

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 076**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/GB2013/050664**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13144562**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13711463 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2830656**

54 Título: **Adyuvante**

30 Prioridad:

26.03.2012 GB 201205237

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

04.12.2017

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY
OF EDINBURGH (100.0%)
Old College South Bridge
Edinburgh EH8 9YL, GB**

72 Inventor/es:

**HOWIE, SARA;
DONALDSON, KENNETH y
CHO, WAN SEOB**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 645 076 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

Adyuvante

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención proporciona adyuvantes innovadores para su uso en la modificación, modulación o aumento de respuestas inmunitarias en sujetos humanos o animales. La invención proporciona además composiciones y vacunas que los comprenden.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Se considera que las vacunas son la última herramienta inmunológica en la prevención de enfermedades infecciosas al proporcionar una inmunidad protectora de larga duración con una buena respuesta de anticuerpos [1;2]. El papel del adyuvante es mejorar la respuesta específica del sistema inmunitario ante una cantidad mínima del antígeno suministrado a través de la activación de células que presentan antígenos [3]. El adyuvante ideal no sería en sí mismo antigénico y estimularía respuestas inmunitarias mientras que no se induce la reacción excesiva del sistema inmunitario que podría dañar al paciente (tal como la inducción del exceso de inflamación local, alergia o hipersensibilidad retardada).

15

20

[0003] Debido a problemas de seguridad, los adyuvantes autorizados son muy limitados y el dolor y la inflamación en las zonas de inyección son efectos secundarios comunes del uso de adyuvantes en vacunas clínicas. Los adyuvantes más ampliamente utilizados en vacunas humanas contienen aluminio [4] tal como alumbre, una sal mineral, normalmente formada como $Al(OH)_3$ o $Al(PO)_4$. Los adyuvantes de alumbre son, por tanto, partículas de óxido metálico.

25

[0004] En ratones, los adyuvantes que contienen aluminio inducen inmunidad humoral principalmente mediante la promoción de respuestas de tipo Th2 mientras se tiene una peor capacidad para simular anticuerpo dependiente de Th1. Los adyuvantes de este tipo no inducen normalmente fuertes respuestas inmunitarias mediadas por células especialmente respuestas de células T citotóxicas [4] aunque se ha observado que preparan respuestas citotóxicas CD8 en presencia de adyuvante lípido adicional [5]. Por lo tanto, el adyuvante que contiene alumbre es adecuado para respuestas contra antígenos de proteínas u organismos inactivados pero no es óptimo para inducir respuestas ante patógenos intracelulares [1-4].

30

35

[0005] Las nanopartículas (NP) se han expandido hasta una amplia variedad de aplicaciones biomédicas debido a sus únicas propiedades fisicoquímicas en comparación con los productos químicos a granel [6]. Por ejemplo, las NP presentan un área mayor y una alta afinidad de unión a proteínas mediante interacción electrostática [7]. Las NP también pueden penetrar profundamente en el tejido y mejorar la absorción celular así como eludir compartimientos lisosómicos [7-9]. Estas propiedades únicas han llevado a considerar las NP como potenciales adyuvantes [10;11]. El tamaño de las NP parece afectar a la capacidad del adyuvante y se ha observado que unas NP más pequeñas producen mayores respuestas inmunitarias celulares y de anticuerpos [12]. Sin embargo, la mayoría de los candidatos de NP para adyuvantes de vacunas son sustancias orgánicas [13].

40

[0006] En modelos murinos de asma, se observó que los nanotubos de carbono de capa múltiple [14], las partículas del humo diésel [15] y el negro de carbono ultrafino de tamaño nanométrico [16] aumentaban los niveles séricos de IgE mediante un mecanismo similar al adyuvante. En comparación con los datos recogidos con el uso de adyuvantes que contienen alumbre [17;18], el negro de carbono de tamaño nanométrico presentaba un efecto de adyuvante similar con aumento de IgG1 e IgE [16].

45

50

[0007] Se ha demostrado que las NP de óxido de níquel (NiONP) y las NP de óxido de cobalto (Co_3O_4NP) son capaces de inducir respuestas de citocina asociadas a Th1 en los pulmones de ratas Wistar hembras [19].

[0008] Pusic Kae *et al.*, (2011: Vaccine; vol. 29, n.º 48, p8898-8908) describe nanopartículas CdSe/ZnS inorgánicas para su uso como un sistema de distribución de vacuna. US2011/123620 da a conocer nanopartículas de vacuna de dióxido de silicio para la inmunoterapia de cáncer. La presente invención busca obviar uno o más de los problemas asociados con la técnica anterior y proporcionar adyuvantes adicionales adecuados para su uso con vacunas contra enfermedades en las que las respuestas inmunitarias mediadas por células son importantes para su prevención o cura.

55

60 SUMARIO DE LA INVENCION

[0009] La presente invención se basa en la identificación de las propiedades de adyuvante de nanopartículas inorgánicas (metal/óxido de metal). El asunto de la invención está definido por las reivindicaciones. En un primer

aspecto, la presente invención proporciona un adyuvante que comprende nanopartículas de cobalto y/o nanopartículas de óxido de cobalto.

[0010] En una forma de realización, el adyuvante puede no comprender alumbre.

[0011] De forma ventajosa, los adyuvantes de la presente invención pueden comprender uno o más tipos de nanopartículas de metal. Por ejemplo, los adyuvantes descritos en el presente documento pueden comprender cócteles o mezclas de diferentes tipos de nanopartícula inorgánica (óxido de metal). En una forma de realización, los adyuvantes descritos en el presente documento pueden comprender además una cantidad de un adyuvante con base de alumbre.

[0012] Como tal, una forma de realización de la presente invención proporciona un adyuvante que comprende, consiste o consiste fundamentalmente en nanopartículas de cobalto y/o nanopartículas de óxido de cobalto.

[0013] El adyuvante de la presente invención puede comprender, consistir o consistir fundamentalmente en nanopartículas de cobalto. En una forma de realización, las nanopartículas de cobalto comprenden óxido de cobalto. Las nanopartículas de óxido de cobalto adecuadas para su uso como adyuvantes de la presente invención pueden comprender, por ejemplo, nanopartículas de óxido (Co_3O_4) de cobalto (II,III).

[0014] En vista de lo anterior, la presente invención proporciona un adyuvante que comprende, consiste o consiste fundamentalmente en nanopartículas de cobalto y/o de óxido (Co_3O_4) de cobalto (II,III).

[0015] Un experto en la técnica entenderá que existen otras formas de óxido de cobalto y que estas pueden tener una aplicación similar como adyuvantes, por consiguiente, los adyuvantes descritos en el presente documento pueden comprender además o pueden consistir o consisten fundamentalmente en óxido cobaltoso (óxido de cobalto (II): CoO) y/o óxido cobáltico (óxido de cobalto (III): Co_2O_3).

[0016] Los inventores han descubierto que los adyuvantes que comprenden nanopartículas inorgánicas, especialmente aquellos que comprenden nanopartículas de metal tal como nanopartículas de cobalto, inducen una respuesta de tipo Th1 y Th2 equilibrada cuando se administra *in vivo*. A diferencia de otros adyuvantes, incluidos, por ejemplo, aquellos que comprenden alumbre, que inducen únicamente una respuesta Th1 o Th2. Un experto en la técnica entenderá que aunque las respuestas Th1 son eficaces a la hora de ayudar a la eliminación de patógenos intracelulares, la mayoría de adyuvantes provocan respuestas Th2 que son más eficaces para la eliminación de patógenos extracelulares. Como tal, los adyuvantes de nanopartículas inorgánicas o de cobalto de la presente invención pueden utilizarse con una amplia variedad de vacunas y son específicamente adecuados para su uso con vacunas contra enfermedades en las que las respuestas inmunitarias mediadas por células y/o humorales son importantes para su prevención o cura.

[0017] Además, los inventores han observado que a diferencia de los adyuvantes con base de alumbre (que comprenden principalmente o consisten en alumbre microparticulado, es decir, partículas de alumbre de entre $0,1\mu\text{m}$ y $100\mu\text{m}$), los adyuvantes de nanopartículas inorgánicas (con base de cobalto) de la presente invención inducen respuestas inmunitarias que comprenden mucho menos del isotipo de inmunoglobulina IgE «alérgico». Esto es importante ya que reduce las reacciones de hipersensibilidad tras la administración de adyuvante.

[0018] Como ventaja adicional, los inventores han descubierto que los adyuvantes con base de nanopartículas inorgánicas, tal como, por ejemplo, los adyuvantes de nanopartículas de cobalto descritos en el presente documento, inducen menos inflamación tanto en la zona de sensibilización como de estimulación. Esto presenta la ventaja de reducir la dolorosa hinchazón que puede ocurrir normalmente tras la administración de un adyuvante como alumbre.

[0019] En vista de lo anterior, y sin pretender ceñirse a la teoría, como consecuencia de la inducción de respuestas inmunitarias TH1 y TH2 equilibradas, la reducida toxicidad en comparación con los adyuvantes con base de alumbre y la relativa falta de efectos secundarios alérgicos, las nanopartículas inorgánicas (por ejemplo, nanopartículas de metal que comprenden cobalto y/o óxido de cobalto (específicamente Co_3O_4)) representan adyuvantes versátiles adecuados para utilizarse con vacunas donde tanto una respuesta Th1 o Th2 o ambas respuestas Th1 y Th2 son necesarias para eliminar patógenos.

[0020] El término nanopartícula incluye partículas que presentan entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 100 nm de diámetro. Por ejemplo, las nanopartículas pueden ser aproximadamente (o tener un diámetro medio de) 1 nm, 5 nm, 10 nm, 15 nm, 20 nm, 25 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 95 nm o 99 nm. En una forma de realización, las nanopartículas de una composición de adyuvante proporcionada por la presente invención pueden presentar un diámetro medio de aproximadamente 15 nm, 16 nm, 17 nm, 18 nm, 19 nm o 20 nm. Cuando la nanopartícula comprenda cobalto, pueden presentar un diámetro

(o un diámetro medio) de aproximadamente 17 nm, 17,5 nm, 18 nm, 18,1 nm, 18,2 nm, 18,3 nm, 18,4 nm, 18,5 nm, 18,6 nm, 18,7 nm, 18,8 nm, 18,9 nm, 19 nm, 19,5 nm or 20 nm.

5 **[0021]** En una forma de realización, las nanopartículas de cobalto de los adyuvantes descritos en el presente documento (incluidas nanopartículas de óxido de cobalto (II,III)) presentan un diámetro medio de aproximadamente $18,4 \pm 5,0$ nm.

10 **[0022]** También se ha descrito en el presente documento el uso de nanopartículas de metal inorgánicas (incluidos cobalto/dióxido de cobalto) descritas en el presente documento como adyuvantes.

[0023] En un segundo aspecto, la invención proporciona nanopartículas de cobalto inorgánicas y/o nanopartículas de óxido de cobalto para su uso como adyuvantes. A modo de ejemplo, la invención puede proporcionar nanopartículas de Co_3O_4 y nanopartículas de Co_3O_4 para su uso como adyuvantes.

15 **[0024]** En un tercer aspecto, los adyuvantes proporcionados por la presente invención puede presentarse como composiciones. En una forma de realización, una composición de adyuvante de la presente invención puede comprender uno o más componentes elegidos del grupo consistente en:

- 20 (i) nanopartículas de cobalto y/o nanopartículas de óxido de cobalto;
 (ii) componentes de adyuvante adicionales (por ejemplo, un adyuvante con base de alumbre); y
 (iii) un excipiente, solvente, portador o diluyente farmacéutica o fisiológicamente aceptable.

25 **[0025]** Entre los excipientes adecuados se puede incluir, por ejemplo, aceite, y un experto en la técnica entenderá que el término «aceite» puede incluir alcanos, alquenos, alquinos, y sus correspondientes ácidos y alcoholes, éteres y ésteres de los mismos, y mezclas de los mismos. Los compuestos individuales del aceite son compuestos de hidrocarburos ligeros, es decir, tales componentes presentan de 6 a 30 átomos de carbono. El aceite puede prepararse de forma sintética o purificarse a partir de productos derivados del petróleo. El «aceite» puede presentar una estructura de cadena lineal o ramificada. Puede estar completamente saturado o presentar uno o más enlaces dobles o triples. Algunos aceites no metabolizables para su uso en la presente invención
 30 incluyen aceite mineral, aceite de parafina y cicloparafinas, por ejemplo.

[0026] También se pretende que el término aceite incluya «aceite mineral ligero», es decir, aceite que se obtiene de forma similar mediante destilación de petrolato, pero que presenta una densidad relativa ligeramente inferior a la del aceite mineral blanco. Otro «aceite» para su uso como excipiente puede incluir aceites metabolizables (no tóxicos). Los aceites de este tipo pueden incluir, por ejemplo, aceites vegetales, aceites de pescado, aceites animales o aceites preparados de forma sintética que pueden ser metabolizados por el cuerpo del sujeto (humano o animal) al que se le administrará el adyuvante y que no son tóxicos. Entre las fuentes de aceites vegetales se incluyen nueces, semillas y granos.

40 **[0027]** Un experto en la técnica entenderá que cualquiera de los excipientes de aceite descritos en el presente documento pueden proporcionarse como formas de emulsión de aceite en agua, agua en aceite o agua en aceite en agua.

45 **[0028]** Una emulsión de aceite en agua proporcionada por la presente invención está compuesta de una fórmula AMPHIGEN(R). Esta fórmula comprende un componente acuoso, lecitina, aceite mineral y tensoactivos. Entre las patentes que describen los componentes de la fórmula se incluyen US 5.084.269 y US 6.572.861.

50 **[0029]** Normalmente, el componente de aceite de la presente invención está presente con una cantidad desde 1 % hasta 50 % en volumen; o con una cantidad desde 10 % y 45 %; o con una cantidad desde 20 % a 40 %.

[0030] Otros componentes de las composiciones de adyuvante descritas en el presente documento pueden incluir excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como portadores, solventes y diluyentes, agentes isotónicos, agentes amortiguadores, estabilizadores, conservantes, agentes vasoconstrictores, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos y similares. Entre los portadores, solventes y diluyentes típicos se incluyen
 55 agua, soluciones salinas, dextrosa, etanol, glicerina, aceite y similares. Agentes isotónicos representativos incluyen cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol, lactosa y similares. Entre los estabilizadores se incluye gelatina, albúmina y similares.

60 **[0031]** Los tensoactivos se utilizan para ayudar en la estabilización de la emulsión seleccionada para que actúe como el portador para el adyuvante y el antígeno. Entre los tensoactivos adecuados para utilizarse en la presente invención se incluyen tensoactivos naturales compatibles biológicamente y tensoactivos sintéticos no naturales. Entre los tensoactivos biológicamente compatibles se incluyen compuestos de fosfolípidos o una mezcla de fosfolípidos. Los fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolinas (lecitina), tal como lecitina de huevo o soja. La lecitina puede obtenerse como una mezcla de fosfátidos y triglicéridos mediante el lavado con agua de aceites

vegetales crudos y la separación y secado de las gomas hidratadas resultantes. Un producto refinado puede obtenerse mediante la fracción de la mezcla en glucolípidos y fosfolípidos insolubles en acetona restantes tras la eliminación de los triglicéridos y el aceite vegetal mediante el lavado por acetona. De forma alternativa, la lecitina puede obtenerse a partir de diversas fuentes comerciales. Otros fosfolípidos adecuados incluyen fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, cardiolipina y fosfatidiletanolamina. Los fosfolípidos pueden aislarse a partir de fuentes naturales o sintetizarse de forma convencional.

[0032] Entre los tensoactivos sintéticos no naturales adecuados para su uso en la presente invención se incluyen tensoactivos no iónicos con base de sorbitán, p. ej., tensoactivos de sorbitán de ácidos grasos sustituidos (disponibles comercialmente bajo el nombre SPAN(R) o ARLACEL(R)), ésteres de ácido graso de sorbitol polietoxilado (TWEEN(R)), ésteres de polietilenglicol de ácidos grasos de fuentes tal como aceite de ricino (EMULFOR(R)); ácido graso polietoxilado (p. ej., ácido esteárico disponible bajo el nombre SIMULSOL M-53(R)), polímero formaldehído/isocitilfenol polietoxilado (TYLOXAPOL(R)), éteres de alcohol graso polioxietileno (BRIJ(R)); éteres no fenilos de polioxietileno (TRITON(R) N), polioxietileno isooctilo fenilo éteres (TRITON(R) X).

[0033] En general, el tensoactivo, o la combinación de tensoactivos, si se utilizan dos o más tensoactivos, está presente en la emulsión con una cantidad de 0,01 % a 10 % en volumen, preferentemente, de 0,1 % a 6,0%, más preferentemente de 0,2% a 5,0%.

[0034] En el presente documento, «un portador farmacéuticamente aceptable» incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, revestimientos, adyuvantes, agentes estabilizadores, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardadores de la adsorción y similares. El portador (o portadores) debería ser «aceptable» en el sentido de ser compatible con los demás componentes de las composiciones y no perjudicial para el sujeto. Normalmente, los portadores estarán esterilizados y libres de pirógenos y se elegirán según el modo de administración que haya de utilizarse. Los expertos en la técnica saben que determinadas fórmulas de portadores farmacéuticamente aceptables comprenden aquellos portadores aprobados en la normativa aplicable promulgada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos o la Administración de Alimentos y Medicamentos estadounidense o agencia gubernamental equivalente en un país no perteneciente a Estados Unidos. Por lo tanto, el portador farmacéuticamente aceptado para la producción comercial de las composiciones puede ser un portador que ya se ha aprobado o que será aprobado por la correspondiente agencia gubernamental en Estados Unidos o en el país extranjero.

[0035] Las composiciones pueden incluir de forma opcional diluyentes sólidos, semisólidos, líquidos farmacéuticamente aceptables (es decir, esterilizados o no tóxicos) que sirvan como medios, excipientes o vehículos farmacéuticos. Entre los diluyentes se puede incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerina y similares. Entre los agentes isotónicos se puede incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizadores incluyen albúmina, entre otros.

[0036] Las composiciones también pueden contener antibióticos u otros conservantes, incluidos, por ejemplo, gentamicina, mertiolato o clorocresol. Las diferentes clases de antibióticos o conservantes a partir de los cuales se eligen son bien conocidos por los expertos en la técnica.

[0037] En una forma de realización, las composiciones de adyuvante de la presente invención pueden comprender uno o más componentes de adyuvante adicionales. Por ejemplo, una composición de adyuvante puede comprender, además de las nanopartículas inorgánicas (cobalto) descritas en el presente documento, uno o más adyuvantes seleccionados del grupo que consiste en alumbre (que comprende hidróxido/fosfato de aluminio); adyuvantes con base de aceite y adyuvantes orgánicos (por ejemplo, escualeno).

[0038] En una forma de realización, el adyuvante y/o las composiciones de adyuvante descritos en el presente documento pueden proporcionarse en forma liofilizada o como composiciones liofilizadas. Un experto en la técnica entenderá que el adyuvante liofilizado/las composiciones de adyuvante liofilizadas de la presente invención pueden reconstituirse utilizando cualquiera de los portadores/diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento.

[0039] De forma ventajosa, los adyuvantes y las composiciones de adyuvante descritos en el presente documento pueden comprender además uno o más agentes conservadores, incluidos por ejemplo, un agente de criopreservación.

[0040] Los adyuvantes se utilizan con frecuencia como componentes de las composiciones de vacuna, en concreto donde el antígeno de la vacuna es poco inmunogénico. Un experto en la técnica entenderá que se pueden utilizar adyuvantes para cambiar, modular, modificar o aumentar los efectos de una vacuna de forma que estimule una respuesta inmunitaria adecuada o apropiada, una que ayude con la eliminación de un patógeno de un huésped humano o animal. Como tal, en un aspecto adicional, la presente invención se extiende a vacunas

para su uso animal o humano, donde dichas vacunas comprenden o se formulan con un adyuvante descrito en el presente documento.

5 **[0041]** En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona los adyuvantes de la presente invención (concretamente, adyuvantes con base de cobalto) para su uso en la mejora de respuestas inmunitarias en sujetos humanos o animales. En una forma de realización, los adyuvantes de la presente invención se administran juntos o de manera simultánea con una vacuna. Normalmente, los adyuvantes se formulan junto con una vacuna para su administración a un sujeto humano o animal. En otras formas de realización, los adyuvantes para su uso pueden formularse como composiciones independientes (junto con portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables) para ser administradas a sujetos humanos o animales antes o después de la administración de una vacuna.

15 **[0042]** Un experto en la técnica entenderá que las referencias a "vacuna" en el presente documento pueden incluir cualquier preparación de antígeno para su uso en la estimulación de respuestas inmunitarias en huéspedes humanos o animales. Actualmente se utilizan muchos tipos diferentes de vacunas y muchas de estas se formulan/combinan o administran (de forma simultánea o por separado) con adyuvantes para mejorar, aumentar o modificar la naturaleza de la respuesta inmunitaria provocada. En algunos casos, un adyuvante es explotado como un medio para mejorar una respuesta inmunitaria en un huésped humano o animal. Por ejemplo, se puede utilizar un adyuvante para mejorar la respuesta inmunitaria provocada por bajas (inferiores al nivel 20 óptimo) dosis de antígeno. En este sentido, un adyuvante/composición de adyuvante de la presente invención puede combinarse con dosis inferiores al nivel óptimo de una vacuna o antígeno, sirviendo la vacuna o antígeno para aumentar la respuesta inmunitaria provocada por la dosis inferior al nivel óptimo. Cuando se administra de forma conjunta o con un adyuvante o composición de adyuvante de la presente invención, la respuesta inmunitaria provocada por una dosis de antígeno/vacuna inferior al nivel óptimo, puede compararse con una 25 respuesta inmunitaria provocada por la administración de una dosis óptima de la vacuna/antígeno de forma aislada (es decir, sin adyuvante).

30 **[0043]** En una forma de realización, las vacunas de antígenos bacterianos y/o virales pueden combinarse o administrarse (de forma simultánea o por separado) con los adyuvantes/composiciones de adyuvante descritos en el presente documento. Por ejemplo, las vacunas contra, por ejemplo, formas de «gripe», difteria, tosferina, sarampión, paperas, rubeola, polio, tuberculosis, meningitis, tétanos, fiebre amarilla, rabia pueden combinarse o administrarse con los adyuvantes descritos en el presente documento.

35 **[0044]** También se describen en el presente documento (i) métodos para provocar respuestas inmunitarias y/o (ii) métodos para mejorar, modular o aumentar las respuestas inmunitarias en sujetos animales o humanos, comprendiendo dichos métodos la etapa de administrar una vacuna y un adyuvante proporcionado por el primer aspecto de la presente invención a un sujeto humano o animal que lo necesite.

40 **[0045]** El adyuvante puede formularse con una vacuna de forma que se administre a un huésped humano o animal con la misma. De forma alternativa, el adyuvante puede formularse como una composición separada de forma que pueda administrarse separado de la vacuna o de forma simultánea con la misma.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 **[0046]** A continuación se describirá la presente invención en detalle haciendo referencia a las siguientes figuras que muestran:

Figura 1: La forma y tamaño de $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ (A) y alumbre-I (B). Las partículas se dispersaron en agua destilada y se midió mediante una microscopia electrónica de transmisión.

50 Figura 2: Citotoxicidad de NP o alumbre-I a células RAW264.7 Las partículas (las concentraciones proporcionadas estaban en $\mu\text{g}/\text{ml}$) se añadieron a las células RAW264.7 durante 24 h con o sin un 1 % OVA. Se midieron los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) para determinar la citotoxicidad. Cabe destacar que alumbre-I mostró alrededor de 6 veces más de citotoxicidad comparado con $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ y OVA aumentó la toxicidad de las partículas. Los datos son la media \pm error estándar de la media (EEM) ($n = 4$ por grupo). Los datos de citotoxicidad de partículas tratadas con 1 % OVA o sin OVA se compararon con sus respectivos controles. *** $P < 0,001$.

Figura 3: Niveles IgG1 específicos de OVA en suero 7 días después de la segunda sensibilización subcutánea. Otras inmunoglobulinas (IgG2a, IgE, IgA e IgM) no mostraron aumentos (datos no mostrados). Los datos son la media \pm EEM ($n = 5$ por grupo).

60 Figura 4: Niveles de inmunoglobulina específicos de OVA presentes en suero 7 días después de la estimulación intraperitoneal con ovoalbúmina. Las inmunoglobulinas se analizaron para detectar (A) IgG1, (B) IgG2a, (C) IgE, (D) IgA y (E) IgM. Los datos son la media \pm EEM (datos representativos, $n = 5$ por grupo). (F) Proliferación de células esplénicas 7 días después de la estimulación intraperitoneal con OVA. Incorporación de ^3H -timidina a células cultivadas con el medio únicamente o en presencia de $10\mu\text{M}$ OVA.

Figura 5: Niveles IgG1 específicos de OVA en fluido del lavado peritoneal 7 días después de la estimulación con ovoalbúmina. Otras inmunoglobulinas (IgG2a, IgE, IgA e IgM) no mostraron aumentos (datos no mostrados). Los datos son la media \pm EEM ($n = 5$ por grupo).

Figura 6: Los niveles de citocina en el fluido del lavado peritoneal extraído 7 días después de la estimulación. (a) IFN- γ ; (B) IL-1 β . Los datos son la media \pm EEM ($n = 5$ por grupo). $P < 0,05$ en comparación con el grupo de tratamiento PBS.

Figura 7: Recuento diferencial de células del fluido del lavado peritoneal extraído 7 días después de la estimulación. Los datos son la media \pm EEM ($n = 5$ por grupo). $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ y $***P < 0,001$ en comparación con grupo de tratamiento PBS.

Figura 8: Histología representativa de la zona de inyección 7 días después de la estimulación. A, PBS; B, NP-OVA; C, alumbre-I-OVA; D, solo NP. Cabe destacar que los grupos NP-OVA y solo NP mostraron una inflamación moderada (flecha) junto con el depósito de NP (puntos negros) mientras que alumbre-I-OVA mostró inflamación masiva y necrosis (flecha).

Figura 9: Gráfico que muestra el número de células dendríticas (DC por sus siglas en inglés) que expresan determinados marcadores.

Figura 10: Gráfico que muestra la respuesta citotóxica a las nanopartículas de óxido de cobalto.

Figura 11: Gráfico que muestra la respuesta citotóxica al alumbre Imject.

Figura 12: Gráfico que muestra la citotoxicidad de las DC en respuesta a NP de óxido de cobalto ± 1 % OVA.

Figura 13: Gráfico que muestra la citotoxicidad de las DC en respuesta a alumbre Imject ± 1 % OVA.

Figura 14: Gráfico que muestra la generación de IL-1 β por DC tratadas con NP de óxido de cobalto ± 1 % OVA.

Figura 15: Gráfico que muestra la generación de IL-1 β por DC tratadas con alumbre Imject ± 1 % OVA.

25 Ejemplo 1

[0047] Ya que muy pocos adyuvantes son capaces de provocar una respuesta Th1, se pensó que se podrían utilizar NP para mejorar la inmunidad Th1 contra un antígeno modelo, ovoalbúmina (OVA).

30 **[0048]** Seleccionamos Co₃O₄NP como un adyuvante candidato porque Co₃O₄NP producía una respuesta Th1 sin la grave patología de hipersensibilidad retardada vista con NiONP[19]. El objetivo era determinar si Co₃O₄NP podría ser adecuado para utilizarse como un adyuvante induciendo una respuesta Th1 y Th2 equilibrada al antígeno modelo OVA proporcionado de forma subcutánea a los ratones hembra C57BL/6.

35 **[0049]** Para ello, comparamos las respuestas anti-OVA inducidas por Co₃O₄NP con aquellas inducidas por un adyuvante que contenía aluminio disponible comercialmente. El adyuvante elegido fue alumbre Imject (alumbre-I), un adyuvante de metal particulado usado ampliamente para experimentos murinos, que contiene una mezcla 50/50 de hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio y estabilizadores inactivos. Además de las respuestas específicas a ovoalbúmina, también se evaluó la toxicidad en la zona de inyección y la citotoxicidad de células que presentan antígenos se evaluó utilizando una línea celular de macrófagos de ratón.

MÉTODOS Y MATERIALES

45 **[0050]** Todos los productos químicos y reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich (Poole, Reino Unido) a menos que se indique lo contrario.

Caracterización y dispersión de partículas.

50 **[0051]** El tamaño de Co₃O₄NP (Nanostructural and Amorphous Materials, TX, EE. UU.) y del alumbre Imject (Thermo Scientific, Cramlington, RU) se midió mediante una microscopía electrónica de transmisión (JEM-1200EX II, JEOL, Tokio, Japón). Los tamaños hidrodinámicos de partículas se midieron mediante un analizador de tamaño de partículas (90Plus/BI-MAS; Brookhaven Instruments Corporation, Nueva York, EE. UU.) en presencia de diferentes concentraciones de un medio de dispersión. Para el estudio *in vivo*, se utilizó ovoalbúmina de huevo de gallina (grado V) como medio de dispersión para Co₃O₄NP + OVA (NP-OVA) y alumbre-I + OVA (alumbre-I-OVA) mientras que se utilizó suero inactivado por calor (concentración final: 5 %) extraído de ratones C57BL/6 sanos para solo NP. Los niveles de endotoxina en las suspensiones de partículas se midieron mediante un ensayo de lisado de amebocitos de Limulus (Cambrex, MD, EE. UU.). La solubilidad de Co₃O₄NP y alumbre-I se midió en el fluido lisosómico artificial ácido (pH 5.5) o fluido intersticial artificial básico (pH 7.4) de conformidad con el método descrito anteriormente[19].

60 Justificación de la selección de las dosis.

[0052] Según nuestro anterior estudio, elegimos la dosis de alumbre-I como 2,0 mg por ratón[17]. Por el contrario, la dosis de Co₃O₄NP se eligió como 25 μ g por ratón según la capacidad de causar inflamación en el

pulmón; la instilación de 419 µg/rata de Co₃O₄NP mostró una inflamación neutrofílica aguda e inflamación neutrofílica/linfocítica con lipoproteinosis alveolar[19].

Ensayo de citotoxicidad (LDH)

5

[0053] Se cultivó la línea celular de macrófagos de ratón, RAW 264.7 a 37 °C con 5 % CO₂ en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) con L-glutamina, antibióticos (penicilina y estreptomycin) y 10 % suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor. Las células se separaron mediante la utilización de Accutase y clasificaron a 5×10^5 en placas de 12 pocillos (Corning, NY, EE. UU.) para los experimentos. Los efectos citotóxicos de las NP y el alumbre se midieron mediante el uso de un kit de ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) (Roche Applied Science, Sussex, RU) de conformidad con las instrucciones del manual. Como partículas de referencia, se utilizaron NP de TiO₂ (30,5 ± 1,8 nm) (Nanostructural and Amorphous Materials, TX, EE. UU.) Se trataron las soluciones de alumbre-I o NP con o sin OVA (1 %) en las células RAW264.7 durante 24 h. Cada NP se analizó con concentraciones de 10, 30, 100 y 500 µg/ml mientras que el alumbre-I se sometió a concentraciones de 80, 240 y 800 µg/ml. Tras la incubación, se centrifugaron los sobrenadantes de cultivo libres de células a 17000 × g durante 20 min para deshacerse de las partículas. La citotoxicidad se calculó como porcentaje comparado con el control positivo (0,1% Triton-X).

10

15

Inmunización animal.

20

[0054] Se obtuvieron ratones C57BL/6 hembra de 6 semanas de Harlan Laboratories (Hillcrest, RU). Todos los animales fueron mantenidos y manipulados bajo una licencia específica concedida por el Ministerio del Interior de Reino Unido a uno de los autores (SEMH) que asegura el trato humano y la mitigación del sufrimiento en todos los experimentos animales. Después de 1 semana para aclimatarse, los ratones (5 ratones por grupo) fueron inmunizados dos veces con un intervalo de 2 semanas. Cada ratón fue sensibilizado mediante inyección subcutánea en la base de cola con una dosis de 100 µl con 25 µl de PBS, 50 µl (100 µg) de ovoalbúmina libre de endotoxinas (Worthington Biochemical Corporation, NJ, EE. UU.) y 25 µl de adyuvante (alumbre-I: 2,0 mg; Co₃O₄NP: 25 µg). Se utilizó PBS (100 µl) y Co₃O₄NP (25 µg en PBS con 5 % de suero de ratón) para los controles negativos. A continuación, se inyectaron 50 µg de OVA en 100 µl de PBS en el peritoneo como estimulación. A los 7 días después de la segunda sensibilización, se extrajo sangre de la vena de la cola. A los 7 días después de la estimulación, se extrajo sangre mediante punción cardíaca y se llevó a cabo un lavado peritoneal tres veces utilizando 2 ml de solución salina al 0,9 %. El primer fluido del lavado se mantuvo para el ELISA de citocinas e inmunoglobulinas, mientras que las células de los tres lavados agruparon para el recuento de células. La zona de inyección también se fijó con formalina tamponada neutral 10 % para el análisis histológico. 2.5. *ELISA de inmunoglobulina*. Se extrajeron muestras de sangre 1 semana después de la inmunización y 1 semana después de la estimulación se analizaron para detectar la presencia de inmunoglobulinas específicas de OVA de IgA, IgE, IgG1, IgG2c (conocido anteriormente como IgG2a^b) y suclases de IgM. Las muestras de lavado peritoneal y suero se diluyeron según corresponda en PBS con 1% ASB. Los anticuerpos secundarios conjugados con biotina se diluyeron como se indica a continuación: anti-IgA - 1:1000; anti-IgG1 - 1:8000; anti-IgG2c - 1:1000; anti-IgM - 1:1000; anti-IgE - 1:250. Antes de medir IgE, se incubó el suero durante una hora con perlas acopladas a proteína-G para eliminar IgG [17;18].

25

30

35

40

ELISA de citocinas.

45

[0055] Con el fin de evaluar el perfil de las citocinas, se analizaron la citocina de tipo Th1 (IFN-γ), las citocinas de tipo Th2 (IL-10 e IL-13) y la citocina proinflamatoria derivada de macrófagos en el lavado peritoneal. Todos los kits se adquirieron de R&D Systems (Abingdon, RU) y las citocinas se midieron de conformidad con las instrucciones del fabricante.

50

Recuento diferencial de células en lavado peritoneal.

[0056] El número de células totales en el fluido de lavado se evaluó mediante un contador de núcleo celular (Chemometec, Surrey, RU). Las células se prepararon en portaobjetos para ponerlas en el Cytospin (Thermo Scientific, Cramlington, RU), fijadas con metanol y teñidas con Diff-Quik (Raymond Lamb, Eastbourne, RU). Se contaron alrededor de 300 - 500 células por portaobjetos bajo un microscopio óptico según su morfología.

55

Ensayo de proliferación de linfocitos.

[0057] Se extrajo el bazo de los ratones y se realizaron suspensiones de células únicas pasándolas por filtros 40 µm. Las células se extendieron en capas en un medio de separación de gradiente de densidad Lympholyte-M™ (Fisher Scientific, Loughborough, RU) y se giraron a 2000 × g durante 15 minutos para eliminar células muertas, eritrocitos y granulocitos. La capa de tejido mononuclear en la interfaz se extrajo mediante lavado y se volvió a suspender en medio de cultivo tisular (RPMI 1640 suplementado con 10% FCS, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin, 2 mM L-glutamina y 50 µM 2-ME; Sigma, RU). Se contaron las células viables y los cultivos

60

triplicados con 4×10^5 células en 200 μ l con o sin 10 μ M ovoalbúmina libre de endotoxinas se colocaron en placas de 96 pocillos. Los cultivos se incubaron durante 48 horas y se añadió 0,5 μ Ci³-H-timidina a cada pocillo durante la noche. Se recogieron los cultivos y se incorporó timidina contados en un contador de centelleo Betaplate (Wallac UK, Milton Keynes, RU). Los sobrenadantes de cultivos paralelos no marcados se cultivaron a 72 h para el análisis de citocina.

Histología.

[0058] Los tejidos fijados por formalina con parafina incluida de la zona de inyección se cortaron en secciones de 3 μ m y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Análisis estadístico.

[0059] Se analizaron los datos con el Software GraphPad Prism (Versión 5, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). Con el fin de comparar los grupos de tratamiento, se aplicó el análisis unilateral de varianza con comparaciones por pares *post hoc* de Tukey. Se consideró $P < 0,05$ estadísticamente significativo.

RESULTADOS

20 Propiedades fisicoquímicas de partículas.

[0060] Co₃O₄NP mostró formas esféricas y el tamaño primario fue $18,4 \pm 5,0$ nm. Alumbre-I mostró formas más heterogéneas y el tamaño medio fue $88,7 \pm 32,4$ nm de longitud y $28,9 \pm 19,7$ nm de ancho (figura 1). Los niveles de endotoxina de ambas partículas estaban por debajo del límite de detección (0,1 EU/ml). Co₃O₄NP mostró grandes aglomerados sin un medio de dispersión pero pequeños aglomerados con ovoalbúmina como dispersante (tabla 1). Alumbre-I mostró pequeños aglomerados incluso sin medio de dispersión. La mayor parte del alumbre-I se disolvió en 3 días en fluido lisosomal artificial ácido (pH 5.5), mientras que se disolvió mínimamente en el fluido intersticial artificial (pH 7.4) (datos no mostrados). Co₃O₄NP mostró una mínima disolución en ambas condiciones (datos no mostrados). 3.2. *Citotoxicidad in vitro* El alumbre-I fue de lejos el más tóxico de las NP analizadas en macrófagos de ratón (figura 2). Cuando las partículas se dispersaron con OVA, las partículas fueron más tóxicas.

Tabla 1. Tamaño hidrodinámico y polidispersidad de partículas 24 h después de la dispersión (media \pm SD).

Dispersión	Co ₃ O ₄ NP		Alumbre Imject	
	Tamaño hidrodinámico	Polidispersidad	Tamaño hidrodinámico	Polidispersidad
Solución salina	943,0 \pm 251,1	0,15 \pm 0,01	218,9 \pm 119,2	0,23 \pm 0,06
Ovoalbúmina 0,1%	90,3 \pm 17,9	0,16 \pm 0,02	241,2 \pm 62,1	0,29 \pm 0,03
Ovoalbúmina 1%	99,8 \pm 32,6	0,20 \pm 0,02	126,2 \pm 36,9	0,19 \pm 0,05

35

Inmunización *in vivo*

Niveles de inmunoglobulinas específicas de ovoalbúmina en el suero después de la sensibilización.

[0061] IgG1 fue la única subclase de inmunoglobulina que se pudo medir en esta etapa. La figura 3 muestra que tanto alumbre-I-OVA como NP-OVA indujeron producción de IgG1 aunque alumbre-I-OVA fue más potente que NP-OVA. Los niveles de inmunoglobulinas específicas de OVA inducidas por solo NP fueron similares a los del vehículo de control (PBS).

45 Niveles de inmunoglobulinas específicas de ovoalbúmina en el suero después de la estimulación

[0062] Los niveles de inmunoglobulina tras la estimulación demostraron una amplia variedad de respuestas. Tanto NP-OVA como alumbre-I-OVA produjeron aumentos en la respuesta IgG1 aunque de nuevo alumbre-I-OVA mostró mayores respuestas que NP-OVA (figura 4A). Los niveles de IgG1 tanto en los grupos NP-OVA como en alumbre-I-OVA mostraron un aumento notable cuando se compararon con aquellos tras la sensibilización. Además, NP-OVA aumentó en los niveles IgG2c (figura 4B). Alumbre-I-OVA indujo mayores niveles IgE, IgM e IgA que NP-OVA (figuras 4C - 4E).

50

Proliferación de esplenocitos tras la estimulación.

55

[0063] Las células esplénicas mononucleares fueron estimuladas *in vitro* con OVA 7 días después de la estimulación. La figura 4F muestra que los esplenocitos tanto de ratones estimulados con alumbre-I como con NP-OVA proliferaron.

5 **Niveles de inmunoglobulinas específicas de ovoalbúmina en el lavado peritoneal después de la estimulación.**

[0064] Tanto NP-OVA como alumbre-I-OVA mostraron aumentos en los niveles de IgG1 (figura 5). Alumbre-I-OVA mostró niveles de IgG1 mayores comparado con NP-OVA. Se detectaron otras inmunoglobulinas (IgG2c, IgE, IgA, and IgM) únicamente en concentraciones muy bajas similares al grupo PBS (datos no mostrados).

Expresión de citocina en el fluido de lavado peritoneal.

[0065] El fluido del lavado peritoneal extraído de los ratones también se utilizó para medir la expresión de citocina. Los niveles de IFN- γ se aumentaron de forma significativa mediante NP-OVA mientras que otros grupos no mostraron respuestas significativas (figura 6A). Los niveles de IL-1 β se aumentaron de forma significativa mediante alumbre-I-OVA únicamente (figura 6B). IL-10 e IL-13 no mostraron cambios significativos en comparación con los controles (datos no mostrados).

20 **Recuento diferencial de células en lavado peritoneal.**

[0066] El número de linfocitos y células totales se aumentó de forma significativa mediante NP-OVA y alumbre-I-OVA mientras que solo NP era comparable al vehículo de control (figuras 7A y 7B). El número de granulocitos se aumentó de forma significativa únicamente mediante alumbre-I-OVA (figura 7C).

Inflamación en la zona de inyección.

[0067] Las muestras histológicas tomadas de la zona de inyección 7 días después de la estimulación proporcionaron resultados llenos de contrastes entre las dos partículas analizadas. El grupo de tratamiento alumbre-I-OVA mostró una inflamación notable y necrosis sin depósito de partículas obvio mientras que el grupo NP-OVA y solo NP mostró inflamación mínima con depósito de partículas alrededor (figura 8).

Ejemplo 2

35 **Objetivos**

[0068]

- Determinar la toxicidad de las nanopartículas de óxido de cobalto y alumbre-I ante células dendríticas derivadas de PBMC mediante el análisis de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa.
- Determinar la dosis requerida para inducir una buena respuesta de citocina de IL-1 β , IL-10 e IL-12 sin inducir toxicidad en las células.
- Tratar las células dendríticas derivadas de PBMC bovino con las concentraciones óptimas de NP/Alumbre-I \pm Ag85. Ag85 se conserva muy bien y la proteína es idéntica en el organismo lo que provoca tuberculosis humana (MTb) y el organismo relacionado (MB) que provoca TB en el ganado. Esto nos permite identificar el perfil de citocinas inmunomoduladoras producidas por las células mediante ELISA y evaluar los marcadores de maduración de la superficie celular y la expresión de CMH de clase 11 mediante el análisis por citometría de flujo.

50 **Resultados**

[0069] Véanse las figuras 9-15 y las tablas 2 y 3 (a-f) a continuación.

Tabla 2: Tamaño hidrodinámico y polidispersidad

	PBS			
	Medios SFB 2 %		Medios SFB 5%	
	Diámetro medio nm	Polidispersidad	Diámetro medio nm	Polidispersidad
Alumbre Imject				
Co ₃ O ₄ NP	1780	0,081	567	0,076

	MQ H2O			
	Medios SFB 2%		Medios SFB 5%	
	Diámetro medio nm	Polidispersidad	Diámetro medio nm	Polidispersidad
Alumbre Imject	337	0,138	193	0,28
Co ₃ O ₄ NP	66	0,187	136	0,005

Tabla 3 (a-f): Respuesta de citocina a nanopartículas de óxido de cobalto y alumbre-Imject (n=4).

3A		
NP	Media	EEM
Medios	17,30	11,74
10 µg/ml	36,42	34,80
30 µg/ml	8,64	7,26
100 µg/ml	140,71	121,57
500µg/ml	10,50	6,99
3B		
NP	Media	EEM
Medios	0,19	0,05
10 µg/ml	0,34	0,18
30 µg/ml	0,27	0,23
100 µg/ml	0,56	0,42
500 µg/ml	0,26	0,12
3C		
NP	Media	EEM
Medios	0,14	0,12
10 µg/ml	0,09	0,08
30 µg/ml	7,8	3,49
100 µg/ml	0,06	0,05
500 µg/ml	1,15	0,27
3D		
ALUMBRE-I	Media	EEM
Medios	14,68	12,27
20 µg/ml	19,75	9,36
80 µg/ml	22,30	9,43
240 µg/ml	52,76	20,05
800 µg/ml	54,61	12,2
3E		
ALUMBRE-I	Media	EEM
Medios	0,44	0,23

20 µg/ml	0,08	0,05
80 µg/ml	0,21	0,19
240 µg/ml	0,19	0,15
800 µg/ml	0,17	0,12
3F		
ALUMBRE-I	Media	EEM
Medios	0,14	0,14
20 µg/ml	0,21	0,18
80 µg/ml	10,85	10,61
240 µg/ml	0,2	0,12
800 µg/ml	0,75	0,69

Sumario

5 [0070]

- Se determinó con éxito el perfil marcador de la superficie celular para las DC restantes. A continuación, esto se comparó con las DC tratadas con nanopartículas de óxido de cobalto y alumbre Imject ± Ag85 para producir cambios en el estado de activación y la expresión de CMH de clase 11.
- 10 • Mediante la utilización del análisis de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa determinamos los niveles de toxicidad contra dosis crecientes de nanopartículas de óxido de cobalto y alumbre Imject. La concentración de cada uno será 50µg/ml.
- Se miró el perfil de citocinas inmunomoduladoras producidas por las células mediante ELISA. Niveles aumentados de IL-1β que se producen en respuesta a mayores dosis de alumbre Imject.
- 15 • No existe diferencia en los niveles de toxicidad celular en células dendríticas tratadas con NP de óxido de cobalto y alumbre-I (± 1% OVA).
- Los niveles de IL-1β en los sobrenadantes de células dendríticas tratadas con NP de óxido de cobalto y alumbre-I son comparables tanto para las DC tratadas con óxido de cobalto como con alumbre Imject.
- La adición de 1% OVA lleva a mayores niveles de IL-1 beta que se produce con alumbre Imject + 1% OVA lo que muestra niveles superiores en comparación con NP de óxido de cobalto + 1% OVA.
- 20

ANÁLISIS

25 [0071] La seguridad de los adyuvantes que han de utilizarse en el ser humano es una cuestión clave en su desarrollo. Estudios recientes han demostrado que el adyuvante autorizado activa monocitos humanos y macrófagos[20], lo que sugiere que lo que se consideraría como toxicidad es potencialmente una parte del mecanismo por el cual el funciona el adyuvante de alumbre. En el presente estudio, se formuló la hipótesis de que Co₃O₄NP podía producir una respuesta Th1 y Th2 equilibrada con menor toxicidad que el alumbre, lo que sugiere que puede ser una opción más segura.

30 [0072] Co₃O₄NP mostró una forma esférica relativamente homogénea de partículas. Resulta interesante que el alumbre-I era más heterogéneo e inferior a 100 nm en ambas dimensiones. La forma heterogénea puede deberse a la composición de alumbre-I que comprende una mezcla de hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio. Por lo tanto, tanto Co₃O₄NP como alumbre-I se encontraban dentro de la definición de nanopartículas y clasificados como NP de óxido de metal[21;22]. Como estudios anteriores han demostrado que el tamaño importa en cuanto a la propiedad de ser adyuvante, una dispersión óptima de NP puede ser útil[12]. OVA actuó como un dispersante excelente para ambas partículas. Co₃O₄NP mostró pequeños aglomerados cuando se dispersó con OVA lo que forma una corona de proteínas que proporciona fuerza repulsiva entre las partículas[23]. A diferencia de Co₃O₄NP, alumbre-I se dispersó relativamente bien en solución salina lo que podría deberse a los estabilizadores añadidos durante la fabricación.

45 [0073] Se cree que los adyuvantes funcionan activando células que presentan antígenos pero hay poca información sobre su toxicidad para dichas células. Mediante la utilización de una línea celular de macrófagos murinos, el estudio de citotoxicidad con LDH mostró que el propio alumbre-I era aproximadamente 6 veces más tóxico que una cantidad equivalente de Co₃O₄NP. La dispersión en OVA mostró un aumento de la toxicidad tanto

de $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ como de alumbre lo que podría deberse a la citotoxicidad de la propia OVA o para facilitar el reconocimiento y fagocitosis de partículas mediante la formación de una corona de proteínas.

5 **[0074]** Los datos tras la sensibilización mostraron que tanto alumbre-I-OVA como NP-OVA aumentaron los niveles séricos de IgG1 específicos de OVA (que es el marcador para la respuesta Th2[3]) mientras que otras inmunoglobulinas no aumentaron. Sin embargo, el potencial de producción IgG1 mediante alumbre-I-OVA era aproximadamente tres veces mayor que el de NP-OVA. Los datos tras la estimulación mostraron que se generaba una respuesta de células T, confirmado por la proliferación de células esplénicas cultivadas con OVA *in vitro*. También se observó el impulso de respuestas de inmunoglobulina en ratones inmunizados con cualquier adyuvante. La presencia de inmunoglobulinas con conmutación de clase específicas de antígenos (IgG y IgE) en el suero indican que los linfocitos T CD4+ específicos de OVA tanto de Th1 como Th2 han sido activados por OVA tras la sensibilización con el antígeno mediante la utilización de $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ como adyuvante. En suero alumbre-I-OVA produjo principalmente respuestas de anticuerpo alérgicas (IgE) y de tipo Th2 (IgG1) mientras que NP-OVA produjo una respuesta Th1 (IgG2c) y Th2 (IgG1) más equilibrada con mucho menos IgE. Esto sugiere que es más probable que $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ como adyuvante proporcione inmunidad «completa» robusta y que es menos probable que induzca efectos secundarios/alérgicos no deseados. Esto se apoya de forma adicional mediante el análisis del fluido de lavado peritoneal tras la estimulación. Los niveles de IgC1 dependientes de Th2 se aumentaron significativamente mediante NP-OVA y alumbre-I-OVA con el mismo patrón observado en suero. IFN- γ del lavado peritoneal, una citocina de tipo Th1 [24], se aumentó únicamente en el grupo inmunizado NP-OVA. El recuento diferencial de células del fluido del lavado peritoneal mostró que tanto NP-OVA como alumbre-OVA indujo inflamación linfocítica que es importante para la propiedad de ser adyuvante[5] pero NP-OVA indujo una inflamación granulocítica bastante menor. Esta inflamación granulocítica por alumbre-I-OVA fue coherente con el aumento de IL-1 β en el lavado peritoneal que es una de las citocinas proinflamatorias derivadas de macrófagos. El patrón de respuesta inducido por alumbre-I-OVA es coherente con lo que se ha observado en otros estudios[25;26].

30 **[0075]** A los 7 días después de la estimulación con las dosis utilizadas, alumbre-I indujo inflamación masiva prolongada y necrosis en la capa muscular y subcutánea de la piel inyectada mientras que $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ mostró inflamación moderada. La mayor inflamación inducida por alumbre-I en comparación con $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ era coherente con un aumento de la secreción de IL-1 β peritoneal y el número de granulocitos identificados en la cavidad peritoneal por alumbre-I lo que indica respuestas inflamatorias en ambas zonas de estimulación y sensibilización. Además, el alumbre-I indujo más anticuerpos séricos IgE anti-OVA alérgicos. Esto proporciona un resultado más redondeado con $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ que un informe anterior donde las TiO_2NP mostraron una respuesta IgE mayor que $\text{Al}(\text{OH})_3$, aunque en ese caso $\text{Al}(\text{OH})_3$ produjo la mayor identificación de granulocitos que coincide con nuestros datos[27]. Además, $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ mostró una respuesta Th1 y Th2 más equilibrada incluso con una masa administrada 80 veces menor que el alumbre-I. La ausencia de muerte celular e inflamación en la zona de inyección del grupo NP-OVA indica que provocaría menos dolor local. Además desde un punto de vista veterinario en animales destinados a la alimentación, menos muerte celular e inflamación en la zona de inyección significa menos deterioro de carne y piel y puede tener una mejora en los beneficios económicos.

40 **[0076]** En 3 días de incubación, la mayor parte del alumbre-I se disolvió en la solución ácida (pH 5.5) que presenta el mismo pH del fluido lisosomal de los macrófagos alveolares[28] mientras que existía disolución mínima en la solución básica (pH 7.4). Sin embargo, $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ mostró una mínima disolución en ambas condiciones. Sería probable que los iones composicionales liberados en el estado lisosomal ácido desempeñaran una función en la muerte celular y la inflamación para NP de alta solubilidad como CuONP [29] y ZnONP [30]. Por lo tanto, Al^{3+} disuelto en los lisosomas de células fagocíticas puede contribuir a la muerte celular y a la inflamación adicional mediante un mecanismo de tipo caballo de Troya[31]. $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ no había cambiado en solubilidad y esto es coherente con la persistencia en la zona de inyección. Esto sugiere que $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ es muy insoluble y estable. Existe una preocupación con respecto a la solubilidad de $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$, ya que los iones de cobalto se liberan muy despacio en las células y su efecto a largo plazo es desconocido[19]. La intoxicación por cobalto no es común, pero puede darse. Existen informes de reemplazos de cadenera (que contienen cobalto y cromo) que se corroen con el tiempo y liberan iones de metal en el cuerpo lo que provoca una enfermedad grave[32]. Esto parece un efecto secundario poco probable en el presente caso para $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ debido a su pequeña dosis y al volumen de la inyección y naturaleza insoluble. En nuestro estudio anterior, el depósito de $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ dentro del pulmón provoca hipersensibilidad retardada y lipoproteínosis alveolar pulmonar[19]. Sin embargo, teniendo en cuenta que el pulmón tiene respuestas inmunitarias mucho más activas que la piel y el músculo, los efectos secundarios subcutáneos pueden ser más limitados y de hecho solo se produjo inflamación moderada en la zona de inyección a las 5 semanas después de dos inyecciones. Sin embargo, si hubiera que administrar múltiples vacunas repetidas, la acumulación de $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ y la liberación de iones de cobalto pueden provocar problemas de salud. La acumulación de $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ en las capas subcutáneas y musculares indica que $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ puede proporcionar una fuente continua de antígeno desorbido que es uno de los modos de acción propuestos para el adyuvante de alumbre[33].

5 [0077] La comparación entre alumbre-I y $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ es adecuada para medir una respuesta en ratones. El alumbre Imject no está autorizado para su uso en humanos y presenta una fisicoquímica diferente para productos clínicamente aprobados[33]. Para poder evaluar completamente $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ en un estudio a largo plazo como un potencial adyuvante para el ser humano se necesitan estudios adicionales, pero creemos que $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ es muy prometedor a la hora de inducir ambas respuestas mediadas de Th1 y Th2.

CONCLUSIÓN

10 [0078] En conclusión, $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ estimuló una producción de anticuerpos alérgicos y una inflamación *in vivo* (en ambas zonas de estimulación y sensibilización) menor que una dosis estándar del adyuvante con alumbre Imject. Junto con la prueba de que también produjeron una toxicidad menor *in vitro* mientras se estimulaban las respuestas de anticuerpos de Th1 y Th2 *in vivo*, esto indica que $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ sería adecuado para su uso como un adyuvante de vacuna.

15 **Referencias**

[0079]

20 1. Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects. *Vaccine*. 13, 1263-1276 (1995).

2. Schijns VE, Brewer JM. New views on immunopotentiators in modern vaccines. *Expert.Rev. Vaccines*. 7, 877-879 (2008).

3. Cox JC, Coulter AR. Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine*. 15, 248-256 (1997).

25 4. Lambrecht BN, Kool M, Willart MA, Hammad H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr.Opin.Immunol*. 21, 23-29 (2009).

5. MacLeod MK, McKee AS, David A, *et al*. Vaccine adjuvants aluminum and monophosphoryl lipid A provide distinct signals to generate protective cytotoxic memory CD8 T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 108, 7914-7919 (2011).

30 6. Leucuta SE. Nanotechnology for delivery of drugs and biomedical applications. *Curr.Clin.Pharmacol*. 5, 257-280 (2010).

7. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 105, 14265-14270 (2008).

35 8. Hallaj-Nezhadi S, Lotfipour F, Dass C. Nanoparticle-mediated interleukin-12 cancer gene therapy. *J.Pharm.Pharm.Sci*. 13, 472-485 (2010).

9. Brewer JM. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol.Lett*. 102, 10-15 (2006).

10. Fahmy TM, Demento SL, Caplan MJ, Mellman I, Saltzman WM. Design opportunities for actively targeted nanoparticle vaccines. *Nanomedicine.(Lond)*. 3, 343-355 (2008).

40 11. Mamo T, Moseman EA, Kolishetti N, *et al*. Emerging nanotechnology approaches for HIV/AIDS treatment and prevention. *Nanomedicine.(Lond)*. 5, 269-285 (2010).

12. Li X, Sloat BR, Yanasarn N, Cui Z. Relationship between the size of nanoparticles and their adjuvant activity: data from a study with an improved experimental design. *Eur.J.Pharm.Biopharm*. 78, 107-116 (2011).

45 13. Tiwari S, Agrawal GP, Vyas SP. Molecular basis of the mucosal immune system: from fundamental concepts to advances in liposome-based vaccines. *Nanomedicine.(Lond)*. 5, 1617-1640 (2010).

14. Inoue K, Koike E, Yanagisawa R, Hirano S, Nishikawa M, Takano H. Effects of multi-walled carbon nanotubes on a murine allergic airway inflammation model. *Toxicol.Appl.Pharmacol*. 237, 306-316 (2009).

15. Dong CC, Yin XJ, Ma JY, *et al.* Exposure of brown Norway rats to diesel exhaust particles prior to ovalbumin (OVA) sensitization elicits IgE adjuvant activity but attenuates OVA-induced airway inflammation. *Toxicol.Sci.* 88, 150-160 (2005).
- 5 16. de Haar C, Hassing I, Bol M, Bleumink R, Pieters R. Ultrafine carbon black particles cause early airway inflammation and have adjuvant activity in a mouse allergic airway disease model. *Toxicol.Sci.* 87, 409-418 (2005).
17. Leech MD, Benson RA, De VA, Fitch PM, Howie SE. Resolution of Der p1-induced allergic airway inflammation is dependent on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory cells. *J.Immunol.* 179, 7050-7058 (2007).
18. Wilson MS, Taylor MD, Balic A, Finney CA, Lamb JR, Maizels RM. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J.Exp.Med.* 202, 1199-1212 (2005).
19. Cho WS, Duffin R, Bradley M, *et al.* NiO and Co3O4 Nanoparticles Induce Lung DTH-Like Responses and Alveolar Lipoproteinosis. *Eur Respir J* erj00471-2011; published ahead of print doi:10.1183/09031936.00047111 (2011).
20. De Gregorio E, Tritto E, Rappuoli R. Alum adjuvanticity: unraveling a century old mystery. *Eur.J.Immunol.* 38, 2068-2071 (2008).
21. Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Borm PJ. Nanotoxicology. *Occup.Environ.Med.* 61, 727-728 (2004).
22. Stone V, Donaldson K. Nanotoxicology: signs of stress. *Nat.Nanotechnol.* 1, 23-24 (2006).
23. Bihari P, Vippola M, Schultes S, *et al.* Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Part Fibre.Toxicol.* 5, 14 (2008).
24. Meyts I, Hellings PW, Hens G, *et al.* IL-12 contributes to allergen-induced airway inflammation in experimental asthma. *J.Immunol.* 177, 6460-6470 (2006,).
25. McKee AS, MacLeod M, White J, Crawford F, Kappler JW, Marrack P. Gr1+IL-4-producing innate cells are induced in response to Th2 stimuli and suppress Th1-dependent antibody responses. *Int.Immunol.* 20, 659-669 (2008).
26. Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J.Immunol.* 163, 6448-6454 (1999).
27. Larsen ST, Roursgaard M, Jensen KA, Nielsen GD. Nano titanium dioxide particles promote allergic sensitization and lung inflammation in mice. *Basic Clin.Pharmacol.Toxicol.* 106, 114-117 (2010).
28. Nyberg K, Johansson U, Johansson A, Camner P. Phagolysosomal pH in alveolar macrophages. *Environ.Health Perspect.* 97, 149-152 (1992).
29. Studer AM, Limbach LK, Van Duc L, *et al.* Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicol.Lett.* 197, 169-174 (2010).
30. Muller KH, Kulkarni J, Motskin M, *et al.* pH-dependent toxicity of high aspect ratio ZnO nanowires in macrophages due to intracellular dissolution. *ACS Nano.* 4, 6767-6779 (2010).
31. Ganrot PO. Metabolism and possible health effects of aluminum. *Environ.Health Perspect.* 65, 363-441 (1986).
- 40 32. Witzleb WC, Ziegler J, Krummenauer F, Neumeister V, Guenther KP. Exposure to chromium, cobalt and molybdenum from metal-on-metal total hip replacement and hip resurfacing arthroplasty. *Acta Orthop.* 77, 697-705 (2006).
- 45 33. Exley C, Siesjo P, Eriksson H. The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? *Trends Immunol.* 31, 103-109 (2010).

REIVINDICACIONES

1. Un adyuvante que comprende nanopartículas de cobalto y/o nanopartículas de óxido de cobalto.
- 5 2. Adyuvante de conformidad con la reivindicación 1, donde el adyuvante no comprende alumbre.
3. Adyuvante de conformidad con la reivindicación 1 o 2, donde las nanopartículas de óxido de cobalto comprenden nanopartículas de óxido (Co_3O_4) de cobalto (II,III).
- 10 4. Adyuvante de conformidad con cualquier reivindicación anterior, donde el adyuvante comprende o comprende además nanopartículas de óxido cobaltoso (óxido de cobalto (II): CoO) y/o nanopartículas de óxido cobáltico (óxido de cobalto (III): Co_2O_3).
- 15 5. Adyuvante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las nanopartículas presentan entre 1 nm y 100 nm de diámetro.
6. Adyuvante de conformidad con cualquier reivindicación anterior, donde las nanopartículas de cobalto presentan un diámetro medio de $18,4 \pm 5,0$ nm.
- 20 7. Nanopartículas de cobalto inorgánicas y/o nanopartículas de óxido de cobalto para su uso como adyuvantes.
8. Nanopartículas de cobalto inorgánicas y/o nanopartículas de óxido de cobalto de conformidad con la reivindicación 7 para su uso según la reivindicación 7, donde las nanopartículas de cobalto y/o las nanopartículas de óxido de cobalto comprenden nanopartículas de Co_3O_4 .
- 25 9. Una composición de adyuvante comprendiendo el adyuvante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, un excipiente, solvente, portador o diluyente farmacéutica o fisiológicamente aceptable.
- 30 10. Composición de adyuvante de conformidad con la reivindicación 9, donde la composición comprende uno o más componentes de adyuvante adicionales.
- 35 11. Una vacuna que comprende un adyuvante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
12. Adyuvante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o vacuna de conformidad con la reivindicación 11, para su uso en (i) la mejora de respuestas inmunitarias en sujetos animales o humanos, (ii) el aumento de respuestas inmunitarias y/o (iii) la mejora, modulación o aumento de respuestas inmunitarias, en sujetos humanos o animales.

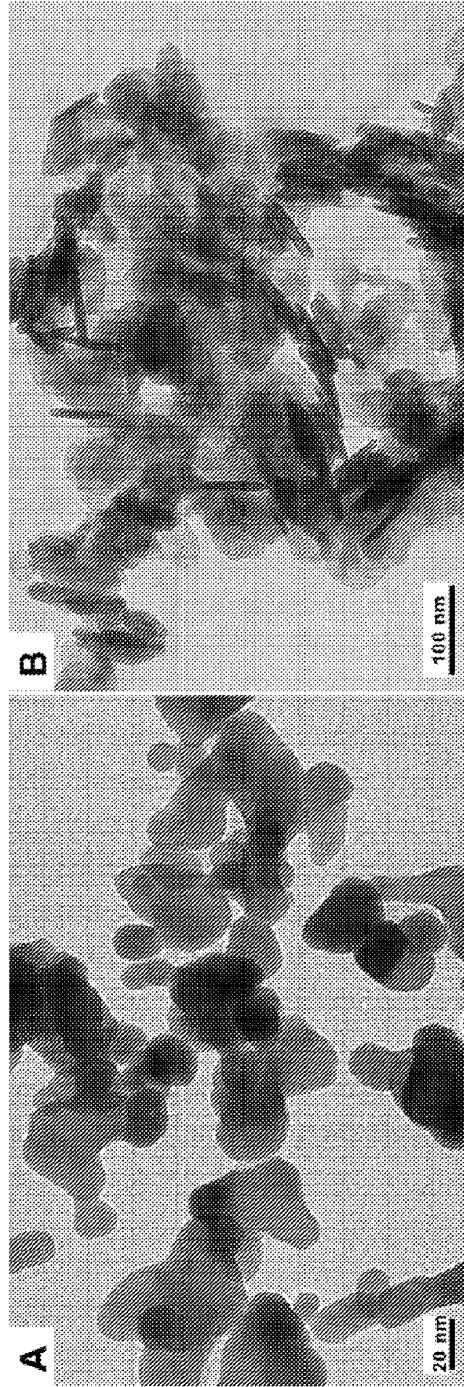


Figura 1

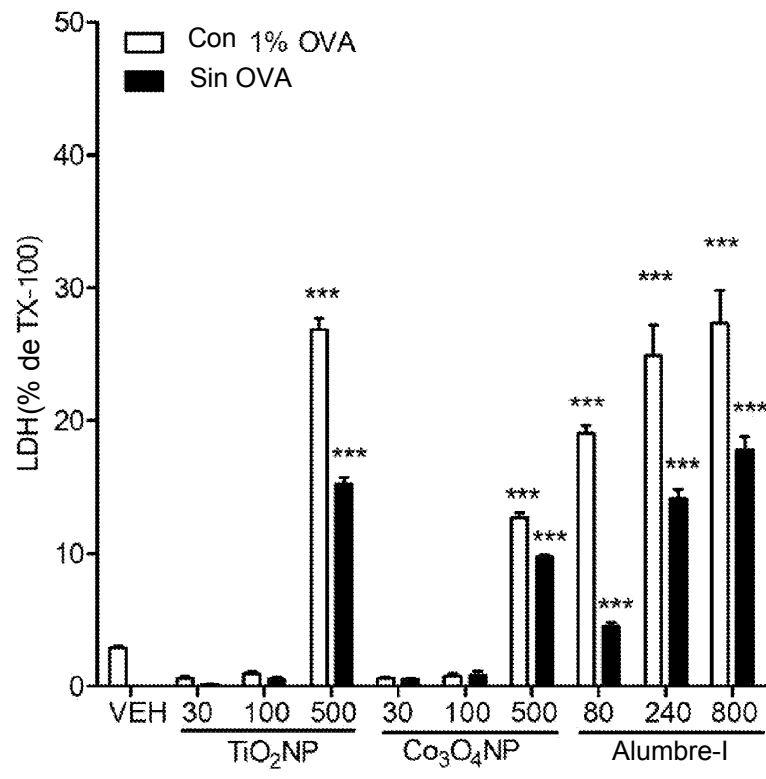


Figura 2

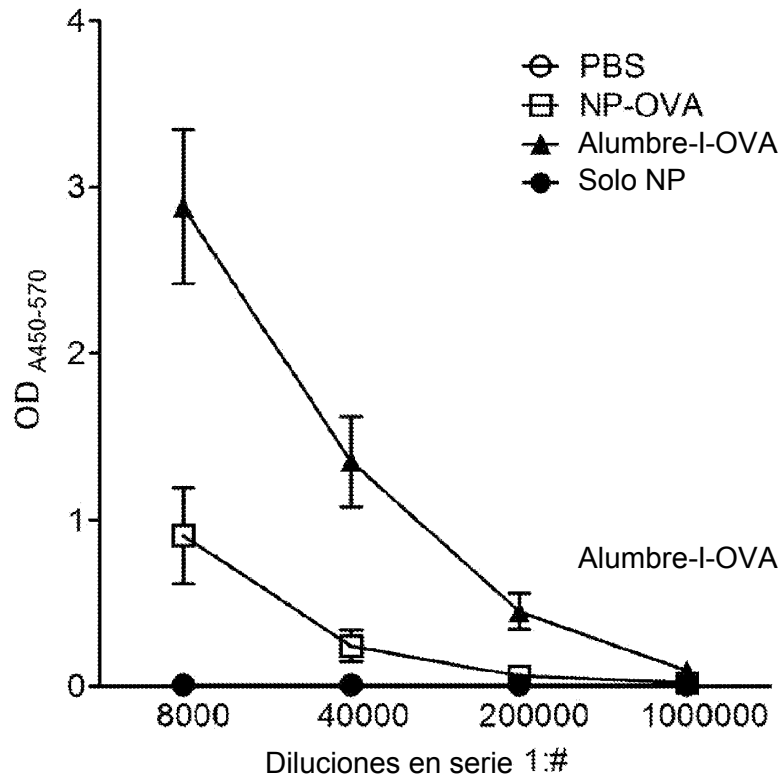


Figura 3

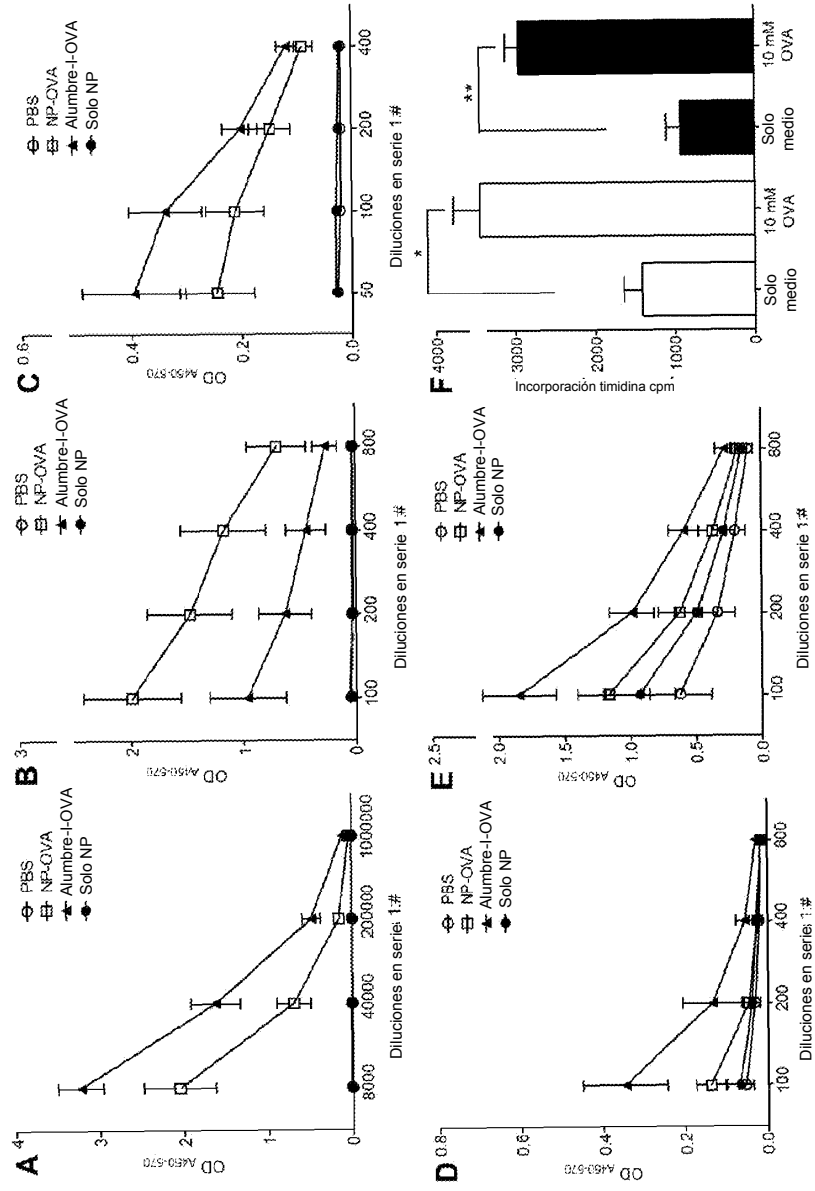


Figura 4

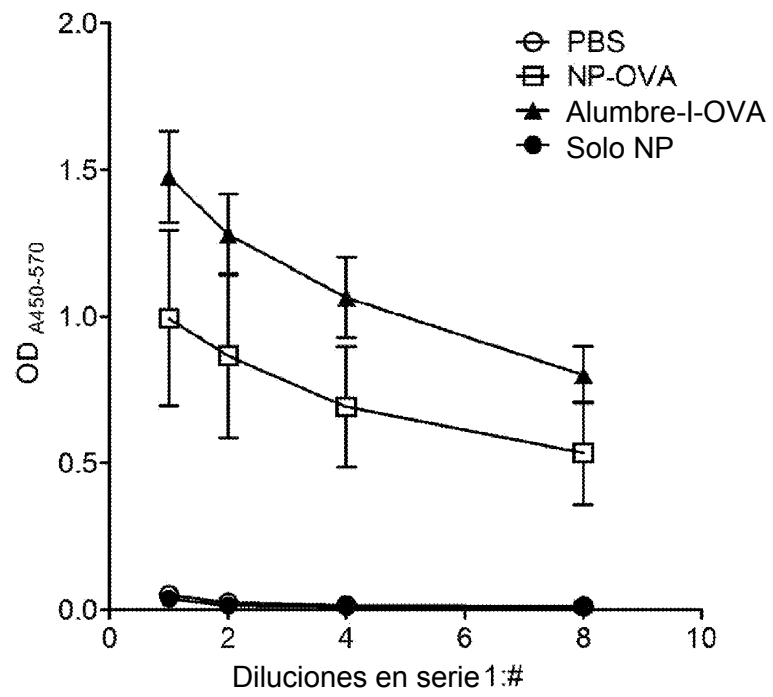


Figura 5

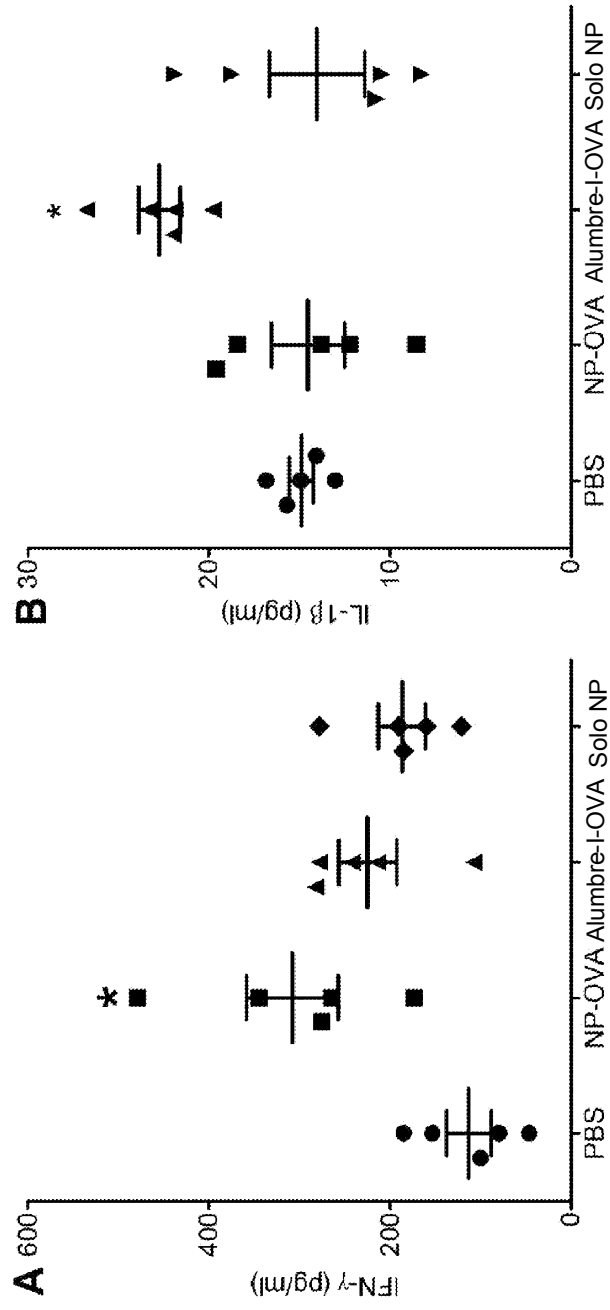


Figure 6

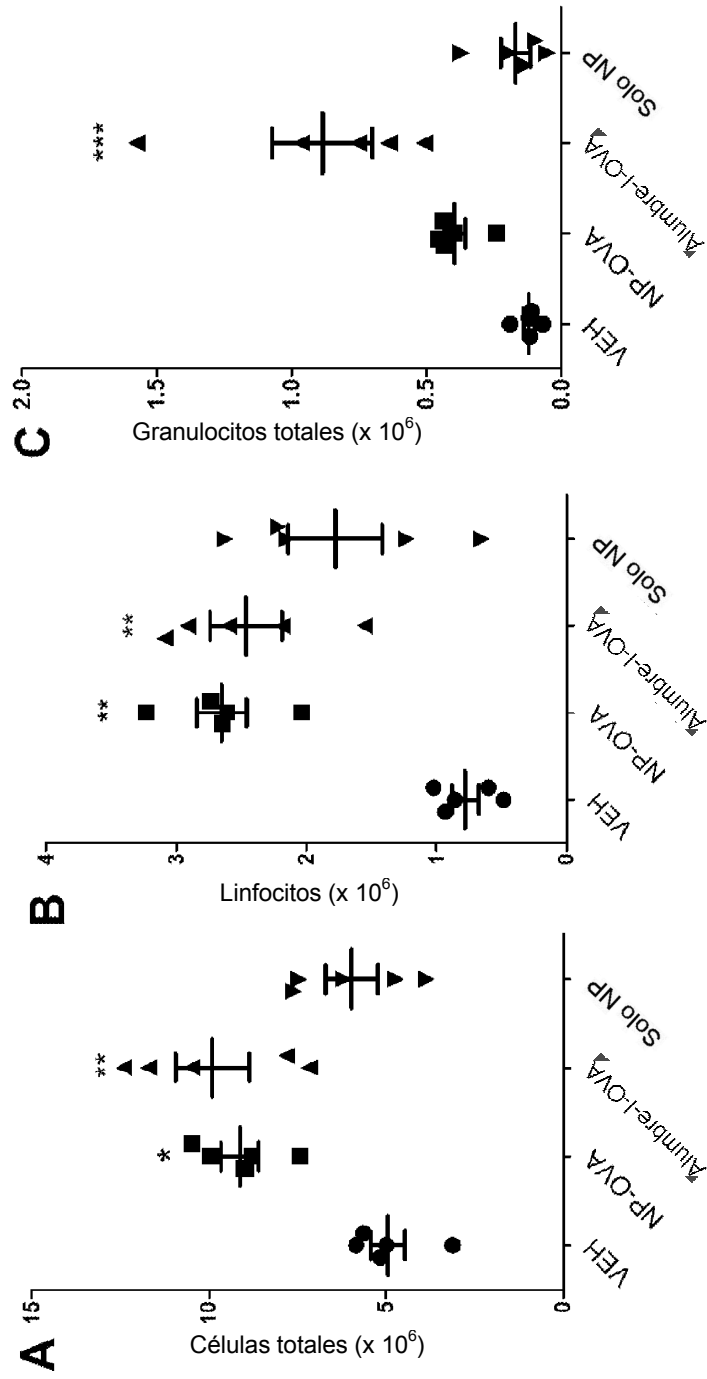


Figura 7

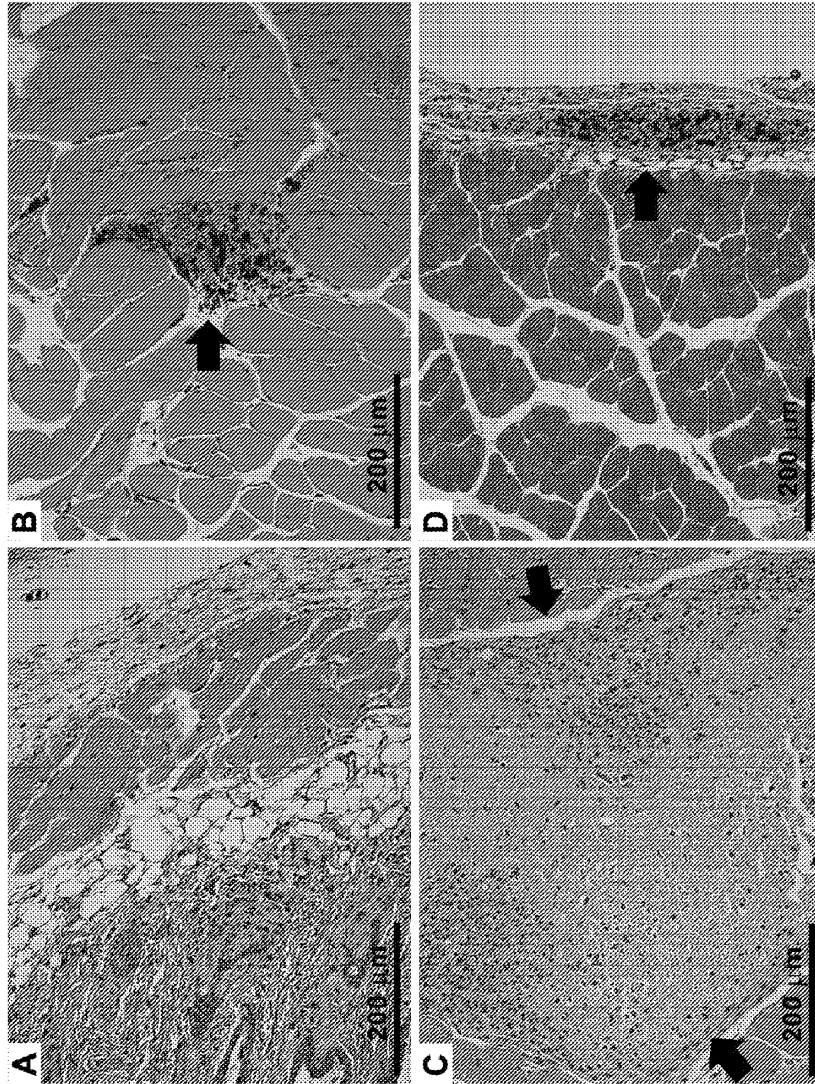


Figura 8

Perfil marcador superficie células dendríticas

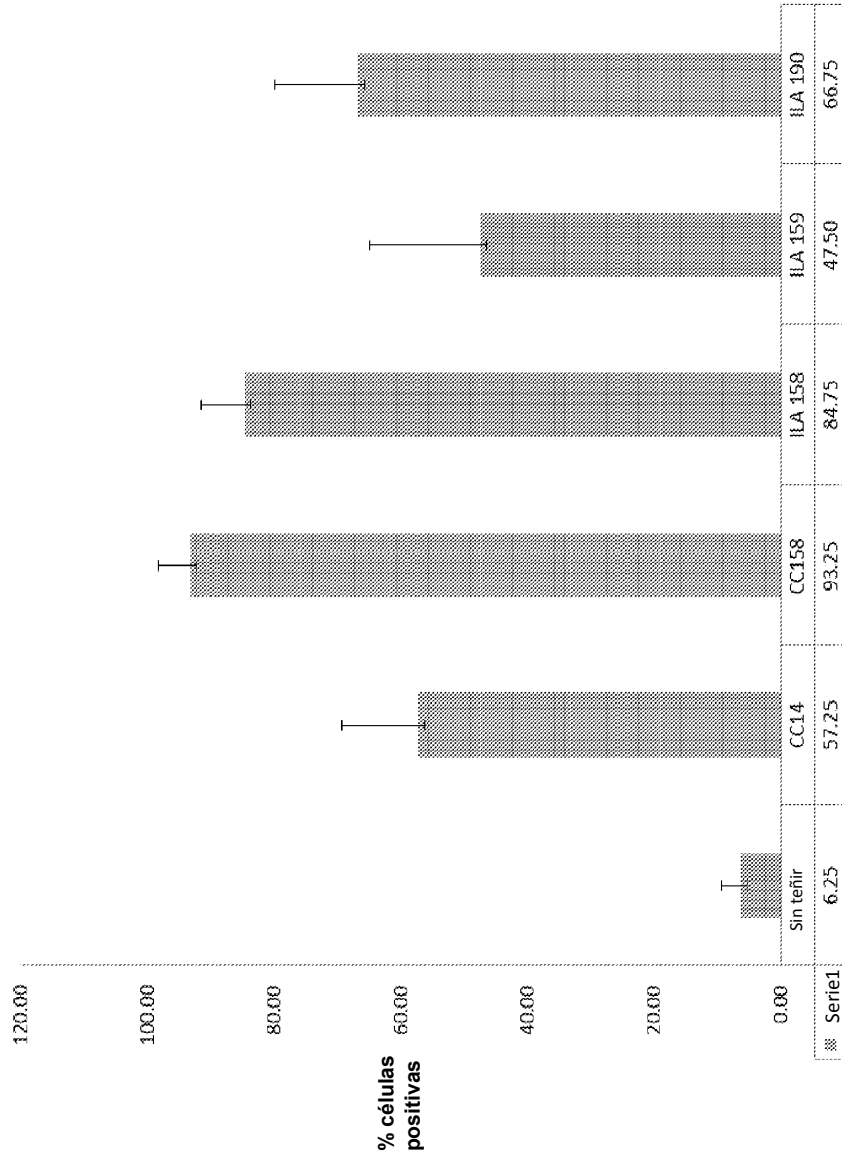


Figura 9

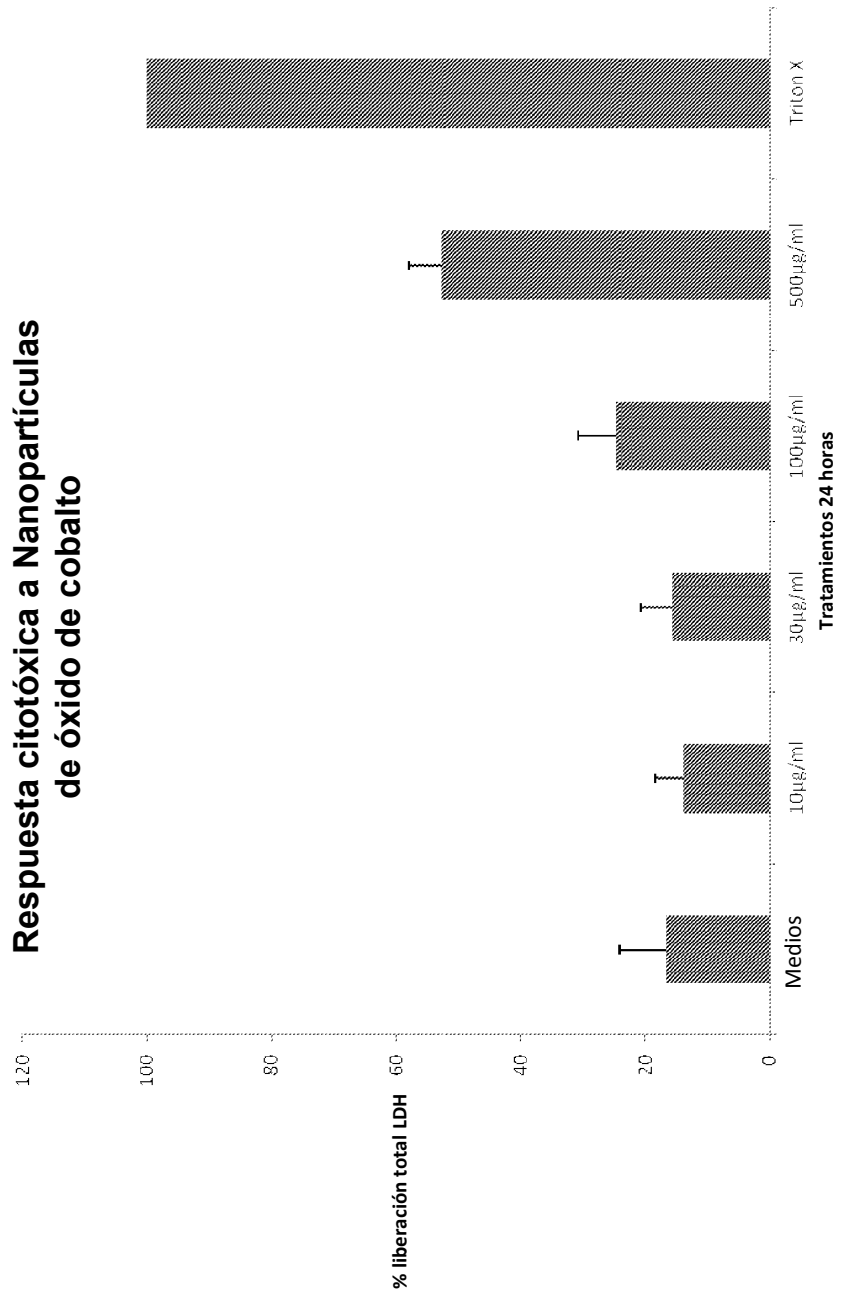


Figura 10

Respuesta citotóxica a Alumbre Imject

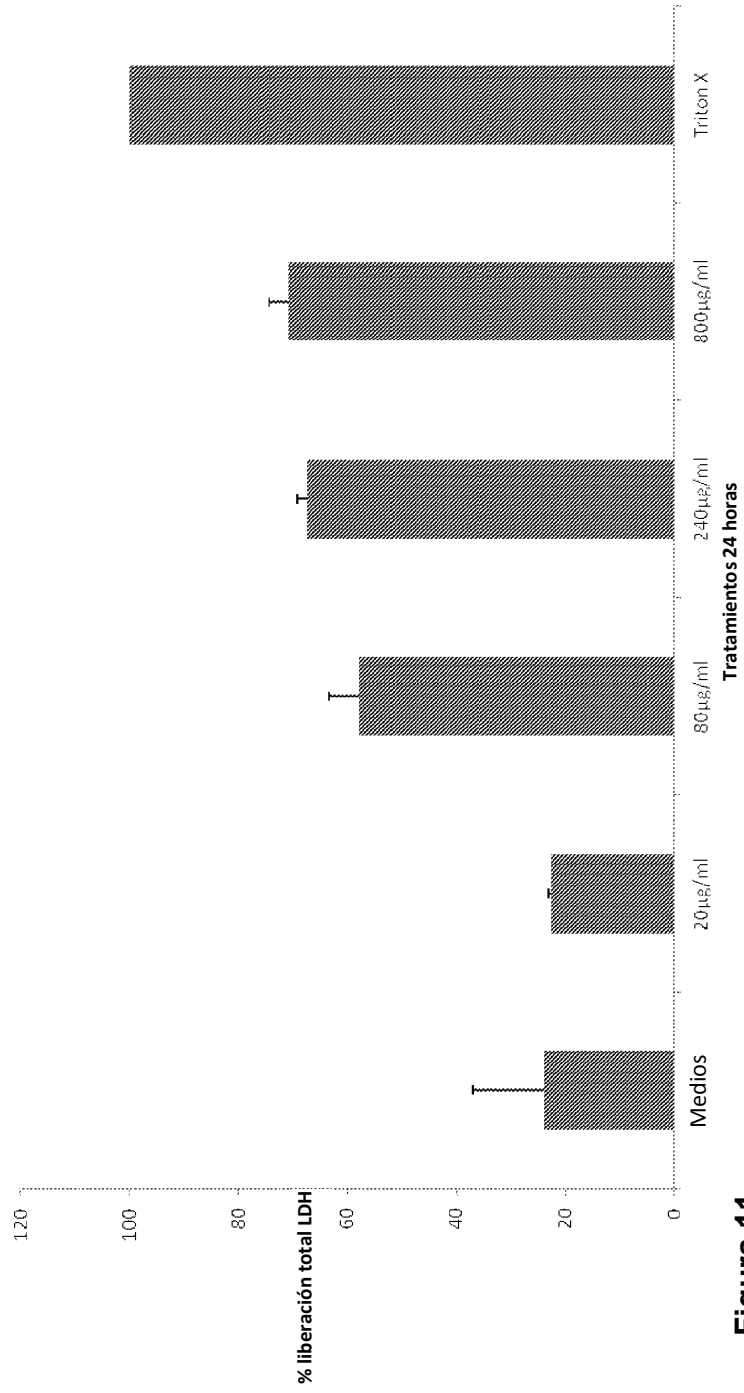


Figura 11

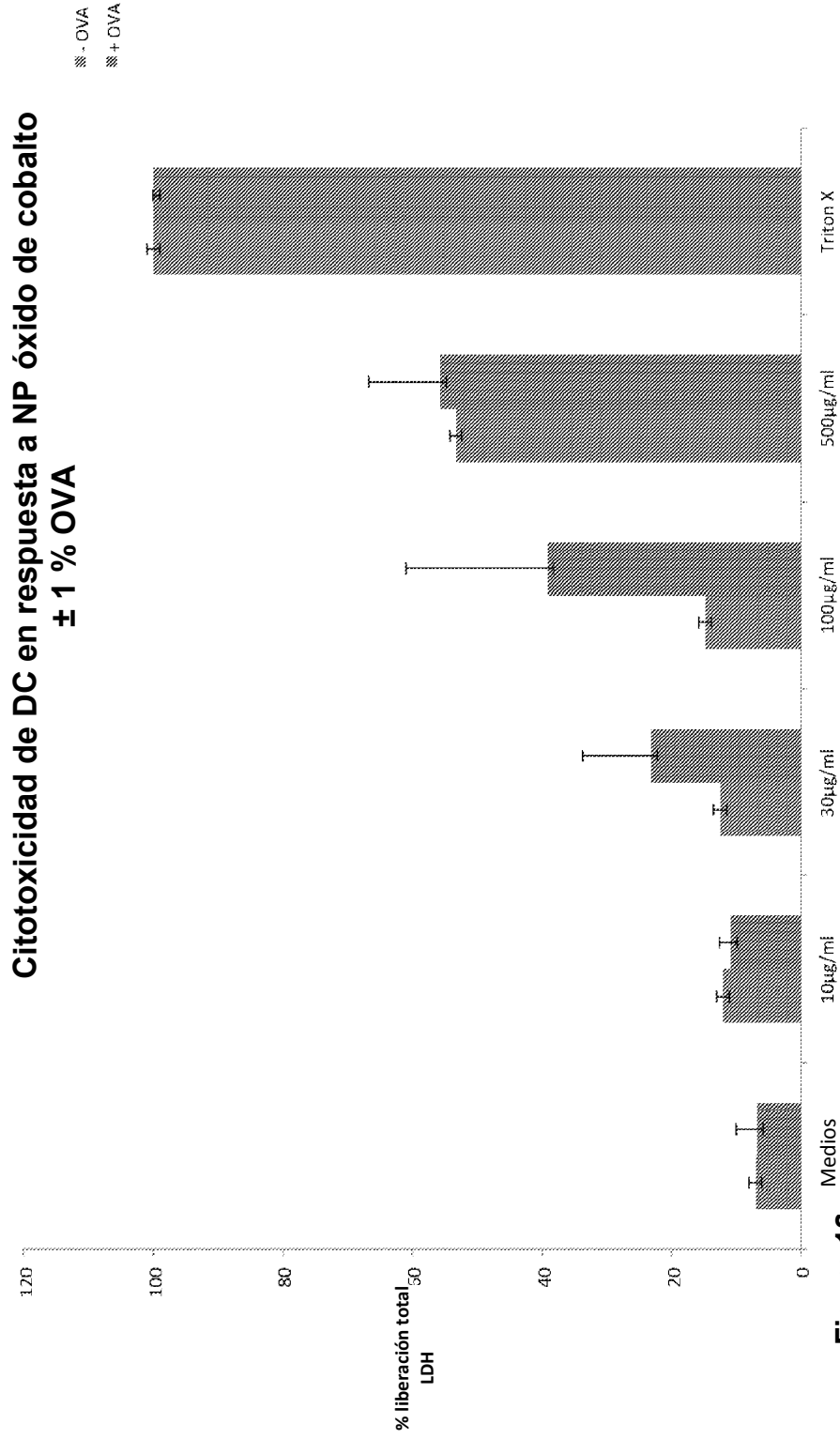


Figura 12

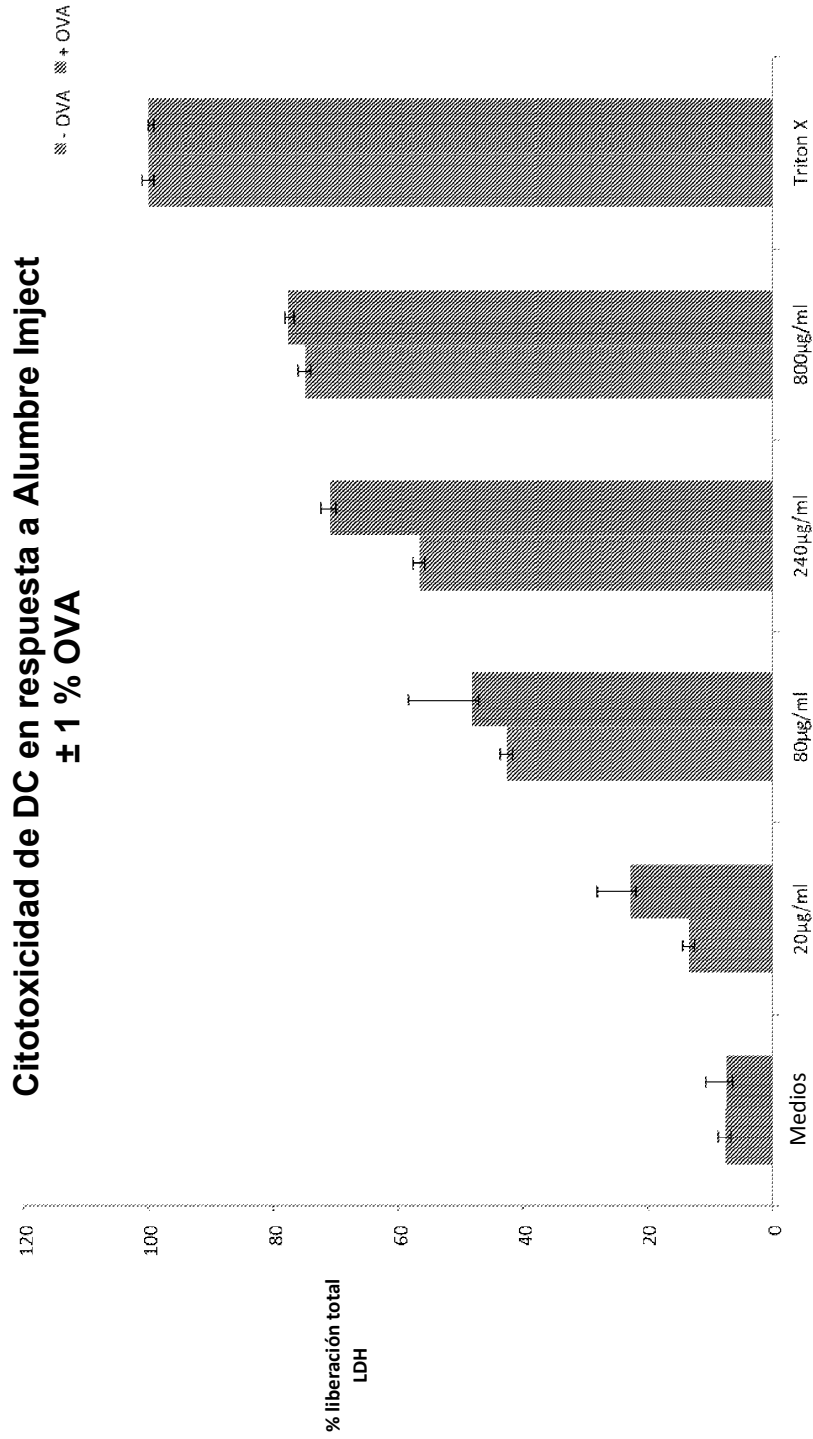


Figura 13

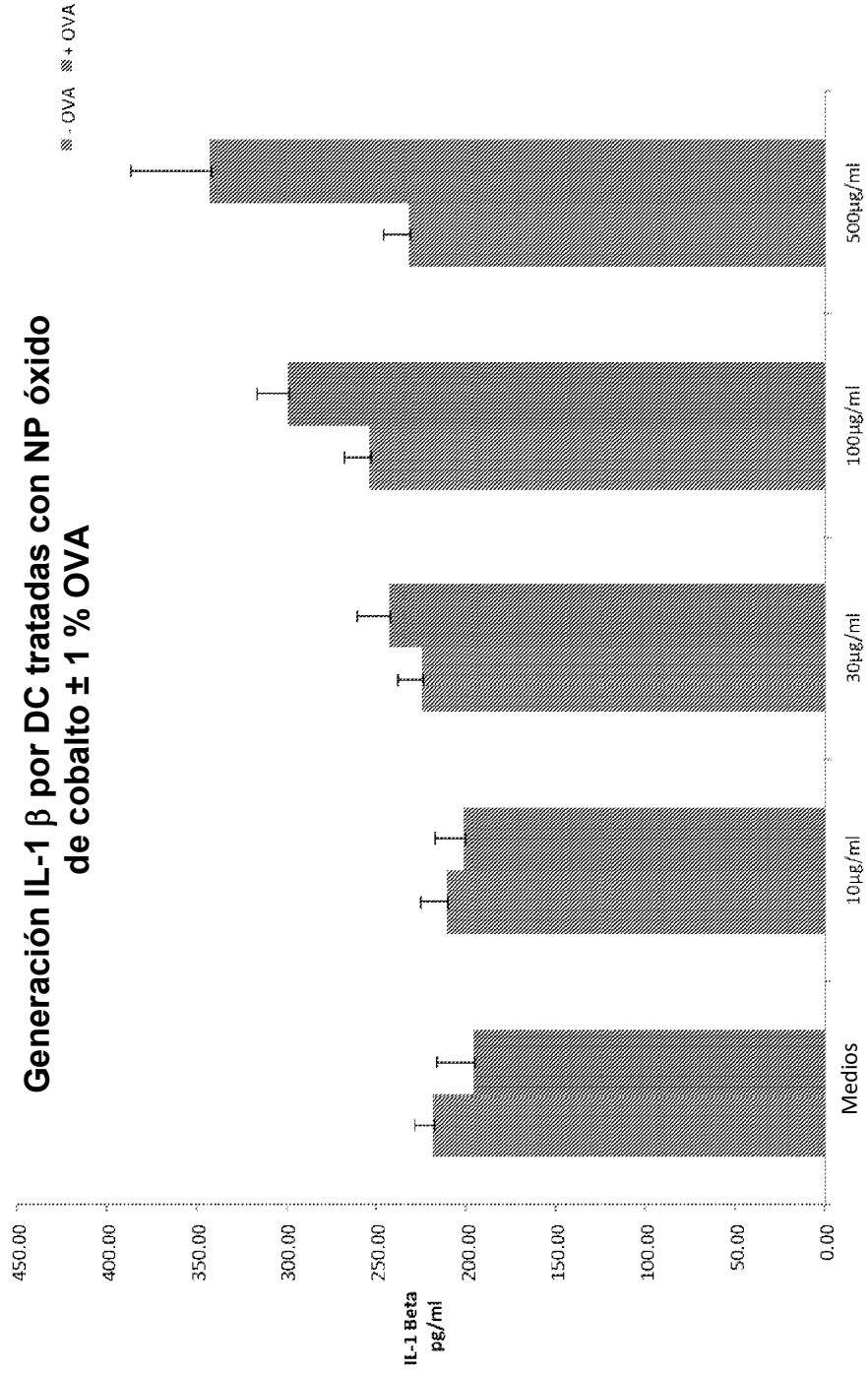


Figura 14

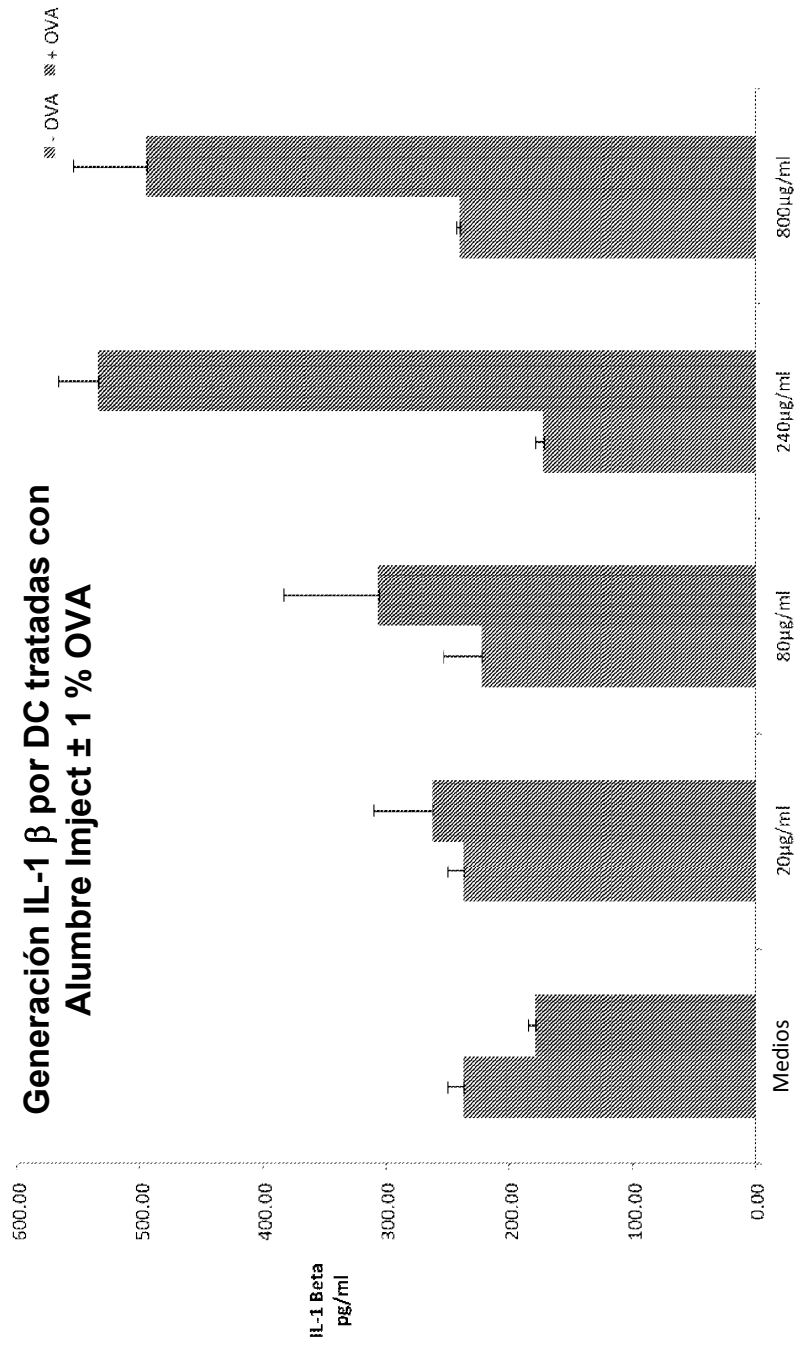


Figura 15