



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 336**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)	A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/35 (2006.01)	A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)	A61K 39/12 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)	C12N 15/63 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)	A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01942305 .2**

96 Fecha de presentación : **15.01.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1255563**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.11.2002**

54 Título: **Composición de administración sublingual de adyuvante glicolípido y antígeno.**

30 Prioridad: **14.01.2000 GB 0000891**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.11.2009

73 Titular/es: **Allergy Therapeutics (UK) Limited**
Dominion Way
Worthing, West Sussex BN14 8SA, GB
CORIXA CORPORATION

72 Inventor/es: **Wheeler, Alan;**
Elliott, Garry y
Cluff, Christopher, Wallace

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 328 336 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

Composición de administración sublingual de adyuvante glicolípido y antígeno.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una respuesta inmune sistémica y de las mucosas, utilizando una formulación administrada sublingualmente, particular pero no exclusivamente, para su utilización en la inmunización como una vacuna profiláctica o terapéutica, o en el tratamiento de las alergias.

10 **Antecedentes de la invención**

El sistema inmune ha evolucionado específicamente para detectar y eliminar materiales extraños o nuevos a partir de un huésped. Estos materiales pueden ser de origen vírico, bacteriano o parasitario, y pueden encontrarse fuera o dentro de las células del huésped, o ser de origen neoplásico. Asimismo, pueden provenir de otros orígenes y no dañar patogénica o intrínsecamente a todos los individuos.

El sistema inmune de las mucosas (MIS) está formado por tejidos linfoides (que se encuentran) en el interior y directamente por debajo del recubrimiento epitelial de los tractos respiratorio, genitourinario y gastrointestinal, así como por debajo del sistema de conductos de las glándulas salivares, lagrimales y mamarias. El producto principal del MIS es IgA.

La vacunación es la aplicación mejor conocida y más exitosa de un principio inmunológico a la salud humana. Naturalmente, para que una vacuna pueda ser presentada y aprobada, debe ser efectiva, debiendo revisarse periódicamente su eficacia. Muchos factores afectan la eficacia de una vacuna. Por ejemplo, una vacuna se administra habitualmente por vía subcutánea o intramuscular. Recientemente, se ha utilizado la vía sublingual para la administración de vacunas terapéuticas de la alergia. Una vacuna efectiva debe inducir la inmunidad apropiada en términos de efectos cuantitativos y cualitativos, y resultar estable en su conservación. En particular, con las vacunas no vivientes, es a menudo necesario reforzar su inmunogenicidad con un adyuvante. Esto puede también aplicarse a algunas vacunas vivas, por ejemplo, atenuadas. Un adyuvante es una sustancia que potencia la respuesta inmunitaria al antígeno.

Durante los trabajos que se llevaron a cabo en la década de los años 20 con respecto a la producción de antiseros animales para la terapia humana, se descubrió que ciertas sustancias, especialmente las sales de aluminio que se añadían a los antígenos o a las emulsiones que incorporaban el antígeno, potenciaban en gran manera la producción de anticuerpos, es decir, actuaban como adyuvantes. El hidróxido de aluminio es todavía muy utilizado, con, por ejemplo, el toxoide diftérico y tetánico, y la tirosina insoluble se utiliza con algunas vacunas para la alergia. Otros adyuvantes más solubles poseen también efectos deseables tales como la inducción de una respuesta inmune más intensa, o dirigir la respuesta hacia, por ejemplo, una respuesta de tipo TH1.

El lípido A monofosforilo 3-de-O-acilado se conoce a partir del documento GB-A-2220211 (Ribi). Químicamente, puede ser una mezcla del lípido A monofosforilo 3-de-O-acilado con 4, 5, ó 6 cadenas aciladas, y se prepara actualmente por Corixa Corporation. Una forma preferida del lípido A monofosforilo 3-de-O-acilado (a la que se hace referencia en la presente memoria como adyuvante MPL[®]), se da a conocer en la solicitud de patente internacional n° WO92/16556.

La publicación de patente internacional n° WO98/44947 dio a conocer una formulación para utilizar en la terapia de desensibilización en individuos que sufrían alergias, que comprendía un alérgeno opcionalmente modificado, tirosina y el lípido A monofosforilo 3-de-O-acilado.

Se han llevado a cabo esfuerzos considerables para producir mejores adyuvantes, particularmente para las respuestas mediadas por las células T, pero debe acentuarse que son todavía escasos los adyuvantes más recientes de éstos que son aceptados todavía para la utilización rutinaria humana. Sin embargo, se ha logrado la autorización para que el adyuvante MPL[®] se utilice con una vacuna del melanoma, y vacunas que contienen el adyuvante MPL[®] están disponibles como "Especiales" en Alemania, Italia y España.

El documento WO00/50078 de Chiron da a conocer una composición que incluye bioadhesivos combinados con adyuvantes y antígenos para el suministro mucoso. Sin embargo, sólo demuestra la producción de una respuesta inmune IgG con la composición. Además, los bioadhesivos son agentes que física o químicamente, se unen al moco. Se cree que deben de existir implicaciones de seguridad que se asocian con la mencionada bioadhesión de algunas composiciones que contengan antígenos. El suministro sublingual no se da a conocer; administrándose por vía nasal la composición de prueba.

Chauncey *et al.*, J. dent. res. vol 33, n° 3, páginas 321-334 (1954), Lindquist *et al.*, Enzyme, vol 20, páginas 277-291 (1975), Chauncey, The Journal of the American Dental Association, vol 44, páginas 360-367 (1961), Garren & Repta, International Journal of Pharmaceutics, vol 48, páginas 189-194, (1988), muestran en su totalidad que la saliva humana contiene esterasas que pueden hidrolizar los adyuvantes glicolípidos. Valdez *et al.*, Dig. Dis., vol 9, páginas 125-132, (1991), da a conocer que después de estimulación, la secreción salivar aumenta y que la saliva incluye lipasas y amilasas que pueden hidrolizar los glicolípidos.

Resulta evidente la necesidad de una composición que genere una respuesta inmune sistémica y mucosa para proteger contra bacterias, virus y otros organismos parásitos, y que pueda utilizarse como una vacuna para la alergia. Idealmente, dicha composición debería poder administrarse a través de una vía asociada al cumplimiento terapéutico (por parte) del paciente, tal como la vía sublingual. También se ha descubierto que el suministro sublingual puede propiciar una absorción rápida y una buena biodisponibilidad de la sustancia que se suministra. El suministro sublingual puede también ser ventajoso con respecto a las inyecciones intermitentes, para mantener las adecuadas concentraciones plasmáticas de las sustancias que se están suministrando. Preferentemente, la composición utilizará adyuvantes disponibles convenientemente.

10 Sumario de la invención

La invención se define utilizando la reivindicación 1, y mediante la reivindicación 13. La presente invención se refiere a un sistema de suministro sublingual, que presenta ventajas asociadas con este medio de suministro. Con mayor detalle, se ha descubierto la posibilidad de utilizar adyuvantes glicolípidos, tal como el adyuvante MPL[®], con un antígeno para producir una respuesta inmune de las mucosas (MIR) cuando se administra sublingualmente. Los presentes inventores consideran el carácter novedoso de su apreciación que consiste en que la utilización sublingual de adyuvantes glicolípidos puede producir una respuesta IgG sistémica, así como otra, mucosa, mediada por la IgA. Sorprendentemente, se descubrió asimismo que puede generarse la MIR en un lugar que está distante del sitio sublingual del suministro, siendo asimismo local. Por ejemplo, IgA puede detectarse en otros tejidos linfoides, tales como en los tractos intestinal, respiratorio y genitourinario. Esto tiene implicaciones particularmente importantes para el tratamiento, por ejemplo, de enfermedades transmitidas sexualmente, pues la aplicación sublingual es conveniente y puede entonces conducir a un buen cumplimiento terapéutico por parte del paciente con cualquier régimen de dosificación.

Parece que el efecto de los adyuvantes se debe principalmente a dos actividades: la concentración persistente del antígeno en un lugar en el que los linfocitos u otras células competentes están expuestas a él (el efecto "prolongado") y la inducción de citoquinas, que regulan la función linfocítica. Nuevos dispositivos tales como liposomas y complejos inmunoestimulantes (ISCOMS) pueden alcanzar idéntico propósito, asegurándose de que los antígenos atrapados en ellos sean suministrados a células presentadoras de antígenos. Los productos bacterianos tales como paredes de células micobacterias, endotoxinas, etc, se cree que actúan estimulando la formación de citoquinas. La inducción citoquínica puede resultar particularmente útil en pacientes inmunocomprometidos, que a veces no responden a las vacunas normales. Se espera que dicha inducción citoquínica podría ser útil asimismo dirigiendo la respuesta inmune en la dirección deseada, por ejemplo, en enfermedades en las que sólo se desea la reactividad de las células TH1 o TH2 (Roitt *et al* "Immunology", 4^a edición).

Se proporciona asimismo una formulación antigénica, que puede decantar el balance TH1-TH2 en favor de una respuesta de TH1, que puede administrarse a las mucosas, preferentemente en la boca y particularmente, al sitio sublingual. La formulación es útil en inmunoterapia, particularmente en el campo vacunal. También es útil para estudiar las respuestas inmunes y en la producción de anticuerpos.

40 Exposición de la invención

La presente invención se refiere a la utilización de por lo menos un antígeno y un adyuvante glicolípido, en la preparación de un medicamento que pueda administrarse sublingualmente, para obtener una respuesta inmune sistémica y de las mucosas, en la que la respuesta inmune de éstas se genera en un lugar que está distante, y sea asimismo local, al sitio sublingual del suministro.

La presente invención se refiere además a una composición que puede administrarse sublingualmente, que comprende, por lo menos un antígeno y un adyuvante glicolípido, para obtener una respuesta inmune sistémica y de las mucosas, en la que la respuesta inmune de éstas se genera en un lugar que está distante, y sea asimismo local, al sitio sublingual del suministro.

En su sentido más amplio, la presente invención se refiere al hallazgo de que los glicolípidos controlarán una respuesta humoral sistémica y de las mucosas para un antígeno, cuando una composición que los contenga se administre sublingualmente a humanos o a animales. Se descubrió que puede utilizarse cualquier excipiente conveniente que pueda administrarse sublingualmente. La capacidad de un adyuvante glicolípido para gobernar la IgG, IgG₁, y la IgG_{2a}, cuando se administra sublingualmente con el antígeno, muestra que la invención puede aplicarse a vacunas profilácticas, así como a la desensibilización alérgica. La capacidad de un adyuvante glicolípido para controlar la IgA de las mucosas, después de dosificación sublingual, muestra además que la invención constituye una forma útil para generar una inmunidad de las mucosas. La generación de inmunidad de las mucosas es útil para proteger contra los patógenos aéreos y las enfermedades de transmisión sexual, en particular.

En términos generales, la presente invención se refiere a una composición que comprende (A) por lo menos un antígeno, y (B) un adyuvante glicolípido, y su utilización (tanto del antígeno como del adyuvante).

En particular, se da a conocer un procedimiento para obtener una respuesta inmune sistémica y/o de las mucosas en humanos o en animales que la requieran, que comprende la administración de una composición que incluye, por lo menos, un antígeno y un adyuvante glicolípido.

ES 2 328 336 T3

De otra forma, la presente invención se refiere a la utilización de, por lo menos, un antígeno y un adyuvante glicolípido en la preparación de un medicamento para obtener una respuesta inmune sistémica y/o de las mucosas.

Se da a conocer un procedimiento para tratar una enfermedad sexual transmitida a través de las mucosas, que comprende la administración sublingual a humanos o animales de una composición que comprende, por lo menos, un antígeno y un adyuvante glicolípido.

De otra forma, la presente invención se refiere a la utilización de por lo menos, un antígeno o un adyuvante glicolípido, en la preparación de un medicamento que puede administrarse sublingualmente, para el tratamiento de una enfermedad sexual transmitida a través de las mucosas.

Estos procedimientos pueden generar una respuesta inmune mediada por la IgA.

De este modo, también se da a conocer un procedimiento para obtener una respuesta inmune IgA en humanos o animales, que comprende la administración sublingual de una composición que comprende por lo menos, un antígeno y un adyuvante glicolípido.

De otra forma, la presente invención se refiere a la utilización de por lo menos un antígeno y un adyuvante glicolípido en la preparación de un medicamento que puede administrarse sublingualmente para obtener una respuesta inmune IgA.

La composición deberá administrarse en una cantidad efectiva. El término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad que no sea tóxica pero suficiente, de la composición, para proporcionar la respuesta inmunológica deseada. Una cantidad efectiva apropiada puede determinarse por el experto en la materia.

Las composiciones pueden ser profilácticas (es decir, prevenir la infección) o terapéuticas, (tratar la enfermedad después de la infección).

Preferentemente, la composición se administra al humano, mamíferos y otros primates, incluyendo primates no humanos tales como chimpancés y monos, animales de granja tales como ganado, ovejas, cerdos, cabras y caballos, mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores, tales como ratas, ratones y cobayas; aves, incluyendo las domésticas, las salvajes y de entretenimiento, tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, ocas, y similares.

El procedimiento puede generar también una respuesta inmune mediada por IgG.

En la presente memoria, se da a conocer una composición que comprende:

(A) uno o más antígenos; y

(B) un adyuvante glicolípido.

El glicolípido es un adyuvante que induce TH1.

Preferentemente, la composición útil en la presente invención comprende un diluyente, excipiente o portador que puede administrarse sublingualmente, que ayuda a la disponibilidad de (A) y (B) en el lugar de administración (sitio de la mucosa sublingual).

Preferentemente, el antígeno se deriva de una bacteria, virus, prion, neoplasma, autoantígeno, planta, animales, u otro organismo patogénico o no, material sintético o recombinante.

El antígeno puede incluir partes seleccionadas de entre moléculas antigénicas, o moléculas preparadas mediante tecnologías sintéticas o recombinantes.

Preferentemente, el antígeno es un alérgeno. Los alérgenos son tipos de antígenos que muestran propensión a inducir alergias. El alérgeno puede incluir partes seleccionadas de moléculas alergénicas, o de moléculas preparadas mediante tecnologías sintéticas o recombinantes.

A continuación, los términos antígeno o antígenos comprenden los términos alérgeno o alérgenos, respectivamente.

Preferentemente, el antígeno está en forma de un polipéptido, hidrato de carbono o lípido. Alternativamente, el antígeno puede estar en forma de un vector que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido antigénico, y en el que dicho polinucleótido está unido funcionalmente a una secuencia reguladora que regula la expresión de dicho polinucleótido.

Preferentemente, el adyuvante glicolípido que induce TH1 es pero no se limita al adyuvante MPL[®], al 3D-MPL o a un derivado o una sal del mismo.

Preferentemente, la composición está en forma de una vacuna.

Preferentemente, la composición está en forma de una solución acuosa, gel, parche, pastilla, cápsula o comprimido, muy preferentemente en solución acuosa o gel.

La presente invención también proporciona la utilización de la composición en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección bacteriana, o viral priónica, o de otra enfermedad tal como cáncer, autoinmunidad o alergia en humanos o en animales.

Se da a conocer además la utilización de la composición en un procedimiento para producir uno o varios anticuerpos que reconozcan dicho antígeno. Los anticuerpos producidos pueden utilizarse en la preparación de un medicamento para tratar infecciones bacterianas o víricas, cáncer, autoinmunidad o alergias en humanos o en animales.

Se describe un procedimiento para preparar un antisuero o una preparación inmunológica del mismo, que comprende la inmunización de humanos o de animales con una composición de la invención.

Asimismo, se da a conocer un procedimiento para preparar una composición de la presente invención, que comprende mezclar una solución de antígenos y del adyuvante glicolípidos con un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, preferentemente una solución acuosa o un gel.

Descripción detallada

Se describirán a continuación a partir de ejemplos no limitativos las diversas características y las formas de realización preferidas de la presente invención.

Respuesta inmune

Una respuesta inmune es una respuesta selectiva orquestada por el sistema inmune de los vertebrados, en la que se producen anticuerpos específicos y/o células citotóxicas contra microorganismos o parásitos invasores, tejidos transplantados y muchas otras sustancias que son reconocidas como extrañas por el organismo, es decir, antígenos. La producción de anticuerpos circulantes en sangre se conoce como respuesta humoral; la producción de células citotóxicas, como una respuesta inmune celular o mediada por células.

Las células implicadas en el sistema inmune se organizan en los tejidos y en los órganos para llevar a cabo sus funciones de forma más efectiva. Se hace referencia a estas estructuras colectivamente como sistema linfóide. El sistema linfóide comprende linfocitos, células accesorias (macrófagos y células presentadoras de antígenos) y en algunos casos, células epiteliales. Se organiza en órganos discretamente encapsulados o en acumulaciones de tejido linfóide difuso. Los órganos linfoides y los tejidos principales se clasifican como primarios (centrales) o secundarios (periféricos). La presente invención se centra en los órganos linfoides secundarios. Los órganos linfoides secundarios incluyen tejidos asociados a mucosas, y proporcionan un entorno en el cual los linfocitos pueden interactuar entre ellos, con las células accesorias y con los antígenos.

Con mayor detalle, la generación de linfocitos en los órganos linfoides primarios (linfopoyesis) es seguida por su migración a los tejidos secundarios periféricos. Los tejidos linfoides secundarios comprenden órganos encapsulados bien organizados -el bazo y los nódulos linfáticos- y acumulaciones o encapsuladas que se encuentran alrededor del organismo. El grueso de los tejidos linfoides no organizados se encuentra asociado con las superficies mucosas y se denomina tejido linfóide asociado a las mucosas (MALT).

El sistema de las mucosas protege al organismo de los antígenos que penetran en el organismo directamente mediante superficies epiteliales mucosas. De este modo, los tejidos linfoides se encuentran asociados con superficies que tapizan el tracto intestinal, el tracto respiratorio y el tracto genitourinario. La presente invención se refiere particularmente a tejidos linfoides que se encuentran asociados con superficies que tapizan la región sublingual. El mecanismo efector más importante en estos lugares es la IgG secretora (sIgA), que se secreta directamente en las superficies epiteliales mucosas del tracto.

La IgA secretora representa sobre el 95% de toda la IgG que se encuentra en las secreciones, y está constituida principalmente por dímeros, con dos unidades monoméricas unidas covalentemente por una cadena J. La IgA dimérica se une a un receptor inmunoglobulín polimérico pIgR en la superficie basal de las células epiteliales mucosas. Este complejo IgA-pIgR experimenta endocitosis y es transportado a la superficie apical (luminal) de las células epiteliales. Durante este proceso de transporte, un pequeño fragmento del pIgR es fragmentado con el componente restante que se denomina el componente secretorio. Así, IgA es secretada como IgA dimérica unida a un componente secretorio.

La IgA secretora no activa el sistema del complemento, pero reviste las bacterias y los virus tales como el de la polio, coxsackie, rota y herpes, evitando de este modo su adherencia al epitelio que recubre la mucosa. Asimismo, algunos virus (que se encuentran) en el interior del epitelio superficial, pueden neutralizarse mediante la IgA internalizada por pIgR.

La generación de IgA secretora, y por tanto, la generación de una respuesta inmune de las mucosas (en adelante, MIR), puede detectarse utilizando procedimientos estándares en la técnica, tales como ELISA. Como ejemplo, sólo el ensayo ELISA estandarizado de la ovoalbúmina que se utiliza en los Ejemplos 1 y 2, se describe en el ejemplo 1 de preparación.

Una MIR contra un antígeno puede conducir a un estado de respuesta sistémica para el mismo antígeno, conocida como tolerancia oral o mucosa. Así, la inmunización mucosa constituye una vía efectiva para estimular tanto las respuestas inmunes sistémicas como locales.

Antígenos

Históricamente, en la técnica, el término “antígeno” se utilizó para cualquier molécula que indujera a las células B a producir un anticuerpo específico. Ahora, sin embargo, el término puede utilizarse para indicar cualquier molécula que pueda ser reconocida específicamente por los elementos adaptativos de la respuesta inmune, es decir, las células B o las células T, o ambas. De este modo, en la técnica, el término “antígeno” se entiende como una molécula que reacciona con los anticuerpos previamente formados y/o con varios receptores específicos sobre las células B o T. Esta definición incluye lo que se conoce tradicionalmente como alérgenos, es decir, un agente, por ejemplo, polvo de polen, que provoca una hipersensibilidad mediada por IgE.

Una alergia (hipersensibilidad de tipo I) es una respuesta a un antígeno del entorno (alérgeno) en la que se produce el anticuerpo IgE en cantidades relativamente abundantes en los individuos alérgicos, comparado con una persona que no sea alérgica, y que se relaciona con las células cebadas y los basófilos en particular. Por los productos de las células cebadas (histamina, etc.) se produce una reacción inmediata de hipersensibilización, cuando se liberan después de la reacción entre IgE en la superficie de las células cebadas o de los basófilos y los alérgenos que causan asma, rinitis polínica, enfermedad del suero, anafilaxis sistemática o dermatitis de contacto. Existen cuatro tipos de reacción de hipersensibilidad (Tipos I, II, III y IV). El tipo II y III están mediados por anticuerpos; el cuarto está mediado principalmente por las células T y los macrófagos. La invención permite que uno se pueda inmunizar con un alérgeno para, a partir de una respuesta inmune alérgica de IgE, mostrar disposición hacia una respuesta inmune no alérgica.

Así, el “antígeno” que se utiliza en la presente invención puede ser un “alérgeno” derivado de cualquier sustancia que provoque alergia, tal como el polen (por ejemplo, polen de abedul o ambrosía), alimentos, venenos de insectos, hongos, ácaros en animales o del polvo doméstico (*D. farinae* o *D. pteronyssinus*).

El antígeno utilizado en la presente invención es preferentemente un inmunógeno, es decir, un antígeno que activa las células inmunes para generar una respuesta inmune contra sí mismo.

En una forma preferida de realización, la presente invención se refiere a una formulación que puede utilizarse como vacuna, siendo el antígeno uno que sea útil en dicha vacuna.

El antígeno utilizado en la presente invención puede ser cualquier antígeno apropiado, que está o deviene disponible.

El tipo de antígeno que se utiliza en una vacuna depende de muchos factores. En general, cuantos más antígenos de un microbio son retenidos en la vacuna, más los organismos vivos tienden a ser más efectivos que los muertos. Las excepciones a esta regla lo constituyen las enfermedades en las que una toxina es responsable de cualquier efecto patológico. En este caso, la vacuna puede basarse sólo en la toxina o en el toxoide.

El antígeno puede derivarse de cualquier organismo vivo; de organismos intactos o no vivientes; fragmentos subcelulares; toxoides, antígenos que se basan en el ADN recombinante, o antiidiotipos o antígenos sintéticos. El antígeno puede derivarse de organismos naturales o atenuados, que pueden ser víricos o bacterianos. El tipo de antígeno puede ser un polisacárido capsular, superficial o interno. Si se basa en el ADN recombinante, el antígeno puede obtenerse a partir de un gen clonado y expresado, o de un ADN desnudo.

El antígeno puede modificarse mediante reacción, por ejemplo, con un agente de entrecruzamiento, tal como un dialdehído, más particularmente, un glutaraldehído.

Por ejemplo, microorganismos contra los que están disponibles vacunas o se buscan, incluyen *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Bordetella*, *Actinobacillus*, *Neisseria*, *Brucella*, *Haemophilus* y *Escherichia coli*.

Las vacunas preferidas incluyen la vacuna (antivariólica); el bacilo del ratón campestre (para TB); polio; sarampión, paperas, rubéola; fiebre amarilla; varicela-zoster; BCG; rabia; gripe; hepatitis A; tífus; pertussis; fiebre tifoidea; cólera; peste; neumococo; meningococo; *Haemophilus influenzae*; hepatitis B; hepatitis C; tétanos y difteria. Las vacunas que se basan en toxinas incluyen el *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Vibrio cholerae* y *Clostridium perfringens*.

Otras enfermedades importantes para las cuales pueden ser útiles las vacunas incluyen: HIV, herpes, virus, adenovirus, rinovirus, estafilococos, estreptococos del grupo A, *Mycobacterium leprae*, *Treponema pallidum*, *Chlamydia*, *Candida*, *Pneumocystis*, malaria, tripanosomiasis; enfermedad de Chagas; esquistosomiasis y oncocercosis.

5 Las enfermedades que se transmiten sexualmente para las que las vacunas pueden ser útiles incluyen, además del HIV y del herpes mencionados anteriormente, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Chlamydia*, *Calymmatobacterium granulomatis* y hepatitis.

10 También se ha demostrado la presencia de antígenos tumorales y, como resultado, ha surgido el concepto de vacunación contra el cáncer. Asimismo, en principio, la concepción y la implantación pueden interrumpirse induciendo inmunidad contra un amplio espectro de hormonas del embarazo y otras reproductoras.

15 Típicamente, el antígeno será un polipéptido, pero pueden también utilizarse estructuras antigénicas alternativas, tales como ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, organismos enteros o atenuados, tales como virus, bacterias o protozoos.

20 El término "polipéptido" se utiliza generalmente para describir moléculas construidas a partir de diversos aminoácidos, uniéndose éstos covalentemente, tal como mediante uniones peptídicas. Generalmente, se usa el polipéptido de forma intercambiable con "proteína" o "péptido", porque no están implicadas diferencias en tamaño o función. Pueden prepararse polipéptidos recombinantes mediante procedimientos bien conocidos en la técnica tales como los que se describen en Sambrook *et al*, "Molecular Cloning; A Laboratory Manual", 2ª edición, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989).

Adyuvante glicolípido

25 En términos generales, un adyuvante es una sustancia que potencia no específicamente la respuesta inmune a un antígeno. Es decir, es un inmunoestimulante. En términos generales, un glicolípido es una molécula lipídica de la membrana celular con una cadena de hidratos de carbono unida a una cola hidrofóbica. Los adyuvantes glicolípidos preferidos de la presente invención son lipopolisacáridos modificados. El polisacárido se modifica de tal forma que la toxicidad se reduce, comparada con el lipopolisacárido de tipo salvaje o el lipopolisacárido del cual se ha derivado. Preferentemente, el adyuvante glicolípido que se utiliza en la presente invención es un lipopolisacárido enterobacteriano detoxificado o su componente lipídico A. El término "detoxificado" se refiere tanto a los mutantes de la toxina con residuos tóxicos escasos como a los (que son) completamente no tóxicos. Preferentemente, el adyuvante detoxificado conserva una toxicidad inferior a 0,01%, más preferentemente a 0,001%, de la correspondiente toxina de tipo salvaje. 35 La toxicidad puede medirse en las células CHO evaluando los cambios morfológicos.

40 Preferentemente, el adyuvante glicolípido es un adyuvante que induce TH1. Mediante "adyuvante que induce TH1", se hace referencia a un adyuvante que tenga propiedades que potencien la respuesta TH1 para un antígeno. Sin embargo, dicho adyuvante puede mostrar también la propensión de aumentar simplemente el nivel de las células producidas, específicas del antígeno o del anticuerpo, o incluso, mediante la inducción de citoquinas modulantes, provocar la anergia (no reactividad) en ciertas poblaciones celulares.

45 Con mayor detalle, la respuesta inmune al antígeno es generalmente mediada por las células T (que puede implicar la muerte celular) o humoral (producción de anticuerpos mediante reconocimiento de epítopos sobre el antígeno). El patrón de producción de citoquinas por las células T implicadas en la respuesta inmune, puede determinar qué tipo de respuestas predomina; por ejemplo, la inmunidad mediada por células (TH1) se caracteriza por una producción alta de IL-2 y de IFN γ , pero baja de IL-4, mientras que en la inmunidad humoral (TH2) el patrón puede ser de IL-2 y IFN γ bajas, pero altas de IL-4, IL-13 e IL-5. Las respuestas son moduladas habitualmente a nivel de los órganos o de las células linfoides secundarios, por lo que la manipulación farmacológica de las células T específicas y de los patrones de las citoquinas de las células presentadoras de los antígenos, pueden determinar el tipo y grado de la respuesta inmune generada. 50

El balance TH1-TH2 se refiere a la interconversión o predominio de dos formas distintas de las células T auxiliares.

55 Las dos formas tienen una amplia escala y a menudo efectos opuestos en el sistema inmune. Si una respuesta inmune favorece a las células TH1, estas células llevarán así a cabo una respuesta con una respuesta asociada con los anticuerpos, mientras que las células TH2 llevarán a cabo una respuesta dominada por los anticuerpos. El isotipo de los anticuerpos responsable de algunas reacciones alérgicas, IgE, y las respuestas inflamatorias asociadas, son inducidos por citoquinas de las células TH2. 60

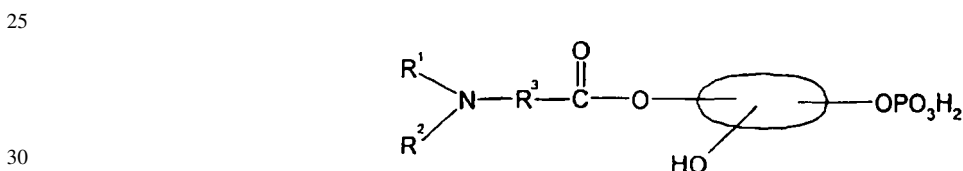
La efectividad de un adyuvante, como uno que induce TH1, puede determinarse obteniendo el perfil de anticuerpos que se dirige contra un antígeno, que resultan de la administración de este antígeno en las vacunas, las cuales se componen también de varios adyuvantes.

65 Preferentemente, el adyuvante es un lipopolisacárido modificado. Tal como se describe en la patente US nº 4.912.094, los lipopolisacáridos enterobacteriáceos (LPS) constituyen inmunoestimulantes poderosos. Sin embargo, pueden también provocar respuestas peligrosas y a veces fatales. Se conoce ahora que las actividades endotóxicas asociadas con los LPS provienen de su componente lípido A. De acuerdo con la presente invención, se utilizan más

preferentemente un derivado detoxificado del lípido A. La Corporación Corixa produjo un derivado del lípido A conocido originariamente como endotoxina detoxificada refinada (RDE), pero que se ha convertido en lípido A monofosforilo (adyuvante MPL[®]). El adyuvante MPL[®] puede obtenerse haciendo que el LPS o el lípido A obtenidos a partir de azúcares c mutantes con menos de siete átomos de carbono de bacterias gram negativas (por ejemplo, *Salmonella sp.*) refluían en soluciones ácidas minerales de fuerza moderada (por ejemplo, 0,1N HCl) durante alrededor de 30 minutos. Este tratamiento lleva a la pérdida de la mitad fosfato en la posición 1 de la glucosamina de final reductor. Además, puede eliminarse el núcleo de hidratos de carbono de la posición 6' de la glucosamina no reductora durante este tratamiento. El adyuvante MPL[®] y el lípido A monofosforilo 3-deacilado y los procedimientos para su preparación se dan a conocer en la patente US n° 4.436.727, y en la patente US n° 4.912.094 y en el certificado de reexamen B1 4.912.094.

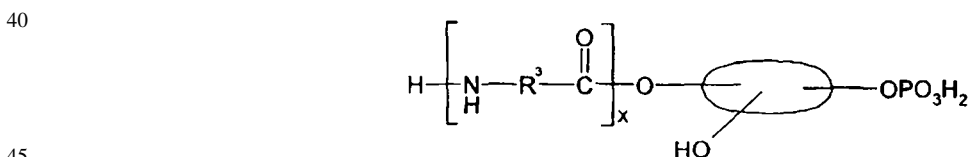
Preferentemente, sin embargo, se utiliza un LPS modificado o un lípido A en el cual el lípido A detoxificado conserva la mitad nuclear unida a la posición 6' de la glucosamina no reductora. Dichos derivados de LPS y del lípido A se describen también en la patente US nº 4.912.094. Con mayor detalle, la patente US nº 4.912.094 da a conocer un lipopolisacárido modificado que se obtiene mediante el procedimiento de eliminación selectiva sólo del residuo β -hidroximirisístico acilo del lipopolisacárido que está unido mediante éster a la glicosamina del extremo reductor en posición 3' de dicho lipopolisacárido, que comprende someter dicho polisacárido a hidrólisis alcalina. Tales lípidos A monofosforil de-O-acetilado (adyuvante MPL[®]), lípido A difosforilo (DPL) y LPS pueden utilizarse en la presente invención. Así, en una forma de realización preferida, la presente invención utiliza el adyuvante MPL[®], DPL o LPS, en los cuales la posición 3' de la glucosamina de extremo reductor es de-O-acetilada. Estos compuestos se conocen como 3D-MPL, 3D-DPL y 3D-LPS respectivamente.

En la patente US nº 4.987.237, se describen derivados del adyuvante MPL[®] que tienen la fórmula



35 y en la que R¹ y R² son H, R³ es una cadena hidrocarbonada recta o ramificada, compuesta de C, H y opcionalmente O, N y S, los cuales si están constituidos por más de un átomo, pueden ser los mismos o distintos, en el que el número total de átomos C no excede de 60, y el círculo representa un núcleo MPL.

Alternativamente, el adyuvante MPL[®] derivado posee la fórmula



en la que el segmento del derivado representado por



60 contiene 2-60 átomos de C y en el que R³ es una cadena hidrocarbonada recta o ramificada, compuesta de C, H y opcionalmente O, N y S, los cuales si están constituidos por más de un átomo, pueden ser los mismos o distintos, y x es un mínimo de 1 y puede ser cualquier número entero, de forma que el número total de átomos C en todos los segmentos x no pase de 60, y en la que la estructura química de cada R³ puede ser la misma o distinta en cada dicho segmento, y en el que el círculo representa un núcleo MPL.

Un adyuvante comercialmente disponible de Corixa Corporation incluye Escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2%, y también el adyuvante MPL®

Otro adyuvante comercialmente disponible es el adyuvante Detox[®] (Corixa Corporation) que comprende el adyuvante MPL[®] y el esqueleto de la pared celular de las micobacterias.

Todos los derivados o sales de LPS o del lípido A mencionados que están disponibles o llegan a estarlo, pueden utilizarse en la presente invención. Preferentemente, los derivados y sales son aquéllos que son farmacéuticamente aceptables.

El adyuvante que induce TH1 puede mezclarse con los otros componentes de la composición, inmediatamente antes de la administración. Alternativamente, puede formularse conjuntamente con los otros componentes durante la preparación del producto. Alternativamente, puede administrarse en un momento distinto que los otros componentes. La administración puede llevarse a cabo por distintas vías. Preferentemente, el adyuvante glicolípido se administra en una cantidad entre 1,0 mg y 250 mg, más preferentemente entre 25 y 50 mg.

Vacunas

Un aspecto se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmunológica, preferentemente una respuesta inmunológica de las mucosas, en un mamífero, preferentemente en humanos, que comprende inocular sublingualmente a un individuo con la composición de la presente invención para producir anticuerpos, preferentemente IgA, y/o una respuesta inmune de las células T. Preferentemente, la respuesta es adecuada para proteger a dicho individuo de la infección, particularmente bacteriana o vírica. Preferentemente, la respuesta es adecuada para proteger a dicho individuo de la enfermedad, tanto si la enfermedad se ha establecido ya en el individuo, como si no. Así, la respuesta inmunológica puede utilizarse terapéutica o profilácticamente.

Las vacunas pueden prepararse a partir de la composición de la presente invención. La preparación de las vacunas que contienen un antígeno como principio activo, es conocida por los expertos en la materia. Típicamente, dichas vacunas se preparan como soluciones líquidas o suspensiones; pueden prepararse asimismo formas sólidas apropiadas para disolverlas en, o suspenderlas en líquido antes de la administración. La preparación puede ser también en un gel, puede emulsificarse, o la composición puede encapsularse en liposomas. Los excipientes apropiados son, por ejemplo, agua, fosfato amónico, dextrosa, glicerol, etanol o similares, y sus combinaciones.

Las composiciones incluyen dichos excipientes que se utilizan normalmente, como por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico, y similares. Estas composiciones toman forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, grageas, cápsulas, formulaciones de liberación controlada, o polvos, y contienen del 10% al 95% del principio activo, preferentemente entre el 25% y el 70%. Si la composición vacunal es liofilizada, el material liofilizado puede ser reconstituido antes de la administración, por ejemplo, como suspensión. La reconstitución se lleva a cabo preferentemente en un tampón.

Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsificantes, agentes de tampón para el pH, y/o otros adyuvantes, que potencian la efectividad de la vacuna.

La proporción del antígeno y del adyuvante puede estar comprendida en un amplio intervalo, siempre que ambos se encuentren presentes en cantidades efectivas. Típicamente, las vacunas se formulan para contener una concentración final de antígeno del orden de 0,2 µg/ml a 200 µg/ml, preferentemente 5 µg/ml a 50 µg/ml, más preferentemente de 15 µg/ml, aproximadamente. La formulación preferida puede determinarse a través de los protocolos de intervalos conocidos de dosis, sirviendo como referencia "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Marck Publishing Company, 19ª edición, 1995.

Después de la formulación, la vacuna puede incorporarse a un recipiente que puede ser estéril y que puede entonces precintarse y guardarse a baja temperatura, por ejemplo, a 4°C, o puede liofilizarse. La liofilización permite un almacenamiento a largo plazo en una forma estabilizada.

Los antígenos que se utilizan en la invención pueden formularse como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales ácidas de adición (formadas con grupos amino libres del péptido), y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos como los ácidos acético, oxálico, tartárico y maleico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres pueden también derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina y procaína.

La composición se presenta como un comprimido, cápsula u otra formulación conveniente con el excipiente que se requiera para dicha formulación.

Preparación de anticuerpos utilizando la composición de la invención

Las composiciones según la invención pueden utilizarse directamente como inmunógenos por las vías de administración que se describen en la presente memoria, sin utilizar otros adyuvantes para generar antisueros, inmunoglobulinas específicas o anticuerpos monoclonales.

Se da a conocer un procedimiento para inducir la obtención de inmunoglobulinas antigénicas específicas, que comprende las etapas que consisten en:

- a) inmunizar a animales con una composición según la presente invención; y
- b) recuperar las inmunoglobulinas específicas para una región del antígeno de la composición, a partir del suero de animales.
- c) Seleccionar los clones celulares que producen el anticuerpo monoclonal.

Las técnicas para generar anticuerpos se obtuvieron de Kohler y Milstein, Nature (1975) 256:495-497.

Los animales que se utilicen para la producción de anticuerpos pueden ser cualesquiera animales que se utilicen habitualmente con este propósito, particularmente, mamíferos. Están indicados especialmente ratones, ratas, cobayas y conejos. Los animales se tratarán con las formulaciones que se describen en la presente memoria.

Más particularmente, la formulación que comprende el antígeno puede utilizarse para preparar anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales. Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero seleccionado (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, etc). Se recupera el suero de animales inmunizados y se trata según los procedimientos conocidos. Si el suero contiene anticuerpos policlonales para otros antígenos, los anticuerpos policlonales requeridos pueden purificarse mediante cromatografía de inmutafinidad. Las técnicas para preparar y procesar anticuerpos policlonales son conocidas en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales que se dirigen contra antígenos que se utilizan en la invención pueden ser asimismo fácilmente preparados por los expertos en la materia. La metodología general para preparar anticuerpos monoclonales mediante hibridomas, es bien conocida. Mediante fusión celular, pueden crearse orígenes celulares inmortales productoras de anticuerpos, y también mediante otras técnicas tales como la transformación directa de los linfocitos B con ADN oncogénico, o la transfección con el virus Epstein-Barr. Los conjuntos de anticuerpos monoclonales producidos contra los antígenos pueden rastrearse con respecto a diversas propiedades; por ejemplo, la afinidad isotópica y epitópica.

Una técnica alternativa implica el rastreo de bibliotecas que muestran fagos, en las que, por ejemplo, los fagos expresan fragmentos scFv sobre la superficie de su envoltura, con una amplia variedad de regiones determinantes complementarias (CDR). Este procedimiento es bien conocido en la técnica.

Los anticuerpos, tanto los monoclonales como los policlonales, que se dirigen hacia antígenos, son particularmente útiles en el diagnóstico, y los que son neutralizantes, son útiles en la inmunoterapia pasiva. Los anticuerpos monoclonales, en particular, pueden utilizarse para generar anticuerpos antiidiotípicos. Los anticuerpos antiidiotípicos son inmunoglobulinas que transportan una "imagen interna" del antígeno del agente infeccioso contra el cual se desea la protección.

En la técnica, se conocen procedimientos para generar anticuerpos antiidiotípicos. Estos anticuerpos antiidiotípicos pueden también ser útiles para el tratamiento, así como para la elucidación de las regiones inmunogénicas de los antígenos.

En el contexto de la invención, el término "anticuerpo", sino se especifica lo contrario, incluye fragmentos de los anticuerpos enteros que conservan su actividad de unión para un antígeno diana. Dichos fragmentos incluyen los fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')₂, así como anticuerpos de cadena única (scFv). Además, los anticuerpos y sus fragmentos pueden ser anticuerpos humanizados, por ejemplo, tal como se describe en EP-A-239400.

Preparación de la composición

La composición puede prepararse mezclando una solución acuosa del antígeno con el adyuvante glicolípido, y añadiendo el diluyente, excipiente o portador que puede administrarse mucosalmente, antes o después de la mezcla anteriormente mencionada. Alternativamente, el adyuvante glicolípido puede coprecipitarse con el antígeno. Además de mezclarse o coprecipitarse con los otros componentes de la composición antes de la administración, el adyuvante glicolípido puede administrarse en un sitio y/o en un tiempo diferente que los otros componentes. La mezcla del adyuvante glicolípido y del antígeno puede también incorporarse en geles, cápsulas, pastillas, etc., o puede presentarse asimismo en varios dispositivos tales como parches, que pueden ser bi- o preferentemente unidireccionales.

El MLP (u otros adyuvantes que inducen TH1), que se ha disuelto mediante ultrasonidos u otros medios (descritos a continuación en Preparación de una solución del adyuvante MPL[®]), puede diluirse con varios medios antes de su adición a los antígenos. La preparación de MPL se lleva a cabo inicialmente a una concentración, típicamente, de entre 0,5 mg por ml y 4 mg por ml, por ejemplo, de 1 mg por ml. Asimismo, puede diluirse a una concentración de entre 500 µg/ml y 20 µg/ml, preferentemente 100 µg/ml. Esta dilución puede realizarse en agua pura o en otros disolventes tales como en una solución acuosa de glicerol que contiene entre 1% y 50% de glicerol.

Los portadores y diluyentes, fisiológicamente aceptables adecuados, incluyen agua estéril o solución acuosa de dextrosa al 5%. Las composiciones son para la utilización humana o veterinaria y se formulan para suministro de las mucosas, preferentemente sublingual.

5

Formulación, dosificación y administración de las composiciones

La composición de la presente invención puede formularse convenientemente con un diluyente, portador o excipiente para la administración sublingual, farmacéuticamente aceptable. En "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 2ª edición, (1994), The Pharmaceutical Press, Londres, editores: Wade & Weller, pueden encontrarse detalles de los excipientes farmacéuticos.

Un aspecto importante de la presente invención es la administración sublingual de la composición de la presente invención. Puede esperarse que resulte preferido un gel u otra formulación viscosa, debido al aumento del contacto del antígeno con la superficie sublingual. Sin embargo, pueden asimismo obtenerse resultados con otras formulaciones, tales como una solución acuosa. En ratones, se encontró que una solución simple dio resultados similares a una formulación génica. No es necesario ni deseable que la formulación se una física o químicamente al tejido de las mucosas.

Las formulaciones apropiadas para la administración sublingual incluyen soluciones acuosas y no acuosas estériles que pueden contener antioxidantes, tampones, compuestos bacteriostáticos y solutos que harán que la formulación sea isotónica con los fluidos corporales, preferentemente con el moco de los individuos; las suspensiones acuosas estériles y no estériles que pueden incluir agentes en suspensión o engrosantes. Las formulaciones pueden presentarse en dosis unitarias o en recipientes multidosis, por ejemplo, ampollas y viales precintados, y pueden guardarse de forma liofilizada, requiriendo sólo la adición del líquido estéril portador inmediatamente antes de utilizarlas.

Preferentemente, en la composición según la invención, un portador se encuentra también presente. El portador puede ser una emulsión de aceite en agua, o una sal de aluminio tal como el fosfato aluminico o el hidróxido aluminico.

Las emulsiones de aceite en agua no tóxicas contienen preferentemente un aceite no tóxico, por ejemplo, escualano o escualeno, un emulsificante, por ejemplo, Tween 80, en un portador acuoso. El portador acuoso puede ser, por ejemplo, solución tamponada salina fosfatada.

También se da a conocer una composición vacunal polivalente que comprende una formulación vacunal de la invención combinada con otros antígenos, en particular, antígenos útiles para tratar cánceres, enfermedades autoinmunes y situaciones relacionadas.

En general, los portadores pueden incluir, pero no se limitan a dextrosa, agua, glicerol, etanol y sus combinaciones.

También se dan a conocer posteriormente equipos farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones mencionadas anteriormente.

La administración de estas composiciones puede ser en forma de bálsamos, pastas, geles, soluciones, polvos y similares. Los geles pueden formularse convenientemente utilizando carbopol, también conocido como carbómero, -un agente engrosante basado en un polímero carboxivinilo o una celulosa-, tal como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa cálcica, carboximetilcelulosa sódica, etil celulosa, metilcelulosa. Los geles pueden también formularse convenientemente utilizando acacia, ácido algínico, bentonita, alcohol cetosteárico, gelatina, goma guar, silicato aluminico de magnesio, maltodextrina, alcohol polivinilo, carbonato de propileno, propilenglicolaglinato, dióxido de silicio coloidal, alginato sódico, goma de tragacanto y/o de xantano. Resultan particularmente preferidos el carbopol y los agentes basados en celulosa.

Las composiciones se administran de una forma compatible con la formulación de la dosis, y en una cantidad tal que sea profiláctica y/o terapéuticamente efectiva. La cantidad que se administra, que es generalmente del orden de 0,5 μ g a 250 μ g de antígeno por dosis, depende del individuo que vaya a ser tratado, de la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, y del grado de protección deseado. Un intervalo preferido es el de entre 2 μ g a aproximadamente 40 μ g por dosis. En algunos casos, el paciente será tratado con una serie de administraciones que incluirán un régimen creciente de dosis antigénicas.

Un tamaño de dosis apropiado es el de aproximadamente 0,1 ml, pero dentro de un régimen, éste puede empezar con un volumen más pequeño y finalizar con un volumen más grande. Las cantidades exactas de principio activo que se administren, pueden depender del criterio del médico y pueden ser peculiares para cada sujeto individual.

La composición puede administrarse mediante un esquema de dosis únicas, o preferentemente mediante un esquema de dosis múltiples. Un esquema de dosis múltiples es uno en el que una tanda inicial de vacunación puede llevarse a cabo con 1-10 dosis separadas, seguida por otras dosis administradas a intervalos subsiguientes de tiempo, necesarios para conservar o y o reforzar la respuesta inmune, por ejemplo, durante 1 a 4 meses con una segunda dosis, y si es necesario, una dosis o dosis subsiguiente(s) durante varios meses. Cuando el producto se está utilizando para el tratamiento de la alergia, los regímenes de administración incluirán una dosificación más frecuente. El régimen

ES 2 328 336 T3

de dosificación será determinado también, por lo menos en parte, por las necesidades del individuo y dependerá del criterio médico.

Además, la composición que contiene el antígeno o antígenos, puede administrarse conjuntamente con otros agentes inmunorreguladores, por ejemplo, inmunoglobulinas.

La invención se describirá a partir de los ejemplos siguientes, proporcionados únicamente a título ilustrativo y no limitativo.

Ejemplos

Preparación de una solución del adyuvante MPL®

Se preparó una solución de 4 mg/ml de 1,2-dipalmitoil-SN-glicero-3-fosfocolina (DPPC) en alcohol absoluto. Por cada 1,0 mg de MPL-TEA (trietilamina) que iban a ser solubilizados, se añadieron 27 μ l de DPPC para disolver el MPL. El MPL puede prepararse tal como se ha descrito anteriormente. El etanol se eliminó haciendo fluir suavemente una corriente de N₂ en el vial. A continuación, 1,0 ml de agua libre de pirógenos se añadieron para inyección por cada mg de MPL en la mezcla seca MPL/DPPC. La solución se sometió a ultrasonidos en un baño de ultrasonación a 60-70°C hasta que se clarificó. La solución MPL/DPPC se esterilizó mediante filtración a través de un filtro SFCA 290-4520 Nalgene de 0,2 μ m. La solución MPL/DPPC se dispensó asépticamente a 1,0 mg/ml en viales despirogenados, marcados MPL-AF (MPL solubilizado en el surfactante DPPC), y conservado a 4°C.

Formulación de Ovalbúmina(XOA)/Adyuvante MPL®/Gel sublingual

La actividad inductora de TH1 en los ratones puede ser considerada equivalente con la producción de anticuerpos específicos IgG2a e IgG2b, y la actividad que induce TH2, con la producción de anticuerpos específicos IgG1 e IgE. Los anticuerpos específicos secretores IgA pueden identificar si una respuesta de las mucosas ha tenido lugar, si es local (anticuerpos salivales), o distal (anticuerpos vaginales), después de inmunización sublingual. El potencial inmunogénico de una formulación puede investigarse, sin embargo, midiendo solamente la respuesta IgG específica en el suero.

Por tanto, como ejemplo, se llevó a cabo un experimento en ratones, para demostrar los perfiles de los anticuerpos específicos de alérgenos para un ejemplar, ovalbúmina (XOA), que se acepta como un antígeno modelo y también es un alérgeno bien conocido, derivado de los huevos de gallina.

Materiales de almacenamiento

1. Almacenamiento de Carbopol TR-1 NF (0,83%)

A. 100 mg de carbopol TR-1 NF en 20 ml de WFI (agua para inyección) = gel al 0,9% peso/vol

B. Se añadieron a A 0,8 ml de TEOA (trietanolamina) al 10% vol/vol = gel al 0,8% peso/vol

11. MPL AF glicerol (20 mg/ml)

A.

MPL 40 mg

DPPC 4,32 mg

Glicerol 800 μ l

WFI cs 40 ml

Tratado con ultrasonidos hasta obtener un tamaño aproximado de partícula de 80 nm.

B. Liofilizado

C. Reconstituido con 1,2 ml de WFI-20 mg/ml de MPL.

ES 2 328 336 T3

111. Almacenamiento de ovoalbúmina (33 mg/ml)

Ovoalbúmina 33 mg

5 WFI 1,0 ml

Formulación para inyección

10 almacenamiento de carbopol 1920 μ l

almacenamiento de ovoalbúmina 480 μ l

15 glicerol 480 μ l

WFI 720 μ l

MPL glicerol 400 μ l

20 1. Carbopol, XOA, glicerol y WIF se añadieron a un vial de 5 ml, mezclándose mediante un movimiento en espiral.

2. El MLP glicerol se añadió a los anteriores, llevándose a cabo a continuación más movimiento en espiral.

25 Inmunización de los ratones

Se anestesiaron con quetamina grupos de 5 ratones hembras Balb/C de 8 semanas de edad. Cuando los animales estaban inconscientes, 20 μ l del gel apropiado que contenía varias cantidades de XOA se situaron bajo la lengua durante 5 minutos. Después de 5 minutos, los geles se enjuagaron fuera de la cavidad bucal con 1,0 ml de solución salina al 0,9% utilizando una jeringuilla y una aguja de sonda nasogástrica. Tres semanas más tarde los ratones fueron tratados idénticamente que en el primer tratamiento. Los ratones se desangraron 2 semanas después del segundo tratamiento, recuperándose los sueros. Éstos se ensayaron con respecto a los anticuerpos IgG específicos para XOA, utilizando un ensayo ELISA.

35

Resultados

40 Respuestas IgG antiovoalbúmina en ratones, a los que se administraron 83,2 μ g o 3,4 μ g de Ovoalbúmina y 33,6 μ g de MPL en 20 μ l de Gel de Carbopol por la ruta sublingual. La revacunación después de 3 semanas y el desangrado después de 2 semanas. Valores OD (densidad óptica) promedio de 5 ratones por grupo, a distintas diluciones séricas.

45

Valores OD a distintas diluciones séricas					
	1/10	1/30	1/90	1/270	1/610
Grupo 1 Dosis 83,2 μ g XOA	1,1	1,0	0,75	0,5	0,3
Grupo 2 Dosis 3,4 μ g XOA	0,6	0,5	0,35	0,15	0,05
Grupo 3 Sólo carbopol	0,15	0,1	0,05	0,05	0,05

50

55

Ejemplo 2

60 Preparación de materiales para la inmunización de los ratones

Las dosis inmunizantes de XOA/NMPL en carbopol o, alternativamente, en el diluyente (formulación acuosa) sin MPL, se prepararon tal como se describe en el Ejemplo 1, excepto para la utilización de las distintas dosis.

65

ES 2 328 336 T3

Inmunización de los ratones

1. Cada ratón se anestesió antes de la administración.
2. Se situaron 20 μ l del material apropiado bajo la lengua durante 5 minutos. De este modo, a cada uno de los grupos de ratones se administraron las siguientes cantidades de sustancias en 20 μ l.

Grupo	Antígeno	MPL	Excipiente
1	80 μ g ovoalbúmina	20 μ g MPL	Carbopol
2	80 μ g ovoalbúmina	0 μ g MPL	Carbopol
3	0 μ g ovoalbúmina	160 μ g MPL	Carbopol
4	80 μ g ovoalbúmina	40 μ g MPL	Diluyente

3. El material se enjuagó fuera de la boca después de 5 minutos con 1,0 ml de solución salina al 0,9%.
4. Tres semanas después de la vacunación primaria y otra vez dos semanas después de esto, los ratones se volvieron a tratar.
5. Los ratones se sangraron 2 semanas después de la tercera aplicación, y los sueros se guardaron hasta que se utilizaron, a -2°C. Se llevaron a cabo lavados nasales y pulmonares, guardándose bajo las mismas condiciones.
6. Los sueros y los lavados se ensayaron con relación a anticuerpos específicos de la ovoalbúmina, como previamente.

Resultados

Anticuerpos séricos IgG específicos. Log titular(2)/(log) titular 2 (SD)

GRUPO	IgG1 sérica	IgG2a sérica	IgG sérica
1	0,625 (0,375)	0,35 (0,4)	0,6 (0,3)
2	0	0	0,2 (0,05)
3	0	0	0,25 (0,02)
4	0,95 (0,01)	0,85 (0,2)	1,0 (0,05)

Media geométrica de anticuerpos IgA anti XOA en distintos fluidos

GRUPO	SUERO	LAVADO NASAL	LAVADO PULMONAR
1	0	73,6 (154,2)	238,5 (533,4)
2	0	0	0
3	0	0	0
4	2.291,3 (2.577,1)	568,5 (395,4)	2.518,4 (3.403,1)

La intensa respuesta de la IgG sérica a XOA, requiere la adición de MPL, que también parece haber estimulado una respuesta de tipo TH1, indicada por la respuesta del anticuerpo IgG2a.

Un hallazgo nuevo e inesperado fue la intensa inducción de una respuesta IgA específica de XOA, cuando MPL se utilizó como un adyuvante:

En los ratones no existió una ventaja aparente por la utilización de carbopol como excipiente. De hecho, existió una fuerte evidencia de que la formulación acuosa de XOA y MPL fue, sin carbopol, más inmunogénica, para la inducción tanto de IgG como de IgA. Esto incluía la IgA sérica, sólo vista en ausencia de carbopol. Sin embargo, es necesario utilizar excipientes en la formulación de vacunas, y el carbopol puede constituir una formulación de excipiente útil y conveniente para el uso animal o humano.

ES 2 328 336 T3

Ejemplo 1 de preparación

Elisa de ovoalbúmina

- 5 1. Los sueros (diluidos 1:2 en tampón borato) de cada uno de los cinco ratones en cada grupo, se ensayaron mediante un ensayo ELISA, para determinar los títulos de anticuerpos IgA o IgG antiovoalbúmina.
2. Para procesar ELISA, son necesarios el siguiente equipo y suministros:
- 10 A. Placas Immulon 2, 96 pocillos, de fondo plano, catálogo de DYNATECH LABORATORIES # 011-010-3455. Tres placas por lote de producto ensayado (suficiente para ensayar los sueros de 10 ratones por duplicado).
- 15 B. Ovoalbúmina (huevos de gallina), Sigma, Grado 5. Solución de almacenamiento (1 mg/ml, en Agua para Inyección) recién preparada cada vez que el ensayo se procese.
- 20 C. Limpieza (mediante autoclave) de los extremos de las pipetas.
- 20 D. Pipeteadores de 20, 100, 200 y 1.000 μ l.
- 20 E. Pipeteador de 8 canales; tamaño de 200 μ l.
- 25 F. Limpiar (de nuevo) tubos de ensayo de 13 mm o viales liofilizados de 2 ml y rejilla
- 25 G. Parafilm o cinta aislante
- 25 H. 1N H₂SO₄
- 30 I. Anti-IgG marcada con peroxidasa de rábano, o el anticuerpo secundario IgA (utilizado a 1:5.000), Southern Biotechnology Associates, Inc.
- 30 J. Kit OPD: comprimidos o-fenilendiamina, una por placa y diluyente. Abbot Labs' *in vitro*, Test nº 7181E. A menudo disponible en el laboratorio.
- 35 K. Sueros de ratones para ser ensayados. Los sueros deberán diluirse 1:2 en Tampón Borato para un almacenamiento a largo plazo.
- 40 L. Tampón Borato (BB):
Disolver lo siguiente en 4 L de WFI:
12,4 g de ácido bórico, Fisher Scientific, #A73-500
0,764 g de borato sódico (Borax), Fisher Scientific, #S248-500
45 17,53 g cloruro sódico, Fisher Scientific #S271-500
Guardar a temperatura ambiente, caduca a los seis meses.
- 50 M. Tampón Borato + Tween 20 al 0,1% (BB-T20):
Añadir 1 ml de Tween-20 (Sigma #P-1379) a 1 litro de BB, mezclando completamente. Almacenar a temperatura ambiente, caduca a los seis meses.
- 55 N. Tampón Borato-Tween 20-BSA al 1% (BB-BSA):
Disolver 1,90 g EDTA (tetrasódica, Fisher Scientific #BP 121-500) y 10 g BSA (Fracción V, libre de proteasas, Boehringer Mannheim #100-350) en 1 litro de BB-T20.
- 60 O. Solución tampón de 0,05 M Carbonato/bicarbonato:
Disolver 4,2 g de NaHCO₃ y 5,3 g de Na₂CO₃ en 1 litro de agua RO o de agua estéril para irrigación, y ajústese el pH a 9,6. Conservar a 4°C, caduca a los tres meses. Calentar a temperatura ambiente antes de usarlo.
- 65 P. Pipeteador automático
- Q. Mezclador rotatorio

ES 2 328 336 T3

- R. Rejillas de microcentrífuga
- S. Lector de placa, que puede realizar lecturas de la O.D. a 490 nm.
- 5 T. Equipo de incubadores a 37°C.
- U. Pipetas serológicas de 25 ml (Fisher Scientific)
- V. Tubos cónicos de polipropileno, de 15 ml (Fisher Scientific)
- 10 W. Cubetas de reactivos para pipeteadores multicanal.
- X. Lavador automático de placas

3. Procedimiento para procesar ELISA

A. Unión del antígeno de prueba

- I. La concentración del antígeno para unir a las placas que se utiliza en un ensayo del adyuvante es de 50 $\mu\text{g/ml}$: 2,5 ml del almacenado de 1 mg/ml. Se añade la solución de ovoalbúmina a 47,5 ml de la solución de 0,05 M carbonato/bicarbonato. Esta cantidad es suficiente para tapizar cuatro placas de 96 pocillos, con 100 μl por pocillo.
- 25 II. Las placas se cubren entonces con cinta aislante y se dejan en posición horizontal y sin manipularlas de ninguna forma, a 4°C en la oscuridad de la noche.

B. Diluciones séricas

Brevemente, se hace rotar cada muestra sérica antes de diluirla, y cada muestra diluida antes de añadirla a la placa. Se deberá utilizar una nueva punta de la pipeta para eliminar suero de los tubos de almacenamiento, cuando se realicen las diluciones.

- 35 1. La dilución inicial para los sueros obtenidos a partir de los ratones inmunizados con el adyuvante y la ovoalbúmina es 1:6.

C. Bloqueo de la placa

- I. Cuando todas las muestras séricas están diluidas, preparar las placas agitando vigorosamente el tampón de revestimiento en una pileta.
- 45 II. Se golpea fuertemente la placa en una almohadilla de toalla de papel para eliminar el exceso de solución. Se lava tres veces la placa con una solución de lavado BB-T20 utilizando el lavador automático de placas programado para lavar con 350 μl y esperar 5 segundos entre cada lavado.
- 50 III. Utilizando el pipeteador multicanal, se añaden 250 μl de BB-BSA por pocillo. Se cubre y precinta con cinta aislante y se incuba a 37°C durante 30 minutos.

D. Carga de la placa

- I. Se agita vigorosamente el tampón bloqueante en una pileta y se golpea fuertemente la placa en una almohadilla de toalla de papel para eliminar el exceso de solución.
- 55 II. Se añaden 100 μl de BB-BSA a todos los pocillos en cada placa. Se añaden 100 μl de las muestras séricas diluidas adecuadamente a los pocillos adecuados en la columna #1. Cada muestra sérica deberá ensayarse por duplicado.
- 60 III. Utilizando el pipeteador multicanal, se pipetea 100 μl hasta y por debajo de ocho veces en la columna #1 para mezclar la muestra, y transferir entonces 100 μl a la columna #2. Pipetear otra vez hasta y por debajo de ocho veces para mezclar, y transferir 100 μl a la columna #3. Se repiten las diluciones en serie a través de la columna #12. Se descartan los 100 μl en los extremos, después de que se mezcle la columna 12. Deberán encontrarse entonces 100 μl en cada pocillo de la placa.
- 65

ES 2 328 336 T3

E. Incubación

Se cubren y precintan las placas con cinta aislante o Parafilm, incubándolas durante 1 hora a 37°C. Se eliminan los anticuerpos no unidos, mediante el procedimiento mencionado en el punto 3a, lavando otra vez la placa tres veces con BB-T20.

F. Conjugado

I. Se prepara el conjugado anticuerpo secundario anti IgG marcado con peroxidasa, diluyéndolo 1:5.000 en BB-BSA (10 μ l de anticuerpo en 50 ml de BB-BSA en un tubo de ensayo cónico de 50 ml). Se invierte el tubo más de 20 veces y se le hace rotar durante 30 segundos para realizar una mezcla completa. Se vierte el anticuerpo diluido en un recipiente de reactivos que está limpio. El conjugado Anti IgA puede prepararse de una forma correspondiente.

II. Se añaden 100 μ l de la solución del conjugado a cada pocillo de la placa, incluyendo los pocillos en blanco.

III. Se recubre e incuba la placa durante 1 hora a 37°C.

IV. Se elimina la solución del conjugado y se lava la placa tres veces como en el punto 3a.

G. Desarrollo del color

I. Se prepara el reactivo sustrato/colorimétrico 10-15 minutos antes de utilizarlo (para su disolución completa), disolviendo 3 comprimidos que van a desarrollar una densidad óptica), en un tampón sustrato de 30,4 ml en un tubo cónico de polipropileno de 50 ml, recubierto por una lámina delgada.

II. Utilizando el pipeteador multicanal, se añaden 100 μ l del reactivo a cada pocillo. Se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos.

III. Se detiene la reacción después de 15 minutos, añadiendo 50 μ l de 1M ácido sulfúrico a cada pocillo, con el pipeteador multicanal.

H. Lectura de la placa

I. Las placas deberán “detenerse” de una forma secuencial, con 1-2 minutos entre cada placa, de modo que el tiempo de “detención” a “lectura” sea consistente entre las placas (después de la detención de la reacción en la última placa, se lee la primera placa en el apropiado lector de placas a 490 nm. Después de 1-2 minutos, se lee la segunda placa, y la tercera placa 1-2 minutos después de esto).

I. Determinación del título inmunoglobulínico

El título de cada una de las muestras séricas se define como el (valor) recíproco de la primera dilución seriada el doble que posee un valor OD que es superior o igual al doble del valor anterior. Los valores OD para los animales de control se promedian en cada dilución, determinándose el título medio para el grupo.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de por lo menos un antígeno y un adyuvante glicolípido en la preparación de un medicamento que se puede administrar sublingualmente, para producir una respuesta inmune sistémica y de las mucosas, en la que la respuesta inmune de las mucosas se genera en un lugar distal, así como local, al lugar de administración sublingual.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el procedimiento produce una respuesta inmune de IgA.
3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el procedimiento produce una respuesta inmune de IgG.
4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para tratar infecciones bacterianas o víricas, cáncer, autoinmunidad o alergia en humanos o en animales.
5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el adyuvante glicolípido es un adyuvante que induce TH1.
6. Utilización según la reivindicación 5, en la que el adyuvante glicolípido es el lípido A monofosforil 3 de-O-acilado (MPL[®]), o un derivado o una sal del mismo.
7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el antígeno deriva de una bacteria, un virus, un prion, un neoplasma, un autoantígeno, un animal, una planta, y un material recombinante o sintético.
8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el antígeno está en forma de un polipéptido.
9. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el antígeno es un alérgeno.
10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el antígeno está en forma de un vector que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido antigénico, y en la que dicho polinucleótido está unido funcionalmente a una secuencia reguladora que regula la expresión de dicho polinucleótido.
11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que por lo menos un antígeno y un adyuvante glicolípido se presentan en una composición única.
12. Utilización según la reivindicación 11, en la que la composición está en forma de una solución acuosa, un gel, una cápsula, una pastilla o un comprimido.
13. Composición que puede administrarse sublingualmente que comprende por lo menos un antígeno y un adyuvante glicolípido para producir una respuesta inmune sistémica y de las mucosas, en la que la respuesta inmune de las mucosas se genera en un lugar distal, así como local, al lugar de la administración sublingual.
14. Composición que puede administrarse sublingualmente según la reivindicación 13, en la que la respuesta inmune comprende una respuesta inmune de IgA.
15. Composición que puede administrarse sublingualmente según la reivindicación 13, en la que la respuesta inmune comprende una respuesta inmune IgG.
16. Composición que puede administrarse sublingualmente según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 para tratar infecciones bacterianas o víricas, cáncer, autoinmunidad o alergias, en humanos o animales.
17. Composición que puede administrarse sublingualmente según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en la que el adyuvante glicolípido es un adyuvante que induce TH-1.
18. Composición que puede administrarse sublingualmente según la reivindicación 17, en la que el adyuvante glicolípido es el lípido A mono-fosforil 3 de-O-acilado (MPL[®]), o un derivado o una sal del mismo.
19. Composición que puede administrarse sublingualmente según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en la que el antígeno deriva de una bacteria, un virus, un prion, un neoplasma, un autoantígeno, un animal, una planta, y un material recombinante o sintético.
20. Composición que puede administrarse sublingualmente según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en la que el antígeno está en forma de un polipéptido.
21. Composición que puede administrarse sublingualmente según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en la que el antígeno es un alérgeno.

ES 2 328 336 T3

22. Composición que puede administrarse sublingualmente según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en la que el antígeno está en forma de un vector que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido antigénico, y en la que dicho polinucleótido está unido funcionalmente a una secuencia reguladora que regula la expresión de dicho polinucleótido.

5

23. Composición que puede administrarse sublingualmente según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22, en la que por lo menos un antígeno y el adyuvante glicolípido se presentan en una composición única.

24. Composición que puede administrarse sublingualmente según la reivindicación 23 en forma de una solución acuosa, un gel, una cápsula, una pastilla o un comprimido.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65