



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 474**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03738849 .3**

96 Fecha de presentación : **07.07.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1539231**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

54 Título: **Preparación de iscom y su utilización.**

30 Prioridad: **05.07.2002 SE 2002102110**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.11.2009

73 Titular/es: **Isconova AB.**
Uppsala Science Park
Dag Hammarskjölds väg 54 A
751 83 Uppsala, SE

72 Inventor/es: **Morein, Bror y**
Lövgren Bengtsson, Karin

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 328 474 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

Preparación de iscom y su utilización.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden una mezcla de por lo menos dos complejos iscom o complejos de matriz iscom, comprendiendo cada uno de los compuestos una fracción de saponina de *Quillaja Saponaria Molina* y la utilización de los mismos como inmunomoduladores o adyuvantes en formulaciones para su utilización como en inmunizaciones comprendiendo vacunas. La presente invención se refiere especialmente a la utilización de fracciones purificadas, semipurificadas, o definidas de saponina de quillaja en iscom y en vacunas con adyuvante de matriz de iscom. La utilización de preparaciones de saponina según la presente invención resulta en productos con una tolerabilidad incrementada y una inmunogenicidad incrementada. Las preparaciones se pueden utilizar en procedimientos para ajustar la inmunogenicidad a un mayor control de las reacciones inflamatorias, de hipersensibilidad y alérgicas.

Técnica anterior

Las propiedades inmunoestimulantes de las saponinas de quillaja son ya conocidas (Ramon 1926) y las saponinas de quillaja se han utilizado libremente, a veces en combinación con $Al(OH)_3$ en vacunas comerciales desde los 1950s (Dalsgaard 1978, Ma *et al.*, 1994, Espinet 1951). Morein *et al.*, en 1984 describen una forma de utilización sustancialmente más eficiente de las saponinas de quillaja en comparación con las formas libres convencionales- la tecnología ISCOM (EP 0 109 942 B1, EP 0 242 380 B1 y EP 0 180 564 B1) y unos años más tarde la metodología de Matriz-ISCOM (Lövgren and Morein 1988, EP 0 436 620 B1). Utilizando la tecnología iscom los antígenos de las vacunas se incorporan en un complejo de 40 nm que comprende saponinas de quillaja, colesterol y fosfolípido(s). La tecnología de matriz-ISCOM utiliza saponinas de quillaja:colesterol:complejo de fosfolípido en una mezcla (no asociada) con el antígeno(s). Las dos metodologías reducen o eliminan la actividad hemolítica de las saponinas de quillaja, una propiedad que produce efectos secundarios locales y se suman a la toxicidad general de las preparaciones de saponinas de quillaja (Bonfod *et al.*, 1992).

Las preparaciones de saponinas de quillaja son mezclas heterogéneas de glicósidos con actividad de superficie y los serios problemas de encontrar/definir lotes con actividad adyuvante predecible y consistente condujeron al aislamiento y caracterización de una "fracción" homogénea referida como "*Quillaja Saponaria Molina*" (Dalsgaard, 1974). Dicha fracción se demostró más tarde que comprendía una gama de estructuras relacionadas que se purificaron todavía más en fracciones/picos mediante HPLC reversa (Kensil 1988, 1991, Kerten 1990 EP 0 362 279 B2, EP 0 555 276 B1). La motivación para esta purificación fue no solamente producir fracciones homogéneas de saponinas que fuesen fáciles de caracterizar y definir sino también definir un producto menos tóxico. La toxicidad aguda y los efectos secundarios han sido preocupaciones importantes en el uso veterinario y principalmente en el humano de las saponinas de quillaja en la preparación de vacunas. Estos objetivos tuvieron un éxito sólo parcial, las fracciones purificadas por ejemplo, QA-21 (EP 0 362 279 B2) y las combinaciones de las fracciones A y C (WO 96/11711, patente-Isotec) desde luego se definieron químicamente en comparación con "*Quillaja Saponaria Molina*" pero continuaron produciendo algo de toxicidad y efectos secundarios. A pesar del hecho de que la fracción A estaba virtualmente desprovista de toxicidad, una mezcla que comprendía un 70% de fracción A y un 30% de fracción C no era menos o solamente marginalmente menos tóxica que un 100% de fracción C de *Quillaja Saponaria Molina*.

En el trabajo que condujo a la presente invención se demostró también que las diferentes fracciones de saponinas de quillaja no solamente tenía diferentes toxicidades sino que también diferentes propiedades inmunoregulatoras (Johansson *et al.*, EP 0 362 279 B2). Mediante la combinación de estas fracciones se obtuvieron diferentes capacidades inmunoregulatoras, por ejemplo, un una capacidad inductora de Th1 o Th2. Sin embargo, es deseable reducir los efectos secundarios que limitan la cantidad de cada fracción que se debe utilizar en una formulación tolerable.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a la utilización de por lo menos dos picos purificados o fracciones definidas de saponinas de quillaja en iscom o matrices-iscom como entidades separadas (partículas). Es decir, estas fracciones no se combinan en las mismas partículas iscom o matrices-iscom, y las partículas con cargas diferentes se mezclan con el fin de constituir una formulación de inmunización. Sorprendentemente, ha ocurrido que una mezcla de iscom o matrices iscom que comprende cada una fracción deferente de *Quillaja Saponaria Molina* tiene una toxicidad inferior que cuando estas fracciones de *Quillaja Saponaria Molina* se integran en las mismas partículas iscom o matrices-iscom. Por ejemplo, la mezcla de matriz de fracción A y matriz de fracción C, o la utilización de matriz de fracción A o matriz de fracción C por si solas eran considerablemente menos tóxicas en ratones que cuando las mismas fracciones se integraban en la misma matriz iscom (Ejemplo 4, Tabla 1). Además, las propiedades inmunogénicas o inmunomoduladoras son fácilmente ajustables y se incrementan considerablemente las posibilidades de producir formulaciones de vacunas mejoradas optimizadas tanto para la especie diana como para las necesidades/requerimientos de los antígenos de las vacunas.

Los ratones son particularmente sensibles a las saponinas de quillaja y la sobredosis conduce a la muerte en 4 días, frecuentemente en 24 horas. Por consiguiente se utilizaron ratones con el fin de monitorizar los efectos tóxicos

e inmunogénicos de las formulaciones preparadas según la presente invención. Las oscilaciones entre especies en sensibilidad a la saponina de quillaja son enormes y reflejan la necesidad optimización de la especie con el fin de obtener formulaciones tolerables, pero también para controlar la obtención de una inmunogenicidad óptima en las formulaciones de las vacunas. Por ejemplo, los equinos no mueren con dosis muy elevadas de saponina de quillaja, pero son susceptibles de desarrollar fiebre y efectos secundarios locales después de la inyección de *Quillaja Saponaria Molina*, iscoms y matrices-iscom producidas con *Quillaja Saponaria Molina* o mezclas de fracciones de *Quillaja Saponaria Molina*.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden una mezcla de por lo menos dos complejos iscom cada uno de los cuales comprende esencialmente una fracción de saponina de *Quillaja Saponaria Molina*. El complejo de iscom puede ser una matriz iscom o un complejo iscom.

Iscom comprende por lo menos un glicósido, por lo menos un lípido y por lo menos un tipo de sustancia anfígena. El lípido es por lo menos un esteroles tal como colesterol y opcionalmente también fosfatidilcolina. Este complejo también puede comprender uno o más de otras sustancias inmunoreguladoras (activas como adyuvantes), y se puede producir tal como se describe en EP 0 109 942 B1; EP 0 242 380 B1 y EP 0 180 564 B1.

Una matriz iscom comprende por lo menos un glicósido y por lo menos un lípido. El lípido es por lo menos un esteroles tal como colesterol y opcionalmente también fosfatidilcolina. Los complejos iscom también pueden comprender una o más sustancias inmunoreguladoras (activas como adyuvantes) adicionales, no necesariamente una saponina y se pueden producir tal como se describe en EP 0 436 620 B1.

La composición según la presente invención puede comprender iscom o complejos de matrices iscom solos o mezclas de complejo iscom y complejo de matriz iscom. Se pueden mezclar diferentes iscoms y/o matrices iscom en las que se utilizan diferentes fracciones de saponina de *Quillaja Saponaria Molina*.

La presente invención comprende también la utilización de una mezcla de por lo menos dos complejos iscom y/o complejos de matrices iscom cada uno de ellos comprendiendo una fracción de saponina de *Quillaja Saponaria Molina* para la preparación de un fármaco inmunoregulador.

Otro aspecto de la presente invención es la utilización de una mezcla de por lo menos dos complejos iscom o complejos de matrices iscom según la reivindicación 1, cada uno de ellos comprendiendo una fracción de saponina de *Quillaja Saponaria Molina* y por lo menos un antígeno para la preparación de una vacuna.

Otro aspecto de la presente invención es la utilización de una mezcla de por lo menos dos complejos de matriz iscom según la reivindicación 1, cada uno de ellos comprendiendo una fracción de saponina de *Quillaja Saponaria Molina* para la preparación de un adyuvante.

El inmunógeno que se incorpora en, o se asocia con la matriz iscom de acuerdo con la presente invención puede ser una entidad química cualquiera que pueda inducir una respuesta inmune en un individuo tal como (pero sin que resulte limitativo) un ser humano u otro animal, comprendiendo, pero sin que resulte limitativo, una respuesta humoral y/o una respuesta inmune mediada por células a bacterias, virus, micoplasma u otros microorganismos. El inmunógeno específico puede ser una proteína o péptido, un carbohidrato, polisacárido, un lipopolisacárido o lipopéptido; o puede ser una combinación de los mismos.

En particular, el inmunógeno específico puede comprender una proteína nativa o un fragmento de proteína, o una proteína o fragmento de proteína o péptido sintéticos; puede comprender glicoproteína, glicopéptido, lipoproteína, lipopéptido, nucleoproteína, nucleopéptido; puede comprender un conjugado péptido-péptido; puede comprender un producto de expresión de ácido nucleico recombinante.

Los ejemplos de tales inmunógenos se mencionan en EP 0 109 942 B1 y comprenden, sin que resulten limitativos, los que pueden inducir una respuesta inmune contra la hepatitis vírica o bacteriana, influenza, difteria, tétano, pertusis, varicela, paperas, rubéola, polio, neumococos, herpes, virus sincítico respiratorio, hemofilus influenza, clamidia, virus varicela-zoster, virus de la rabia y virus de la inmunodeficiencia humana.

Los antígenos se pueden incorporar o acoplar al iscom o a la matriz iscom o mezclar con el iscom y/o matriz iscom. Se puede utilizar una mezcla cualquiera de tales iscoms matrices iscom. Se puede utilizar uno o más de tales antígenos y se puede utilizar un antígeno de transporte o pasajero tal como se describe en EP 9600647-3 (PCT/SE97/00289).

Los lípidos utilizados son particularmente los descritos en la patente de los solicitantes EP 0 109 942 B1 en particular en p. 3 y en la patente EP 0 436 620 B1 en p.7 líneas 7-24. En especial se utilizan los esteroides tales como colesterol y fosfolípidos tales como la fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina. Se pueden utilizar los receptores que comprenden lípidos que se unen a los componentes que se unen a las células, tales como los glicolípidos que comprenden el receptor de la toxina del cólera, que es el gangliósido GM1, y los antígenos fucosilados de los grupos sanguíneos. Los componentes que se unen a las células pueden entonces funcionar como moléculas que se dirigen a la mucosidad y se unen a las sustancias que comprenden lípidos simplemente mediante su mezclado con comple-

ES 2 328 474 T3

jos que los comprenden. Los complejos iscom que comprenden tales receptores y receptores se describen en WO 97/30728.

5 El término “una fracción de saponina de *Quillaja Saponaria Molina*” se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones como descripción genérica de una fracción de saponina semipurificada o definida de *Quillaja Saponaria* o una fracción sustancialmente pura. Es importante que la fracción no comprenda lo suficiente de las demás fracciones para afectar negativamente los buenos resultados que se obtienen cuando se utilizan mezclas de iscom o matrices iscom que comprenden esencialmente una fracción. La preparación de saponina puede, si se desea, comprender cantidades inferiores a por ejemplo hasta el 40% en peso, tal como hasta el 30% en peso, hasta el 25% en peso, hasta el 20% en peso, hasta el 15% en peso, hasta el 10% en peso, hasta el 7% en peso, hasta el 5% en peso, hasta el 2% en peso, hasta el 1% en peso, hasta el 0,5% en peso, hasta el 0,1% en peso de otros compuestos tales como otras saponinas u otros materiales adyuvantes.

15 Las fracciones de saponina según la presente invención pueden ser las fracciones A, B y C descritas en WO 96/11711, las B3, B4 y B4b descritas en EP 0 436 620, las fracciones QA1-22 descritas en EP 0 362 279 B2, Q-VAC (Nor-Feed, AS Denmark), *Quillaja Saponaria Molina* Spikoside (Isonova AB, Ultunaallén 2B, 756 51 Uppsala, Sweeden).

20 Se pueden utilizar las fracciones QA-1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17-18-19-20-21 y 22 de EP 0 362 279 B2, especialmente QA-7, 17-18 y 21. Éstas se obtienen tal como se describe en EP 0 362 279 B1, especialmente en la página 6 y en el Ejemplo 1 en las páginas 8 y 9.

25 Las fracciones A, B y C descritas en WO 96/11711 se preparan a partir de la fracción lipófila obtenida en la separación cromatográfica del extracto crudo de *Quillaja Saponaria Molina* y elución con 70% acetonitrilo en agua para recuperar la fracción lipófila. Esta fracción lipófila se separa a continuación mediante HPLC semipreparativa con elución utilizando un gradiente entre 25% y 60% de acetonitrilo en agua ácida. La fracción referida en la presente memoria como “Fracción A” o “QH-A” es, o corresponde a, la fracción, que eluye a aproximadamente 39% acetonitrilo. La fracción referida en la presente memoria como “Fracción B” o “QH-B” es, o corresponde a, la fracción, que eluye a aproximadamente 47% acetonitrilo. La fracción referida en la presente memoria como “Fracción C” o “QH-C” es, o corresponde a, la fracción, que eluye a aproximadamente 49% acetonitrilo.

30 Mediante la combinación de complejos iscom o de matrices iscom que comprenden diferentes fracciones de *Quillaja Saponaria Molina* es posible producir preparaciones que son menos tóxicas. También ocurre que el efecto de las composiciones parece estar mediado por receptores, es decir, receptores en las células (APC) presentadoras de antígenos que reconocen a los complejos. Así, cuando dos de dichas fracciones de *Quillaja Saponaria Molina* se integran en el mismo complejo iscom este complejo se puede unir a receptores con afinidad por la fracción 1 más a receptores con afinidad por la fracción 2, es decir dos grupos de receptores. Mientras que cuando las fracciones están en diferentes partículas iscom o partículas de matrices iscom, cada partícula se unirá al receptor(s) correspondiente y estará limitada a los receptores por los que tiene afinidad. Cuando la misma partícula dispara dos grupos de receptores en la APC se pueden producir efectos fuertes que resultan en efectos secundarios. Además, la forma en la que los complejos producen efecto a través de los receptores puede ser diferente en especies diferentes. Por consiguiente, se puede utilizar una combinación cualquiera en % en peso de complejos iscom basada en el contenido de diferentes fracciones de *Quillaja Saponaria Molina*.

45 La utilización de preparaciones de saponina según la presente invención resulta en productos con una tolerabilidad superior, inmunogenicidad incrementada. Las preparaciones se pueden utilizar en procedimientos para ajustar la inmunogenicidad, comprendiendo el control de la inflamación, la hipersensibilidad y las reacciones alérgicas. Este ajuste puede ser dependiente de la especie y puede afectar la toxicidad, tolerabilidad e inmunogenicidad.

50 Se puede utilizar una proporción cualquiera de subfragmentos de *Quillaja Saponaria Molina*. También se puede utilizar una combinación cualquier de subfragmentos de *Quillaja Saponaria Molina*. Así, dos o más subfragmentos se pueden integrar, cada uno de ellos, en un complejo iscom o complejo de matriz iscom y utilizado en la mezcla según la presente invención.

55 Se utilizan preferentemente mezclas de iscom y/o matriz en las que la fracción de *Quillaja Saponaria Molina* y fracción de Quil C se separan por separado en diferentes complejos iscom y/o matrices. Tal como se mencionó anteriormente se puede utilizar una combinación cualquiera en % en peso de los diferentes complejos iscom sobre la base de su contenido de fracción A y C de *Quillaja Saponaria Molina* respectivamente. Las mezclas pueden comprender entre 0,1 y 99,9% en peso, 5 y 95% en peso, 10 y 90% en peso, 15 y 85% en peso, 20 y 80% en peso, 25 y 75% en peso, 30 y 70% en peso, 35 y 65% en peso, 40 y 60% en peso, 45 y 55% en peso, 40 y 60% en peso, 50 y 50% en peso, 55 y 45% en peso, 60 y 40% en peso, 65 y 35% en peso, 70 y 30% en peso, 75 y 25% en peso, 80 y 20% en peso, 85 y 15% en peso, 90 y 10% en peso, 95 y 5% en peso, de complejo iscom que comprende fracción A de *Quillaja Saponaria Molina* (tal como se define en la presente memoria) y el resto hasta el 100% en cada uno de los casos de intervalo, de complejos iscom que comprenden fracción C de *Quillaja Saponaria Molina* (tal como se define en la presente memoria), calculado respecto al contenido de la suma de fracciones A y C de *Quillaja Saponaria Molina* en los complejos iscom.

ES 2 328 474 T3

La mezcla puede comprender entre el 75% y el 99,5% en peso de fracción A y entre el 0,5% y el 25% en peso de fracción C. Preferentemente, la mezcla comprende entre el 90% y el 99% en peso de fracción A y entre el 1% y el 10% en peso de fracción C. Una preparación particularmente preferida comprende entre aproximadamente el 91% y el 98% en peso de fracción A y entre aproximadamente el 2% y el 9% en peso de fracción C, especialmente entre aproximadamente el 92% en peso y el 96% en peso de fracción A y entre aproximadamente el 4% y el 8% en peso de complejos de fracción C calculado con respecto al contenido de la suma de las fracciones A y C de *Quillaja Saponaria Molina* en los complejos iscom.

Todos los intervalos mencionados anteriormente se pueden utilizar en una combinación cualquiera de cualesquiera fracciones de *Quillaja Saponaria Molina* en formulaciones para la administración a una especie cualquiera de animal o ser humano. Los ejemplos de especies animales a las que se pueden administrar las formulaciones según la presente invención son animales de compañía tales como gatos, perros, caballos, pájaros tales como loros, especies de importancia económica tales como ganado, por ejemplo especies bovinas, cerdos, ovejas, cabras. Preferentemente, se utiliza más del 50% en peso de fracción C en combinación con una cualquiera de las demás fracciones y especialmente en combinación con la fracción A. Así, se puede utilizar entre el 50,5% y el 99,5% en peso de C y entre el 0,5 y el 49,5% en peso de A.

Cuando se prepara tal como se describe en la presente memoria, las Fracciones A, B y C de *Quillaja Saponaria Molina* cada una de ellas representa grupos o familias de moléculas químicamente próximas con propiedades definibles. Las condiciones cromatográficas de su obtención son tales que la reproducibilidad entre lotes en términos del perfil de elución y actividad biológica es muy consistente.

La presente invención se extiende también a una composición de vacuna que comprende como componente activo de la misma (i) un iscom inmunogénico tal como se describió ampliamente anteriormente o (ii) una matriz iscom tal como se describió ampliamente anteriormente y por lo menos un inmunógeno, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y/o diluyentes.

La formulación de tales composiciones de vacuna es bien conocida por los expertos en la materia. Los vehículos farmacéuticamente aceptables y/o diluyentes comprende uno cualquiera y todos los disolventes convencionales, medios de dispersión, rellenos, vehículos sólidos, disoluciones acuosas, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y semejantes. La utilización de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocida en la técnica y se describe, como ejemplo, en Remington Pharmaceutical Sciences, 18ava edición, Mack Publishing Company, Pennsylvania, USA. Mientras un medio convencional o agente cualquiera no sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su utilización en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Los agentes activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Los complejos iscom o de matriz iscom según la presente invención que comprenden cada uno de ellos esencialmente una fracción de *Quillaja Saponaria Molina* se pueden administrar como una mezcla o por separado en el mismo lugar de administración o en diferentes lugares de administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes. Se pueden utilizar diferentes fracciones de *Quillaja Saponaria Molina* en los diferentes complejos iscom y complejos de matrices y en las diferentes composiciones.

La invención, por lo tanto, se refiere también a un equipo de partes que comprende por lo menos dos partes, en el que cada parte comprende un complejo iscom o un complejo de matriz iscom comprendiendo cada uno de los complejos una fracción de saponina de *Quillaja Saponaria Molina*. Se pueden utilizar diferentes fracciones de *Quillaja Saponaria Molina* en los diferentes complejos iscom y complejos de matriz iscom en las diferentes composiciones de las diferentes partes.

Las composiciones y el equipo de partes según la presente invención pueden también comprender por lo menos otro adyuvante a diferente de las fracciones de *Quillaja Saponaria Molina*. Estos adyuvantes se pueden mezclar con el iscom y/o los complejos de matriz iscom o estar integrados en los complejos.

Los ejemplos de otros adyuvantes que se pueden incorporar en el iscom y la matriz iscom son un adyuvante cualquiera, natural o sintético, con el efecto inmunomodulador deseado, por ejemplo, derivados de muramil dipéptido (MDP), tales como los ácidos grasos, MDP sustituido, análogos treonílicos de MDP; DDA, polianiones tales como sulfato de dextrano, lipopolisacáridos tales como saponinas (diferentes de Quil A). ("Future prospects for vaccine adjuvants", Warner, H.S. *CRC Crit. Rev. Immunol.*, 8:2, 83-101 (1988); "Characterization of non-toxic monophosphoryl lipid A", Johnson, A.G. *et al.*, *Rev. Infect. Dis.*, 9:5, 5512-5516 (1987); "Developmental status of synthetic immunomodulators", Berendt, M.J., *et al.*, *Year Immunol.*, 193-201 (1985); "Immuno-potentiating conjugates", Stewart-Tull, D.E., *Vaccine*, 85, 3:1 40-44.

Es especialmente ventajoso formular composiciones en formas de dosis unitarias para facilitar su administración y uniformidad de dosis. Forma de dosis unitaria, tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos humanos que se deben tratar; cada unidad comprende una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo y/o diluyente farmacéutico requerido.

ES 2 328 474 T3

Todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para provocar o inducir una respuesta inmune en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad inmunogénicamente efectiva de una composición de vacuna tal como se describió ampliamente anteriormente.

5 Tal como se mencionó anteriormente, los individuos pueden ser seres humanos u otros animales, que comprenden ganado (por ejemplo, ovejas, vacas o caballos) animales de laboratorio (por ejemplo, ratones, ratas, conejo o cobayas), animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos) o un animal salvaje.

10 Una cantidad inmunológicamente efectiva se refiere a la cantidad necesaria para obtener por lo menos en parte la respuesta inmunológica deseada, o para retardar la aparición, inhibir la progresión de, o detener por completo, la aparición o progresión de un trastorno que se está tratando. Esta cantidad oscila dependiendo de la salud y estado fisiológico del individuo que se debe tratar, el grupo taxonómico del individuo que se debe tratar, la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la valoración de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté comprendida en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar mediante ensayos de rutina.

15 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones siguientes, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, la palabra “comprende” o variaciones tales como “ello comprende” o “comprendiendo” se refieren a inclusión de un componente especificado o grupo de componentes pero no la exclusión de uno cualquiera de los componentes o grupo de componentes.

La presente invención se ilustra mediante las siguientes figuras de las cuales:

20 La Fig. 1 representa la preparación de las fracciones A, B y C mediante HPLC;

25 La Fig. 2 representa respuestas de anticuerpos específicos a antígenos contra micelas del virus de la influenza tal como se describe en la presente memoria, ensayadas mediante ELISA (Log. del título) en IgG1 subclase (A) e IgG2a (B). Se inmunizaron ratones (hembras NMRI) a las semanas 0 y 4 con la formulación de vacuna descrita en la Tabla 2, es decir., grupos 2 a 8. Los ratones se sangraron en las semanas 3 y 6. La respuesta de anticuerpos se ensayó en los sangrados recogidos en la semana 6.

30 La Fig. 3 representa la respuesta inmune celular medida como la producción de las citocinas IL-5 (A) e IFN- γ (B) de las células de bazo recogidas la semana 6 después de la inmunización tal como se describe en la Fig.2 después de estimulación *in vitro* con micelas de virus de la influenza tal como se describe en el texto.

35 La Fig. 4 muestra que una dosis elevada (50 μ g) de QHC en la matriz es tóxica, mientras que una dosis elevada de QHA en MATRIZ-ISCOM no es tóxica, cuando se suplementa a OVA con el fin de amplificar la respuesta de anticuerpos en ratones Balb/C (ver el texto). Las dos formulaciones amplifican anticuerpos específicos semejantes contra OVA tal como se midió a las 3 semanas después de la segunda inmunización, mediante ELISA de la respuesta de IgG total (A) y de la subclase IgG2a (B).

40 La Fig. 5 representa los efectos sinérgicos de matrices QHA y QHC cuando se suplementan a OVA con el fin de amplificar la respuesta de anticuerpos en ratones Balb/C (ver el texto). La dosis de matrices QHA y C estuvieron comprendidas como se expone a continuación en el grupo 1, ni A ni C; Gr. 2, 0,3 μ g de A no C; Gr. 3, 0,3 μ g A + 2 μ g C; Gr. 4, 10 μ g A no C; Gr. 5, 10 μ g A 2 μ g C. La dosis de OVA fue de 10 μ g. Hubo 8 ratones por grupo, que se inmunizaron s.c. dos veces separados por 4 semanas con las formulaciones respectivas. Los títulos de anticuerpo se midieron mediante ELISA contra:

45 A, IgG3 total 3 semanas después de la primera inmunización.

B, IgG2a dos semanas después de la segunda inmunización

C, IgG1 2 semanas después de la segunda inmunización.

50 Existe una diferencia altamente significativa entre los grupos 4 y 5 ($p < 0,0001$).

La totalidad de las publicaciones mencionadas en la presente memoria se incorporan como referencia. La presente invención será a continuación descrita mediante los ejemplos no limitativos siguientes.

60 Ejemplos

Ejemplo 1

65 *Preparación de subfragmentos de saponinas de Quillaja Saponaria Molina*

Purificación de extracto de *Quillaja Saponaria Molina* cruda en fracciones A, B y C.

ES 2 328 474 T3

Una disolución (0,5 ml) de extracto acuoso de *Quillaja Saponaria Molina* (0,5 g/ml) se pretrata en una columna sep-pack (Waters Associates, MA).

5 El pretratamiento implica lavar la columna sep-pack cargada con 10% acetonitrilo en agua ácida con el fin de eliminar las sustancias hidrófilas. Las sustancias lipófilas que comprenden QH-A, QH-B y QH-C se eluyen a continuación mediante 70% acetonitrilo en agua.

10 A continuación la fracción lipófila de la columna sep-pak se separa mediante columna HPLC semipreparativa (CT-sil, C8, 10X 250 mm, Chrom Tech, Sweden). A continuación se eluyen las muestras de la columna mediante un gradiente entre 25% y 60% acetonitrilo en agua ácida. Durante la separación se recogen 3 fracciones de la columna HPLC. Los residuos después de evaporar las tres fracciones constituyen QH-A, QH-B y QH-C.

15 Las fracciones designadas QH-A, QH-B y QH-C eluyeron a aproximadamente 39, 47 y 49% de acetonitrilo respectivamente. El perfil exacto de elución y las condiciones se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 2

Preparación de matriz iscom

20

Materiales

Colesterol, e.g., Sigma C 8503

25

Fosfatidilcolina (derivada de huevo) por ejemplo, Sigma P 3556

MEGA-10 (Bachem AG, Switzerland)

Fracciones A y C de saponina de Quillaja (patente WO9611711)

30

0,22 μ m Filtros estériles (Acrodisc)

PBS (10 mM disolución salina 150 mM tamponada con 10 mM fosfato, pH 6,8 a 7,4)

35

Casetes Slide-A-Lyzer, MW de corte 12 a 14.000 (Pierce)

MEGA-10 (disolución madre)

40 Preparar una disolución madre 20% (peso/peso) añadiendo 8 ml de agua destilada a 2,0 g de MEGA-10 sólido. Disolver mediante un calentamiento ligero (30 a 50°C). Filtrar a través de un filtro estéril de 0,22 μ m, alícuotar y almacenar a -20°C.

Mezcla de lípido (15 mg/ml)

45 Disolver 100 mg cada uno de colesterol y fosfatidil colina en 10 ml de 20% MEGA-10. Los lípidos se disuelven lentamente a entre 30 y 60°C con agitación ligera. Filtrar a través de un filtro estéril de 0,22 μ m, alícuotar y almacenar a -20°C. Después de congelar, la mezcla de lípidos necesita ser calentada a 40°C hasta que se aclara. Atemperar todas las disoluciones a $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

50 Disoluciones madre de saponina (100 mg/ml)

Se disuelve en agua estéril 1,0 g de fracciones de *Quillaja Saponaria Molina* (A o C). Mantener las alícuotas congeladas a -20°C. Filtrar a través de un filtro estéril de 0,22 μ m, alícuotar y almacenar a -20°C.

55

Las diferentes matrices iscom se preparan tal como se describe en la Tabla 1.

Preparar las mezclas como se expone a continuación:

Añadir 2 ml PBS a un tubo Falcon de 50 ml,

60

1. añadir la mezcla de lípidos y mezclar completamente

2. añadir saponina y mezclar completamente

65

3. añadir PBS hasta un volumen final de 12,0 ml, mezclar por completo

4. incubar durante 30 minutos

ES 2 328 474 T3

5. cargar en el Slide-A-Lyzer
6. dializar contra 4 cambios de 2 litros de PBS ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) (durante entre 48 y 60 horas)
7. aspirar del Slide-A-Lyzer y filtrar a través de un filtro estéril de 0,22 μm .

La formación de matriz iscom se verificó mediante microscopía electrónica con tinción negativa y la concentración de saponina de quillaja se determinó mediante HPLC.

TABLA 1

preparación	Mezcla de lípidos		Saponina de quillaja		PBS
	Cantidad (mg)	Volumen (μl)	Cantidad (mg)	Volumen (μl)	Volumen (ml)
Matriz-A	12	800	48	480	2,0 + 8,72
Matriz-C	12	800	30	300	2,0 + 8,90
Matriz-703	12	800	42	420	2,0 + 8,78

Ejemplo 3

Preparación de micelas de proteína PR-8

1. Diluir 12 mg de monómero PR-8 (1,5 mg/ml) con PBS a una concentración final de proteína de 1,0 mg/ml
2. Filtrar a través de un filtro estéril de 0,22 μm
3. Cargar en el Slide-A-Lyzer
4. Dializar contra 4 cambios de 2 litros de PBS ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) (durante entre 48 y 60 horas)
5. Aspirar del Slide-A-Lyzer

Ejemplo 4

Estudio de inmunización

Este ejemplo se realizó con el fin de demostrar en un estudio comparativo que la matriz iscom compuesta de una mezcla de partículas de matriz provoca un mínimo grado de efectos secundarios. Un conjunto de partículas comprendió QHA como la única saponina y el otro conjunto de partículas comprendió QHC como la única saponina y se prepararon según el Ejemplo 2. Esta formulación se designa matriz con una "mezcla de partículas". La comparación se hace con una matriz iscom tal como se describe en la patente WO 96/11711, es decir, cada partícula comprende tanto QHA como QHC en, por ejemplo, una proporción del 70% QHA y 30% QHC. Esta es una "matriz con todo en una partícula".

Se inmunizaron ratones Balb/C en los días 0 y 42 con 1 μg de micelas PR8 (preparadas tal como se describe en el Ejemplo 3) mezcladas con la formulación de matriz iscom "matriz con una mezcla de partículas" y se comparó con la matriz iscom "matriz con todo en una partícula", o con matriz iscom que comprende 100% QHA o 100% QHC tal como se describe en la Tabla 2. Los grupos en los que más del 50% de los ratones murieron o sufrieron efectos secundarios inaceptables debidos al tratamiento se eliminaron y excluyeron de posterior investigación.

Se extrajeron muestras de suero de todos los ratones en los grupos 1 a 7 en el día 56, dos semanas después de la administración de la dosis de recuerdo. El suero se cribó para determinar anticuerpos de las subclases IgG1 (A) e IgG2a (B) específicos al antígeno. El grupo 8 en la figura representa los ratones no vacunados. Los resultados se muestran en la Fig. 2.

Después del segundo sangrado se extrajeron los bazo de dos ratones por grupo (grupos 2, 4, 5, 6 y 7). Las células de los bazo se estimularon con micelas PR8 *in vitro* y se midió la inducción antígeno específica de IL-5 (A) e IFN- γ (B). El grupo 8 en la figura representa los ratones no vacunados. Los resultados se muestran en la Fig. 3.

ES 2 328 474 T3

TABLA 2

5

10

15

20

25

30

Grupo nº	Cantidad (µg)	Proporción (A/C)	Mezcla/CONV	Nº de ratones	# muertos/total
1	50	80:20	MIX	8	2/8
2	50	92:8	MIX	8	0/8
3	50	96:4	MIX	8	0/8
4	50	100% A		8	0/8
5	10	100% A		8	0/8
6	10	100% C		8	0/8
7	10	70:30	CONV	8	0/8
8	50	80:20	CONV	8	8/8
9	50	92:8	CONV	8	6/8
10	50	96:4	CONV	8	5/8
11	50	70:30	CONV	8	8/8
12	50	100% C		8	8/8

Los ratones sacrificados o que murieron en las 24 h después de la administración.
A:C proporción (en peso) de las fracciones A y C de saponina de quillaja

Resultados

35

Los ratones inmunizados con micelas PR8 adyuvadas con una dosis elevada (50 µg) matriz iscom con 80% QHA y 20% QHC, es decir, 10 µg, murieron en entre 1 y 2 días. Del mismo modo, los ratones inmunizados con 50 µg de formulación 100% QHC murieron en 2 días.

40

Por el contrario, los ratones inmunizados con 50 µg de formulación 100% QHA sobrevivieron sin reacciones adversas notables. Es decir, la dosis inferior de QHC fue suficiente para matar los ratones cuando se incorporó en las mismas partículas de matriz que QHA (grupo CONV 8 en la Tabla 2). Incluso cuando se combinó una pequeña cantidad, 4 µg (8%) de QHC con 46 µg (92%) de QHA en una matriz CONV murieron 6 de 8 ratones (grupo 9, Tabla 2). También, 2 µg (4%) de QHC mató los ratones cuando se combinó con QHA en matriz CONV (grupo 10, Tabla 2). Los ratones del grupo 6 (Tabla 2) recibieron 10 µg de QHC (100%) (es decir, no QHA) en la matriz y todos los ratones sobrevivieron.

45

Así, los ratones fueron más sensibles a QHC cuando estaba en combinación con QHA en las mismas partículas de matriz CONV (grupos 8, 9 y 10).

50

Los ratones que recibieron dosis bajas de matriz, es decir, 10 µg de saponina total dividida en 70% de QHA y 30% QHC sobrevivieron todos. En este caso los ratones recibieron 3 µg de QHC.

55

Los ratones inmunizados contra micelas PR8 adyuvadas con una formulación comprendiendo diferentes partículas de matriz, es decir, una mezcla de partículas (MIX) que comprendió un conjunto QHA y otro conjunto QHC sobrevivieron dosis muy superiores de esta formulación de matriz que de la formulación CONV. Los ratones inyectados con la formulación con un 92% QHA (46 µg) y 8% QHC (4 µg) grupo 2 de la Tabla 2 (92:8) o con la formulación 96:4 (grupo 3, Tabla 2) comprendiendo 2 µg de QHC sobrevivieron todos. Este resultado se debe comparar con el de la cantidad correspondiente de QHA y QHC en la matriz CONV (grupos 9 y 10, Tabla 2) que provocó una elevada mortalidad. Así, la mortalidad-oxicidad se puede evitar mediante la separación física de QHC de QHA y distribuyéndolas entre diferentes partículas de matriz.

Amplificación de la respuesta de anticuerpo

60

65

Los resultados se representan en la Fig. 2. La respuesta específica al antígeno se dividió entre las subclases de IgG. Se inmunizaron ratones (hembras NMRI) en las semanas 0 y 4 con las formulaciones de vacuna descritas en la Tabla 2. Los ratones se sangraron en las semanas 3 y 6. La respuesta de IgG1 (log₁₀ título ELISA) en la semana 6 se muestra en A y la respuesta IgG2 correspondiente en B.

Un descubrimiento importante en este experimento es que la capacidad de amplificación inmune se mantiene o amplifica tal como se mide por la respuesta de anticuerpo cuando QHA y QHC se separa en diferentes conjuntos de partículas, tal como se demuestra en la Fig. 2.

5 En la Fig. 2 se muestra que una mezcla de partículas (MIX) amplifica al mismo nivel el anticuerpo IgG1 (Fig. 2A) a las micelas PR8 que la misma dosis de QHA y QHC en la misma proporción cuando están incorporadas en la misma partícula, es decir, partículas CONV. Sin embargo, se amplificaron niveles superiores de anticuerpos IgG2a por la formulación MIX (Fig. 2B). Los grupos 2 y 3 (MIX) se deben comparar con los grupos 9 y 10 (CONV) matriz QHA-QHC y con 100% QHC de dosis baja de matriz (grupo 6) y con 100% de QHA dosis elevada de matriz (grupo 4, 10 Tabla 2). Los ratones en el grupo 7 inyectados con un dosis baja de 10 μg (CONV 70:30), es decir, la dosis que pueden aceptar los ratones, respondieron con una potente respuesta IgG1 (Fig. 2A), pero un respuesta IgG2a baja (Fig. 2B).

Por consiguiente, la presente invención con una formulación de matriz con una mezcla de partículas de matriz se puede administrar en dosis elevadas evitando los efectos secundarios, incrementando la respuesta de anticuerpo a niveles superiores que los que se obtienen con la matriz CONV. En particular, la respuesta IgG2a se amplifica. La respuesta IgG2a es, por ejemplo, particularmente importante en la defensa contra los parásitos intracelulares, por ejemplo, virus.

20 *Amplificación de la respuesta inmune mediada por células*

Las formulaciones de matriz CONV tienen una capacidad inferior para amplificar la respuesta inmune mediada por células en dosis toleradas en formulaciones de matriz MIX (Fig. 3A y B). La formulación MIX (92:8, grupo 2) amplificó niveles considerablemente superiores de IL-5 que la CONV (70:30, grupo 7), la formulación QHA-QHC o la matriz 100% QHC, formulación (grupo 6). La formulación mezcla (92:8, grupo 9) también amplifica la IFN- γ 25 considerablemente mejor que la matriz QHC 100% (grupo 6) o la formulación CONV (70:30, grupo 7).

Se debe subrayar que QHA tiene una elevada capacidad para incrementar la respuesta inmune mediada por células tal como se mide la producción de IL-5 e IFN- γ , pero una baja capacidad para amplificar la respuesta de anticuerpos.

30 En conclusión, la presente invención define un concepto para las formulaciones iscom y de matriz iscom que reduce considerablemente la toxicidad y efectos secundarios permitiendo dosis potentes de las moléculas activas del adyuvante sin perder la capacidad para amplificar la respuesta inmune.

Además, mientras que una baja, pero aceptable, dosis de formulación de matriz QHC tiene una buena capacidad para amplificar una respuesta IgG1, es más baja con respecto a la IgG2a más importante. La capacidad de la matriz QHC para inducir inmunidad mediada por células también es comparativamente más baja que la de la invención.

La potencia de la matriz QHA amplifica la inmunidad mediada por células, pero es inferior a la invención en amplificar la respuesta inmune mediada por anticuerpos.

40 La presente invención con partículas de matriz mezcladas es superior a las formulaciones de matriz que comprenden QHA o QHC en la misma partícula (CONV) medida mediante la respuesta de anticuerpos IgG2a y medida por las respuestas mediadas por células.

45 La nueva invención amplifica una respuesta inmune completa y es por consiguiente superior a las formulaciones de matriz descritas anteriormente, como demuestra el ejemplo 4.

50 *Ejemplo 5*

En el presente experimento se hace énfasis en que QHA se tolera bien y tiene una fuerte capacidad de amplificación de la respuesta inmune e inmunomoduladora. Se utiliza la ovalbúmina (OVA) debido a que es un antígeno débil y como tal no induce una respuesta de tipo Th1. Se compara QHA con QHC, ya que el último se evalúa en el ensayo clínico humano.

55 *Materiales y métodos*

La preparación de los subfragmentos de *Quillaja Saponaria Molina* se describe en el Ejemplo 1.

60 La preparación de matriz iscom se describe en el Ejemplo 2.

Diseño experimental

65 El grupo 1 comprende 8 ratones inmunizados dos veces subcutáneamente, separadas por 4 semanas, con 10 μg OVA adyuvada con 50 μg de QHA. El grupo 2 comprendió el mismo número de ratones inmunizados mediante el mismo procedimiento pero el adyuvante fue 50 μg de QHC.

Las respuestas de anticuerpo mostradas lo son del suero recogido 2 semanas después de la dosis de recuerdo.

Determinación de anticuerpo

Las respuestas de anticuerpo específicas a OVA en el suero se determinaron por ELISA tanto para la respuesta de IgG total como para la respuesta de la subclase IgG2a, tal como se describe en el Ejemplo 4, utilizando un procedimiento estándar con 10 µg de OVA por ml para recubrir las placas ELISA como antígeno de ensayo.

Resultados

Todos los ratones inmunizados con OVA adyuvado con matriz QHA sobrevivieron y no desarrollaron signo alguno de incomodidad. De los 8 ratones inmunizados con OVA adyuvado con matriz QHC murieron, 4 ratones, es decir el 50%.

No hubo diferencia significativa entre los grupos con respecto a la respuesta total de anticuerpos (Fig. 4 A), pero los títulos ELISA oscilaron más entre los animales en el grupo 1, es decir los ratones inmunizados con QHA.

No hubo diferencia en la media de los títulos en la subclase de IgG2a entre el grupo 1 y el grupo 2 excepto que los títulos de ELISA oscilaron más entre los animales individuales en el grupo 2, es decir, los ratones inmunizados con QHC (Fig. 4 B).

En el segundo experimento del presente ejemplo se exploró si la matriz QHA se podía beneficiar de complementación con otro adyuvante. La dosis de matriz QHA y matriz C osciló como se expone a continuación en el grupo 1, no A o C; Gr. 2, 0,3 µg A no C; Gr. 3, 0,3 µg A + 2 µg C; Gr. 4, 10 µg A no C; Gr. 5, 10 µg A, 2 µg C. La dosis de OVA fue de 10 µg. Hubo 8 ratones por grupo, que se inmunizaron dos veces separadas por 4 semanas, s.c. con las respectivas formulaciones (Figs. A, B y C).

Se recogió suero 3 semanas después de la primera inmunización y 2 semanas después de la dosis de recuerdo.

Las respuestas de anticuerpo específicas a OVA se determinaron mediante ELISA para la respuesta total de IgG y para las subclases de IgG2a e IgG1 tal como se ha descrito [Johansson, M and Lövgren-Bengtsson, Iscoms with different quillaja saponin components differ in their immunomodulating activities. *Vaccine* 19, 2894-2900 (1999)].

Resultados

Después de la primera inmunización no se registró respuesta de anticuerpo alguna en los ratones que no recibieron OVA adyuvada u OVA adyuvada con 0,3 µg de matriz QHA con y sin 2 µg de matriz QHC (Fig. 5A).

Después de la segunda inmunización se detectó una baja respuesta en 3 de 8 ratones inmunizados con OVA no adyuvada en la subclase IgG1 pero no se registró respuesta en la subclase IgG2a. Tampoco se registró respuestas de anticuerpo con las dosis más bajas de adyuvante de matriz QHA, es decir, 0,3 µg con y sin 2 µg de matriz QHC. Se produjo una clara amplificación de la respuesta de anticuerpo en la subclase IgG2a cuando la baja dosis de QHC se añadió a los 10 µg de QHA (Fig. 5B).

Conclusión

La matriz QHA tiene un bajo nivel de toxicidad y aun así un elevado efecto modulador, cuando se incluye en ISCOMATRIX como se muestra mediante la promoción de una fuerte respuesta de tipo TH1, contrariamente al OVA no adyuvado o muy poco adyuvado, que solamente indujo respuestas de anticuerpo en la subclase IgG1. También se demuestra que la matriz QHA presenta sinergia con una baja dosis de matriz QHC. Estos resultados son importantes, porque posibilitan optimizar el efecto adyuvante y minimizar los efectos secundarios de una forma sencilla. Tal como se muestra para un antígeno débil tal como OVA que requiere un adyuvante potente.

Bibliografía

Bomford, R., Stapleton, M., Wnsor, R., Beesley, J.E., Jssup, E.A., Price, K.R. and Fenwick, G.R., Adjuvanticity and iscom formation by structurally diverse saponins, *Vaccine* 10, 572-577 (1992).

Cox, J.C. and Coulter, A.R. (1992). Advances in adjuvant technology and application, in *Animal parasite control utilizing biotechnology*, Chapter 4, Ed. Yong, W.K., *CRC Press*.

Dalsgaard, K., *Arch. Gesamte Virusforsch.*, 44, 243 (1974).

Dalsgaard, K. A study on the isolation and characterisation of the saponin *Quillaja Saponaria Molina*. Evaluation of its adjuvant activity with special reference to the application in foot-and-mouth disease. *Acta Vet. Scand.*, 69 (Suppl.), 1-40 (1978).

Espinet, R. G. Nuevo tipo de vacuna antiaftosa a complejo glucovirico. *Gac. Vet.* 74, 1-13 (1951).

ES 2 328 474 T3

Johansson, M., Lovgren-Bengtsson, K. Iscoms with different quillaja saponin components differ in their immunomodulating activities. *Vaccine*. 17, 2894-2900 (1999).

Kensil, CA, et al., International Patent Application No. PCT1US88101842 (1988).

5

Kensil, CA et al., *J. Immunol.*, 146, 431 (1991).

Kersten, G. FA et al (1990). "Aspects of Iscoms. Analytical, Pharmaceutical and Adjuvant Properties; Thesis, University of Utrecht.

10

Lövgren, K. and Morein, B., The requirement of lipids for the formation of immunostimulating complexes (iscoms). *Biotechnol. Appl. Biochem.* 10, 161-172 (1988).

Ma, J., Bulger, P. A, Davis, D. R, Perilli-Palmer, P., Bedore, D. A, Kensil, C. R., Young, E. M., Hung, C. H., Seals, J. R. and Pavia, C. S. Impact of the saponin adjuvant QS-21 and aluminium hydroxide on the immunogenicity of recombinant OspA and OspB of *Borrelia burgdorferi* L *Vaccine* 12, 925-932 (1994).

15

Ramon, G., Procédés pour accroître la production des antitoxines. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris 40,1-10 (1926).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende por lo menos dos complejos iscom diferentes, comprendiendo cada uno de los complejos diferentes una fracción de saponina de *Quillaja Saponaria Molina*, en la que la fracción de saponina en un complejo es diferente de la fracción de saponina en el otro complejo, presentando actividad inmunomoduladora, actividad adyuvante amplificada y toxicidad reducida.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, en la que las partículas iscom son complejos iscom.
3. Composición según la reivindicación 1, en la que las partículas iscom son complejos de matriz iscom.
4. Composición según la reivindicación 1, en la que las partículas iscom son complejos iscom y complejos de matriz iscom.
- 15 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además por lo menos otro adyuvante diferente de la fracción de saponina de *Quillaja Saponaria Molina*.
- 20 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la fracción de saponina de *Quillaja Saponaria Molina* se selecciona de entre fracción A, fracción B, fracción C de *Quillaja Saponaria Molina*, spicoside, Q VAC, QA 1-22.
- 25 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la fracción de saponina de *Quillaja Saponaria Molina* se selecciona de entre fracción A de *Quillaja Saponaria Molina*, fracción B de *Quillaja Saponaria Molina* y fracción C de *Quillaja Saponaria Molina*.
- 30 8. Composición según la reivindicación 7, que comprende de 5 a 95% en peso de fracción A de *Quillaja Saponaria Molina* y el resto hasta 100% en peso de fracción C de *Quillaja Saponaria Molina* calculado con respecto al peso de la fracción A y la fracción C.
- 35 9. Composición según la reivindicación 7, que comprende de 90 a 99% en peso de fracción A de *Quillaja Saponaria Molina* y de 1% a 10% en peso de fracción C de *Quillaja Saponaria Molina* calculado con respecto al peso de la fracción A y la fracción C.
10. Composición según la reivindicación 7, que comprende de 50% a 70% en peso de fracción A de *Quillaja Saponaria Molina* y de 30% a 50% en peso de fracción C de *Quillaja Saponaria Molina* calculado con respecto al peso de la fracción A y la fracción C.
- 40 11. Composición según la reivindicación 7, que comprende de 30% a 50% en peso de fracción A de *Quillaja Saponaria Molina* y de 50% a 70% en peso de fracción C de *Quillaja Saponaria Molina* calculado con respecto al peso de la fracción A y la fracción C.
- 45 12. Composición según la reivindicación 6, en la que la fracción de saponina de *Quillaja Saponaria Molina* se selecciona de entre Quil 1-21.
- 50 13. Utilización de una composición que comprende por lo menos dos fracciones definidas, purificadas de *Quillaja Saponaria Molina* en partículas iscom separadas con actividad inmunomoduladora, actividad adyuvante amplificada y toxicidad reducida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la preparación de un fármaco inmunomodulador.
- 55 14. Utilización de una composición que comprende por lo menos dos fracciones definidas, purificadas de *Quillaja Saponaria Molina* en partículas iscom separadas con actividad inmunológica, actividad adyuvante amplificada y toxicidad reducida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la preparación de una vacuna.
15. Utilización de una composición que comprende por lo menos dos fracciones definidas, purificadas de *Quillaja Saponaria Molina* en partículas iscom separadas con actividad inmunomoduladora, actividad adyuvante amplificada y toxicidad reducida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la preparación de un adyuvante.
- 60 16. Kit de partes que comprende por lo menos dos partes, en el que cada parte comprende diferentes complejos iscom, comprendiendo cada uno de dichos diferentes complejos una fracción de saponina de *Quillaja Saponaria Molina*, en el que la fracción de saponina en uno de los complejos es diferente de la fracción de saponina en el otro complejo, comprendiendo el kit una composición que presenta actividad inmunomoduladora, actividad adyuvante amplificada y toxicidad reducida.

FIG 1

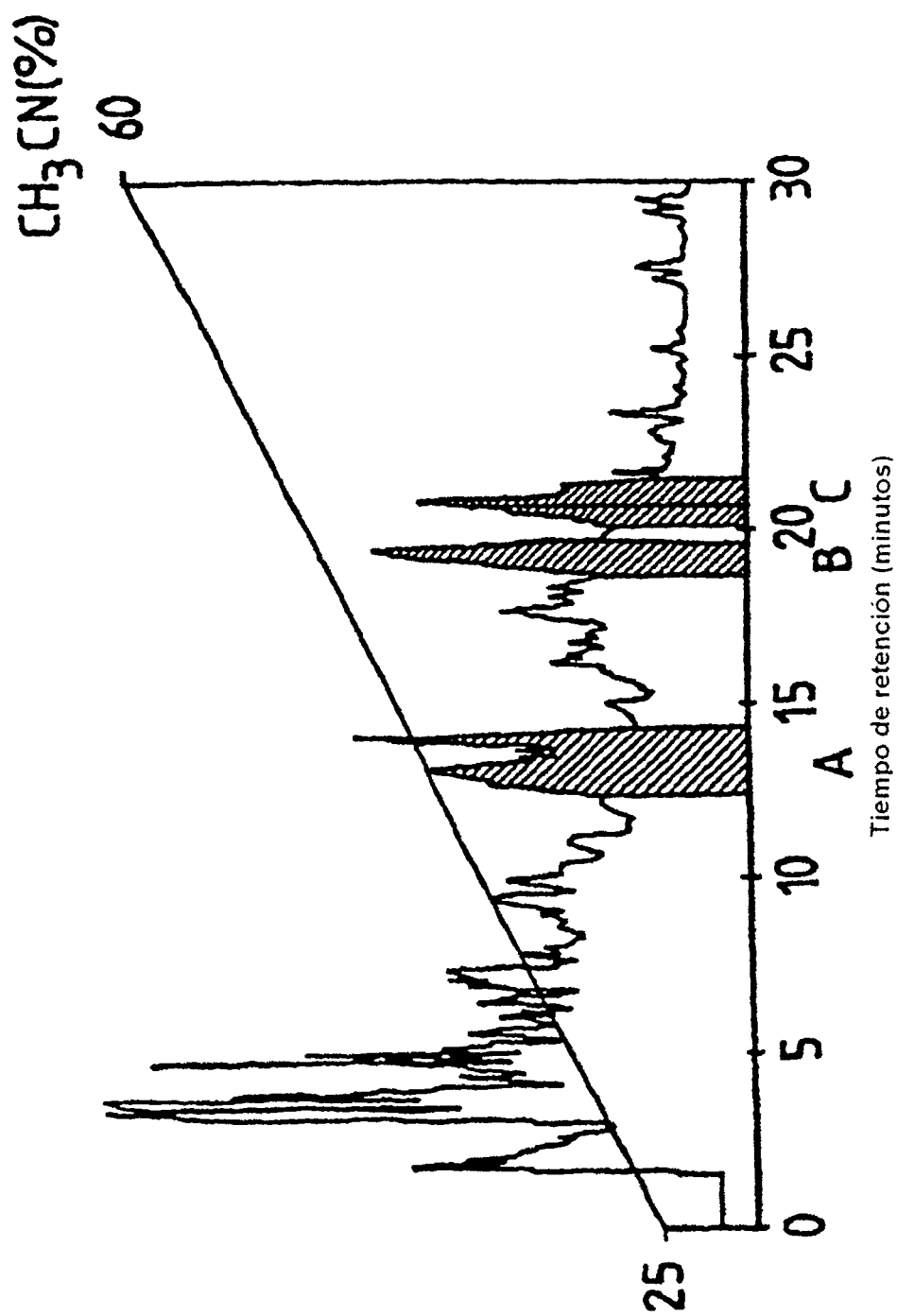


Fig. 2A

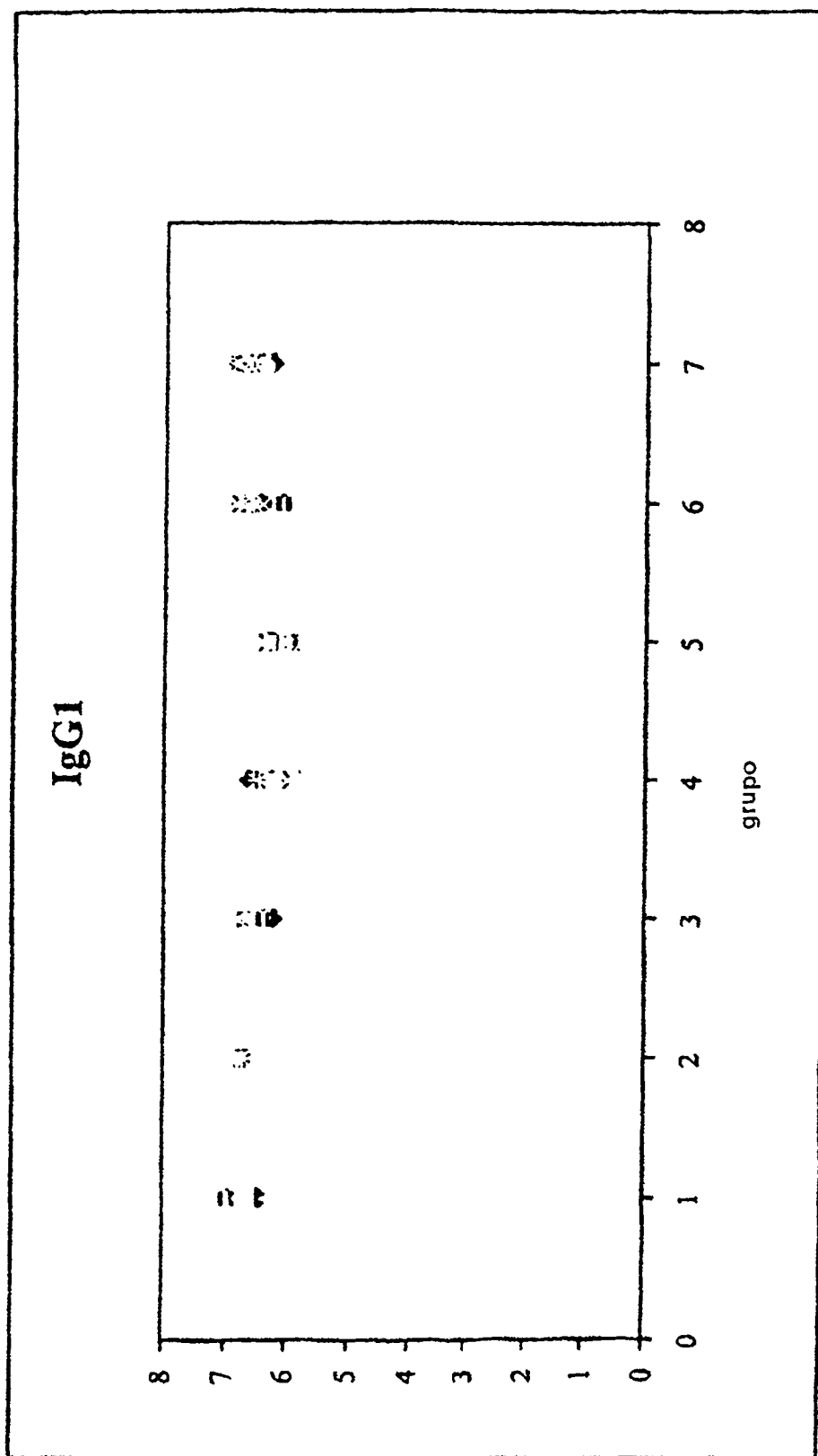


Fig. 2B

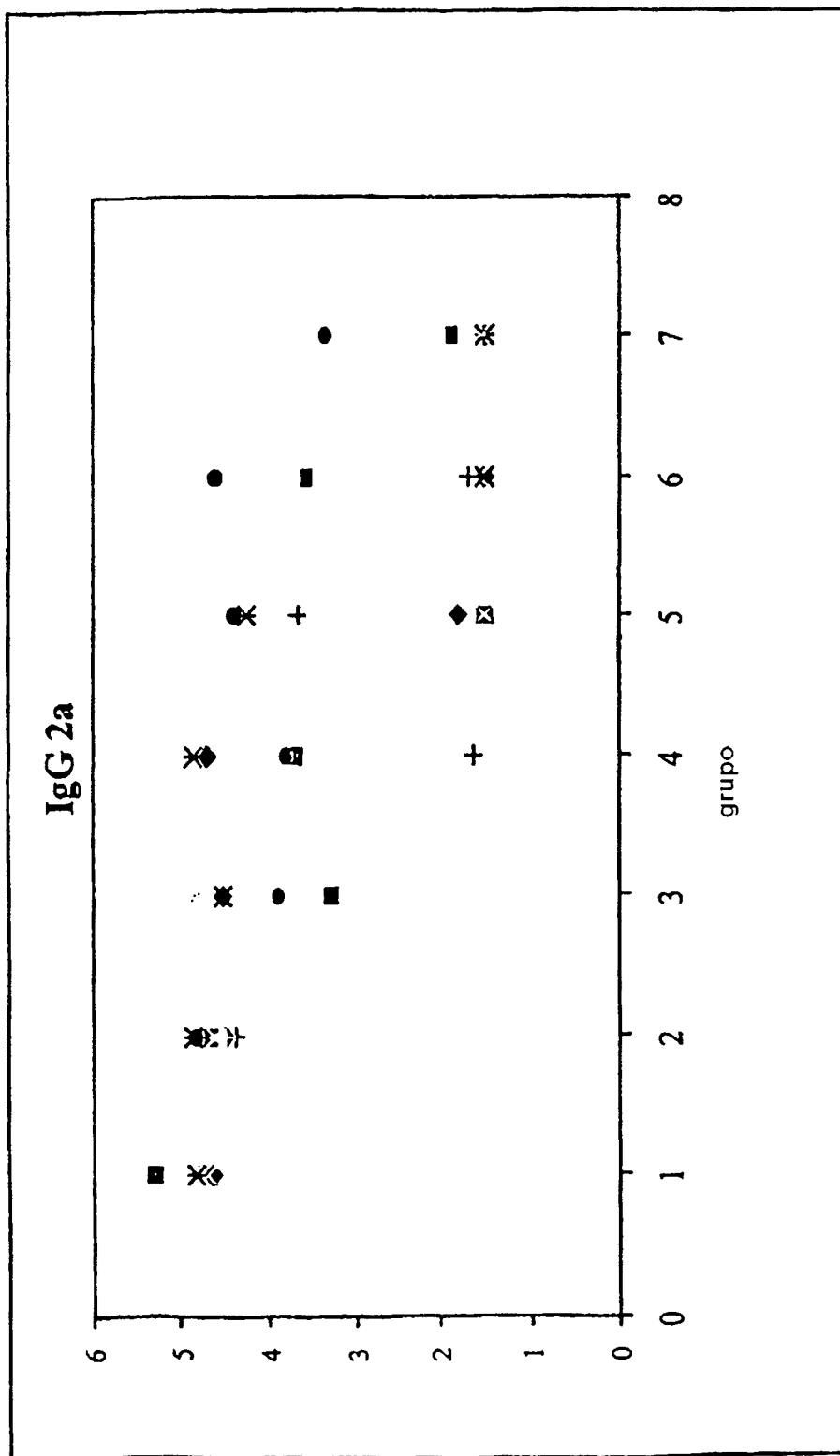


Fig. 3A

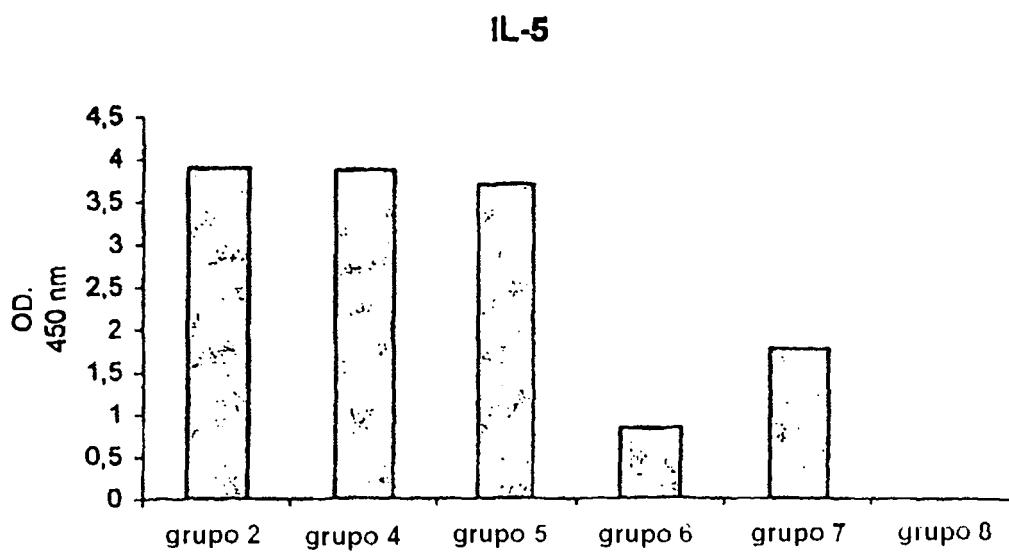


Fig. 3B

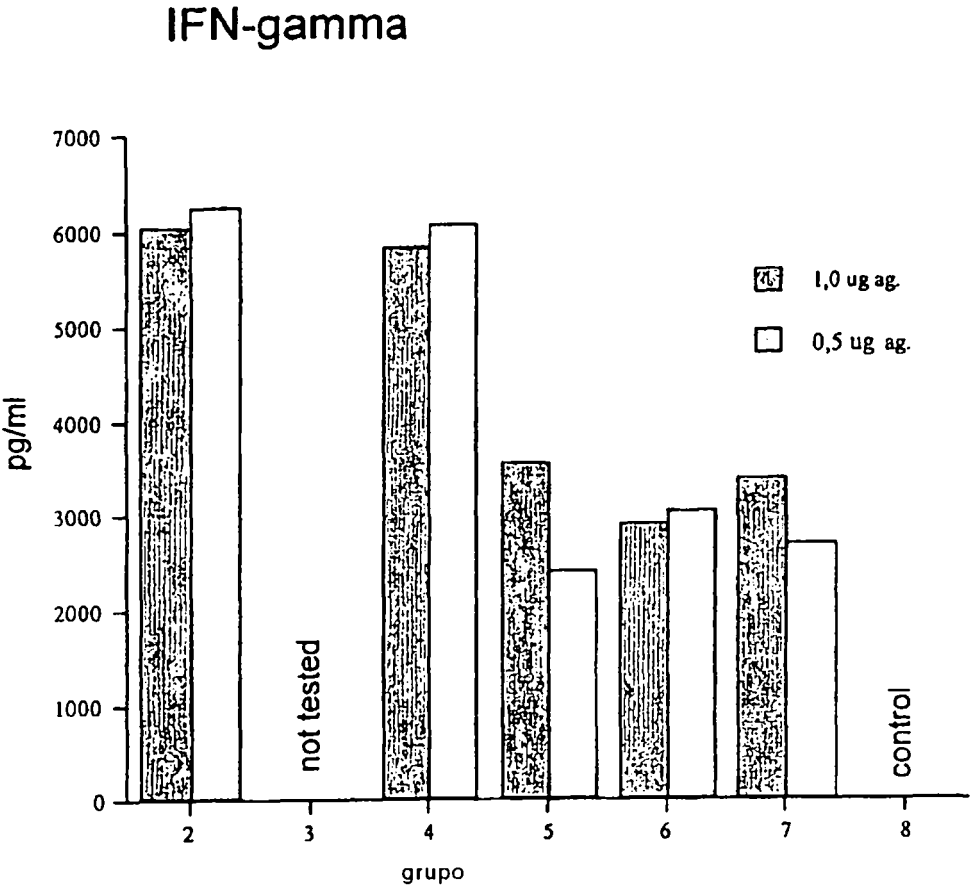


Fig 4

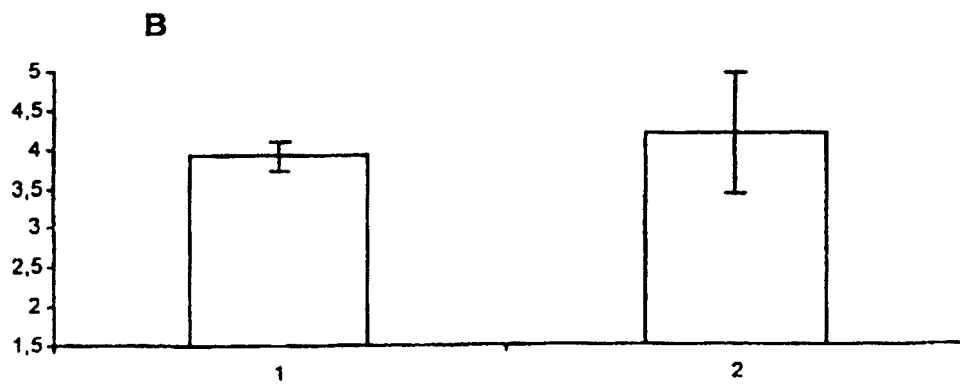
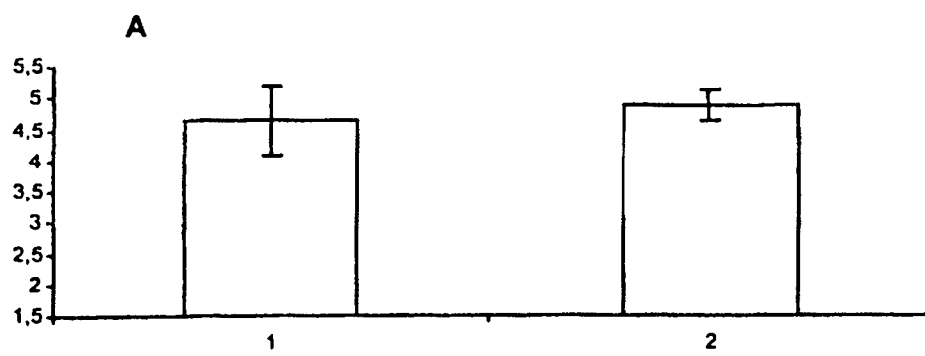


Fig 5

