilmente como se describe en el presente documento (véanse los diagramas de flujo de las Figuras 1A y 1B) y en la técnica (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.726.292 ó N° 5.985.284).

Los liposacáridos se refieren a lipopolisacáridos o lipooligosacáridos (colectivamente, denominados también "LPS") nativos o modificados (aislados de un organismo o preparados sintéticamente con una estructura nativa) derivados de bacterias Gram-negativas. Por ejemplo, un liposacárido puede aislarse de o producirse sintéticamente para tener la misma estructura en carbohidratos que una forma de liposacárido de *Shigella flexneri* o *Plesiomonas shigelloides*, u otras bacterias Gram-negativas (incluyendo especies de los géneros *Alcaligenes*, *Bacteroides*, *Bordetella*, *Borrellia*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Ehrlichia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Gardnerella*, *Hemophilus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Leptospira* (incluyendo *Leptospira interrogans*), *Moraxella*, *Morganella*, *Neisseria*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Providencia*, otras *Plesiomonas*, *Porphyromonas* (incluyendo *Porphyromonas gingivalis*), *Prevotella*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Serratia*, otras *Shigella*, *Spirillum*, *Veillonella*, *Vibrio*, o especies de *Yersinia*). El liposacárido puede estar en una forma destoxificada (es decir, que tiene el lípido A o el núcleo del lípido A eliminado) o puede estar en una forma que no se haya destoxificado. En la presente divulgación, el liposacárido no necesita estar y preferentemente no está destoxificado. Por ejemplo, en las composiciones descritas en el presente documento puede usarse un LPS que contenga especies múltiples de lípido A tales como *P. gingivalis* (véase, por ejemplo, Darveau y col., Infect. Immun. 72:5041-51 (2004)). El liposacárido puede prepararse, por ejemplo, como se describe en el diagrama de flujo de la Figura 2.

Una mezcla de Proteosoma:LPS o ProtollinTM (también conocida como IVX o IVX908) descrita en el presente documento es una preparación de Proteosomas (Proyuvante) mezclada como se describe en el presente documento al menos con un tipo de liposacárido para proporcionar una composición PME-LPS, que puede usarse como una composición inmunoestimuladora. Por lo tanto, el adyuvante PME-LPS o Protollin incluye una preparación de proteínas de membrana externa de Proteosomas preparada a partir de bacterias Gram-negativas, tales como *Neisseria sp.* (por ejemplo, *Neisseria meningitidis*) y una preparación de uno o más liposacáridos. El Protollin también puede incluir uno o más lípidos, glucolípidos, glucoproteínas, pequeñas moléculas o similar. El Protollin puede prepararse, por ejemplo, como se describe en el diagrama de flujo de la Figura 3 (véase también, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de

Patente de Estados Unidos N° 2003/0044425).

El proyuvante se usa generalmente junto con antígenos (antígenos naturales, aislados o antígenos modificados) que poseen un resto hidrófobo (denominado también pie hidrófobo). El Protollin (con LPS añadido exógenamente) puede asociarse con un antígeno que contenga un pie hidrófobo o puede usarse con un antígeno (o antígenos) que sea hidrófilo y no contenga un dominio de pie hidrófobo.

La presente descripción proporciona generalmente composiciones inmunoestimuladoras que pueden incluir un Proteosoma formulado adicionalmente con un liposacárido (Protollin). Por ejemplo, una composición de Protollin puede usarse para estimular una respuesta inmune protectora independiente de antígeno, no específica. Además, la composición inmunoestimuladora puede usarse en combinación con una composición inmunogénica para promover inicialmente (es decir, estimular, provocar o potenciar) una respuesta inmune no específica y posteriormente o de manera simultánea estimular o provocar una respuesta inmune adaptativa.

Como introducción y sin desear ligarse a teoría alguna, el sistema inmune se diseña para detectar y eliminar patógenos invasores discriminando entre auto-patógenos y no auto-patógenos. En mamíferos, se considera que el sistema inmune tiene dos ramificaciones; una se refiere a una inmunidad innata y la otra a la inmunidad adaptativa. La inducción de las respuestas inmunes innatas puede contribuir significativamente a la defensa inmune global (Medzhitov y Janeway, Trends in Microbiol. 8:452, 2000). La inmunidad innata puede proporcionar una primera línea de defensa, no específica, para limitar la infección inmediatamente después de la exposición y también "interconectar" con el sistema de respuesta inmune adaptativa estimulando las respuestas clonales (Hoffmann y col., Science 284:1313, 1999). Por lo tanto, una respuesta inmune no específica o innata se refiere a una respuesta inmune independiente de anticuerpos o independiente de antígenos contra patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP) (véase, por ejemplo, Medzhitov y Janeway, anteriormente), tales como los efectos específicos mediados por un sistema inmune innato en mamíferos. Por ejemplo, la interacción de los PMAP con receptores de tipo Toll (TLR) que están presentes en las células presentadoras de antígenos (CPA) fagocíticas inducen la liberación de citocinas pro-inflamatorias (por ejemplo, IFN- γ , TNF- α e IL-12) y la regulación positiva de moléculas co-estimuladoras, que a su vez pueden estimular la inmunidad adaptativa.

Una composición inmunoestimuladora como se describe en el presente documento puede ser cualquiera de una o más de una proteína, péptido, carbohidrato, lípido, ácido nucleico, compuesto químico y otra molécula o composición de la misma, que puede cebar, potenciar, activar, estimular, aumentar, reforzar, amplificar o mejorar una respuesta inmune innata. Un agente o composición inmunoestimuladora puede mitigar, modificar, tratar o prevenir (por ejemplo, como un agente profiláctico) una afección o enfermedad infecciosa. Debería entenderse que una respuesta inmune no específica potenciada o activada es protectora, incluso proporcionando un amplio espectro de protección en ausencia de, o antes de, o en simultáneo con una respuesta inmune específica dependiente de anticuerpos, dependiente de antígeno. Es decir, una respuesta inmune activada puede proporcionar a un huésped protección contra una infección por una diversidad de microorganismos, que incluyen bacterias, virus, parásitos y hongos. Los ejemplos representativos de agentes o composiciones inmunoestimuladoras, como se describen en el presente documento con más detalle, incluyen, por ejemplo, adyuvantes tales como Proteosomas ("Proyuvante") o Protollin (Proteosomas: liposacárido).

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la inducción de una respuesta inmune mediada por el sistema inmune innato implica patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP) que pueden ejercer efectos no antigénicos, aunque específicos. La interacción de los PMAP con receptores de tipo Toll (TLR, de los que al menos se conocen 10 y se denominan TLR-1, TLR-2, etc.), que están presentes en la superficie celular de las células presentadoras de antígenos (CPA) fagocíticas, por ejemplo, inician una ruta de transducción de señal intracelular, que a su vez induce la liberación de citocinas pro-inflamatorias (por ejemplo IFN- γ , TNF- α e IL-12) y regula positivamente a las moléculas de co-estimuladoras que a su vez pueden estimular la inmunidad adaptativa. Los componentes de la inmunidad innata reconocen estructuras que son características de patógenos microbianos pero que no están presentes en células de mamíferos, que incluyen estructuras únicas de ácidos nucleicos (tales como secuencias de CpG del ADN), carbohidratos complejos (tales como LPS) así como proteínas bacterianas, lipoproteínas y peptidoglicanos. Por ejemplo, el TLR-2 reconoce a las proteínas de porina Neisseriales (por ejemplo, porina A, porina B que se usan para preparar Proteosomas) y el TLR-4 reconoce al LPS (que es un componente del Protollin) de las bacterias Gram-negativas. El Proteosoma (Proyuvante) y los adyuvantes del Protollin pueden usarse para estimular una respuesta innata inmune. Además, a través de la unión de los dos componentes del Protollin (proteína y liposacárido) con los TLR en las CPA, el Protollin puede iniciar una cadena de eventos que conduce a la inducción tanto de la inmunidad innata como adaptativa. Además para la activación del receptor del tipo Toll de inmunidad innata, el Protollin puede activar otros componentes del sistema inmune o funciones inmunes. Se entiende que el LPS puede ser inmunoestimulador a través de interacciones con receptores TLR-4 presentes en la superficie celular de determinadas células del sistema inmune; por lo tanto, una respuesta inmune estimulada o provocada por Proteosomas (Proyuvante) y una respuesta inmune estimulada o provocada por Protollin puede diferenciarse cualitativa o cuantitativamente de manera estadísticamente significativa ya que se correlaciona con la proporción de PME con respecto a LPS en Protollin. Las composiciones de Protollin descritas en el presente documento también pueden incluir un LPS que puede

interaccionar con más de un receptor de tipo Toll tal como el LPS obtenido de *Porphyromonas gingivales* (véase, por ejemplo, Darveau y col., *Infect. Immun.* 72:5041-51 (2004)).

5 Una respuesta inmune adaptativa (es decir, específica o adquirida) incluye resistencia contra un agente infeccioso o un antígeno que está mediado por el sistema inmune y que da como resultado la exposición previa al agente infeccioso o antígeno. Por ejemplo, la inmunidad específica puede ser un resultado de una infección adquirida naturalmente (patente o latente) o de una vacunación intencionada. Además, la inmunidad específica puede adquirirse pasiva o transitoriamente a partir de la transferencia natural de anticuerpos de otros (por ejemplo, heredada maternalmente) o de transferencias exógenas de anticuerpos o células inmunes por inoculación intencionada (denominada algunas veces inmunoterapia pasiva).

10 Una composición inmunogénica, como se describe en el presente documento, comprende uno o más compuestos, antígenos, inmunógenos o agentes capaces de cebar, provocar, potenciar, activar, estimular, aumentar, reforzar, amplificar o mejorar una respuesta inmune adaptativa (específica), que puede ser una respuesta celular (células T) o humoral (células B) o una combinación de células T y B. Preferentemente, la respuesta inmune adaptativa será protectora. Un ejemplo representativo de un inmunógeno es un agente microbiano, tal como una o más bacterias, virus, hongos o proteínas parasitarias de interés.

15 Una composición inmunomoduladora como se describe en el presente documento puede comprender adyuvantes de Proteosomas o de Protollin y cualquiera de una o más de una proteína, péptido, compuesto químico u otra molécula o composición de la misma que pueda cambiar (modificando, modulando, ajustando, regulando) (o aumentando (potenciando) o disminuyendo (suprimiendo) de una manera estadísticamente significativa o de una manera clínicamente significativa) una o más funciones inmunes. Un agente o composición inmunomoduladora puede mitigar mejorar, tratar o prevenir (por ejemplo, como un agente profiláctico) una respuesta inflamatoria no deseada o anómala. Una función inmune puede incluir una respuesta celular con un patrón particular de producción de citocinas (por ejemplo, Th1, Th2), una respuesta humoral (por ejemplo, producción de anticuerpos) o una combinación de los mismos, contra un microbio o antígeno particular. Por ejemplo, si un sujeto previamente expuesto a un alérgeno (es decir, sensibilizado) se pone de nuevo en contacto con el alérgeno, el asma alérgica puede desarrollarse debido a una respuesta Th2 caracterizada por una producción aumentada de citocinas de tipo 2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) secretadas por linfocitos T CD4+. Una composición inmunomoduladora como se describe en el presente documento puede modificar la respuesta Th2, por ejemplo, cambiando la respuesta hacia un fenotipo Th1 que es menos perjudicial para las vías respiratorias. Es decir, una respuesta inmune modificada (o modulada) puede proporcionar protección a un huésped contra una infección por una diversidad de microorganismos (incluyendo bacterias, virus, parásitos y hongos) o contra respuestas inflamatorias (por ejemplo, alergia, asma, pólipos nasales) causadas por antígenos.

35 Una reacción alérgica, como se describe en el presente documento, se refiere a una reacción local o general en un sujeto después de ponerse en contacto con un antígeno específico (alérgeno) al cual el sujeto se ha expuesto y sensibilizado previamente. La interacción inmunológica de antígenos endógenos o exógenos con anticuerpos o linfocitos sensibilizados puede dar lugar a inflamación y lesión tisular – en otras palabras, la alergia es una reacción inmune que produce lesiones a los propios tejidos y células, habitualmente mediante reacciones inflamatorias. El asma extrínseca o alérgica (denominada también, en el presente documento, enfermedad reactiva de las vías respiratorias) es una enfermedad inflamatoria de los pulmones caracterizada por una obstrucción generalmente reversible de las vías respiratorias. Las características del asma alérgica incluyen concentraciones elevadas de IgE en suero, eosinofilia pulmonar, hipersensibilidad de las vías respiratorias, producción excesiva de mucosidad en las vías respiratorias y remodelación de las vías respiratorias caracterizada por la deposición de colágeno peribronquiolar y aumento de la masa del músculo liso de las vías respiratorias. Otras reacciones alérgicas o afecciones inflamatorias ejemplares incluyen alveolitis alérgica, aspergilosis alérgica broncopulmonar, dermatitis alérgica, eczema, conjuntivitis alérgica, coriza alérgica, vasculitis alérgica, rinosinusitis y rinitis alérgica.

45 La hipersensibilidad se refiere a una respuesta o afección anómala en la que un agente extraño provoca una respuesta inmune exagerada. Por ejemplo, el asma alérgica puede ser resultado de una exposición repetida a alérgenos transportados por el aire que desencadenan respuestas inmunológicas perjudiciales, tales como inflamación persistente en la pared bronquial, que puede dar como resultado cambios estructurales y funcionales en el sistema respiratorio. Después de que los sujetos sensibilizados inhalen el alérgeno (es decir, aquellos sujetos que ya se han expuesto al alérgeno), la respuesta inmune es dependiente de linfocitos T CD4+ que se desvían hacia un fenotipo T2 auxiliar (Th). Las citocinas Th2, por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 son importantes en la patogénesis asmática. Por ejemplo, IL-4 conduce la respuesta auxiliar T a favor de Th2, dando como resultado la producción potenciada de IgE; IL-5, que con el factor estimulante de colonias granulocitos - macrófagos (GM-CSF) e IL-3, es importante para la producción de eosinófilos; e IL-13, que es necesario para la hipersensibilidad de las vías respiratorias y la metaplasia mucosa, que son características patofisiológicas aguas abajo que se encuentran estrechamente relacionadas con el asma clínico. Todas estas citocinas, junto con TGF-beta se han implicado en la remodelación de las vías respiratorias. Aunque la función de los eosinófilos en la patología del asma aun no se conoce completamente, el número de eosinófilos en las vías respiratorias está directamente asociado con la gravedad de la enfermedad (véase, por ejemplo,

Lee y col., Science 305:1773 (2004); Humbles y col., Science 305:1776 (2004)). Los cambios estructurales y morfométricos resultantes (remodelación) incluyen fibrosis subepitelial, hiperplasia y metaplasia de las células caliciformes, que dan como resultado consecuencias funcionales tales como pérdida de distensibilidad de las vías respiratorias asmáticas, hiperreactividad bronquial (incluso en ausencia del alérgeno) y una disminución progresiva acelerada del volumen expiratorio forzado a intervalos de tiempo de 1 segundo (VEF₁). Las citocinas Th2 también pueden cebar y activar eosinófilos para liberar agentes proinflamatorios, mediadores lipídicos y otras citocinas que se piensa que contribuyen a la lesión tisular, remodelación e hipersensibilidad observadas.

Como se usa en el presente documento, la tolerancia se refiere a la capacidad para soportar o ser menos sensible frente a un estímulo, especialmente durante un periodo de exposición continuada, tal como frente a un alérgeno. Por ejemplo, la tolerancia inmunológica se refiere a un estado natural o artificialmente inducido de sensibilidad reducida o no sensibilidad frente a un antígeno específico o alérgeno.

En la presente descripción, debe entenderse que cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje, intervalo de proporción u otro intervalo de número entero incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo enumerado y, cuando sea apropiado, fracciones de los mismos (tales como una décima parte y una centésima parte de un número entero), a menos que se indique otra cosa. Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" o "comprende esencialmente" significa \pm el 15 %. El uso de la alternativa (por ejemplo, "o") debe entenderse en el sentido de uno, dos o cualquier combinación de las mismas de las alternativas. Como se usa en el presente documento, el uso de un artículo indefinido, tal como "un" o "una", debe entenderse para referirse al singular y plural de un sustantivo o un sintagma nominal. Además, debe entenderse que las composiciones formulaciones o compuestos individuales o grupos de composiciones, formulaciones o compuestos, derivados de diversos componentes o combinaciones de la composición o secuencias, estructuras y sustituyentes descritos en el presente documento, que desvela la presente solicitud es en el mismo grado como si cada composición o compuesto o grupo de composiciones o compuestos se expusiesen individualmente. Por lo tanto, la selección de secuencias, estructuras o sustituyentes particulares se encuentra dentro del ámbito de la presente invención.

En una realización de la divulgación, una composición inmunomoduladora puede comprender un Proteosoma formulado con un liposacárido, es decir, Protollin. Por ejemplo, una composición de Protollin puede usarse para suprimir o inhibir una respuesta inmune no deseada o para inducir o promover la tolerancia frente a una exposición inmune no deseada (por ejemplo, el cambio de un fenotipo de producción de citocina Th2 a un fenotipo Th1). Además, las composiciones inmunomoduladoras descritas en el presente documento pueden usarse en combinación con una composición inmunogénica para promover inicialmente la supresión de una respuesta inmune no deseada y posteriormente o de manera simultánea, promover la inducción de tolerancia. Como introducción y sin desear ligarse a ninguna teoría, los linfocitos T, en particular las células T CD4+ que producen citocinas Th2 y que han experimentado una expansión anormal, desempeñan una función importante en la patogénesis del asma. En un modelo murino, la administración de agentes tales como IL-12 e IFN- γ u oligodesoxinucleótidos CpG puede inhibir la producción de citocinas Th2 y estimular linfocitos Th1 y/o citocinas para prevenir el desarrollo de la hipersensibilidad de las vías respiratorias inducida por antígenos (AHR) y la inflamación (véase Lack y col., J. Immunol. 157:1432 (1996); Gavett y col., J. Exp. Med. 182: 1527-36 (1995); Kline y col., J. Immunol. 160: 2555 (1998)).

En determinadas realizaciones, las composiciones inmunoestimuladoras descritas en el presente documento son útiles para provocar una respuesta inmune no específica (o innata). Dicha composición inmunoestimuladora puede proporcionar una respuesta protectora no específica que previene o trata una infección microbiana en un huésped o sujeto. La composición inmunoestimuladora descrita en el presente documento también puede usarse para estimular una respuesta inmune innata (no específica) que potencia o mejora una respuesta inmune adaptativa provocada por una vacuna administrada posteriormente, por ejemplo, una composición inmunogénica que comprende Protollin formulada con un antígeno microbiano, tal como el antígeno pesticida F1-V, el Antígeno Protector de *Bacillus anthracis*, o un antígeno bacteriano de *Chlamydia trachomatis*, *E. coli* enteropatógena u otra bacteria patógena.

En determinadas realizaciones de la divulgación, las composiciones inmunoestimuladoras e inmunogénicas pueden administrarse simultáneamente para provocar una respuesta inmune innata potenciando o cebando al mismo tiempo una respuesta inmune adaptativa. En otras realizaciones determinadas, las composiciones inmunomoduladoras e inmunogénicas pueden administrarse simultáneamente para provocar una respuesta inmune modificada potenciando o cebando al mismo tiempo la tolerancia. Como alternativa, el uso a corto plazo de una composición inmunoestimuladora o inmunomoduladora como se describe en el presente documento puede usarse sin tratamiento posterior o simultáneo con una composición inmunogénica. La protección no específica o una respuesta inmune modificada (sin tratamiento posterior o simultáneo con la composición inmunogénica) pueden durar aproximadamente de 1 día a 3 meses o más. Por ejemplo, los animales continúan protegidos de la exposición a *Chlamydia* al menos 11 semanas después del tratamiento con Proteosoma-LPS (Protollin) (véase el Ejemplo 15).

En otras realizaciones de la divulgación, las composiciones inmunomoduladoras descritas en el presente documento son útiles para modificar una respuesta inmune inflamatoria. Como se expone en el presente documento, las actuales

composiciones pueden usarse para modificar una respuesta inmune inflamatoria (por ejemplo, cambiar un fenotipo Th2 a Th1) que puede potenciar o mejorar el desarrollo de la tolerancia contra un antígeno específico.

5 Como se desvela en el presente documento, una composición inmunoestimuladora o inmunomoduladora comprende un adyuvante, preferentemente un Proteosoma o un adyuvante Proteosoma: LPS. Los Proteosomas pueden comprender proteínas de membrana externa (PME o porinas) de especies de *Neisseria*, pero también pueden derivar de otras bacterias Gram-negativas (véase, por ejemplo, Lowell y col., J. Exp. Med. 167:658, 1988; Lowell y col., Science 240:800, 1988; Lynch y col., Biophys. J. 45:104, 1984; Patente de Estados Unidos N° 5.726.292; Patente de Estados Unidos N° 4.707.543), o una combinación de las PME de *Neisseria* y las PME de al menos otra bacteria Gram-negativa. Como introducción y sin desear ligarse a ninguna teoría, la mezcla de Proteosomas con una proteína (por ejemplo, un antígeno microbiano) proporciona una composición que comprende la asociación, interacción o coordinación no covalente entre el antígeno microbiano y los Proteosomas, cuya asociación o coordinación se forma cuando el detergente usado para solubilizar los Proteosomas se elimina o reduce selectivamente, por ejemplo, por diálisis o diafiltración.

15 Los Proteosomas pueden usarse como un adyuvante (es decir, un componente de una composición inmunoestimuladora o inmunomoduladora) y/o pueden usarse como una composición de suministro antigénico (es decir, una composición inmunogénica). En una realización de la divulgación, una composición inmunogénica comprende uno o más agentes microbianos (es decir, antígenos o inmunógenos bacterianos, parasitarios, fúngicos o virales o variantes y fragmentos de los mismos) y un adyuvante, en el que el adyuvante comprende Proyuvante (es decir, Proteosoma) o Protollin (es decir, Proteosoma:LPS). Un antígeno microbiano preferido es uno que estimula o provoca una respuesta inmune (humoral o mediada por células) que protege (previene una infección microbiana, reduce la carga microbiana, destruye los microorganismos o previene su propagación) al huésped o sujeto.

25 En determinadas realizaciones de la divulgación, la composición inmunoestimuladora o inmunomoduladora puede ser un Proteosoma formulado adicionalmente con un liposacárido. Es decir, el adyuvante Proteosoma (Proyuvante) puede prepararse para incluir una molécula adicional inmunoestimuladora o inmunomoduladora (por ejemplo, exógena o endógena), tal como LPS. El liposacárido puede prepararse sintéticamente, aislarse de una fuente biológica (por ejemplo, no destoxificada), modificarse químicamente (por ejemplo, destoxificarse o modificarse de otra manera químicamente añadiendo, delecionando o cambiando sustituyentes) o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, el Proyuvante puede mezclarse como se describe en el presente documento con el liposacárido para proporcionar un adyuvante PME: LPS (es decir, Protollin). Estos dos componentes del Protollin pueden formularse en proporciones iniciales específicas (véase el diagrama de flujo de la Figura 3) para optimizar su interacción, dando como resultado la asociación y la formulación estable de los componentes para su uso en una composición inmunoestimuladora o inmunomoduladora. El proceso para fabricar Protollin generalmente implica mezclar los componentes en una solución de detergente seleccionada (por ejemplo, Empigen® BB (n-Dodecil-N,N-dimetilglicina), Triton® X-100 (octil fenol etoxilado) o Mega-10 (n-Decanoil-N-metilglucamida)) u otro detergente (por ejemplo, octoglucósido). La formación del complejo de los componentes PME y LPS se produce aunque se reduzca la cantidad de detergente hasta una concentración predeterminada, preferida, por procedimientos de diálisis o por diafiltración/ultrafiltración. La duración de la diálisis puede ajustarse para conservar cantidades de detergente que varían en la formulación de las vacunas incluyendo, por ejemplo, concentraciones de 250, 500, 750, 100 ppm o más, o incluso mayores cantidades (por ejemplo, 50 ppm). La mezcla, co-precipitación o liofilización de los dos componentes también puede usarse para efectuar una asociación o formulación adecuada y estable. En determinadas realizaciones, el Protollin puede formularse para comprender LPS de una bacteria o puede formularse para comprender dos o más liposacáridos obtenidos de diferentes bacterias. Por ejemplo, una formulación Protollin puede incluir liposacáridos de *Escherichia* y *Shigella*, o de *Chlamydia* y *Yersinia*, o *Phorphyromonas* y *Shigella*, o de *Neisseria*, *Escherichia*, *Yersinia*, y *Shigella*, y así sucesivamente. Una formulación de Protollin puede optimizarse con uno o una pluralidad de tantos liposacáridos diferentes como sea necesario o se desee.

55 Las composiciones de Protollin descritas en el presente documento pueden contener liposacáridos derivados de cualquier especie de bacterias Gram-negativas, que puede ser la misma especie bacteriana Gram-negativa que es la fuente de los Proteosomas o puede ser una especie bacteriana diferente. En una realización, el contenido final en peso del liposacárido como un porcentaje de la proteína de Proteosoma total puede estar en un intervalo de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 10 %, de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 5 %, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 500 %, o en un intervalo de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 100 %, aproximadamente del 5 % a aproximadamente el 20 % ó de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 50 %, o en un intervalo de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 200 %, o en un intervalo de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 150 % o de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 150 %. En una realización preferida, la composición inmunoestimuladora comprende un componente Proteosoma preparado de *Neisseria meningitidis* y el liposacárido se prepara de *Shigella flexneri* o *Plesiomonas shigelloides*, de manera que el contenido final del liposacárido está entre el 50 % al 150 % del total de la proteína de Proteosoma por peso. En otra realización, los Proteosomas se preparan con contenido lipooligosacárido

(LOS) endógeno de *Neisseria* que varía de aproximadamente el 0,5 % hasta aproximadamente el 5 % del total de PME. En otra realización se proporcionan Proteosomas que comprenden liposacáridos endógenos (es decir, de la misma bacteria que los Proteosomas) en un intervalo de aproximadamente el 12 % a aproximadamente el 25 % y en una realización preferida entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 20 % del total de PME. Como alternativa, pueden usarse bacterias mutantes que ya no pueden producir LPS (por ejemplo una cepa de *Neisseria sin* - LPS) para preparar Proadyuvante de manera que la mezcla PME:LPS tenga el 0 % de LPS endógeno. Por consiguiente, el Protollin puede tener LPS exógeno, LPS endógeno o una combinación de los mismos, en el que el LPS exógeno y endógeno puede estar presente en cantidades iguales o en proporciones diferentes.

La presente invención también se refiere generalmente al uso de antígenos microbianos en combinación con una composición inmunoestimuladora o inmunomoduladora para generar una composición inmunogénica. Los antígenos son preferentemente de microorganismos clínicamente importantes, tales como bacterias, que incluyen bacterias patógenas; virus (por ejemplo, Gripe, Sarampión, Coronavirus); parásitos (por ejemplo, *Tripanosoma*, *Plasmodium*, *Leishmania*); hongos (por ejemplo, *Aspergillus*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*) y similares. Por ejemplo, el antígeno puede ser de bacterias, particularmente bacterias patógenas, tales como agentes causantes del ántrax (*Bacillus anthracis*); plagas (*Yersinia pestis*), cáncer de estómago (*Helicobacter pylori*), enfermedades transmitidas sexualmente (*Chlamydia trachomatis* o *Neisseria gonorrhoea*) y similares. Otros ejemplos representativos incluyen antígenos de determinados virus tales como el virus (o los virus) de la gripe, virus de Norwalk, virus de la viruela, virus del Nilo Occidental, virus SARS, virus sincitial respiratorio, virus del sarampión y similares. Los hongos ejemplares incluyen *Cándida albicans* o *Aspergillus spp.* y los parásitos ejemplares incluyen los agentes causantes de tripanosomiasis, leishmania, peste neumónica y enfermedad de Lyme (*Borrellia burgdorferi*).

Como se describe en el presente documento, los antígenos pueden prepararse aislados, de manera recombinante, sintéticamente, a partir de una fuente biológica, modificarse de manera recombinante o químicamente y cualquier combinación de los mismos. Una fuente biológica incluye, pero sin limitación, una muestra biológica de un huésped o sujeto (por ejemplo, tejido, sangre, suero, plasma, lavado pulmonar, lavado nasal), cultivos celulares de bacterias o cultivos celulares de tejidos. Como se usa en el presente documento, una "muestra" se refiere a una muestra biológica y puede proporcionarse obteniendo una muestra de sangre, una muestra de ensayo de biopsia, un explante de tejido, un cultivo de órganos o cualquier otro tejido o preparación celular de un sujeto o una fuente biológica. Adicionalmente una muestra puede referirse a una preparación de tejido o de células en la que la integridad morfológica o estado físico se ha alterado, por ejemplo, por disección, disociación, solubilización, fraccionamiento, homogenización, extracción bioquímica o química, pulverización, liofilización, sonicación o cualquier otro medio para procesar una muestra derivada de un sujeto o fuente biológica.

Un antígeno o fragmento microbiano del mismo puede prepararse a partir de una diversidad de fuentes biológicas, tales como tejidos de un sujeto infectado o líneas celulares cultivadas. El aislamiento primario puede ser, por ejemplo, de células sanguíneas periféricas o de secreciones o excreciones respiratorias. Preferentemente, los microbios aislados se propagan o cultivan sobre medios de cultivo apropiados conocidos por los expertos en la técnica, en cultivos celulares primarios o en líneas celulares establecidas conocidas en la técnica como se requiere para un microbio particular. En determinadas realizaciones, los antígenos o fragmentos de los mismos, están aislados de partículas microbianas intactas. Como se usa en el presente documento, la expresión "aislado" o "derivado de" significa que el material se extrae de su entorno original o natural. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico o polipéptido de origen natural presente en un animal o célula o virus vivo no está aislado, aunque la misma molécula de ácido nucleico o polipéptido se aísla cuando se separa de alguno o de todos los materiales co-existentes en el sistema natural. Una molécula de ácido nucleico aislada o una molécula de ácido nucleico que se extrae de su entorno natural incluye un vector tal como un vector de expresión recombinante, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno microbiano. En otras realizaciones, los péptidos o polipéptidos, tales como antígenos o variantes y fragmentos de los mismos, pueden purificarse parcialmente o purificarse hasta la homogeneidad.

En el presente documento también se describen procedimientos para producir agentes microbianos sintéticos, que incluyen proteínas de fusión que comprenden un antígeno, variante o fragmento microbiano de los mismos. Un componente peptídico o polipeptídico de una composición inmunogénica puede sintetizarse por procedimientos químicos convencionales, incluyendo síntesis mediante un procedimiento automatizado. En general, los polipéptidos o péptidos inmunogénicos se sintetizan basándose en estrategias convencionales de protección Fmoc en fase sólida con HATU como agente acoplante. El péptido inmunogénico puede escindirse de la resina en fase sólida con ácido trifluoroacético que contiene eliminadores apropiados, que también desprotegen los grupos funcionales de cadena lateral. El péptido inmunogénico bruto también puede purificarse adicionalmente usando cromatografía preparativa de fase inversa. Pueden usarse otros procedimientos de purificación, tales como cromatografía de reparto, filtración en gel, electroforesis en gel o cromatografía de intercambio iónico. Para producir péptidos inmunogénicos similares pueden emplearse otras técnicas de síntesis conocidas en la técnica, tales como la estrategia de protección tBoc, el uso de diferentes reactivos acoplantes y similares. Además, puede usarse cualquier aminoácido de origen natural o no natural o derivados de los mismos, incluyendo aminoácidos D o L y combinaciones de los mismos.

Como se describe en el presente documento, los antígenos microbianos o fragmentos de los mismos pueden ser recombinantes, en los que una construcción de expresión de ácidos nucleicos recombinantes comprende un polinucleótido que codifica el antígeno y está unido operativamente a una secuencia de control de expresión (por ejemplo, promotora, potenciadora). Las construcciones de expresión de polinucleótidos recombinantes pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica de biología molecular. Los vectores de clonación y expresión para su uso con huéspedes procariontes y eucariotes se describen, por ejemplo, en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición, Cold Spring Harbor, NY, (2001), y pueden incluir plásmidos, cósmidos, vectores lanzadera, vectores virales y vectores que comprenden un origen de replicación cromosomal como se describe en el presente documento. Las construcciones de expresión recombinante también comprenden secuencias de control de expresión (secuencias reguladoras) que permiten la expresión de un polipéptido de interés en una célula huésped, que incluye una o más secuencias promotoras (*por ejemplo, lac, tac, trc, ara, tip*, el fago λ , el fago T7, el promotor del fago T5, CMV, timidina quinasa HSV, inmediata temprana, SV40 temprano y tardío, retrovirus de los LTR y metalotioneina-I de ratón), secuencias potenciadoras, secuencias operadoras (por ejemplo, *lacO*), y similares.

Generalmente, los vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permiten la transformación de la célula huésped y un promotor derivado de un gen muy expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural aguas abajo. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en la fase apropiada con el inicio de la traducción y secuencias de terminación. En realizaciones preferidas las construcciones se incluyen en composiciones que se administran in vivo. Dichos vectores y construcciones incluyen secuencias de ADN sintéticas y cromosomales, no cromosomales, por ejemplo, derivados del SV40; plásmidos bacterianos; ADN de fagos, plásmidos de levaduras, vectores derivados de combinaciones de ADN de plásmidos y fagos; ADN viral, tales como vacunas, adenovirus, virus de la viruela aviar y pseudorrabia; o retrovirus sin replicación como se describe a más adelante. Sin embargo, para la preparación de una construcción de expresión recombinante puede usarse cualquier otro vector y en realizaciones preferidas dicho vector se replicará y será viable en la célula huésped (sujeto).

El vector de expresión recombinante puede introducirse en una célula huésped por transformación, transfección o transducción de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica de biología molecular. Las células huéspedes (tales como células huéspedes eucariotes o procariontes o células de insectos) pueden cultivarse para permitir la expresión del antígeno microbiano codificado, produciendo de esta manera un antígeno proteico recombinante (o inmunógeno) o fragmento del mismo. Los antígenos pueden fusionarse o conjugarse adicionalmente con otras secuencias de aminoácidos, cuyas secuencias pueden ser un anclaje o pie hidrófobo (ancla) para facilitar o potenciar de otra manera la asociación no covalente con el Proyuvante o Protollin. Un fragmento de un polipéptido antigénico microbiano puede comprender una parte de dicho polipéptido que tenga al menos un epítipo capaz de provocar una respuesta inmune protectora (celular o humoral) contra una infección microbiana. Los polipéptidos inmunogénicos también pueden organizarse o combinarse y unirse en una forma lineal y cada inmunógeno puede o no repetirse, en el que la repetición puede producirse una o múltiples veces. Además, puede seleccionarse una pluralidad de diferentes polipéptidos inmunogénicos (por ejemplo, variantes de proteína o fragmentos de las mismas) y mezclarse o combinarse en una composición cóctel para proporcionar una vacuna multivalente para su uso provocando una respuesta inmune protectora.

Una variante de un antígeno, que incluye un antígeno o alérgeno microbiano, como se describe en el presente documento, o un fragmento de un antígeno o variante, incluye moléculas que son estructuralmente similares y funcionalmente similares. Una variante o fragmento de antígeno o alérgeno, es funcionalmente similar al antígeno o alérgeno si la variante o fragmento es capaz de provocar una respuesta inmune al menos comparable, de acuerdo con una o más características o parámetros de una respuesta inmune, con la provocada por el antígeno o alérgeno, que puede determinarse usando procedimientos, incluyendo modelos animales y ensayos in vitro, descritos en el presente documento y llevados a la práctica en la técnica. Por ejemplo, una respuesta inmune comparable puede determinarse por determinación cuantitativa y/o cualitativa de producción de citocinas, producción de anticuerpos (incluyendo clase y/o isotipo) y protección según se determina en un modelo animal. Una respuesta inmune de una variante o fragmento antigénico comparable con el antígeno puede indicarse por análisis estadístico de una medida particular (tal como la producción de citocinas o la producción de inmunoglobulinas) y puede estar dentro del 5 %, 10 %, 15 % ó 20 % ó 25 % de la medición. Una variante o fragmento funcionalmente similar también es capaz de unirse a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno o alérgeno.

Dichas variantes incluyen polimorfismos o variantes alélicas de origen natural, variantes de cepas microbianas así como polipéptidos sintéticos (o los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de las variantes) que contienen sustituciones conservativas de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos. Una diversidad de criterios conocidos por los expertos en la técnica indican si los aminoácidos en una posición particular en un péptido o polipéptido son similares. Por ejemplo, un aminoácido similar o una sustitución conservativa de aminoácido es una en la que el resto aminoacídico se sustituye por un resto aminoacídico que tiene una cadena lateral similar, que incluye aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina); cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido

aspártico, ácido glutámico); cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, histidina); cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano); cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano). La prolina, que se considera más difícil de clasificar, comparte propiedades con aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (por ejemplo, Leu, Val, Ile y Ala). En determinadas circunstancias, la sustitución de glutamina por ácido glutámico o de asparagina por ácido aspártico puede considerarse una sustitución similar ya que la glutamina y la asparagina son derivados amina del ácido glutámico y del ácido aspártico, respectivamente.

Las variantes polinucleotídicas y sus productos polipeptídicos codificados pueden identificarse determinando si los polinucleótidos se hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos en condiciones muy rigurosas o moderadamente rigurosas. Como una alternativa, los polinucleótidos de variantes y los polipéptidos codificados pueden identificarse por comparación de secuencias. Como se usa en el presente documento, dos secuencias de aminoácidos tienen "identidad de secuencia de aminoácidos del 100 %" si los restos aminoacídicos de las dos secuencias de aminoácidos son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima. De manera similar, dos secuencias de nucleótidos tienen "identidad de secuencia de nucleótidos del 100 %" si los restos nucleotídicos de las dos secuencias de nucleótidos son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima. Las comparaciones de las secuencias pueden realizarse usando cualquier programa informático convencional, tal como BLAST, tBLAST, pBLAST o MegAlin. Algunos otros incluyen los proporcionados en el paquete de programas informáticos Lasergene bioinformatics, que produce DNASTAR® (Madison, Wisconsin). Pueden encontrarse referencias para algoritmos tales como ALING o BLAST, por ejemplo, en Altschul, J. Mol. Biol. 219:555-565, 1991; o Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992. BLAST está disponible en el sitio web NCBI. Los expertos en la técnica conocen bien otros procedimientos para comparar secuencias múltiples de nucleótidos o de aminoácidos determinando el alineamiento óptimo (véase, por ejemplo Peruski y Peruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997); Wu y col. (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins," in Methods in Gene Biotechnology, págs. 123-151 (CRC Press, Inc. 1997); and Bishop (ed.), Guide to Human Genome Computing, 2nd Edition, Academic Press, Inc., 1998). Un antígeno o alérgeno y una variante de los mismos debería tener al menos una identidad de secuencia de aminoácidos del 50 % y preferentemente, una identidad superior al 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % ó 90 % ó 95 %.

Las variantes pueden prepararse fácilmente usando técnicas de mutagénesis conocidas y practicadas en la técnica. Por ejemplo, mutagénesis dirigida (por ejemplo, Kramer y col. (Nucleic Acids Res. 12, 9441, (1984)); the Anglian Biotechnology Ltd handbook; Kunkel Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-92 (1985); Kunkel y col., Methods in Enzymol. 154:367-82 (1987)) y en la técnica se conocen bien y se usan ampliamente técnicas de mutagénesis al azar, tales como mutagénesis mediante alanina, mutagénesis propensa a error de la reacción en cadena de la polimerasa y mutagénesis dirigida a oligonucleótidos (véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (2001)).

En el presente documento se describen procedimientos para preparar las composiciones inmunoestimuladoras, composiciones inmunomoduladoras y composiciones inmunogénicas y se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitudes de patente de Estados Unidos Nº 2001/0053368 y 2003/0044425). El antígeno (o antígenos) y el adyuvante se formulan en proporciones iniciales específicas (peso: peso) para optimizar la interacción (o cooperación) entre los componentes dando como resultado una asociación no covalente (o yuxtaposición no específica) de una parte significativa de los dos componentes entre sí. Por ejemplo, se prepara una mezcla de al menos un antígeno con un Proteosoma (Proyuvante) o Protollin en presencia de detergente y la reducción de la concentración de detergente o la eliminación del detergente de la mezcla por diafiltración/ultrafiltración conduce a la asociación (interacción o coordinación) del antígeno (o antígenos) con el adyuvante (véase la Figura 3). La proporción de Proteosoma o Protollin con respecto al antígeno después de que la mezcla se haya dializado, diafiltrado o ultrafiltrado puede ser la misma o puede modificarse (aumentarse o disminuirse) de la proporción inicial. En determinadas realizaciones, la proporción inicial o post-dialisis/diafiltración/ultrafiltración del Proteosoma o Protollin (el peso de Protollin es igual al peso combinado de los Proteosomas y liposacárido) con respecto al antígeno (p/p) en una mezcla de composición inmunogénica varía de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 4:1. La proporción puede variar de 1:1 a aproximadamente 8:11 o superior. En otras realizaciones determinadas, la proporción Proteosoma o Protollin con respecto al antígeno (p/p) en la mezcla varía de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:500 o en un intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:200 o aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1: 200 ó en un intervalo de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:100 o en un intervalo de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:50 o en un intervalo de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:20. Las soluciones basadas en detergente de los dos componentes pueden contener el mismo detergente o diferentes detergentes y en la mezcla puede estar presente más de un detergente sometido a ultrafiltración/diafiltración. Los detergentes adecuados incluyen Triton®, Empigen® BB y Mega-10. También pueden usarse otros detergentes (por ejemplo, octoglucósido). Los detergentes sirven para solubilizar los componentes usados para preparar la composición. El uso de una mezcla de

detergentes puede ser particularmente ventajoso. El detergente (o detergentes) se elimina o se reduce la concentración por diafiltración/ultrafiltración antes de la formulación final.

También se desvelan procedimientos para tratar o prevenir una infección microbiana, administrando una composición inmunoestimuladora descrita en el presente documento para provocar una respuesta inmune protectora no específica.

5 En otra realización, se desvela un procedimiento para tratar o prevenir una infección microbacteriana administrando una composición inmunoestimuladora para provocar una respuesta inmune innata y administrar una composición inmunogénica para provocar una respuesta inmune adaptativa. También se contemplan procedimientos para modificar una respuesta inflamatoria o tratar o prevenir una reacción alérgica, usando las composiciones inmunomoduladoras y/o inmunogénicas de la presente descripción. Una composición inmunoestimuladora, composición inmunomoduladora o composición inmunogénica puede incluir adicionalmente un vehículo, transportador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, además de uno o más antígenos microbianos (o inmunógenos) o fragmentos o fusión de los mismos y, opcionalmente, otros componentes. Por ejemplo, los transportadores u otros componentes farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso con composiciones inmunoestimuladoras, composiciones inmunomoduladoras o composiciones inmunogénicas incluyen un agente espesante, un agente tamponante, un disolvente, un humectante, un conservante, un agente quelante, un adyuvante adicional y similar y combinaciones de los mismos.

Además, las composiciones farmacéuticas, como se describen en el presente documento, pueden incluir adicionalmente un diluyente tal como agua o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En determinadas realizaciones, el diluyente es PBS con una concentración de fosfato final que varía de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 2,5 mM a aproximadamente 10 mM y la concentración salina final varía de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 125 mM a aproximadamente 175 mM. En otra realización, la concentración de PBS final es de aproximadamente fosfato 5mM y aproximadamente sal 50 mM (tal como NaCl). En determinadas realizaciones, cualquiera de las composiciones inmunoestimuladora, inmunomoduladora, o inmunogénica, mencionadas anteriormente, que comprenden adicionalmente un diluyente serán estériles.

Las composiciones pueden esterilizarse preparándolas en un entorno aséptico o por esterilización terminal usando procedimientos disponibles en la técnica. Muchos productos farmacéuticos se fabrican para ser estériles y este criterio se define en UPS XXII <1211>. El término "USP" se refiere a la farmacopea de Estados Unidos (Rockville, MD). La esterilización puede conseguirse mediante varios medios aceptados en la industria y enumerados en la UPS XXII <1211>, incluyendo esterilización con gas, radiación ionizante, o filtración. La esterilización puede conservarse mediante lo que se denomina procesamiento aséptico, también definido en la UPS XII <1211>. Los gases aceptables usados para la esterilización con gas incluyen el óxido de etileno. Los tipos de radiación aceptables usados para los procedimientos de radiación ionizante incluyen la radiación gamma, por ejemplo de una fuente de cobalto 60 y un haz de electrones. Una dosis típica de radiación gamma es 2,5 MRad. Cuando es apropiado, la filtración puede conseguirse usando un filtro con un tamaño de poro adecuado, por ejemplo, 0,22 µm y un material adecuado, por ejemplo, Teflon®. La preparación de Proteosomas o Protollin produce bastantes partículas pequeñas suficientes que en las composiciones inmunogénicas pueden filtrarse a través de un filtro de 0,8 µm, un filtro de 0,45 µm o un filtro de 0,2 µm. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, las composiciones inmunoestimuladoras, inmunomoduladoras y/o inmunogénicas de la presente invención pueden esterilizarse mediante filtro. Esto es muy ventajoso para eliminar cualquier complicación debida a la presencia de contaminantes.

En una realización, se describe un procedimiento para provocar una respuesta inmune protectora no específica, que comprende administrar a un sujeto (o paciente) que lo necesita una cantidad de una composición inmunoestimuladora y en condiciones suficientes para provocar, inducir o estimular una respuesta inmune de manera que la cantidad de la composición inmunoestimuladora sea terapéuticamente eficaz. Las condiciones en las que se provoca una respuesta inmune en un sujeto incluyen una diversidad de parámetros y criterios, descritos en el presente documento y que entienden los expertos en la técnica médica e incluyen, pero sin limitación, el mismo tiempo de dosificación, número de dosis, vía de administración y similar. Una respuesta inmune protectora no específica, como se describe en el presente documento, incluye una respuesta inmune innata que no es una respuesta específica dependiente de antígenos o dependiente de anticuerpos (es decir, no implica la expansión clonal de células T y/o células B) y que puede provocar cualquiera de los numerosos antígenos, inmunógenos o microorganismos. La composición inmunoestimuladora comprende Proteosomas y liposacárido (Protollin), cualquiera de ellos o ambos pueden provocar una respuesta protectora no específica. Cuando la composición inmunoestimuladora se usa para provocar una respuesta inmune no específica o una respuesta inmune innata para el tratamiento o prevención de una infección microbiana, tal como una infección bacteriana o una infección viral, la composición inmunoestimuladora que comprende Protollin puede no contener un liposacárido del género de la bacteria que es el agente causante de una infección a tratar o prevenir. Es decir, el Protollin no necesita tener componentes o PMAP (patrones moleculares asociados a patógenos) del organismo que es el causante de una infección o que puede causar una infección. Como ejemplo, puede usarse una

- composición inmunoestimuladora que comprende Proteosomas obtenidos de *Neisseria meningitidis* y un LPS obtenido de *Shigella flexneri* para estimular una respuesta innata en un sujeto que proporciona protección, es decir, trata o previene la infección causada por un virus, tal como un virus de la gripe o por una bacteria tal como *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, o *Chlamydia trachomatis*. Por consiguiente, las composiciones inmunoestimuladoras descritas en el presente documento pueden ser útiles para el tratamiento o prevención de infecciones de pueden producir una de las numerosas cepas diferentes de un virus, tales como diferentes cepas del virus de la gripe o pueden producir una de las numerosas cepas, serotipos, o inmunotipos diferentes de una especie bacteriana.
- Los Proteosomas y liposacárido de Protollin pueden obtenerse a partir del mismo o diferente género o especie bacteriana. Los Proteosomas pueden obtenerse a partir de una bacteria Gram-negativa tal como una especie de *Neisseria* y el liposacárido puede obtenerse de otra bacteria Gram-negativa tal como de *Shigella*, *Chlamydia*, *Pleisomonas*, *Porphyromonas*, o *E. coli*. En una realización, se proporciona un procedimiento para potenciar una respuesta inmune específica, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunoestimuladora, en la que la composición inmunoestimuladora comprende Proteosomas y liposacárido.
- En otra realización, se desvela un procedimiento para tratar o prevenir una infección microbiana, en el que después de administrar al sujeto (o paciente) que lo necesita la composición inmunoestimuladora, se le administra una composición inmunogénica en una cantidad suficiente y en condiciones de manera que la administración de ambas composiciones provoca eficazmente una respuesta inmune específica. En una determinada realización, la composición inmunogénica comprende Proteosomas, liposacárido y un antígeno tal como un antígeno microbiano (antígeno bacteriano, viral, parasitario o fúngico). La composición inmunogénica puede comprender Proteosomas que se obtienen de la misma o de diferentes fuentes de los Proteosomas de la composición inmunoestimuladora, tal como géneros y/o especies bacterianas diferentes Gram-negativas. De manera similar, un componente LPS de la composición inmunogénica y la composición inmunoestimuladora puede proceder de la misma o de diferentes bacterias. La composición inmunogénica puede comprender un antígeno que es un antígeno microbiano o puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8-10 antígenos microbianos. Cuando la composición inmunogénica contiene al menos dos antígenos microbianos, los antígenos pueden obtenerse de, asociarse con o se sabe que derivan originalmente del mismo microorganismo o de diferentes microorganismos. Como alternativa, la composición inmunogénica puede comprender al menos un antígeno sin Proteosomas y/o LPS, o la composición inmunogénica puede comprender al menos un antígeno y un adyuvante tal como alumbre. El antígeno puede aislarse (purificarse) o aislarse parcialmente (o purificarse) o puede suministrarse como un microorganismo vivo, infeccioso o en una forma atenuada. En determinadas realizaciones, el agente microbiano es un antígeno viral fragmentado como se describe en el presente documento, que puede contener todos los componentes de un virus. Cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento puede administrarse a un sujeto una vez o más de una vez (múltiples veces) después de la administración de una composición inmunoestimuladora.
- Las composiciones inmunoestimuladoras e inmunogénica descritas en el presente documento pueden administrarse a un sujeto (o paciente) como un tratamiento profiláctico para prevenir una infección microbiana antes de la exposición al microorganismo que causa la infección. Un tratamiento profiláctico también incluye la administración de una composición inmunoestimuladora en solitario o seguida de una composición inmunogénica para evitar una infección microbiana en un sujeto que se sabe que ha estado expuesto, que está en peligro de exposición o que probablemente se ha expuesto al agente microbiano causante de la infección. Una composición inmunoestimuladora en solitario o seguida de una composición inmunogénica también puede usarse para tratar a un sujeto que puede tener una infección subclínica (es decir, no detectada de acuerdo con un criterio clínico apropiado) o puede tener una infección clínica que se diagnostica o puede diagnosticarse clínicamente de acuerdo con criterios conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen sintomatología, química clínica y análisis microbiológico.
- La proporción (p:p) (proporción inicial o post-eliminación del detergente) de Proteosomas o Protollin (peso combinado de Proteosomas y liposacárido) con respecto al antígeno de la composición inmunogénica puede variar de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4, y puede ser al menos 4:1 o al menos 2:1. La proporción de Proteosomas (o Protollin) con respecto al antígeno puede ser superior a 1:1, superior a 2:1, superior a 3:1 y superior a 4:1. La proporción puede ser tan elevada como 8:1 o superior. Como alternativa, la proporción de Proteosoma (o Protollin) con respecto al antígeno en la mezcla es 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, ó 1:8. La proporción de Proteosoma o Protollin con respecto al antígeno en la mezcla puede variar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:500, o de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:200 o de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:100 o de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:50 o de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:20.
- Como se describe en el presente documento, en las preparaciones de Protollin pueden usarse diferentes fuentes de LPS. El uso de una fuente o tipo particular de LPS puede depender de las propiedades del adyuvante de la composición Proteosoma:LPS cuando se administra mediante una vía particular, tal como por vía intranasal, del tipo de respuesta inmune inducida (innata y/o adaptativa), de la cantidad o de la calidad de la producción de citocina, de la capacidad de un tipo de LPS particular para interactuar con una célula huésped particular, de las propiedades de

5 solubilidad del LPS (es decir, la longitud de una cadena O-polisacárido puede influir en la solubilidad de la mezcla Proteosoma/LPS durante la preparación de Protollin), así como de los procedimientos de producción (por ejemplo, rendimiento, requisitos de contención de riesgo biológico). El Protollin puede prepararse conteniendo LPS de *S. flexneri* 2a, LPS de diferentes cepas de *E. coli*, o LPS de otras bacterias Gram-negativas y caracterizarse de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica.

10 La proporción de Proteosoma (PME) frente a LPS en una preparación de Protollin puede determinarse por procedimientos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica para determinar la cantidad de LPS o PME que está libre (es decir, sin formar complejo) frente a la que está unida (es decir, en un complejo PME:LPS), tales como electroforesis por capilaridad. El contenido de LPS del Protollin puede determinarse mediante un ensayo KDO, RMN, electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción de plata del gel y otros procedimientos realizados por un experto con experiencia en la técnica. El contenido de PME del Protollin puede determinarse mediante varios ensayos que miden el contenido de proteína que incluyen, pero sin limitación, procedimientos de espectrometría de masas tales como LC-MS, cromatografía líquida a alta presión en fase inversa (RP-HPLC), electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) (que incluye tinción de la proteína tal como con azul de Coomassie o inmunotransferencia), secuenciación N-terminal, análisis de aminoácidos, ensayos de proteínas de Lowry o BCA y MALDI-TOFMS. El LPS residual en una preparación de Proteosoma también puede determinarse mediante los ensayos de LPS, tales como KDO. Los ácidos nucleicos permanecen en la preparación de PME, LPS o Protollin por procedimientos conocidos en la técnica para detectar ácidos nucleicos y la presencia de detergente puede determinarse por HPLC.

20 En determinadas realizaciones, el antígeno es bacteriano, por ejemplo, un Antígeno Protector (AP) de ántrax (véase, por ejemplo, Linder y col., Infect. Immun. 66:5731-42 (1988)) o un antígeno pesticida. El antígeno pesticida usado en la composición inmunogénica puede comprender un antígeno F1 o un antígeno V de *Yersinia pestis* o un antígeno de proteína de fusión antígeno F1-V o una combinación de los mismos (véase, por ejemplo, Andersonu col., Infect. Immun. 64:4580-85 (1996)). En otras realizaciones, el antígeno es viral, tal como una preparación de antígeno viral fragmentado (por ejemplo, un antígeno fragmentado de la gripe (véase la solicitud de patente de Estados Unidos 2004/0156867) o un antígeno fragmentado del sarampión). Un antígeno viral fragmentado es una preparación antigénica que se separa o aísla de una partícula viral. Un antígeno viral fragmentado generalmente comprende más de un sólo antígeno viral y puede comprender todos los antígenos virales aunque no en la misma proporción o cantidad en la que puede encontrarse en una partícula viral intacta. Un antígeno viral fragmentado puede prepararse de acuerdo con procedimientos que enriquecen uno o más antígenos virales, es decir, la proporción de un antígeno particular en una preparación de antígeno fragmentado puede ser superior que en un virus intacto. Por ejemplo, un antígeno fragmentado de la gripe puede enriquecerse por el antígeno hemaglutinina de la gripe.

35 Otros agentes microbianos ejemplares incluyen, pero sin limitación, lipopolisacáridos, polipéptidos o glucoproteínas estructurales, proteínas flagelares o ciliares, toxinas, factores de virulencia, proteínas de núcleo viral, proteínas de la envuelta viral y glucoproteínas. En determinadas realizaciones, el LPS aislado puede ser un antígeno, por ejemplo, LPS aislado de *P. gingivalis* que puede formularse con Proteosomas para su uso estimulando una respuesta inmune contra *P. gingivalis* para tratar o prevenir enfermedades en las encías, enfermedades periodontales, deterioro dental y similares.

40 En determinadas realizaciones, la composición inmunogénica se administra entre aproximadamente uno a aproximadamente diez días, de uno a catorce días o de uno a veintiún días después de la composición inmunoestimuladora, preferentemente al menos tres días después de la administración de la composición inmunoestimuladora y provoca una respuesta inmune adaptativa. Dicho procedimiento para tratar o prevenir una infección microbiana puede comprender administrar a un paciente que lo necesita una composición inmunoestimuladora que tenga Proteosomas y liposacárido en una cantidad y en condiciones suficientes para provocar una respuesta inmune protectora innata o no específica y administrar a un paciente que lo necesita una composición inmunogénica que tenga Proteosomas, liposacárido y un antígeno o al menos dos agentes microbianos en una cantidad y en condiciones suficientes para provocar una respuesta inmune adaptativa.

50 Como se describe en el presente documento, una respuesta inmune innata comprende el reconocimiento del huésped de constituyentes moleculares invariantes de microorganismos infecciosos que representan estructuras moleculares (PMAP) compartidas por grandes grupos de microorganismos, por ejemplo, lipopolisacáridos con la estructura lipídica A conservada que se encuentra en las bacterias Gram-negativas o peptidoglicanos comunes para las bacterias Gram-positivas. Los receptores huéspedes reconocen dichos antígenos como antígenos no propios, por lo tanto el huésped provoca una respuesta inmune no específica para destruir la diana no propia. La capacidad de las composiciones inmunoestimuladoras descritas en el presente documento, tales como Protollin en solitario, para estimular la inmunidad innata contra la exposición por aerosol con diversos patógenos, tales como *Chlamydia trachomatis* o *Bacillus anthracis*, puede determinarse de acuerdo con procedimientos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica, que incluyen modelos animales. Animales, tales como roedores (ratones, ratas, conejos) pueden tratarse con Protollin, preparado como se describe en el presente documento y después exponerse a un microorganismo patógeno.

Después, puede determinarse la morbilidad y la mortalidad. Los animales pueden recibir uno, dos, tres ó más tratamientos con una composición inmunoestimuladora para determinar si la respuesta inmune innata puede mantenerse o re-estimularse y durante cuánto tiempo. La capacidad de una composición inmunoestimuladora en presencia y ausencia de una composición inmunogénica para provocar, potenciar o estimular la respuesta inmune innata también puede examinarse por la capacidad de las composiciones para regular positivamente el MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) de clase I y II y B7.2 en linfocitos B de sangre periférica, células dendríticas y células epiteliales de la mucosa de ratones de tipo silvestre y de animales transgénicos knockout TLR-2, TLR-4 y MyD88.

En una realización, la divulgación se refiere a un procedimiento para modificar una respuesta inmune inflamatoria, que comprende administrar a un sujeto (o paciente) que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunomoduladora, en el que la composición inmunomoduladora comprende Proteosomas y liposacárido de manera que la respuesta inmune inflamatoria se modifica. En otra realización, un procedimiento para tratar o prevenir una reacción alérgica comprende administrar a un sujeto (o paciente) que lo necesita una cantidad de una composición inmunomoduladora, en el que la composición inmunomoduladora comprende Proteosomas y liposacárido, de manera que la reacción alérgica se trata, se atenúa, se mejora o se previene. En determinadas realizaciones cuando se trata o se previene una reacción alérgica, tal como una reacción inducida por alérgenos, la composición inmunomoduladora que comprende Protollin no contendrá ningún alérgeno específico o si el alérgeno es una bacteria no contendrá liposacáridos del género de la bacteria que es el alérgeno. Es decir, el Protollin no necesita tener componentes que causen directa o indirectamente una reacción alérgica. En algunas realizaciones, los Proteosomas y liposacárido se obtienen a partir de la misma o de distinta especie o género bacterianos. Preferentemente, los Proteosomas son de especies de *Neisseria* y el liposacárido se obtiene de *Shigella*, *Chlamydia*, *Pleisonomas*, *Porphyromonas*, o *E. coli*.

En otra realización desvelada, después de administrarse la composición inmunomoduladora, a un sujeto que padece o que está en riesgo de padecer una reacción alérgica se le proporciona una cantidad de una composición inmunogénica que comprende Proteosomas, liposacárido y un alérgeno (por ejemplo, un antígeno microbiano o polen) de manera que la reacción alérgica se trata, previene, disminuye, atenúa o mejora. En determinadas realizaciones, la proporción (p:p) (inicial y/o después de la eliminación del detergente) de Proteosomas (o Protollin, que incluirá el peso combinado de los Proteosomas y el liposacárido) con respecto al alérgeno (o antígeno) de la composición inmunogénica varía de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4, preferentemente la proporción al menos es 4:1 o al menos es 2:1. En otra realizaciones, la proporción de Proteosomas (o Protollin) con respecto al antígeno de la composición inmunogénica varía de aproximadamente 1:1, a aproximadamente 1:500, preferentemente la proporción es al menos de 1:20, al menos de 1:50, o al menos de 1:100. En otras realizaciones determinadas, la proporción de Proteosoma o Protollin con respecto al alérgeno (o antígeno) en la mezcla varía de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:500 o en un intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:200 o de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:200 o en un intervalo de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:100 o en un intervalo de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:50 o en un intervalo de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:20. En determinadas realizaciones, el alérgeno es al menos uno de una partícula inhalada, polen (por ejemplo, microesporas de maleza, árboles, hierba, etc.), vapor, gas, alimento, bebida (o un componente de los mismos), fármaco, toxina, agente microbiano (por ejemplo, viral, antígeno viral fragmentado, bacteriano, parasitario, fúngico y combinaciones de los mismos), productos de descamación, compuestos derivados de animales, polvo (por ejemplo, polvo que tiene LPS o heces de ácaros del polvo), polipéptidos, carbohidratos, ácidos nucleicos o cualquier otro agente capaz de provocar una reacción alérgica. La composición inmunogénica puede administrarse de aproximadamente uno a aproximadamente diez días, de uno a doce días o de uno a trece días después de la composición inmunomoduladora o aproximadamente tres días después, de manera que se modifica una respuesta inmune inflamatoria o una respuesta alérgica.

Las composiciones inmunoestimuladoras, inmunogénicas y/o inmunomoduladoras descritas en el presente documento pueden inducir respuestas inmunes o efectos inmunomoduladores contra-antígenos específicos, incluyendo uno o más de los siguientes. Para producir anticuerpos específicos contra antígenos se puede provocar o estimular una respuesta humoral específica que pueden incluir cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgA, IgM, y/o IgE e isotipos de las clases. Por ejemplo, la presencia de IgG, IgA (particularmente en secreciones mucosas) e IgE específicos en suero, lavado nasal, lavado pulmonar u otros tejidos puede determinarse mediante cualquiera de los diversos inmunoensayos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, ELISA, inmunotransferencia, radioinmunoensayo, inmunohistoquímica, separación de células activadas por fluorescencia (FACS), Ouchterlony, y similares. En un inmunoensayo, para la detección del antígeno o de los anticuerpos específicos contra microorganismos, se puede dejar que la muestra biológica interaccione o se ponga en contacto con un antígeno que se purifica, se aísla parcialmente o un fragmento del mismo o que interaccione o se ponga en contacto con un microorganismo, que puede fijarse (tal como con etanol o formaldehído) o no fijarse o no desnaturalizarse. Las secreciones mucosas incluyen las extraídas del tracto respiratorio, incluyendo nasofaringe y pulmones. También pueden realizarse ensayos funcionales de manera que la capacidad de un anticuerpo específico contra un antígeno para neutralizar una toxina (tal como un ensayo de protección contra macrófagos), facilite la fagocitosis u opsonización

de un microorganismo o impida la entrada de un microorganismo en una célula huésped, la fusión o la propagación de un microorganismo tal como un virus en una célula huésped. En el presente documento se describen estos procedimientos y los expertos en la técnica los llevan a la práctica de manera rutinaria.

5 La inmunidad mediada por células (IMC) o la respuesta inmune en un sujeto que ha recibido una o más de las composiciones inmunes descritas en el presente documento también puede terminarse usando procedimientos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica. Una respuesta inmune mediada por células incluye determinar si una respuesta inmune ha cambiado de una respuesta predominantemente Th2 a una respuesta Th1 y Th2 equilibrada o mezclada (debido a un aumento en la respuesta de Th1 o a un aumento simultáneo en la respuesta de Th1 y disminución en Th2) o a una respuesta predominantemente Th1. De manera similar, puede determinarse un cambio de una respuesta Th1 a una respuesta Th1/ Th2 equilibrada o mezclada o a una respuesta Th2 aumentada o predominante. Por ejemplo, de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento, pueden determinarse niveles de citocinas Th1, tales como IFN- γ , IL-2, y TNF- β , y de citocinas de Tipo 2, tales como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, y IL-13, y llevarse a la práctica en la técnica, incluyendo ELISA, ELISPOT y citometría de flujo (para medir las citocinas intracelulares). Las respuestas de tipo 1 predicen la inducción de otras respuestas asociadas con IMC, tales como el desarrollo de células T citotóxicas (CTL), que son indicativas de inmunidad Th1. La proliferación celular inmune y la expansión clonal resultante de una provocación o estimulación específica contra antígeno de una respuesta inmune puede determinarse aislando linfocitos, tales como esplenocitos o células procedentes de ganglios linfáticos, estimulando las células con el antígeno y midiendo la producción de citocina, la proliferación celular y/o la viabilidad celular, tal como incorporando timidina tritiada o ensayos no radioactivos, tales como ensayos con MTT y similares.

En cualquiera de estos procedimientos mencionados anteriormente, las composiciones inmunomoduladoras, composiciones inmunoestimuladoras y las composiciones inmunogénicas pueden comprender adicionalmente un transportador excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable como se describe en el presente documento. Una composición farmacéutica puede ser una solución, suspensión o emulsión acuosa o no acuosa estéril, que comprenda adicionalmente un transportador fisiológicamente aceptable (es decir, un material no tóxico que no interfiera con la actividad del ingrediente activo). Dichas composiciones pueden estar en forma de un sólido, líquido o gas (aerosol). Como alternativa, las composiciones de la presente invención pueden formularse como un liofilizado. Las composiciones farmacéuticas dentro del ámbito de la presente invención también pueden contener otros componentes, que pueden ser biológicamente activos o inactivos. Dichos componentes incluyen, pero sin limitación, tampones (solución salina neutra no tamponada o solución salina tamponada con fosfato), diluyentes, estabilizantes, colorantes, agentes saboríferos, agentes de suspensión y/o conservantes.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención puede emplearse cualquier transportador adecuado conocido por un especialista habitual en la técnica. Los transportadores de uso terapéutico se conocen bien y se describen, por ejemplo, en Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro ed. (1985)). En general, el tipo de transportador se selecciona basándose en el modo de administración. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de cualquier manera de administración apropiada, incluyendo, por ejemplo, la administración tópica, oral, nasal, intratecal, rectal, vaginal, sublingual o parenteral, incluyendo inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intrasternal, intracavernosa, intrameatal o intrauretral. Para la administración parenteral, el transportador comprende preferentemente agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para la administración oral, puede emplearse cualquiera de los transportadores anteriores o un transportador sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, caolín, glicerina, dextrinas de almidón, alginato sódico, carboximetilcelulosa, etil celulosa, glucosa, sacarosa y/o carbonato de magnesio.

Una composición farmacéutica (por ejemplo, para la administración oral o suministro por inyección) puede estar en forma de un líquido (por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión). Una composición farmacéutica líquida puede incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites no volátiles tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como el disolvente o como medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. Una preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples fabricados de vidrio o plástico. Se prefiere el uso de solución salina fisiológica y preferentemente una composición farmacéutica inyectable es estéril.

55 Como se usa en el presente documento, el término tratamiento y mejora se refiere a la administración terapéutica de una composición o compuesto deseado, en una cantidad y en condiciones suficientes para tratar, inhibir, atenuar, mejorar, reducir, prevenir o modificar al menos un aspecto o señal de una enfermedad, de una manera significativamente estadística o de una manera clínicamente significativa. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una

composición inmunomoduladora, composición inmunoestimuladora o composición inmunogénica es la cantidad de la composición que trata al menos un aspecto o señal de una enfermedad como se describe en el presente documento.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender una o más composiciones inmunomoduladoras, inmunoestimuladoras e inmunogénicas que puedan estar de cualquier forma que permitan administrar la composición a un sujeto, tal como un ser humano o un animal. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse y administrarse como una solución líquida o prepararse como una forma sólida (por ejemplo, liofilizada), que puede administrarse en forma sólida o resuspenderse en una solución junto con la administración. Las composiciones pueden formularse para permitir que los ingredientes activos contenidos en su interior estén biodisponibles después de la administración a un sujeto o paciente o puedan estar biodisponibles mediante la liberación lenta. Las composiciones que se administrarán a un sujeto o paciente tienen la forma de una o más unidades de dosificación, por ejemplo, una gota puede ser una sola unidad de dosificación y un envase de una o más composiciones puede contener una pluralidad de unidades de dosificación. En determinadas realizaciones preferidas, cualquiera de las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente que comprenden una composición inmunoestimuladora o una composición inmunoestimuladora con una composición inmunogénica que comprende al menos un antígeno (o inmunógeno) o un cóctel de inmunógenos o una composición inmunomoduladora se incluyen en un envase, preferentemente un envase estéril.

El diseño de un protocolo particular para la administración, que incluye niveles de dosificación y temporización de la dosificación se determinan optimizando dichos procedimientos usando procedimientos rutinarios bien conocidos por los expertos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de una manera apropiada para la enfermedad a tratar (o prevenir). Factores tales como el estado del paciente, el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, la forma particular del ingrediente activo y el procedimiento de administración determinarán una dosis apropiada y una duración y frecuencia de administración adecuadas. En general, a las composiciones se les proporciona una dosis y un régimen de tratamiento apropiados en una cantidad suficiente (cantidad terapéuticamente eficaz) para proporcionar beneficios terapéuticos y/o profilácticos (por ejemplo, un resultado clínico mejorado tal como erradicación completa o parcial más frecuente de la infección o sin enfermedad y/o supervivencia global durante más tiempo o una disminución de la gravedad de los síntomas). Para su uso profiláctico, una dosis debe ser suficiente para prevenir, retrasar la aparición o disminuir la gravedad de una enfermedad asociada con el microorganismo infeccioso particular.

En una realización, cualquiera de la composición inmunomoduladora, composición inmunoestimuladora o composición inmunogénica se administra por vía nasal. Otras vías de administración incluyen la administración enteral, parenteral, transdérmica/transmucosa, sublingual, nasal y por inhalación. El término enteral, como se usa en el presente documento, es una vía de administración en la que la composición inmunogénica se absorbe a través del tracto gastrointestinal o de la mucosa oral, incluyendo oral, rectal y sublingual. El término parenteral, como se usa en el presente documento, describe vías de administración que evitan el tracto gastrointestinal, incluyendo inyección intraarterial, intradérmica, intramuscular, intranasal, intraocular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, submucosa e intravaginal o técnicas de infusión. El término transdérmica/transmucosa, como se usa en el presente documento, es una vía de administración en la que cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento se administra a través o por medio de la piel, incluyendo la administración tópica. Los términos "nasal" e "inhalación" incluyen técnicas de administración en las que una composición inmunogénica se introduce en el árbol pulmonar, incluyendo intrapulmonar o transpulmonar. Preferentemente, las composiciones de la presente invención se administran por vía nasal.

Adicionalmente, las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden usarse para potenciar la inmunidad o como una inducción de seguimiento o inmunización o tolerancia, cuando se administran junto con otra vacuna, tal como una vacuna viva atenuada, o una vacuna sub-unitaria no viva. Por ejemplo, las composiciones que comprenden uno o más antígenos o fragmentos o fusiones de los mismos con Proyuvante o Protollin pueden usarse como una inmunización cebadora o de refuerzo (por la vía mucosa o parenteral) antes o después de administrar una vacuna diferente.

Ejemplos

Ejemplo 1

50 PREPARACION DE PROTEOSOMAS

Los inmunógenos (por ejemplo, antígenos o alérgenos microbianos) pueden formularse con Proteosomas para formar una composición inmunogénica de la presente invención que puede provocar una respuesta inmune protectora o tolerancia en un sujeto humano o animal. Los Proteosomas son útiles como adyuvantes y se componen de proteínas de membrana externa purificadas de bacterias Gram-negativas. Los procedimientos para preparar Proteosomas se describen, por ejemplo, en Mallett y col. Infect. Immun. 63:2382,1995; en la Patente de Estados Unidos N° 6.476.201

B1; en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2001/0053368; y en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003/0044425. En resumen, se extrajo un concentrado de *Neisseria meningitidis* de tipo 2 del Grupo B destruida con fenol con una solución de Empigen® BB (EBB) al 6% (Albright y Wilson, Whithaven, Cumbria, UK) en cloruro de calcio 1 M. El extracto se precipitó con etanol, se solubilizó en solución salina EBB-Tris/EDTA al 1 % y después se precipitó con sulfato de amonio. Los Proteosomas precipitados se re-solubilizaron en tampón EBB al 1 %, se diafiltraron y se almacenaron en un tampón con EBB al 0,1 % a -70°C.

En el diagrama de flujo 1A (Figura 1A) se muestra un diagrama de flujo de este proceso, que produce Proteosomas con un contenido en liposacáridos de entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 5 %. Para acortar el proceso, los Proteosomas también pueden prepararse sin la etapa de precipitación con sulfato de amonio. Los Proteosomas resultantes tienen un contenido en liposacáridos de entre aproximadamente el 12 % y aproximadamente el 25 % y dependiendo de los materiales puede ser entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 20 % como se muestra en el diagrama de flujo 1B (Figura 1B). Un especialista habitual en la técnica podría ajustar los procedimientos para preparar formulaciones que comprendan el Proyuvante o las composiciones de PME-LPS (Protollin) como se describe en el presente documento para optimizar las características particulares de los componentes de la vacuna.

Ejemplo 2

PREPARACIÓN DE LIPOSACÁRIDOS

El ejemplo del diagrama de flujo 2 (Figura 2) muestra el proceso para aislar y purificar LPS (por ejemplo, no destoxificado) de *S. flexneri* o *P. shigelloides*. De manera similar, este proceso puede usarse para preparar LPS de una o más de otras bacterias Gram-negativas, que incluyendo especies de *Shigella*, *Plesiomonas*, *Porphyromonas*, *Escherichia* y *Salmonella*. Después del crecimiento de las bacterias por fermentación en 300 l, las bacterias se sedimentaron y el concentrado celular se re-hidrató con 3 ml de NaCl 0,9 M, EDTA 0,005 M, y 10 mg de lisozima por gramo de concentración bacteriana. Se dejó llevar a cabo la digestión con lisozima durante una hora a temperatura ambiente. Después, se añadieron 50 U/ml de Benzonasa® (DNasa) (Merck Chemicals) en MgCl₂ 0,025 M y se dejó llevar a cabo la digestión con DNasa a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, la suspensión se fraccionó pasando a través de un microfluidizador de 96,50 a 130,96 MPa. Se añadió DNasa reciente (50 U/ml) y se dejó llevar a cabo la digestión de la suspensión durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. La suspensión celular digerida se calentó a 68°C en un baño de agua. Posteriormente se añadió un volumen igual de fenol al 90 % (también calentado a 68°C) y la mezcla se incubó con agitación a 68°C durante 30 minutos. La mezcla se centrifugó a 4°C para separar las fases acuosa y orgánica. La fase acuosa se recogió y la fase orgánica se re-extrajo con API (agua para inyección) a 68°C durante 30 minutos. La mezcla se centrifugó a 4°C, la segunda fase acuosa se recogió y las dos fases acuosas recogidas se combinaron. Para precipitar los ácidos nucleicos, se añadió etanol al 20 % con CaCl₂ 10 mM a las fases acuosas combinadas. La mezcla se agitó a 4°C durante una noche. Después, los ácidos nucleicos precipitados se sedimentaron por centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante se recogió, se concentró y se diafiltró usando un cartucho de fibra hueca de 30.000 PM en NaCl 0,15 M, Tris 0,05 M, EDTA 0,01 M y Empigen® BB al 0,1 %, pH 8,0 (tampón TEEN). Después, el LPS se filtró de manera estéril usando una unidad de filtro Millipak® 60 de 0,22 µm, se dividieron alícuotas en recipientes de almacenaje estériles y se congeló a -80°C. Los estudios de estabilidad indicaron que el LPS a granel tiene una vida de almacenamiento de al menos 2 años.

Ejemplo 3

PRERARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ADYUVANTE PROTEOSOMA: LIPOSACÁRIDO

Se preparó una formulación de adyuvante de Proteosoma mezclando Proteosomas con LPS (Protollin). El LPS que se mezcla con los Proteosomas del Ejemplo 1, puede derivar de cualquiera de serie de una o más bacterias Gram-negativas, tales como especies de *Shigella*, *Plesiomonas*, *Escherichia* o *Salmonella* (véase el Ejemplo 2), como se describe en el diagrama de flujo 3 (Figura 3). En resumen, los Proteosomas y LPS se descongelaron durante una noche a 4°C y la concentración del detergente se ajustó al 1% con Empigen® BB al 1% en tampón TEEN. Los Proteosomas y el LPS se mezclaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en cantidades que dieron como resultado una proporción final p/p de entre aproximadamente 10:1 y aproximadamente 1:3 de Proteosoma: LPS. La mezcla Proteosoma: LPS se diafiltró en un cartucho de fibra hueca de 10.000 PMLI (peso molecular límite) apropiadamente dimensionado en un tampón TNS (Tris 0,05 M, NaCl 150 mM pH 8,0). La diafiltración se detuvo cuando el contenido de Empigen® en el infiltrado era <50 ppm, lo cual se determinó mediante un ensayo de Turbidez con Empigen® o mediante un ensayo con reactivo Bradford siguiendo los protocolos del fabricante y convencionales. El adyuvante a granel (denominado en el presente documento PME-LPS) se concentró y se ajustó a 5 mg/ml de proteína. El contenido en proteína se determinó mediante un ensayo de Lowry convencional. El adyuvante se filtró de manera estéril usando una unidad de filtro Millipak 20 de 0,22 µm. El adyuvante a granel se dividió en alícuotas en recipientes de almacenaje estériles y se congeló.

El adyuvante PME-LPS se ensayó para determinar (1) Empigen® (400 ppm) usando HPLC de fase inversa; (2) contenido en proteína mediante un ensayo de Lowry; y (3) contenido en LPS por medición en un ensayo 2-ceto-3-desoxi octonato (KDO). La composición PME-LPS se caracterizó adicionalmente para la distribución de tamaño de partículas según se determina por análisis cuantitativo ponderado en número usando un calibrador de partículas (por ejemplo, instrumentos Brookhaven modelo 90 plus o una máquina similar) (10-100 nm). Sin embargo, el tamaño de las partículas para el complejo puede aumentarse o modularse variando la proporción Proteosoma con respecto al LPS. Estos complejos Proteosoma:LPS se han denominado Protollin. Los datos de estabilidad indican que esta formulación es estable durante más de 2 años.

El Protollin se preparó usando otras fuentes de LPS. Se realizaron dos preparaciones de Protollin usando LPS de dos cepas diferentes de *E. coli* y tenían similar actividad adyuvante. El Protollin también se preparó usando LPS de *N. meningitidis*. Con frecuencia el LPS de *N. meningitidis* se denomina LOS que significa lipooligosacárido porque la cadena lateral O del liposacárido de *N. meningitidis* es más corta que la de otras bacterias Gram-negativas tales como *E. coli* y *Shigella*. La producción de Protollin con LPS de *N. meningitidis* (Protollin-Nm) es diferente de las restantes versiones de Protollin. Durante la producción de las PME del Proteosoma de *N. meningitidis*, el LPS se elimina mediante técnicas de precipitación con sulfato de amonio de manera que las partículas del Proteosoma tienen menos del 2,5% de LPS de *N. meningitidis*. Si en esta etapa no se elimina el LPS, las partículas del Proteosoma resultante tienen aproximadamente un 20-25 % de LPS, dando como resultado una proporción PME:LPS que varía de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 4:1. Por lo tanto, el Protollin-Nm se produce en una sola etapa, eliminando por lo tanto la purificación adicional de las partículas del Proteosoma. Para verificar la formación del complejo de PME del Proteosoma con el LPS se conserva una alícuota de cada Protollin para su uso, por ejemplo, en un ensayo de desactivación. Cada una de estas versiones de Protollin se ensaya en ratones para determinar la actividad adyuvante después de la formulación con APr (antígeno Protector recombinante).

Ejemplo 4

INMUNIZACIÓN CON PROTOLLIN FORMULADO CON ANTÍGENO PESTICIDA F1-V.

Este ejemplo describe la capacidad de las composiciones de Proteosoma: LPS (Protollin) formuladas con antígeno pesticida (F1-V) para provocar una respuesta inmune capaz de proteger contra una exposición letal con *Yersinia pestis*. La respuesta inmune al F1-V se ensayó inmunizando grupos de 20 ratones hembra Swiss-Webster de 6 - 8 semanas de edad (Charles River, St-Constant, Quebec) los días 0 y 21. Se mezclaron alícuotas descongeladas recientes de Protollin y de la proteína de fusión F1-V (Instituto de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la Armada de los Estados Unidos) 16 horas menos antes de la inmunización. Para la administración nasal, primero se anestesió ligeramente a los ratones mediante inhalación con isoflurano. Se aplicaron veinticinco microlitros de vacuna o muestras de control apropiadas (sólo Protollin o sólo F1-V) en las fosas nasales (12,5 µl por orificio nasal) de cada ratón. En paralelo, se inmunizó a un grupo de ratones por vía intramuscular (i.m.) por inyección en las patas traseras con 25 µl de F1-V adsorbido a 500 mg de Alhydrogel®. También se realizaron inyecciones i.m. de control. Después de 35 y 55 días, se sacrificaron 10 ratones de cada grupo por asfixia con CO₂ y exanguinación. Se obtuvieron muestras de suero, lavado nasal y lavado pulmonar y se almacenaron a -80 °C. Se procesaron los bazos para la re-estimulación y evaluación in vitro de las citocinas liberadas. Los 10 ratones restantes de cada grupo se expusieron el día 35 o 55 a inhalación de DL₅₀ de 170-250 de *Y. pestis* aerosolizada (cepa Colorado 92) para evaluar la protección. Para determinar la morbilidad y la mortalidad, los ratones se controlaron durante 28 días después de la exposición.

Los anticuerpos presentes en las muestras de suero y de líquido del lavado pulmonar se obtuvieron de ratones inmunizados por vía intranasal con dos dosis de antígeno F1-V formulado con Protollin y se compararon con muestras de ratones inmunizados por vía intranasal sólo con F1-V o con ratones inmunizados por vía intramuscular con F1-V adsorbido en Alhydrogel®. En la Figura 4 se muestran los resultados. Todas las combinaciones de Protollin y de F1-V fueron muy inmunogénicas y provocaron titulaciones de IgG en suero específicas contra F1-V de entre 1 y 9 mg/ml (Figura 4A). En ambos días del muestreo se observó una tendencia hacia titulaciones más bajas provocadas por las menores concentraciones de F1-V y/o Protollin, pero no se midieron diferencias significativas en las titulaciones de IgG específicas provocadas por cualquier combinación de concentraciones de F1-V y Protollin o las provocadas por inyección intramuscular de 20 µg de F1-V adsorbido en Alhydrogel (P > 0,05). Todas las titulaciones de IgG en suero específicas en ratones inmunizados con vacunas formuladas con F1-V fueron significativamente superiores a las titulaciones medidas en los animales que recibieron administración nasal de controles F1-V no formulados (P ≤ 0,001). En el suero de los ratones de control no se detectaron anticuerpos específicos contra F1-V.

Los niveles de anticuerpos anti-F1-V, anti-F1, y anti-V específicos presentes en las muestras de lavado de pulmón se determinaron por ELISA realizado de acuerdo con metodologías convencionales usando como antígenos proteínas de fusión F1-V, polipéptido F1 y polipéptido V (Instituto de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la Armada de los Estados Unidos). Las titulaciones de los anticuerpos IgG e IgA se determinaron en muestras individuales por ELISA como se ha descrito anteriormente (Plante y col., Vaccine 20:218 (2001)). En resumen, se revistieron placas de ELISA con F1-V, F1 o V a concentraciones predeterminadas. La unión de los anticuerpos se detectó con IgG o IgA anti-ratón

conjugado con HRP (peroxidasa de rábano picante). Los datos se expresan como medias geométricas de concentraciones de los anticuerpos en muestras individuales de ratón, y el significado de los datos se evalúa mediante análisis ANOVA usando comparaciones por parejas de Tukey-Kramer. Todos los grupos de ratones inmunizados por vía intranasal con antígeno F1-V más Protollin tenían elevadas titulaciones de IgA específico contra F1-V en pulmón como se muestra en la Figura 4B, lo que confirma que la inmunización por la vía mucosa (por ejemplo, intranasal) provoca de manera eficaz anticuerpos en las mucosas. El análisis ANOVA no indicó diferencias significativas en las titulaciones de IgA entre los grupos de ratones que se inmunizaron con diferentes combinaciones de F1-V más Protollin. Los animales que sólo recibieron F1-V no formulado por vía nasal apenas tenían niveles de IgA detectables. El IgA secretor no se detectó en muestras de ratones inyectados i.m. con F1-V adsorbido con Alhydrogel.

El suero y el líquido del lavado pulmonar de todos los ratones inmunizados con una dosis de 20 µg de antígeno F1-V se examinaron en un ELISA para determinar si los anticuerpos en suero se unen específicamente a F1 o a V o a ambos componentes. En todos los casos y en los dos tiempos del muestreo, se detectaron anticuerpos IgG en suero e IgA en líquido de lavado pulmonar que reconocían partes de F1 y de V del antígeno F1-V (Tabla 1). La unión de los anticuerpos del lavado pulmonar y del suero de los ratones inmunizados con composiciones de Protollin a las partes F1 y V del antígeno F1-V indican que las respuesta inmune se dirigió en primer lugar contra el componente V de la proteína de fusión F1-V (Tabla 1). Las muestra de lavado pulmonar también contenían titulaciones significativas de IgG específicas contra F1-V, aun cuando las titulaciones representaban únicamente un pequeño porcentaje de las titulaciones en suero (intervalo del 0,11 % - 0,56 %; media 0,175 %).

Tabla 1. Proporción de Anticuerpos Anti-F1 con respecto a anti-V en Suero y Líquido de Lavado Pulmonar de Ratones Inmunizados con Varias Formulaciones del Antígeno Pesticida F1-V

	F1-V + 2,5 µg de Protollin	F1-V + 1 µg de Protollin	F1-V + 0,25 µg de Protollin	F1-V i.n.	F1-V + Alhydrogel i.m.
IgG d35 en suero	0,31	0,30	0,34	0,31	0,65
IgG d55 en suero	0,25	0,26	0,33	0,58	0,29
IgA d35 en pulmón	0,42	0,39	0,33	No disponible	No disponible
IgA d55 en pulmón	0,49	0,29	0,32	No disponible	No disponible
IgG d35 en pulmón	0,40	0,53	0,44	No disponible	1,02
IgG d55 en pulmón	0,48	0,48	0,46	No disponible	1,03

Ejemplo 5

DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE CITOCINAS DESPUÉS DE LA INMUNIZACIÓN CON PROTOLIN:ANTÍGENO PESTICIDA

Para comparar el fenotipo (tipo 1 o tipo 2) de la respuesta inmune adaptativa provocada por la vacuna de Protollin administrada por vía intranasal o de F1-V inyectada con el adyuvante Alhydrogel®, se re-estimularon *in vitro* esplenocitos procedentes de grupos seleccionados de ratones inmunizados (véase el Ejemplo 4) con F1-V. Se agruparon bazos de cada grupo de ratones y se procesaron en suspensiones celulares simples de acuerdo con procedimientos convencionales. Después, las suspensiones de esplenocitos se incubaron con diferentes concentraciones de F1-V. Las citocinas liberadas en los sobrenadantes del cultivo se determinaron por ELISA cuantitativo usando kits OptEIA (BD Biosciences, San Jose, CA). Las cantidades de citocinas IFN-γ, TNF-α e IL-5 liberadas en los sobrenadantes del cultivo se determinaron. Los esplenocitos de ratones inmunizados por vía intranasal con F1-V (50 µg) mezclados con Protollin (1 µg) respondían a la re-estimulación *in vitro* secretando altos niveles de IFN-γ y de TNF-α; también se detectó una cantidad muy baja de IL-5. Por otro lado, los esplenocitos de ratones inmunizados mediante inyección de F1-V (20 µg) adsorbidos sobre Alhydrogel® respondieron secretando comparativamente menores cantidades de IFN-γ y TNF-α, aunque se detectó una cantidad significativa de IL-5. Por lo tanto, el perfil de citocinas provocado por la administración nasal de Protollin formulado (con adyuvante) con antígeno F1-V era coherente con la provocación de una respuesta inmune de tipo 1, mientras que el perfil de citocinas inducido por inyección i.m. del antígeno F1-V formulado con Alhydrogel® es más coherente con una respuesta sesgada hacia un fenotipo de tipo 2.

Ejemplo 6EXPOSICIÓN DE RATONES INMUNIZADOS CON *Y. PESTIS* VIVA AEROSOLIZADA

Este Ejemplo describe la protección inmune proporcionada por la inmunización intranasal con F1-V formulado con Protollin. Los ratones que recibieron F1-V combinado con Protollin se expusieron completamente a *Y. pestis* viva aerosolizada (véase el Ejemplo 4) El nivel de protección de la exposición indicado por la supervivencia de los animales se comparó con la protección de los ratones a los que se les inyectó F1-V adsorbido sobre Alhydrogel y los ratones que sólo recibieron administración intranasal de F1-V o sólo Protollin. A los 35 días y a una dosis de exposición a *Y. pestis* de DL₅₀169, todos los ratones inmunizados por vía intranasal con 5, 20 ó 50 µg de F1-V más 1 ó 2,5 µg de Protollin sobrevivieron, así como los ratones inyectados con F1-V adsorbido sobre Alhydrogel. La supervivencia de los ratones inmunizados por vía nasal con 5, 20 ó 50 µg de F1-V y 0,25 µg de Protollin fue del 90%, 100%, y 90% respectivamente, mientras que la supervivencia de los ratones inmunizados por vía nasal con la misma dosis de F1-V sin Protollin sólo fue del 30%, 40% y 40% respectivamente. Ninguno de los ratones del control que sólo recibieron Protollin sobrevivió más de 4 días después de la exposición. La supervivencia de todos los grupos de ratones inmunizados con F1-V formulado con Protollin fue muy significativa en comparación con la supervivencia de los ratones de control o ratones inmunizados sólo con F1-V ($P \leq 0,05$ o mejor usando el Ensayo de Probabilidad Exacto de Fisher). Los resultados de los ratones inmunizados con dosis de 20 µg de F1-V se muestran en la Figura 5A y los resultados de los animales inmunizados con dosis de 5 µg de F1-V se muestran en la Figura 5D.

Cuando los animales se expusieron el día 55 (Figura 5B), se obtuvieron resultados similares. Todos los ratones inmunizados con 2,5 µg de Protollin formulado con F1-V y los ratones inmunizados por inyección de F1-V adsorbido sobre Alhydrogel sobrevivieron a la exposición de *Y. pestis*. Todos los ratones inmunizados con 1 µg de Protollin formulado con 50 µg o 20 µg de F1-V también sobrevivieron, mientras que el 90% de los animales que recibieron todas las demás combinaciones de Protollin y F1-V sobrevivieron. En todos los ratones inmunizados con F1-V formulado (F1-V más Protollin), la protección observada fue muy significativa ($P \leq 0,01$ o mejor) en comparación con los ratones inmunizados con F1-V no formulado (10-30% de protección) o el grupo de ratones de control sólo con Protollin en el que ningún animal sobrevivió.

Los ratones inmunizados por vía nasal con 50 µg de F1-V con o sin 1 µg de Protollin o a los que se inyectaron 20 µg de F1-V adsorbido sobre Alhydrogel, se expusieron el día 55 por completo a exposición con *Y. pestis* viva aerosolizada a un valor DL₅₀ de 254. Los resultados se presentan en la Figura 5C. El 80 por ciento de los ratones que se inmunizaron con 50 µg de F1-V más 1 µg de Protollin sobrevivieron; el 60% de los ratones que se inmunizaron con 20 µg de F1-V adsorbido sobre Alhydrogel sobrevivieron y el 20% de los animales que sólo recibieron F1-V sobrevivieron a la exposición letal. Todos los ratones de control que sólo recibieron Protollin murieron. La inmunización con F1-V formulado indujo protección significativa contra la muerte en comparación con los ratones de control ($P \leq 0,001$ para F1-V más Protollin nasal; $P \leq 0,01$ para F1-V inyectado i.m.). La inmunización nasal con F1-V más Protollin ofreció protección significativa contra la muerte en comparación con la inmunización sólo con F1-V ($P \leq 0,05$). La supervivencia de los ratones inyectados con F1-V adsorbido sobre Alhydrogel no fue significativamente mejor que la supervivencia de los animales inmunizados por vía intranasal con F1-V sin Protollin ($P = 0,095$).

Ejemplo 7

PROTECCIÓN DE RATONES CON FORMULACIONES INMUNOGÉNICAS DE ÁNTRAX CON PROTOLLIN

En este Ejemplo, se evaluó Protollin formulado con Antígeno Protector (PA) de *Bacillus anthracis* (véase el Ejemplo 8) para determinar su capacidad para inducir una respuesta inmune ejemplificada por una reducción estadísticamente significativa en la destrucción de macrófagos mediada por el AP. Los ratones se inmunizaron por vía nasal los días 0 y 14 con 5 ó 25 µg de AP_r (List Biological Laboratories) mezclado con 1 µg de Protollin.

Se usó un protocolo ELISA convencional para detectar IgG e IgA I en muestras de suero y lavado pulmonar. En resumen, se añadieron diluciones en serie de las muestras de ensayo (suero y líquidos de lavado) a los pocillos de placas ELISA que se revistieron con AP_r purificado. Los anticuerpos específicos de antígeno que se adhirieron al antígeno inmovilizado se detectaron con un anticuerpo anti-ratón de región constante conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Después de la incubación del conjugado anticuerpo HRP, los pocillos se lavaron, se añadió sustrato TMB y la cantidad de anticuerpo HRP unido se detectó midiendo la adsorbancia a 490 nm. Las concentraciones de anticuerpos en las muestras de ensayo se calcularon a partir de curvas convencionales que se procesaron en paralelo, usando anticuerpos convencionales purificados para IgA e IgG. Los datos ELISA se expresaron como medias geométricas a niveles de confianza del 95% de acuerdo con un análisis estadístico usando datos logarítmicos transformados. Los animales que recibieron Protollin más AP mostraron niveles de IgG en suero e IgA en pulmón específicos anti-AP que fueron significativamente mayores a los de los ratones a los que se administró por vía intranasal sólo 5 ó 25 µg de AP_r ($p < 0,05$) (Figura 6A-B). Los niveles de IgA en la mucosa de los animales tratados sólo con Protollin o sólo con AP_r estaban por debajo del nivel de detección de este ensayo.

La capacidad de los anticuerpos anti-AP específicos para neutralizar la destrucción de macrófagos mediada por AP se evaluó usando un sistema de ensayo de cultivo celular usando muestras de líquido de lavado pulmonar y suero procedentes de los animales. Se sembraron en placas estériles de 96 pocillos macrófagos RAW264.7 (ATCC, Manassas, VA) (2×10^5 células por pocillo) y se incubaron a 37°C durante 24 horas en CO₂ al 5%. Se incubaron durante 1 hora las diluciones en serie de las muestras de suero y de lavado de pulmón procedentes de animales inmunizados con AP con una solución de AP (4 µg/ml en medio de cultivo celular rPMI complementado con suero bovino fetal al 10%) a 37°C, después de lo cual las mezclas se añadieron a los pocillos que contenían las células RAW264.7. Se añadió a los pocillos una solución de Factor Letal (FL) y las placas se incubaron a 37°C en CO₂ al 5% durante 4 horas. Después se añadió, a cada pocillo, una solución de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro difeniltetrazolio) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para medir la viabilidad celular y las placas se incubaron durante 4 horas a 37°C en CO₂ al 5%. La reacción se detuvo añadiendo SDS al 20% en DMF (dimetilformamida) al 50%, pH 4,3. La densidad óptica se mide con un lector de placa ELISA (Molecular Devices, Menlo Park, CA) a 570 nm (referencia a 690 nm). Este ensayo es lineal en las concentraciones celulares en el intervalo de 10^4 a 10^5 células/pocillo. La vacuna nasal, APr+Protollin, provoca niveles comparables de anticuerpos que neutralizan la actividad del APr así como la vacuna con adyuvante de alumbre IM (Figura 7).

Ejemplo 8

PREPARACIÓN DE FORMULACIONES DE LA VACUNA ÁNTRAX

Las vacunas nasales del ántrax con Protollin se fabrican mezclando antígenos AP de ántrax con Proteosoma preformado soluble más LPS (es decir, Protollin) antes de la inmunización. Los dos antígenos APr y APr-anclaje (APr con una secuencia de anclaje hidrófoba) se evalúan con varias formulaciones diferentes de Protollin para determinar la formulación (o formulaciones) con el antígeno inmunogénico preferido y los componentes de Protollin. Las formulaciones de control constan, por ejemplo, sólo de Protollin o están mezcladas con al menos uno y preferentemente dos antígenos de control, que incluyen una proteína estreptococal recombinante con o sin una secuencia de anclaje hidrófoba (anclaje). Por consiguiente, las formulaciones de Protollin que se evalúan tienen diferentes fuentes de LPS, proporciones variadas de Proteosoma:LPS y proporciones variadas de Protollin:antígeno APr. También se formula el APr-anclaje con proteínas de Proteosoma que tienen niveles muy bajos de LPS (<2% por peso) usando la metodología de diálisis o diafiltración descrita en el presente documento, que se diseña para eliminar o reducir la concentración de detergente en la cual se almacena el adyuvante de Proteosoma. Estas preparaciones de adyuvante de Proteosoma no tienen LPS exógeno añadido. Las preparaciones de Proteosoma usadas para formular Protollin como se describe en este ejemplo se han usado en muchos estudios pre-clínicos de toxicidad así como en ensayos clínicos humanos de Fase 1 y Fase 2 para evaluar la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de una vacuna nasal contra la gripe de Proteosoma.

El tipo y la fuente bacteriana preferida del LPS y la proporción preferida de la formulación PME:LPS se determina mediante estudios de inmunogenicidad. Después de la fermentación de la bacteria preferida, el LPS se purifica y se analiza. El LPS purificado se mezcla después con partículas de PME de Proteosoma a una proporción seleccionada para formar un complejo PME:LPS, Protollin. El grado de formación del complejo del LPS y las PME se determina de acuerdo con ensayos "libre frente unido" usando electroforesis capilar, estudios de "adición" de LPS y otros análisis practicados en la técnica. El Protollin se analiza para determinar el contenido de LPS usando KDO, RMN y PAGE con tinción de plata y se analizan para determinar el contenido de PME en el Proteosoma usando, por ejemplo, LC-MS, RP-HPLC, SDS-PAGE (tinción con Azul de Coomassie e Inmunotransferencia de Western usando anticuerpos monoclonales y policlonales), secuenciación N-terminal, análisis de aminoácidos, proteína total por Lowry o BCA y MALDI-TOFMS. La presencia de LPS, ácidos nucleicos y detergentes residuales se determina usando diversas técnicas que incluyen KDO para determinar el contenido en LPS y HPLC para determinar la presencia de detergente.

Ejemplo 9

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN SUERO Y EN LA MUCOSA

Se realizó un ELISA para determinar la inmunoglobulina total y las titulaciones de IgG, IgA e IgM específicos del Antígeno Protector (AP) de *B. anthracis* en muestras biológicas obtenidas de animales (ratones, conejos), inmunizados con las formulaciones inmunoestimuladoras o inmunogénicas del ensayo como se describe en el presente documento. Las muestras incluyen suero, lavados mucosos nasales y pulmonares. Se usó un protocolo ELISA convencional para determinar la linealidad, especificidad, sensibilidad y reproducibilidad. En breve, se añadieron diluciones en serie de las muestras de ensayo (líquidos de suero y lavado) a los pocillos de placas ELISA que se revistieron con APr purificado o sus derivados. Los anticuerpos específicos de antígeno que se adhieren al antígeno inmovilizado se detectan con anticuerpos de animales (por ejemplo y anticuerpos de región constante anti-conejo o anti-ratón) y conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) específicos del subtipo de anticuerpos. Después de una incubación de un conjugado de anticuerpo con HRP, los pocillos se lavan, se añade sustrato TMB y la cantidad de anticuerpo HRP unido se detecta midiendo la absorbancia a 490 nm. Las concentraciones de anticuerpos en las

muestras de ensayo se calculan a partir de curvas convencionales que se procesan en paralelo, usando anticuerpos convencionales para IgA, IgM y/o IgG (incluyendo isotipos de ratón IgG1 e IgG2a). Cuando es apropiado, los niveles de anticuerpos específicos en las muestras de líquido de lavado de mucosa se estandarizan y se normalizan expresando los anticuerpos específicos detectados en comparación con la cantidad total de IgA o IgG en la muestra. Los datos ELISA se expresan como medias geométricas a niveles de confianza del 95% de acuerdo con un análisis estadístico usando datos logarítmicos transformados.

Ejemplo 10

ENSAYO DE PROTECCIÓN DE MACRÓFAGOS PARA EVALUAR ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES DE ÁNTRAX

Este Ejemplo describe un ensayo que se usa para medir anticuerpos neutralizantes de animales inmunizados con vacunas de Proteosoma. Los ensayos *in vitro* se diseñan para medir la inhibición de la citotoxicidad de la toxina del ántrax por muestras de suero obtenidas de animales inmunizados. En una placa de 96 pocillos, se añaden diluciones en serie de las muestras de suero en combinación con cantidades letales de AP de ántrax y Factor Letal (FL) (List Biological Laboratories, Cambell, CA) a células de macrófagos J774A.1 u otra línea celular de macrófagos durante 3 horas a 37°C. La viabilidad celular se mide cromatográficamente añadiendo una solución de un décimo de volumen de 5 mg/ml de MTT. Después de una incubación de 4 horas a 37°C, las placas de ensayo se analizan espectrofotométricamente a 570 nm usando un lector de placa ELISA (Molecular Devices, Menlo Park, CA). El ensayo es lineal para las concentraciones celulares en el intervalo de 10^4 a 10^5 células/pocillo.

Ejemplo 11

ENSAYO DE INMUNIDAD MEDIADO POR CÉLULAS PARA EVALUAR LA INMUNIZACIÓN CONTRA EL ÁNTRAX

Las respuestas inmunes celulares que se inducen después de la inmunización con las vacunas AP basadas en Proteosoma se estudian usando una diversidad de procedimientos. Por ejemplo, Las citocinas derivadas de células T se ensayan sobre células T purificadas o enriquecidas re-estimuladas con AP aisladas de bazo y/o de ganglios linfáticos mediastinales de ratón. La presencia y los niveles de citocinas de Tipo 1 (por ejemplo IFN- γ) y de Tipo 2 (por ejemplo, IL-4 e IL-5) se determinan mediante uno o más procedimientos que incluyen ELISA, ELISPOT. La presencia y los niveles de citocinas intracelulares se determinan mediante procedimientos de citometría de flujo convencionales. Las técnicas que miden la proliferación de células T de CMSP (células mononucleares de sangre periférica) re-estimuladas con AP se usaron para evaluar respuestas inmunes mediadas por células en conejos debido a la no disponibilidad de reactivos que sean específicos para citocinas de conejo.

Los ensayos de proliferación de linfocitos T se usan para medir el efecto de inmunización sobre la expansión clonal y determinar la presencia de linfocitos de memoria en animales de diversos modelos de animales. Después del sacrificio del animal, los ganglios linfáticos mediastinales y cervicales se eliminan quirúrgicamente usando técnicas convencionales, los linfocitos se aíslan y después se cultivan con y sin AP. La proliferación se mide mediante la captación de timidina tritiada. Las células procedentes de animales inmunizados con una vacuna simulada se usarán como controles negativos. Los resultados del ensayo se usan para determinar el efecto de inmunización sobre la diferenciación de las células T en los ganglios linfáticos, particularmente en relación con la inmunidad de la mucosa. Los resultados también se correlacionan con la eficacia de la inmunización determinada en estudios de animales expuestos a ántrax.

Ejemplo 12

PROCEDIMIENTOS PARA RECOGER LAVADO NASAL Y PULMONAR

Para analizar la respuesta inmune frente a formulaciones inmunoestimuladoras o inmunogénicas se recogieron lavados pulmonares y nasales de ratones y conejos. En ratones, los lavados nasales y pulmonares se realizaron canulando la traquea y bombeando 1 ml de PBS complementado con albúmina de suero bovino al 0,1% e inhibidores de proteasa (Coctel Inhibidor de Proteasa de Uso General; Sigma-Aldrich Chemicals que contenía AEBSR 0,2 mM, 1 μ g/ml de aprotinina, 3,25 μ M de bestatina, 10 μ M de leupeptina) hacia arriba a través de la traquea. El líquido emergente de los orificios nasales se recogió, se sometió a agitación vorticial y después se centrifugó para eliminar los residuos titulares y celulares. Los sobrenadantes se almacenaron a -70°C. Se reinsertó una cánula en la traquea y se dirigió hacia el pulmón para recoger los líquidos pulmonares. Los pulmones se lavaron dos veces con PBS complementado con 1,0 ml de proteasa; el líquido se recogió y se sometió a agitación vorticial y los residuos celulares se eliminaron por centrifugación. Los lavados pulmonares y nasales se almacenan a -70°C. Los fluidos de las mucosas de conejos se recogieron de manera similar, ajustando los volúmenes según sea apropiado. En algunos experimentos, después de recoger las muestras de la mucosa, los ganglios linfáticos cervicales y mediastinales se extrajeron quirúrgicamente y las células mononucleares se aislaron y se cultivaron para realizar ensayos de anticuerpos por ELISPOT, de citocinas y de CMI (concentración mínima inhibitoria) como se describe en el presente documento.

Ejemplo 13

PROVOCACIÓN DE INMUNIDAD INNATA EN CONEJOS CON PROTOLLIN

El Protollin tiene actividad adyuvante relacionada con Proteosomas y con LPS. Se determinó la capacidad del Protollin sólo (sin antígeno) para estimular la inmunidad innata contra la exposición con aerosol a diversos patógenos, tales como *Chlamydia trachomatis* o *Bacillus anthracis*. Los conejos se exponen mediante aerosol con DL₅₀ de 100 ó 200 de esporas de ántrax a los pocos días o más después de recibir Protollin. Los conejos que sobreviven a la exposición con ántrax se inmunizan de nuevo con Protollin para determinar si la protección puede prolongarse o reestimarse la inmunidad innata.

Ejemplo 1410 INDUCCIÓN DE UNA RESPUESTA INMUNE POR FORMULACIONES PROTEOSOMA:LPS CONTRA LA EXPOSICIÓN A *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

El LPS de *Chlamydia* está muy conservado entre las diversas cepas de *Chlamydia* y los datos sugieren que los anticuerpos específicos para los LPS específicos del género *Chlamydia* pueden proteger contra la infección por *Chlamydia* (Peterson et al., Infect. Immun. 66: 3848, 1998). EL LPS de *Chlamydia* se produjo en una *Escherichia coli* recombinante que sintetiza LPS de *E. coli* y un mutante basto de "tipo Chlamydia" (LPSr) en las mismas proporciones (LPSr C.t./E. coli) (adquirido en GlycoTech, Kukels, Alemania). Para la infección con *Chlamydia* se usó un modelo pulmonar murino para evaluar la respuesta inmune efectuada por LPSr C.t./E. coli formulado con Protollin.

Las composiciones de Proteosoma:LPS se prepararon usando un procedimiento de diálisis con LPSr C.t./E. coli. Se añadieron sólo Proteosomas (solubilizados en detergente Empigen® BB al 0,1%) o solubilizados con LPS (solubilizado en detergente Empigen® BB al 1%) a una concentración final de 1 mg/ml de Proteosomas a un tubo de diálisis SpectraPor® con un PM límite de 1.000. La diálisis se realizó frente a una solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 10 días o más. La duración de la diálisis puede ajustarse para conservar cantidades de detergente que varían en la formulación de vacuna incluyendo, por ejemplo, concentraciones de 250, 500, 750, 1000 ppm o más o incluso menores cantidades (por ejemplo, 50 ppm). La concentración de LPS en las muestras dializadas se determinó midiendo 3-Desoxi-D-manno-octulosonato y la concentración de proteína se determinó usando el procedimiento de Lowry convencional. Una mezcla de Proteosomas y de LPSr C.t./E. coli antes de la diálisis era aproximadamente a una concentración de 1:2,7 (peso de Proteosomas:peso de LPSr C.t./E. coli), que dio como resultado una proporción de aproximadamente 1:1,8 después de la diálisis. Una mezcla de Proteosomas y de LPS de *E. coli* antes de la diálisis era de 1:1,35 y fue aproximadamente de 1:1,4 después de la diálisis.

Para determinar si el LPS de *Chlamydia* proporcionado en una formulación de proteosoma es capaz de proteger a ratones específicamente contra una exposición bacteriana de *Chlamydia* viva, se anestesiaron grupos de 16 ratones (de 6-8 semanas de edad) y después se inmunizaron por vía intranasal los días 0 y 22 con Proteosoma:LPSr C.t./E. coli. Los ratones también se trataron con Proteosoma:LPS de *E. coli*, o Proteosoma:LPS de *Plesiomonas shigelloides*. Las formulaciones de Proteosoma:LPS se proporcionaron en las proporciones y dosis de Proteosoma:LPS descritas en la Tabla 2. Otros grupos de ratones recibieron 400 unidades infecciosas (UIF) de extracto de células CT MoPn (control positivo) o HeLa (control negativo; correspondiente al volumen de extracto requerido para purificar 400 UIF de cepas de neumonitis de ratón de *C. trachomatis* (CT MoPn) cultivadas en células HeLa infectadas) como una sola dosis el día 0. Todas las inmunizaciones se proporcionaron en volúmenes de 25 µl (12,5 µl/fosa nasal)

La sangre se recogió asépticamente de los senos retroorbitales de cada ratón los días 1 y 30. Se realizaron lavados broncoalveolares el día 30 en 6 ratones por grupo. El día 34, a cada uno de los 10 ratones/grupo restantes se les proporcionó una exposición intranasal con 5.000 UIF de CT MoPn vivas. Diariamente se midieron los pesos corporales de estos ratones durante 10 días consecutivos. Se realizó la exanguinación cardiaca y la recogida pulmonar en los ratones sacrificados durante este periodo de 10 días. La cantidad de UIF de *Chlamydia* en los pulmones se determinó aplicando muestras de pulmón y lavado a células HeLa e identificando los cuerpos elementales (CE) de *Chlamydia* usando anticuerpos monoclonales fluorescentes específicos anti-*Chlamydia*.

Los ratones que se inmunizaron por vía nasal con 400 UIF de CT MoPn (grupo 2 Ct400) estaban muy protegidos contra la pérdida de peso corporal (pérdida máxima de PC) (Tabla 3; P= 0,001326). Ninguno de los ratones en este grupo tenía *C. trachomatis* detectable en sus pulmones (Tabla 4; P = 4 x 10⁻⁹) hasta diez días después de la exposición intranasal con 5.000 UIF de CT MoPn. Cinco ratones de Control que recibieron extracto de células HeLa (grupo 1 HELA) no se protegieron de la exposición letal como se muestra por la elevada pérdida máxima de peso corporal (% de reducción) y elevadas titulaciones de unidades infecciosas por *Chlamydia* (UIF) en los pulmones (Tablas 3 y 4). Los ratones tratados con preparaciones de proteosoma que contenían LPS de *Chlamydia* y también LPS de *E. coli* o de *P. shigelloides*, mostraron una protección significativa contra la pérdida de peso y el crecimiento bacteriano (Tablas 3 y 4).

Para investigar si la protección puede deberse, al menos en parte, a anticuerpos LPS específicos anti-*Chlamydia*, se

determinó por ELISA la presencia de anticuerpos específicos contra *Chlamydia* en suero y pulmón de ratones inmunizados usando células de *Chlamydia* completamente inactivadas como la fuente de antígeno. El suero se obtuvo de animales inmunizados con 5 vacunas de proteosoma-LPS 2 semanas después de la segunda inmunización el día 22. Los sueros de animales inmunizados con extracto de células HeLa o CT-MoPn se obtuvieron el día 30 después de la primera y única inmunización. Los resultados presentados en la Tabla 2 demuestran que los anticuerpos presentes en suero y pulmón de los animales que habían recibido Proteosomas formulados con LPS de *Chlamydia* se unían a todas las células de *Chlamydia*.

Para determinar si los anticuerpos que se unían a *Chlamydia* reaccionaban en cruzado con epítopes presentes en LPS de *E. coli* y LPS de *P. shigelloides*, también se determinó por ELISA la unión de los anticuerpos en sueros y pulmones de los animales tratados a estos tipos de LPS. Los resultados presentados en la Tabla 2 demuestran que los anticuerpos en los sueros de ratones inmunizados con cada uno de los tipos de LPS específicos en las formulaciones Proteosoma:LPS se unen solamente a los correspondientes LPS. Únicamente los anticuerpos de los animales inmunizados con LPS de *Chlamydia* formulados con Proteosomas se unen a todas las células de *Chlamydia*. El proteosoma formulado sólo con LPS de *E. coli* o *P. shigelloides* no se unen a todas las células de *Chlamydia*; sin embargo, estas preparaciones protegen significativamente a los ratones contra la exposición a *Chlamydia* (véanse las Tablas 3 y 4).

Tabla 2. Inmunogenicidad de las Composiciones de Protollin Administradas por Vía Intranasal a Ratones BALB/c

Grupo	Antígenos ⁽¹⁾	Proporción del Nivel de Dosis µg de Proyuvante: µg de LPS	Titulaciones de Ab anti-LPS en suero ⁽²⁾			Titulaciones de CE Anti-C. tr. MoPn (ng/ml)		
			LPSr de C.t. / E. coli	LPS de E. coli	LPS de P. shig.	Suero ⁽³⁾		Pulmón ⁽⁴⁾
						IgG	IgA	IgG
1	Extracto de células HeLa	No aplicable	-	-	-	<40	<12	<2
2	CE vivos en CT-MoPn	400 UIF	1280	-	-	10.906	669	173
3	LPS de <i>E. coli</i>	12 : 8	160	1280	-	<40	378	<2
4	LPSr de C. t./E.coli	1,5 : 1	640	40	-	3.158	1532	109
5	LPSr de C. t./E.coli	1,6 : 8 1: 5	320	-	-	2.187	404	15
6	LPS de <i>P. shigella</i>	10 : 8,6 1: 1	-	-	>> 2560	<40	<12	<2

(1) Las inmunizaciones intranasales (25 µl, 12,5 µl/fosa nasal) se proporcionaron una vez el Día 0 al Grupo 1 (células HELA) y al grupo 2 (*Chlamydia trachomatis*) o se proporcionaron dos veces, el Día 0 (proporción superior) y el Día 22 (proporción inferior) al grupo 3-6 (vacunas proteosoma:LPS) a ratones anestesiados (16 ratones/grupo)

(2) Las titulaciones de anticuerpos anti-LPS en suero (grupos de 6 ratones) obtenidas 5 semanas (día 30) después de la primera inmunización (2 semanas después de la segunda inmunización con vacunas proteosoma-LPS) se expresan como dilución que proporcionaron una D.O. a 450 nm aproximadamente dos veces mayor que el fondo.

(3) No se detectó IgA anti-*Chlamydia* en suero independiente del antígeno usado para la inmunización.

(4) Para los grupos 1 y 2, se analizaron grupos de pulmones homogeneizados. Para los grupos 3-6, se analizaron grupos de lavados pulmonares. Los pulmones y los lavados pulmonares se obtuvieron el día 30.

“-“: No se detectaron anticuerpos.

Tabla 3. Reducción del Porcentaje del Peso Corporal (Pérdida Máxima) Después del Segundo Tratamiento

Grupo	1	2	3	4	5	6
	HeLa	Ct400	Ec12:8	Ct12:8	Ct1,6:8	Ps10:9
Nº de Ratón en el Grupo						
1	29,3	2	10,6	11,2	11,7	15,5
2	19,4	1,1	32,6	8,7	7,4	1,7
3	35,5	9,8	15,1	5,8	18	11,4
4	28,6	16,9	16,2	7	20,5	14,2
5	28,3	14,5	37,7	16,4	7	7
6	30,3	17,6	17,5	11,7	12,3	8,1
7	36,9	6,8	5,9	36,8	4,2	6,2
8	23,1		3,1	8,4	41,2	7,9
9	25,7	9	8,9	4,5	24,2	9,1
10	26,2	20,9	28,6	2,6	8,5	13,5
Media del grupo	27,88	7,89	13,85	8,79	12,56	8,25
Log Ensayo-t frente HeLa		0,001326	0,014	0,000124	0,00224	1,727 x10 ⁻⁵

Tabla 4. UIF de *C. trachomatis* en el Pulmón después del Segundo Tratamiento

Grupo	1	2	3	4	5	6
	HeLa	Ct400	Ec12:8	Ct12:8	Ct1,6:8	Ps10:9
Nº de ratón en el Grupo						
1	48500	9	9	9	9	1100
2	51300	9	91000	9	9	9
3	1100	9	9	9	14900	290
4	6000	9	2250	9	1500	9
5	200	9	24400	9	9	9
6	35000	9	500	3150	9	9
7	47000	9	9	46500	9	9
8	1300	9	9	9	29400	320
9	63000	9	9	9	16300	9
10	77000	10	1900	9	9	5000
Media del grupo	11304,14	9,10	221,18	38,02	149,81	55,38
Log Ensayo-t frente HeLa		4 x 10 ⁻⁹	0,0088	0,00015	0,0050	6,71 x 10 ⁻⁵
Ct400 – <i>Chlamydia</i> ; Ec12:8 – LPS de <i>E.coli</i> ; Ct12:8 o Ct1,6:8 – LPS de <i>Chlamydia/E. coli</i> ; y Ps10:9 – LPS de <i>P. shigelloides</i> .						

Ejemplo 15**DURACIÓN DE LA PROTECCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA CONTRA CHLAMYDIA**

Se examinó la longevidad de la protección no específica inducida por composiciones inmunoestimuladoras, tales como Proteosoma:LPS (Proteollin) o Proteosomas (proyuvante). Se trataron grupos de 10 ratones los Días 0 y 22 con (a) sólo Proteosomas (Prot10), (b) Proteosomas formulados con LPS de *E. coli* (Ec10:14); (c) Proteosomas formulados con LPS de *C.tr./E. coli* (Ct10:18); (d) Proteosomas formulados con LPS de *P. shigelloides* (Ps10:12); (e) infección con *Chlamydia* viva (800 UIF) (CT800); o (f) infección simulada en células HeLa (HeLa). Para cada tratamiento, se expusieron grupos de ratones diferentes a bacterias viables de *Chlamydia* a las 2, 5, 8 u 11 semanas después del segundo tratamiento. La protección se evaluó determinando la pérdida máxima de peso corporal (reducción en %) y determinando las UIF de *Chlamydia* en el pulmón de cada ratón (designado por el n° de ratón en el Grupo). Los datos se representan en las Tablas 5-12.

Como se describe en el Ejemplo 14, el tratamiento con cada una de las formulaciones de Proteosoma:LPS o inmunización con *Chlamydia* viva proporciona una protección significativa en comparación con los grupos de control de las células HeLa como se indica mediante la prevención de la pérdida de peso y/o reducción de las titulaciones bacterianas en el pulmón. La protección de los animales tratados sólo con Proteosomas se perdió durante aproximadamente 5 semanas después de la segunda inmunización. Se realizó un ensayo con esplenocitos de ratón para determinar la respuesta proliferativa de las células T después de la re-estimulación con antígeno de *Chlamydia*. Los bazo de cada grupo de ratones se agruparon y se procesaron en suspensiones celulares únicas de acuerdo con procedimientos convencionales. Las suspensiones celulares esplénicas se incubaron después con diferentes concentraciones de antígeno de *Chlamydia*. Las citocinas (IFN- γ , IL-10, IL-2 y TNF- α) liberadas en los sobrenadantes del cultivo se determinaron mediante ELISA cuantitativo usando kits OptEIA (BD Biosciences, San Jose, CA). En estos experimentos no se observaron respuestas de células T esplénicas específicas de *Chlamydia* inducidas por las formulaciones de Proteosoma: LPS en ratones inmunizados. En ausencia de anticuerpos específicos de *Chlamydia* o de respuestas de células T específicas de antígeno en estos animales inmunizados, se aconseja una función para la inmunidad independiente de antígeno (innata), no específica como un mecanismo para la protección de ratones de la infección pulmonar por *Chlamydia*. De manera similar, en el experimento descrito en el Ejemplo 14, se observó una respuesta a células T específica de antígeno sólo en animales que recibieron bacterias de *Chlamydia* y no en animales que recibieron cualquiera de las formulaciones de Proteosoma:LPS.

Tabla 5. Pérdida Máxima de Peso Corporal Medida Después de la Exposición 2 Semanas Después de la Segunda Inmunización

Grupo	1	2	3	4	5	6
	HeLa	CT800	Ec10:14	Ct10:18	Ps10:12	Prot10
Nº de ratón en el Grupo						
1	33,6	17	37	23,6	35	30,3
2	34,4	12,7	17,4	34,1	14,6	15,6
3	41,1	13	23,2	8,3	2,8	31,7
4	36,5	13,9	29,3	8,1	9,4	38,7
5	29,1	5,8	22	16,7	15,2	25
6	41,1	12,1	30,1	10,8	11,7	26,8
7	38,1	10,9	12,3	7,6	10,7	15,5
8	34,3	2,9	34,5	8,1	10,2	25,3
9	30,1	21,4	15	4,4	14,3	19,9
10	30,5	19,2	23,6	39,4	22,6	23,5
Media del grupo	34,64	11,35	23,11	12,64	12,38	24,28
Log del ensayo-t frente a HeLa		$1,83 \times 10^{-5}$	0,003578	0,000393	0,000123	0,00253

Tabla 6. UIF de *Chlamydia* en Pulmón Cuantificadas Después de la Exposición 2 Semanas Después de la Segunda Inmunización

Grupo	1	2	3	4	5	6
	HeLa	CT800	Ec10:14	Ct10:18	Ps10:12	Prot10
Nº de ratón en el Grupo						
1	465000	9	368000	41700	5300000	100000
2	4920000	9	25600	4200000	20000	9
3	1170000	9	725000	9	9	1200000
4	2270000	9	1510000	9	9	100000
5	497000	9	128000	272000	58100	72400
6	8660000	9	124000	69000	9	114000
7	2010000	9	60800	9	9	9
8	273170	9	1180000	9	9	437000
9	70100	9	44200	9	27100	33000
10	456000	10	52700	2850000	69500	28900
Media del grupo	925084,91	9,10	175269,07	1880,56	962,86	17882,17
Log del ensayo-t frente a HeLa		$1,6705 \times 10^{-15}$	0,019655	0,00418	0,000736	0,010898

Los valores de 9 y 10 se usaron para cálculos fuera del ensayo; sin embargo, no se detectó *Chlamydia*

Tabla 7. Pérdida Máxima de Peso Corporal Medida Después de la Exposición 5 Semanas Después de la Segunda Inmunización

Grupo	1	2	3	4	5	6
	HeLa	CT800	Ec10:14	Ct10:18	Ps10:12	Prot10
Nº de ratón en el Grupo						
1	24,1	12,9	8,9	37,2	20,7	11,6
2	31,7	20,4	8,2	12,1	28,6	11,3
3	31,5	13,5	32,7	24,9	13,5	19,8
4	39,4	15,5	15,2	14,5	18,9	26,3
5	40,9	12,1	22,5	26,2	25,8	32,2
6	33,8	4,7	30,2	26,1	24,3	11,2
7	25,7	28,9	2,5	25,1	15,2	20,9
8	23,3	17,4	38,3	18,5	5,2	15,3
9	40,1	11,8	24,6	15,9	10,4	37
10	39,4	13,4	13,5	38,9	10,8	8,3
Media del grupo	32,31	13,79	15,47	22,41	15,58	17,31
Log del ensayo-t frente a HeLa		$5,9122 \times 10^{-5}$	0,01443	0,018168	0,000717	0,002056

Tabla 8. UIF de *Chlamydia* en Pulmón Cuantificadas Después de la Exposición 5 Semanas Después de la Segunda Inmunización

Grupo	1	2	3	4	5	6
	HeLa	CT800	Ec10:14	Ct10:18	Ps10:12	Prot10
Nº de ratón en el Grupo						
1	61200	9	9	573000	29200	9
2	1220000	9	9	172000	38900	9
3	4620	9	75600	686000	20000	96900
4	2570000	9	41900	97000	26300	217000
5	5910000	9	62300	181000	40000	121000
6	1420000	9	9710000	863000	69300	9
7	200000	9	9	157000	82800	52300
8	9	9	7000000	9	9	83300
9	538000	9	889000	9	9	339000
10	889000	10	9	409000	9	9
Media del grupo	151583,48	9,10	6156,61	37381,58	3162,18	2749,09
Log del ensayo-t frente a HeLa		$4,179 \times 10^{-7}$	0,1725	0,4684	0,0456	0,0615
Los valores de 9 y 10 se usaron para cálculos fuera del ensayo; sin embargo no se detectó <i>Chlamydia</i>						

Tabla 9. Pérdida Máxima de Peso Corporal Medida Después de la Exposición 8 Semanas Después de la Segunda Inmunización

Grupo	1	2	3	4	5	6
	HeLa	CT800	Ec10:14	Ct10:18	Ps10:12	Prot10
Nº de ratón en el Grupo						
1	35,1	9	23,7	7,5	14	35,6
2	34	10,2	11,6	10,8	26,9	25,6
3	16,1	7,6	21,2	9,9	12,8	31,7
4	15,2	13,2	8,7	18,1	21,9	25,2
5	34,7	18,7	15,9	18,1	17,5	9,5
6	36,4	8,2	34,9	6	24,5	20,3
7	32,2	12,4	10,6	11,7	27,4	33,2
8	33,5	20,8	26,4	26,2	6,7	25,5
9	32,1	10,2	9,7	5,1	16,7	15,3
10	38,6	13,9	7,7	18,7	14,4	13,6
Media del grupo	29,46	11,78	15,03	11,65	16,98	21,84
Log del ensayo-t frente a HeLa		$9,657 \times 10^{-6}$	0,00314	0,000218	0,00505	0,1013

Tabla 10. UIF de *Chlamydia* en Pulmón Cuantificadas Después de Exposición 8 Semanas Después de la Segunda Inmunización

Grupo	1	2	3	4	5	6
	HeLa	CT800	Ec10:14	Ct10:18	Ps10:12	Prot10
Nº de ratón en el Grupo						
1	6840000	9	11200	9	92400	355000
2	226000	9	9	129000	257000	157000
3	9	9	14200	9	9	4260000
4	9	9	3340	137000	5770	69200
5	2040000	9	57700	352000	15600	6650
6	$5,33 \times 10^7$	9	1710000	3530	18500	198000
7	1210000	10000	9	9	345000	7140000
8	$1,44 \times 10^7$	9	28200	15300	3040	124500
9	667000	9	9	9	47300	163000
10	2210000	9	9	18800	16700	65600
Media del grupo	226134,74	18,15	1255,06	1451,26	14026,81	214441,56
Log del ensayo-t frente a HeLa		$9,626 \times 10^{-5}$	0,0344	0,0395	0,1809	0,978

Los valores de 9 y 10 se usaron para cálculos fuera del ensayo; sin embargo no se detectó *Chlamydia*

Tabla 11. Pérdida Máxima de Peso Corporal Medida Después de la Exposición 11 Semanas Después de la Segunda Inmunización

Grupo	1	2	3	4	5	6
	HeLa	CT800	Ec10:14	Ct10:18	Ps10:12	Prot10
Nº de ratón en el Grupo						
1	28,3	11,3	11,5	18,2	21,2	16,9
2	19,9	7,9	21,1	32,7	15,8	22,5
3	29,4	8,6	22,6	25,5	24,8	16,8
4	39,3	13,2	9	23,3	8,8	33,3
5	30,7	15,7	6,2	23,7	5,3	16,1
6	19	15,1	39,1	38,4	6,8	35,7
7	38,8	12,4	22,3	25,6	12,5	38
8	34	17,7	15,8	28,6	15,5	27,9
9	19,7	15,5	24	24,6		18,5
10	27,2	13,3		38,1		26,9
Media del grupo	27,72	12,69	16,70	27,19	12,26	24,04
Log del ensayo-t frente a HeLa		$3,74 \times 10^{-6}$	0,02195	0,8653	0,000739	0,30697

Tabla 12. UIF de *Chlamydia* en Pulmón Cuantificadas Después de Exposición 11 Semanas Después de la Segunda Inmunización

Grupo	1	2	3	4	5	6
Nº de ratón en el Grupo	HeLa	CT800	Ec10:14	Ct10:18	Ps10:12	Prot10
1	192000	9	9	2310	29100	9
2	9090	9	153000	576000	17500	28300
3	476000	9	338000	20800	17900	5000
4	2225000	9	38000	31700	9	2100000
5	2890000	9	8000	5000	9	100000
6	21800	9	2500000	414000	9	3270000
7	$1,12 \times 10^7$	9	6430	10000	30800	3330000
8	$4,17 \times 10^7$	9	18600	45000	30000	95500
9	17500	9	37400	11400		10000
10	216000	10		680000		1500000
Media del grupo	427705,51	9,10	22671,14	38034,29	1254,65	72783,09
Log del ensayo-t frente a HeLa		$5,44 \times 10^{-10}$	0,0597	0,0421	0,00259	0,268
Los valores de 9 y 10 se usaron para cálculos fuera del ensayo; sin embargo no se detectó <i>Chlamydia</i>						

Ejemplo 16**5 EL PROTOLLIN ESTIMULA LA INMUNIDAD INNATA PROTECTORA CONTRA LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE**Experimento 1

Se administró a los ratones una sola dosis de Protollin intranasal (que contenía aproximadamente 5 µg de PME de *Neisseria* y de LPS de *S. flexneri cada uno*) los días 1, 2 ó 3 antes de la exposición intranasal al virus de la gripe A/H3 adaptado para ratón a una DL₅₀ de 25 (Hong Kong). El virus se propagó de acuerdo con procedimientos convencionales (la semilla de trabajo original fue un generoso regalo del Dr. Phil Wyde (Universidad de Baylor, Waco, TX)). Los ratones se pesaron antes de la exposición y después de cada 2 días durante un total de 14 días. La morbilidad se evaluó pesando a los supervivientes individuales y expresando el cambio de peso como el porcentaje de peso el día de la exposición (véase la Figura 8B). También se registró el día de cualquier muerte (véase la Figura 8A). Todos los ratones que recibieron Protollin 3 días antes de la exposición sobrevivieron y también carecían de morbilidad aguda (la pérdida de peso máxima fue del 7%). Se observó el 70% de supervivencia en los grupos de animales que recibieron Protollin 1 ó 2 días antes de la exposición; sin embargo, en los dos grupos los animales sufrieron una pérdida de peso del 15-18%. El significado estadístico del retraso del tiempo de muerte para cada grupo en su conjunto se evaluó por el ensayo de rango con signo de Wilcoxon. Todos los ratones que recibieron Protollin 72 horas antes de la exposición sobrevivieron. En comparación con los datos de supervivencia para el grupo de control negativo (sin Protollin), la supervivencia de los ratones que recibieron Protollin el día 3 antes de la exposición fue muy significativa ($P \leq 0,001$; Ensayo de Probabilidad Exacto de Fisher). El 70% de los ratones que recibieron Protollin los días 1 ó 2 antes de la exposición sobrevivieron ($P \leq 0,07$ en comparación con el grupo de control negativo). Aunque el número total de supervivientes en estos dos grupos no fue significativamente diferente del número de supervivientes en el grupo de control, el momento de la muerte se prolongó significativamente en ambos grupos en comparación con los ratones de control ($P \leq 0,05$ o $\leq 0,01$ respectivamente en los grupos que recibieron Protollin 1 ó 2 días antes de la exposición).

La morbilidad se controló en todos los grupos de ratones supervivientes, usando la pérdida de peso corporal (con respecto al día de la exposición) como un criterio de morbilidad resultante de la infección. Todos los ratones perdieron peso durante el periodo de control aunque los ratones que obtuvieron Protollin perdieron menos peso que los ratones de control que recibieron PBS. La pérdida de peso también dependía del tiempo entre la administración de Protollin y la

exposición. Los ratones que recibieron Protollin 3 días antes de la exposición perdieron menos peso que los que recibieron Protollin 2 días antes de la exposición y los animales que recibieron Protollin 2 días antes de la exposición perdieron menos peso que los que recibieron Protollin un día antes de la exposición. . Hasta el día 8 (tiempo después del cual el número de supervivientes limitado en el grupo control hace que las comparaciones estadísticas no sean fiables), los ratones de control pierden significativamente más peso que los ratones que reciben Protollin (los días 4 y 6 después de la exposición, $P \leq 0,01$ frente a todos los ratones que reciben Protollin; el día 8 después de la exposición, $P \leq 0,01$ y $P \leq 0,05$, respectivamente, frente a ratones que reciben Protollin 3 días o 2 días antes de la exposición). Estos resultados demuestran que Protollin induce respuestas innatas que protegen a los ratones contra la muerte después de la exposición letal al virus vivo y reduce significativamente la morbilidad asociada a la infección.

10 Experimento 2

Además, se analizó la duración de la protección dentro de un intervalo de dosis limitante. Se administró una sola dosis de 3, 1 ó 0,3 μg de Protollin a grupos de ratones (10 animales por grupo) los días 15, 12, 9, 6 ó 3 antes de la exposición con una DL_{50} de 25 de un virus de la gripe A/H3 adaptado a ratón. Los indicadores de los criterios humanos para este experimento se basaron en el peso corporal, aspecto y comportamiento. Los animales se puntuaron de 0 a 3 en cada categoría de la siguiente manera. Para el peso corporal, una puntuación de 0 indica sin pérdida de peso corporal desde el inicio de estudio; 1 indica el 10% o menor de pérdida de peso desde el inicio del estudio; 2 indica una pérdida de peso del 11-19% desde el inicio del estudio y 3 indica una pérdida de peso del 20% o más desde el inicio del estudio. Para el aspecto, una puntuación de 0 indica un aspecto normal; una puntuación de 1 indica pelaje erguido; una puntuación de 2 indica pelaje erguido grasiento, supuración nasal y/u ocular; una puntuación de 3 indica dorso encorvado, deshidratación grave. Para el comportamiento, una puntuación de 0 indica comportamiento normal; una puntuación de 1 indica forma de andar anómala y debilidad; una puntuación de 2 indica actividad disminuida, temblores graves y una puntuación de 3 indica inactividad. Se sacrificó a los ratones con una puntuación de 3 o más en los síntomas individuales o combinados.

Todos los ratones en el grupo de control (sin Protollin) y en los grupos que reciben 0,3 μg de Protollin alcanzan los criterios de valoración 6 días después de la exposición y se sacrificaron. De los animales que recibieron 1 μg de Protollin, todos se sacrificaron 6 días después de la exposición excepto los animales del grupo que recibieron la dosificación 3 días antes de la exposición, en los que 5 ratones sobrevivieron hasta 8 días después de la exposición. En comparación con el grupo de control, la supervivencia de los animales en este grupo constituyó un retraso significativo del momento de la muerte ($P < 0,05$ para el grupo como un conjunto).

En los grupos que recibieron 3 μg de Protollin, el 30% de los animales que recibieron la dosificación 6 días antes de la exposición sobrevivieron al estudio; el 70% restante alcanzó los criterios de valoración entre los 6 y 8 días después de la exposición. Aunque estos resultados sugieren que el número de supervivientes no fue significativamente diferente de los del grupo de control (mediante el Ensayo de Probabilidad Exacto de Fisher), el momento de la muerte para el grupo como un conjunto fue significativamente diferente del grupo de control ($P < 0,001$). El 50% de los ratones que recibieron 3 μg de Protollin, tres días antes de la exposición, sobrevivieron al estudio ($P < 0,05$ por el Ensayo de Probabilidad Exacto de Fisher); el 50% restante de los ratones alcanzó los criterios de valoración entre los días 6 y 8 después de la exposición. De nuevo para el grupo como un conjunto, el momento de la muerte fue significativamente diferente del grupo de control ($P < 0,001$).

En estos experimentos, la inducción de una respuesta inmune independiente de antígeno, no específica protectora se produjo por encima de un intervalo de umbral de 3-5 μg de Protollin y cuando se administró Protollin los días 3-6 antes de la exposición. Adicionalmente, la co-administración de un antígeno de la gripe (derivado de una variante homotípica de la cepa de la gripe A/H3 adaptada a ratón usada para la exposición) con Protollin no inhibió las respuestas inmunes innatas protectoras. La inducción de una respuesta inmune innata protectora también se indujo con Protollin que comprendía otra LPS ligera de una bacteria Gram negativa – en este caso una cepa no patógena de *E. coli* (*E. coli* 017).

45 Experimento 3

Se proporcionó Protollin a grupos de ratones los días 8, 6, 4 y 2 antes de la exposición y el día de la exposición (30 minutos antes de la exposición). A otros grupos de ratones se les administró al mismo tiempo Protollin en combinación con antígeno de la gripe derivado de un virus de variante homotípica de la cepa de la gripe A/H3 adaptada a ratón usada para la exposición. Los ratones se expusieron a una DL_{50} de aproximadamente 40 de virus vivo A/H3 adaptado para ratón y se controlaron durante 14 días después de la exposición como se ha descrito anteriormente.

A la DL_{50} de 40 del virus, no sobrevivió ningún animal en el grupo de control sólo con PBS. A pesar de esta exposición letal, sobrevivió el 50% de los ratones que habían recibido Protollin 6 días antes de la exposición ($P \leq 0,05$ en comparación con los ratones de control; Ensayo de Probabilidad Exacto de Fisher). Los grupos de animales que recibieron Protollin 4-6 días antes de la exposición tuvieron el mayor porcentaje de supervivencia. El control de los

cambios del peso corporal (un equivalente de morbilidad después de la infección) en los ratones supervivientes indicó que el tiempo óptimo para la dosificación fue de aproximadamente 4 días antes de la exposición. Todos los ratones que recibieron dosificación 2, 4, 6 días antes de la exposición perdieron menos peso corporal que los otros ratones y comenzaron antes a recuperar el peso corporal.

- 5 De los ratones que recibieron Protollin en combinación con antígeno antes de la exposición letal, la mayoría de los supervivientes se encontraban en los grupos que recibieron la dosificación 4 y 6 días antes de la exposición (100% y 60%; $P \leq 0,001$ y $0,01$, respectivamente, en comparación con los controles). Las respuestas específicas de los anticuerpos (IgG) contra el antígeno de la gripe podría esperarse que fuera menor que la óptima dentro de 4-6 días de recibir el antígeno. Como se indica en los anteriores experimentos, los cambios de peso corporal confirman que la inducción de las respuestas inmunes, innatas y posterior protección contra la mortalidad y morbilidad se produce cuando los ratones reciben la dosificación durante un periodo de 2 a 6 días antes de la exposición.

Ejemplo 17

MODELO MURINO DE ASMA ALÉRGICA INDUCIDA POR ALERGENO

15 Este Ejemplo describe un modelo animal de asma alérgica murino. Los ratones se expusieron a extracto de polen de abedul (ExPA) múltiples veces para estimular la inflamación y la hipersensibilidad de las vías respiratorias (*es decir*, estimular una reacción alérgica). En resumen, se sensibilizaron ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad el día 0 mediante una sola inyección intraperitoneal (i.p.) con 8 μg de ExPA (Greer Laboratories, Inc.) y 1 mg de hidróxido de aluminio (alumbre) (ALHYDROGEL®, Superfos Biosector, Kvistgard, Dinamarca) en 150 μl de solución salina tamponada con fosfato 150 μl . Después de la sensibilización, los ratones se expusieron por vía intranasal (i.n.) bajo una anestesia ligera de halotano una vez al día los días 15, 16 y 17 a 10 μg de ExPA en 3,6 μl de PBS (18 μl por fosa nasal). Los controles incluyeron (1) ratones sensibilizados de manera simulada, que recibieron 150 μl de PBS por vía i.p. el día 0 y después se expusieron por vía i.n., bajo anestesia ligera de halotano una vez al día, los días 15, 16 y 17, a 10 μl de ExPA en 36 μl de PBS (18 μl por fosa nasal) y (2) ratones expuestos de manera simulada, que se sensibilizaron por vía i.p. el día 0 con 8 μg de ExPA y 1 mg de alumbre y después recibieron por vía i.n. ,con anestesia ligera, 36 μl de PBS (18 μl por fosa nasal) una vez al día los días 15, 16 y 17. Cada ratón recibió cada tipo de tratamiento. Después de la sensibilización y exposición, se proporcionó a los ratones un bolo intravenoso (i.v.) de metacolina (MCh), un bronco constrictor para inducir la hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR). Dos días después de la exposición final (*es decir* el día 19), se midieron las respuestas de las vías respiratorias (resistencia y elastancia respiratoria) frente al tratamiento con MCh. Para evaluar la inflamación se realizaron análisis adicionales.

Ejemplo 18

ANÁLISIS DE MODELO MURINO DE ASMA ALÉRGICA INDUCIDA POR ALERGENO

Hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR)

35 Se realizó la determinación de la AHR de la siguiente manera. Se sedaron ratones BALB/c tratados como se describe en el Ejemplo 17 mediante una inyección i.p. de hidrocloreuro de xilacina (10 mg/kg) y posteriormente se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/kg). Se realizó una pequeña incisión en el cuello para aislar la vena yugular, la cual se cateterizó. Se realizó una traqueostomía, y se insertó un tubo dentro de la traquea de manera que el animal pudiera respirar mecánicamente. La respiración de los animales era casi sinusoidal (proporción inspiratoria con respecto a espiratoria de 1:1) usando un respirador para animales pequeños (FlexiVent; SCIREQ, Montreal, Canadá) con los siguientes ajustes: una tasa respiratoria de 150 respiraciones/minuto, un volumen de corriente de 0,15 ml y un nivel de presión expiratoria final positiva (PEFP) de 1,5 cm de H_2O . Los ratones recibieron una inyección intravenosa de bromuro de pancuronio (0,5 mg/kg) para inducir la parálisis de manera que los animales pudieran respirar mecánicamente. Se controló la frecuencia cardíaca mediante EKG para asegurar que los animales estaban profundamente anestesiados. Después del inflado a presión de las vías respiratorias de 30 cm de H_2O para proporcionar un historial de volumen convencional, se proporcionó MCh (metacolina) mediante la cánula yugular en dosis dobles de 20 a 640 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se midió la resistencia y elastancia del sistema respiratorio durante la oscilación de la misma manera a la usada durante la respiración mecánica antes de la administración de MCh y se repitió cada 15 segundos después del suministro de MCh, indicando los valores máximos. La medición de la resistencia de las vías respiratorias (R_L) proporciona una valoración cuantitativa del nivel de constricción en los pulmones – *es decir*, un aumento de la resistencia de las vías respiratorias representa un aumento de la obstrucción de las vías respiratorias, que puede estar producido por una respuesta inflamatoria. La elasticidad de las vías respiratorias (E_L) es una medida de la rigidez elástica pulmonar; por lo tanto, valores de elastancia aumentados indican una rigidez aumentada de los pulmones. Los valores R_L y E_L se calcularon con el programa informático proporcionado por el fabricante FlexiVent usando regresión lineal múltiple para obtener el mejor ajuste para la siguiente ecuación:

$$P = P_{res} + P_{el} + P_{in} = FR_L + VE_L + K$$

5 en la que P es presión de gas aplicada por el respirador mecánico; P_{res} es la presión resistiva; P_{el} es la presión elástica; P_{in} es una presión inerte; F es flujo de gas; V es volumen pulmonar con respecto a la capacidad residual funcional y K es una constante (Irvin y col., Respir. Res. 4:4 (2003)). La resistencia y la elastancia de las vías respiratorias se representan como valores medios \pm ETM. Para determinar el nivel de diferencia entre los grupos de animales, se usó el ensayo de la t de Student.

Suero

10 Inmediatamente después de las mediciones de la sensibilidad de las vías respiratorias, los ratones se sacrificaron por exanguinación mediante punción cardíaca, la sangre extraída se centrifugó y el suero resultante se transfirió a un tubo transparente y se congeló. Los sueros se analizaron usando ELISA para determinar si estaban presentes anticuerpos específicos de ExPA (extracto de polen de abedul).

Lavados Bronco alveolares (LBA) y Eosinofilia

15 Después de la exanguinación, la aorta descendente se seccionó y se realizó una perfusión cardíaca con 5 ml de tampón salino para eliminar la sangre de los pulmones antes de realizar los LBA. Se instiló un total de 4,6 ml de tampón salino mediante una cánula de traqueostomía en un volumen inicial de 0,6 ml seguido de volúmenes de 1 ml sucesivos. El regreso de los primeros 0,6 ml de líquido de lavado se centrifugó y el sobrenadante se analizó mediante ELISA para detectar anticuerpos y citocinas.

20 Las células recogidas del líquido de lavado inicial se resuspendieron en tampón salino y después se agruparon con células extraídas por centrifugación a partir de las cuatro alícuotas posteriores de líquido de lavado. Se contó el número total de células usando tinción con azul de tripano y un hemocitómetro. Se prepararon portaobjetos de células de LBA con citospina usando una citocentrífuga (Cytospin modelo II; Shandon, Pittsburgh, PA).

La eosinofilia se evaluó en los LBA midiendo el porcentaje de macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y células epiteliales teñidas diferencialmente (Equipo Médico Internacional Diff-Quick) en las muestras de lavado. Los recuentos celulares diferenciales se determinaron mediante microscopía óptica a partir de un recuento de al menos 200 células.

25 Tejido Pulmonar

30 Después de los LBA, se expusieron los pulmones de cada ratón y se punzó el lóbulo izquierdo. El lóbulo más grande del pulmón derecho se puso directamente en parafina al 10%. El segundo lóbulo más grande se puso en una solución de extracción de ARN (tampón Rneasy® RLT; Qiagen Inc, Mississauga, Ontario), que se mantuvo a 4°C durante una noche y después se almacenó congelado a -70°C para su uso posterior en una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (PCR). Los otros dos lóbulos del pulmón derecho se transfirieron a un tubo Eppendorf, y se sumergieron en nitrógeno líquido y después se almacenaron a -70°C. Los homogeneizados de pulmón se prepararon y los sobrenadantes se analizaron mediante ELISA para detectar anticuerpos totales y específicos de ExPA y niveles de citocinas. El pulmón izquierdo se infló con un compuesto de inclusión de temperatura de corte óptima (TCO) al 5% (Miles Labs, Elkhart, IN) (aproximadamente una presión de 285 cm), se puso en TCO al 100% con inmersión en isopentanol (vaso de precipitado en nitrógeno líquido; es decir congelación instantánea) y se almacenó a -70°C.

40 Se seccionaron los tejidos pulmonares en parafina y las secciones se tiñeron con ácido-de Schiff periódico (tinción de PAS) para evaluar la producción de mucosidad. Las secciones de parafina también se analizaron para determinar la presencia de colágeno (tinción de Van Gieson) y de eosinófilos (tinción de Giemsa). Además, en las secciones teñidas, se evaluó la lesión de las vías respiratorias. Los tejidos pulmonares congelados en el compuesto de inclusión TCO se seccionaron y se analizaron *in situ* por inmunotinción. Los eosinófilos se cuantificaron por inmunotinción con un anticuerpo anti - proteína básica principal (PBP) de ratón. Las secciones de pulmón se usaron para la identificación de citocinas (anti-IL-4, anti-IL-5 o anti-IFN- γ), células T (anti-CD3) y macrófagos (anti-CD68).

Procedimiento ELISA de Anticuerpos y Niveles de Citocinas

45 Se usaron procedimientos ELISA para identificar anticuerpos específicos (IgA, IgE, IgG1 y IgG2a) y citocinas específicas (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF- α e IFN- γ). Se analizaron sueros, LBA y homogeneizados de pulmón para determinar la especificidad del ExPA e IgE total usando el kit de IgE de ratón OptEIA (BD Pharmingen, Mississauga, Ontario). Se analizaron los sueros, LBA y los homogeneizados de pulmón para determinar la especificidad del ExPA e IgG1 e IgG2a total usando reactivos de Southern Biotech Associates, Inc. (Birmingham, AL). Se analizaron los sueros, LBA y los homogeneizados de pulmón para determinar la especificidad del ExPA e IgA total usando reactivos de Bethyl

Laboratories, Inc. (Montgomery, TX). Se analizaron los LBA y los homogeneizados de pulmón para determinar el nivel de IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ usando reactivos de BD Pharmingen (Mississauga, Ontario). Se analizaron los LBA y los homogeneizados de pulmón para determinar el nivel de IL-13 usando reactivos de R&D Systems (Minneapolis, MN). Las titulaciones de los anticuerpos y de las citocinas se expresaron como ng/ml y pg/ml, respectivamente, deducidas a partir de procesamientos convencionales en paralelo con los correspondientes anticuerpos recombinantes o citocinas.

La cuantificación de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF- α e IFN- γ por PCRC en tiempo real, en muestras de pulmón mantenidas congeladas en solución de extracción de ARN (como se describe en el presente documento) se inicia por aislamiento de ARN total celular usando el Kit Qiagen RNeasy® Mini (Qiagen Inc.). La concentración del ARN extraído se determinó midiendo las densidades ópticas a 260 nm (DO₂₆₀) y la pureza se evaluó basándose en proporciones DO₂₆₀/DO₂₈₀ iguales o superiores a 1,8. Se realizó la transcripción inversa en muestras de 1 μ g de ARN usando kits de transcriptasa inversa Omniscript™ (Qiagen Inc.) en un volumen constante de 20 μ l. Se usó un volumen de 1 μ l de las soluciones resultante del ADN complementario (ADNc) para las reacciones PCRC en tiempo real, que se realizaron en un LightCycler™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Las reacciones incluyen Sybr®Green I como un colorante de unión específico al ADN bicatenario en el kit cebador LightCycler™ (Search Lc, Heidelberg, Alemania) para una citocina específica o para la proteína ribosomal S9 (control, gen constitutivo).

La hipersensibilidad de las vías respiratorias, se midió por la resistencia (Tabla 13) y elastancia (Tabla 14) de las vías respiratorias, aumentada en animales que recibieron cantidades en aumento de MCh y que se sensibilizaron y se expusieron al ExPA en comparación con ratones que solamente se sensibilizaron o solamente se expusieron al ExPA. Después de una inyección intravenosa de MCh a 320 μ g/ml, los ratones sensibilizados/expuestos tenían una resistencia (12,88 cm de H₂O s/ml) y elastancia (103,08 cm de H₂O/ml) de las vías respiratorias que era dos veces superior que en los ratones sensibilizados/de manera simulada (p=0,014 y p=0,038, respectivamente) y ratones expuestos/de manera simulada (p=0,042 y p=0,084, respectivamente) (véanse las Tablas 13 y 14). Los ratones sensibilizados/expuestos, después de inyección i.v. de MCh a 640 μ g/ml, mostraron resistencia de las vías respiratorias de 36,63 cm de H₂O s/ml y una elastancia de 359,88 cm de H₂O/ml, que era de 3 y 5 veces superior que en los ratones de control que sólo se sensibilizaron con ExPA (p=0,014 y p=0,028, respectivamente) y en los ratones que sólo se expusieron a ExPA (p=0,031 y p=0,062, respectivamente) respectivamente (véanse las Tablas 13 y 14).

Tabla 13. Resistencia Media del Sistema Respiratorio (cm H₂O s/ml) en el Modelo Murino de Asma Alérgica

MCh (μ g/ml)	Línea basal	10	20	40	80	160	320	640
Grupo 1: sensibilizado/expuesto	0,66	0,68	0,73	0,90	1,59	4,24	12,88	36,63
Grupo 2: sensibilizado/simulado	0,69	0,70	0,75	0,93	1,40	2,58	5,67	10,03
Grupo 3: simulado/expuesto	0,69	0,71	0,78	0,97	1,63	3,01	6,11	8,19

Los datos se analizaron mediante el ensayo de t: Grupo 1 frente a Grupo 2 a 320 μ g/ml de MCh: p = 0,014
 Grupo 1 frente a Grupo 3 a 320 μ g/ml de MCh: p = 0,042
 Grupo 1 frente a Grupo 2 a 640 μ g/ml de MCh: p = 0,014
 Grupo 1 frente a Grupo 3 a 640 μ g/ml de MCh: p = 0,031

Tabla 14. Elastancia Media del Sistema Respiratorio (cm H₂O s/ml) en el Modelo Murino de Asma Alérgica

MCh (μ g/ml)	Línea basal	10	20	40	80	160	320	640
Grupo 1: sensibilizado/expuesto	28,89	30,25	31,89	33,99	37,42	47,52	103,08	359,88
Grupo 2: sensibilizado/simulado	27,63	28,74	30,14	31,70	34,29	40,54	53,08	71,31
Grupo 3: simulado/expuesto	28,48	29,84	31,43	33,58	37,34	44,38	57,82	64,21

Los datos se analizaron mediante el ensayo de t. Grupo 1 frente a Grupo 2 a 320 μ g/ml de MCh: p = 0,038
 Grupo 1 frente a Grupo 3 a 320 μ g/ml de MCh: p = 0,084
 Grupo 1 frente a Grupo 2 a 640 μ g/ml de MCh: p = 0,028
 Grupo 1 frente a Grupo 3 a 640 μ g/ml de MCh: p = 0,062

Además, la combinación de sensibilización y exposición al ExPA en ratones BALB/c produjo eosinofilia. Los macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y las células epiteliales se enumeraron en muestras de lavado bronquio

5 alveolar (LBA). El porcentaje de cada tipo de célula por el número total de células se representa en la Tabla 15. En estos ratones, el porcentaje de eosinófilos (8,26%) y linfocitos (10,16%) fue 12 y 4 veces superior, respectivamente, que en los ratones de control que solamente se sensibilizaron con el ExPA (p=0,036 y p=0,024, respectivamente); estos valores fueron 3 y 2 veces superiores, respectivamente, que en los ratones que se expusieron únicamente con el ExPA (p=0,204 y p=0,320, respectivamente).

Tabla 15. Recuentos Celulares Diferenciales (%) en LBA en el Modelo Murino de Asma Alérgica

Tipo Celular	Macrófagos	Neutrófilos	Eosinófilos	Linfocitos	Células Epiteliales
Grupo 1: sensibilizado/expuesto	74,13	2,90	8,26	10,16	4,64
Grupo 2: sensibilizado/simulado	86,42	3,12	0,66	2,34	6,36
Grupo 3: simulado/expuesto	73,08	7,01	2,56	5,91	6,61

Los datos se analizaron mediante el ensayo de t.

Ejemplo 19

10 SUPRESIÓN DE LA HIPERSENSIBILIDAD E INFLAMACIÓN DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS INDUCIDA POR PROTOLLIN

15 Se usó el modelo murino de asma alérgica (como se describe en el Ejemplo 18) para analizar composiciones para la supresión de una respuesta inmune inflamatoria e hipersensibilidad de las vías respiratorias (*es decir* la supresión de una reacción alérgica). En resumen, se sensibilizaron ratones BALB/c de seis a ocho semanas de edad por vía intraperitoneal i.p. el día 0 con 8 µg de ExPA (extracto de polen de abedul) y 1 mg de alumbre en 150 µl de PBS. Los días 7, 10 y 13, posteriores a la sensibilización, cada uno de los grupos de 8 ratones se inmunizaron i.n. (por vía intranasal) con soluciones de 10 µl (5 µl por fosa nasal) de (1) PBS; (2) 10 µg de ExPA; (3) 10 µg de ExPA mezclado con 10 µg de Protollin; o (4) sólo con 10 µg de Protollin. Después de la inmunización, los ratones se expusieron i.n., bajo leve anestesia de halotano una vez al día los días 15, 16 y 17, a 10 µg de ExPA en 36 µl de PBS (18 µl por fosa nasal). Dos días después de la exposición final (*es decir*, el día 19), a los ratones se les proporcionó un bolo de MCh (metacolina) i.v. (20-640 µg/ml). Las respuestas de las vías respiratorias (resistencia y elastancia respiratoria) al tratamiento con MCh, inflamación y eosinofilia se determinaron como se describe en el Ejemplo 18.

25 Los ratones sensibilizados que se inmunizaron con una composición que comprendía ExPA con Protollin o sólo con Protollin y posteriormente se expusieron i.n. con ExPA, mostraron una resistencia y elastancia reducida en las mediciones AHR a medida que aumentaban las cantidades de MCh intravenosa (*véanse* las Tablas 16 y 17). Después de una inyección intravenosa de MCh de 640 µg/ml, los ratones tratados con ExPA mezclado con Protollin habían reducido la resistencia (12,54 cm H₂O s/ml) y la elasticidad (99,73 cm H₂O/ml) de las vías respiratorias, aproximadamente el 43% y el 48%, respectivamente, en comparación con los ratones tratados sólo con PBS (p=0,028 y p=0,050, respectivamente) o sólo con ExPA (p=0,132 y p=0,220, respectivamente). De manera similar, el adyuvante de Protollin en solitario también disminuyó la resistencia (9,71 cm H₂O s/ml) y la elastancia (69,24 cm H₂O/ml) de las vías respiratorias, aproximadamente el 56% y el 64%, respectivamente, en comparación con los ratones tratados sólo con PBS (p=0,005 y p=0,009, respectivamente) o sólo con ExPA (p=0,029 y p=0,074, respectivamente).

Tabla 16. Resistencia media del sistema respiratorio (cm H₂O s/ml) después de la administración de Protollin: Extracto de Polen de Abedul (ExPA) en el modelo murino de asma alérgica

Mch (µg/ml)	Línea basal	20	40	80	160	320	640
Grupo 1: PBS	0,61	0,68	0,87	1,48	3,27	9,72	24,13
Grupo 2: ExPA	0,67	0,71	0,90	1,47	3,41	8,81	19,87
Grupo 3: ExPA: Protollin	0,63	0,68	0,79	1,17	2,39	6,03	12,54

Mch (µg/ml)	Línea basal	20	40	80	160	320	640
Grupo 4: Protollin	0,60	0,64	0,75	1,06	2,00	4,59	9,71
Los datos se analizaron mediante el ensayo de t. Grupo 3 frente a Grupo 1 a 640 µg/ml de MCh: p = 0,028 Grupo 3 frente a Grupo 2 a 640 µg/ml de MCh: p = 0,132 Grupo 4 frente a Grupo 1 a 640 µg/ml de MCh: p = 0,005 Grupo 4 frente a Grupo 2 a 640 µg/ml de MCh: p = 0,029							

Tabla 17. Elasticidad media del sistema respiratorio (cm H₂O /ml) después de la administración de Protollin: Extracto de Polen de Abedul (ExPA) en el modelo murino de asma alérgica

Mch (µg/ml)	Línea basal	20	40	80	160	320	640
Grupo 1: PBS	26,33	28,07	30,29	35,05	43,20	75,16	205,50
Grupo 2: ExPA	25,61	27,23	29,27	32,33	40,91	75,15	180,82
Grupo 3: ExPA: Protollin	24,91	26,56	28,21	30,81	35,50	48,69	99,73
Grupo 4: Protollin	24,77	26,15	27,98	30,11	34,83	45,50	69,24
Los datos se analizaron mediante el ensayo de t. Grupo 3 frente a Grupo 1 a 640 µg/ml de MCh: p = 0,050 Grupo 3 frente a Grupo 2 a 640 µg/ml de MCh: p = 0,220 Grupo 4 frente a Grupo 1 a 640 µg/ml de MCh: p = 0,009 Grupo 4 frente a Grupo 2 a 640 µg/ml de MCh: p = 0,074							

5 El grado de inflamación de las vías respiratorias en los animales se determinó contando las células inmunes presentes en las muestras de lavado bronquio alveolar (LBA) procedentes de los ratones tratados con PBS, ExPA, ExPA + Protollin y sólo con Protollin. Los datos se presentan en la Tabla 18. Los animales que se trataron con el alérgeno ExPA mezclado con Protollin tenían niveles reducidos de eosinófilos en LBA, aproximadamente el 56% y el 43%, en comparación con ratones que se trataron sólo con PBS (p=0,36) o sólo con ExPA (p=0,29), respectivamente. El tratamiento con Protollin más ExPA también redujo el número de linfocitos en LBA en aproximadamente el 51% y el 40% en comparación con los animales tratados sólo con PBS (p=0,004) o sólo con ExPA (p=0,26), respectivamente. Los animales tratados sólo con Protollin habían reducido los niveles de eosinófilos en LBA, aproximadamente el 71% y el 63%, en comparación con el número de eosinófilos de los ratones tratados sólo con PBS (p=0,28) o sólo con ExPA (p=0,14), respectivamente. El tratamiento de los ratones sólo con Protollin también redujo el número de linfocitos, aproximadamente el 45% y el 32%, en comparación con los ratones tratados sólo con PBS (p=0,10) o ExPA (p=0,40), respectivamente. Se analizaron muestras de pulmón para determinar la presencia de células caliciformes. También se indicó reducción de la inflamación de las vías respiratorias por la disminución del porcentaje de ratones que tenían células caliciformes, productoras de mucosidad en los bronquiolos, en el grupo tratado con ExPA más Protollin o sólo con Protollin (el 29%; es decir, en cada grupo, 2 de 7 ratones tenía al menos el 1% de células caliciformes del número total de células epiteliales bronquiales) en comparación con los ratones tratados sólo con PBS (el 75%; 5 de 7 ratones) o sólo con ExPA (el 50%; 3 de 6 ratones).

Los anticuerpos presentes en suero que se unen específicamente a ExPA se detectaron por ELISA usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 18. Se midieron los IgE e IgG1 específicos de ExPA a bajos niveles en suero de ratón aunque el IgG2a en suero específico de ExPA se detectó escasamente (véase Tabla 19). El tratamiento intranasal de los animales sólo con Protollin redujo los niveles de IgE e IgG1 específicos de ExPA al menos el 50% en comparación con los ratones tratados sólo con PBS o sólo con ExPA.

Tabla 18. Inflamación de las vías respiratorias: células inmunes en Lavado Bronco alveolar (LBA) y porcentaje de ratones con células caliciformes productoras de mucosidad

Tratamiento	Macrófagos/Monocitos (x 10 ⁴ /ml)	Neutrófilos (x 10 ⁴ /ml)	Eosinófilos (x 10 ⁴ /ml)	Linfocitos (x 10 ⁴ /ml)	Células epiteliales (x 10 ⁴ /ml)	Células caliciformes (%ratones)
PBS	83,0	9,1	14,7	9,4	18,5	71%
ExPA	93,6	7,0	11,4	7,7	15,0	50%
ExPA/Protollin	66,0	5,4	6,5	4,6	10,4	29%
Protollin	92,7	4,9	4,2	5,2	14,4	29%

Tabla 19. Niveles en suero de anticuerpos específicos de alérgeno

Tratamiento	IgE (x 100 ng/ml)	IgG1(x 1000 ng/ml)
PBS	80,77	28,800
ExPA	27,28	15,945
ExPA/Protollin	31,53	35,839
Protollin	9,18	7,931

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunoestimuladora que comprende Proteosomas y un liposacárido para su uso en el tratamiento o en la prevención de una infección viral, provocando una respuesta inmune innata, en la que los Proteosomas se obtienen de especies de *Neisseria*.
- 5 2. La composición inmunoestimuladora para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 que adicionalmente comprende una composición inmunogénica que comprende Proteosomas, un liposacárido y un antígeno viral capaz de provocar una respuesta inmune adaptativa.
3. La composición inmunoestimuladora para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el antígeno deriva del virus sincitial respiratorio.
- 10 4. La composición inmunoestimuladora para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que cada una de las composiciones es para administración mediante una vía seleccionada entre al menos una vía de mucosa, enteral, parenteral, sublingual, transdérmica, transmucosa, nasal y por inhalación.
5. La composición inmunoestimuladora para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que se activa más de un receptor de tipo Toll.
- 15 6. Una composición que comprende (a) una composición inmunoestimuladora que comprende Proteosomas y un liposacárido y (b) una composición inmunogénica que comprende Proteosomas, un liposacárido y un antígeno microbiano;
como una preparación combinada para su uso simultáneo o secuencial en la terapia o prevención de una infección viral, en la que la composición inmunomoduladora (a) provoca una respuesta inmune innata y la composición
20 inmunogénica (b) provoca una respuesta inmune adaptativa, en la que los Proteosomas se obtienen de especies de *Neisseria*.

Fabricación del Material de Proteosoma a Granel: DIAGRAMA DE FLUJO 1A

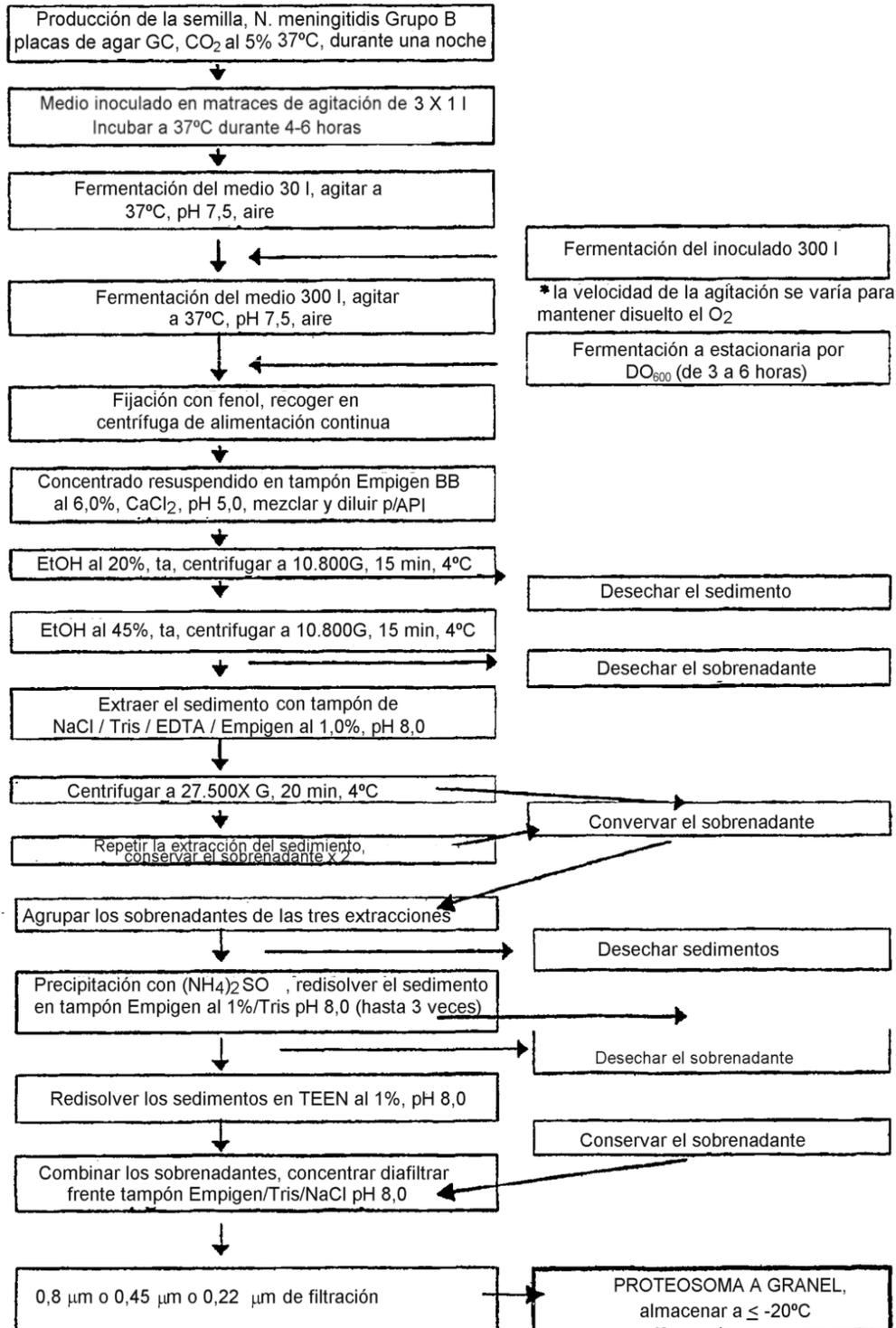


FIG. 1A

Fabricación del Material de Proteosoma a Granel: DIAGRAMA DE FLUJO 1B

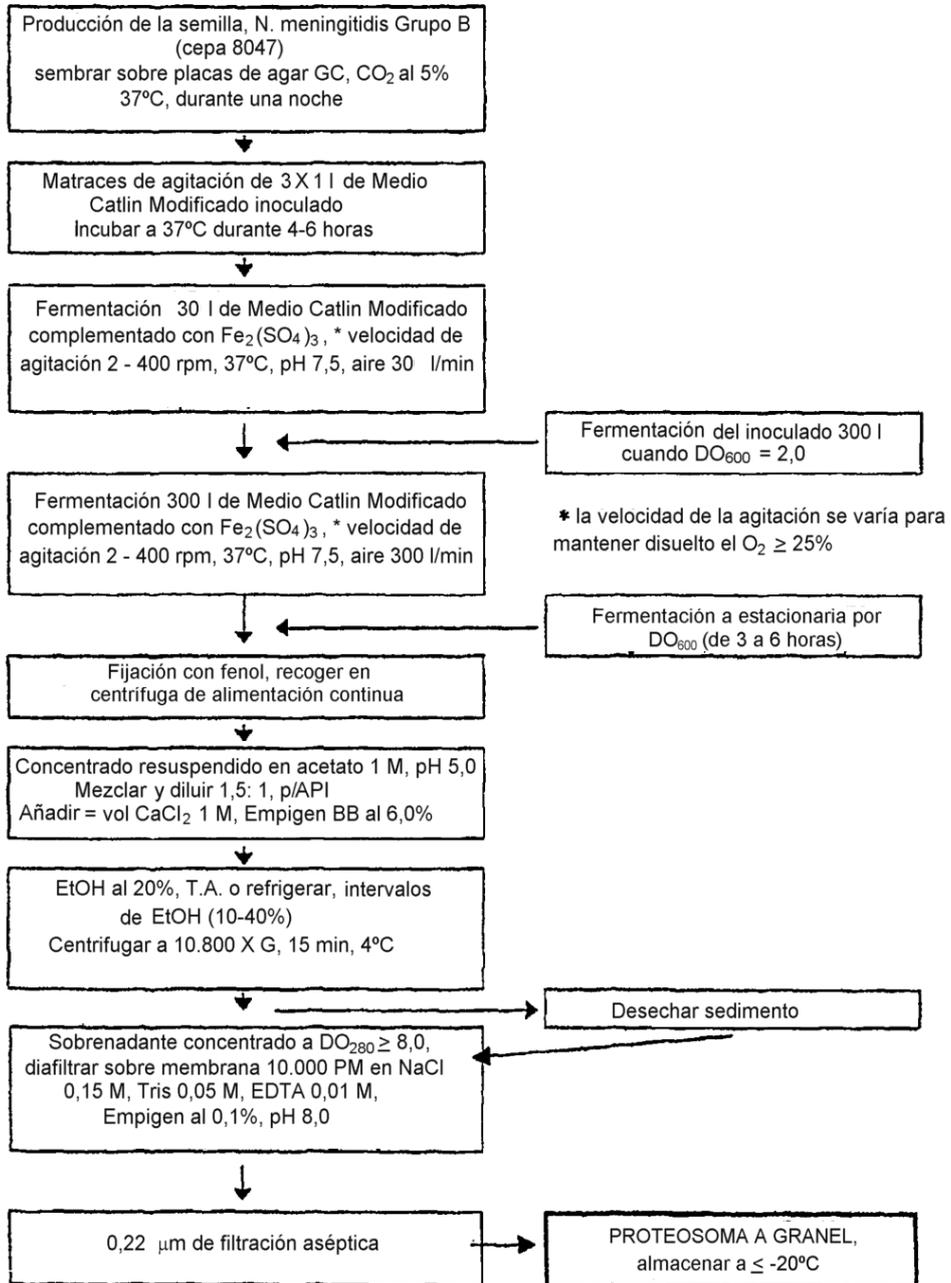


FIG. 1B

Fabricación de LPS de *S. flexneri* 2a: DIAGRAMA DE FLUJO 2

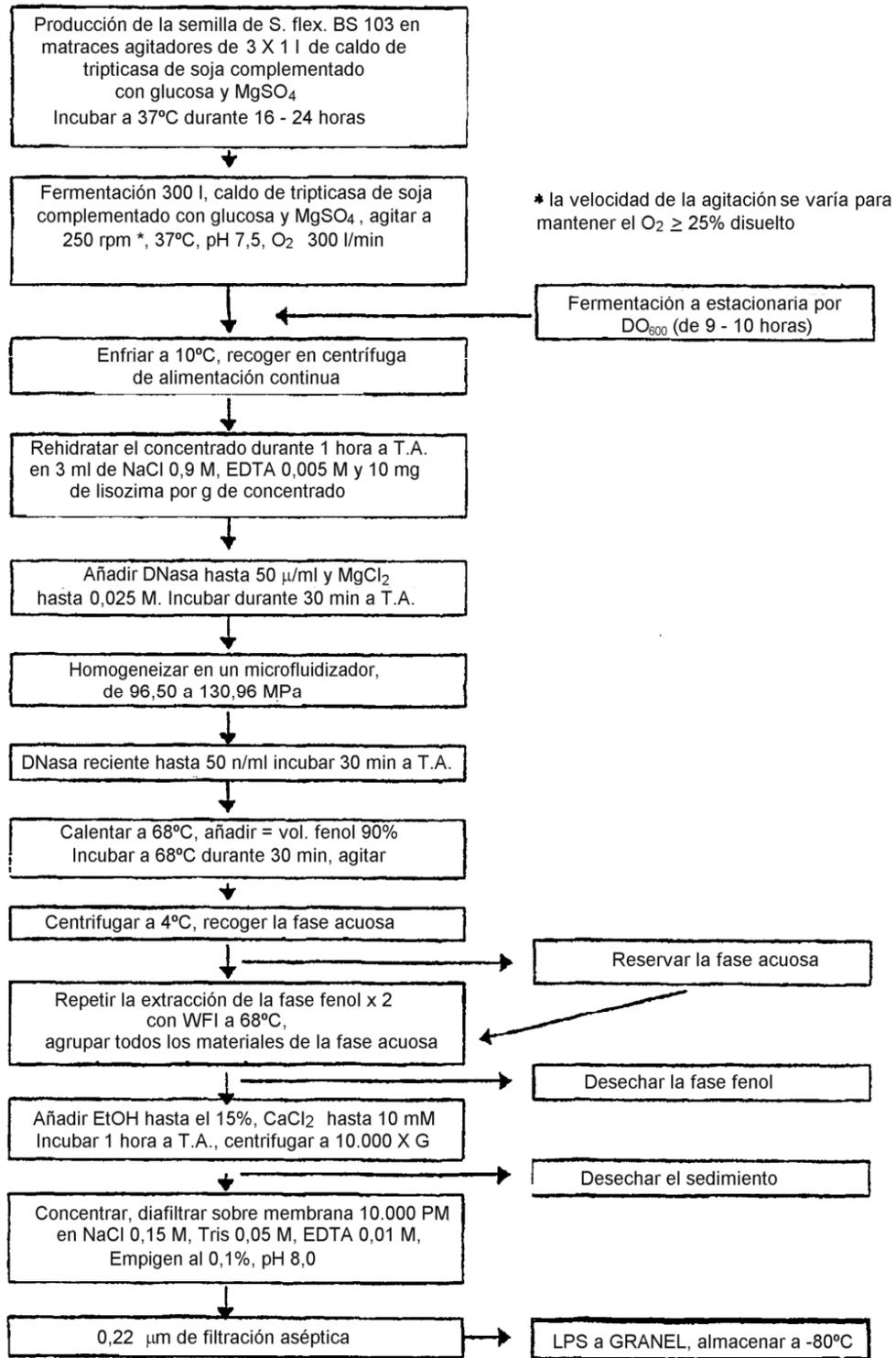


FIG. 2

Fabricación de adyuvante proteosoma IVX-908-LPS: DIAGRAMA DE FLUJO 3

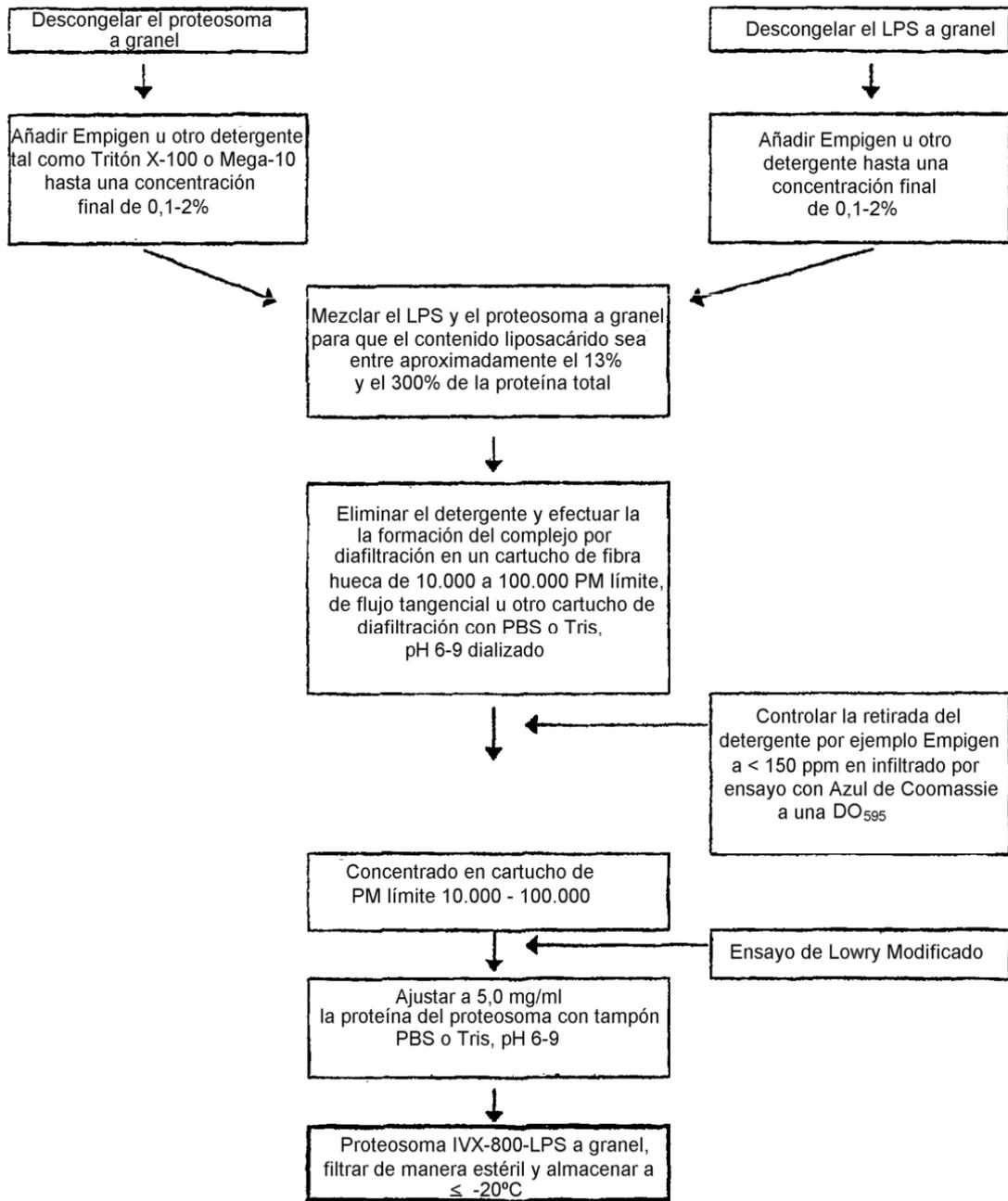


FIG. 3

Figura 4A

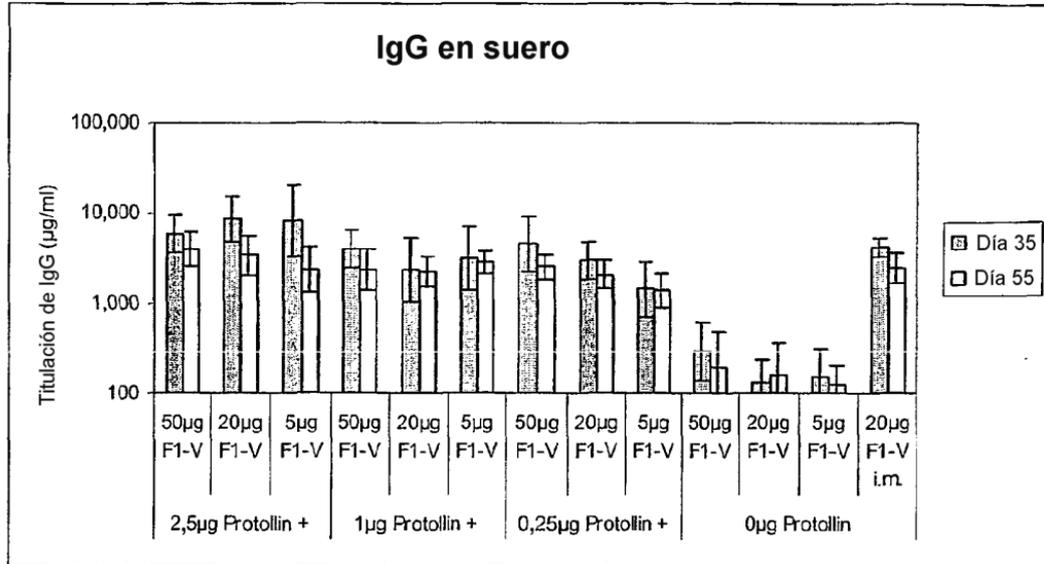


Figura 4B

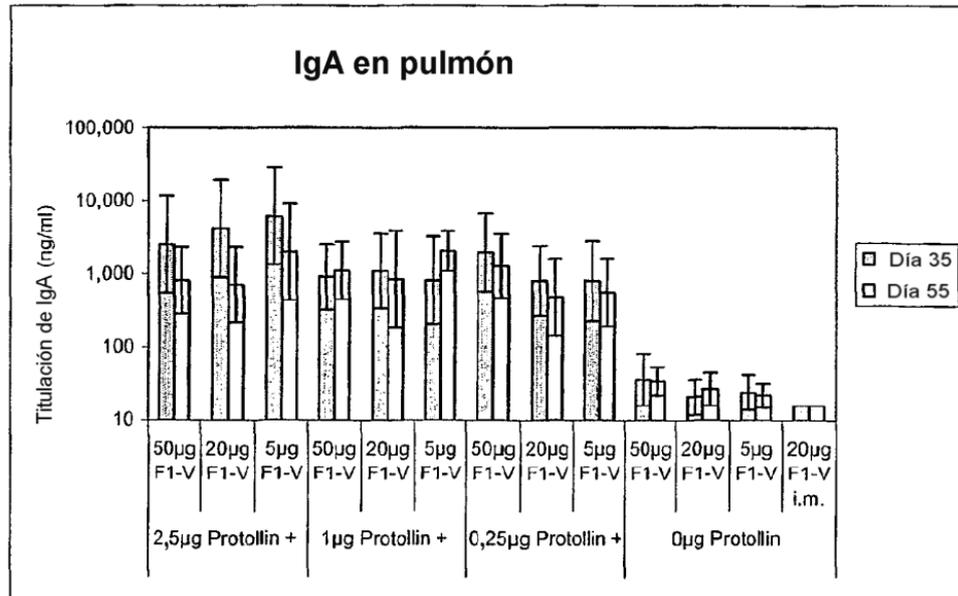


Figura 4C

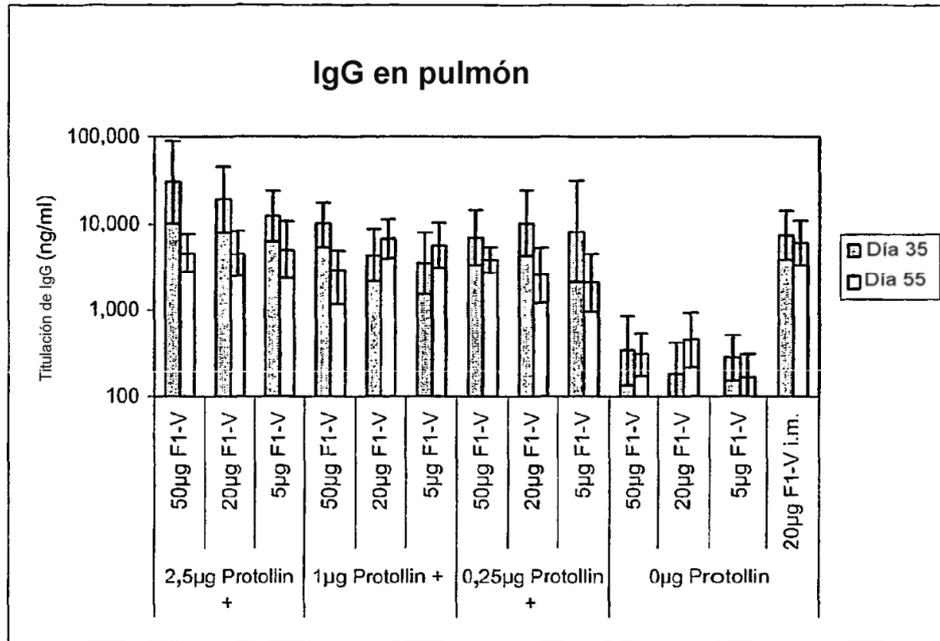


Figura 5A

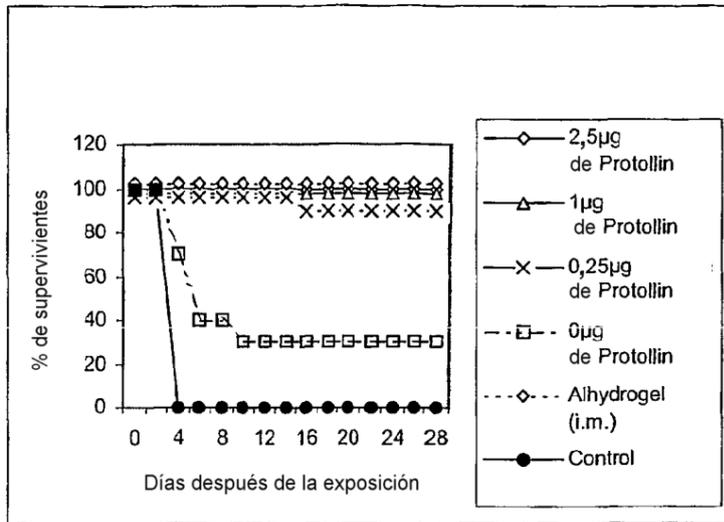


Figura 5B

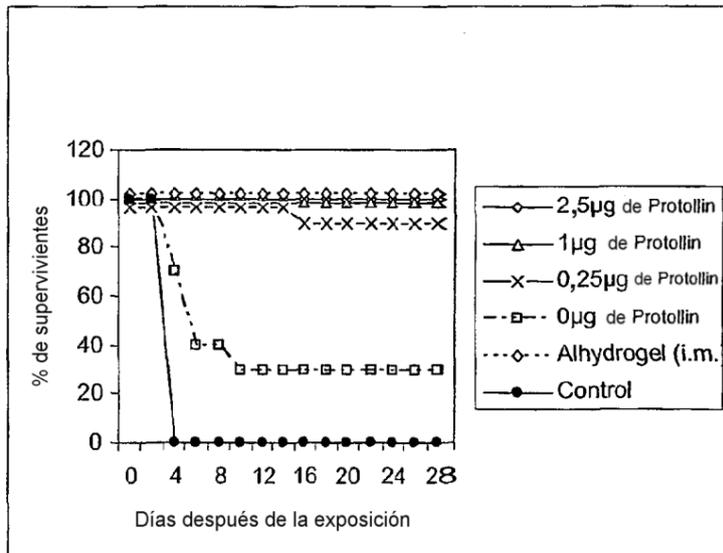


Figura 5C

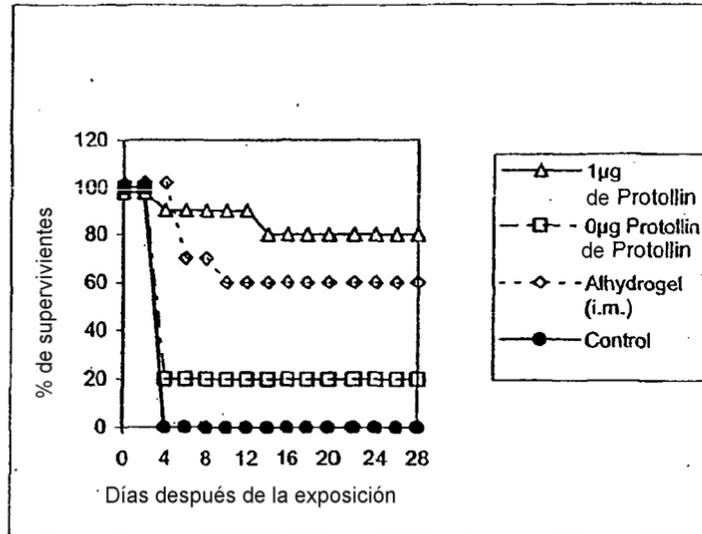


Figura 5D

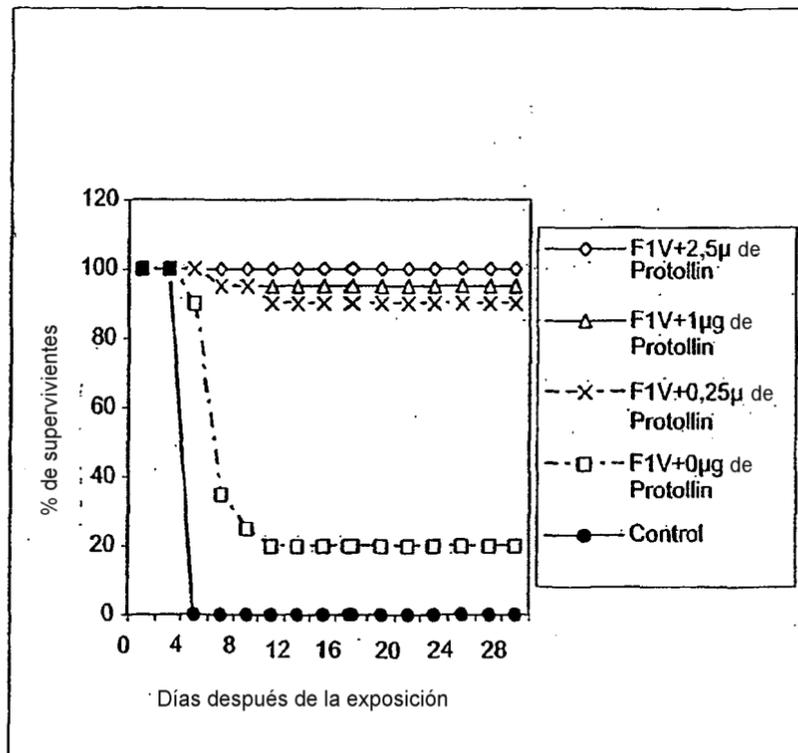


Figura 6A

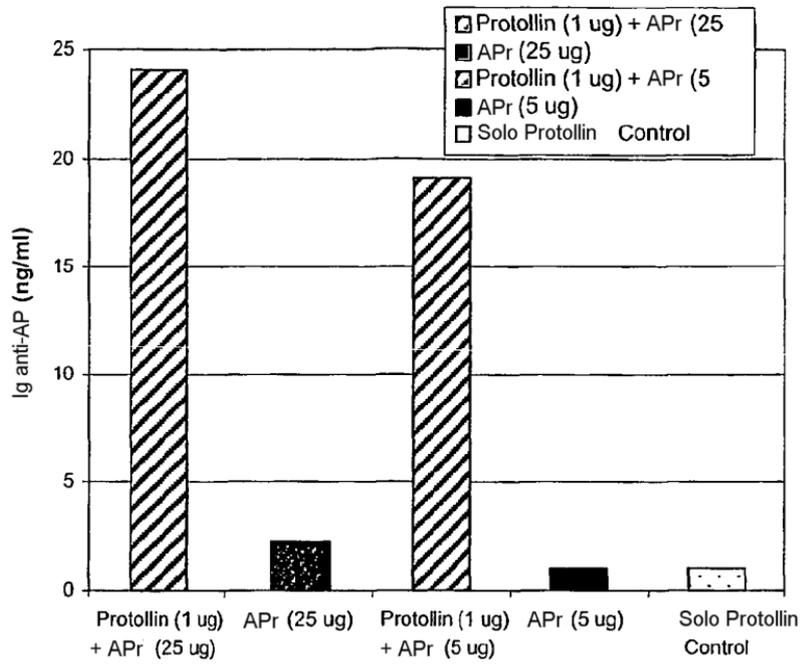


Figura 6B

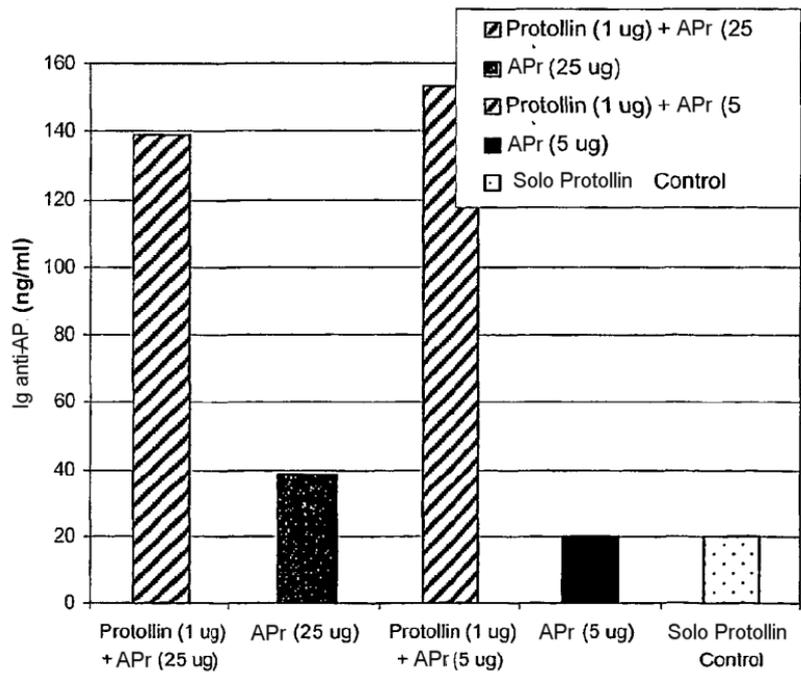


Figura 7A

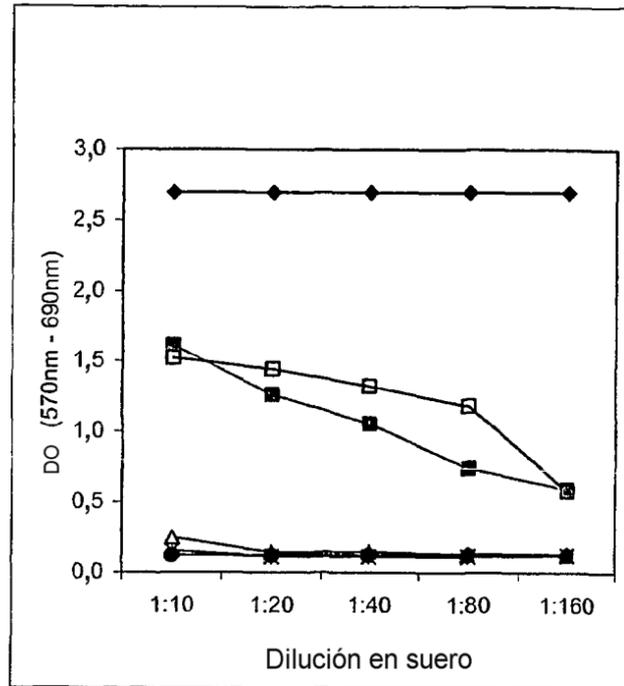


Figura 7B

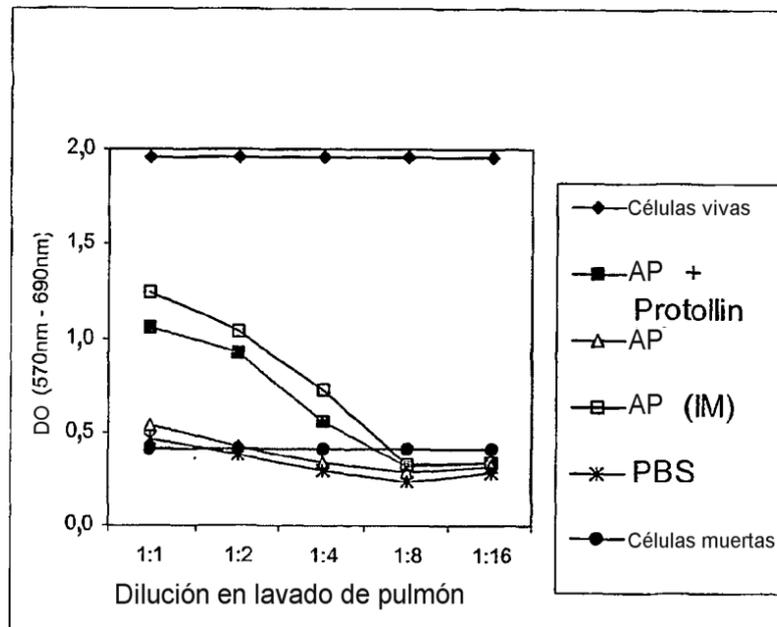


Figura 8A

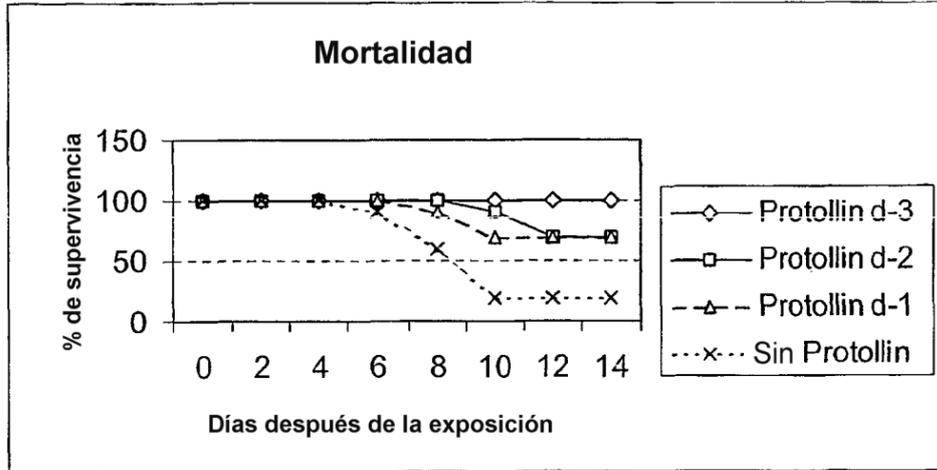


Figura 8B

