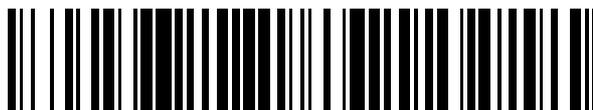


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01) **A61P 37/00** (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)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2001 E 01942305 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **02.03.2016 EP 1255563**

54

Título: **Composición de antígeno y adyuvante glicolipídico para administración sublingual**

30

Prioridad:

14.01.2000 GB 0000891

45

Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
21.06.2016

73

Titular/es:

**ALLERGY THERAPEUTICS (UK) LIMITED (50.0%)
DOMINION WAY WORTHING
WEST SUSSEX BN14 8SA, GB y
CORIXA CORPORATION (50.0%)**

72

Inventor/es:

**WHEELER, ALAN;
ELLIOTT, GARRY y
CLUFF, CHRISTOPHER, WALLACE**

74

Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 328 336 T5

DESCRIPCIÓN

Composición de antígeno y adyuvante glicolípido para administración sublingual

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para producir una respuesta inmunitaria mucosal y sistémica usando una formulación administrada por vía sublingual en particular, pero no de forma exclusiva, para uso en inmunización como una vacuna profiláctica o terapéutica, o en el tratamiento de alergia.

10

Antecedentes de la invención

El sistema inmunitario ha evolucionado específicamente para detectar y eliminar material extraño o nuevo de un hospedador. Este material puede ser de origen vírico, bacteriano, o parasitario y se puede encontrar fuera o dentro de las células del hospedador, o tener un origen neoplásico. También puede ser de otras fuentes y no patógeno o no dañar de forma intrínseca a todos los sujetos.

15

El sistema inmunitario mucosal (MIS) consiste en tejidos linfoides dentro y directamente por debajo del revestimiento epitelial del tracto respiratorio, genitourinario y gastrointestinal así como por debajo del sistema ductal de las glándulas salivales, lagrimales y mamarias. El producto primario del MIS es la IgA.

20

La vacunación es la aplicación mejor conocida y más satisfactoria de un principio inmunológico para la salud humana. Naturalmente, para su introducción y aprobación, una vacuna debe ser eficaz y la eficacia de todas las vacunas se revisa de vez en cuando. En la eficacia de una vacuna influyen muchos factores. Por ejemplo, una vacuna normalmente se administra por vía subcutánea o intramuscular. Recientemente, la vía sublingual se ha usado para administración de vacunas terapéuticas para la alergia. Una vacuna eficaz debe inducir la inmunidad apropiada en términos de efectos cuantitativos y cualitativos y ser estable en el almacenamiento. En particular con vacunas no vivas, a menudo es necesario reforzar su inmunogenicidad con un adyuvante. Esto también se puede aplicar a algunas vacunas vivas, por ejemplo atenuadas. Un adyuvante es una sustancia que aumenta la respuesta inmune a un antígeno.

25

30

Durante el trabajo en la década de 1920 sobre la producción de antisuero animal para terapia en seres humanos, se descubrió que ciertas sustancias, en particular sales de aluminio añadidas a antígenos o emulsiones que incorporan antígenos, aumentar en gran medida la producción de anticuerpos, es decir, actúan como adyuvantes. El hidróxido de aluminio aún se usa ampliamente, por ejemplo, con toxoide de difteria y tetánico y la tirosina insoluble se usa con algunas vacunas para alergia. Otros adyuvantes más solubles también tienen efectos deseables tales como la inducción de un aumento de la respuesta inmunitaria dirección de la respuesta hacia, por ejemplo, una respuesta de tipo TH1.

35

El monofosforil lípido A 3 des-O-acilado se conoce a partir del documento GB-A-2220211 (Ribi). Químicamente, puede ser una mezcla de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado con cadenas 4, 5 o 6 aciladas y en la actualidad se fabrica en Corixa Corporation. Una forma preferente de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (también denominado en el presente documento adyuvante de MPL®) se desvela en la Solicitud de Patente Internacional N° WO92/16556.

40

La Publicación de Patente Internacional N° WO98/44947 describió una formulación para uso en terapia de desensibilización de personas que padecen alergia que comprendía un alérgeno opcionalmente modificado, tirosina y monofosforil lípido A 3 des-O-acilado.

45

Se han realizado esfuerzos considerables para producir mejores adyuvantes, en particular para respuestas mediadas por linfocitos T, pero se debería hacer énfasis en que muy pocos de estos adyuvantes más recientes ya están aceptados para uso de rutina en seres humanos. Sin embargo, el adyuvante de MPL® se ha autorizado para uso con una vacuna para Melanoma y algunas vacunas para alergia que contienen adyuvante de MPL® están disponibles como 'Agentes Especiales' en Alemania, Italia y España.

50

El documento de patente WO00/50078 de Chiron describe una composición que incluye bioadhesivos en combinación con adyuvantes y antígenos para administración por vía mucosal. Sin embargo, este solamente demuestra la producción de una respuesta inmunitaria de IgG con la composición. Además, el bioadhesivo es un agente que se une física o químicamente a la mucosa. Se cree que puede haber problemas de seguridad asociados con tal bioadhesión de algunas composiciones que contienen antígenos. No se enseña la administración sublingual; administrando ser la composición de ensayo por vía intranasal.

55

60

Chauncey *et al.*, J. dent. res. vol 33, n.º 3, págs. 321-334 (1954), Lindquist *et al.*, Enzyme, vol. 20, págs. 277-291 (1975), Chauncey, The Journal of the American Dental Association, vol. 44, págs. 360-367 (1961), Garren y Repta, International Journal of Pharmaceutics, vol. 48, págs. 189-194 (1988) todos muestran que la saliva humana comprende esterasas que pueden hidrolizar los adyuvantes glicolípidicos. Valdez *et al.*, Dig. Dis., vol. 9, págs. 125-

65

132 (1991) describen que tras la estimulación aumenta la producción de saliva y que la saliva comprende lipasas y amilasas que pueden hidrolizar glicolípidos.

5 Evidentemente, todavía existe una necesidad de una composición que genere una respuesta inmunitaria mucosal y sistémica para proteger frente a bacterias, virus y otros organismos para sicarios, y que se pueda usar como una vacuna para la alergia. De forma ideal, tal composición se debería poder administrar mediante una vía que esté asociada con el buen cumplimiento del paciente, tal como la vía sublingual. También se ha encontrado que la administración sublingual puede proporcionar una absorción rápida y una buena biodisponibilidad de la sustancia que se está administrando. La administración sublingual también puede ser ventajosa con respecto a las inyecciones intermitentes en el mantenimiento de concentraciones en sangre adecuadas de la sustancia que se está administrando. Preferentemente, la composición debería usar adyuvantes convenientemente disponibles.

Sumario de la Invención

15 La invención está definida por el uso de la reivindicación 1 y por la reivindicación 13. La presente invención se refiere a un sistema de administración sublingual y tiene ventajas asociadas con este medio de administración. Con más detalle, los inventores han encontrado que es posible usar adyuvantes glicolipídicos, tal como el adyuvante de MPL®, con un antígeno para producir una respuesta inmunitaria mucosal (MIR) cuando se administra por vía sublingual. Los inventores entienden que son los primeros en darse cuenta que el uso de adyuvantes glicolipídicos por vía sublingual puede producir una IgG sistémica así como una respuesta mediada por la IgA mucosal. De forma sorprendente, los inventores también han encontrado que la MIR se puede generar en un sitio que es distal con respecto a, así como local con respecto a, el sitio de administración sublingual. Por ejemplo, la IgA se puede detectar en otros tejidos linfoides, tal como en el tracto intestinal, tracto respiratorio y tracto genitourinario. Esto presenta implicaciones particularmente importantes para el tratamiento, por ejemplo, de enfermedades transmitidas por vía sexual, ya que es conveniente la aplicación sublingual y por lo tanto puede conducir al buen cumplimiento por parte del paciente con cualquier régimen de dosificación.

30 Parece que el efecto del adyuvante se debe principalmente a dos actividades: la concentración persistente de antígeno en un sitio en el que los linfocitos u otras células competentes se exponen al mismo (el efecto de "liberación prolongada") y la inducción de citoquinas, que regulan la función de los linfocitos. Algunos dispositivos más nuevos tales como liposomas y complejos de estimulación inmune (ISCOMS) pueden conseguir la misma finalidad asegurando que los antígenos atrapados en los mismos se administren a células que presentan antígenos. Se cree que algunos productos bacterianos tales como paredes celulares de micobacterias, endotoxinas, etc., actúan estimulando la formación de citoquinas. La inducción de citoquinas puede ser particularmente útil en pacientes inmunocomprometidos, que a menudo fracasan en su respuesta a vacunas normales. Se espera que tal inducción de citoquinas también pueda ser útil en la dirección de la respuesta inmunitaria en la dirección deseada, por ejemplo en enfermedades en las que solamente se desea la capacidad de respuesta de las células TH1 o TH2 (Roitt *et al.*, "Immunology" 4ª edición).

40 Los inventores también proporcionan una formulación de antígeno, que pueda inclinar el equilibrio de TH1-TH2 a favor de una respuesta de TH1, que se pueda administrar a las mucosas, preferentemente a la boca y en particular al sitio sublingual. La formulación es útil en inmunoterapia, en particular en el campo de las vacunas. También es útil en el estudio de respuestas inmunes y en la producción de anticuerpos.

45 Exposición de la invención

La presente invención se refiere al uso de al menos un antígeno y un adyuvante glicolipídico en la preparación de un medicamento que se puede administrar por vía sublingual para producir una respuesta inmunitaria mucosal y sistémica, donde la respuesta inmunitaria mucosal se genera en un sitio tanto distal como local respecto al sitio de administración sublingual.

55 La presente invención se refiere además a una composición que se puede administrar por vía sublingual que comprende al menos un antígeno y un adyuvante glicolipídico para producir una respuesta inmunitaria mucosal y sistémica, donde la respuesta inmunitaria mucosal se genera en un sitio tanto distal como local respecto al sitio de administración sublingual.

60 En su sentido más amplio, la presente invención se refiere al descubrimiento de que algunos glicolípidos conducirán una respuesta humoral sistémica y mucosal a antígenos cuando una composición que los contiene se administra por vía sublingual en un ser humano o animal. Los inventores han encontrado que se puede usar cualquier excipiente administrable por vía sublingual conveniente. La capacidad de un adyuvante glicolipídico para conducir IgG, IgG₁ e IgG_{2a} en suero cuando se administra con antígeno por vía sublingual muestra que la invención se puede aplicar a vacunas profilácticas así como a desensibilización de alergia. La capacidad de un adyuvante glicolipídico para conducir la IgA mucosal después de dosificación sublingual muestra adicionalmente que la invención es una manera útil para generar inmunidad mucosal. La generación de inmunidad mucosal es útil para protección frente a patógenos transmitidos por el aire y en particular enfermedades transmitidas por vía sexual.

En términos generales, la presente invención se refiere a una composición que comprende (A) al menos un antígeno y (B) un adyuvante glicolípido y sus usos.

5 En particular, se describe un método para producir una respuesta inmunitaria mucosal y/o sistémica en un ser humano o animal con necesidad de la misma que comprende administrar una composición que comprende al menos un antígeno y un adyuvante glicolípido.

10 Dicho de otra manera, la presente invención se refiere al uso de al menos un antígeno y un adyuvante glicolípido en la preparación de un medicamento para producir una respuesta inmunitaria mucosal y/o sistémica.

Se describe un método para tratar una enfermedad transmitida por vía mucosal que comprende administrar por vía sublingual a un ser humano o animal una composición que comprende al menos un antígeno y un adyuvante glicolípido.

15 Dicho de otra manera, la presente invención se refiere al uso de al menos un antígeno y un adyuvante glicolípido en la preparación de un medicamento que se puede administrar por vía sublingual para el tratamiento de una enfermedad transmitida por vía mucosal.

20 Estos métodos pueden generar una respuesta inmunitaria mediada por IgA.

Por lo tanto, también se describe un método para producir una respuesta inmunitaria de IgA en un ser humano o animal que comprende administrar por vía sublingual una composición que comprende al menos un antígeno y un adyuvante glicolípido.

25 Dicho de otra manera, la presente invención se refiere al uso de al menos un antígeno y un adyuvante glicolípido en la preparación de un medicamento que se puede administrar por vía sublingual para producir una respuesta inmunitaria de IgA.

30 La composición se debería administrar en una cantidad eficaz. La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad no tóxica pero suficiente de la composición para proporcionar la respuesta inmunológica deseada. Una cantidad eficaz apropiada la puede determinar un experto en la materia.

35 Las composiciones pueden ser ya sea profilácticas (es decir, previenen infecciones) o terapéuticas (para tratar enfermedades después de infección).

40 Preferentemente, la composición se administra a seres humanos, mamíferos y otros primates, incluyendo primates no humanos tales como simios y monos, animales de granja tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores tales como ratones, ratas y cobayas; aves, que incluyen aves domésticas, salvajes y de caza tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos, y similares.

El método también puede generar una respuesta inmunitaria mediada por IgG.

45 En la presente se describe una composición que comprende:

- (A) uno o más antígenos; y
- (B) un adyuvante glicolípido.

50 El glicolípido es un adyuvante que induce TH1.

Preferentemente la composición útil en la presente invención comprende un diluyente, excipiente o vehículo que se puede administrar por vía sublingual que ayuda en la disponibilidad de (A) y (B) en el sitio de administración (sitio mucosal sublingual).

55 Preferentemente, el antígeno deriva de una bacteria, virus, prión, neoplasia, autoantígeno, planta, animal, u otro organismo patógeno o no patógeno, material sintético o recombinante.

60 El antígeno puede comprender porciones seleccionadas de moléculas antigénicas, o moléculas preparadas a partir de tecnologías sintéticas o recombinantes.

Preferentemente, el antígeno es un alérgeno. Los alérgenos son tipos de antígenos, que tienen la inclinación a inducir alergia. El alérgeno puede comprender porciones seleccionadas de moléculas alergénicas, o moléculas preparadas a partir de tecnologías sintéticas o recombinantes. En lo sucesivo en el presente documento los términos antígeno o antígenos incluyen los términos alérgeno o alérgenos respectivamente.

65

Preferentemente, el antígeno se encuentra en forma de un polipéptido, carbohidrato o lípido. Como alternativa, el antígeno puede estar en forma de un vector que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido antigénico, y en el que dicho polinucleótido se une de forma operativa a una secuencia reguladora que regula la expresión de dicho polinucleótido.

5 Preferentemente, el adyuvante glicolípido que induce TH1 es, sin carácter limitante, un adyuvante MPL®, 3D-MPL o uno de sus derivados o de sus sales.

Preferentemente, la composición se encuentra en forma de una vacuna.

10 Preferentemente, la composición se encuentra en forma de una solución acuosa, un gel, un parche, una pastilla para chupar, cápsula o un comprimido, lo más preferentemente una solución acuosa o gel.

15 La presente invención también proporciona el uso de la composición en la preparación de una medicina para el tratamiento o la prevención de una infección bacteriana o priónica vírica u otra enfermedad tal como el cáncer, autoinmunidad o alergia en un ser humano o un animal.

20 Además se describe el uso de la composición en un método para producir uno o más anticuerpos que reconocen dicho antígeno. Los anticuerpos producidos se pueden usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento de infecciones bacterianas o víricas, cáncer, autoinmunidad o alergia en un ser humano o animal.

Se describe un método para preparar una preparación de antisuero o inmunoglobulina a partir del mismo, que comprende la inmunización de un ser humano o animal con una composición de la presente invención.

25 También se describe un método para preparar una composición de la presente invención que comprende la mezcla de una solución de antígenos y el adyuvante glicolípido con un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, preferentemente una solución acuosa o un gel.

Descripción detallada

30 A continuación se describirán diversas características y realizaciones adicionales preferentes de la presente invención a modo de ejemplo no limitante.

Respuesta inmune

35 Una respuesta inmunitaria es una respuesta selectiva organizada por el sistema inmunitario de los vertebrados en los que se producen anticuerpos y/o células citotóxicas frente a microorganismos invasivos, parásitos, tejido trasplantado y otras muchas sustancias que se reconocen como extrañas en el organismo, es decir, antígenos. La producción de anticuerpos en circulación en la sangre se conoce como respuesta humoral; la producción de células citotóxicas como respuesta inmunitaria mediada por células o celular.

40 Las células implicadas en el sistema inmunitario se organizan en tejidos y órganos con el fin de realizar sus funciones de la manera más eficaz. De forma colectiva, estas estructuras se denominan sistema linfoide. El sistema linfoide comprende linfocitos, células auxiliares (macrófagos y células que presentan antígenos) y en algunos casos, células epiteliales. Este se organiza ya sea en órganos encapsulados de forma discreta o acumulaciones de tejido linfoide difuso. Los órganos y tejidos linfoides principales se clasifican ya sea 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 que los linfocitos pueden interactuar entre sí, con células auxiliares y con antígenos.

50 Con más detalle, la generación de linfocitos en órganos linfoides primarios (linfopoyesis) va seguida de su migración a tejidos secundarios periféricos. Los tejidos linfoides secundarios comprenden órganos encapsulados bien organizados - el bazo y nódulos linfáticos - y acumulaciones no encapsuladas que se encuentran alrededor del organismo. La parte principal del tejido linfoide no organizado se encuentra en asociación con superficies de mucosa y se denomina tejido linfoide asociado a mucosa (MALT).

55 El sistema mucosal protege el organismo de antígenos que entran en el organismo directamente a través de superficies del epitelio de la mucosa. Por lo tanto, los tejidos linfoides se encuentran asociados con superficies que revisten el tracto intestinal, el tracto respiratorio y el tracto genitourinario. La presente invención se refiere en particular a tejidos linfoides encontrados en asociación con superficies que revisten la región sublingual. El mecanismo efector principal en estos sitios es la IgA secretora (sIgA), secretada directamente en las superficies del epitelio de la mucosa o el tracto.

60 La IgA secretora representa aproximadamente un 95 % de toda la Ig encontrar en secreciones y es principalmente dimérica con dos unidades monoméricas unidas de forma covalente mediante una cadena J. La IgA dimérica se une a un receptor de inmunoglobulina polimérico, pIGR, en la superficie basal de las células del epitelio de la mucosa.

Este complejo de IgA-pIGR experimentar endocitosis y se transporta a la superficie apical (luminal) de la célula epitelial. Durante este proceso de transporte, una pequeña pieza del pIGR se extiende con el componente restante denominado ahora componente secreto. Por lo tanto, la IgA se secreta como IgA dimérica unida a un componente secretor.

5 La IgA secretora no activa el sistema de complemento pero reviste bacterias y virus tales como polio, coxsackie, rota y herpes, evitando de este modo su adherencia al epitelio del revestimiento mucosal. Además, algunos virus dentro de los epitelios superficiales se pueden neutralizar mediante la IgA internalizada con pIGR.

10 La generación de IgA secretora, y por lo tanto la generación de una respuesta inmunitaria mucosal (en lo sucesivo en el presente documento MIR), se puede detectar usando técnicas convencionales en la técnica, tales como ELISA. A modo de ejemplo solamente el ensayo de ELISA de ovoalbúmina estandarizado usado en los Ejemplos 1 y 2 se describe en el Ejemplo de Preparación 1.

15 Una MIR a un antígeno puede conducir a un estado de respuesta sistémica al mismo antígeno, conocido como tolerancia mucosal u oral. Por lo tanto, la inmunización mucosal es una manera eficaz de estimular las respuestas inmunes tanto locales como sistémicas.

Antígeno

20 Históricamente, en la técnica, el término "antígeno" se usó para cualquier molécula que inducía a los linfocitos B a producir un anticuerpo específico. En la actualidad, sin embargo, el término se puede usar para indicar cualquier molécula que se puede reconocer de forma específica por los elementos adaptativos de la respuesta inmune, es decir, por los linfocitos B o los linfocitos T, o ambos. Por lo tanto, en la técnica se entiende que el término "antígeno" hace referencia a una molécula que reacciona con anticuerpo preformado y/o con diversos receptores específicos en los linfocitos T y B. Esta definición incluye lo que tradicionalmente se conoce como "alérgenos", es decir, un agente, por ejemplo polvo de polen, que causa hipersensibilidad mediada por IgE.

30 Una alergia (hipersensibilidad de tipo 1) es una respuesta a antígeno ambiental (alérgeno) en el que se produce el anticuerpo de IgE en cantidades relativamente grandes en sujetos alérgicos en comparación con una persona no alérgica y se une mastocitos y basófilos en particular. Una reacción de hipersensibilidad inmediata se produce mediante los productos de mastocitos (histamina, etc.) cuando se liberan después de la reacción entre IgE en la superficie del mastocito o basófilo y alérgeno causando asma, fiebre del heno, enfermedad del suero, anafilaxis sistémica o dermatitis por contacto. Existen cuatro tipos de reacción de hipersensibilidad (Tipos I, II, III e IV). Los Tipos II y III están mediados por anticuerpos; el cuarto está mediado principalmente por linfocitos T y macrófagos. La invención permite a uno inmunizar con un alérgeno con el fin de alejar el sesgo de una respuesta inmunitaria alérgica de IgE hacia una respuesta inmunitaria no alérgica.

40 Por lo tanto, el "antígeno" usado en la presente invención puede ser un "alérgeno" derivado de cualquier sustancia que causa alergia, tal como polen (por ejemplo, ambrosía o polen de abedul), alimentos, veneno de insectos, moho, pelo de animal o ácaro del polvo doméstico (*D. farinae* o *D. pteronyssinus*).

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

En una realización preferente, la presente invención se refiere a una formulación para uso como una vacuna y el antígeno es uno útil en tal vacuna.

50 El antígeno usado en la presente invención puede ser cualquier antígeno apropiado, que está disponible o se convierte en disponible.

El tipo de antígeno usado en una vacuna depende de muchos factores. En general, cuantos más antígenos de un microbio están retenidos en la vacuna, mejor y los organismos vivos tienden a ser más eficaces que los muertos. Algunas excepciones a esta regla son las enfermedades en las que una toxina es responsable de cualquier efecto patogénico. En este caso, la vacuna se puede basar en la toxina o toxoide solos.

60 El antígeno puede derivar de cualquier organismo vivo; organismos intactos o no vivos; fragmentos subcelulares; toxoides; antígenos o anti-idiotipos basados en ADN recombinante o antígenos sintéticos. El antígeno puede derivar de organismos naturales o atenuados, que pueden ser víricos o bacterianos. El tipo de antígeno puede ser un polisacárido capsular, antígeno de superficie o interno. Si se basa en ADN recombinante, el antígeno se puede obtener a partir de un gen clonado y expresado o ADN desnudo.

El antígeno se puede modificar por reacción, por ejemplo, con un agente de reticulación, tal como un dialdehído, más particularmente glutaraldehído.

65

Por ejemplo, algunos microorganismos frente a los cuales hay disponibilidad de vacunas o se buscan incluyen *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Morazella*, *Flavobacterium*, *Bordetella*, *Actinobacillus*, *Neisseria*, *Brucella*, *Haemophilus* y *Escherichia coli*.

Algunas vacunas preferentes incluyen vaccinia (para viruela); bacilo vole (para TB); polio; sarampión, parotiditis; rubeola; fiebre amarilla; varicela zóster; BCG; rabia; gripe; hepatitis A; tífus; tosferina; fiebre tifoidea; cólera; peste; neumococos; meningococos; *Haemophilus influenzae*; hepatitis B; hepatitis C; tétanos y difteria. Algunas vacunas basadas en toxinas incluyen *Chlostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Vibrio cholerae* y *Clostridium perfringens*.

Otras enfermedades principales para las que las vacunas pueden ser útiles incluyen: VIH, herpes, virus, adenovirus, rinovirus, estafilococo, estreptococos del grupo A, *Mycobacterium leprae*, *Treponema pallidum*, *Chlamydia*, *Candida*, *Pneumocystis*, malaria, tripanosomiasis; enfermedad de Chagas; esquistosomiasis y oncoceriasis.

Algunas enfermedades transmitidas por vía sexual para las que las vacunas pueden ser útiles incluyen, además del VIH y herpes mencionados anteriormente: *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, Clamidia, *Calymmatobacterium granulomatis* y hepatitis.

La presencia de antígenos tumorales también se ha demostrado, y, como resultado, ha surgido el concepto de la vacunación frente al cáncer. Además, en principio, la confección e implantación se puede interrumpir mediante la inducción de inmunidad frente a un amplio intervalo de hormonas del embarazo y otras hormonas reproductoras.

Por lo general, el antígeno será un polipéptido, pero también se pueden usar estructuras antigénicas alternativas, tales como ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, organismos completos o atenuados, tales como virus, bacterias o protozoos.

El término "polipéptido" se usa generalmente para indicar moléculas construidas a partir de una pluralidad de aminoácidos, estando los aminoácidos unidos en conjunto de forma covalente tal como a través de enlaces peptídicos. Por lo general, polipéptido se usa de forma indistinta con "proteína" o "péptido" por que no se ve implicada diferencia alguna en el tamaño o función. Algunos polipéptido recombinantes se pueden preparar mediante procesos bien conocidos en la técnica tales como los que se describen en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; 2ª Ed., Cold Spring Harbor Lab. Press (1989).

Adyuvante glicolipídico

En términos generales, un adyuvante es una sustancia que no aumenta de forma específica la respuesta inmunitaria hacia un antígeno, es decir, es un inmunoestimulante. En términos generales un glicolípido es una molécula lipídica de la membrana celular con una cadena de carbohidrato unida ha una cola hidrófoba. Los adyuvantes glicolipídicos preferidos de la presente invención son lipopolisacáridos modificados. El lipopolisacárido se modifica de modo que su toxicidad se reduce en comparación con el polisacárido de tipo silvestre correspondiente o lipopolisacárido a partir del cual deriva. Preferentemente, el adyuvante glicolipídico utilizado en la presente invención es un lipopolisacárido enterobacteriano destoxificado o su componente de lípido A. El término "destoxificado" se refiere a mutantes tanto completamente no tóxicos como tóxicos de baja capacidad residual de la toxina. Preferentemente, el adyuvante destoxificado retiene una toxicidad inferior a un 0,01 %, más preferentemente un 0,001 %, de la toxina de tipo silvestre correspondiente. La toxicidad se puede medir en células CHO mediante la evaluación de cambios morfológicos.

Preferentemente, el adyuvante glicolipídico es un adyuvante que induce TH1. Por "adyuvante que induce TH1" los inventores quieren hacer referencia a un adyuvante, que tiene propiedades que aumentan la respuesta de TH1 a un antígeno. Sin embargo, al adyuvante también puede tener la tendencia a aumentar simplemente el nivel de anticuerpo o células específicas de antígeno producidas o incluso, mediante la inducción de citoquina de modulación que causa anergia (sin capacidad de respuesta) en ciertas poblaciones celulares.

Con más detalle, la respuesta inmunitaria al antígeno es generalmente cualquiera mediada por linfocitos T (que puede implicar muerte celular) o humoral (producción de anticuerpo mediante el reconocimiento de epítomos en el antígeno). El patrón de producción de citoquinas mediante los linfocitos T implicados en una respuesta inmunitaria puede influir en cuál de estos tipos de respuestas predomina: por ejemplo, la inmunidad mediada por células (TH1) se caracteriza por una producción elevada de IL-2 e IFN γ pero baja de IL-4, mientras que en la inmunidad humoral (TH2) el patrón puede ser producción baja de IL-2 e IFN γ pero elevada que IL-4, IL13, IL-5. Las respuestas normalmente están moduladas al nivel del órgano linfoide secundario o células, de modo que la manipulación farmacológica de los linfocitos T específicos y antígenos que presentan patrones de citoquinas celulares pueden influir en el tipo y el alcance de la respuesta inmunitaria generada.

El equilibrio de TH1-TH2 se refiere a la interconversión o predominancia de las dos formas diferentes de linfocitos T auxiliares. Las dos formas tienen efectos a gran escala y a menudo de oposición en el sistema inmune. Si una

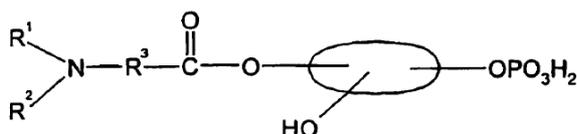
respuesta inmunitaria favorece a las células TH1, entonces estas células conducirán una respuesta celular con producción de anticuerpos asociada, mientras que las células TH2 conducirán una respuesta dominada por anticuerpos. El isotipo de anticuerpos responsables de algunas reacciones alérgicas, IgE, y respuestas inflamatorias asociadas están inducidas por citoquinas a partir de células TH2.

5 La eficacia de un adyuvante como un adyuvante que induce TH1 se puede determinar mediante la determinación del perfil de anticuerpos dirigidos frente a un antígeno que resulta de la administración de este antígeno en vacunas, que también están formadas por varios adyuvantes.

10 Preferentemente, el adyuvante es un lipopolisacárido modificado. Como se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.912.094 los lipopolisacáridos enterobacterianos (LPS) son un potente inmunoestimulante. Sin embargo, también pueden provocar respuestas nocivas y en ocasiones mortales. En la actualidad se sabe que las actividades endotóxicas asociadas con LPS resultan de su componente de lípido A. Por consiguiente, la presente invención utiliza más preferentemente un derivado destoxificado del lípido A. Corixa Corporation produjo un derivado del lípido A conocido originalmente como endotoxina destoxificada refinada (RDE) pero que se ha llegado a conocer como monofosforil lípido A (adyuvante de MPL®). El adyuvante de MPL® se puede producir calentando a reflujo LPS o lípido A obtenido de mutantes sin heptosa de bacterias gram negativas (por ejemplo, *Salmonella sp.*) en soluciones de ácido mineral de fuerza moderada (por ejemplo, HCl 0,1 N) durante un periodo de aproximadamente 20 30 minutos. Este tratamiento da como resultado la pérdida del resto fosfato en la posición 1 de la glucosamina en el extremo reductor. Además, el núcleo de carbohidrato se puede retirar de la posición 6' de la glucosamina no reductora durante este tratamiento con adyuvante de MPL® y monofosforil lípido A 3-desacilado y algunos métodos para su fabricación se desvelan en el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.436.727, y en el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.912.094 y en el certificado de reexamen B1 4.912.094.

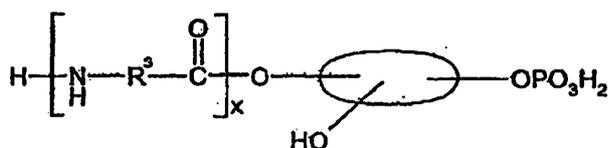
25 Preferentemente, sin embargo, se usa un LPS o lípido A modificado en el que el lípido A destoxificado retiene el resto núcleo unido a la posición 6' de una glucosamina no reductora. Tales derivados de LPS y lípido A también se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.912.094. Con más detalle, el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.912.094 desvela un lipopolisacárido modificado que se obtiene con el método de retirar de forma selectiva solamente el resto de ácido β-hidroximirístico de lipopolisacárido que se une mediante éster a la glucosamina con extremo reductor en la posición 3' de dicho lipopolisacárido, que comprende someter a dicho lipopolisacárido a hidrólisis alcalina. En la presente invención se pueden usar dicho monofosforil lípido A des-O-acilado (adyuvante de MPL®), difosforil lípido A (DPL) y LPS. Por lo tanto, en una realización preferente, la presente invención usa adyuvante de MPL®, DPL o LPS en los que la posición 3' de la glucosamina con extremo reductor está des-O-acilada. Estos compuestos se conocen como 3D-MPL, 3D-DPL y 3D-LPS respectivamente.

35 En el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.987.237, se describen derivados de adyuvante de MPL® que tienen la fórmula:

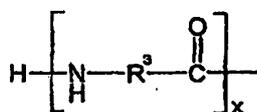


40 y en la que R¹ y R² son H, R³ es un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada formado por C, H y opcionalmente O, N y S, en el que, si hay más de un átomo, pueden ser iguales o diferentes, en la que el número total de átomos de C no supera 60, y el círculo representa un núcleo de MPL.

45 Como alternativa, el derivado de adyuvante de MPL® tiene la fórmula



50 en la que el segmento del derivado representado por



contiene de 2 a 60 átomos de C y en la que R³ es un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada formado por C, H y opcionalmente O, N y S, en el que, si hay más de un átomo, pueden ser iguales o diferentes, y x es un mínimo de 1

y puede ser cualquier número entero de modo que el número total de átomos de C en todos los segmentos de x no supera 60, y en la que la estructura química de cada R³ puede ser igual o diferente en cada uno de tales segmentos y en la que el círculo representa un núcleo de MPL.

- 5 Un adyuvante disponible en el mercado de Corixa Corporation incluye un 2 % de Escualeno, Tween 80 al 0,2 % así como el adyuvante de MPL®.

Otro adyuvante disponible en el mercado es el adyuvante Detox® (Corixa Corporation) que comprende adyuvante de MPL® y esqueleto de pared celular de micobacterias.

- 10 Todos estos derivados o sales de LPS o lípido A que están o llegan a estar disponibles se pueden usar en la presente invención. Preferentemente, los derivados y sales son aquellos que son farmacéuticamente aceptables.

- 15 El adyuvante que induce TH1 se puede mezclar con los otros componentes de la composición inmediatamente antes de su administración. Como alternativa, se puede formular junto con los otros componentes durante la fabricación del producto. Como alternativa, se puede administrar en un momento diferente al de los otros componentes. La administración puede ser mediante una serie de vías. Preferentemente, el adyuvante glicolípido se administra en una cantidad de aproximadamente 1,0 mg a 250 mg, más preferentemente de 25 mg a 50 mg.

20 Vacunas

- Un aspecto se refiere a un método para inducir una respuesta inmunológica, preferentemente una respuesta inmunológica mucosal, en un mamífero, preferentemente seres humanos, que comprende la inoculación por vía sublingual de un individuo con la composición de la presente invención para producir anticuerpos, preferentemente 25 IgA, y/o una respuesta inmunitaria a linfocitos T. preferentemente, la respuesta es adecuada para proteger al dicho individuo de la infección, en particular infección bacteriana o vírica. Preferentemente, la respuesta es adecuada para proteger a dicha individuo de la enfermedad, aunque esa enfermedad ya esté establecida dentro del individuo o no. Por lo tanto, la respuesta inmunológica se puede usar de forma terapéutica o de forma profiláctica.

- 30 Las vacunas se pueden preparar a partir de la composición de la presente invención. Un experto en la materia conoce la preparación de vacunas que contienen un antígeno como el principio activo. Por lo general, tales vacunas se preparan ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de su administración. La preparación también se puede producir en un gel, emulsionado, o la composición encapsulada en liposomas. Algunos excipientes adecuados son, 35 por ejemplo, agua, fosfato de amonio, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos.

- Las composiciones incluyen excipientes usados normalmente tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones 40 de liberación sostenida o polvos y contienen de un 10 % a un 95 % de principio activo, preferentemente de un 25 % a un 70 %. Cuando la composición de vacuna está liofilizada, el material liofilizado se puede reconstituir antes de su administración, por ejemplo en forma de una suspensión. La reconstitución se realiza preferentemente en tampón.

- Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes 45 humectantes o emulgentes, agentes de tamponamiento del pH y/o adyuvantes adicionales, que aumentan la eficacia de la vacuna.

- La proporción de antígeno y adyuvante puede variar en una amplia gama siempre y cuando ambos estén presentes en cantidades eficaces. Por lo general, las vacunas se formulan para que contengan una concentración final de 50 antígeno en el intervalo de 0,2 µg/ml a 200 µg/ml, preferentemente de 5 µg/ml a 50 µg/ml, lo más preferentemente aproximadamente 15 µg/ml. La formulación preferente se puede determinar a través de protocolo de intervalo de dosificación conocido y se hace referencia al "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Mack Publishing Company, 19^a Edn, 1995.

- Después de la formulación, la vacuna se puede incorporar en un envase que puede ser estéril y que a continuación se puede cerrar herméticamente y almacenar a baja temperatura, por ejemplo 4 °C, se puede liofilizar. La liofilización 55 permite el almacenamiento a largo plazo en una forma estabilizada.

- Los antígenos usados en la invención se pueden formular como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con grupos amino libres del péptido) 60 and y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico y maleico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina y procaína.

65

La composición se puede presentar como un comprimido, cápsula u otra formulación conveniente con los excipientes necesarios para preparar tal formulación.

Preparación de anticuerpos usando la composición de la invención

5 Las composiciones de acuerdo con la invención se pueden usar directamente como inmunógenos mediante las vías de administración que se describen en el presente documento, sin el uso de adyuvantes adicionales para generar antisueros, inmunoglobulinas específicas o anticuerpos monoclonales.

10 Se describe un método para inducir la producción de inmunoglobulina específica de antígeno que comprende las etapas de:

- a) inmunizar un animal con una composición de acuerdo con la presente invención; y
- 15 b) recuperar inmunoglobulina específica para una región del antígeno de la composición a partir del suero del animal.
- c) Seleccionar clones de células que producen anticuerpos monoclonales.

Algunas técnicas para generar anticuerpos se enseñan en Kohler y Milstein, Nature (1975) 256: 495-497.

20 Los animales usados para producción de anticuerpos pueden ser cualquier animal usado normalmente para la finalidad, en particular mamíferos. Son especialmente indicados ratones, ratas, cobayas y conejos. Los animales se tratarán con las formulaciones que se describen en el presente documento.

25 Más particularmente, la formulación que comprenderá antígeno se puede usar para producir anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales. Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero seleccionado (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, etc.). El suero del animal inmunizado se recoge y se trata de acuerdo con procedimientos conocidos. Si el suero contiene anticuerpos policlonales para otros antígenos, los anticuerpos policlonales requeridos se pueden purificar mediante cromatografía de afinidad. En la técnica se conocen algunas técnicas para producir y procesar antisueros policlonales.

30 Un experto en la materia también puede producir fácilmente los anticuerpos monoclonales dirigidos frente a antígenos usados en la invención. La metodología general para preparar anticuerpos monoclonales mediante hibridomas se conoce bien. Se pueden crear líneas celulares que producen anticuerpos inmortales mediante fusión celular, y también con otras técnicas tales como transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o transfección con virus de Epstein-Barr. Algunos paneles de anticuerpos monoclonales producidos frente a antígenos se pueden identificar sistemáticamente para diversas propiedades; es decir, para afinidad de isotipo y epítipo.

35 Una técnica alternativa implica la identificación sistemática de bibliotecas de presentación de fagos en las que, por ejemplo, el fago expresa fragmentos de scFv en la superficie de su revestimiento con una gran diversidad de regiones que determinan la complementariedad (CDR). Esta técnica se conoce bien en la técnica.

40 Los anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, que se dirigen frente a antígenos son particularmente útiles en diagnóstico, y los que se neutralizan son útiles en inmunoterapia pasiva. Los anticuerpos monoclonales, en particular, se pueden usar para aumentar los anticuerpos anti-idiotipo. Los anticuerpos anti-idiotipo son inmunoglobulinas que portan una "imagen interna" del antígeno del agente infeccioso frente al que se desea protección.

45 En la técnica se conocen algunas técnicas para aumentar los anticuerpos anti-idiotipo. Estos anticuerpos anti-idiotipo también pueden ser útiles para tratamiento, así como para una explicación de las regiones inmunogénica es de los antígenos. Para los fines de la presente invención, el término "anticuerpo", a menos que se especifique de otro modo, incluye fragmentos de anticuerpos completos que retienen su actividad de unión para un antígeno diana. Tales fragmentos incluyen fragmentos de Fv, F(ab') y F(ab')₂, así como anticuerpos de cadena individual (scFv). Además, los anticuados y fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanizados, por ejemplo como se describe en el documento de patente EP-A-239400.

Preparación de Composición

55 La composición se puede preparar mezclando una disolución acuosa del antígeno con el adyuvante glicolípido, y añadiendo el diluyente, excipiente o vehículo que se puede administrar por vía mucosal, ya sea antes o después de la mezcla mencionada anteriormente. Como alternativa, el adyuvante glicolípido se puede co-precipitar con el antígeno. Además de ser mezclado o co-precipitado con los otros componentes de la composición antes de su administración, el adyuvante glicolípido se puede administrar en un sitio y/o momento diferente con los otros componentes. La mezcla de adyuvante glicolípido y antígeno también se puede incorporar en geles, cápsulas, pastillas para chupar, etc., o también se puede presentar en diversos dispositivos tales como parches que pueden ser bi- o preferentemente unidireccionales.

El MPL (u otro adyuvante que induce TH1) que se ha disuelto mediante sonicación u otro medio (que se describe posteriormente en Preparación de una solución de adyuvante de MPL®), se puede diluir con diversos medios antes de su adición a antígenos. La preparación de MPL se realiza inicialmente a una concentración por lo general entre 0,5 mg por ml y 4 mg por ml, por ejemplo 1 mg por ml. A continuación se puede diluir hasta una concentración entre 500 µg/ml y 20 µg/ml, preferiblemente 100 µg/ml. Esta dilución se puede realizar en agua pura o en otros disolventes tales en una solución acuosa de glicerol que contiene entre un 1 % y un 50 % de glicerol.

Algunos vehículos y diluyentes fisiológicamente aceptables adecuados incluyen agua estéril o solución acuosa de dextrosa al 5 %. Las composiciones son para uso en seres humanos y veterinario y se formulan para administración mucosal, preferentemente sublingual.

Formulación, Dosificación y Administración de Composiciones

La composición de la presente invención se puede formular de forma conveniente con un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para administración sublingual. Algunos detalles de excipientes farmacéuticos se pueden encontrar en "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 2ª Ed. (1994), The Pharmaceutical Press, London, Editors: Wade & Weller.

Los inventores han encontrado que un aspecto importante de la presente invención es la administración sublingual de la composición de la presente invención. Se puede esperar que un gel u otra formulación viscosa sea precedente debido al aumento del contacto del antígeno con la superficie sublingual. Sin embargo, también se pueden conseguir resultados con otras formulaciones tales como una solución acuosa. En ratones, se encontró que una solución sencilla daba resultados similares a los de una formulación de gel. No es necesario ni deseable que la formulación se una por vía física o por vía química al tejido mucosal.

Algunas formulaciones adecuadas para administración sublingual incluyen soluciones estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, compuestos bacteriostáticos y solutos que convierten a la formulación en isotónica con el fluido corporal, preferentemente la mucosa, del individuo; las suspensiones estériles acuosas y no acuosas pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en envases de una sola dosis o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales cerrados herméticamente y se pueden almacenar en una condición liofilizada que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su uso.

Preferentemente, un vehículo también está presente en la composición de acuerdo con la invención. El vehículo puede ser una emulsión de aceite en agua, o una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

Las emulsiones de aceite en agua no tóxicas contienen preferentemente un aceite no tóxico, por ejemplo, escualano o escualeno, un agente emulgente, por ejemplo Tween 80, en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

Se describe una composición de vacuna polivalente que comprende una formulación de vacuna de la invención en combinación con otros antígenos, en particular antígenos útiles para el tratamiento de cánceres, enfermedades autoinmunes y afecciones relacionadas.

En general, los vehículos pueden incluir, pero no se limitan a, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos.

También se describen envases y kits farmacéuticos que comprenden uno o más envases rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones mencionadas anteriormente.

La administración éstas composiciones puede estar en forma de pomadas, pastas, geles, soluciones, polvos y similares. los geles se pueden formular convenientemente usando carbopol también conocido como carbómero – un polímero de carboxivinilo, o un agente espesante basado en celulosa tal como hidroxietil celulosa, hidroxipropil celulosa o hidroxipropil metilcelulosa, carboximetilcelulosa cálcica, carboximetilcelulosa sódica, etil celulosa, metilcelulosa. Los geles también se pueden formular de forma conveniente usando: goma arábiga, ácido algínico, bentonita, alcohol cetosteárico, gelatina, goma de guar, silicato de magnesio y aluminio, maltodextrina, alcohol polivinílico, carbonato de propileno, alginato de propilenglicol, dióxido de silicio coloidal, alginato sódico, tragacanto, y/o , de xantano. Son particularmente preferentes el carbopol y los agentes basados en celulosa.

Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad de modo que sea profiláctica y/o terapéuticamente eficaz. La cantidad administrada, que está generalmente en el intervalo de 0,5 µg a 250 µg de antígeno por dosis, depende del sujeto a tratar, la capacidad del sistema inmunitario del sujeto para sintetizar anticuerpos, y el grado de protección deseada. Un intervalo preferente es de aproximadamente 2 µg a aproximadamente 40 µg por dosis. En algunos casos, el paciente se tratará con una serie de administraciones que incluirán un aumento del régimen de acción del antígeno.

Un volumen de dosis adecuado es aproximadamente 0,1 ml, pero dentro de un régimen, este puede comenzar a un volumen inferior y acabar en un volumen superior. Las cantidades precisas de principio activo administrado pueden depender del criterio del profesional y puede ser característico para cada sujeto individual.

5 La composición se puede proporcionar en un programa de una sola dosis, o preferentemente en un programa de múltiples dosis. Un programa de múltiples dosis es uno en el que transcurso primario de la vacunación puede ser con 1 a 10 dosis separadas, seguido de otras dosis proporcionadas a intervalos de tiempo posteriores necesarios para mantener y/o reforzar la respuesta inmune, por ejemplo, de 1 a 4 meses para una segunda dosis, y si fuera necesario, una dosis(s) posteriores después de varios meses. Cuando el producto se está usando para el tratamiento de alergia, los regímenes de administración incluirán una dosificación más frecuente. El régimen de dosificación también se determinará, al menos en parte, mediante las necesidades del individuo y dependerá del criterio del profesional.

15 Además, la composición que contiene el antígeno o antígenos se puede administrar en conjunto con otros agentes inmunoreguladores, por ejemplo, inmunoglobulinas. La invención se describirá con referencia a los siguientes ejemplos que solamente pretenden ser ilustrativos y no limitantes.

Ejemplos

20 Preparación de una solución de adyuvante de MPL®

Se preparó una solución de 4 mg/ml de 1,2-dipalmitoil-SN-glicero-3-fosfo colina (DPPC) en etanol absoluto. Por cada 1,0 mg de sal de MPL-TEA (trietilamina) a solubilizar, se añadieron 27 µl de DPPC para disolver el MPL. El MPL se puede preparar como se ha descrito anteriormente. El etanol se retiró soplando una corriente de N₂ suavemente en el vial. A continuación se añadió 1,0 ml de agua sin pirógenos para inyección por cada mg de MPL en la mezcla de MPL/DPPC seco. La solución se sonicó en un baño sonicador a 60-70 °C hasta que era transparente. A continuación, la solución de MPL/DPPC se esterilizó por filtración mediante filtración a través de un filtro de 0,2 µm SFCA 290-4520 de Nalgene. La solución de MPL/DPPC se distribuyó de forma aséptica a 1,0 mg/ml en viales despirogenados, etiquetados MPL-AF (MPL solubilizado en el tensioactivo DPPC), y se almacenaron a 4 °C.

Formulación de adyuvante de Ovoalbúmina (XOA)/MPL®/Gel Sublingual.

35 La actividad de inducción de TH1 en ratones se puede equiparar con la producción de anticuerpos IgG2a e IgG2b específicos y la actividad de inducción de TH2 con la producción de anticuerpos IgG1 y anticuerpos IgE específicos. Los anticuerpos de IgA secretores específicos pueden identificar si se ha producido una respuesta mucosal, si esta puede ser local (anticuerpo salivar) o distal (anticuerpo vaginal) después de inmunización sublingual. Sin embargo, el potencial inmunogénico de una formulación se puede investigar midiendo únicamente la respuesta específica de IgG en suero.

40 Por lo tanto, como un ejemplo, se realizó un experimento en ratones para demostrar los perfiles de los anticuerpos específicos de alérgeno con respecto a un ejemplar, ovoalbúmina (XOA) que se acepta como un modelo de antígeno y también es un alérgeno bien conocido derivado de huevos de pollo.

45 Materiales de reserva.

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

- A. 100 mg de carbopol TR-1 NF en 20 ml de WFI (agua para inyección) = 0,9 % en p/v de gel.
- 50 B. Se añadieron 0,8 ml de TEOA (trietanolamina) al 10 % en v/v a A = .0,8 % en p/v de gel.

11 MPL AF glicerol (20 mg/ml)

55 A.

MPL	40 mg
DPPC	4,32 mg
Glicerol	800 µl
WFI cs	40 ml
Sonicado hasta tamaño de partícula aprox. = 80 nm	

B. Liofilizado

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

Reserva de 111 Ovoalbúmina (33 mg/ml)

Ovoalbúmina	33 mg
WFI	1,0 ml

5 Formulación Para Inyección

Reserva de Carbopol	1920 µl
Reserva de Ovoalbúmina	480 µl
Glicerol	480 µl
WFI	720 µl
glicerol MPL	400 µl

1. Carbopol, XOA, glicerol y WFI se añadieron en un vial de 5 ml y se mezclaron mediante agitación vorticial.
2. El glicerol MPL se añadió a lo mencionado anteriormente y se realizó agitación vorticial adicional.

Inmunización de ratones

- 10 Se anestesiaron 5 grupos de ratones Balb/C hembra de ocho semanas de edad con Ketamina. Cuando los ratones estaban inconscientes, se pusieron 20 µl del gen apropiado que contenía diversas cantidades de XOA debajo de la lengua durante 5 minutos. Los geles se retiraron de la boca aclarando después de 5 minutos con 1,0 ml de solución salina al 0,9 % usando una jeringa y una aguja para sonda. Tres semanas más tarde, los ratones se trataron de forma idéntica a la del primer tratamiento.
- 15 Se extrajo sangre de los ratones 2 semanas después del segundo tratamiento y se recogieron los sueros. Éstos se sometieron a ensayo para anticuerpos IgG específicos de XOA usando un ensayo de ELISA.

Resultados

- 20 Respuestas de IgG anti-Ovoalbúmina en Ratones Administrados ya sea con 83,2 µg o 3,4 µg de Ovoalbúmina y 33,6 µg de MPL en 20 µl de Gel de Carbopol a través de la Vía Sublingual, Estimulados después de 3 Semanas y con Extracción de Sangre 2 Semanas más tarde. (Valores de DO (densidad óptica) media de 5 Ratones por Grupo)

Valores de DO a Diferentes Diluciones de Suero

	1/10	1/30	1/90	1/270	1/610
Grupo 1 Dosis de 83,2 µg de XOA	1,1	1,0	0,75	0,5	0,3
Grupo 2 Dosis de 3,4 µg de XOA	0,6	0,5	0,35	0,15	0,05
Grupo 3 solo Carbopol	0,15	0,1	0,05	0,05	0,05

25 Ejemplo 2

Preparación de Materiales para Inmunización de Ratones

- 30 Las dosis de inmunización de XOA/NMPL en carbopol o como alternativa en el diluyente (formulación acuosa) sin MPL se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 excepto por el uso de diferentes dosis.

Inmunización de Ratones

- 35 1. Cada ratón se anestesió antes de la administración.
2. Se pusieron 20 µl del material apropiado debajo de la lengua durante 5 minutos. Por lo tanto, a cada uno de los grupos de ratones se le administraron las siguientes cantidades de sustancias en 20 µl.

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

- 40 3. El material se retiro de la boca aclarando después de 5 minutos con 1,0 ml de solución salina al 0,9 %.

4. Tres semanas después de la primera vacunación y de nuevo después de dos semanas después de esto, los ratones se volvieron a tratar.

5. Se extrajo sangre a los ratones 2 semanas después de la tercera aplicación y los sueros se almacenaron hasta su uso a -20 °C. Se realizaron lavados nasales y pulmonares y se almacenaron en las mismas condiciones.

5 6. Los sueros y los lavados se sometieron a ensayo para anticuerpos específicos de ovoalbúmina tal como se realizó anteriormente.

RESULTADOS

10 Anticuerpos de IgG en suero específicos para log(2) del Título de XOA/(log)2 del título de referencia (DT)

GRUPO	IgG1 en Suero	IgG2a en Suero	IgG en Suero
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 de IgA Anti XOA en diferentes fluidos (DT)

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)

15 La fuerte respuesta de IgG en suero con respecto a XOA requiere la adición de MPL, que también parece que ha estimulado una respuesta de tipo TH1 indicada por la respuesta del anticuerpo IgG2a.

20 Un nuevo e inesperado hallazgo fue la fuerte inducción de una respuesta de IgA específica de XOA cuando se usó MPL como un adyuvante:

25 En ratones no había ninguna ventaja significativa por el uso del carbopol como un excipiente. De hecho, se produjo una fuerte evidencia de que la formulación acuosa de XOA y MPL era más inmunogénica para la inducción tanto de IgO como de IgA sin carbopol. Esto incluía en IgA suero, solamente observado en ausencia de carbopol. Sin embargo, es necesario el uso de excipientes en la formulación de vacunas y el carbopol puede ser una formulación de excipiente útil y conveniente para uso en seres humanos y animales.

Ejemplo de Preparación 1 - ELISA PARA OVOALBÚMINA

30 1. Se someten a ensayos sueros (diluidos a 1:2 en tampón de borato) de cada uno de los cinco ratones en cada grupo en un ensayo de ELISA para determinar los títulos de anticuerpos de IgG o IgA anti-ovoalbúmina.

2. Para realizar el ELISA, se requieren el siguiente equipo y suministros:

35 A. Placa de Immulon 2, 96 pocillos, fondo plano, DYNATECH LABORATORIES N° de catálogo 011-010-3455. Tres placas por lote de producto sometidas a ensayo (suficiente para someter a ensayos sueros de 10 ratones por duplicado).

40 B. Ovoalbúmina (nuevo de pollo), Calidad 5 de Sigma. Solución de reserva (1 mg/ml en Agua para Inyección) recién preparada cada vez que se realiza en ensayo.

C. Puntas de pipeta limpias (en autoclave)

45 D. Pipeteadores de 20, 100, 200, 1000 µl

B. Pipeteador de 8 canales; tamaño de 200 µl

F. Tubos de ensayo de 13 mm limpios (nuevos) o crioviales de 2 ml y rejilla

50 G. Parafilm o Envoltura Saran

H. H₂SO₄ 1 N

ES 2 328 336 T5

I. Anticuerpo secundario anti-IgG o anti-IgA marcado con peroxidasa de rábano picante (Usado a 1:5.000). Southern Biotechnology Associates, Inc.

5 J. kit de OPD: comprimidos de o-Fenilendiamina, uno por placa y diluyente. Ensayo N° 7181E de Labs Abbott *in vitro*. A menudo disponible en las instalaciones.

K. Sueros de ratón a someter a ensayo. Los sueros se deberían haber diluido a 1:2 en Tampón de Borato para almacenamiento a largo plazo.

10 L. Tampón de Borato (BB):

Disolver lo siguiente en 4 l de WFI estéril:

15 12,4 g de Ácido Bórico, Fisher Scientific N° A73-500
0,764 g de Borato Sódico (Bórax), Fisher Scientific N° S248-500
17,53 g de Cloruro Sódico, Fisher Scientific N° S271-500
Almacenar a temperatura ambiente, caduca a los seis meses

20 M. Tampón de Borato + Tween 20 al 0,1 % (BB-T20):

Añadir 1 ml de Tween-20 (Sigma N° P-1379) a 1 litro de BB, mezclar minuciosamente. Nacional a temperatura ambiente, caduca a los seis meses.

25 N. Tampón de Borato-Tween-20-BSA al 1 % (BB-BSA):

Disolver 1,90 g de EDTA (tetrasódico, Fisher Scientific N° BP 121-500) y 10 g de BSA (Fracción V, sin proteasa, Boehringer Mannheim N° 100-350) en 1 litro de BB-T20.

30 O. Solución tampón de carbonato/bicarbonato 0,05 M:

Disolver 4,2 g de NaHCO_3 y 5,3 g de Na_2CO_3 en 1 litro de agua RO o Agua estéril para Irrigación y ajustar el pH a 9,6. Almacenar a 4 °C, caduca en tres meses. Calentar a temperatura ambiente antes de su uso.

35 P. Pipeteador automático

Q. Mezclador vorticial

R. Rejillas de microcentrífuga

40 S. Lector de placas, capaz de tomar lecturas de D.O. a 490 nm

T. Incubadora ajustada a 37 °C

45 U. Pipetas serológicas de 25 ml (Fisher Scientific)

V. Tubos cónicos de propileno de 15 ml (Fisher Scientific)

W. Cubetas de reactivo para pipeteador multicanal

50 X. Lavador de placas automático

3. Procedimiento para la realización del ELISA

55 A. UNIÓN DEL ANTÍGENO DE ENSAYO

I. La concentración de antígeno para unión a placas usadas en el ensayo de adyuvante es 50 µg/ml:

60 2,5 ml de la solución de ovoalbúmina de 1 mg/ml de reserva se añade a 47,5 ml de solución de carbonato/bicarbonato 0,05 M. Esta cantidad es suficiente para revestir cuatro placas de 96 pocillos a 100 µl por pocillo.

II. A continuación, la placa se cubre con Envoltura Saran y se deja equilibrar y sin alterar a 4 °C en la oscuridad durante una noche.

ES 2 328 336 T5

B. DILUCIONES DE SUERO: Brevemente agitar vorticialmente cada muestra de suero antes de dilución y cada muestra diluida antes de su adición a la placa. Se debería usar una nueva punta de pipeta para retirar el suelo de los tubos de reserva cuando se hacen las diluciones.

- 5 1. La dilución de partida para los sueros obtenidos de ratones inmunizados con adyuvante y ovoalbúmina es de 1:6.

C. BLOQUEO DE LA PLACA

- 10 I. Cuando todas las muestras de suero están diluidas, preparar la placa agitando vigorosamente el tampón de revestimiento en un recipiente.
II. Golpetear la placa rápidamente en una almohadilla de toalla de papel para retirar el exceso de solución. Lavar la placa tres veces con solución de lavado BB-T20 usando el lavador de placas automático programado para lavar con 350 µl y esperar 5 segundos entre cada lavado.
- 15 III. Usando el pipeteador multicanal, añadir 250 µl de BB-BSA por pocillo. Cubrir y cerrar herméticamente con envoltura Saran e incubar a 37 °C durante 30 minutos.

D. CARGA DE LA PLACA

- 20 I. Agitar vigorosamente el tampón de bloqueo en un recipiente y golpetear la placa rápidamente en una almohadilla de toalla de papel para retirar el exceso de solución.
- 25 II. Añadir 100 µl de BB-BSA a todos los pocillos en cada placa. Añadir 100 µl de las muestras de suero diluidas apropiadamente a los pocillos apropiados en la columna Nº 1. Cada muestra de suero se debería someter a ensayo por duplicado.
- 30 III. Usando el pipeteador multicanal, pipetear 100 µl arriba y abajo ocho veces en la columna Nº 1 para mezclar la muestra, y a continuación transferir 100 µl a la columna Nº 2. De nuevo, pipetear arriba y abajo ocho veces para mezclar y transferir 100 µl a la columna Nº 3. Repetir las diluciones en serie a través de la columna Nº 12. Descartar los 100 µl en las puntas después de haber mezclado la columna 12. Ahora debería haber 100 µl en cada pocillo de la placa.

E. INCUBACIÓN

- 35 Cubrir y cerrar herméticamente las placas con Envoltura Saran o Parafilm. Incubar las placas durante 1 hora a 37 °C. Retirar el anticuerpo sin unir con el procedimiento que se ha resaltado en la etapa 3a, lavando de nuevo la placa tres veces con BB-T20.

F. CONJUGAR

- 40 I. Preparar el conjugado de anticuerpo secundario anti IgG marcado con peroxidasa diluyéndolo a 1:5.000 en BB-BSA (10 µl de anticuerpo en 50 ml de BB-BSA en un tubo cónico de 50 ml). Voltar el tubo > 20 veces y agitar de forma vorticial durante 30 segundos para mezclar minuciosamente. Verter el anticuerpo diluido en un recipiente limpio para reactivo. El conjugado anti IgA se puede preparar de una manera correspondiente.
- 45 II. Añadir 100 µl de solución de conjugado a cada pocillo de la placa, incluyendo pocillos de blanco.
- III. Cubrir e incubar la placa durante 1 hora a 37 °C.
- 50 IV. Retirar la solución de conjugado y lavar la placa tres veces como en la etapa 3a.

G. DESARROLLO DEL COLOR:

- 55 I. Preparar el sustrato/reactivo colorimétrico 10-15 minutos antes de su uso (para darle tiempo a disolverse completamente) mediante disolución de 3 comprimidos de desarrollo de densidad óptica en 30,4 ml de Tampón de Sustrato en un tubo cónico de polipropileno de 50 ml cubierto con papel de aluminio.
- 60 II. Usando el pipeteador multicanal, añadir 100 µl de reactivo a cada pocillo. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- III. Detener la reacción después de 15 minutos mediante la adición de 50 µl de ácido sulfúrico 1 M a cada pocillo con el pipeteador multicanal.

H. LECTURA DE LA PLACA

65

I. Las placas se deberían "detener" de una manera secuencial, con 1-2 minutos entre cada placa, de modo que el tiempo desde la "parada" hasta la "lectura" sea coherente entre las placas (después de detener la reacción en la última placa, leer la primera placa en el lector de placas apropiado a 490 nm. Leer la segunda placa 1-2 minutos después, en la tercera placa 1-2 minutos después de eso).

5

I. DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE INMUNOGLOBULINA

El título de cada una de las muestras de suero se define como el recíproco de la primera dilución en serie dos veces que tiene un valor de DO que es mayor o igual a dos veces el valor del fondo. Los valores de DO para los animales de control se calculan como promedio en cada dilución y se determina el título medio para el grupo.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de al menos un antígeno y un adyuvante glicolípido para preparar un medicamento que se puede administrar por vía sublingual para producir una respuesta inmunitaria mucosal y sistémica, donde la respuesta inmunitaria mucosal se genera en un sitio tanto distal como local respecto al sitio de administración sublingual.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el método produce una respuesta inmunitaria de IgA.
- 10 3. El uso de acuerdo con cualquiera reivindicación precedente, en la que el método produce una respuesta inmunitaria de IgG.
4. El uso de acuerdo con cualquiera reivindicación precedente para tratar una infección bacteriana o vírica, cáncer, autoinmunidad o alergia en un ser humano o un animal.
- 15 5. El uso de acuerdo con cualquiera reivindicación precedente, en la que el adyuvante glicolípido es un adyuvante que induce TH1.
- 20 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el adyuvante glicolípido es monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (MPL[®]) o uno de sus derivados o sales.
7. Uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en la que el antígeno deriva de una bacteria, virus, prión, neoplasia, autoantígeno, animal, planta, material recombinante o sintético.
- 25 8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en la que el antígeno está en forma de un polipéptido.
9. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en la que el antígeno es un alérgeno.
- 30 10. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en la que el antígeno está en forma de un vector que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido antigénico, y en el que dicho polinucleótido se une de forma operativa a una secuencia reguladora que regula la expresión de dicho polinucleótido.
- 35 11. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en las que el antígeno o antígenos y el adyuvante glicolípido están presentes en una composición única.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11 en la que la composición está en forma de una solución acuosa, un gel, una cápsula, una pastilla para chupar o un comprimido.
- 40 13. Una composición que se puede administrar por vía sublingual que comprende al menos un antígeno y un adyuvante glicolípido para producir una respuesta inmunitaria mucosal y sistémica, en la que la respuesta inmunitaria mucosal se genera en un sitio tanto distal como local respecto al sitio de administración sublingual.
14. La composición que se puede administrar por vía sublingual de acuerdo con la reivindicación 13, para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la respuesta inmunitaria comprende una respuesta inmunitaria de IgA.
- 45 15. La composición que se puede administrar por vía sublingual de acuerdo con la reivindicación 13, para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la respuesta inmunitaria comprende una respuesta inmunitaria de IgG.
- 50 16. La composición que se puede administrar por vía sublingual de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, para tratar una infección bacteriana o vírica, cáncer, autoinmunidad o alergia en un ser humano o un animal.
17. La composición que se puede administrar por vía sublingual de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-16, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en la que el adyuvante glicolípido es un adyuvante que induce TH1.
- 55 18. La composición que se puede administrar por vía sublingual de la reivindicación 17, para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en la que el adyuvante glicolípido es monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (MPL[®]) o uno de sus derivados o sales.
- 60 19. La composición que se puede administrar por vía sublingual de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-18, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-18, en la que el antígeno deriva de una bacteria, virus, prión, neoplasia, autoantígeno, animal, planta, material recombinante o sintético.
- 65 20. La composición que se puede administrar por vía sublingual de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-18, para su uso de acuerdo con cualquiera las reivindicaciones 13-18, en la que el antígeno está en forma de un polipéptido.

21. La composición que se puede administrar por vía sublingual de acuerdo con cualquiera las reivindicaciones 13-18, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-18, en la que el antígeno es un alérgeno.
- 5 22. La composición que se puede administrar por vía sublingual de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-18, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-18, en la que el antígeno está en forma de un vector que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido antigénico, y en el que dicho polinucleótido se une de forma operativa con una secuencia reguladora que regula la expresión de dicho polinucleótido.
- 10 23. La composición que se puede administrar por vía sublingual de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-22, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-22, en las que el antígeno o antígenos y el adyuvante glicolipídico están presentes en una composición única.
- 15 24. La composición que se puede administrar por vía sublingual de la reivindicación 23, para su uso de acuerdo con la reivindicación 23, en forma de una solución acuosa, un gel, una cápsula, una pastilla para chupar o un comprimido.