

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 585**

51 Int. Cl.:

A61K 39/29	(2006.01)	A61K 39/102	(2006.01)
A61K 39/145	(2006.01)	A61K 39/245	(2006.01)
A61K 39/12	(2006.01)	A61K 39/21	(2006.01)
A61P 1/16	(2006.01)		
A61K 39/00	(2006.01)		
A61K 39/04	(2006.01)		
A61K 39/07	(2006.01)		
A61K 39/25	(2006.01)		
A61K 39/39	(2006.01)		
A61K 39/095	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2011 PCT/KR2011/009759**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012 WO12081947**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2011 E 11849214 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2664345**

54 Título: **Vacuna para inducir una reacción inmune mejorada**

30 Prioridad:

18.12.2010 KR 20100130357

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

10.10.2018

73 Titular/es:

**EYEGENE, INC. (100.0%)
414 Ho DMC High-Tech Business Center 1580
Sangam-dong
Mapo-gu, Seoul 121-912, KR**

72 Inventor/es:

**CHO, YANG JE;
LEE, NA GYONG;
JANG, JIN WOOK;
KIM, KWANG SUNG y
YOO, WON IL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 685 585 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

Vacuna para inducir una reacción inmune mejorada

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición de vacuna farmacéutica para uso en la vacunación contra un virus de la influenza, que comprende: (a) antígeno del virus de la influenza; (b) un lipooligosacárido (LOS); (c) un inmunoadyuvante que es: Alum; y (d) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

Descripción de la técnica relacionada

Recientemente, los inmunoadyuvantes se han enfocado y utilizado nuevamente en diversas vacunas, como las vacunas contra el cáncer de cuello uterino y las vacunas contra la influenza. De ellos, el ADN bacteriano recibió atención como un agente contra el cáncer desde la década de 1960, y se ha investigado sucesivamente hasta ahora. Sin embargo, el ADN bacteriano no se ha usado como un agente anticancerígeno debido a su baja eficacia (Glick, J. L. The specificity of inhibition of tumor cell viability by DNA. *Cancer Res.*27:2338,1967). A pesar de este defecto, se demostró que se sabe que el ADN bacteriano activa diversas células inmunes sin efectos secundarios graves, y tiene muchas ventajas como adyuvante (McCluskie MJ, et al. CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. *J Immunol.*Nov1;161(9):4463-6.1998).

Para estos efectos del ADN bacteriano, Yamamoto et al. en el argumento de Japón de que las secuencias palindrómicas que contienen CG desempeñan un papel crucial en los efectos del ADN bacteriano, que son demostradas por Krieg et al. (Yamamoto S. et al. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment IFN-mediated natural killer activity. *J. Immunol.*148:4072,1992; Krieg AM, Antitumor applications of stimulating toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides. *Curr. Oncol. Rep. Mar; 6(2):88-95.2004*). Con base en estudios relacionados con CpG de mediados de la década de 1990, la preocupación por el agente anticancerígeno de ADN llevó a deducir una probabilidad de ADN sintético (CpG-ODN) que contiene CG no metilado como agente anticancerígeno, por ejemplo, un estudio para la sustitución de S en enlaces diéster para inhibir la degradación corta del ADN sintético. A este respecto, los productos relacionados con CpG-ODN se utilizaron en un ensayo clínico como agente anticancerígeno y como adyuvante (<http://www.coleypharma.com>).

Sin embargo, quedan por resolver algunos problemas que incluyen la inmunogenicidad y la actividad anticancerígena aún baja de la sustitución de S en enlaces diéster de CpG-ODN. En la clínica actual, CpG 7909 es un oligonucleótido de fosfotioato que induce Ab anti-ADN (*Clin Immunol.* 2001 Aug; 100(2): 157-63), y está estrechamente asociado con trastornos autoinmunes tales como SLE (lupus eritematoso sistémico) (*J Clin Immunol.* 1986 July; 6(4): 292-8). Además, se sabe que la estructura del fosfotioato funciona como TI Ag, lo que contribuye a la alteración de la protección inmunitaria contra las infecciones (*Mol Immunol.* 1998 diciembre; 35(18): 1161-70).

En los LPS que se sabe que tienen efecto contra el cáncer desde 1950, la utilización de LPS fue difícil porque los LPS en un intervalo de ng resultan en la muerte por sepsis. Es opinión general que el enlace entre LPS y ADN causa una citotoxicidad grave, y por lo tanto la eliminación de LPS se entiende como un proceso muy importante en medicamentos relacionados con ADN (Gao JJ. et. al, Bacterial DNA and lipopolysaccharide induce synergistic production of TNF-alpha through a post-transcriptional mechanism. *J Immunol* 166(11):6855-60, 2001). Con respecto a las eficacias, se debe considerar que las respuestas inmunes estimuladas por LPS son mucho más fuertes que las del ADN, mientras que las respuestas tipo Th2, no del tipo Th1, que es importante como anticancerígeno, suponiendo que el LPS no es adecuado como un agente anticancerígeno (Lebman DA et al Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. *J Exp Med* Sep 1;168(3):853-62. 1988). Dado que la actividad inmunitaria de tipo Th2 inhibe la actividad inmunitaria de tipo Th1, fue muy difícil utilizar LPS como un agente anticancerígeno debido a la actividad inmunitaria de tipo Th2 estimulada por LPS (Rengarajan J et al. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today.* Oct;21(10):479-83. 2000).

Park et al. (*Immune Responses of Mice to Influenza Subunit Vaccine in Combination with CIA07 as an Adjuvant, Microbiol. Immunol.* 51(11), 1099-1107, 2007) divulga una composición de vacuna farmacéutica que comprende un antígeno del virus de la influenza; un LOS modificado, así como un transportador farmacéuticamente aceptable. Park et al. no contiene ninguna descripción de alum añadido a la composición de vacuna farmacéutica de acuerdo con la presente invención. Se han estudiado diversos intentos de desintoxicación de LPS, que conducen a reducir con éxito su citotoxicidad mediante la eliminación de la cadena de polisacáridos o la desacilación del lípido A (Katz SS et al Deacylation of lipopolysaccharide in whole *Escherichia coli* during destruction by cellular and extracellular components of a rabbit peritoneal inflammatory exudate. *J Biol Chem.* Dec 17;274(51):36579-84 1999). Por ejemplo, el monofosforil lípido A (MPL) se obtiene por fosforilación del lípido A en el que se elimina la cadena de polisacáridos de LPS para desarrollar un agente inmunoterapéutico anticancerígeno. Sin embargo, se sabe que su eficacia es bastante baja (<http://www.corixa.com>).

65

Por otro lado, los presentes solicitantes ya han desarrollado un nuevo inmunoadyuvante para complementar los inconvenientes de los inmunoadyuvantes antes mencionados (patente coreana No. 0740237 (2007.07.10)).

5 Descripción detallada de esta invención

Propósitos técnicos de esta invención

10 Los presentes inventores han realizado estudios intensivos para desarrollar una nueva composición de vacuna que puede superar los problemas de las vacunas convencionales y aumentar la eficacia de las vacunas. Como resultado, han descubierto que un LOS (lipooligosacárido) no tóxico se puede usar como un inmunoadyuvante en inmunización utilizando antígenos de diversos patógenos, por lo que las respuestas inmunes son mucho más notables que las producidas por vacunas convencionales, lo que permite funcionar como una excelente vacuna para prevenir diversas enfermedades.

15 Otros objetos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada a seguir tomada en conjunción con las reivindicaciones y dibujos adjuntos.

Soluciones técnicas de esta invención

20 En un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición de vacuna farmacéutica para uso en vacunación contra el virus de la influenza que comprende:

(a) antígeno del virus de la influenza;

25 (b) un lipooligosacárido (LOS), donde LOS se define como un LPS modificado (lipopolisacárido) de bajo peso molecular que tiene glicocadenas más cortas que los LPS naturales y que tienen un peso molecular en un intervalo de 5,000-10,000 Da antes de la desacilación, donde los LOS se derivan de Escherichia coli que tiene un peso molecular en el intervalo de 2,000-4,000 Da después de la desacilación, que se desacila mediante la eliminación de LOS de un ácido graso unido a la glucosamina del lípido A a través de un enlace -C(O)O- que da como resultado una reducción significativa de citotoxicidad en comparación con LOS; y

(c) un inmunoadyuvante que es hidróxido de aluminio;

(d) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Los presentes inventores han realizado estudios intensivos para desarrollar una nueva composición de vacuna que puede superar los problemas de las vacunas convencionales y aumentar la eficacia de las vacunas. Como resultado, han descubierto que un LOS (lipooligosacárido) no tóxico e hidróxido de aluminio pueden usarse como inmunoadyuvantes en la inmunización utilizando antígeno del virus de la influenza, por lo que las respuestas inmunes son mucho más notables que las de las vacunas convencionales, lo que permite funcionar como una excelente vacuna para prevenir la influenza.

40 La presente invención es útil en vacunas contra influenza que causa influenza. El antígeno de la influenza usado en la presente invención incluye diversos antígenos derivados de la influenza conocidos convencionalmente. Preferiblemente, un antígeno de influenza adecuado para la presente invención es glicoproteína de envoltura HA o NA, y más preferiblemente glicoproteína de envoltura HA.

45 Es la mayor característica de la presente composición farmacéutica utilizar un LOS desacilado (lipooligosacárido) no tóxico como inmunoadyuvante. El término "LOS (lipooligosacárido)", adaptado en primer lugar en este documento, se refiere a un LPS (lipopolisacárido) modificado con bajo peso molecular que tiene glicocadenas más cortas que el LPS natural. LOS tiene un peso molecular en un intervalo de 5,000-10,000 Da antes de la desacilación. El término "LOS desacilado" utilizado aquí significa una forma de LOS que un ácido graso unido a glucosamina de lípido A a través de un enlace -C(O)O- se elimina de LOS, lo que resulta en una reducción significativa de citotoxicidad en comparación con LOS. Los ácidos grasos están ligados a glucosamina del lípido A a través de -C(O)O- y el enlace -C(O)NH-. El LOS desacilado de la presente invención es un LOS del cual el ácido graso enlazado por el enlace -C(O)O- es eliminado por la desacilación del lípido A.

50 Los LOS no tóxicos desacilados de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con diversos métodos, por ejemplo, métodos divulgados en patentes anteriores de los presentes inventores, que incluyen la Patente coreana No. 0456681; WO 2004/039413; la patente coreana No. 0740237; y WO 2006/121232. Por ejemplo, una porción de ácido graso en LOS se elimina y se desintoxica del lípido A a través de la desacilación a través de un tratamiento de base fuerte (por ejemplo, NaOH 2 N) a LPS (lipopolisacárido).

65 De acuerdo con una realización preferible, el LOS desacilado usado como un inmunoadyuvante en la presente invención se desintoxica por desacilación del lípido A por tratamiento alcalino de LPS (lipopolisacárido). El ejemplo preferido del tratamiento alcalino incluye NaOH, KOH, Ba(OH)₂, CsOH, Sr(OH)₂, Ca(OH)₂, LiOH, RbOH y Mg(OH)₂,

más preferiblemente NaOH, KOH, Ba(OH)₂, Ca(OH)₂, LiOH y Mg(OH)₂, mucho más preferiblemente NaOH, KOH y Mg(OH)₂, y más preferiblemente NaOH.

5 El grado de desintoxicación de LPS se puede analizar según diversos métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la desintoxicación se puede determinar midiendo una cantidad de TNF- α (factor de necrosis tumoral- α) secretada en THP-1 (leucemia monocítica aguda) tratada con LPS. El LOS no tóxico desacilado de la presente invención induce una cantidad relativamente pequeña de secreción de TNF- α en comparación con el LPS convencional.

10 Otra característica es que los LOS no tóxicos desacilados de la presente invención tienen un peso molecular menor que los LPS convencionales que se usan en general. Preferiblemente, los LOS desacilados no tóxicos usados en la presente invención tienen un peso molecular en un intervalo de 1,500-10,000 Da, más preferiblemente 2,000-5,000 Da, mucho más preferiblemente 2,000-4,000 Da, aún mucho más preferiblemente 3,000-4,000 Da, y lo más preferiblemente 3,200-3,700 Da. La medición del peso molecular se puede llevar a cabo usando un método
15 convencional, por ejemplo, MALDIMASS.

De acuerdo con una realización preferible, los LOS no tóxicos desacilados de esta invención se derivan de Escherichia coli (E. coli), y más preferiblemente E. coli EG0021 (KCCM 10374) aislada por los presentes inventores.

20 El LOS no tóxico desacilado usado en la presente invención es muy adecuado para la composición de vacuna de esta invención debido a su excelente efecto inmunoestimulador y citotoxicidad significativamente baja en comparación con los inmunoadyuvantes convencionales. Como se demuestra en los ejemplos a continuación, los LOS no tóxicos desacilados de esta invención tienen una citotoxicidad mucho menor que el monofosforil lípido A (MPL) obtenido mediante la fosforilación del lípido A a partir del cual se elimina una cadena polisacárida de LPS
25 para reducir la citotoxicidad de LPS.

Como se muestra en el ejemplo a continuación, la administración de los LOS peligrosos desacilados de la presente invención con antígenos de diversos patógenos también induce el nivel de respuesta inmune, demostrando que los
30 LOS no tóxicos desacilados de la presente invención pueden inducir sinérgicamente respuestas inmunitarias junto con antígenos de diversos patógenos.

La composición de vacuna de la presente invención puede contribuir a una eficacia preventiva sobre una determinada enfermedad solo en una composición fundamental que contiene antígeno de patógeno y LOS no tóxico desacilado. El inmunoadyuvante usado en la composición de vacuna de la presente invención es hidróxido de
35 aluminio.

En las composiciones de vacuna farmacéutica de esta invención, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser convencional para formulación, incluyendo lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, caucho, fosfato de potasio, arginato, gelatina, silicato de potasio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabes,
40 metilcelulosa, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceites minerales, pero sin limitación. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede incluir además un lubricante, un humectante, un edulcorante, un agente aromatizante, un emulsionante, un agente de suspensión y un conservante. Los detalles de portadores y formulaciones farmacéuticamente aceptables adecuados pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences (19^a ed., 1995).

45 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede administrarse por vía oral o parenteral. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral, puede realizarse por administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, abdominal y transdérmica. Una dosis adecuada de la composición farmacéutica de la presente invención puede variar dependiendo de los métodos de formulación farmacéutica, métodos de administración, edad del paciente, peso corporal, sexo, gravedad de las enfermedades,
50 dieta, tiempo de administración, vía de administración, tasa de excreción y sensibilidad para una composición farmacéutica usada. Preferiblemente, la composición farmacéutica de la presente invención se administra con una dosis diaria de 0,0001-1,000 mg/kg (peso corporal).

55 De acuerdo con las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, la composición farmacéutica puede formularse con vehículo y/o vehículo farmacéuticamente aceptable como se describe anteriormente, proporcionando finalmente varias formas que incluyen una forma de dosis unitaria y una forma de dosis múltiple. La formulación puede ser aceite o medios acuosos, resuspensión o emulsión, extracto, polvo, gránulo, tableta y cápsula y además comprende dispersante o estabilizante.

60 La composición de vacuna farmacéutica de la presente invención induce respuestas inmunes fuertes contra patógenos y, por lo tanto, tiene una potencia excelente para prevenir una determinada enfermedad. Además, la composición de vacuna farmacéutica de la presente invención posee una estabilidad superior debido a que el LOS no tóxico desacilado usado como inmunoadyuvante en la presente invención casi no tiene citotoxicidad.
65

Entre diversos antígenos de patógenos, el LOS desacilado no tóxico utilizado en la presente invención tiene un excelente efecto inmunoestimulador en la respuesta inmune contra el antígeno del virus de la influenza, como se demuestra en los ejemplos a continuación.

5 En otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona una composición para inducir la maduración de células dendríticas, incluyendo un LOS desacilado no tóxico (Lipooligosacárido).

10 En otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona un método para preparar células dendríticas maduras, que comprenden la incubación de las células dendríticas inmaduras con un LOS desacilado no tóxico (Lipooligosacárido).

15 En la preparación de la vacuna de células dendríticas, las células dendríticas aisladas a partir de in vivo tienen que madurar. En este proceso, los LOS (Lipooligosacáridos) no tóxicos desacilados pueden ser muy útiles.

20 Según el método para preparar la vacuna de células dendríticas, las células dendríticas inmaduras se derivan de monocitos o células madre hematopoyéticas, y más preferiblemente monocitos, porque las células dendríticas con propiedades uniformes de monocitos se pueden obtener de una manera más rápida que las células madre/progenitoras hematopoyéticas pluripotentes.

25 De acuerdo con una realización preferida, los monocitos se recogen de sangre periférica. El método para obtener células dendríticas inmaduras de células progenitoras (por ejemplo, monocitos o células madre hematopoyéticas) en sangre periférica puede realizarse con la forma de células progenitoras aisladas o no aisladas de otras células en sangre periférica.

30 Posteriormente, se inducen monocitos obtenidos de sangre periférica para diferenciarlos a células dendríticas. Los monocitos se cultivan en medios que contienen citocinas adecuadas para la diferenciación a células dendríticas. Las citoquinas son GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos), IL-4 (interleuquina-4), IL-13 o la combinación de las mismas. Una cantidad apropiada de citocinas añadidas es una cantidad suficiente para diferenciar células dendríticas, y puede seleccionarse empíricamente por investigadores en el laboratorio.

35 Cuando se usan citoquinas en la primera incubación para diferenciar células dendríticas de monocitos, el tiempo de incubación es comúnmente más de 5 días, y preferiblemente 6-7 días.

Finalmente, el proceso de maduración se lleva a cabo utilizando células dendríticas inmaduras obtenidas a partir del proceso de diferenciación descrito anteriormente, es decir, las células dendríticas se maduran cultivando en incubadora con medios que contienen el presente LOS no tóxico desacilado. El tiempo de incubación secundario es comúnmente más de 10 horas, y preferiblemente más de 20 horas, por ejemplo, 1-3 días.

40 La presente invención puede preparar vacunas de células dendríticas maduras eficazmente.

Efectos de esta invención

45 Las características y ventajas de esta invención se resumirán como sigue:

(a) La presente composición de vacuna usa antígeno derivado de patógenos y un LOS desacilado no tóxico como inmunoadyuvante.

50 (b) Un LOS desacilado no tóxico como inmunoadyuvante tiene un excelente efecto inmunoestimulador en la respuesta inmune contra cierto patógeno, y posee una estabilidad superior porque casi no tiene citotoxicidad.

(c) Además, un LOS desacilado no tóxico permite preparar una vacuna de células dendríticas maduras eficazmente.

55 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra que el nuevo adyuvante CIA05 tiene menos citotoxicidad que MPL (secreción de TNF- α).

60 Las Figuras 2a-d son los resultados del análisis de eficacia de la presente vacuna contra Mycobacterium tuberculosis en las Figs. 2a-d, Ag85A, HspX, proteína 1 de unión a fosfato y ESAT-6 se usaron como antígeno para Mycobacterium tuberculosis, respectivamente.

65 La Figura 2e son los resultados de la comparación del efecto inmunoestimulador de Ag85A, HspX, ESAT-6 y 38-kDa. Se utilizaron CIA05 (0.5 μ g) y antígenos (cada uno de 2 μ g).

La Figura 3 es un resultado del análisis de eficacia de la presente vacuna contra *Bacillus anthracis*.

La Figura 4 es un resultado del análisis de eficacia de la presente vacuna contra el VHA (virus de la hepatitis A).

5 La Figura 5 es el resultado del análisis de eficacia de la presente vacuna contra el VHB (virus de la hepatitis B).

La Figura 6 son los resultados del análisis de eficacia de la presente vacuna contra el VHC (virus de la hepatitis C).

10 La Figura 7 es el resultado del análisis de eficacia de la presente vacuna contra el VIH.

La Figura 8 es un resultado del análisis de eficacia de la presente vacuna contra la influenza.

15 Las Figuras 9a-b son los resultados del análisis de eficacia de la presente vacuna contra el VHS-2 (virus del herpes simple 2). En las Figuras 9a-b, se usaron antígenos gD y antígeno gB como antígeno, respectivamente.

La Figura 9c es el resultado de la comparación del efecto inmunoestimulador de gD y gB. Se utilizaron CIA05 (0.5 µg) y antígenos (cada uno de 2µg).

20 La Figura 10 es un resultado del análisis de eficacia de la presente vacuna contra Hib (*Haemophilus influenzae* tipo b).

La Figura 11 es un resultado del análisis de eficacia de la presente vacuna contra *Neisseria meningitidis*.

25 Las Figuras 12a-c son los resultados del análisis de eficacia en la presente vacuna para DPT. En las Figs. 12a-c, toxina diftérica, toxina Pertusis y toxina tetánica se usaron como antígeno, respectivamente.

La Figura 12d son los resultados de la comparación del efecto inmunoestimulador de la toxina diftérica, la toxina Pertusis y la toxina tetánica. Se utilizaron CIA05 (0.5 µg) y antígenos (cada uno de 2 µg).

30 La Figura 13 es un resultado del análisis de eficacia de la presente vacuna contra Varicela.

La Figura 14a son los resultados del análisis de eficacia sobre CIA05 (el adyuvante preparado en el Ejemplo 1) para la maduración de células dendríticas en BMDC de ratón (CD de médula ósea).

35 La Figura 14b son los resultados del análisis de eficacia sobre CIA05 (el adyuvante preparado en el Ejemplo 1) para la maduración de células dendríticas en MDDC humanas (células DC derivadas de monocitos).

Mejor modo de llevar a cabo la invención

40 La presente invención se describirá ahora con más detalle mediante ejemplos.

Ejemplos

45 Ejemplo 1: Fabricación de un Lipooligosacárido muy corto (LOS) CIA05 como un nuevo inmunoadyuvante

Los inventores cribaron una cepa (*E. coli* EG0021) que tiene una cadena de azúcar muy corta de lipopolisacárido de *Escherichia coli* que vive en los cuencos de humanos sanos y depositaron la cepa *E. coli* EG0021 en el Centro de Cultivo de Microorganismos de Corea (KCCM) el 2 de mayo, 2002, su número de acceso KCCM 10374 (c.f., República de Corea, Patente No. 0456681, WO 2004/039413, Patente Coreana No. 0740237, WO 2006/121232). La purificación de LPS a partir de esta cepa se realizó de acuerdo con los métodos divulgados en la patente de Corea No. 0456681; WO 2004/039413; Pat. Coreana No. 0740237; y WO 2006/121232. El peso molecular del LPS fue de 3,500 Da estimado por MALDI-MASS (Shimadzu, Axima-LNR V 2.3.5 (Mode Liner, Power: 106)). La toxicidad del LPS purificado se eliminó siguiendo los protocolos descritos en la Pat. coreana No. 0456681; WO 2004/039413; Pat. Coreana No. 0740237; y WO 2006/121232. El lipopolisacárido de *E. coli* purificado se ajustó a una concentración de 3 mg/ml, y el NaOH 2 N se mezcló con el lipopolisacárido a una relación de mezcla de 1:1 (en volumen), desacidada durante 140 minutos mientras se agitaba a 60°C cada 10 minutos. Se añadió ácido acético 1 N a un volumen de aproximadamente 1/5 del NaOH 0.2 N inicial para titular el pH a 7.0. Después de la titulación, la mezcla resultante se precipitó con etanol para obtener lipooligosacárido no tóxico (CIA05).

60 Ejemplo 2: Comparando la toxicidad del nuevo adyuvante CIA05 con adyuvante convencional MPL

El nuevo adyuvante CIA05 desarrollado en esta invención para ser utilizado para una vacuna se comparó con el MPL convencional (Monofosforil lípido A) por su toxicidad. Se sembraron PBMC humanas (células mononucleares de sangre periférica) de donantes humanos sanos a 5×10^5 células/ml en una placa de cultivo tisular de 24 pozos. Se añadió 1 ml del medio de crecimiento (RPMI 1640 (Gibco) + 10% de FBS (Gibco)) a cada pozo. La mezcla se trató

ES 2 685 585 T3

con las condiciones siguientes: 1) BSS de control negativo (solución salina equilibrada) 100 µl; 2) LOS no tóxico desacilados (CIA05) 10 µg/100 µl; y 3) MPL (E. coli F583 MPL) 10 µg/100 µl.

5 Después de 12 horas, el medio tratado se reunió y se centrifugó. El nivel de TNF-α secretado por THP-1 (leucemia monocítica aguda) se cuantificó usando el kit ELISA (sistema de I+D, DY210). Como se muestra en la Figura 1, CIA05 mostró 1/3 de toxicidad menor en comparación con el adyuvante convencional MPL.

Ejemplo de referencia 3: Análisis de eficacia sobre la presente vacuna contra Mycobacterium tuberculosis

10 Inmunización con antígeno de la vacuna de Mycobacterium Tuberculosis, y adyuvante CIA05

15 Con el fin de verificar la eficacia del adyuvante CIA05 para la vacuna de Mycobacterium tuberculosis, se usaron 4 antígenos de Mycobacterium tuberculosis. Ellos fueron Ag85A (32 kDa), HspX (16 kDa), proteína aglutinante de fosfato 1 (38 kDa) y ESAT-6 (6 kDa). Se inyectaron ratones Balb/c de seis semanas de edad (SLC, Japón) 3 veces con intervalo de 1 semana con los antígenos (cada uno de 2 µg) solos o la mezcla que incluía Alum (hidróxido de aluminio, Brenntag, Alemania) o CIA05 en el volumen final de 100 µl.

Medición del título del anticuerpo específico para antígeno de la vacuna contra Mycobacterium tuberculosis

20 Para medir el título de anticuerpo específico de antígeno de Mycobacterium tuberculosis en suero después de la inmunización, se utilizó el método de ELISA de punto final (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima). Se recubrieron placas de 96 pozos con 100 µl de Ag85A (32 kDa), HspX (16 kDa), la proteína aglutinante de fosfato 1 (38 kDa) y ESAT-6 (6 kDa) con una concentración de 1 mg/ml, respectivamente. Luego, la placa se bloqueó con 300 µl de BSA al 1% (albúmina de suero bovino) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del bloqueo, cada
25 pozo se lavó tres veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05% y se incubó con 100 µl de suero que se obtuvo después de la inmunización durante 2 horas a 37°C. Para determinar el anticuerpo específico antígeno de Mycobacterium tuberculosis, la placa se hizo reaccionar con IgG antiratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (Zymed), posteriormente se añadió TMB (tetrametilbenzidina, BD Bio Science, 55555214) y se detuvo con H₂SO₄ 1 N. El nivel de anticuerpo específico de antígeno de Mycobacterium tuberculosis en suero después de la
30 inmunización se verificó midiendo la absorbancia a 450 nm.

Análisis de eficacia del adyuvante CIA05 en la vacuna antituberculosa Mycobacterium

35 Como resultado del análisis de la eficacia de 4 antígenos de Mycobacterium tuberculosis y el adyuvante CIA05, en el caso de Ag85A (32 kDa), la producción de anticuerpos específicos del antígeno de Mycobacterium tuberculosis en el grupo Alum se incrementó en aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 8 veces (100 µg de Alum) en comparación con el grupo de antígeno solo. Además, la producción de anticuerpo específico de antígeno de Mycobacterium tuberculosis en el grupo CIA05 aumentó aproximadamente 16 veces (0.5 µg de CIA05) o aproximadamente 128 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 2a). Además,
40 cuando se usó CIA05, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno de Mycobacterium tuberculosis se incrementó notablemente de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que CIA05 es un adyuvante muy adecuado para el antígeno Ag85A de Mycobacterium tuberculosis. Mientras tanto, donde el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno de Mycobacterium tuberculosis se aumentó aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 4 veces (100 µg de Alum) en
45 comparación con el 0.5 µg del grupo CIA05 solo. Cuando el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno de Mycobacterium tuberculosis aumentó aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 4 veces (100 µg de Alum) en comparación con 1.0 µg del grupo CIA05 solo.

50 En el caso de HspX (16-kDa), la producción de anticuerpos específicos del antígeno Mycobacterium tuberculosis en el grupo Alum se incrementó en aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 8 veces (100 µg de Alum) en comparación con el grupo solo del antígeno. Además, la producción de anticuerpo específico de antígeno de Mycobacterium tuberculosis en el grupo CIA05 aumentó aproximadamente 16 veces (0.5 µg de CIA05) o aproximadamente 128 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 2b). Además,
55 cuando se usó CIA05, el nivel de producción de anticuerpo específico para antígenos de Mycobacterium tuberculosis aumentó notablemente de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que CIA05 es un adyuvante muy adecuado para el antígeno HspX de Mycobacterium tuberculosis (16 kDa). Mientras tanto, donde el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno de Mycobacterium tuberculosis se aumentó aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 4 veces (100 µg de Alum)
60 en comparación con los 0.5 µg del grupo de CIA05 solo. Cuando el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno de Mycobacterium tuberculosis aumentó aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 4 veces (100 µg de Alum) en comparación con el 1.0 µg del grupo de CIA05 solo.

65 En el caso de la proteína 1 aglutinante de fosfato (38 kDa), la producción de anticuerpo específico de antígeno de Mycobacterium tuberculosis en el grupo Alum se incrementó aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o

aproximadamente 8 veces (100 µg de Alum) en comparación al grupo de antígeno solo. Además, la producción de anticuerpo específico de antígeno de Mycobacterium tuberculosis en el grupo CIA05 se aumentó en aproximadamente 8 veces (0.5 µg de CIA05) o aproximadamente 64 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 2c). Además, cuando se usó CIA05, el nivel de producción de anticuerpo específico de antígeno de Mycobacterium tuberculosis aumentó notablemente de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que CIA05 es un adyuvante muy adecuado para antígeno de Mycobacterium tuberculosis para la proteína 1 aglutinante de fosfato (38 kDa). Mientras tanto, donde el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno de Mycobacterium tuberculosis se aumentó aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 4 veces (100 µg de Alum) en comparación con el 0.5 µg del grupo CIA05 solo. Cuando el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno de Mycobacterium tuberculosis aumentó aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 4 veces (100 µg de Alum) en comparación con el 1.0 µg del grupo de CIA05 solo.

En el caso de ESAT-6 (6-kDa), la producción de anticuerpo específico de antígeno de Mycobacterium tuberculosis en el grupo Alum se incrementó en aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 8 veces (100 µg de Alum) en comparación con el grupo de antígeno solo. Además, la producción de anticuerpo específico de antígeno de Mycobacterium tuberculosis en el grupo CIA05 aumentó aproximadamente 16 veces (0.5 µg de CIA05) o aproximadamente 128 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 2d). Además, cuando se usó CIA05, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno Mycobacterium tuberculosis aumentó notablemente de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que CIA05 es un adyuvante muy adecuado para el antígeno Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 (6 kDa). Mientras tanto, donde el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno de Mycobacterium tuberculosis se aumentó aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 4 veces (100 µg de Alum) en comparación con los 0.5 µg del grupo de CIA05 solo. Cuando el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno de Mycobacterium tuberculosis aumentó aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 4 veces (100 µg de Alum) en comparación con el 1.0 µg del grupo de CIA05 solo.

La prueba se realizó para seleccionar el mejor antígeno para el efecto inmunoestimulador entre antígenos de Mycobacterium tuberculosis (Figura 2e). Como resultado, el mejor antígeno para el efecto inmunoestimulador fue Ag85A, HspX, ESAT-6 y 38-kDa en este orden. Por lo tanto, se determinaría que el antígeno más apreciado para el presente CIA05 era Ag85A.

En conclusión, la presente vacuna contra Mycobacterium tuberculosis que incluye el adyuvante CIA05 tiene la excelente eficacia de inmunización, es decir, la eficacia de la vacuna y tiene un efecto inmunoestimulador más excelente al antígeno de Mycobacterium tuberculosis que el adyuvante convencional de Alum.

Ejemplo de referencia 4: Análisis de eficacia en la presente vacuna contra Bacillus anthracis

Inmunización con antígeno de vacuna contra Bacillus anthracis PA y adyuvante CIA05

Bacillus anthracis está comprendido de 3 proteínas, PA (antígeno protector), LF (antígeno letal) y EA (antígeno edema). Produce 2 tipos de toxinas. PA se ha utilizado para la vacuna contra Bacillus anthracis. Se utilizó un antígeno de PA de longitud completa recombinante en este experimento. Ratones Balb/c macho de seis semanas de edad fueron inyectados por vía intraperitoneal por 3 veces en un intervalo de 2 semanas con los 10 µg del antígeno PA de Bacillus anthracis. Se administraron 10 µg de antígeno PA contenido en el volumen final de 100 µl. Se administraron 0.5 µg o 1.0 µg de CIA05 contenido en el volumen final de 100 µl. Se administraron 50 µg o 100 µg de Alum contenidos en el volumen final de 100 µl. El control negativo se administró con PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7.3) en 100 µl cada vez. Después de la tercera inyección, se recogió sangre completa del ratón y se centrifugó para obtener suero. Con el fin de medir un título específico de anticuerpos contra el antígeno PA en el suero después de la inmunización, se utilizó el método de ELISA de punto final (Ensayo inmunosorbente ligado a enzimas) de la misma manera en el Ejemplo 3.

Como resultado del análisis del antígeno específico de PA en suero después de la inmunización, donde se administró el adyuvante CIA05, el antígeno específico de PA aumentó aproximadamente 10 veces (0.5 µg de CIA05) y aproximadamente 21 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación a la inmunización con antígeno solo de PA, lo que indica que CIA05 juega un papel como adyuvante con el antígeno PA de Bacillus anthracis en la vacuna de Bacillus anthracis (Figura 3). Además, cuando el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, se pudo determinar que la CIA05 y el Alum pueden mejorar la inmunización específica de PA (figura 3). En conclusión, la presente vacuna contra Bacillus anthracis que incluye el adyuvante CIA05, particularmente, la vacuna de Bacillus anthracis que usa la combinación de antígeno de PA y CIA05 tiene la excelente eficacia de inmunización, es decir, la eficacia de la vacuna.

Ejemplo de referencia 5: Análisis de eficacia sobre la actual vacuna contra el virus de la hepatitis A (VHA)

El VHA inactivado cultivado en la línea celular MRC-5 se usó como antígeno. Se inyectaron por vía intraperitoneal ratones Balb/c macho de seis semanas de edad 3 veces a intervalos de 1 semana con VHA inactivado solo o la mezcla que incluía CIA05. Una semana después de la tercera inyección, se recogió sangre completa del ratón y se centrifugó para obtener suero, y se midió el título de anticuerpos específicos del VHA con el método de ELISA de punto final (Ensayo inmunosorbente ligado a enzimas) de la misma manera en el Ejemplo 3.

Como resultado, la producción de anticuerpo específico de antígeno HAV en el grupo Alum se incrementó en aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 4 veces (100 µg de Alum) en comparación con el grupo de antígeno solo. Además, la producción de anticuerpo específico de antígeno HAV en el grupo CIA05 se aumentó en aproximadamente 8 veces (0.5 µg de CIA05) o aproximadamente 32 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 4). Además, cuando se usó CIA05, el nivel de producción de anticuerpo específico de antígeno HAV aumentó notablemente de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que CIA05 es un adyuvante muy adecuado para el antígeno de HAV (HAV inactivado). Mientras tanto, donde el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno HAV se incrementó en aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 4 veces (100 µg de Alum) en comparación con los 0.5 µg del grupo de CIA05 solo. Cuando el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno HAV aumentó aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 4 veces (100 µg de Alum) en comparación con el 1.0 µg del grupo de CIA05 solo.

En conclusión, la presente vacuna HAV que incluye el adyuvante CIA05, particularmente, la vacuna HAV que usa la combinación de HAV inactivado y CIA05 tiene la excelente eficacia de inmunización, es decir, la eficacia de la vacuna.

Ejemplo de referencia 6: Análisis de eficacia sobre la actual vacuna contra el virus de la hepatitis B (VHB)

El antígeno de superficie del VHB HBsAg (subtipo adr) se expresó en *Hansenula polymorpha* para obtener HBsAg recombinante. El HBsAg recombinante se purificó y se usó como un antígeno para la vacuna de VHB. Se inyectaron ratones Balb/c 3 veces con intervalo de 1 semana con 2 µg de antígeno de VHB HBsAg solo o la mezcla que incluía Alum o CIA05. Una semana después de la tercera inyección, se recogió sangre completa del ratón y se centrifugó para obtener suero, y se midió el título de anticuerpos específicos de HBsAg con el método de ELISA de punto final (Ensayo inmunosorbente ligado a enzimas) de la misma manera en el Ejemplo 3.

Como resultado, la producción de anticuerpo específico de antígeno HBsAg en el grupo Alum se incrementó en aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 4 veces (100 µg de Alum) en comparación con el grupo de antígeno solo. Además, la producción de anticuerpo específico de antígeno HBsAg en el grupo CIA05 se aumentó en aproximadamente 8 veces (0.5 µg de CIA05) o aproximadamente 16 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 5). Además, cuando se usó CIA05, el nivel de producción de anticuerpo específico de antígeno HBsAg aumentó notablemente de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que CIA05 es un adyuvante muy adecuado para el antígeno de HBsAg. Mientras tanto, donde se usaron conjuntamente el adyuvante CIA05 y el Alum, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno HBsAg aumentó aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 4 veces (100 µg de Alum) en comparación con los 0.5 µg del grupo de CIA05 solo. Cuando el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno HBsAg aumentó aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 8 veces (100 µg de Alum) en comparación con el 1.0 µg del grupo de CIA05 solo.

En conclusión, la presente vacuna de VHB que incluye el adyuvante CIA05, particularmente, la vacuna de VHB que usa la combinación de antígeno de HBsAg y CIA05 tiene la excelente eficacia de inmunización, es decir, la eficacia de la vacuna.

Ejemplo de referencia 7: Análisis de eficacia sobre la actual vacuna contra el virus de la hepatitis C (VHC)

Con el fin de verificar la eficacia del adyuvante CIA05 para la vacuna contra el VHC, comercial se usó NS3 recombinante de HCV (Z00042, GenScript) como antígeno.

Se inyectaron ratones Balb/c de seis semanas de edad 3 veces al intervalo de 1 semana con 2 µg de antígeno NS3 solo o la mezcla que incluía Alum o CIA05. Una semana después de la tercera inyección, se recogió sangre completa del ratón y se centrifugó para obtener suero, y se midió el título de anticuerpos específicos de NS3 con el método de ELISA de punto final (Ensayo inmunosorbente ligado a enzimas) de la misma manera en el Ejemplo 3.

Como resultado, la producción de anticuerpo específico de antígeno NS3 en el grupo Alum se incrementó en aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 4 veces (100 µg de Alum) en comparación con el grupo de antígeno solo. Además, la producción de anticuerpo específico de antígeno NS3 en el grupo CIA05 aumentó aproximadamente 4 veces (0.5 µg de CIA05) o aproximadamente 16 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 6). Además, cuando se usó CIA05, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno NS3 se incrementó notablemente de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que CIA05 es un adyuvante muy adecuado para el antígeno NS3. Mientras tanto, donde el adyuvante CIA05 y

el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno NS3 aumentó aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 4 veces (100 µg de Alum) en comparación con los 0.5 µg del grupo de CIA05 solo. Cuando el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno NS3 aumentó aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 4 veces (100 µg de Alum) en comparación con el 1.0 µg del grupo de CIA05 solo.

En conclusión, la presente vacuna de VHC que incluye adyuvante CIA05, particularmente, la vacuna de VHC que usa la combinación de antígeno NS3 y CIA05 tiene la excelente eficacia de inmunización, es decir, la eficacia de la vacuna.

Ejemplo de referencia 8: Análisis de eficacia sobre la actual vacuna contra el VIH

Con el fin de verificar la eficacia del adyuvante CIA05 para la vacuna contra el VIH, se utilizó como antígeno el antígeno (Env) de la envoltura comercial de VIH-1 (H9909, Sigma). Se inyectaron ratones Balb/c de seis semanas de edad 3 veces en un intervalo de 1 semana con 2 µg de antígeno Env de VIH-1 solo o la mezcla que incluía Alum o CIA05. Una semana después de la tercera inyección, se recogió sangre completa del ratón y se centrifugó para obtener suero, y se midió el título de anticuerpos específicos de Env del VIH-1 con el método de ELISA de punto final (Ensayo inmunosorbente ligado a enzimas) de la misma manera en el Ejemplo 3.

Como resultado, la producción de anticuerpos específicos del antígeno Env del VIH-1 en el grupo Alum se incrementó en aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 8 veces (100 µg de Alum) en comparación con el grupo del antígeno solo. Además, la producción de anticuerpo específico de antígeno Env HIV-1 en el grupo CIA05 se incrementó en aproximadamente 16 veces (0.5 µg de CIA05) o aproximadamente 64 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 7) Además, cuando se usó CIA05, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno Env del VIH-1 se incrementó notablemente de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que el CIA05 es un adyuvante muy adecuado para el antígeno Env del VIH-1. Mientras tanto, donde el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno Env del VIH-1 aumentó aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 8 veces (100 µg de Alum) en comparación con los 0.5 µg del grupo de CIA05 solo. Cuando el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno Env del VIH-1 aumentó aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 8 veces (100 µg de Alum) en comparación con 1.0 µg del grupo CIA05 solo.

En conclusión, la presente vacuna contra el VIH que incluye el adyuvante CIA05, particularmente, la vacuna contra el VIH que usa la combinación del antígeno Env del VIH-1 y CIA05 tiene la excelente eficacia de inmunización, es decir, la eficacia de la vacuna.

Ejemplo 9: Análisis de eficacia sobre la actual vacuna contra la influenza

Con el fin de verificar la eficacia del adyuvante CIA05 para la vacuna contra la influenza, se usó como antígeno la subunidad comercial de HA (CJ Co., Incheon, Corea) obtenida de 3 tipos de cepas del virus de la influenza. Los 3 tipos de cepas del virus de la influenza son A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1), A/Panamá/2007/99 (H3N2) y B/Shangdong/7/97. Ratones Balb/c de seis semanas de edad se inyectaron 2 veces a intervalo de 4 semanas con 1.5 µg de antígeno de subunidad de HA solo o la mezcla que incluía Alum o CIA05. Cuatro días después de la segunda inyección, se recogió sangre completa del ratón y se centrifugó para obtener suero, y se midió el título de anticuerpo específico de subunidad de HA con el método de ELISA de punto final (Ensayo inmunosorbente ligado a enzima) de la misma manera en el Ejemplo 3.

Como resultado, la producción de anticuerpo específico de antígeno de subunidad de HA en el grupo Alum se incrementó en aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 4 veces (100 µg de Alum) en comparación con el grupo de antígeno solo. Además, la producción de anticuerpo específico de antígeno de subunidad HA en el grupo CIA05 aumentó aproximadamente 4 veces (0.5 µg de CIA05) o aproximadamente 8 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 8). Además, cuando se usó CIA05, el nivel de producción de anticuerpo específico de antígeno de subunidad de HA aumentó notablemente de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que CIA05 es un adyuvante muy adecuado para el antígeno de subunidad de HA. Mientras tanto, donde el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico antígeno de la subunidad HA aumentó aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 8 veces (100 µg de Alum) en comparación con los 0.5 µg del grupo de CIA05 solo. Cuando se usaron conjuntamente el adyuvante CIA05 y el Alum, el nivel de producción del anticuerpo específico de antígenos de la subunidad HA aumentó aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 8 veces (100 µg de Alum) en comparación con 1.0 µg del grupo CIA05 solo.

En conclusión, la presente vacuna de la influenza que incluye el adyuvante CIA05, particularmente, la vacuna de la influenza que usa la combinación del antígeno de la subunidad HA y CIA05 tiene la excelente eficacia de inmunización, es decir, la eficacia de la vacuna.

Ejemplo de referencia 10: Análisis de eficacia en la presente vacuna contra HSV-2 (virus herpes simple tipo 2)

Con el fin de verificar la eficacia del adyuvante CIA05 para la vacuna HSV-2, se usaron la glicoproteína gD y la gB de HSV-2 como antígeno. La glicosilación en 2 tipos de antígenos fue importante, de modo que 2 tipos de antígenos se expresaron en células de mamífero (línea celular CHO) y se purificaron (Boucher et al., Detección de anticuerpos contra el virus herpes simplex tipo 2 con una línea celular de mamífero que expresa glicoproteína gG-2. Clin. Diagn. Virol 1(1):29-38(1993)). Se inyectaron ratones Balb/c de seis semanas de edad 3 veces en un intervalo de 1 semana con los antígenos (cada uno de 2 µg) solos o la mezcla que incluía Alum o CIA05. Una semana después de la tercera inyección, se recogió sangre completa del ratón y se centrifugó para obtener suero, y se midió el título de antígeno gD- y gB del antígeno HSV-2 con el método de ELISA de punto final (Ensayo inmunosorbente ligado a enzima) como el de la misma manera en el Ejemplo 3.

Como resultado, en el caso del antígeno gD, la producción de anticuerpos específicos del antígeno gD en el grupo Alum se incrementó en aproximadamente 8 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 32 veces (100 µg de Alum) en comparación con el grupo de antígeno solo. Además, la producción de anticuerpo específico de antígeno gD en el grupo CIA05 aumentó aproximadamente 24 veces (0.5 µg de CIA05) o aproximadamente 128 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 9a). Además, cuando se usó CIA05, el nivel de producción de anticuerpo específico de antígeno gD se incrementó notablemente de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que CIA05 es un adyuvante muy adecuado para el antígeno gD. Mientras tanto, donde se usaron conjuntamente el adyuvante CIA05 y el Alum, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno gD aumentó aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 16 veces (100 µg de Alum) en comparación con los 0.5 µg del grupo CIA05 solo. Cuando el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno gD aumentó aproximadamente 2 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 16 veces (100 µg de Alum) en comparación con el 1.0 µg del grupo CIA05 solo.

En el caso del antígeno gB, la producción de anticuerpo específico de antígeno gB en el grupo Alum se incrementó en aproximadamente 8 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 32 veces (100 µg de Alum) en comparación con el grupo de antígeno solo. Además, la producción de anticuerpo específico de antígeno gB en el grupo CIA05 aumentó aproximadamente 16 veces (0.5 µg de CIA05) o aproximadamente 32 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 9b). Además, cuando se usó CIA05, el nivel de producción de anticuerpo específico de antígeno gB aumentó notablemente de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que CIA05 es un adyuvante muy adecuado para el antígeno gB. Mientras tanto, donde el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno gB aumentó en aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 16 veces (100 µg de Alum) en comparación con los 0.5 µg del grupo CIA05 solo. Cuando se usaron conjuntamente el adyuvante CIA05 y el Alum, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno gB aumentó aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 16 veces (100 µg de Alum) en comparación con 10 µg del grupo CIA05 solo.

La prueba se realizó para seleccionar el mejor antígeno para el efecto inmunoestimulador entre los antígenos de HSV-2 (Figura 9c). Como resultado, el mejor antígeno para el efecto inmunoestimulador fue gD. Por lo tanto, se determinaría que el antígeno más apreciado para el presente CIA05 era gD.

En conclusión, la presente vacuna HSV-2 que incluye el adyuvante CIA05, en particular, la vacuna HSV-2 que usa la combinación de antígeno gD y CIA05 tiene la excelente eficacia de inmunización, es decir, la eficacia de la vacuna.

Ejemplo de referencia 11: Análisis de eficacia en la presente vacuna contra Hib (Haemophilus influenzae tipo b)

Con el fin de verificar la eficacia del adyuvante CIA05 para la vacuna contra Hib, se usó como antígeno comercial ActHIB (Vacuna conjugada de Haemophilus b, Conjugado de toxoide de tétanos, Sanofi Pasteur S A). Se inyectaron ratones Balb/c 2 veces en un intervalo de 2 semanas con el antígeno solo o la mezcla que incluía Alum o CIA05. Una semana después de la segunda inyección, se recogió sangre completa del ratón y se centrifugó para obtener suero, y se midió el título de anticuerpo específico de Hib con el método de ELISA de punto final (Ensayo inmunosorbente ligado a enzima) de la misma manera en el Ejemplo 3.

Como resultado, la producción de anticuerpo específico de antígeno ActHIB en el grupo Alum se incrementó en aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 16 veces (100 µg de Alum) en comparación con el grupo de antígeno solo. Además, la producción de anticuerpo específico de antígeno Hib en el grupo CIA05 aumentó aproximadamente 16 veces (0.5 µg de CIA05) o aproximadamente 32 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 10). Además, cuando se usó CIA05, el nivel de producción de anticuerpo específico de antígeno ActHIB se incrementó notablemente de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que CIA05 es un adyuvante muy adecuado para el antígeno ActHIB. Mientras tanto, donde el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno ActHIB aumentó en aproximadamente 8 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 16 veces (100 µg de Alum) en comparación con los 0.5 µg del grupo Alum CIA05 solo. Cuando el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno ActHIB aumentó aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 24 veces (100 µg de Alum) en comparación con el 1.0 µg del grupo CIA05 solo.

En conclusión, la presente vacuna Hib que incluye el adyuvante CIA05, particularmente, la vacuna Hib que usa la combinación de ActHIB y CIA05 tiene la excelente eficacia de inmunización, es decir, la eficacia de la vacuna.

5 Ejemplo de referencia 12: Análisis de eficacia de la presente vacuna contra *Neisseria meningitidis*

10 Con el fin de verificar la eficacia del adyuvante CIA05 para la vacuna de *Neisseria meningitidis*, se usó proteosoma aislado de *Neisseria meningitidis* atenuado como antígeno (Lowell et al., Proteosome-lipopeptide vaccines: enhancement of immunogenicity for malaria CS peptides. *Science*, 240:800-802(1980)). Ratones Balb/c de seis semanas de edad fueron inyectados 2 veces en un intervalo de 2 semanas con el antígeno solo o la mezcla que incluye Alum o CIA05. Una semana después de la segunda inyección, se recogió sangre completa del ratón y se centrifugó para obtener suero, y se midió el título de anticuerpos específicos de proteosoma de *Neisseria meningitidis* con el método de ELISA de punto final (Ensayo inmunosorbente ligado a enzimas) de la misma manera en el Ejemplo 3.

15 Como resultado, la producción de anticuerpo específico de antígeno proteosoma de *Neisseria meningitidis* en el grupo Alum se incrementó en aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 8 veces (100 µg de Alum) en comparación con el grupo de antígeno solo. Además, la producción del anticuerpo específico de antígeno proteosoma de *Neisseria meningitidis* en el grupo CIA05 aumentó aproximadamente 8 veces (0.5 µg de CIA05) o aproximadamente 16 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 11). Además, cuando se usó CIA05, el nivel de producción de anticuerpo específico de antígeno proteosoma de *Neisseria meningitidis* aumentó notablemente de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que CIA05 es un adyuvante muy adecuado para el antígeno proteosoma de *Neisseria meningitidis*. Mientras tanto, donde el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno proteosoma de *Neisseria meningitidis* aumentó en aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 16 veces (100 µg de Alum) en comparación con el 0.5 µg del grupo CIA05 solo. Cuando el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico de antígeno de la subunidad HA aumentó aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 16 veces (100 µg de Alum) en comparación con 1.0 µg del grupo CIA05 solo.

30 En conclusión, la presente vacuna contra *Neisseria meningitidis* que incluye el adyuvante CIA05, en particular, la vacuna contra *Neisseria meningitidis* que usa la combinación de proteosoma de *Neisseria meningitidis* y CIA05 tiene la excelente eficacia de inmunización, es decir, la eficacia de la vacuna.

35 Ejemplo de referencia 13: Análisis de eficacia sobre la actual vacuna contra la difteria, la tos ferina y el tétano (DPT)

DPT es una vacuna para prevenir enfermedades causadas por la difteria, la tos ferina y el tétano. Vacuna contra estas enfermedades

40 Con el fin de verificar la eficacia del adyuvante CIA05 para la vacuna contra estas enfermedades, se usó como antígeno diftérico la toxina diftérica comercial (D0564, Sigma) derivada de *Corynebacterium diphtheria*. La toxina Pertusis comercial (P7208, Sigma) derivada de *Bordetella pertussis pertussis* se usó como antígeno pertussis. La toxina comercial del tétano (T3194, Sigma) derivada de *Clostridium tetani* se usó como antígeno del tétano. Se inyectaron ratones Balb/c de seis semanas de edad 2 veces en un intervalo de 2 semanas con los antígenos (cada uno de 2 µg) solos o la mezcla que incluía Alum o CIA05. Una semana después de la segunda inyección, se recogió sangre completa del ratón y se centrifugó para obtener suero, y se midió cada título de anticuerpo específico de toxina con el método de ELISA de punto final (Ensayo inmunosorbente ligado a enzima) de la misma manera en el Ejemplo 3.

50 Como resultado, en el caso del antígeno de la toxina diftérica, la producción de anticuerpos específicos del antígeno de la toxina diftérica en el grupo Alum se incrementó en aproximadamente 32 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 64 veces (100 µg de Alum) en comparación con el grupo de antígeno solo. Además, la producción de anticuerpo específico de antígeno de toxina diftérica en el grupo CIA05 aumentó aproximadamente 32 veces (0.5 µg de CIA05) o aproximadamente 128 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 12a). Además, cuando se usó CIA05, el nivel de producción del anticuerpo específico contra el antígeno de la toxina diftérica aumentó notablemente de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que CIA05 es un adyuvante muy adecuado para el antígeno de la toxina diftérica. Mientras tanto, donde el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo antígeno específico de la toxina diftérica se incrementó en aproximadamente 8 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 16 veces (100 µg de Alum) en comparación con los 0.5 µg del grupo CIA05 solo. Cuando se usaron conjuntamente el adyuvante CIA05 y el Alum, el nivel de producción del anticuerpo específico contra el antígeno de la toxina diftérica aumentó aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 8 veces (100 µg de Alum) en comparación con 1.0 µg del grupo CIA05 solo.

65 En el caso del antígeno de la toxina Pertusis, la producción del anticuerpo específico del antígeno de la toxina Pertusis en el grupo Alum se incrementó en aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 16 veces (100 µg de Alum) en comparación con el grupo del antígeno solo. Además, la producción de anticuerpo

específico de antígeno de toxina de Pertusis en el grupo CIA05 aumentó aproximadamente 16 veces (0.5 µg de CIA05) o aproximadamente 24 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 12b). Además, cuando se usó CIA05, el nivel de producción del anticuerpo específico contra el antígeno de la toxina de Pertusis aumentó notablemente de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que CIA05 es un adyuvante muy adecuado para el antígeno de la toxina diftérica. Mientras tanto, donde el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno de la toxina Pertusis aumentó aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 32 veces (100 µg de Alum) en comparación con el de 0.5 µg del grupo CIA05 solo. Cuando se usaron conjuntamente el adyuvante CIA05 y el Alum, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno de la toxina Pertusis aumentó aproximadamente 8 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 32 veces (100 µg de Alum) en comparación con 1.0 µg del grupo CIA05 solo.

En el caso del antígeno de toxina tetánica, la producción del anticuerpo específico de antígeno de la toxina tetánica en el grupo Alum se incrementó en aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 8 veces (100 µg de Alum) en comparación con el grupo de antígeno solo. Además, la producción de anticuerpo específico de antígeno de toxina tetánica en el grupo CIA05 aumentó aproximadamente 16 veces (0.5 µg de CIA05) o aproximadamente 32 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 12b). Además, cuando se usó CIA05, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno de la toxina del tétanos aumentó notablemente de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que CIA05 es un adyuvante muy adecuado para el antígeno de la toxina diftérica. Mientras tanto, donde se usaron conjuntamente el adyuvante CIA05 y el Alum, el nivel del anticuerpo específico de antígeno de la toxina tetánica se incrementó en aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 8 veces (100 µg de Alum) en comparación con los 0.5 µg del grupo CIA05 solo. Cuando se usaron conjuntamente el adyuvante CIA05 y el Alum, el nivel de producción del anticuerpo específico contra antígeno de toxina tetánica se incrementó en aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 8 veces (100 µg de Alum) en comparación con 1.0 µg del grupo CIA05 solo.

La prueba se realizó para seleccionar el mejor antígeno para el efecto inmunoestimulador entre antígenos DPT (Figura 12d). Como resultado, el mejor antígeno para el efecto inmunoestimulador fue la toxina diftérica, la toxina Pertusis y la toxina tetánica en este orden. Por lo tanto, se determinaría que el antígeno más apreciado para el presente CIA05 era la toxina diftérica.

En conclusión, la presente vacuna DPT que incluye el adyuvante CIA05, particularmente, la vacuna DPT que usa la combinación de toxina diftérica y CIA05 tiene la excelente eficacia de inmunización, es decir, la eficacia de la vacuna.

Ejemplo de referencia 14: Análisis de eficacia de la vacuna actual contra la varicela

Con el fin de verificar la eficacia del adyuvante CIA05 para la vacuna contra la varicela, se utilizó la cepa VIA Suduvax (1VIA Suduvax inj, GREEN CROSS CORP.) como antígeno. La cepa Suduvax es una vacuna contra la varicela en forma de varicela viva atenuada. Ratones Balb/c de seis semanas de edad fueron inyectados 2 veces en un intervalo de 2 semanas con el antígeno solo o la mezcla que incluye Alum o CIA05. Una semana después de la segunda inyección, se recogió sangre completa del ratón y se centrifugó para obtener suero, y se midió el título de anticuerpo específico de la cepa Suduvax con el método de ELISA de punto final (Ensayo inmunosorbente ligado a enzima) de la misma manera en el Ejemplo 3.

Como resultado, la producción de antígeno específico de antígeno de cepa Suduvax en el grupo Alum se incrementó en aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 8 veces (100 µg de Alum) en comparación con el grupo de antígeno solo. Además, la producción del anticuerpo específico de antígeno proteosoma de Neisseria meningitidis en el grupo CIA05 aumentó aproximadamente 16 veces (0.5 µg de CIA05) o aproximadamente 64 veces (1.0 µg de CIA05) en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 13). Además, cuando se usó CIA05, el nivel de producción del antígeno específico del antígeno de la cepa Suduvax se incrementó notablemente de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que CIA05 es un adyuvante muy adecuado para el antígeno de la cepa Suduvax (varicela atenuada). Mientras tanto, donde el adyuvante CIA05 y el Alum se usaron juntos, el nivel de producción del anticuerpo específico del antígeno proteosoma de Neisseria meningitidis aumentó en aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 8 veces (100 µg de Alum) en comparación con el 0.5 µg del grupo CIA05 solo. Cuando se usaron conjuntamente el adyuvante CIA05 y el Alum, el nivel de producción del anticuerpo específico de antígenos de la subunidad HA aumentó aproximadamente 4 veces (50 µg de Alum) o aproximadamente 32 veces (100 µg de Alum) en comparación con 1.0 µg del grupo CIA05 solo.

En conclusión, la presente vacuna contra varicela que incluye el adyuvante CIA05, particularmente, la vacuna contra varicela que usa la combinación de varicela atenuada y CIA05 tiene la excelente eficacia de inmunización, es decir, la eficacia de la vacuna.

Ejemplo 15: Análisis de eficacia de CIA05 para la maduración de células dendríticas

Aislamiento de MDDC humanos (células DC derivadas de monocitos) y BMDC de ratón (CD de médula ósea)

Se recogieron aproximadamente 80 ml de sangre de donantes humanos sanos y se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con el método de separación de gradientes Ficoll-Paque™. Los monocitos se aislaron a partir de PBMC usando microperlas anti-CD14 (sistema MACS), se sembraron a 1×10^8 células/ml en una placa de 24 pozos con medio RPMI conteniendo 10% de FBS, IL-4 y GM-CSF y se cultivaron para obtener MDDC humanos.

5 Las células de la médula ósea se aislaron a partir de ratones BALB/c macho y se cultivaron con medio que contenía IL-4 y GM-CSF durante 6 días para obtener BMDC. Luego, a los 7 días, las células CD11c⁺ se aislaron usando perlas magnéticas recubiertas con anti-CD11c.

10 Análisis sobre el aumento de la expresión del marcador de superficie de las células dendríticas (DC) por adyuvante CIA05

Se aislaron MDDC humanas (células DC derivadas de monocitos) y BMDC de ratón (CD de médula ósea) con el método descrito anteriormente, se trataron respectivamente con LPS, MPL y CIA05 con 1 µg/ml de concentración y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación, se verificaron CD40, CD80 y CD86 en la superficie de los BMDC de ratón, y se verificaron HLA-DR, CD80 y CD86 en MDDC humanos por citometría de flujo, respectivamente. En las BMDC de ratón, se determinaría que el marcador de superficie DCs CD40, CD80 y CD86 se expresaron con una distribución similar en todos los LPS, MPL y CIA05 (Figura 14a). Sin embargo, en los MDDC humanos, se determinaría que el marcador de superficie MDDC HLA-DR, CD80 y CD86 en CIA05 estaban más altamente expresados que en el MPL que se ha usado ampliamente como adyuvante de vacuna (Figura 14b). Se

15 indica que la eficacia de MPL se mantiene con el nivel de LPS en el ratón, sin embargo, es limitada en humanos. Por lo tanto, CIA05 puede resolver estos problemas.

20

En conclusión, el adyuvante CIA05 actúa para aumentar considerablemente la eficacia de la inmunización, es decir, la eficacia de la vacuna, y particularmente, tiene el excelente efecto para la maduración de células dendríticas humanas.

25

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna farmacéutica para uso en vacunación contra un virus de influenza, que comprende:

5 (a) antígeno del virus de la influenza;

(b) un lipooligosacárido (LOS), donde el LOS se define como un LPS (lipopolisacárido) modificado de bajo peso molecular que tiene glicocadenas más cortas que los LPS naturales y que tienen un peso molecular en un intervalo de 5,000-10,000 Da antes de la desacilación, donde LOS se deriva de Escherichia coli que tiene un peso molecular en el intervalo de 2.000-4.000 Da después de la desacilación, que se desacila mediante la eliminación de LOS de un ácido graso unido a la glucosamina del lípido A a través de un enlace -C(O)O- que da como resultado una reducción significativa de citotoxicidad en comparación con LOS; y

10

(c) un inmunoadyuvante que es hidróxido de aluminio;

15

(d) un transportador farmacéuticamente aceptable.

2. La composición según la reivindicación 1, en la que el antígeno del virus de la influenza es glicoproteína HA o NA de envoltura.

20

3. La composición según la reivindicación 2, en la que el antígeno del virus de la influenza es glicoproteína HA de envoltura.

4. La composición según la reivindicación 1, en la que la desacilación de lipooligosacárido (LOS) es a través de tratamiento alcalino de lipopolisacárido (LPS).

25

Fig. 1

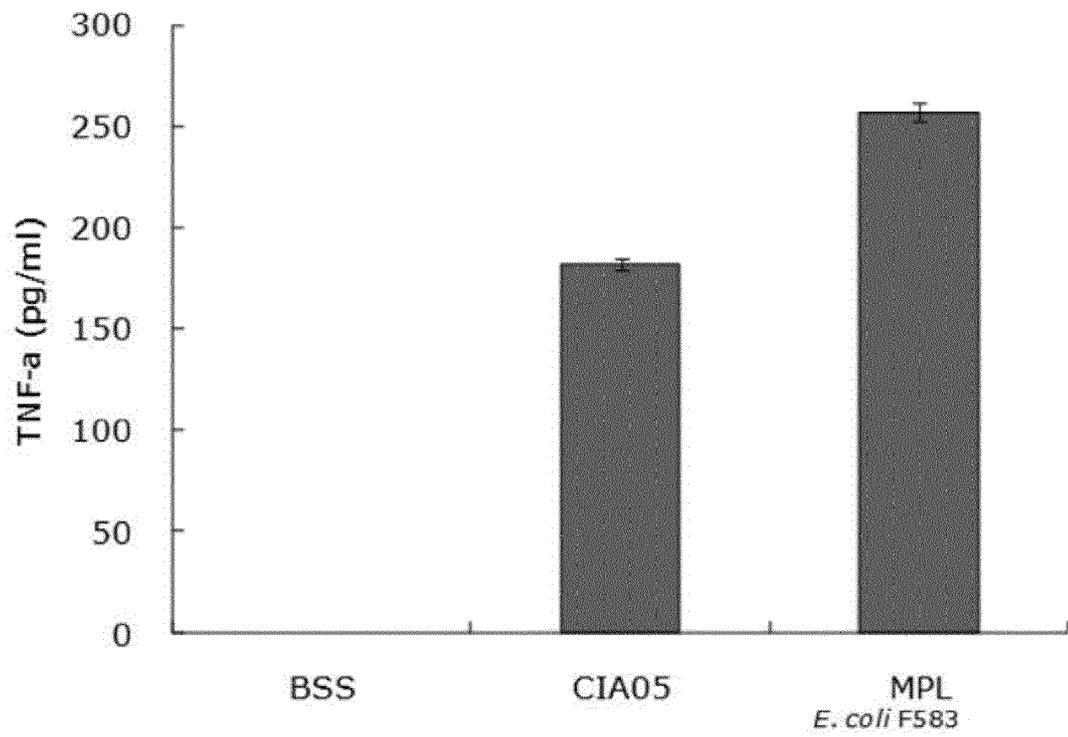


Fig. 2a

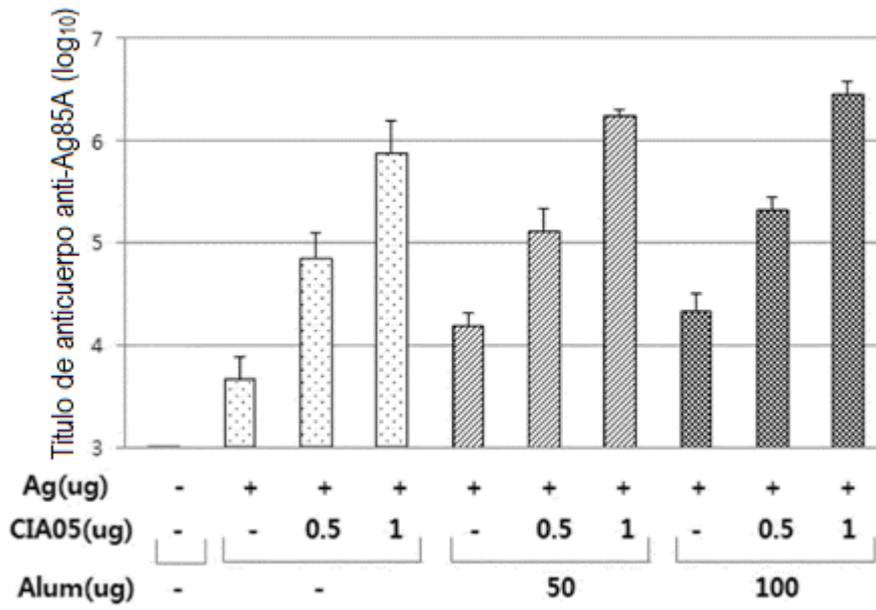


Fig. 2b

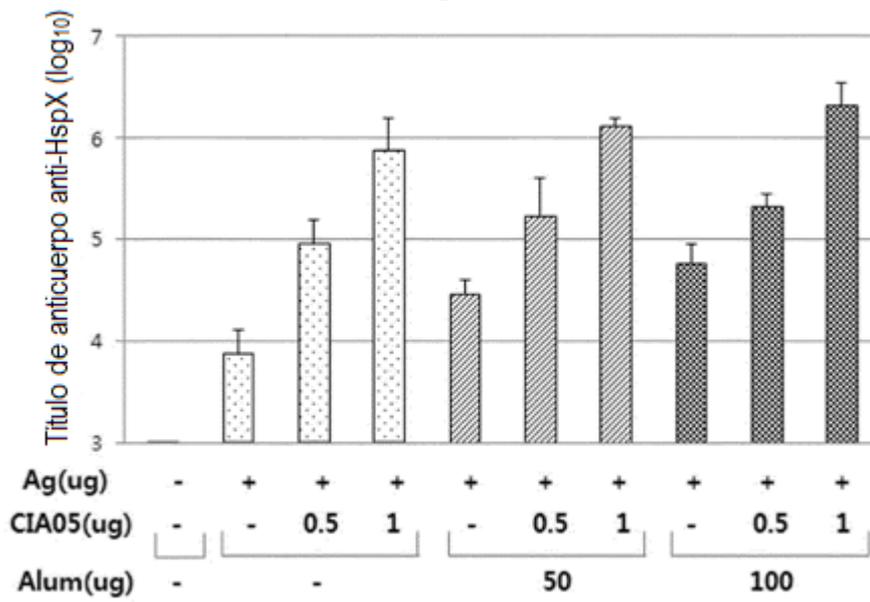


Fig. 2c

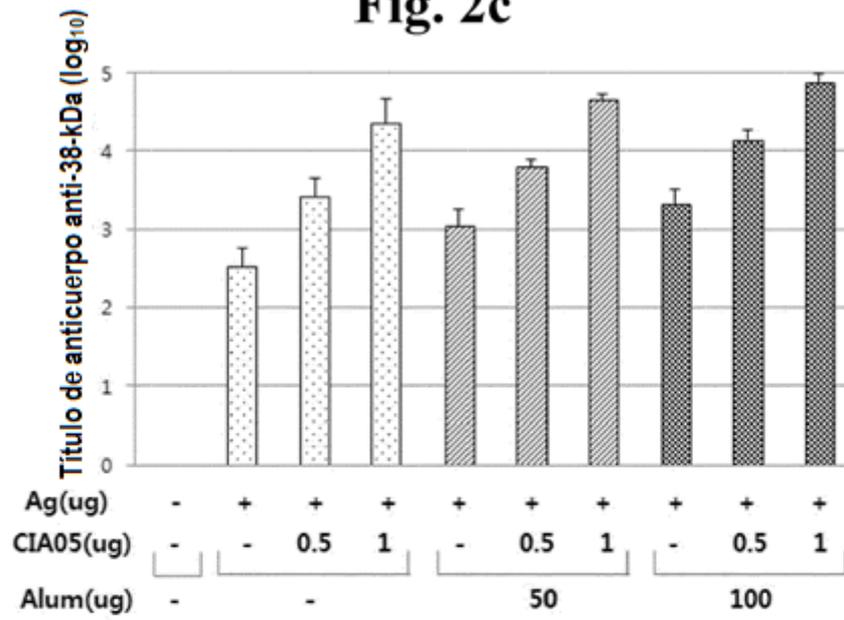


Fig. 2d

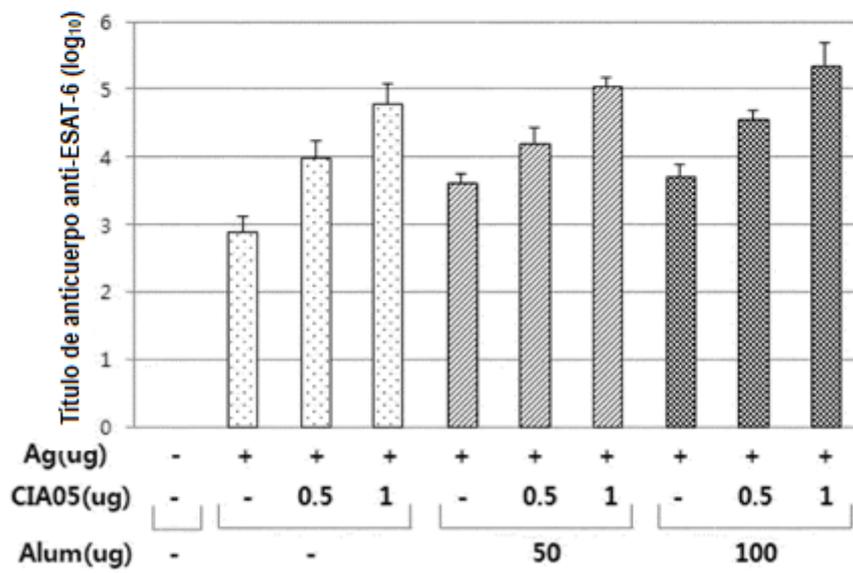


Fig. 2e

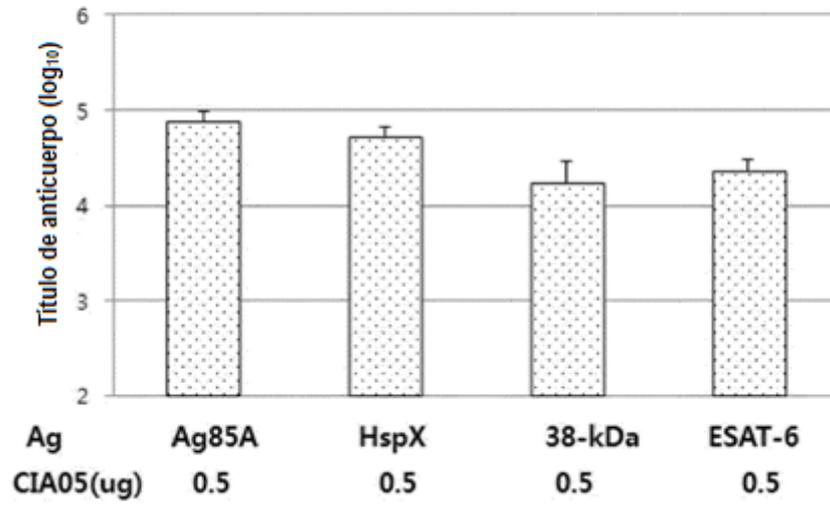


Fig. 3

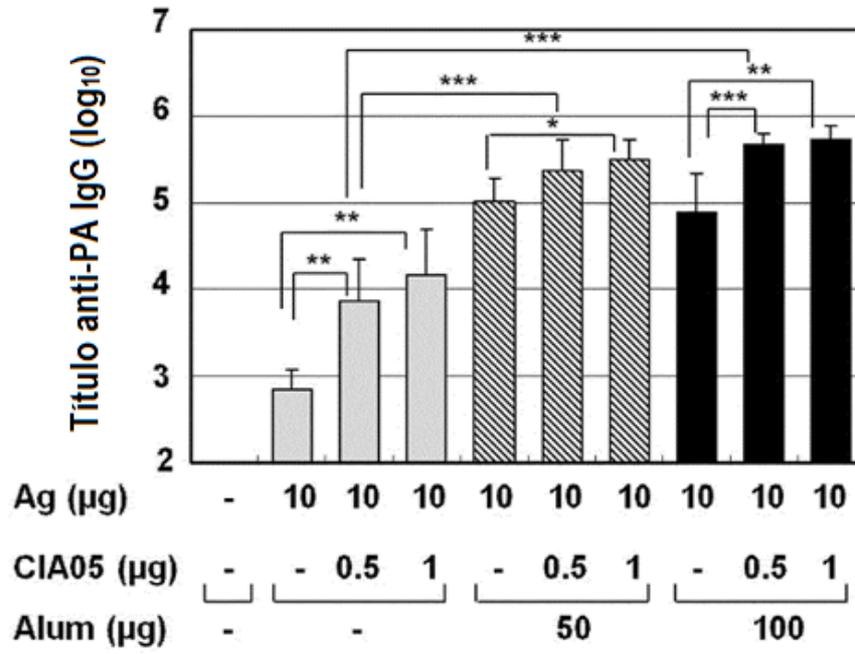


Fig. 4

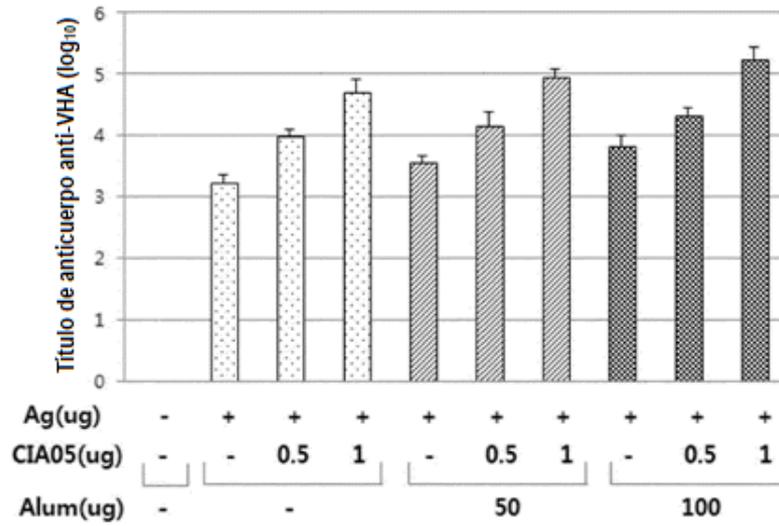


Fig. 5

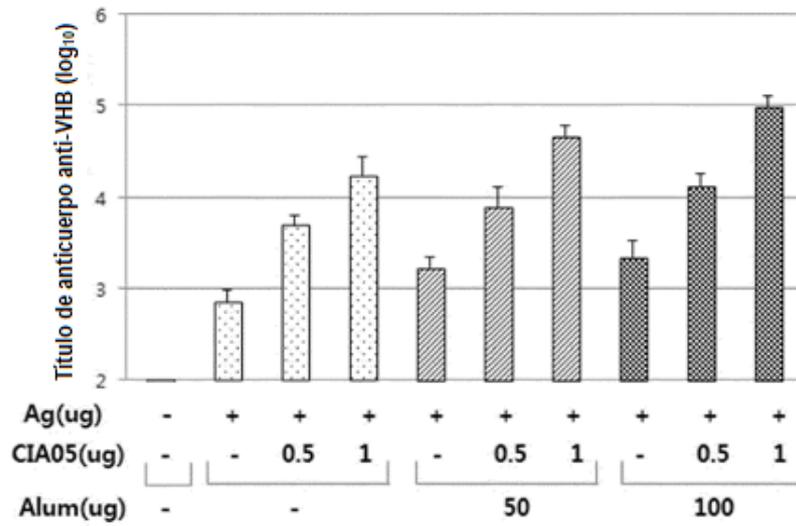


Fig. 6

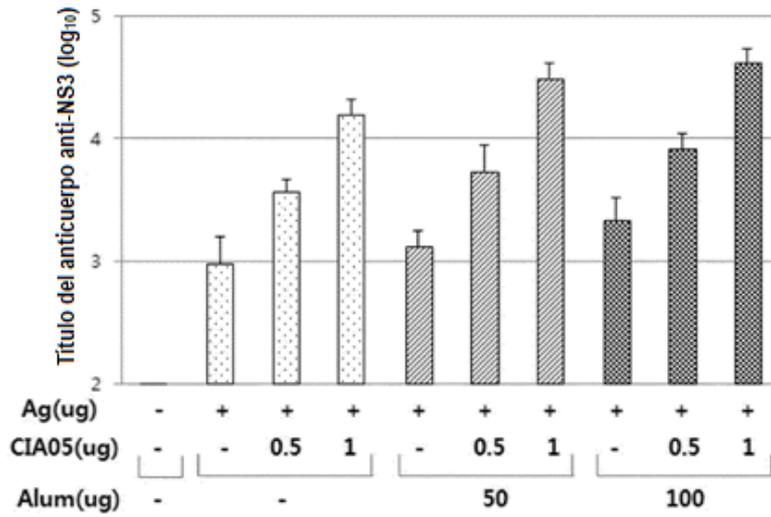


Fig. 7

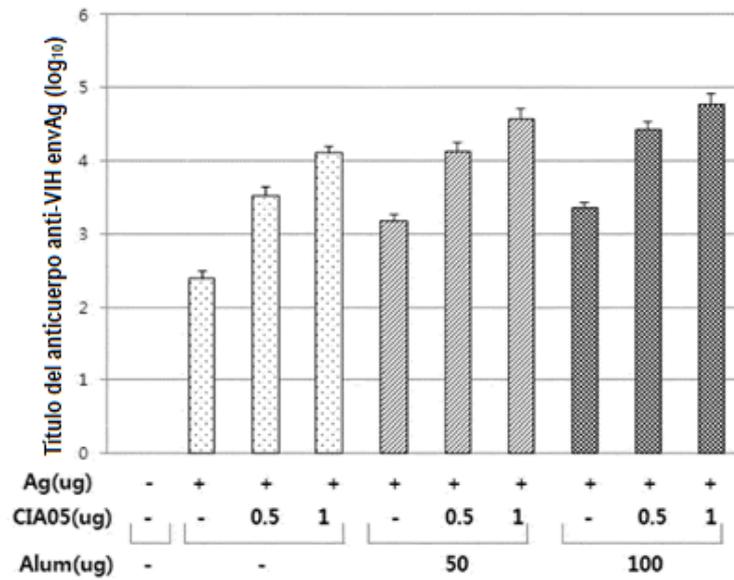


Fig. 8

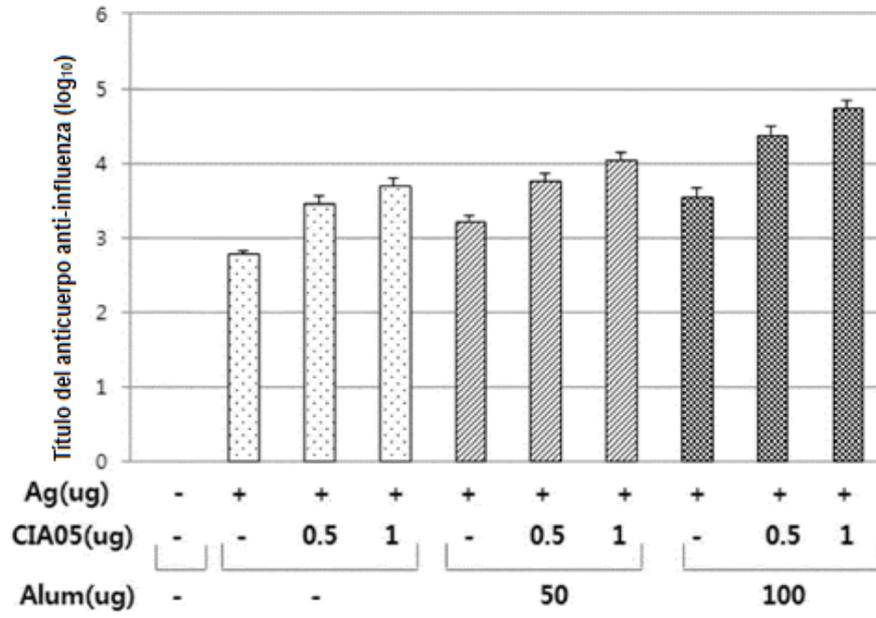


Fig. 9a

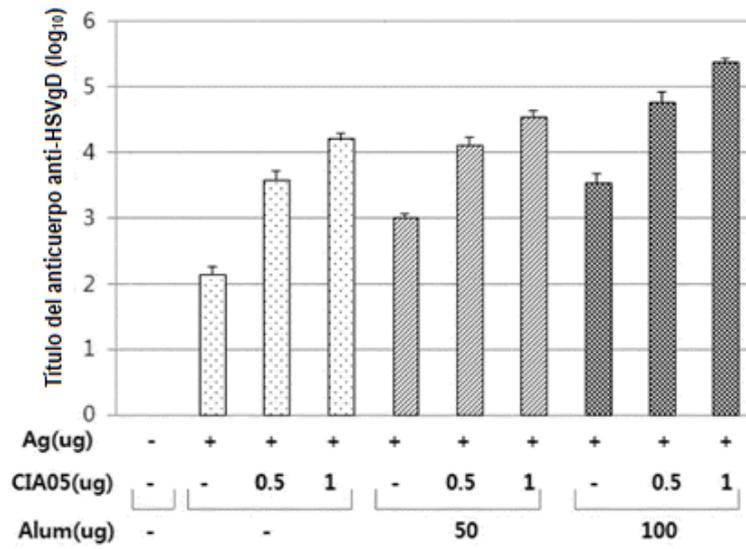


Fig. 9b

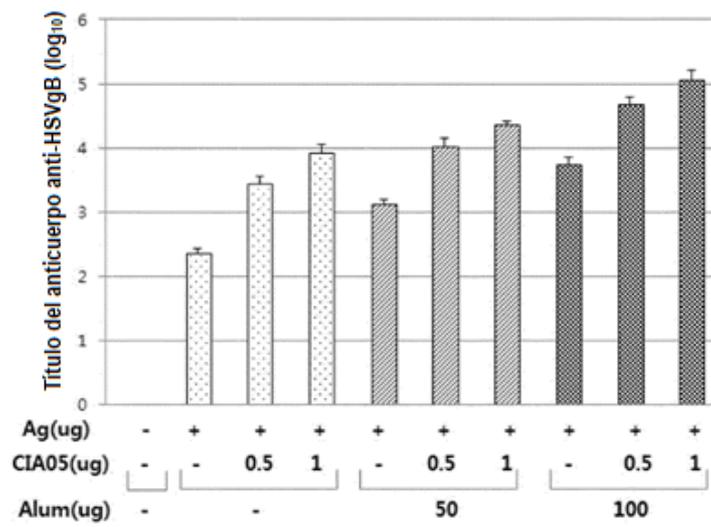


Fig. 9c

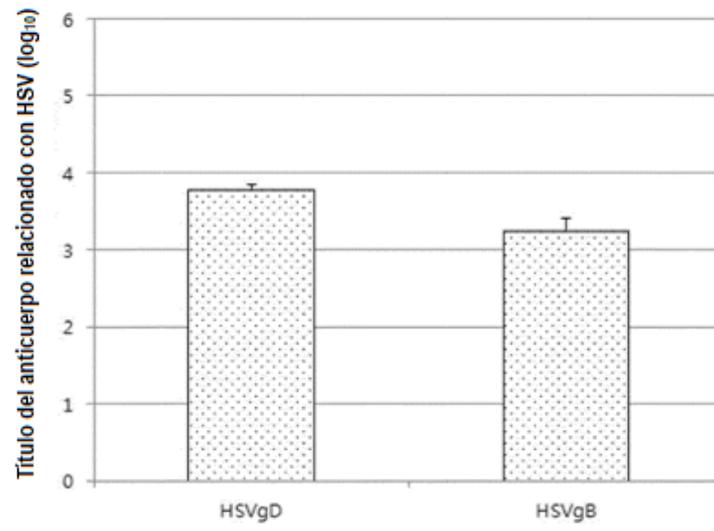


Fig. 10

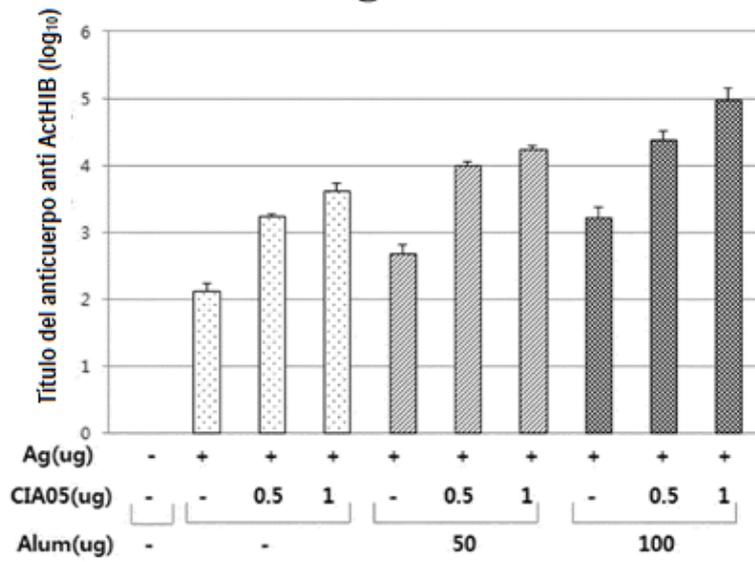


Fig. 11

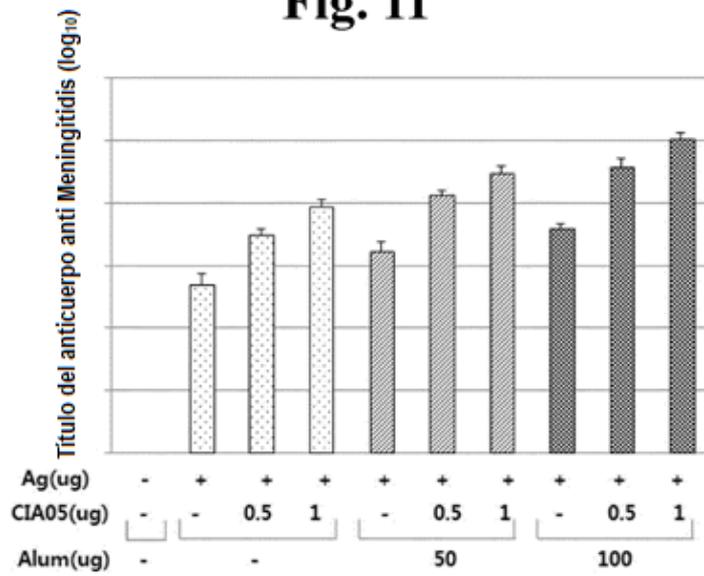


Fig. 12a

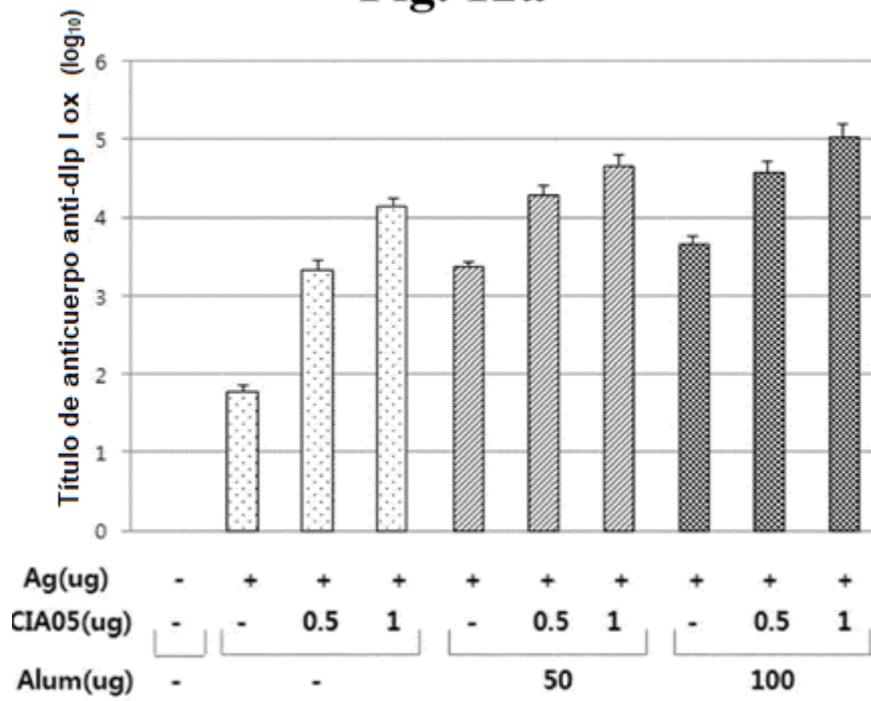


Fig. 12b

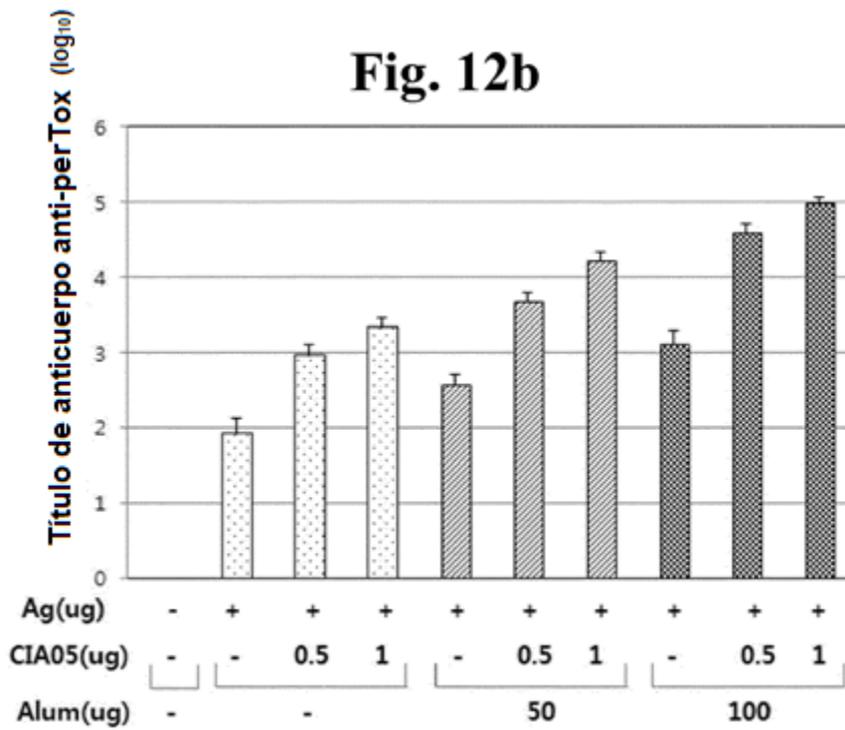


Fig. 12c

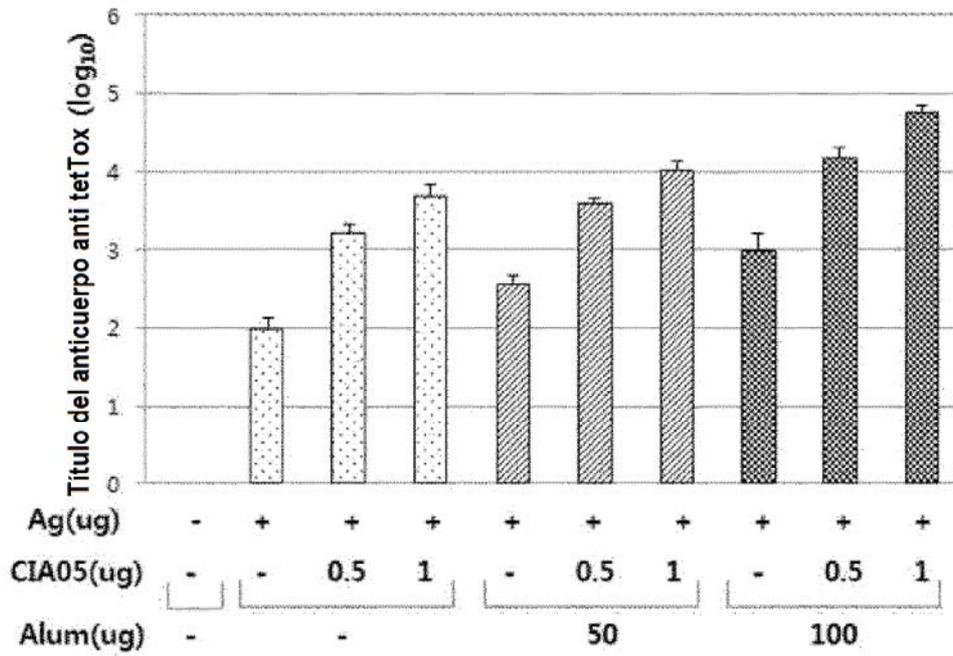


Fig. 12d

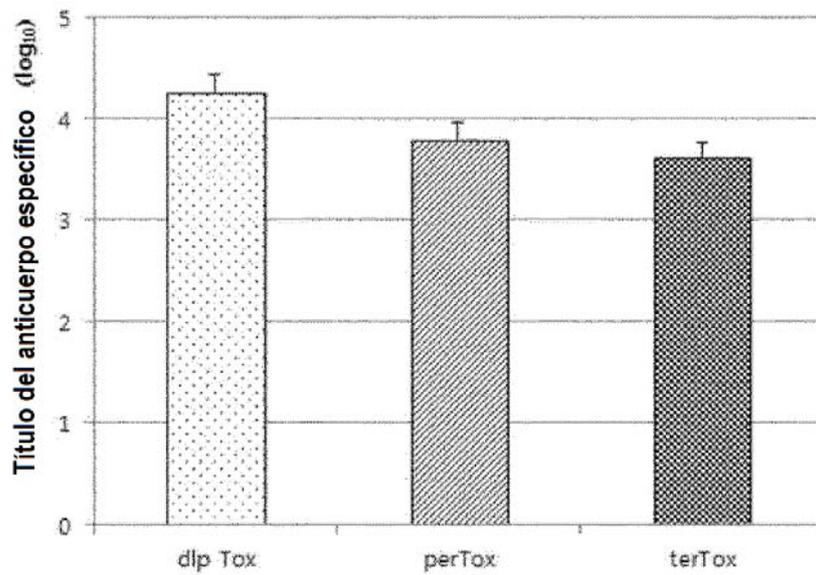


Fig. 13

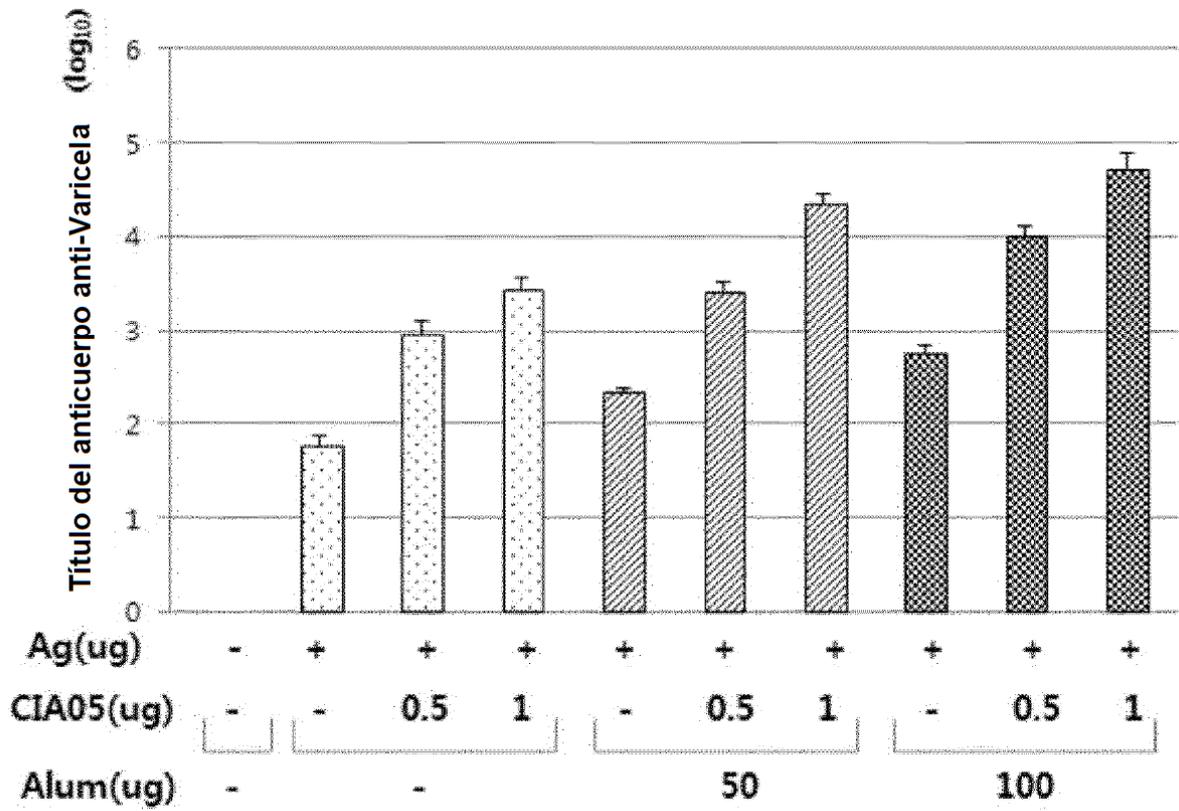


Fig. 14a

BMDC de murino

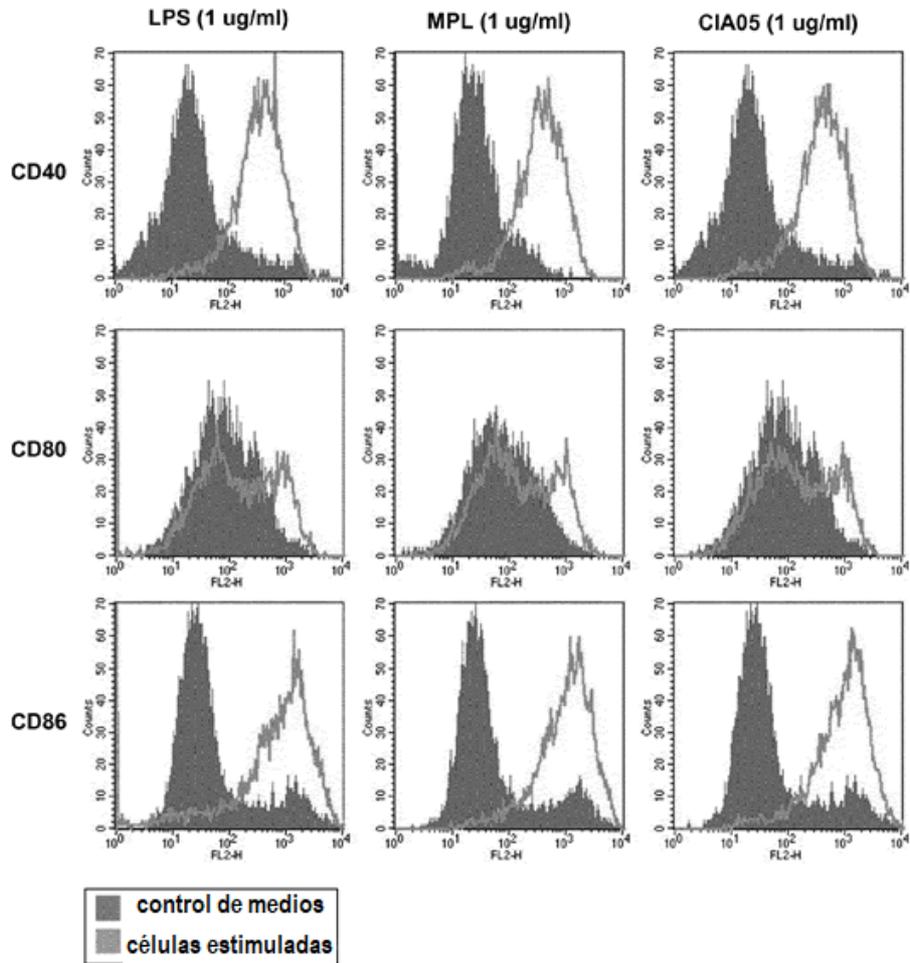


Fig. 14b

BMDC Humano

