

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 202**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61K 31/739** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.12.2009 PCT/EP2009/009342**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2010 WO10139352**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2009 E 09799043 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2437754**

54 Título: **Lipopolisacárido de Ochrobactrum intermedium y su uso como inmunoestimulante en mamíferos**

30 Prioridad:

**04.06.2009 ES 200930265**

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

**06.02.2018**

73 Titular/es:

**LABORATORIOS OVEJERO, S.A (100.0%)  
Cta. León-Vilecha, 30  
24005 León, ES**

72 Inventor/es:

**OVEJERO GUIASOLA, JUAN LGNACIO y  
FRESNO ESCUDERO, MANUEL**

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

ES 2 653 202 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

Lipopolisacárido de *Ochrobactrum intermedium* y su uso como inmunoestimulante en mamíferos

5 La presente invención se refiere a lipopolisacárido (LPS) de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG3306, y su uso como un inmunoestimulante de mamíferos en una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o prevención de la sepsis y como adyuvante para una vacuna en animales inmunodeprimidos y contra la leishmaniosis.

## 10 TÉCNICA ANTECEDENTE

Los miembros del género *Ochrobactrum* se incluyen en el subgrupo alfa-2 del dominio *Proteobacteria*. Habitan principalmente el suelo y se sabe que son patogénicos únicamente en pacientes gravemente enfermos o inmunocomprometidos o en pacientes con catéteres internos. Aunque en dichas situaciones *Ochrobactrum* puede causar meningitis, osteomielitis, bacteremia y septicemia, estas bacterias no son capaces de establecer infecciones crónicas por sí solas y se eliminan del huésped normales después de la retirada del catéter (Cieslak, T. J., C. J. Drabick, y M. L. Robb. 1996. *Pyogenic infections due to Ochrobactrum anthropi*. *Clin. Infect. Dis.* 22: 845-847).

Debido a la composición de todos los lipopolisacáridos, el componente principal de la membrana externa de las bacterias gram-negativas sigue un principio general, que incluye un polisacárido unido a un lípido A terminado con un componente lipídico a través de un azúcar específico denominado ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico (KDO) (Rietschel, E. T., Schade, U., Jensen, M., Wollenweber, H. W., Luderitz, O. y Greisman, S. G. 1982. *Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicaemia*. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 3:8), se ha asumido que todas las moléculas de LPS tienen efectos biológicos idénticos.

25 Sin embargo, este concepto se ha modificado mediante estudios que muestran una gran variación en la capacidad de varias especies de LPS para producir la síntesis de citocinas, estando este factor relacionado con las características estructurales de su porción de lípidos A (Netea, M. G., van Deuren, M., Kullberg, B. J., Cavillon, J. M. y van der Meer, J. W. M. 2002. *Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors?* *Trends Immunol.* 23: 135.).

La *Legionella pneumophila*, una bacteria intracelular facultativa Gram-negativa, también es similar a *Brucella* con respecto a tanto la baja endotoxicidad como la estructura química de sus LPS y significativamente menor que la producida por los LPS endobacterianos (Zahringer, U., Knirel, Y. A., Lindner, B., Helbig, J. H., Sonesson, A., Marre, R. and Rietschel, E. T. 1995. *The lipopolysaccharide of Legionella pneumophila serogroup 1 (strain Philadelphia 1): chemical structure and biological significance*. *Prog. Clin. Biol. Res.* 392: 113. 26). Se han usado lipopolisacáridos de *Brucella abortus* en la técnica como vehículo/adyuvante en vacunas (documento US5824310). El lipopolisacárido de *Pseudomonas aeruginosa* protege frente a sepsis (Cryz SJ y col, *Infection and Immunity*, 1984, vol. 43, nº 3, págs. 795-799).

40 *Ochrobactrum anthropi* es el pariente conocido más cercano de *brucellae* (Velasco y col. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48 (1998) 759-768). A pesar de su cercana relevancia filogenética, *B abortus* y *Ochrobactrum* difieren notablemente en las propiedades de OM y estas amplias diferencias son causadas, al menos en parte, por pequeños cambios en los LPS (Velasco y col. *Infection and Immunity* 68 (2000)3210-3218).

45 Se determinó la estructura principal del lípido A de núcleo completo de los LPS de *Ochrobactrum intermedium* LMG 3301 y la cadena-O de LPS de *Ochrobactrum anthropi* LMG 3331 (Velasco y col. *Carbohydrates Research* 306 (1996)123-126; Velasco y col. *Carbohydrates Research* 306 (1998)283-290; Velasco y col. *Infection and Immunity* 68 (2000)3210-3218).

50 La cepa de *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306 se describió por Velasco y col. (*International Journal of Systematic Bacteriology* 48 (1998) 759-768) y sin embargo, no se habían descrito previamente LPS de *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306.

55 Por otra parte, aproximadamente, y sólo en Estados Unidos, se presentan 900.000 casos de sepsis al año, causando aproximadamente 210.000, y con un coste de aproximadamente 17 billones de dólares. La sepsis es una enfermedad común con una creciente incidencia y con una mortalidad que varía del 27-48%. El choque séptico es una consecuencia, con frecuencia mortal, de la sepsis. La gran infección que se da junto con la infección durante la sepsis ha sido el objetivo de muchas intervenciones terapéuticas. Sin embargo, después de más de 20 años de estudios clínicos con agentes antiinflamatorios generales han mostrado que este enfoque no tiene demasiado éxito.

60 Los mecanismos patológicos que llevan a la sepsis son muy complejos y están muy lejos aún de poder comprenderse. La sepsis implica una respuesta de la respuesta inflamatoria sistémica seguida de una respuesta

antiinflamatoria compensatoria. El balance entre ellas es crucial para la supervivencia del huésped. Además, los modelos de animales de sepsis no se asemejan fácilmente a esta naturaleza compleja de la sepsis en pacientes humanos.

5 Recientemente, se ha intentado tratar dichos efectos mediante antagonistas de receptores semejantes a toll (TLR) ya que se cree que la mayoría de las consecuencias del choque séptico se deben a la enorme liberación de endotoxina de circulación (LPS). Por lo tanto, el Eritoran, un análogo estructural de la porción del Lípido A de LPS que actúa como un antagonista TLR4 se encuentra en fase II y muestra una reducción de la mortalidad en pacientes con sepsis severa. Además, TAK-242 es un inhibidor de la transducción de señal TLR-4 que reduce los niveles de  
10 citocina proinflamatoria y también reduce la mortalidad en un subgrupo con varios pacientes de sepsis con altos niveles de IL-6.

Al día de hoy, hay muchas enfermedades infecciosas para las que no existe vacuna. En algunos de estos casos, el fallo se debe a la falta del adyuvante correcto que induzca la respuesta inmune correcta y apropiada. Para algunos  
15 agentes infecciosos, como bacterias intracelulares, virus y la mayoría de los protozoos, la respuesta inmune protectora es de linfocitos T auxiliares de tipo 1 (Th1), caracterizada por la producción de IFN-gamma. Por el contrario, la respuesta protectora frente a la mayoría de los helmintos debe ser de tipo 2 (Th2), caracterizada por la producción de IL-4 (Fresno, M., M. Kopf, y L. Rivas. 1997. Cytokines and infectious diseases. Immunol Today 18: 56-58). Están disponibles pocos adyuvantes para la formulación de vacunas para seres humanos, debido a la toxicidad de muchos de ellos, debido a una inducción exacerbada de Th1. Se usa alumbre, que realmente no es un adyuvante, en la mayoría de las formulaciones de vacunas para humanos. Recientemente, los agonistas de receptores semejantes a Toll (TLR) han atraído un gran interés (Hoffman, Nature Reviews Drug Discovery 4, 879, 2005, Kwissa, Expert Vaccine Rev., 6, G73, 2007). Actualmente se están analizando varios antígenos junto con  
20 varios agonistas de diversos TLR.

25 Finalmente, uno de los principales problemas de cualquier formulación de vacuna, incluyendo los autorizados es que raramente funcionan en sujetos inmunodeprimidos. Además, algunos de ellos tienen efectos secundarios sobre los pacientes (Kwissa, y col., 2007).

30 La estructura principal del lípido A de núcleo completo del LPS natural de mutación rfa (un LPS en el que la cadena-O no está presente y en el que faltan algunos monosacáridos de la parte de núcleo externa) de *Ochrobactrum intermedium* LMG 3301 se describió por Velasco y col. Carbohydrates Research 306 (1998) 283-290; se describió la cadena de O de LPS natural de mutación rfa de *Ochrobactrum anthropi* LMG 3331 LPS (Velasco y col. Carbohydrates Research 306 (1996) 123-126; y el lípido A, y el peso molecular del LPS completo se publicó por  
35 Velasco y col. Infection and Immunity 68 (2000) 3210-3218.

La cepa de *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306 se describió por Velasco y col. (International Journal of Systematic Bacteriology 48 (1998) 759-768) y sin embargo, ningún LPS natural de mutación rfa de *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306 no se había descrito previamente.

#### 40 RESUMEN DE LA INVENCION

A continuación, se ha demostrado que el lipopolisacárido de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306 (IM) es eficaz en el tratamiento y/o prevención de la sepsis, así como adyuvante para vacunas en animales  
45 inmunodeprimidos y contra la leishmaniosis.

Por lo tanto, la presente invención da a conocer el uso del lipopolisacárido de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306 (IM) en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la sepsis, así como adyuvante para vacunas en animales inmunodeprimidos y contra la leishmaniosis.

50 La presente invención también da a conocer el uso de lipopolisacárido de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306 (IM) como adyuvante de vacunas para enfermedades infecciosas tanto en seres humanos como en animales.

De acuerdo con una realización particular de la presente invención, ésta proporciona el uso del IM en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de infecciones en animales, incluyendo seres humanos, que  
55 están inmunodeprimidos.

De acuerdo con la presente invención, los usos descritos del lipopolisacárido de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306 pueden aplicarse tanto en seres humanos como en animales. Por lo tanto, la referencia al uso en  
60 animales a lo largo de la presente invención también incluye a los seres humanos.

En resumen, el inmunoestimulante de la invención cura y evita la septicemia, tiene propiedades adyuvantes de vacuna en animales inmunodeprimidos y tiene propiedades adyuvantes de vacuna y un efecto protector y curativo

en el modelo de ratón experimental por leishmaniosis en la planta del pie.

El IM (lipopolisacárido de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG3306) ha demostrado tener una amplia actividad como inmunoestimulante, que incluye:

- Induce la producción de IL-12 en macrófagos.
- Los niveles de TN inducidos por el LPS de la invención son mucho menores que el LPS entérico sin presentar efectos patológicos.
- El LPS de la presente invención induce la activación de linfocitos T auxiliares de tipo 1 (TH1) y la producción de IFN-gamma.

Por lo tanto, la invención da a conocer una composición inmunoestimulante que comprende el lipopolisacárido de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG3306 y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, la modulación de la respuesta inmune consiste en mejorar la inmunocompetencia de los seres humanos.

La presente invención se refiere al uso del IM, inmunoestimulante de mamíferos como un compuesto que previene y cura la septicemia y la endotoxemia. La invención se refiere particularmente al uso de IM como un adyuvante para mejorar la vacunación en animales normales e inmunodeprimidos experimentales.

Por tanto, según un primer aspecto de la presente invención, se refiere a un lipopolisacárido de *Ochrobactrum intermedium* LMG3306 para su uso en el tratamiento y/o prevención de la sepsis.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende un lipopolisacárido de *Ochrobactrum intermedium* LMG3306 y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento y/o prevención de la sepsis.

Según una realización particular, la composición de la presente invención comprende 0,5-120 µg/ml de LPS de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG3306.

En otra realización preferida, el lipopolisacárido de la composición de la presente invención está en forma de una suspensión homogénea en la que la fase micelar es estable a 4 °C durante más de un periodo de 1 año.

En otra realización preferida, el pH de la composición de la presente invención está entre 2-12.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a la composición de la presente invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de la septicemia y/o endotoxemia.

Según otro aspecto de la presente invención, se refiere a una composición que comprende un lipopolisacárido de *Ochrobactrum intermedium* LMG3306 y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para su uso como adyuvante para vacunas en animales inmunodeprimidos.

Según una realización particular, la composición de la presente invención comprende 0,5-120 µg/ml de LPS de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG3306.

En otra realización preferida, el lipopolisacárido de la composición de la presente invención está en forma de una suspensión homogénea en la que la fase micelar es estable a 4 °C durante más de un periodo de 1 año.

En otra realización preferida, el pH de la composición de la presente invención está entre 2-12.

En otra realización preferida, la vacuna es una vacuna para una enfermedad infecciosa.

En otra realización preferida, la vacuna es una vacuna contra la leishmaniosis. A este respecto, como un ejemplo de sus propiedades adyuvantes, la presente invención se refiere particularmente al uso del IM como un adyuvante de vacuna para la infección de leishmaniosis experimental y un efecto curativo y protector de la leishmaniosis cutánea que usa el modelo de ratones experimentales de la leishmaniosis de planta de pie principal de la leishmaniosis.

Según otro objeto, la presente invención se refiere a una composición que comprende un lipopolisacárido de *Ochrobactrum intermedium* LMG3306 y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades infecciosas.

La presente divulgación se refiere a un procedimiento para la preparación del LPS de la cepa *Ochrobactrum*

*intermedium* LMG3306 como un compuesto para usar en el campo de la medicina como un inmunoestimulante para mamíferos.

5 La invención da a conocer una actividad específica como inmunoestimulante en el campo experimental que sigue el desarrollo en vacas, cerdos, ganado lechero y ratones:

- Influencia en el aumento de anticuerpos neutralizantes contra los virus de IBR después de una vacunación específica combinada con la presente invención.
- Inducción de la diferenciación de macrófagos.
- 10 - Inducción de TNF en macrófagos.
- Inducción de IL-12 en macrófagos.
- Inducción de la producción de IFN-gamma por linfocitos de bazo
- Actuación inmunoestimulante a través de los receptores TLR4 y TLR2.
- Influencia de la estimulación de linfocitos T en una forma dependiente de la dosis

15 Por consiguiente, la presente invención se refiere a la capacidad del lipopolisacárido de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG3306 (LPS) de estimular una respuesta inmune en un mamífero. Por lo tanto, la invención da a conocer una composición inmunoestimulante que comprende el lipopolisacárido de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG3306 y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, la modulación de la respuesta inmune consiste en mejorar la inmunocompetencia del mamífero.

20 La presente invención también se refiere a procedimientos de modulación de la respuesta inmune en un mamífero que comprende administrar LPS de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG3306 o la composición farmacéutica que lo contiene al mamífero. Por lo tanto, la presente invención también se refiere al uso de la composición inmunoestimulante en la preparación de un medicamento para inducir una inmunidad celular general en un mamífero. La presente invención también se refiere al uso de una composición inmunoestimulante de la invención en la preparación de un medicamento para la inducción de la diferenciación de macrófagos, la producción de TNF, la producción de IL-12, la producción de IFN-gamma por linfocitos de bazo y linfocitos T CD8 y CD4 específicos de virus activado, en un mamífero que comprende administrar el LPS de *O. intermedium* LMG3306 al mamífero.

30 La composición inmunoestimulante de la invención se usa como adyuvante en vacunas para conseguir una mejor inmunización contra virus específicos y/o bacterias contenidas en la vacuna. La mayoría de los trabajos relacionados con la prevención del choque endotóxico por bajas dosis subletales de los mismos LPS u otros menos tóxicos han mostrado que se necesita la inoculación previa (Hatao, F., y col., The induction of super-resistance using synthetic lipopolysaccharide receptor agonist rescues fatal endotoxemia in rats without excessive immunosuppression. Shock 2005; 23(4): 365-70). Sorprendentemente, los inventores han descubierto que el lipopolisacárido de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306 no necesitaba un periodo previo de desensibilización y sólo la inoculación del lipopolisacárido de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306 junto con el LPS protegía del efecto tóxico.

40 Además, la mayoría de los datos publicados encuentran una relación entre la supresión de TNF *in vitro* o en líneas celulares y los efectos desensibilizadores *in vivo* (véase, por ejemplo Lehner, M. D., y col., Lipopolysaccharide and Highly Purified Lipoteichoic Acid Via Different Toll-Like Receptors Independent of Paracrine Mediators. 2001. J. Immunol. 166: 5161-5167). Sin embargo, ahora los inventores han demostrado que el lipopolisacárido de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306 aunque protege de la acción de LPS *in vivo* no disminuye la secreción de TNF o IL-12 en líneas de macrófagos, en macrófagos peritoneales o en células esplénicas. Los resultados preliminares *in vivo* también sugieren que el lipopolisacárido de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306 (IM) es capaz de reducir drásticamente los niveles de TNF inducidos por LPS. En cualquier caso, no hay una relación directa entre los niveles de TNF y la protección. Estos resultados son sorprendentes.

50 Otras hipótesis atribuyen el efecto desensibilizador a la producción elevada de IL-10 o TNF- $\beta$  (Randow, F. y col., Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. J. Exp. Med. 1995. 181, 1887-1892). Sin embargo, esto no parece ser el caso, debido al hecho de que el IL-10 apenas se induce, *in vitro*, por el IM, de hecho parece que se inhibe la producción de IL-10 (aunque no es significativo) en macrófagos peritoneales o en células esplénicas y los niveles de IL-10 inducidos por LPS no aumentan significativamente por el IM excepto en células esplénicas de ratones C57BL/6.

60 Otro aspecto muy interesante es la capacidad del IM de modular respuestas inmunes frente a patógenos. Así, usando un sistema de infección por *Leishmania* mayor, se ha podido comprobar que el IM potencia la acción inmunogénica de un extracto antigénico de *Leishmania*, de modo similar a CpG. CpG es un conocido inmunomodulador que, a través de la unión con TLR9, potencia la respuesta Th1 (que es protectora frente a patógenos, tales como *Leishmania* y muchos otros) y que se ha patentado como un inmunomodulador y adyuvante de vacunas. Sin embargo, el IM no altera el perfil *in vivo* de Th1/Th2 de la manera exacerbada de CpG. Esto podría

indicar que el IM será un mejor adyuvante que CpG en infecciones en las que tanto la respuesta humoral (Th2) como la celular (Th1) tengan una función importante en la protección. Es quizá más importante el haber demostrado que IM no sólo induce una respuesta protectora, sino que puede inducir la protección directamente, es decir tiene un efecto terapéutico en la infección por Leishmania.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 La figura 1 muestra la prevención del efecto tóxico causado por el LPS de *E. coli* debido al uso del IM. Se trataron grupos de 5 ratones con LPS de *E. coli* (1,75 mg) o IM (LPS de *Ochrobactrum intermedium* LMG3306) 0,6 µg/kg (dosis 60) o 3 µg/kg (dosis 300) solos o en combinación, y se evaluó la supervivencia.

15 La figura 2 muestra el tratamiento del choque endotóxico por LPS. Se trataron grupos de 5 animales con LPS de *E. coli* (2 mg/animal). 24 horas más tarde, se les inyectó con IM (LPS de *Ochrobactrum intermedium*) 0,6 µg/kg (dosis 60) o 3 µg/kg (dosis 300), y se evaluó su supervivencia.

20 La figura 3 muestra la prevención de la peritonitis por infección con *E. coli*. Se infectaron grupos de 5 animales con *E. coli* (1E7 unidades formadoras de colonias, UFC); 24 horas después de que se inocularan los animales con IM (LPS de *Ochrobactrum intermedium*) 0,6 µg/kg (dosis 60) o 6 µg/kg (dosis 600), y se evaluaron la supervivencia (panel superior) y los síntomas clínicos (panel inferior).

25 La figura 4 muestra la curación de la peritonitis causada por *E. coli*. Se infectaron grupos de 5 animales con *E. coli* (1E8 unidades formadoras de colonias, UFC); 4 horas más tarde se inocularon con IM (LPS de *Ochrobactrum intermedium*) 6 µg/kg (dosis 600), y se evaluaron la supervivencia (panel superior) y los síntomas clínicos (panel inferior).

30 La figura 5 muestra la inmunidad protectora frente a la leishmaniosis y las características generales del esquema inmunológico del transcurso de la actuación. Como se muestra en la figura, la interacción de los parásitos con los macrófagos produce una respuesta inmunológica que, si está basada predominantemente en la activación linfocitaria Th1, la respuesta al parásito es eficaz y satisfactoria, mientras que si la respuesta con Th2 es la representativa, se manifestará la infección.

35 La figura 6 muestra el protocolo de inmunización para evaluar el potencial del adyuvante del IM (lipopolisacárido de *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306) en una vacuna contra la leishmaniosis. Se vacunaron grupos de 5 ratones con el antígeno SLA, solo o con CpG o IM en los días 0, 15 y 30. El día 60, se inoculan 1000 promastigotes a cada animal en cada planta del pie y se evalúan la evolución de la lesión y parámetros inmunológicos.

La figura 7 muestra la evolución de la lesión en los animales vacunados con SLA y SLA-CpG (panel superior) o con SLA-IM como adyuvantes. Se cuantifica la inflamación de la almohadilla del pie a lo largo de la infección.

40 La figura 8 muestra el estado macroscópico de las lesiones en la almohadilla plantar de los animales vacunados con SLA, SLA-CpG o SLA-IM frente al grupo control (PBS). En la figura se muestran fotos de un animal del grupo control, uno vacunado con SLA, uno con SLA-CpG y los seis vacunados con SLA-IM, transcurridas seis semanas de la infección.

45 La figura 9 muestra la cuantificación del número de parásitos en el bazo y los nódulos linfáticos (DLN) en los que la inmunización con SLA no produce reducción alguna del número de parásitos contados en los órganos comentados con respecto al grupo de control, mientras que el SLA-CpG se reduce en una magnitud de aproximadamente 2 log dicho recuento y en el que el grupo SLA-IM obtiene resultados similares para la reducción.

50 La figura 10 muestra los resultados en gráficos de la evaluación de la respuesta Th1 (IFN-γ) y/o Th2 (IL-4) en las células de los bazos de los animales sacrificados, mientras que estas células aisladas se estimulan *in vitro* con SLA.

55 La figura 11 muestra la evaluación de la respuesta Th1/Th2 dependiendo del análisis de los niveles de Leishmania respecto de los isotipos específicos de anticuerpos IgG2a (Th1) e IgG1 (Th2).

La figura 12 muestra el protocolo de evaluación del efecto terapéutico del IM en una infección experimental con Leishmania.

60 La figura 13 (A) muestra la evolución de la lesión en los animales vacunados con IM. Se cuantifica la inflamación de la almohadilla plantar a lo largo de la infección. (B) Muestra el estado macroscópico de las lesiones en la almohadilla plantar de los animales vacunados con IM en comparación con el grupo de control (PBS). Se incluyen fotos de un animal que pertenece al grupo control, un animal vacunado con CpG, y los seis vacunados con SLA-IM,

transcurridas seis semanas de la infección. (C) Muestra la cuantificación del número de parásitos en el bazo y los nódulos linfáticos (DLN) después de siete semanas.

5 La figura 14 muestra una tabla comparativa entre la muestra de control PBS, CPG e IM para los anticuerpos IgG1 e IgG2a incluyendo la proporción entre ellos.

10 La figura 15 muestra el esquema del protocolo usado para analizar la función del adyuvante RT en animales inmunodeprimidos. Se inmunodeprimieron grupos de 5 animales con dexametasona y se vacunaron con SLA, SLA-CpG o SLA-IM. Transcurridas 24 horas, los animales se infectaron y posteriormente se volvieron a infectar en día 8. Tras sacrificarlos el día 60, se evalúa la evolución de la lesión y los parámetros inmunológicos.

15 La figura 16 muestra el efecto adyuvante del IM tras la vacunación con SLA en células esplénicas de ratones. Las células esplénicas se cultivaron con o sin el antígeno SLA (10 µg/ml) durante 72 horas se evaluó y la proliferación por la incorporación de timidina al ADN durante en un período de 72 horas. Los resultados muestran la media de 2 experimentos por triplicado usando 6 animales en cada experimento.

20 La figura 17 muestra el efecto en la producción de IL-4 por las células esplénicas de animales vacunados. Las células esplénicas se aislaron de varios animales y se estimularon con SLA (10 µg/ml), y se analizó por ELISA la secreción de IL-4.

La figura 18 muestra el efecto de la producción de IL-4 e IFN-gamma por las células esplénicas de ratones vacunados y tratados con dexametasona (DEX).

25 La figura 19 muestra la respuesta celular a SLA en animales vacunados. Muestra la respuesta específica frente a IFN-gamma y respuesta frente a SLA 17 días después de la adición *in vitro* de SLA. Muestra la proporción de la secreción IFN-gamma (Th1)/IL-4 (Th2).

30 La figura 20 muestra la diferenciación de las células J774 después de la adición del compuesto inmunoestimulante en comparación con el LPS de *E. coli* en macrófagos Raw. El compuesto inmunoestimulante de la invención induce una inhibición dependiente de la dosis de la diferenciación de macrófagos J774. Este efecto es aproximadamente 500 veces menos potente que el observado con el LPS de *E. coli* en una base peso/volumen en macrófagos J774 o Raw (no mostrados).

35 La figura 21 muestra que macrófagos no estimulados no sintetizan TNF detectable por ELISA. La composición inmunoestimulante de la invención a dosis de 0,1-10 µg/ml induce de manera dosis-respuesta niveles de reactividad de una producción significativa de TNF de hasta 4000 pg/ml en macrófagos J774 (figura 21a), así como en células raw (no mostradas). El efecto del inmunoestimulante de la invención aunque altamente significativo era aproximadamente 500 veces menos potente que el LPS de *E. coli* (figura 21b).

40 La figura 22 muestra que la composición inmunoestimulante de la invención induce la producción de TNF en macrófagos de cepas de ratones tanto Balb/c como C57Bl/6, aunque con menos potencia que el LPS de *E. coli* a concentraciones equivalentes (figura 3).

45 La figura 23 muestra que el estimulante de la invención en dosis de 10m µg/ml induce grandes cantidades de IL-12 en macrófagos peritoneales tanto de C57Bl/6 como de Balb/c (figura 4)

50 La figura 24 muestra que la estimulación de ConA induce una gran cantidad de secreción de IFN-gamma por las células esplénicas de ambas cepas de ratón, lo que sugiere la estimulación de una respuesta Th1 caracterizada por la producción de IFN gamma. La composición inmunoestimulante de la invención en dosis de 1-10m µg/ml induce grandes cantidades de linfocitos de bazo de IFN gamma de tanto C57Bl/6 como de Balb/c.

55 La figura 25 muestra que la composición inmunoestimulante de la invención induce TNF en macrófagos peritoneales de C57Bl/6, mientras que la deficiencia de TLR-2 únicamente evita parcialmente la actividad, y falta de TLR4 en macrófagos disminuyó fuertemente la inducción.

La figura 26 muestra que la composición inmunoestimulante de la invención induce IL-12 en macrófagos peritoneales de C57Bl/6, mientras que la deficiencia de TLR-2 únicamente evita parcialmente la actividad, y falta de TLR4 en macrófagos disminuyó fuertemente la inducción.

60 La figura 27 muestra que la estimulación de ConA induce la secreción de IFN-gamma, que disminuyó en gran medida gravemente en las células esplénicas de C57Bl/6 tlr2<sup>-/-</sup>, y casi desapareció por completo cuando se usaron las células C57Bl/6 tlr4<sup>-/-</sup> en 10 mg de compuesto inmunoestimulante.

La figura 28 muestra la respuesta de linfocitos T de CD4 (figura 28b) o CD8 (figura 28a) inducida después de la infección con el virus de la Limfocoriomeningitis en células esplénicas de ratones B6 C57 y además de estímulos diferentes; de izquierda a derecha: sin péptido; péptido CMB N° 396 (PÉPTIDO N° 396); sólo medio; PMA más ionomicina; y compuesto inmunoestimulante a diferentes concentraciones.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES/EJEMPLOS PARTICULARES

La expresión “composición inmunoestimulante” se define en este documento en un sentido amplio para referirse a cualquier tipo de agente biológico en una forma administrable capaz de estimular una respuesta inmune en un mamífero inoculado con el producto.

Como se ha usado en este documento, el término “purificado” que se refiere a LPS, indica que el LPS se ha sometido a procedimientos de fraccionamiento o purificación, tales como, pero sin limitación, los procedimientos que se han descrito anteriormente, para eliminar diversos componentes diferentes, y cuya composición retiene sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se usa la expresión “sustancialmente purificado”, esta denominación se referirá a una composición en la que los LPS forman el componente no disolvente principal de la composición. Por ejemplo, “LPS sustancialmente purificado” indica que más de aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95% del componente no disolvente de una solución o composición es el LPS de la presente invención.

La composición inmunoestimulante de la presente invención incluye el LPS de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG3306 en una forma sustancialmente purificada en la que el componente no disolvente no está contaminado con más del 0,2% de otros compuestos (ADN, ARN, Proteínas, glucanos, lípidos...).

Una “cantidad inmunológicamente eficaz” se refiere a una cantidad lo suficientemente inmunogénica para inducir una respuesta inmune celular o humoral detectable en un mamífero.

Una “respuesta inmune protectora”, como se usa en este documento, se refiere a una respuesta inmune celular o humoral que evita o retrasa la infección o la enfermedad causada por un patógeno especificado.

El compuesto de la invención puede prepararse usando técnicas de preparación convencionales en base al excipiente, el pH y la concentración.

El lipopolisacárido se extrae de *Ochrobactrum intermedium* LMG3306 siguiendo las etapas:

- a) centrifugar el cultivo inactivado de *O. intermedium* LMG3306;
- b) resuspender el sedimento obtenido en una suspensión salina;
- c) diálisis con agua purificada y polietilenglicol;
- d) precipitar con cuatro volúmenes de metanol y el 1% de metanol saturado con acetato sódico;
- e) Liofilizar para obtener el LPS en bruto.

Una vez que el LPS en bruto se ha liofilizado, se purifica siguiendo las etapas:

1. disolver el LPS en bruto en tampón (Tris-HCl 10 mM a pH 7,5), opcionalmente ayudado por ultrasonido;
2. añadir proteinasa K e incubar a temperatura ambiente;
3. recoger el LPS purificado por ultracentrifugación;
4. liofilizar la muestra.

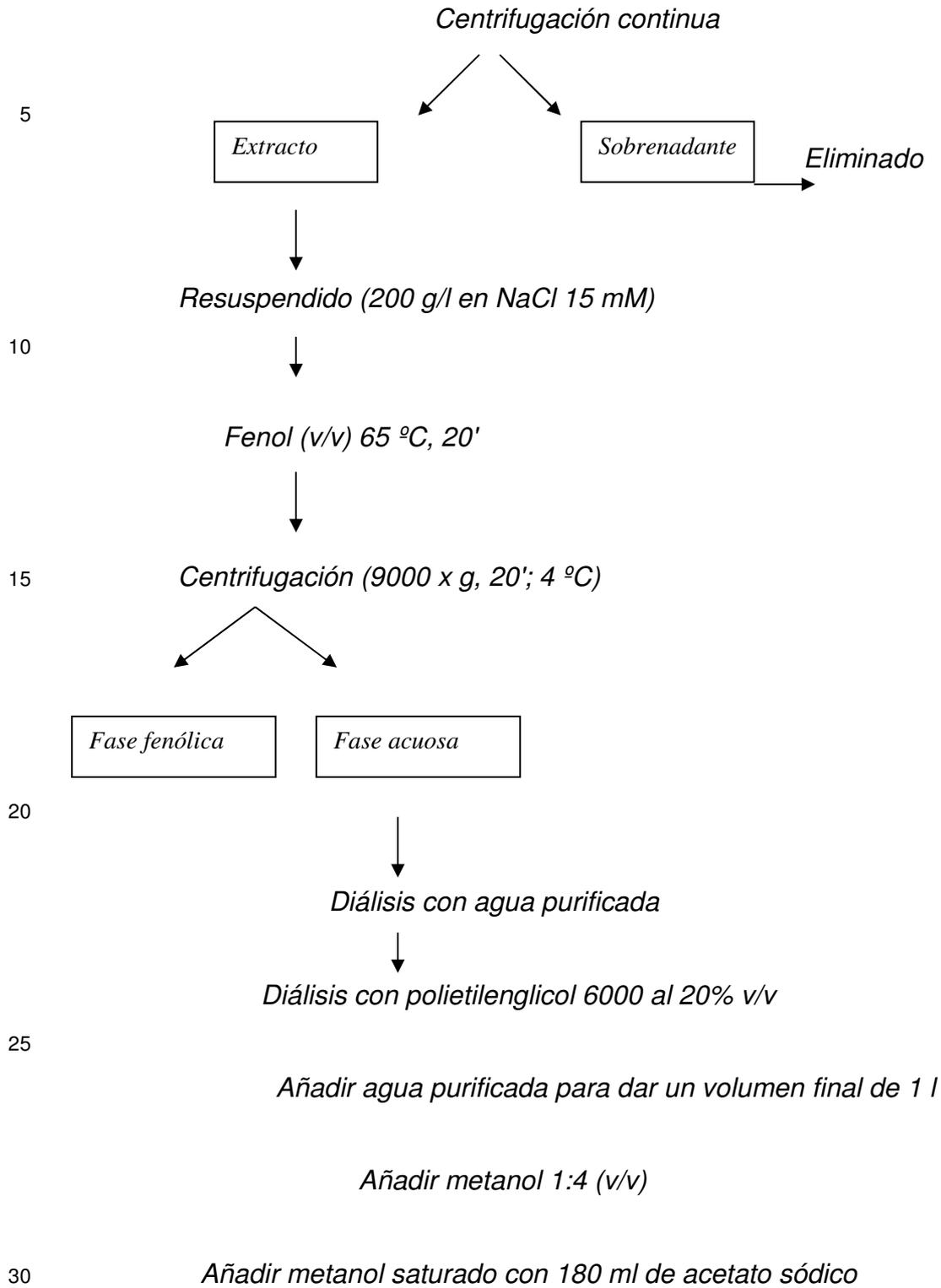
El procedimiento de fabricación del compuesto inmunoestimulante de la invención se representa en el siguiente diagrama de flujo:

Diagrama de flujo del procedimiento de extracción de LP de *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306:

*Cultivo de Ochrobactrum intermedium LMG 3306 (Fase estacionaria)*



Formaldehído al 0,4% v/v



24 horas a -20 °C

Centrifugar (9000 x g, 20')

5                                      *Extracto*                                      *Sobrenadante*



*Resuspensión en agua purificada*



*Liofilización del LPS en bruto*

10



*Purificación (Tratamiento enzimático)*



*Liofilización del LPS purificado*

15 El procedimiento de fabricación comprende las siguientes etapas:

i) Descongelar las bacterias de semillas de trabajo (cepa LMG3306)

**Preparación del preinóculo:**

20

1. Preparar 1 l de caldo de Tripticasa de soja (TSB)
2. Preparar un tubo con 60 ml de TSB
3. Tomar una perla del vial congelado de semilla de trabajo e incluirlo en el tubo con 60 ml de TSB.
4. Incubar a 37 °C ± 0,1 durante 24 horas con agitación.

25 5. Controlar el preinóculo: Identificación y control de pureza: verificar la morfología de las colonias y la morfología microscópica del cultivo.

ii) Crecimiento en fermentadores de control:

30 **Preparación del inóculo**

1. Preparar el medio de cultivo TSB suplementado con sacarosa al 2 %.
2. Preparar una botella de inoculación con 5 l de TSB suplementado con sacarosa al 2 % atemperado con un pH de 6,75 ± 0,15.
3. Inocular el preinóculo en una botella de inoculación con el medio de cultivo.
4. Incubar a 37 °C ± 0,1 durante 24 horas con agitación.
5. Controlar en los inóculos: Identificación y control de pureza: verificar la morfología de las colonias y la morfología microscópica del cultivo.

40 **Cultivo**

1. Limpiar y esterilizar los fermentos
2. Preparar 400 ml de TSB suplementado con sacarosa al 2 %.
3. Rellenar los fermentos con 400 ml de TSB suplementado con sacarosa al 2 % ajustando el pH a 6,75 ± 0,15.
4. Inyectar los inóculos los fermentos con el medio de cultivo.
5. Incubar a 37 °C ± 0,1 durante 24 horas en un agitador al máximo de 50 rpm
6. Control del cultivo: Identificación y control de pureza: Verificar morfología de las colonias y morfología microscópica del cultivo.

45

**Inactivación**

1. Transferir el cultivo a un tanque de inactivación mediante conducciones estériles.  
 2. Añadir una solución de formaldehído hasta una concentración final del 0,4%, e incubar a 37° C con 10 rpm durante 3 días.

**Centrifugación**

1. Conectar los fermentos a la centrifugación continua y centrifugar el contenido de los fermentos.  
 2. Embotellar el cultivo inactivado en botellas de plástico de 10 litros de capacidad. Mantener a 4 °C hasta su uso.

iii) Seguir el procedimiento de extracción de LPS como se describe a continuación:

- 1-Centrifugación del cultivo inactivado de *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306. El sobrenadante se elimina.  
 2-Resuspender el sedimento obtenido en una suspensión de solución salina: 200 g/l de NaCl 15 mM.  
 3-Añadir fenol a una solución acuosa al 90% y a 65 °C.  
 4-Agitar durante 20' a 65 °C. Enfriar la mezcla hasta 10 °C.  
 5-Centrifugar a 9000 x g durante 20'. Mantener a 4 °C durante 24 horas.  
 6-Diálisis. En primer lugar, con agua purificada y después con polietilenglicol  
 7-Precipitación con cuatro volúmenes de metanol y con el 1% de metanol saturado con acetato sódico.  
 8-Centrifugar a 9000 x g durante 20'. El sobrenadante se elimina. El extracto se resuspende con agua purificada y se agita.  
 9-Repetir la etapa 7.  
 10-Liofilizado de la muestra para obtener el LPS en bruto.

iv) LPS purificado de acuerdo con el siguiente procedimiento:

1. Disolver 100 mg de LPS en bruto en 20 (5 mg/ml) de tampón (Tris-HCl 10 mM a pH 7,5) ayudado por ultrasonidos. Usar 5-10 mg de LPS como control.  
 2. Añadir 0,5 ml de proteinasa K (50 µg/ml o 5 µg de proteinasa por mg de LPS). Incubar a temperatura ambiente durante 12 horas con agitación y mezcla suave.  
 3. Recoger el LPS purificado por ultracentrifugación (100.000 x g, 6 horas). Resuspender el sedimento en agua purificada.  
 4. Liofilizar la muestra.

v) Calcular la concentración de LPS para preparar la solución a granel como se describe a continuación:

**Materiales y reactivos**

1. H2SO4 1,25 N: 6,66 ml de reactivo disponible en el mercado en H2O DD a 100 ml.  
 2. ácido peryódico 0,042 N: 0,48 g de ácido peryódico (ácido paraperyódico, H15IO6) en 100 ml de H2SO4 0,125 N.  
 3. Arsenita sódica al 2% en HCl 0,5 N (8,3 ml de HCl concentrado a 200 ml de H2O).  
 4. Ácido tiobarbitúrico (Sigma): pH 2 al 0,3% (disuelto en H2O DD a 50 °C). Usar en 15 días.  
 5. Dimetilsulfóxido  
 6. Estándares:

Kdo (Peso molecular = 255,1) (Sigma, almacenar a -20 °C)  
 Desoxirribosa (Peso molecular = 136) (Sigma, almacenar a -20 °C)

7. LPS cuantificado del lote anterior  
 8. Tubos de vidrio (limpiados con una mezcla crómica o equivalente), en los que adaptar mármol.  
 9. Espectrofotómetro

**Proceso**

1. Preparar tubos con estándares de Kdo (0,05 µg), desoxirribosa (0,025 µg), LPS cuantificado de un lote anterior (0,2 µg) y un reactivo blanco (200 µl de H2O).  
 a) si la muestra es LPS extraído y liofilizado, peso de 0,2 µg y preparar un tubo  
 b) si la muestra es el producto final, preparar un tubo con 200 µl.  
 Añadir H2O a los tubos hasta 200 µl.

2. Colocar los tubos con las muestras en hielo, añadir 20 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,25 N en cada tubo y hervirlos cubiertos con mármol durante 20 minutos exactamente. Enfriarlos en hielo. Esta no se realiza con los estándares.

3. Añadir rápidamente 0,25 ml de ácido peryódico a las muestras y los estándares, agitarlos e incubarlos a temperatura ambiente durante 20 minutos (contar desde el primer tubo). Para añadir el ácido peryódico, los tubos han de estar en el mismo orden que se ha añadido el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

El tiempo de hidrólisis ha de optimizarse, ya que la cantidad de Kdo medido depende de la solubilización del Kdo, pero también de su degradación en las condiciones de hidrólisis (20 minutos son adecuados para el LPS de *Ochrobactrum intermedium* LMG3306).

4. Con los tubos en el mismo orden que en la etapa 3, añadir 0,5 ml de arsenita sódica, agitar en el vórtice y esperar 2 minutos, desde la adición al primer tubo (el color amarillo que aparece al añadir el reactivo desaparece en este tiempo).

5. Añadir rápidamente 2 ml de ácido tiobarbitúrico a cada tubo, en el mismo orden que anteriormente. Hervirlos con mármol durante 20 minutos.

6. Añadir exactamente 1 ml de DMSO (evita la aparición de turbidez) a cada tubo antes de enfriarlo en una bandeja con agua del grifo.

7. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Encender el espectrofotómetro al comienzo de los 30 minutos para estabilizar la lámpara.

8. Leer cada tubo a 552 nm y a 536 nm (absorción máxima de Kdo y la desoxirribosa, respectivamente). Pueden usarse bandejas de plástico.

### Cálculos

Mk552 = Abs552/µmolk; calcular Mk536, Md552 y Md536 de la misma manera.

$$\mu\text{mol KDO} = \frac{\text{Md536 Abs552} - \text{Md552 Abs536}}{\text{Mk552 Md536} - \text{Mk536 Md552}}$$

k: KDO; d: desoxirribosa; Abs: absorbancia

vi) Homogeneidad del lote hasta el proceso final como se describe a continuación:

Esta validación de homogeneidad del procedimiento de cuantificación se usa dos veces durante la fabricación del producto y de acuerdo con el EMEA/CVMP/598/99 "Note for guidance on process validation":

- Al final de la extracción de LPS del cultivo inactivado de *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306, para conocer su riqueza.
- En el producto final para comprobar la cantidad de LPS.

El proceso validado es el que se aplica al final del periodo de extracción. Las cantidades usadas en el procedimiento analítico son mucho mayores que las cuantificadas en el producto final. Con este procedimiento se pretende conocer la concentración del LPS extraído.

La cuantificación de LPS se realiza a partir de uno de sus componentes de cuantificación, Kdo. Kdo es una parte de la molécula de LPS y siempre es una cantidad constante para un LPS específico, pero es una cantidad variable en el LPS con bacterias diferentes. En *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306 son 2 moléculas de Kdo para cada molécula de LPS.

La cuantificación se realiza por espectrofotometría.

El procedimiento de cuantificación de Kdo no es específico cuando la muestra es LPS extraído, ya que cualquier desoxirribosa residual, (componente de ADN) dejado al final de la extracción y el procedimiento de purificación del LPS, puede interferir con el ensayo debido a la absorbancia en una longitud de onda de máxima absorbancia de Kdo (552 nm).

La validación de la cuantificación de Kdo usando el estándar Kdo demostrara que el Kdo se cuantifica de forma lineal, precisa y exacta. La falta de especificidad del procedimiento cuando la muestra de LPS está contaminada con restos de desoxirribosa se resuelve aplicando una fórmula de corrección. Esta fórmula ajusta el valor de Kdo teórico obtenido al valor real eliminando la interferencia de desoxirribosa cuando esta interferencia existe en la muestra.

La linealidad de la cuantificación de desoxirribosa mostrará que este componente se comporta linealmente no sólo en solitario sino también cuando es un contaminante de LPS.

Cada vez que se usa este procedimiento, se usarán muestras con concentraciones diferentes de estándares Kdo, muestras con diferentes concentraciones de desoxirribosa, muestras con diferentes concentraciones de LPS cuantificada previamente y muestras con diferentes concentraciones de muestras de ensayo, y todas ellas se medirán en la longitud de onda de absorbancia máxima de desoxirribosa (552 nm).

Con los resultados obtenidos se realizarán las siguientes etapas:

- Una línea recta convencional con el estándar Kdo: Se ensaya la linealidad.
- Una línea recta convencional con la desoxirribosa convencional: Se ensaya la linealidad.
- Una línea recta con el LPS cuantificado previamente. El procedimiento se comprueba. Se ensaya.
- Se calculan los cocientes entre los valores de absorbancia obtenidos para cada muestra, siendo el numerador la absorbancia a 552 nm para el Kdo convencional, para el LPS cuantificado previamente y para las muestras de ensayo y la absorbancia a 536 nm para la desoxirribosa convencional.

Para aplicar la fórmula, se toman los valores de concentración de las muestras de ensayo cuyos valores de los cocientes están más cerca de los obtenidos a partir de las concentraciones de Kdo convencional y desoxirribosa convencional, siempre y cuando los valores seleccionados se encuentren dentro de la línea recta convencional. Si un valor no está dentro de la línea recta, se toma en su lugar el valor más cercano.

La aplicación de la fórmula determina los micromoles de Kdo en la muestra de ensayo.

La presente invención da a conocer adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto inmunoestimulante de LPS proporcionado en este documento mezclado con uno o más vehículos excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados dependerán de la condición que se está tratando a lo largo de la ruta de administración. Se entenderá que las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse como adyuvantes para aumentar una respuesta inmune a un antígeno o mejorar ciertas actividades de células del sistema inmune, o en algunos casos como una composición profiláctica o terapéutica para evitar o tratar una afección particular en un sujeto.

La presente invención da a conocer composiciones farmacéuticas que contienen un LPS de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en las que el LPS está presente en una cantidad eficaz para modular una respuesta inmune, que es la cantidad de compuesto requerida para conseguir el efecto deseado en cuanto a la estimulación de una respuesta inmune deseada, tratamiento o inhibición de una enfermedad o afección. Las composiciones farmacéuticas también pueden actuar como un adyuvante cuando se coadministran con un antígeno.

La composición inmunoestimulante de la presente invención muestra fuertes efectos de la inmunoestimulación cuando se administran en un amplio intervalo de dosis y un amplio intervalo de proporciones. De acuerdo con una realización, la composición inmunoestimulante comprende entre 0,5 y 120 µg/ml de LPS. Más preferiblemente, la composición comprende entre 0,5 y 10 µg/ml de LPS.

De acuerdo con una realización preferida, el lipopolisacárido está en una suspensión homogénea en la que la fase micelar es estable a 4°C durante más de 1 año.

Preferiblemente, el pH de la composición inmunoestimulante de la invención está entre 2-12.

La cantidad de inmunoestimulante administrado junto con una dosis de vacuna se selecciona generalmente como una cantidad que conjuntamente, junto con la vacuna, induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos adversos significativos en vacunas típicas. Dicha cantidad también variará dependiendo de qué inmunógenos específicos se empleen y cómo se presenten. Generalmente, se espera que cada dosis comprenda aproximadamente 1-1000 µg de antígeno y 0,1-200 µg de inmunoestimulante, más típicamente aproximadamente 2-100 µg de antígeno y 0,5-150 µg de inmunoestimulante, y preferiblemente aproximadamente 5-50 µg de la preparación de antígeno y 1-75 µg de inmunoestimulante. Por supuesto, las dosificaciones administradas pueden depender de la edad, el peso, el tipo de tratamiento concurrente, si lo hubiera, y la naturaleza del antígeno y el inmunoestimulante que se está administrando.

El modo de administración de la composición inmunoestimulante de la invención puede ser una vía adecuada que administre una inmunoestimulación general. Sin embargo, la composición inmunoestimulante se administra preferiblemente por vía parenteral, las vías intramuscular o subcutánea. Más preferiblemente, la composición inmunoestimulante se administra por vía subcutánea. También pueden emplearse otros modos de administración, cuando se desee, por lo tanto, los ejemplos de composiciones de la invención incluyen preparaciones líquidas por orificios, por ejemplo, oral, nasal, anal, vaginal, etc., administraciones tales como suspensiones, jarabes, o elixires; y,

preparaciones para administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (por ejemplo, administración inyectable), tales como suspensiones estériles o emulsiones. En dichas composiciones, la composición inmunoestimulante de la invención puede mezclarse con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado, tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa o similares.

5 La inmunoprotección apropiada y la dosis no tóxica de dichas dosis pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica, es decir, la cantidad inmunoprotectora apropiada y no tóxica de la cepa de esta invención contenida en el producto de esta invención puede estar en el intervalo de la cantidad eficaz de LPS. No existe una edad mínima recomendada para la aplicación, de hecho, en algunos estudios realizados se muestra 1 día.

10 Por supuesto, la administración puede repetirse a intervalos adecuados, si fuera necesario. Preferiblemente, la programación de la aplicación es la siguiente:

- Primera aplicación 0,1 µg/kg de peso corporal (p.c.) por vía subcutánea.
  - Segunda aplicación a la misma dosis 15 días después.
- Más aplicación: Está bien recomendado una aplicación de 6 meses-1 año (0,1 µg/kg p.c. por vía subcutánea).

#### Ejemplo 1. Tratamiento y prevención de endotoxemia

20 Para esto, se usó LPS de *E. coli* en el modelo grave de ratones Balb/c.

En primer lugar, se determinó la dosis de LPS de *E. coli* que inducía el 100% de mortalidad en un período de 6 días (dosis letal 100).

25 El LPS de la cepa *E. coli* O111: B4 se adquirió en la casa comercial SIGMA (St. Louis, MO, Estados Unidos). En todos los estudios, se usa tampón fosfato-sal como diluyente de LPS. En todos los casos el vehículo usado fue solución salina tamponada con fosfato (PBS). La dosis apropiada de LPS para los estudios de supervivencia se determinó mediante una curva dosis-respuesta en la que las dosis de aumento de LPS se administraron a ratones hembras BALB/c por vía intraperitoneal (IP).

30 Prevención de los efectos letales de la endotoxemia:

Los ratones hembras BALB/c que experimentaban endotoxemia se trataron o no con 2 dosis diferentes del IM, 0,6 µg/kg (dosis 60) o 3 µg/kg (dosis 300), IP, 24 h antes de la estimulación con LPS (O111:B4 de *E. coli*). El LPS se inyectó IP a 1,75 mg/ratón.

35 Para proporcionar una reanimación de fluido igual en la configuración de la sepsis, todas las inyecciones eran del mismo volumen.

40 El IM en ambas dosis previno completamente la muerte asociada a LPS de los animales debido al choque endotóxico de los LPS de *E. coli*. Además, los animales tratados con el IM, no mostraron ningún síntoma asociado a choque séptico (figura 1). La dosis de LPS usada era mucho mayor que la dosis del IM. Por lo tanto, es poco probable que el IM (LPS de *Ochrobactrum intermedium* 3306) pueda competir con el LPS.

45 Cura del choque endotóxico letal:

El principal problema de la sepsis habitualmente no es tanto evitarla sino curarla una vez el proceso ha comenzado. Para ensayar esto, se infectaron 5 ratones IP (por vía intraperitoneal) con 2 mg/animal de LPS (*E. coli* O111: B4) y 24 horas después se trataron con LPS de IM con 0,6 µg/kg (dosis 60) o 3 µg/kg (dosis 300) IP. El IM tiene un efecto protector frente a la mortalidad inducida por LPS. Por lo tanto, 72 horas después del tratamiento con placebo todos los animales murieron. Sin embargo, el tratamiento con IM produjo la supervivencia del 20% de los animales y retrasó su muerte significativamente. Esto indica que el IM fue capaz de curar parcialmente a los ratones que experimentaron choque endotóxico (figura 2).

55 Sorprendentemente, los animales tratados con IM muestran niveles de coagulación sanguínea menores que los del grupo placebo. Este hecho es muy importante, ya que se asocian problemas de excesiva coagulación al fenómeno de la sepsis y, de hecho, el único compuesto aprobado recientemente para esta afección presenta un efecto bloqueante de la coagulación.

60 Peritonitis bacteriana:

El lipopolisacárido de *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306 se ensayó en otro modelo de sepsis, la peritonitis

inducida por *E. coli* indujo sepsis.

Tratamiento de la peritonitis letal por *E. coli*:

5 Para este estudio, se inocularon ratones hembras C57BL/6 con bien  $10^7$  o  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) de *E. coli* 026:B6 vivas y 24 o 4 horas después, respectivamente, los animales se trataron con IM de LPS, 0,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (dosis 60) o 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (dosis 300), o con un placebo usando una sola inyección IP.

10 Después de esto, se evaluaron la supervivencia y los síntomas patológicos (anorexia, mortalidad, alopecia, caquexia, actividad física, etc.).

Veinticuatro horas después de la inyección con *E. coli*, algunos ratones inoculados con  $10^7$  UFC comienzan a morir (el 20% de ellos) y muestran signos patológicos de sepsis (3 de media en una escala de 0 a 5).

15 El tratamiento con IM evitó la muerte de los animales y revirtió completamente, en una manera de dosis-respuesta, los síntomas de la sepsis (figura 3).

20 Cuando se usó la dosis de  $10^8$  UFC de *E. coli*, todos los animales murieron a las 24 horas, por lo que se trataron con el IM 4 h después de la inoculación de *E. coli*. En ese tiempo los ratones no murieron, aunque, la puntuación media de los síntomas patológicos era muy alta (4 de 5). A las 14 h, todos los ratones infectados con *E. coli* murieron. Sin embargo, el IM de 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (dosis 300) evitó la muerte de la mayoría de los animales (tasa de supervivencia del 80%) y disminuyó gradualmente la gravedad de los síntomas clínicos (figura 4).

**Efecto adyuvante en la infección experimental por leishmaniosis**

25 Efecto adyuvante en la infección de la almohadilla plantar:

30 Es bien conocido que el extracto de antígeno SLA (Antígeno Soluble de Leishmania) no induce un efecto protector contra la infección experimental por Leishmania mayor, ya que este antígeno es incapaz de activar la respuesta protectora Th1 (figura 5). Pero, cuando el SLA se combina con un adyuvante tal como CpG (Patente de Estados Unidos US 7521063) como adyuvante para vacunas, debido a la estimulación de la respuesta inmune a través de TLR9 y un aumento de la respuesta Th1 (Heeg, Int. J. Microbiol, 298, 33, 2008), es capaz a través del TLR9 (Receptor semejante a Toll) de inducir una activación protectora Th1 (IFN- $\gamma$ ) (Patente de Estados Unidos 6890542).

35 Por lo tanto, este modelo es muy útil para ensayar el IM en comparación con el uso de CPG bien conocido como adyuvante para la vacunación contra la leishmaniosis experimental.

En la figura 6 se muestra el protocolo para este fin:

40 Básicamente, el antígeno SLA se inocula sólo o junto con CpG o con IM los días 0, 15 y 30.

45 El día 60, se inocula a cada animal 1.000 promastigotes en cada almohadilla plantar del ratón y se controlan los parámetros de lesiones e inmunológicos. La evolución de la infección puede seguirse macroscópicamente y se correlaciona con el número de parásitos. Como se muestra en la figura 7, después de la inoculación es patente la infección en el grupo de control. El antígeno de SLA no produce ningún efecto protector; mientras que tanto los grupos SLA+CpG como SLA+IM reducen significativamente las lesiones.

50 Además, los resultados macroscópicos 6 semanas después de la infección se muestran en la figura 8, y demuestran una reducción significativa de las lesiones en los animales tratados con SLA-CpG o SLA-IM en comparación con la almohadilla plantar de animales tratados solamente con SLA.

55 Además, el número de parásitos se cuantificó en la almohadilla plantar y el bazo. 7 semanas después de la infección, los animales fueron sacrificados y se determinaron los parásitos presentes en el bazo y los nódulos linfoides (DLN). La inmunización con SLA no produce ninguna reducción del número de parásitos en contraste con el IM y CpG. El CpG reduce este número en una magnitud casi de 2 log y el IM mostró resultados similares al menos en 4 del total de 6 animales (figura 9).

60 En resumen, SLA no protege en solitario pero su combinación con CpG o IM tiene un efecto protector frente a la infección.

Las células esplénicas de los animales sacrificados se recogieron y se estimularon *in vitro* con SLA y se evaluó la respuesta Th1 (IFN $\gamma$ ) y/o Th2 (IL-4).

Se describe bien que la infección por *Leishmania* mayor en un modelo susceptible Balb/c mejora relativamente los niveles de IL-4 sobre los de IFN $\gamma$ . Aunque la vacunación con SLA no modifica ese patrón, su combinación con CpG aumenta la respuesta Th1 cuantificada por la producción de IFN $\gamma$  y, en consecuencia, disminuye la expresión relativa de IL-4. Por lo tanto, la proporción IFN $\gamma$  (respuesta Th1)/IL-4 (respuesta Th2) aumenta significativamente (figura 10).

Sorprendentemente, aunque el IM ha mostrado un efecto similar y protector al de CpG, el mecanismo inmunológico es diferente. La protección no guarda relación con la proporción de IFN $\gamma$  (respuesta Th1)/IL-4 (respuesta Th2), ya que ambos parámetros aumentan al mismo tiempo (figura 10).

Una segunda manera de determinar la respuesta Th1/Th2 es analizando los niveles séricos de los anticuerpos de isotipos específicos de *Leishmania* IgG2a (Th1) e IgG1 (Th2).

Aunque no está claro el mecanismo, los niveles de IgG2a guardan relación con la protección contra la *Leishmania*. En los animales no tratados, o tratados solamente con SLA, no se detectan niveles de IgG2a. Sin embargo, se detectaron niveles de IgG2a en animales tratados con CpG o IM. Por lo tanto, la proporción IgG2a/IgG1 es baja en animales no tratados o tratados solamente con SLA a diferencia de los grupos con SLA-CpG o SLA-IM (figura 11).

#### Efecto protector y terapéutico del IM en el modelo de ratón de almohadilla plantar experimental:

En la Figura 12 se muestra el protocolo para evaluar el efecto terapéutico del IM en una infección experimental en curso con *Leishmania*.

Para ello, se inocularon IM al mismo tiempo que la leishmaniosis con dos dosis diferentes:

- 1) Grupo IMF-1, 2 y 3, que reciben 0,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (18 ng/ratón)
- 2) Grupo IMF-4, 5 y 6, que reciben una dosis de 1,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (36 ng/ratón).

Los resultados muestran que el IM es capaz de proteger con una potencia similar a la obtenida con CpG frente a una infección por leishmaniosis mayor (figura 13 A).

Los animales tratados con IM no mostraron ninguna lesión aparente (figura 13B). Después de 7 semanas de la infección, los animales se sacrificaron y se cuantificó el número de parásitos en el bazo y los nódulos linfoides (LN). Se obtuvieron resultados similares en los grupos CpG e IM con una reducción significativa (10.000 veces) en los nódulos linfoides, no se encontraron parásitos en el bazo (figura 13C).

Finalmente, y de acuerdo a los experimentos anteriores, el grupo CpG muestra un cambio significativo en la proporción de los niveles de los anticuerpos IgG2a/IgG1. Además, el IM no muestra un cambio significativo en esta proporción de acuerdo con los resultados que se han obtenido previamente (figura 14).

Como conclusión final, se descubrió que el IM posee propiedades similares a CpG pero difiere de éste último en el mecanismo inmune, no debido a un cambio en el perfil y la proporción de Th1/th2 o de IgG2a/IgG1. En este contexto, el IM puede ser un mejor adyuvante debido a la activación de ambas respuestas (no solo Th1, como se demostró para CpG).

#### El IM (LPS de *Ochrobactrum intermedium*) tiene propiedades adyuvantes en la vacunación en animales inmunodeprimidos:

El IM ha mostrado previamente tener un efecto adyuvante en la vacunación en la infección por leishmaniosis usando SLA como antígeno.

Este antígeno es muy pobre inmunológicamente y de manera más importante, induce fundamentalmente una respuesta Th2 (caracterizada por un predominio de anticuerpos IgG1 y producción de IL-4), y no induce una respuesta Th1 (caracterizada por una respuesta IgG2a y la producción de IFN-gamma) que es la protectora.

Para analizar el efecto adyuvante en ratones inmunodeprimidos, se trataron ratones hembras Balb/c con el corticoesteroide Dexametasona (Dex), 20  $\mu\text{g}$  IP/animal, y 24 h después, los animales se inocularon sólo con SLA (10  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ) o en combinación con IM, 0,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (dosis 60) o 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (dosis 300), o CpG, un compuesto que se ha indicado previamente que induce respuestas Th1 (véase la figura 15 para el protocolo usado)- Los ratones fueron revacunados una semana más tarde sólo con SLA y al día 17 los animales fueron sacrificados, se recogieron las células esplénicas y se evaluaron las titulaciones anti-SLA en el suero.

Como se muestra en la Figura 16, se detectaron anticuerpos específicos anti-SLA en todos los animales inyectados con SLA pero no en los de control sólo con Dex, pero la mayoría de los anticuerpos fueron del isotipo IgG1. Como se indica, el adyuvante de CpG aumento la proporción IgG2a/IgG1 y lo que es más importante, el IM fue mejor que CpG en la inducción de este desplazamiento, representativo de un cambio Th2 a Th1 *in vivo*. Esto indicó que el IM posee una actividad como adyuvante en animales inmunodeprimidos, y lo que es más importante, favorece las respuestas Th1 incluso en animales inmunodeprimidos.

Además, se obtuvieron células esplénicas de diferentes animales y se estimularon *in vitro* con SLA y se midió la proliferación e IFN- $\gamma$  (una citocina de Th1 necesaria para la protección frente a leishmaniosis). Como se muestra en la figura 17, SLA indujo una respuesta proliferativa en animales tratados con Dex. Los animales tratados con CpG tenían una repuesta proliferativa mejorada. De forma interesante, los animales tratados con el IM también tienen una mejor respuesta proliferativa a SLA en una manera dosis-respuesta (figura 17). No se observaron diferentes en la respuesta a mitógenos entre los animales (no mostrado).

Se comprobó el IFN- $\gamma$  (una citocina Th1) e IL-4 (una citocina Th2) liberado en los sobrenadantes de las células esplénicas después del tratamiento con SLA de células esplénicas "in vitro". Como se muestra en la Figura 18, los animales de control Dex no vacunados no tenían una producción detectable de IL-4 o IFN- $\gamma$  tras la exposición a SLA in vitro. Los animales vacunados con SLA, exposición a SLA "in vitro", dan como resultado la producción de IL-4 pero muy poco IFN- $\gamma$  de acuerdo con los datos de IgG1/IgG2a en el suero de los mismos animales.

El tratamiento con CpG indujo un aumento tanto de IL-4 como de IFN- $\gamma$  sin alterar demasiado su proporción (figura 19). De manera interesante, el LPS de IM aumentó también ambas citocinas, pero IFN- $\gamma$  en una proporción mucho mayor que IL-4. Esto era especialmente evidente en animales tratados con 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (dosis 300), un aumento de 10 veces de la proporción IFN- $\gamma$ /IL-4 (figura 19).

#### Ejemplo 2. Procedimiento de fabricación

El LPS inmunoestimulante se obtuvo a partir de la cepa *O. intermedium* LMG 3306 tras el procedimiento de fabricación que se ha descrito anteriormente.

1. Procedimiento para obtener el antígeno de fermentación de acuerdo con la parte (ii) que se ha descrito anteriormente (Procedimiento de fabricación)

2. Procedimiento de extracción de LPS de acuerdo con la parte (iii) que se ha descrito anteriormente (Procedimiento de fabricación)

3. Purificación y cálculo de la cantidad de LPS de acuerdo con las partes (iv) y (v) que se han descrito anteriormente (Procedimiento de fabricación)

El producto se almacenó en un tanque de acero inoxidable que se ha había esterilizado previamente y provisto con un sistema de agitación continua, con el fin de mantener la homogeneidad del lote durante hasta 24 horas a 4 °C. El producto se transfirió desde el tanque al área de embotellado usando un sistema de tubos de gas estéril.

El embotellado se realizó en un entorno estéril, clase 100 A, con fondo 100 B. Los tapones de caucho y las cápsulas se aplicaron en la misma zona.

Los viales que contenían el producto final se almacenaron a 4 °C, hasta que se etiquetaron y empaquetaron. El etiquetado y el empaquetado se realizaron en una zona separada, y sólo un lote del producto final y su material de acondicionamiento pueden entrar en esta zona a la vez. El almacenamiento final hasta su comercialización se realizó a 5  $\pm$  3 °C.

#### Ejemplo 3. Composición:

NOMBRE DE SUSTANCIAS	CANTIDAD DOSIS (1 ml)	POR
<b>Sustancias activas:</b>		
LPS <i>Ochrobactrum intermedium</i> LMG3306	6 $\mu\text{g}$	
<b>Excipientes:</b>		
Agua para inyección	1 ml	

## ES 2 653 202 T3

### Ejemplo 4. Prueba Kdo:

El objetivo principal de este estudio y comprobar la repetibilidad de la determinación de los nanomoles por ml de LPS tras el procedimiento colorimétrico de Kdo que se ha descrito anteriormente.

Los parámetros que se examinaron fueron:

- 1-Precisión de intra-ensayo
- 2-Precisión de inter-ensayo
- 3-Precisión de inter-lote

#### 1-Resultados de la precisión intra-ensayo

En este ensayo, se usó un lote del producto de la invención (A003A), se titularon 3 muestras el mismo día con 10 réplicas por muestra. Después, se ensayaron tres diluciones (1/2, 1/4 y 1/8) de cada muestra, con 10 réplicas por dilución para comprobar la repetitividad del ensayo.

Resultados:

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,25	0,25	0,25	0,26	0,25	0,25	0,24	0,25	0,25	0,25
2	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
3	0,25	0,26	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

MEDIA	SD	VC
0,25	0,003	1,2%

Los resultados indican que la prueba es repetitiva; el VC es menor del 10%.

Muestra	Dilución	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1/2	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13	0,12	0,13	0,12	0,12
	1/4	0,06	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,06
	1/8	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03
2	1/2	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
	1/4	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06
	1/8	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04
3	1/2	0,12	0,12	0,13	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
	1/4	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
	1/8	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03

Dilución de 1/2:

MEDIA	SD	VC
0,121	0,003051	2,52%

Dilución de 1/4:

MEDIA	SD	VC
0,061333	0,003457	5,63%

Dilución de 1/8:

MEDIA	SD	VC
0,031	0,003051	9,84%

Se estudió el VC para cada dilución. Los resultados obtenidos indican la repetibilidad de la prueba; cada VC era menor del 10%.

#### 2-Precisión inter-ensayo

Para comprobar la variabilidad debida principalmente a las manipulaciones de los técnicos, el mismo lote de

## ES 2 653 202 T3

producto de la invención se tituló en tres días diferentes. Cada día, todas las soluciones necesarias se prepararon nuevas y las muestras de producto se almacenaron a 4 °C entre el primer y el último día del experimento.

5 En este ensayo, un lote del producto de la invención (A003A) se tituló en tres días diferentes, 3 muestras diferentes con 10 réplicas por muestra.

Resultados:

Día	Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	0,25	0,25	0,25	0,26	0,25	0,25	0,24	0,25	0,25	0,25
	2	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	3	0,25	0,26	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
2	1	0,25	0,26	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	2	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,24	0,25	0,25
	3	0,25	0,25	0,25	0,25	0,24	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
3	1	0,25	0,25	0,25	0,26	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	2	0,24	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,24	0,25	0,25
	3	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,26	0,25

MEDIA	SD	VC
0,25	0,003352	1,34%

10

Los resultados obtenidos indican la repetibilidad de la prueba; el VC era menor del 10%.

3-Precisión de inter-lote

15 Para comprobar la variabilidad de la producción de los lotes:  
En este ensayo, se titularon tres lotes del producto de la invención (A001A, A002A y A003A). Tres muestras de cada lote con 10 réplicas por muestra.

Lote	Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A001A	1	0,25	0,25	0,25	0,26	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	2	0,25	0,25	0,25	0,24	0,25	0,25	0,24	0,25	0,25	0,25
	3	0,25	0,26	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
A002A	1	0,26	0,25	0,25	0,25	0,26	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	2	0,25	0,25	0,26	0,25	0,25	0,25	0,25	0,26	0,25	0,25
	3	0,25	0,26	0,25	0,25	0,24	0,25	0,25	0,25	0,26	0,25
A003A	1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,26	0,25	0,25	0,25
	2	0,24	0,26	0,25	0,25	0,25	0,26	0,25	0,24	0,25	0,25
	3	0,24	0,25	0,25	0,24	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

MEDIA	SD	VC
0,25	0,004475	1,78%

20

No se observaron diferencias significativas de la actividad Kdo en el intra-ensayo, el inter-ensayo y los ensayos temporales, con muestras del producto de la invención.

Ejemplo 5. Prueba de inmunogenicidad como adyuvante para una vacuna de virus inactivado

25

Prueba de campo

30 Esta prueba de campo se realizó con el fin de evaluar la eficacia del inmunoestimulante sobre la respuesta inmunitaria sobre anticuerpos en suero, totales y neutralizantes frente al Herpesvirus Bovino 1 (BHV-1) o el virus de la Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), inducida por la inmunización con una vacuna inactivada de rutina, en terneros seronegativos.

Material y metodología

1. Selección del rebaño

5 Para seleccionar el rebaño de prueba, previamente se examinaron 120 animales de otros 5 rebaños de ganado lechero. Ya que en estos 5 rebaños hubo animales seropositivos, se tomaron muestras de un sexto rebaño; los animales examinados eran seronegativos y se seleccionó este rebaño.

Las serologías se realizaron con la prueba ELISA disponible en el mercado que detecta los anticuerpos totales frente a los virus de IBR.

10 2. Protocolo de actuación: tratamiento, vacunación y recogida de muestras

2.1. Tratamiento y vacunación

15 La prueba se realizó en 22 vaquillas seronegativas de un rebaño lechero sin el virus de IBR. No se dejaron animales nuevos en el rebaño durante la prueba.

Las vaquillas se separaron en los siguientes grupos:

20 - Grupo 1. Se trataron trece vaquillas con 5 ml de compuesto inmunoestimulante (6 microgramos/ml) en los días de ensayo 0 y 7 y se vacunaron con 5 ml de la vacuna registrada disponible en el mercado que contenía los virus inactivados de IBR los días 7 y 28. Ambos productos se inyectaron a través de inyecciones intramusculares profundas en el cuello.

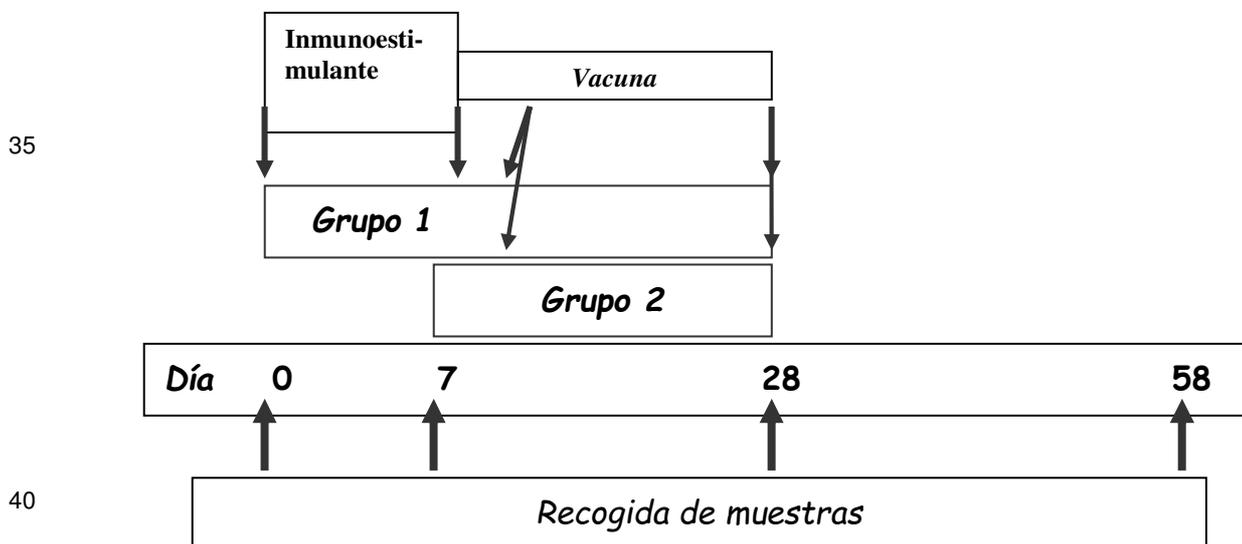
- Grupo 2. Se inmunizaron seis vaquillas con la misma dosificación y forma de vacunación los días 7 y 28.

25 - Grupo 3. Tres vaquillas fueron el grupo de control; no se trataron ni se inmunizaron con el fin de verificar que el virus no circulaba.

2.2. Recogida de muestras

30 Se tomó una muestra de sangre de cada animal los días 0, 7, 28 y 58 del periodo de ensayo.

**Esquema de desarrollo de la prueba**



3. Detección de anticuerpos neutralizantes en suero de Herpesvirus Bovino (BHV-1).

45 I. La titulación de anticuerpos neutralizantes del Herpesvirus Bovino 1 se determinó mediante una prueba de neutralización vírica convencional; hizo uso de 100 DI<sub>50</sub>CT/25 µl de la cepa Colorado en el "riñón bovino de Georgia" (GBK), una línea celular bien establecida obtenida a partir de riñón bovino (proporcionado por el Prof. Marcelino Álvarez, Dpto. Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, España) y cada suero se ensayó 4 veces.

50 Los sueros se titularon de suero puro. El suero se mezcló con el virus (25 µl de suero diluido y 25 µl de suspensión

viral), se diluyó y su titulación se descubrió con el método Spearman-Kärber (TRIMMED SPEARMAN-KARBER (TSK) VERSIÓN DEL PROGRAMA 1.5, ECOLOGICAL MONITORING RESEARCH DIVISION ENVIRONMENTAL MONITORING SYSTEMS LABORATORY, U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY CINCINNATI, OHIO 45268). Se expresa como el recíproco de la dilución de mayor protección al 50% de suero.

5 II. En los dos grupos de investigación, se descubrió la titulación de media logarítmica y se expresó como el inverso de su anti-logaritmo. La conversión en suero se definió como el aumento cuatro veces de anticuerpos entre cada dos recogidas de suero.

10 III. Para verificar la existencia de diferencias estadísticamente relevantes entre las titulaciones de la media logarítmica obtenidos para los grupos de animales tratados y no tratados en los diferentes días de ensayo, se realizó un análisis estadístico (Prueba no paramétrica de Kinscall-Wallis) con el software EpiInfo en entorno de Windows.

#### 15 Resultados y análisis

I. No hay conversión en suero de animales de control durante el ensayo.

20 II. La tasa de conversión en suero para los días 7 y 28 fue del 92,3% y el 83,3% en los grupos de animales tratados y no tratados, respectivamente, y para los días 28 y 58 fue del 69,2% y del 16,7% en los grupos de animales tratados y no tratados, respectivamente.

25 En ambos casos, la tasa de conversión en suero fue mayor en el grupo de animales tratados que en el grupo de animales no tratados; pero la diferencia entre estos grupos fue sólo significativa estadísticamente en la tasa de conversión en suero entre los días 28 y 58.

III. El día 28 la titulación de media logarítmica de los anticuerpos neutralizantes de IBR fue 3,50 en el grupo de animales tratados, que era significativamente mayor que la titulación de 2,37 obtenido en el grupo de animales no tratados.

30 El día 58 la titulación de media logarítmica de anticuerpos neutralizantes de IBR fue 12 en el grupo de animales tratados, que fue significativamente mayor que la titulación de 4,8 obtenido en el grupo de animales no tratados.

35 Las titulaciones de anticuerpos en suero del virus de IBR obtenidos en los animales tratados fueron 1,5 y 2,5 mayores que los de los animales no tratados los días 28 y 58, respectivamente.

#### Conclusiones

40 1. Como se muestra por los resultados obtenidos, la administración del compuesto inmunoestimulante aumentó significativamente la respuesta humoral en forma de anticuerpos neutralizantes y nivel de protección en animales vacunados; por lo tanto, tuvo una importante función en la implementación de la respuesta inmunológica inducida por la vacunación.

2. La aplicación se recomienda:

45 - en asociación a cualquier patrón de inmunización aplicado a ganado bovino, debido a su bajo coste.  
- Básicamente cuando los animales están en situaciones de estrés, tales como las que tienen lugar en zonas de engorde, ya que estos resultados confirman otros resultados clínicos y productivos descubiertos en otras pruebas de campo realizadas en terneros lactantes y de pastoreo.

#### 50 Ejemplo 6. Inducción de la diferenciación de macrófagos

Una de las características de las moléculas inmunomoduladoras, tales como los ligandos del receptor semejantes a Toll (TLR), incluyendo LPS de muchas especies bacterianas, es su capacidad de inducir un cambio morfológico en líneas celulares de macrófagos asociadas a un descenso en la actividad proliferativa.

55 Con el fin de estudiar esto, se cultivaron líneas celulares de macrófagos J774 (clon J774A168) y Raw 264.7 de ratón en un medio RPMI 1640 (GIBCO, Gran Island, NY) suplementado con L-glutamina 2 mM (Sigma), antibióticos, gentamicina y FCS al 5%. Para los experimentos, se cultivaron las células en RPMI suplementado con FCS al 0,5% y diferentes dosis del compuesto inmunoestimulante de la invención o LPS de *E. coli*. Los cultivos se incubaron durante 72 h a 37 °C y la proliferación celular se evaluó por la incorporación de (3H) timidina (New England Nuclear, Boston, MA) al ADN durante las últimas 16 h de cultivo. Las células se pulsaron con 1 µCi de (3H) timidina y se recogieron en filtros de fibra de vidrio usando un recolector celular automático. La incorporación radioactiva se midió

60

en un espectrómetro de centelleo líquido. El ensayo se realizó en cultivos triplicados.

La composición inmunoestimulante de la invención induce la diferenciación de las células J774 como se muestra en la figura 20 en comparación con LPS de *E. coli* LPS en macrófagos Raw. La diferenciación de macrófagos normalmente se asocia a un descenso en la proliferación celular. La composición inmunoestimulante de la invención induce una inhibición dependiente de la dosis de la diferenciación de macrófagos J774. Este efecto es aproximadamente 500 veces menos potente que el observado con LPS de *E. coli* en una base peso/vol en macrófagos J774 o Raw.

#### 10 Ejemplo 7. Inducción de TNF en macrófagos:

Uno de los ensayos más sensibles para estudiar la actividad de los ligandos TLR es estudiar la producción de citocina de TNF mediante líneas celulares de macrófagos o macrófagos. Para este ensayo se cultivaron este macrófago J774 (clon J774A168) y Raw 264.7 (de ATCC TIB-71) de ratón en medio RPMI 1640 (GIBCO, Gran Island, NY) suplementado con L-glutamina 2 mM (Sigma), antibióticos, gentamicina y FCS al 5%. Para los experimentos, las células se cultivaron en RPMI suplementado con FCS al 0,5% y diferentes dosis de la composición inmunoestimulante de la invención o LPS de *E. coli*. Los cultivos se incubaron a 37° C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 h, y los sobrenadantes se recogieron. Se detectó TNF mediante un ELISA sándwich de dos sitios (Endogen, Woburn, MA).

Los macrófagos no estimulados no sintetizan TNF detectable por ELISA. La composición inmunoestimulante de la invención a dosis de 0,1-10 µg/ml induce niveles de reactividad de producción de TNF de dosis-respuesta de manera significativa de hasta 4000 pg/ml en macrófagos J774 (figura 21a), así como en células raw. El efecto del inmunoestimulante de la invención, aunque altamente significativo, era de aproximadamente 500 veces menos potente que el LPS de *E. coli* (figura 21b).

Además, los macrófagos peritoneales se aislaron por lavado peritoneal de ratones de 12 semanas de edad BALB/c o C57Bl/6, 4 días después de una sola inyección peritoneal de una solución al 10% de tioglicolato (1 ml; Difco Laboratories). Los macrófagos de C57Bl/6, considerados como una cepa de ratones propensos a montar respuestas Th1 y de Balb/c que en contraste se piensa que están sesgados a respuestas Th2, se trataron con la composición inmunoestimulante de la invención. Se dejó que las células (1,5 x 10<sup>6</sup>/pocillo) se adhirieran durante 1 h en placas de fondo plano de 12 pocillos y se cubrieron con RPMI recién preparado/FCS al 0,5% en presencia o ausencia de la cantidad indicada de LPS (serotipo 026.B6 *E. coli*, Sigma) o el inmunoestimulante de la invención. Los cultivos se incubaron a 37° C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 h, y los sobrenadantes se recolectaron. Se detectó TNF mediante un ensayo ELISA sándwich de dos sitios (Endogen, Woburn, MA).

La composición inmunoestimulante de la invención induce la producción de TNF en macrófagos de tanto las cepas Balb/c como las cepas C57B16 de ratón, aunque con menos potencia que el LPS de *E. coli* a concentraciones equivalentes (figura 22). Puede concluirse que el inmunoestimulante de la invención es 500 veces menos potente que el LPS de *E. coli* al inducir el TNF en base a una concentración equivalente. Por lo tanto, la composición inmunoestimulante de la invención es capaz de inducir dosis inmunoestimuladoras de TNF pero no dosis excesivas que pueden ser tóxicas y son las responsables del choque endotóxico inducido por LPS de *E. coli*.

#### 45 Ejemplo 8. Inducción de IL-12 en macrófagos:

IL-12 es una citocina secretada principalmente por macrófagos en respuesta a muchos estímulos, incluyendo ligandos del TCR. IL-12 es una de las citocinas más importantes ya que IL-12 controlan la diferenciación de linfocitos T auxiliares (Th) hacia un fenotipo Th1. IL-12 es un heterodímero de 70 kD compuesto de cadenas proteicas p35/p40.

Para este ensayo estos macrófagos peritoneales se aislaron por lavado peritoneal de ratones de 12 semanas de edad BALB/c o C57Bl/6, 4 días después de una sola inyección peritoneal de una solución al 10% de tioglicolato (1 ml; Difco Laboratories). Se dejó que las células (1,5 x 10<sup>6</sup>/pocillo) se adhirieran durante 1 h en placas de fondo plano de 12 pocillos y se cubrieron con RPMI recién preparado/FCS al 0,5% en presencia o ausencia de la cantidad indicada de LPS (serotipo 026.B6 *E. coli*, Sigma) o la composición inmunoestimulante de la invención. Los cultivos se incubaron a 37° C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 h, y los sobrenadantes se recolectaron. IL-12 se detectó por ELISA. El inmunoestimulante de la invención a dosis de 10m µg/ml induce grandes cantidades de IL-12 en macrófagos peritoneales de tanto C57Bl/6 como Balb/c (figura 23)

#### 60 Ejemplo 9. Inducción de la producción de IFN-gamma por linfocitos de bazo:

Se prepararon suspensiones de células esplénicas (SC) de ratones. Las SC se empobrecieron de eritrocitos

mediante lisis hipotónica con agua destilada y se suspendieron de nuevo en medio completo RPMI-1640 que contenía FCS al 5%, L-glutamina 2 mM, penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 ng /ml) (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY).

5 Se cultivaron células esplénicas ( $0,4 \times 10^6$  células/pocillo) en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA) en 250  $\mu$ l de medio de cultivo (RPMI 1640, FCS al 10%, L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M, 100 U/ml de penicilina, 0,1  $\mu$ g/ml de estreptomina) en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37 °C. Las células se activaron con Concanavalina A (Con A) (10 ng/ml) en presencia o ausencia de la cantidad indicada del compuesto inmuoestimulante.

10 La IFN- $\gamma$  de ratón se midió en sobrenadantes de 24 h obtenidos a partir de cultivos de células esplénicas en presencia o ausencia de Con A. Se ensayaron mediante un miniKit de ELISA sándwich específico de ratón (Endogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como se muestra en la figura 24, la estimulación con Con A induce una gran cantidad de secreción de IFN-gamma por las células esplénicas de ambas cepas de ratón, lo que se sugiere de la estimulación de una respuesta Th1 caracterizada porque la producción de IFN gamma.

15 Ejemplo 10. Actuación del inmuoestimulante a través de los receptores TLR4 y TLR2:

20 Para hacer frente al receptor putativo usado por el inmuoestimulante de la invención, en los ensayos que se han mencionado anteriormente se usaron macrófagos peritoneales de ratón o células esplénicas de deficientes en el receptor TLR2 o TLR4.

25 Los macrófagos peritoneales se aislaron por lavado peritoneal de ratones de 12 semanas de edad C57Bl/6 o C57Bl/6 tlr4<sup>-/-</sup> o C57Bl/6 tlr2<sup>-/-</sup> (Sarna JR, Dyck RH, Whishaw IQ. 2000. The Dalila effect: C57BL6 mice barber whiskers by plucking. Behavioral Brain Research, 108(1): 39-45. PubMedID: 10680755), 4 días después de una sola inyección peritoneal de una solución al 10% de tioglicolato (1 ml; Difco Laboratories). Se dejó que las células ( $1,5 \times 10^6$ /pocillo) se adhirieran durante 1 h en placas de fondo plano de 12 pocillos y se cubrieron con RPMI recién preparado/FCS al 0,5% en presencia o ausencia de la cantidad indicada de LPS (serotipo 026.B6 *E. coli*, Sigma) o el inmuoestimulante de la invención. Los cultivos se incubaron a 37° C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 h, y los sobrenadantes se recolectaron. TNF e IL-12 se detectaron por ELISA sándwich de dos sitios. La falta de TLR4 en macrófagos disminuyó fuertemente la capacidad del inmuoestimulante de la invención para inducir TNF (figura 25) e IL-12 (figura 26), mientras que la deficiencia de TLR-2 sólo evita parcialmente la actividad.

30 Se prepararon suspensiones de células esplénicas (SC) de ratones. Las SC se empobrecieron de eritrocitos mediante lisis hipotónica con agua destilada y se suspendieron de nuevo en medio completo RPMI-1640 que contenía FCS al 5%, L-glutamina 2 mM, penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 ng /ml) (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY).

35 Se cultivaron células esplénicas ( $0,4 \times 10^6$  células/pocillo) en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA) en 250  $\mu$ l de medio de cultivo (RPMI 1640, FCS al 10%, L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M, 100 U/ml de penicilina, 0,1  $\mu$ g/ml de estreptomina) en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37 °C. Las células se activaron con Concanavalina A (10 ng/ml).

40 La IFN- $\gamma$  de ratón se midió en sobrenadantes de 24 h obtenidos a partir de cultivos de células esplénicas en presencia o ausencia de Con A más la composición estimulante de la invención. Se ensayaron mediante un miniKit de ELISA sándwich específico de ratón (Endogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como se muestra en la figura 27, la estimulación con Con A induce una gran cantidad de secreción de IFN-gamma, que disminuyó en gran medida en las células esplénicas de C57Bl/6 tlr2<sup>-/-</sup> y casi desapareció completamente cuando se usaron células C57Bl/6 tlr4<sup>-/-</sup>.

45 Por lo tanto, el inmuoestimulante de la invención actúa en su mayor parte a través del acoplamiento de receptores TLR4 y en parte a través de TLR2.

50 Ejemplo 11. Los linfocitos T se estimulan por LPS de *Ochrobactrum intermedium* LMG 3306 de manera dependiente de la dosis

55 Se estudiaron las capacidades inmuoestimuladoras de LPS haciendo un experimento específico.

60 Se infectaron ratones B6 C57 con  $2 \times 10^5$  UFP del virus de la linfocoriomeningitis (LCMV) y 7 días más tarde, en el pico de la respuesta de linfocitos T inducida por el virus, los ratones se sacrificaron, sus células esplénicas se aislaron y después se sometieron a estimulación ex vivo durante varias horas con estímulos diferentes.

- 5 Con el fin de estudiar la estimulación específica de péptidos, las células esplénicas se incubaron durante 6 horas en presencia de Brefeldina A (para evitar la secreción de IFN gamma) sólo con medio o con el péptido LCMV NP396, uno de los epítomos CTL restringidos del H2b dominante de LCMV (Denis Hudrisier, Joëlle Riond, y Jean Edouard Gairin, Molecular and Functional Dissection of the H-2D<sup>b</sup>-Restricted Subdominant Cytotoxic T-Cell Response to Lymphocytic Choriomeningitis Virus, J Virol. Marzo de 2001; 75(5): 2468–2471).
- 10 Con el fin de detectar todos los linfocitos T activados en el ratón en este momento (independientemente de la especificidad peptídica), las células esplénicas se incubaron sin o con forbol miristato acetato (PMA) más ionomicina a concentraciones óptimas.
- 15 Finalmente, y para estudiar la capacidad estimuladora de LPS de *O. intermedium*, el compuesto se añadió a diferentes concentraciones: a 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml y 100 µg/ml.
- 20 Como se muestra en la figura 28, a 0,1 y 1 µg/ml, la estimulación fue subóptima. El nivel máximo de estimulación se alcanzó a concentraciones por encima de 10 µg. A estas concentraciones, la mayor parte de los linfocitos T CD8 y CD4 activados marcaron positivo para la expresión de IFN $\gamma$ , al menos en comparación con el protocolo “óptimo” de la estimulación de linfocitos T.
- 25 Los LPS de *Brucella* spp. y *O. anthropi*, que contenían restos de lípidos A con características estructurales diferentes de las Enterobacteriaceae producen la señalización bioquímica a través de solo TLR-4 a altas concentraciones (10 µg/ml). Hay que tener en cuenta que mientras que PMA/ionomicina resultó tóxico tanto para linfocitos T CD8 como CD4, el LPS ni siquiera estaba a la concentración máxima usada. Un gran porcentaje de estas células entraron en apoptosis añadiendo PMA/ionomicina, dando como resultado números mucho menores de linfocitos T.
- 30 Los LPS de *O. intermedium* realizan muchas de las características de ser no sólo un buen adyuvante para usos más comunes, sino también para aumentar las respuestas inmunes inducidas por las vacunas de ADN.
1. Los resultados obtenidos en el laboratorio con dosis ópticas de LPS mejoran la respuesta inmune inducida por los plásmidos de ADN, al menos para aumentar las respuestas de los anticuerpos inducidas en ratones.
  2. El LPS es capaz también de activar linfocitos T específicos de virus tanto CD8 como CD4 cuando se añade *in vitro* de una manera dependiente de la dosis.
  3. Incluso cuando se añade a 100 µg/ml no es tóxico en absoluto, mientras que PMA/ion (usando habitualmente) induce la apoptosis de células esplénicas.
- 35 Se produce por bacterias no patogénicas por lo que son fáciles de transformar.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un lipopolisacárido de *Ochrobactrum intermedium* LMG3306 para su uso en el tratamiento y/o prevención de la sepsis.
2. Una composición que comprende un lipopolisacárido de *Ochrobactrum intermedium* LMG3306 y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento y/o prevención de la sepsis, septicemia y/o endotoxemia.
- 10 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada porque comprende 0,5-120 µg/ml de LPS de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG3306.
4. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 2-3, en la que el lipopolisacárido está en forma de una suspensión homogénea en la que la fase micelar es estable a 4 °C durante más de un periodo de 1 año.
- 15 5. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 2-4, en la que el pH de la composición está entre 2-12.
6. Una composición que comprende un lipopolisacárido de *Ochrobactrum intermedium* LMG3306 y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para su uso como adyuvante para vacunas en animales inmunodeprimidos.
- 20 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque comprende 0,5-120 µg/ml de LPS de la cepa *Ochrobactrum intermedium* LMG3306.
- 25 8. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en la que el lipopolisacárido está en forma de una suspensión homogénea en la que la fase micelar es estable a 4 °C durante más de un periodo de 1 año.
- 30 9. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en la que el pH de la composición está entre 2-12.
10. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en la que la vacuna es una vacuna para una enfermedad infecciosa.
- 35 11. Composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en la que la vacuna es una vacuna contra la leishmaniosis.
- 40 12. Una composición que comprende un lipopolisacárido de *Ochrobactrum intermedium* LMG3306 y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente, para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades infecciosas.

### Prevención del choque endotóxico por LPS

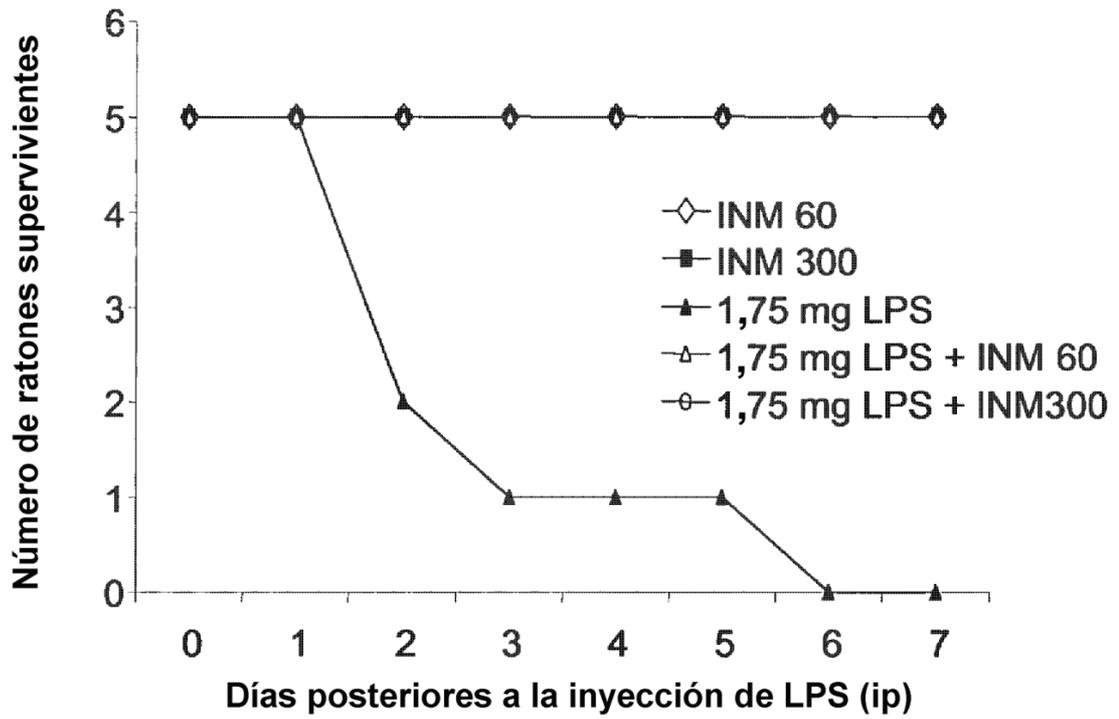
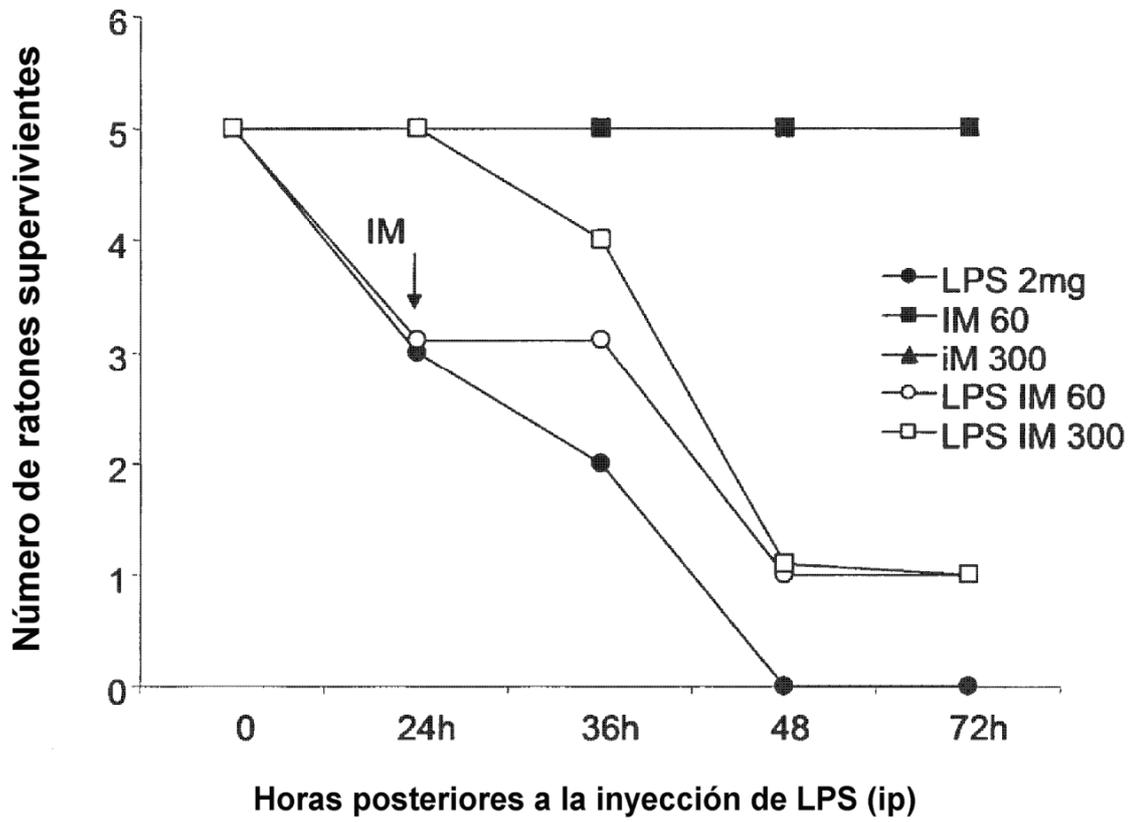


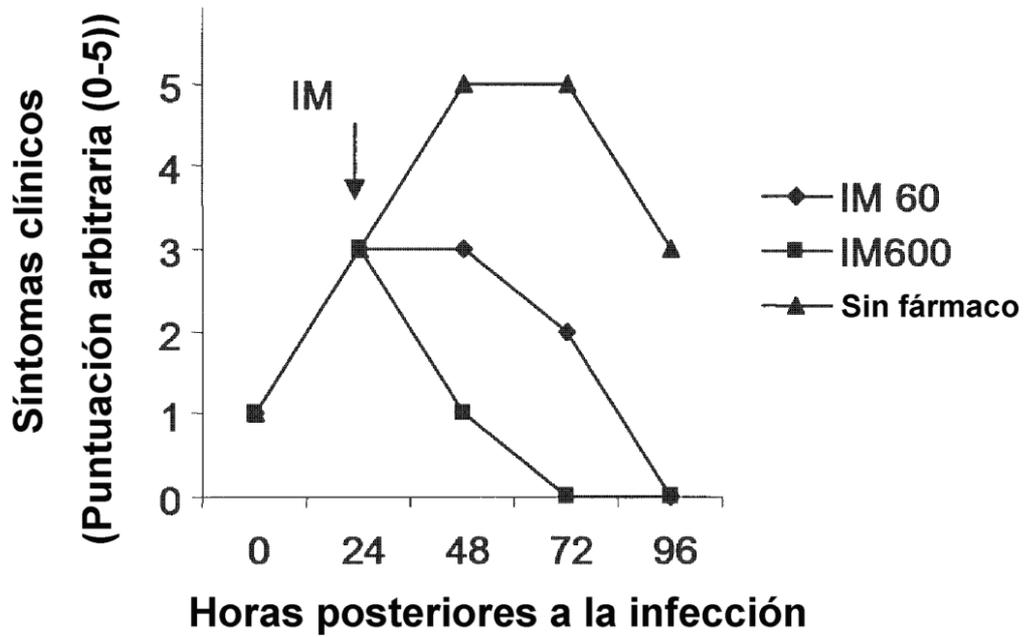
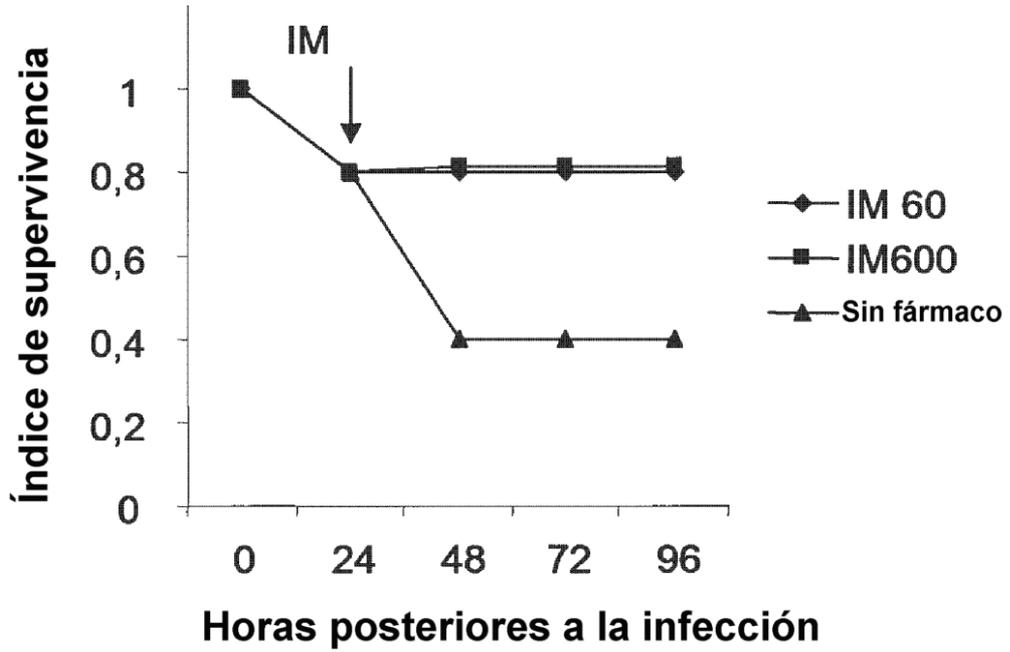
Figura 1

**Cura del choque endotóxico por LPS**



**Figura 2**

**Peritonitis E. coli 1E7 UFC**



**Figura 3**

### Peritonitis de E. coli 1E8 CFU

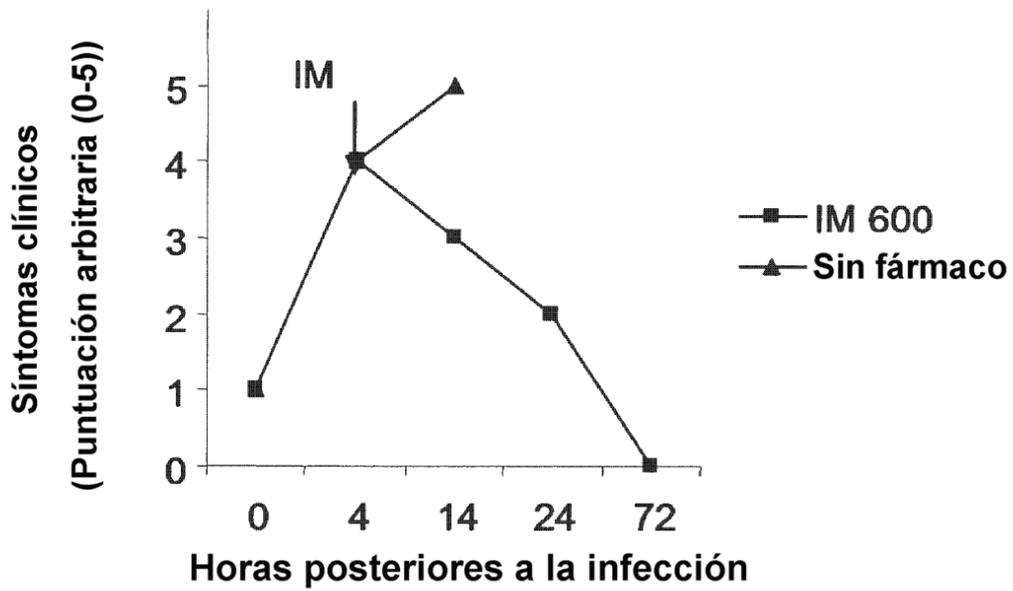
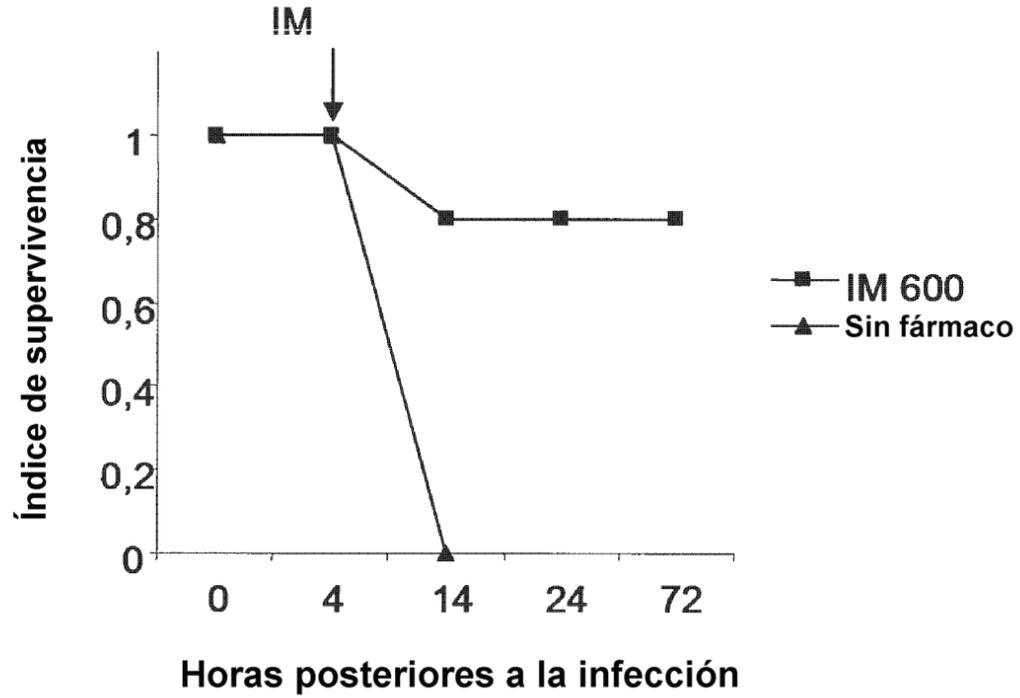
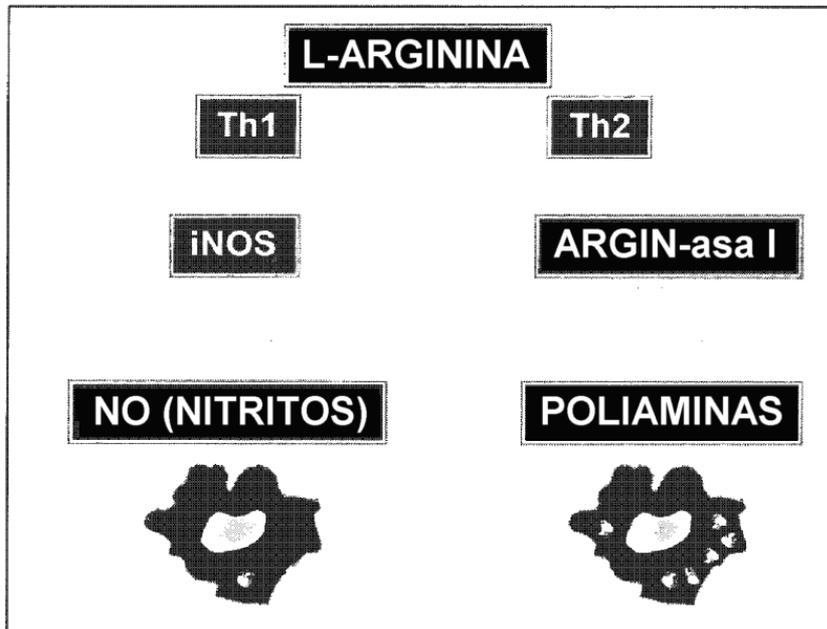
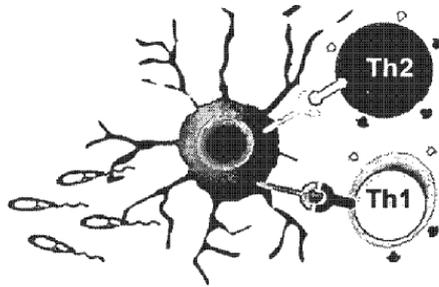
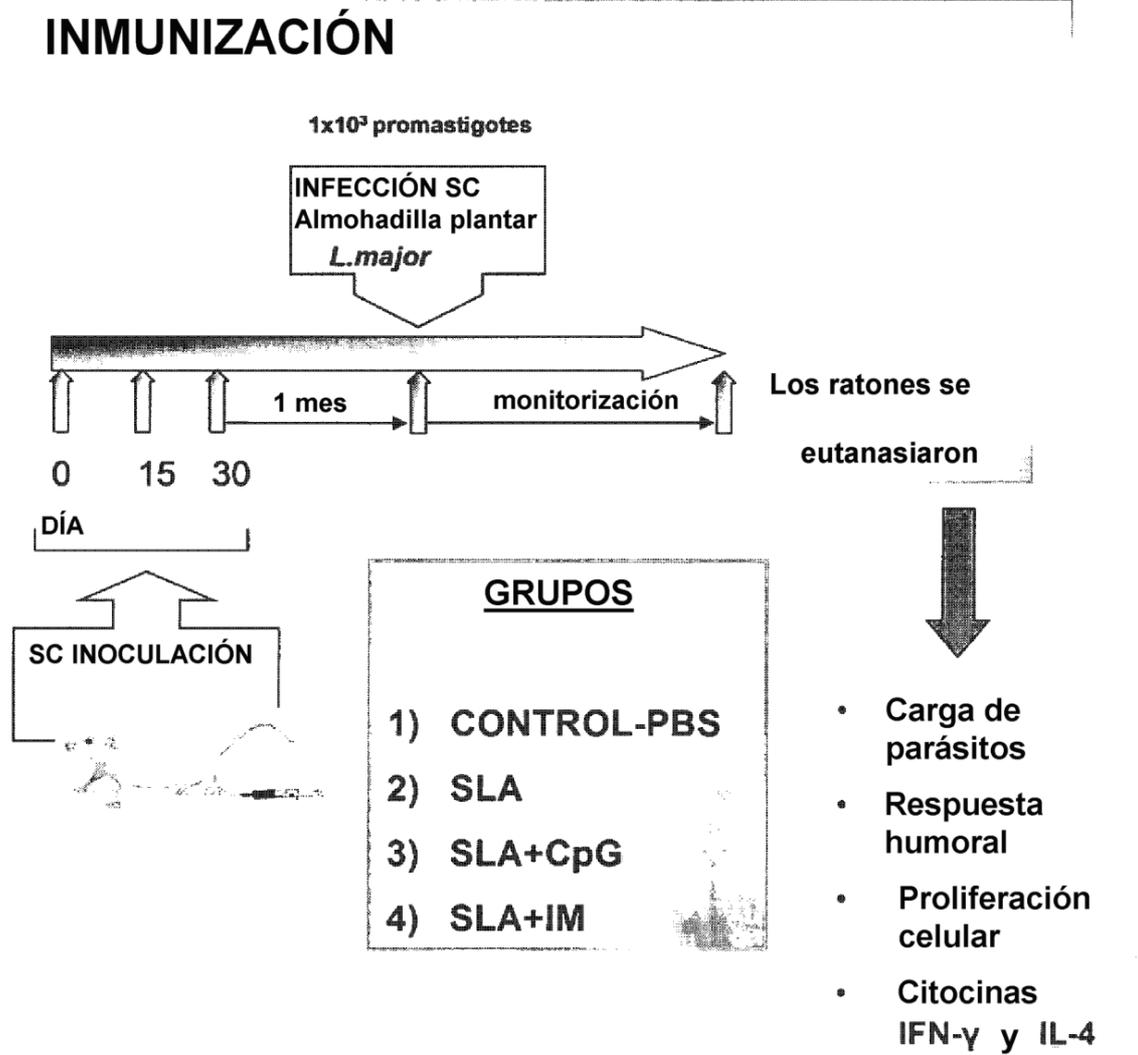


Figura 4

**LEISHMANIOSIS CUTÁNEA MURINA**  
La inmunidad protectora depende de la inducción de  
citocinas Th1 productoras de linfocitos T



**Figura 5**



**Figura 6**

7/28

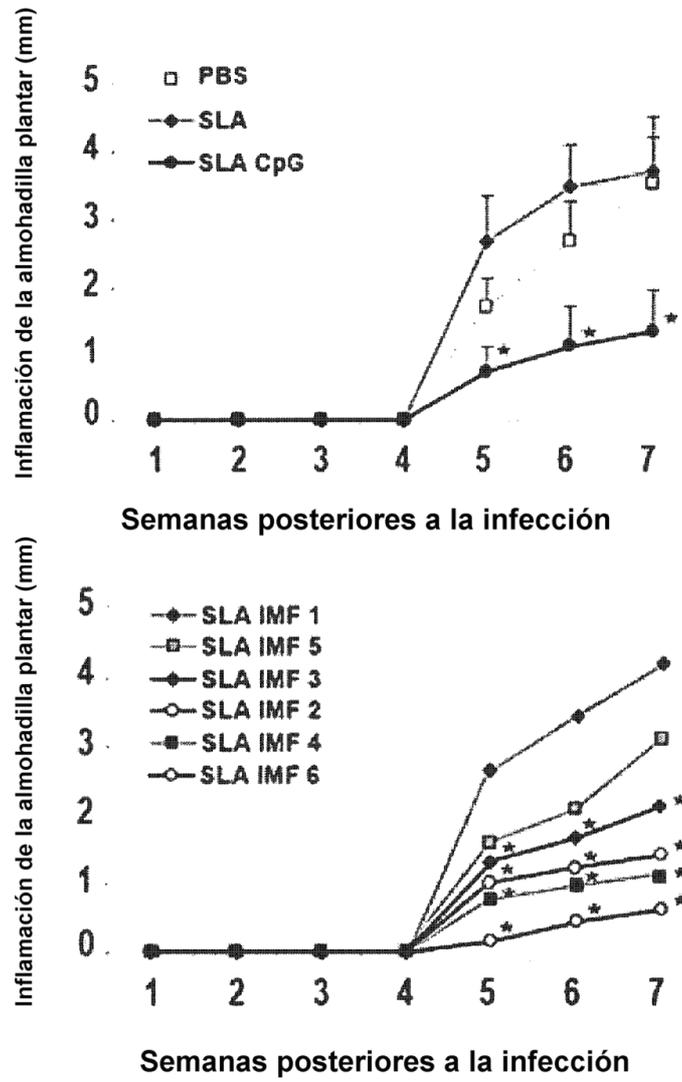


Figura 7

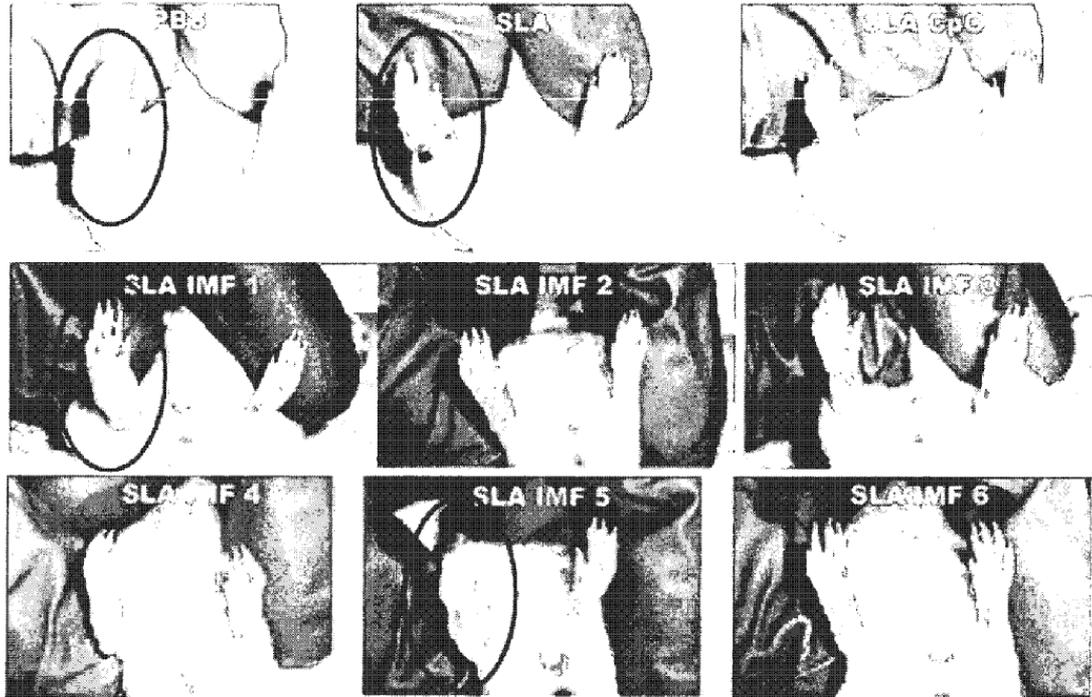


Figura 8

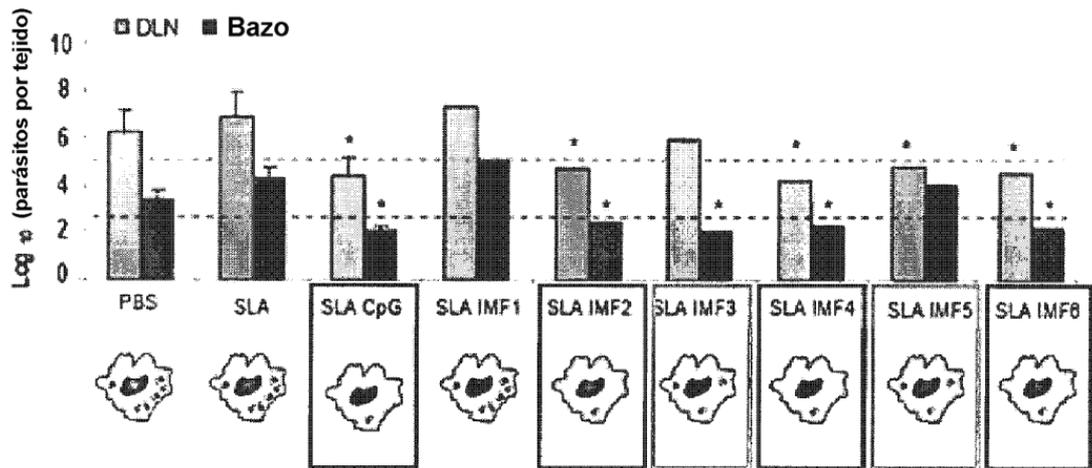


Figura 9

9/28

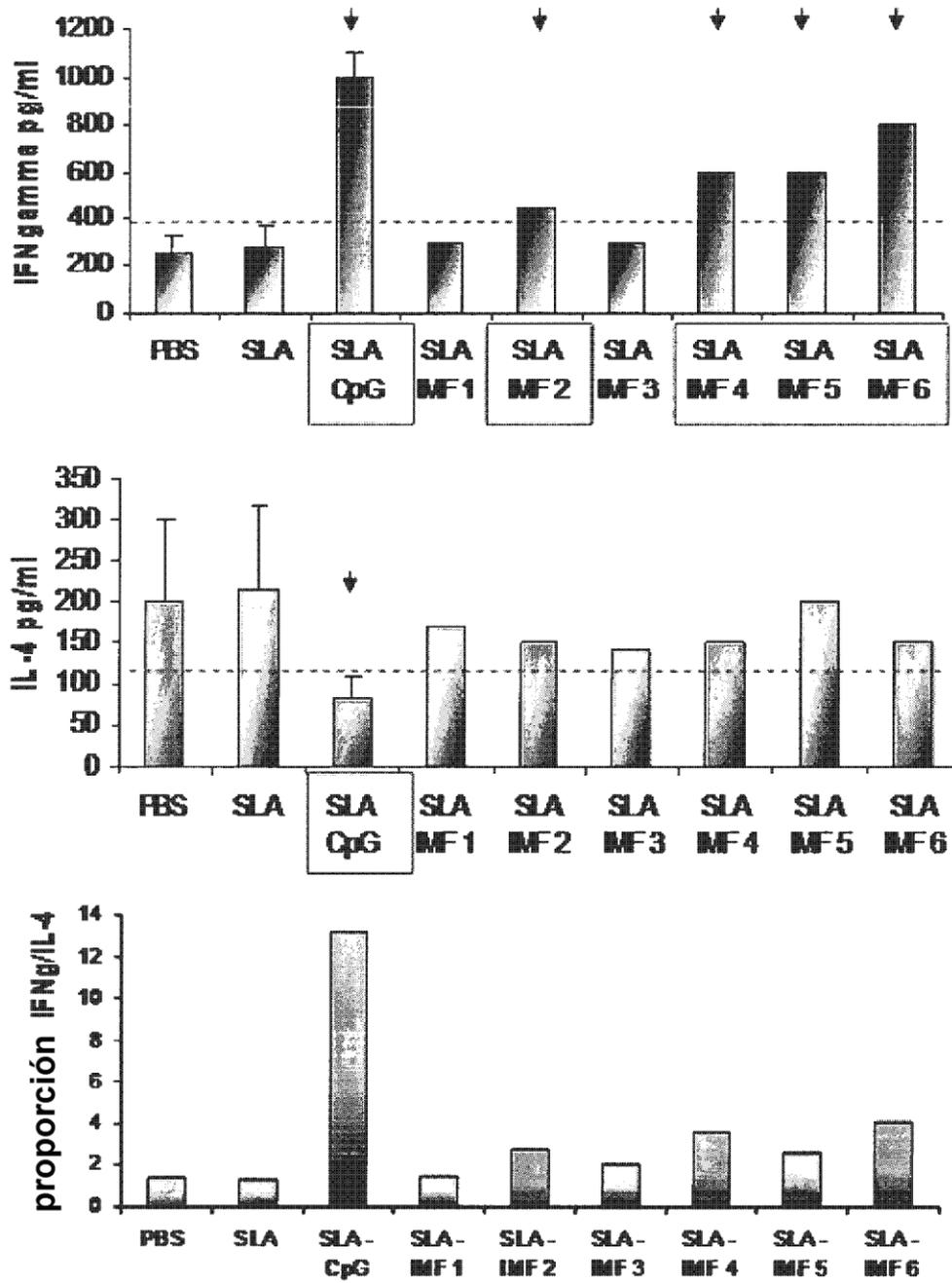


Figura 10

10/28

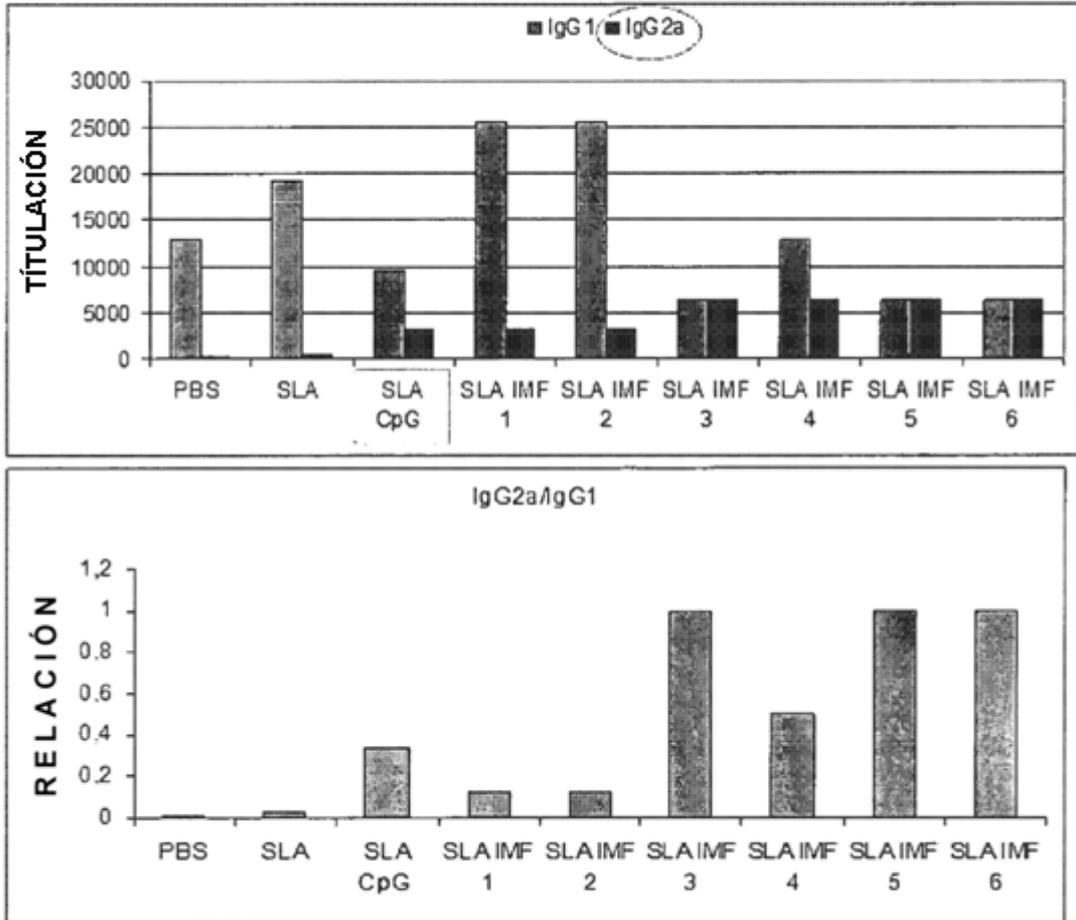


Figura 11

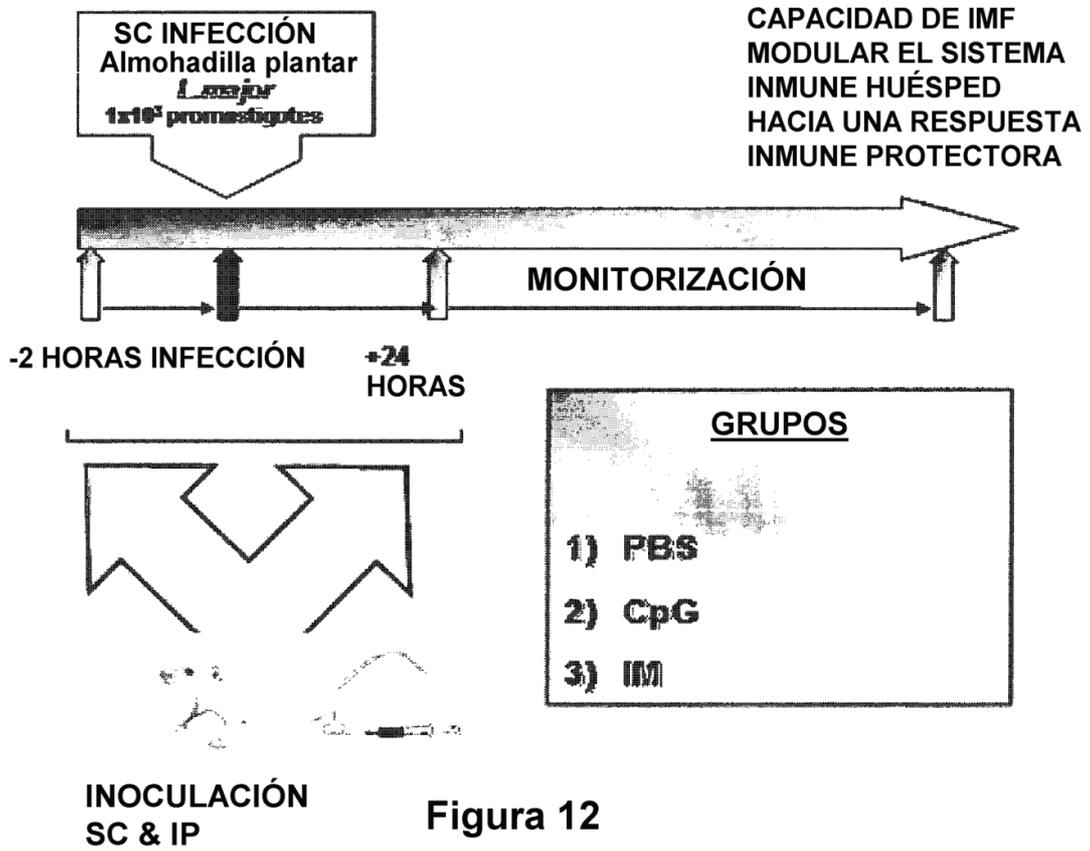
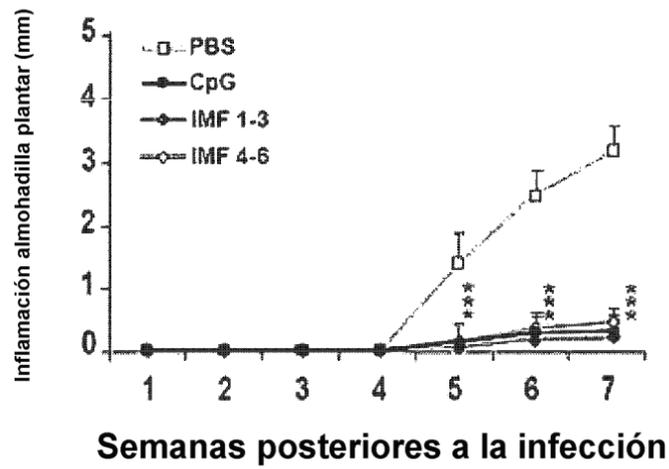


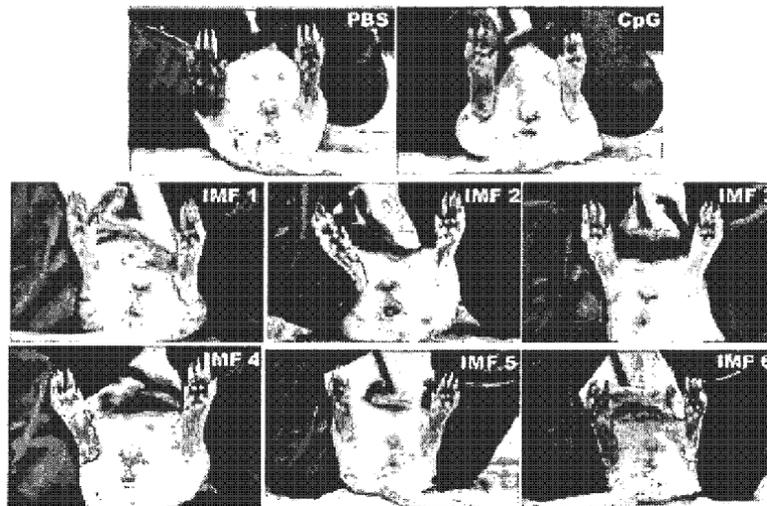
Figura 12

12/28

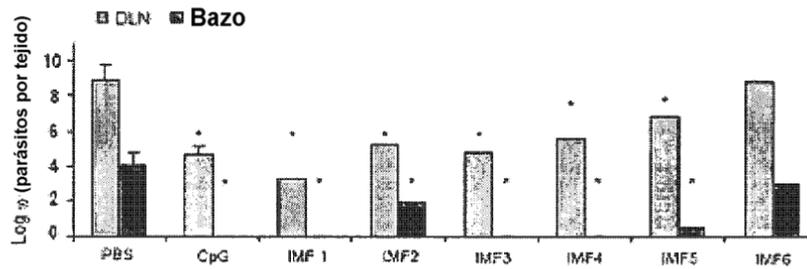
**A**



**B**



**C**



**Figura 13**

TITULACIÓN HUMORAL ANTI-LEISHMANIA			PROPORCIÓN
	IgG1	IgG2a	IgG2a/IgG1
PBS	38400	3600	0,1 ± 0,1
CpG	1333	4667	6,2 ± 4,0
IMF 1	200	100	0,5
IMF 2	300	150	0,5
IMF 3	300	1600	5,3
IMF 4	1600	1600	1,0
IMF 5	800	300	0,4
IMF 6	51200	1600	0,0

Figura 14

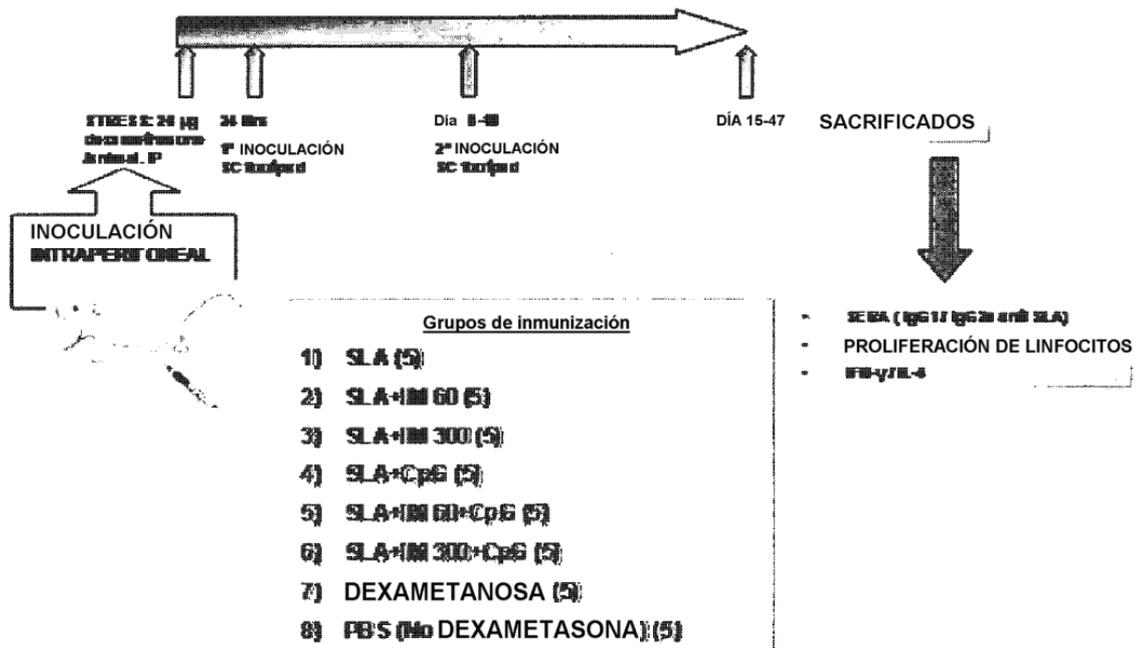
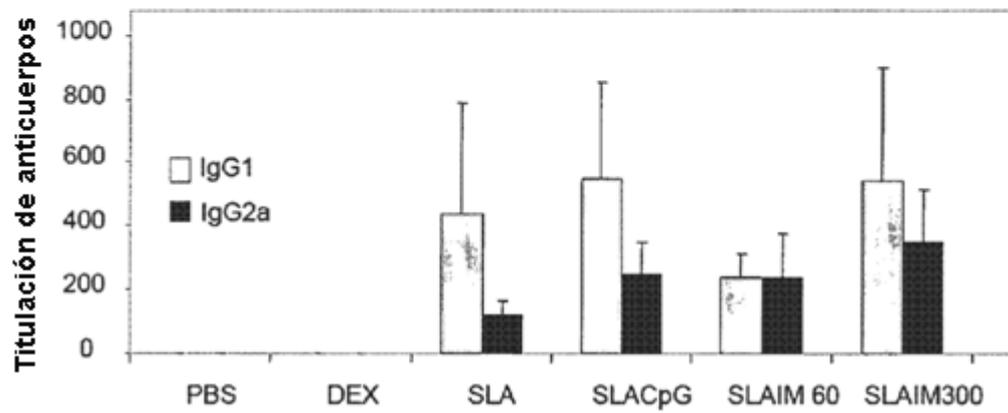
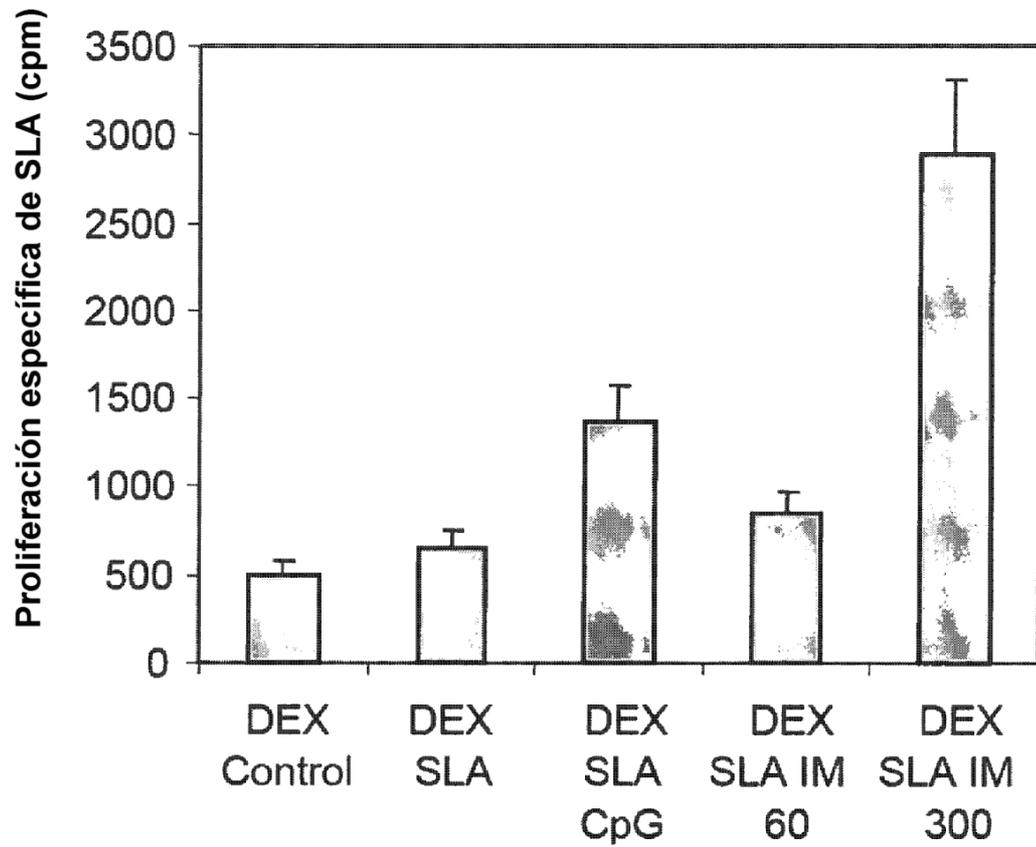


Figura 15

**FIGURA 16**

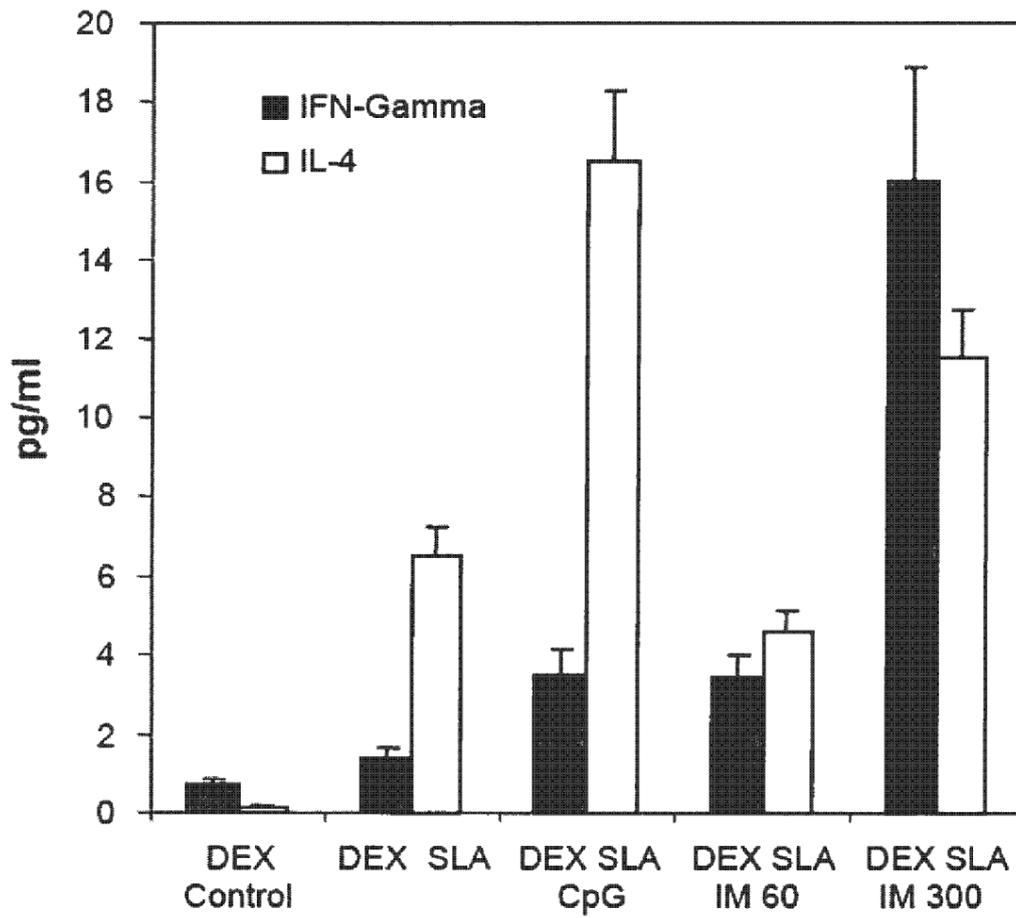
**RESPUESTA HUMORAL**  
**IgG1 e IgG2a ANTI-SLA.**  
**Agrupación sérica/5 animales por grupo**



**FIGURA 17****Proliferación de células esplénicas específicas de SLA**

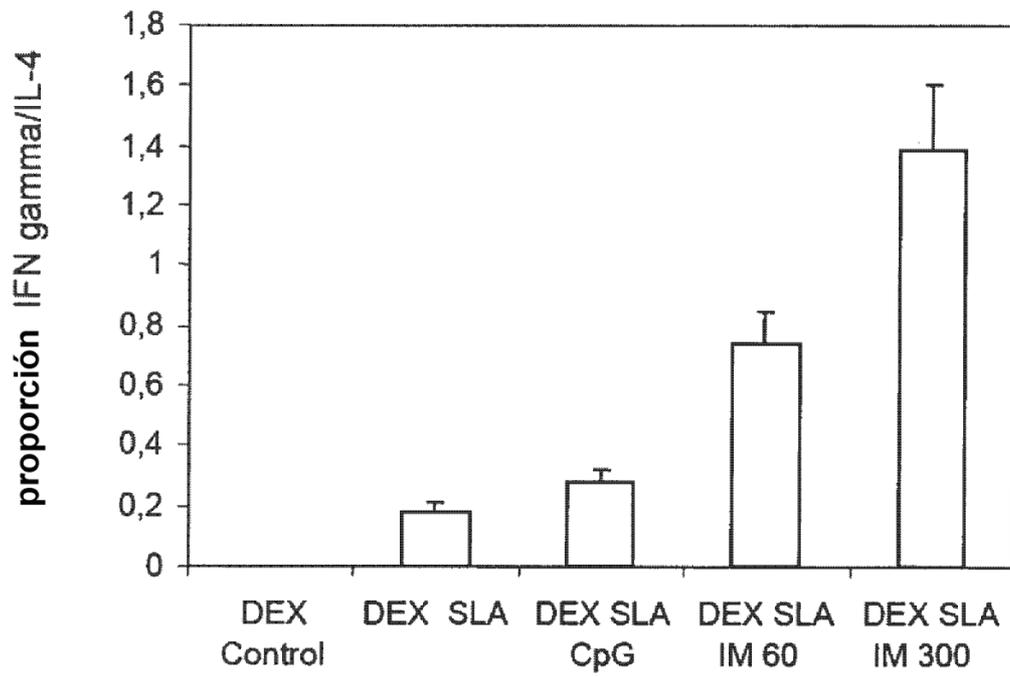
**FIGURA 18**

**Producción de citocina específica de SLA por células esplénicas**

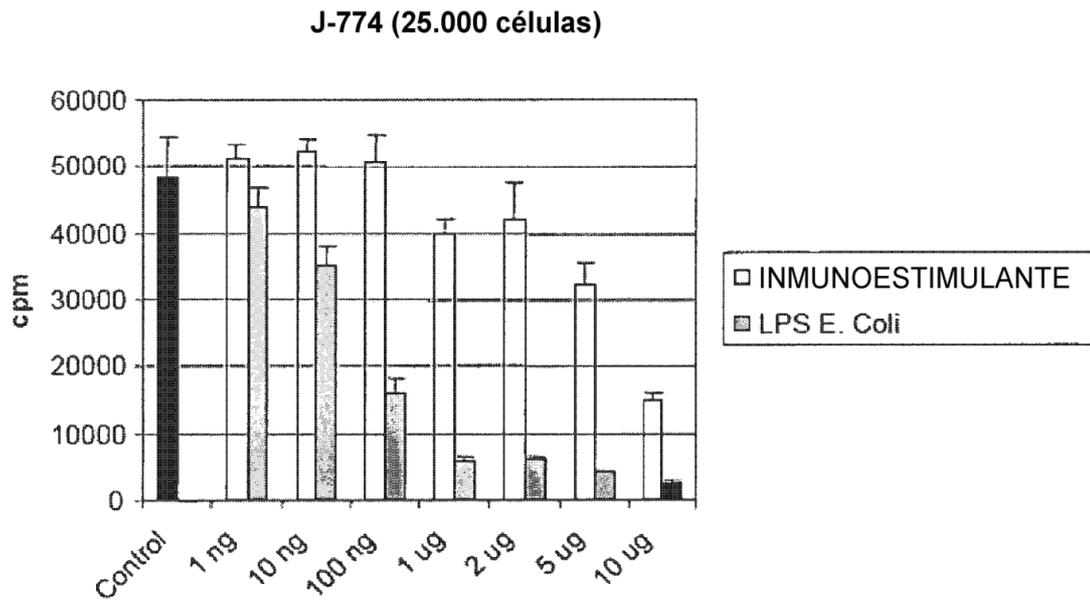


**FIGURA 19**

relación citocina Th1/Th2 de células esplénicas estimuladas por SLA

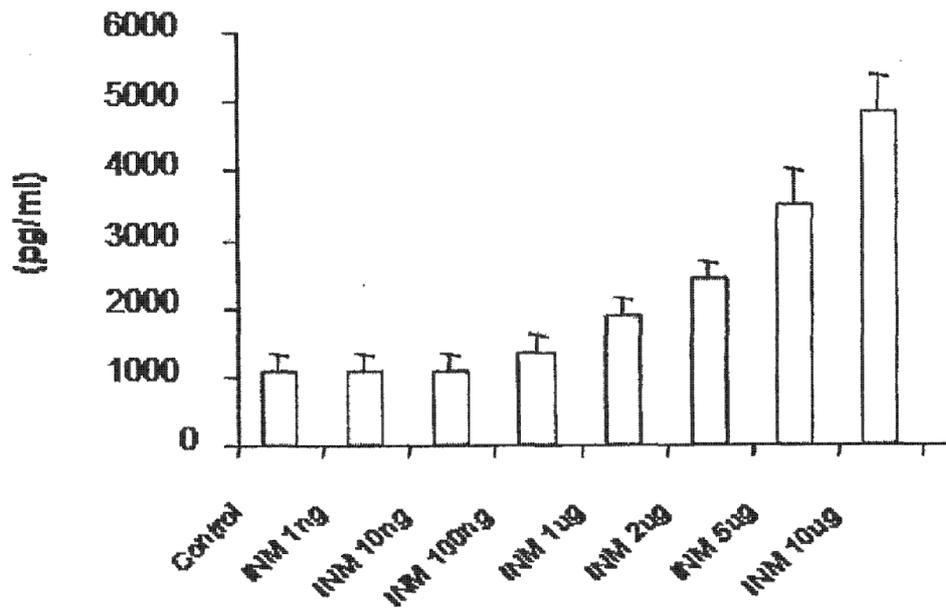


# FIGURA 20



19/28

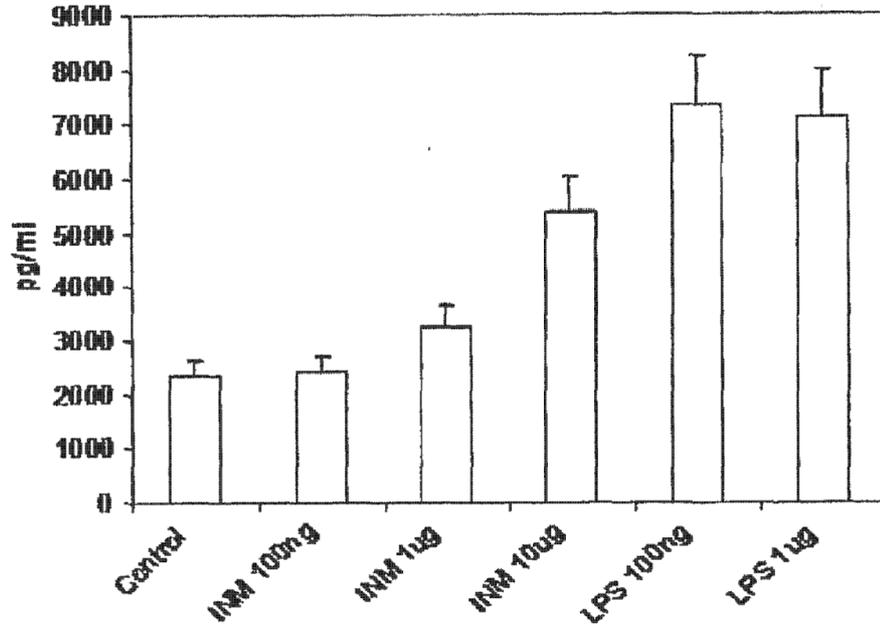
**TNF $\alpha$  J-774**



**FIG. 21A**

20/28

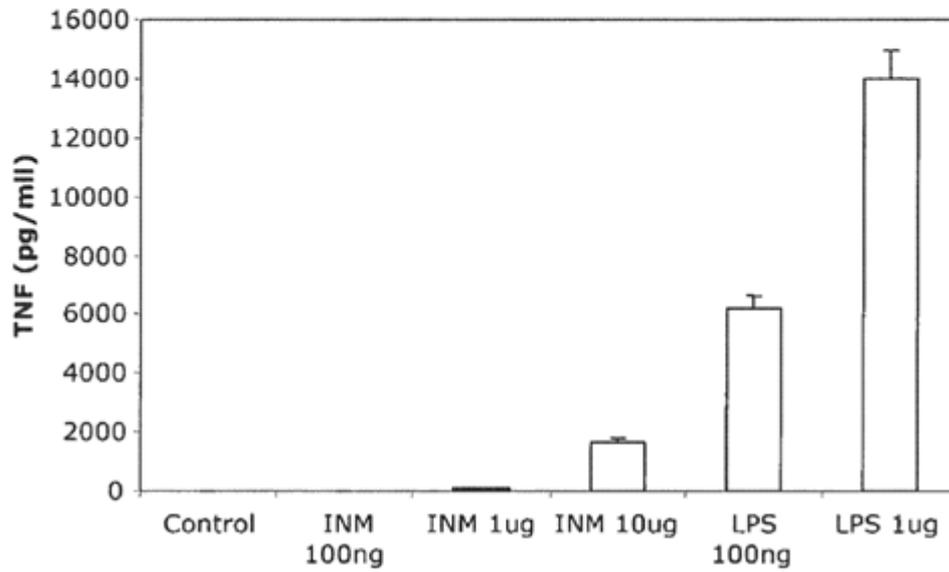
**TNF $\alpha$  J-774**



**FIG. 21B**

Figura 22

**Macrófagos de Balb/c de producción de TNF**



**Macrófagos de C57Bl/6 de producción de TNF**

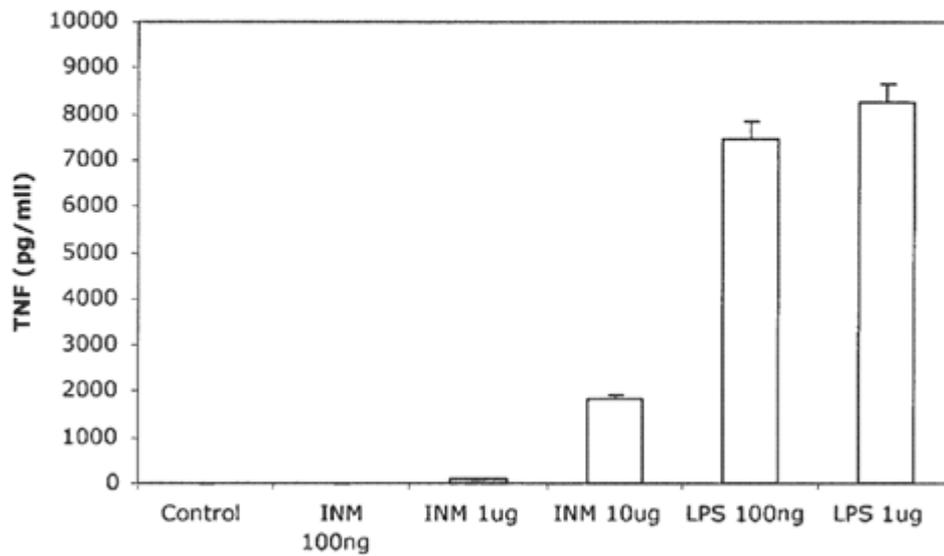


Figura 23

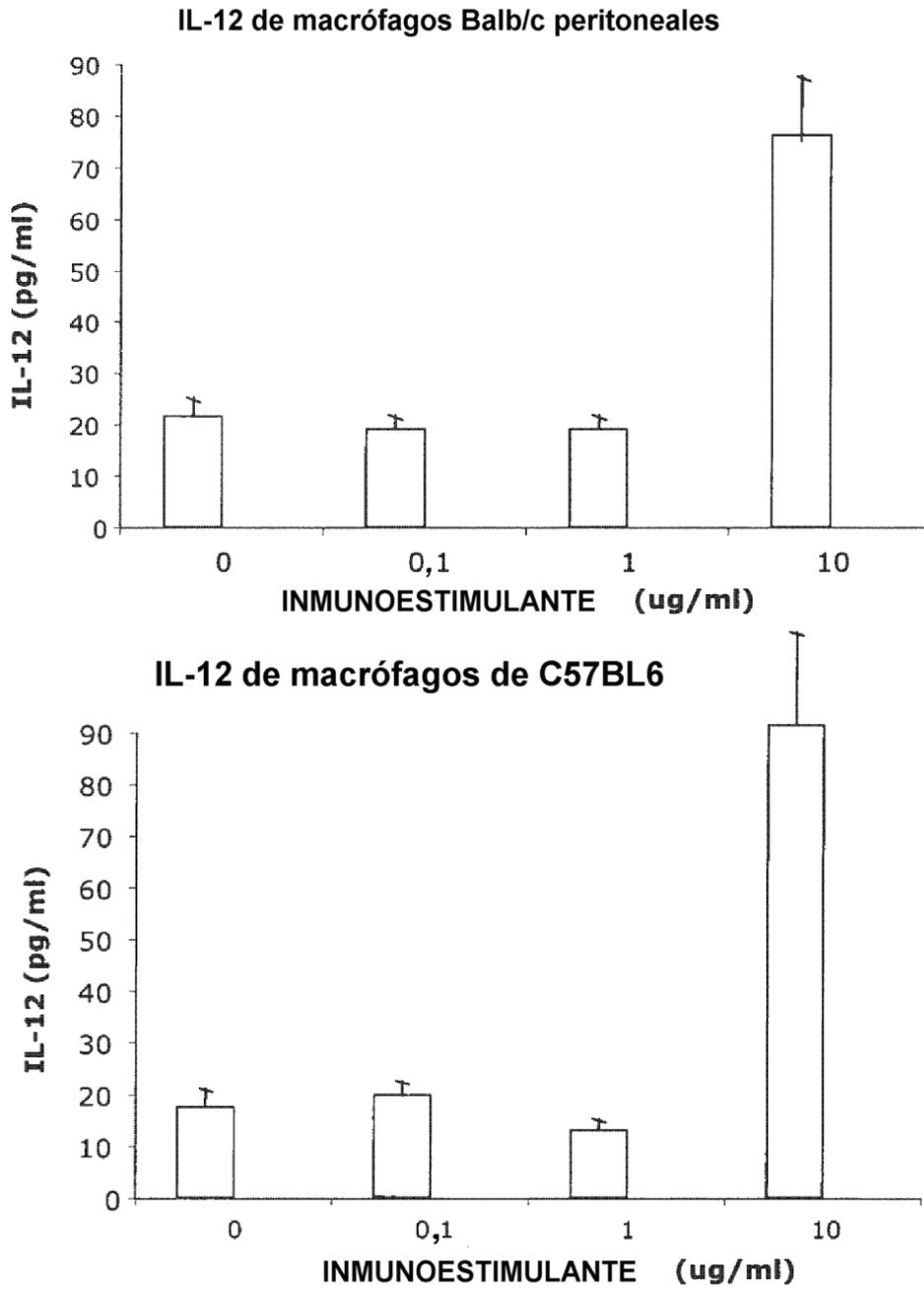
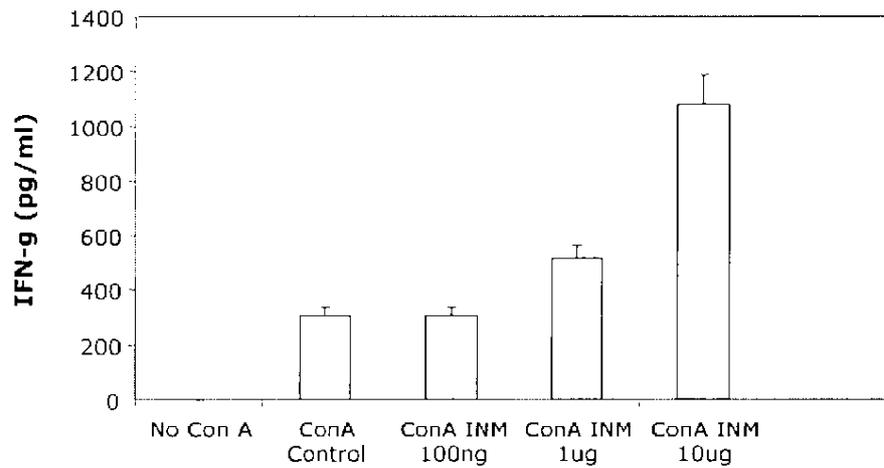


Figura 24

**IFN-gamma por células esplénicas Balb/c estimuladas con ConA**



**IFN-gamma por células esplénicas C57BL/6 estimuladas con ConA**

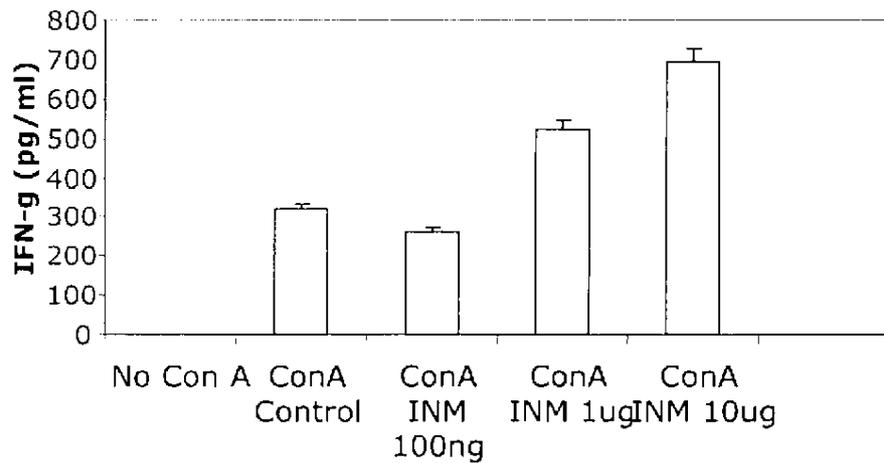


Figura 25

**Macrófagos peritoneales de TNF**

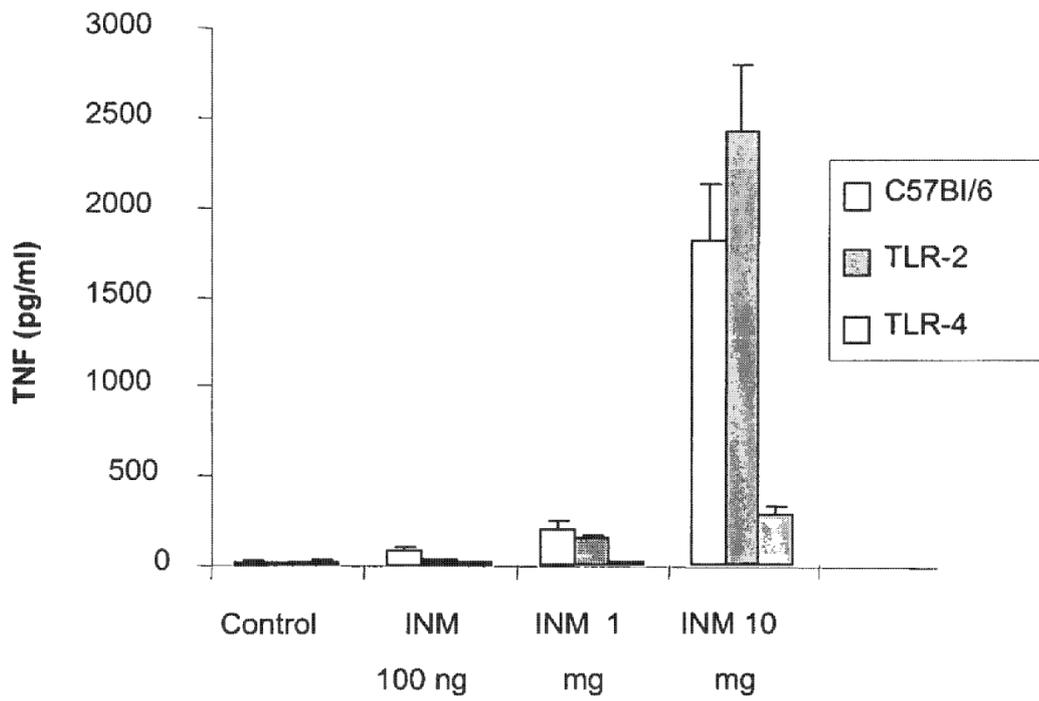


Figura 26

IL-12 por macrófagos peritoneales

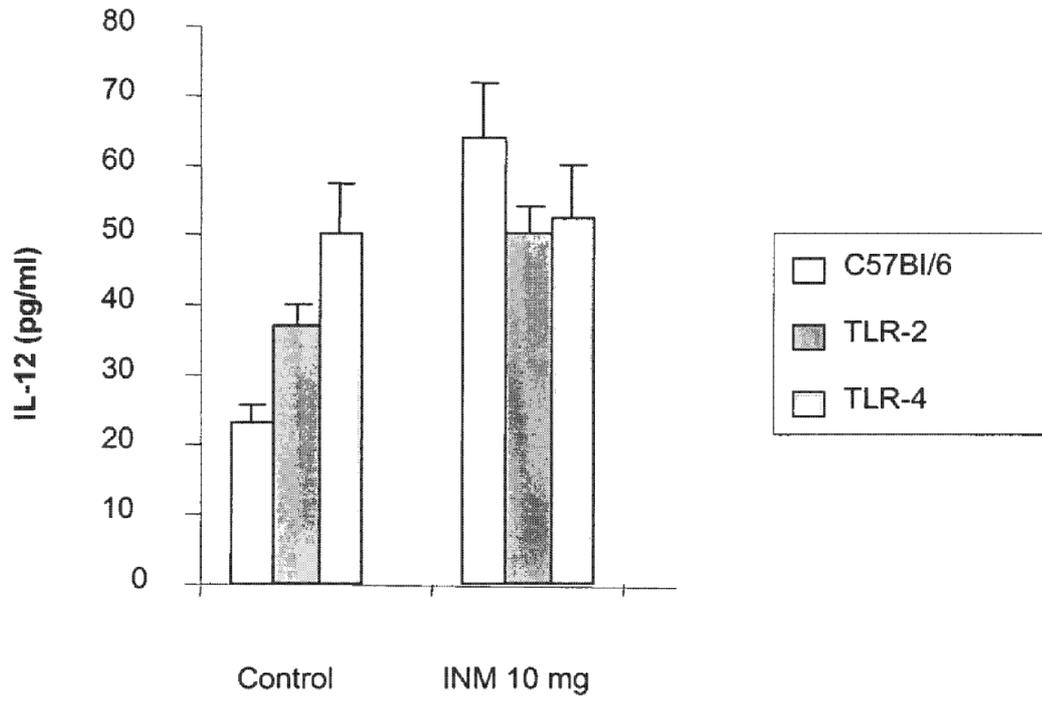
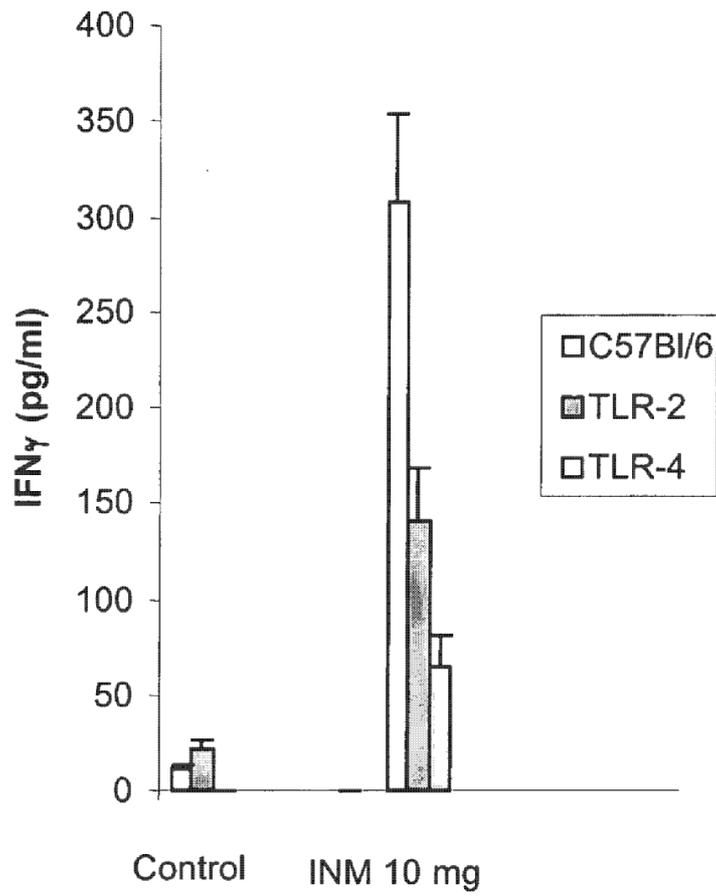


Figura 27

**Secreción de IFN gamma por células esplénicas**

27/28

Figura 28A

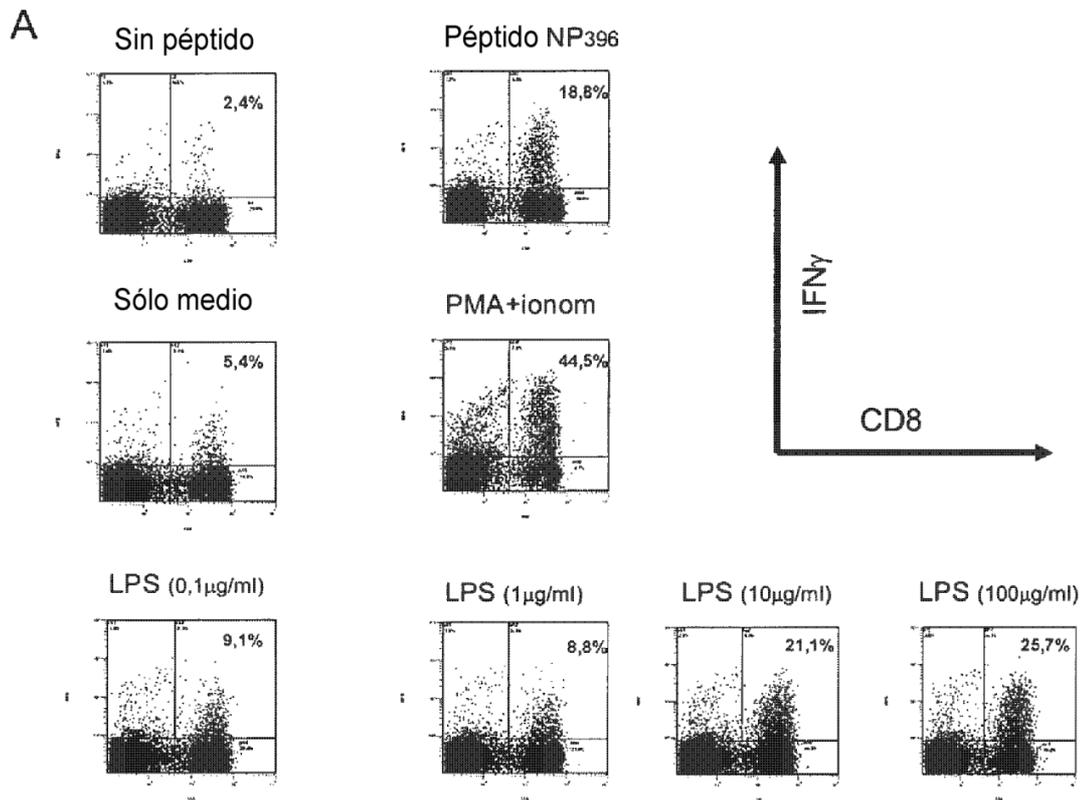


Figura 28B

