



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 697**

51 Int. Cl.:

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 9/02 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04776195 .2**

96 Fecha de presentación : **02.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1631264**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.03.2006**

54

Título: **Composiciones inmunogénicas basadas en micropartículas biodegradables que comprenden un toxoide de difteria y de tétanos.**

30

Prioridad: **02.06.2003 US 475010 P**
21.10.2003 US 513074 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.11.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.11.2009

73

Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608, US

72

Inventor/es: **O'Hagan, Derek;**
Singh, Manmohan y
Kazzaz, Jina

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 328 697 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

Composiciones inmunogénicas basadas en micropartículas biodegradables que comprenden un toxoide de difteria y de tétanos.

5

Divulgación**Campo de la invención**

La presente invención esta dirigida a composiciones farmacéuticas inmunogénicas, en particular a composiciones para vacunas.

Antecedentes de la técnica

La aparición de vacunas de subunidades, que incluyen vacunas de polipéptidos, polisacáridos, conjugados y ADN, ha intensificado la necesidad de disponer de composiciones que contengan adyuvantes seguros y efectivos.

Actualmente, los adyuvantes más comúnmente utilizados en los Estados Unidos son los adyuvantes de alumbre (es decir, sales de aluminio tales como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio). En la actualidad, sólo el alumbre está aprobado para uso humano por el U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (PVA) (Departamento de Salud y Servicios Humanos, Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos). Por ejemplo, se dispone de diversas vacunas contra la difteria-tétanos en las que los toxoides de la difteria y los toxoides del tétanos se adsorben a sales de aluminio. Si bien los adyuvantes de aluminio tienen un perfil de seguridad demostrado que data de muchos años, estos adyuvantes están no obstante ocasionalmente asociados con reacciones locales. Por ejemplo, los granulomas pos-vacunación son una reacción bien conocida asociada con las vacunas adsorbidas a aluminio.

Se han utilizado vehículos particulados con antígenos adsorbidos o atrapados, en intentos por lograr respuestas inmunes adecuadas. Típicamente, tales vehículos le presentan al sistema inmune múltiples copias de un antígeno proteico recombinante seleccionado y promueven el atrapamiento y retención de los antígenos en ganglios linfáticos locales. Las partículas pueden ser fagocitadas por macrófagos y pueden aumentar la presentación de antígenos a través de la liberación de citocinas.

Por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional del solicitante WO 98/33487 describe el uso de micropartículas con antígenos adsorbidos y con antígenos encapsulados para estimular las respuestas inmunológicas, que incluyen respuestas inmunológicas mediadas por células, así como procedimientos de preparación de las micropartículas. Los polímeros utilizados para formar las micropartículas incluyen poli(lactida) y poli(lactida-co-glicolida), también denominados en la presente "PLG".

La Solicitud de Patente Internacional del solicitante WO 00/06123 desvela procedimientos para la preparación de micropartículas que tienen macromoléculas adsorbidas, que incluyen ADN, polipéptidos, antígenos y adyuvantes. Las micropartículas comprenden, por ejemplo, un polímero tal como un poli(α -hidroxiácido) (por ej., PLG), un ácido polihidroxi-butírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido y similares, y se forman utilizando, por ejemplo, detergentes catiónicos, aniónicos o no iónicos. Se proponen micropartículas que contienen detergentes aniónicos, tales como micropartículas de PLG con dodecil sulfato de sodio (SDS), para el uso de macromoléculas cargadas positivamente, tales como polipéptidos. Se proponen micropartículas que contienen detergentes catiónicos, tales como micropartículas de PLG con CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), para el uso de macromoléculas cargadas negativamente, tales como ADN. También se desvela el uso de tales micropartículas para estimular respuestas inmunológicas, que incluyen respuestas inmunológicas mediadas por células.

El documento US 5.981.719 describe micropartículas que están compuestas por macromoléculas y polímeros entrecruzados homogéneamente distribuidos.

El documento US 6.007.845 describe nanopartículas en las que se incorpora un antígeno a las nanopartículas.

Peyre *et al.* (Proceed. In'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., vol. 28, 2001, pp. 1077-1078) describen microesferas biodegradables con antígenos microencapsulados.

Los documentos US 2002/0136776 y WO 02/26209 describen micropartículas que comprenden polímeros biodegradables, y un primer y un segundo agentes biológicamente activos que incluyen antígenos en ambos casos.

Compendio de la invención

La invención proporciona una composición inmunogénica que comprende: (a) micropartículas poliméricas que comprenden un polímero biodegradable; (b) un antígeno toxoide de la difteria y un antígeno toxoide del tétanos, adsorbidos a las micropartículas; y (c) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona el uso de (a) micropartículas poliméricas que comprenden un polímero biodegradable y (b) un antígeno adsorbido a las micropartículas de acuerdo con la invención, en la fabricación de un medicamento para estimular una respuesta inmune en un animal huésped vertebrado.

- 5 La invención también proporciona un procedimiento para producir la composición inmunogénica de acuerdo con la invención que comprende: (a) formar una emulsión agua-en-aceite-en-agua que comprende agua, disolvente orgánico y polímero biodegradable; (b) eliminar el disolvente orgánico de la emulsión para formar las micropartículas poliméricas; y (c) adsorber el antígeno toxoide de la difteria y el antígeno toxoide del tétanos a las micropartículas.
- 10 Otros aspectos de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

Los aspectos de la siguiente divulgación que no esta dirigida específicamente a la invención reivindicada sólo tienen propósitos de comparación e ilustración.

15 Sumario de la divulgación

La presente divulgación esta dirigida a composiciones inmunogénicas que comprenden micropartículas poliméricas biodegradables que tienen antígenos que contienen toxoides y polisacáridos adsorbidos a las mismas.

- 20 De acuerdo con un primer aspecto de la divulgación, se provee una composición inmunogénica que comprende: (a) micropartículas poliméricas que comprenden un polímero biodegradable, por ejemplo un polímero seleccionado de un poli(α -hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido y un neocatolicismo; (b) un antígeno adsorbido a las micropartículas seleccionado de (i) un antígeno toxoide, tal como un toxoide del tétanos, un toxoide de la difteria, o una combinación de los mismos, y/o (ii) un antígeno que contiene polisacáridos, tal como un antígeno polisacárido Hib, un antígeno conjugado Hib que comprende regiones de polisacáridos y polipéptidos, un antígeno polisacárido meningocócico, un antígeno conjugado meningocócico que comprende regiones de polisacáridos y polipéptidos, un antígeno conjugado neumocócico, un antígeno conjugado neumocócico que comprende regiones de polisacáridos y polipéptidos, o una combinación de los mismos; y (c) un excipiente farmacéuticamente aceptable. Típicamente, las micropartículas se preparan por alguna de una variedad de técnicas, después de lo cual el antígeno se adsorbe a las micropartículas.
- 30

- En numerosas realizaciones, las micropartículas se forman a partir de un poli(α -hidroxiácido), tal como una poli(lactida) ("PLA"), un copolímero de lactida y glicolida, tal como una poli(D,L-lactida-co-glicolida) ("PLG"), o un copolímero de D,L-lactida y caprolactona. Los polímeros poli(D,L-lactida-co-glicolida) incluyen los que tienen una relación molar lactida:glicolida que oscila, por ejemplo, de 20:80 a 80:20, de 25:75 a 75:25, de 40:60 a 60:40 o de 55:45 a 45:55, y que tienen un peso molecular que oscila, por ejemplo, de 5.000 a 20.000 Daltons, de 10.000 a 100.000 Daltons, de 20.000 a 70.000 Daltons o de 40.000 a 50.000 Daltons.
- 35

- En numerosas realizaciones, las composiciones inmunogénicas comprenderán antígenos adicionales a los antígenos que contienen toxoides y polisacáridos. Estos antígenos adicionales pueden, independientemente, por ejemplo: (a) estar adsorbidos a la superficie de las micropartículas, (b) estar atrapados dentro de las micropartículas, (c) estar en solución o suspensión, (d) estar adsorbidos a poblaciones separadas de micropartículas y/o (e) estar atrapadas dentro de poblaciones separadas de micropartículas.
- 40

- Los antígenos pueden ser, por ejemplo, patógenos muertos o atenuados (por ej., bacterias, virus, hongos o parásitos) o células (por ej., células tumorales), antígenos que contienen polipéptidos, antígenos que contienen polisacáridos, toxoides o antígenos que contienen polinucleótidos.
- 45

- Los ejemplos de antígenos que contienen polinucleótidos incluyen, por ejemplo, (a) secuencias de ácido nucleico que codifican directamente antígenos que contienen polipéptidos (por ej., una molécula de ARNm) y (b) construcciones de vectores que codifican indirectamente antígenos que contienen polipéptidos, por ejemplo construcciones de vectores que expresan secuencias heterólogas de ácidos nucleicos, que, a su vez, codifican antígenos que contienen polipéptidos (por ej., construcciones de vectores de ADN y construcciones de vectores de ARN). Los antígenos que contienen polipéptidos codificados pueden ser, por ejemplo, antígenos tumorales y/o antígenos obtenidos a partir de organismos patógenos.
- 50
- 55

- En forma similar, los antígenos que contienen polipéptidos y los antígenos que contienen polisacáridos pueden ser, por ejemplo, antígenos tumorales y/o antígenos de organismos patógenos. Así, en algunas realizaciones, estos antígenos se obtienen a partir de tumores. En otras realizaciones, los antígenos se obtienen a partir de virus, por ejemplo virus de la hepatitis, herpes simple, virus de inmunodeficiencia humana, virus de la varicela, polio, sarampión, paperas, rubéola, citomegalovirus y virus de la gripe. En otras realizaciones, los antígenos se obtienen a partir de bacterias tales como, por ejemplo, difteria, tétanos, tos ferina, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenza* (por ej., *Haemophilus influenzae* de tipo b), estreptococos, *Neisseria gonorrhoeas*, *Helicobacter pylori* y cólera. En aun otras realizaciones, los antígenos se obtienen a partir de hongos, o de parásitos tales como, por ejemplo, un parásito de la malaria.
- 60
- 65

Los ejemplos específicos de antígenos incluyen diversas combinaciones de los siguientes: (a) antígenos de tos ferina (por ej., antígenos de tos ferina de células enteras y acelulares), (b) antígenos de *Haemophilus Influenzae* de

ES 2 328 697 T3

tipo b (Hib) (por ej., polisacáridos de Hib y antígenos conjugados de Hib) (c) antígenos de hepatitis (por ej., antígenos del virus de la hepatitis A, antígenos del virus de la hepatitis C, antígenos del virus de la hepatitis D, antígenos del virus de la hepatitis E, antígenos del virus de la hepatitis G y combinaciones de los mismos, por ej., hepatitis A-B); (d) antígenos de la polio (por ej., antígenos de virus muertos y de virus vivos atenuados, típicamente antígenos de la polio inactivados trivalentes); (e) antígenos meningocócicos (*Neisseria meningitidis*), que incluyen antígenos de polisacáridos y conjugados (por ej., meningitis A, meningitis B, meningitis C, meningitis W, meningitis Y y combinaciones, tales como meningitis A-C, meningitis A-B-C, meningitis A-C-W-Y y meningitis A-B-C-W-Y); (f) antígenos neumocócicos (*Streptococcus pneumoniae*) (por ej., antígenos de polisacáridos y conjugados); (g) antígenos del virus de la varicela zoster (varicela) (por ej., antígenos de virus vivos, atenuados y liofilizados), (h) antígenos del virus del sarampión (por ej., antígenos de virus vivos atenuados), (i) antígenos del virus de las paperas (por ej., antígenos de virus vivos atenuados), (j) antígeno del virus de la rubéola (por ej., antígenos de virus vivos atenuados).

Las composiciones inmunogénicas divulgadas en la presente también pueden comprender diversos adyuvantes inmunológicos suplementarios. Así como con los antígenos adicionales anteriores, estos adyuvantes inmunológicos suplementarios pueden, independientemente, por ejemplo: (a) estar adsorbidos a la superficie de las micropartículas, (b) estar atrapados dentro de las micropartículas, (c) estar en solución/suspensión, (d) estar adsorbidos a poblaciones separadas de micropartículas y/o (e) estar atrapados dentro de poblaciones separadas de micropartículas.

Los ejemplos de adyuvantes inmunológicos suplementarios incluyen: (a) oligonucleótidos inmunoestimulantes tales como oligonucleótidos de CpG, (b) ARN de doble hebra, (c) toxinas de *E. coli* lábiles al calor, (d) compuestos fosfato-liposacáridos (por ej., monofosforil-lípido A y derivados) y miméticos de fosfato-liposacáridos y (e) emulsiones submicrónicas que comprenden un aceite metabolizable, tal como escualeno, y un agente emulsionante, tal como uno o más derivados de sorbitán (por ej., MF59).

Incluso, pueden incluirse otros componentes suplementarios dentro de las diversas composiciones descritas en la presente, que incluyen productos farmacéuticos, hormonas, enzimas, mediadores de la transcripción o traducción, intermediarios de vías metabólicas, inmunomoduladores y combinaciones de los mismos.

Realizaciones adicionales divulgadas en la presente esta dirigida a procedimientos para administrar antígenos a un animal huésped, que comprenden administrar al animal huésped cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en la presente. Preferiblemente, el animal huésped es un animal vertebrado, más preferiblemente un mamífero, y aún más preferiblemente un ser humano.

La divulgación también esta dirigida a procedimientos para estimular una respuesta inmune en un animal huésped, que comprenden administrar al animal huésped cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en la presente en una cantidad efectiva para inducir la respuesta inmune.

La divulgación también esta dirigida a procedimientos para inmunizar a un animal huésped contra un tumor o un organismo patógeno que comprende administrar al animal cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en la presente en una cantidad efectiva para inducir una respuesta protectora.

La administración de las composiciones inmunogénicas divulgadas en la presente puede llevarse a cabo por cualquier procedimiento conocido, que incluye inyección directa (por ej., en forma subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular).

Así, de acuerdo con algunas realizaciones develadas en la presente, se proveen composiciones y procedimientos que tratan, incluyendo inmunización profiláctica o terapéutica, a un animal huésped contra infecciones virales, bacterianas, fúngicas, por micoplasmas o protozoos, así como contra tumores. Los procedimientos desvelados en la presente son útiles para conferir inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un animal huésped, preferiblemente un ser humano.

Otras realizaciones divulgadas en la presente esta dirigida a procedimientos para producir las composiciones anteriores. Por ejemplo, las micropartículas poliméricas anteriores pueden producirse por un procedimiento que comprende: (a) formar una emulsión agua-en-aceite-en-agua que comprende agua, disolvente orgánico y polímero biodegradable; (b) eliminar el disolvente orgánico de la emulsión para formar las micropartículas poliméricas; y (c) adsorber un antígeno toxoide, tal como un toxoide del tétanos o de la difteria, un antígeno que contiene polisacáridos tal como un Hib, un antígeno de polisacárido o conjugado meningocócico o neumocócico, o una combinación de los mismos, a las micropartículas. En numerosas realizaciones, la emulsión además comprenderá un tensioactivo, por ejemplo un tensioactivo aniónico.

Una ventaja de las composiciones inmunogénicas divulgadas en la presente es la capacidad de generar respuestas inmunes en un sujeto vertebrado, que incluye respuestas de anticuerpos convencionales.

Estas y otras varias realizaciones, aspectos y ventajas de la presente divulgación se tornan fácilmente evidentes para aquellos con experiencia ordinaria en la técnica en vista de la presente divulgación y de las reivindicaciones adjuntas.

Breve divulgación de las figuras

La Fig. 1 es el Cronograma de Vacunación Recomendado para Niños y Adolescentes de los Estados Unidos de 2003 del Departamento de Salud y Servicios Humanos, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Programa Nacional de Vacunación.

La Fig. 2 es un gráfico de barras que ilustra el % de adsorción y el % de liberación para el toxoide del tétanos y el toxoide de la difteria de partículas de LPG en tampón de Histidina.

La Fig. 3 es un gráfico de barras que ilustra el % de adsorción y el % de liberación para el conjugado Men-X Crm de partículas de LPG.

Divulgación detallada

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, de química de polímeros, de bioquímica, de biología molecular, de inmunología y de farmacología, dentro de las habilidades propias de la técnica. Tales técnicas se explican en forma completa en la literatura. Véase, por ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S., ed, CR C Press, 1997) y Seymour/Carraher=s Polymer Chemistry (4th edition, Marcel Dekker Inc., 1996).

De acuerdo con lo utilizado en esta memoria descriptiva y en cualquiera de las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referencias a los plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, el término "micropartículas" esta dirigida a una o más micropartículas, y similares.

A menos que el contexto indique lo contrario, todos los porcentajes y relaciones de la presente se dan sobre una base en peso.

A. Definiciones

Durante la divulgación de la presente invención, se emplearán los siguientes términos y se definen como se indica a continuación.

De acuerdo con lo utilizado en la presente, el término "micropartícula" esta dirigida a una partícula de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 150 μm de diámetro, más típicamente de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 30 μm de diámetro, y aún más típicamente, de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 10-20 μm de diámetro. En ciertas circunstancias, las micropartículas de la presente invención pueden agregarse para dar masas mayores. En general, la micropartícula tendrá un diámetro que permita la administración parenteral o a través de mucosas sin ocluir agujas ni capilares. El tamaño de las micropartículas se determina con facilidad por técnicas bien conocidas en la técnica, tales como espectroscopia de correlación de fotones, difracción láser y/o microscopía electrónica de barrido. El término "partícula" también puede utilizarse para denotar una micropartícula definida en la presente.

Típicamente, las micropartículas poliméricas para utilizar en la presente se forman a partir de materiales que son esterilizables, sustancialmente no tóxicos y biodegradables. Tales materiales incluyen poli(α -hidroxiácidos), ácidos polihidroxi-butíricos, policaprolactonas, poliortoésteres, polianhídridos y policianoacrilatos (por ej., polialquilcianoacrilato o "PACA"). Más típicamente, las micropartículas para utilizar con la presente invención son micropartículas poliméricas obtenidas a partir de poli(α -hidroxiácidos), por ejemplo a partir de una poli(lactida) ("PLA") o un copolímero de lactida y glicolida, tal como una poli(D,L-lactida-co-glicolida) ("PLG"), o un copolímero de D,L-lactida y caprolactona. Las micropartículas poliméricas pueden obtenerse a partir de diversos materiales poliméricos de partida que tienen una variedad de pesos moleculares y, en el caso de los copolímeros tales como PLG, una variedad de relaciones entre monómeros (por ej., lactida:glicolida), cuya selección será principalmente una cuestión de elección, dependiendo en parte de las especies coadministradas. Estos parámetros se discuten en mayor medida a continuación.

El término "tensoactivo" de acuerdo con lo utilizado en la presente, incluye detergentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión y estabilizadores de emulsión. Los tensoactivos catiónicos incluyen, pero sin limitación, bromuro de cetiltrimetilamonio o "CTAB" (por ej., cetrimida), cloruro de benzalconio, DDA (bromuro de dimetil dodeciloammonio), DOTAP (dioleoil-3-trimetilamonio-propano) y similares. Los tensoactivos aniónicos incluyen, pero sin limitación, SDS (dodecil sulfato de sodio), SLS (lauril sulfato de sodio), DSS (disulfosuccinato), alcoholes grasos sulfatados y similares. Los tensoactivos no iónicos incluyen, pero sin limitación, PVA, povidona (también conocida como polivinilpirrolidona o PVP), ésteres de sorbitán, polisorbatos, monoéteres de glicol polioxietilenados, alquilfenoles polioxietilenados, poloxámeros y similares.

El término "emulsión submicrónica", de acuerdo con lo utilizado en la presente, esta dirigida a una emulsión aceite-en-agua que comprende gotitas de aceite, todas las cuales oscilan sustancialmente en un tamaño de hasta 1000 nm, por ejemplo de 10 nm a 1000 nm.

ES 2 328 697 T3

El término “producto farmacéutico” esta dirigida a compuestos biológicamente activos tales como antibióticos, agentes antivirales, factores de crecimiento, hormonas, antígenos y similares.

5 El término “adyuvante” esta dirigida a cualquier sustancia que asiste o modifica la acción de un producto farmacéutico, que incluye, pero sin limitación, adyuvantes inmunológicos, que aumentan o diversifican la respuesta inmune a un antígeno. Por lo tanto, los adyuvantes inmunológicos son compuestos que son capaces de potenciar una respuesta inmune a los antígenos.

10 Un “polinucleótido” es un polímero de ácido nucleico. Un polinucleótido puede incluir, como mínimo, 5, 6, 7 u 8 nucleótidos. Además, un “polinucleótido” puede incluir secuencias bicatenarias y monocatenarias, y esta dirigida, pero sin limitación, a ADNc proveniente de ARNm viral, procariota o eucariota, secuencias de ARN y ADN genómicos de ADN viral (por ej., de virus y retrovirus de ARN y ADN) o procariota, y secuencias de ADN sintético. El término también abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN. El término también incluye modificaciones, tales como supresiones, adiciones y sustituciones (en general, de naturaleza conservadora), a una secuencia nativa, por ejemplo cuando la molécula de ácido nucleico codifica una proteína anti-
15 génica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, tal como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de huéspedes que producen antígenos.

20 De acuerdo con lo utilizado en la presente, el término “ácido nucleico” esta dirigida a ADN, ARN o quimeras formadas a partir de los mismos.

Una “especie que contiene polinucleótido” es una molécula en la que al menos una porción es un polinucleótido. Los ejemplos incluyen construcciones de vectores de ARN, construcciones de vectores de ADN, etc..

25 Un “oligosacárido” esta dirigida a un polímero de monosacárido relativamente corto, es decir que contiene de 2 a 30 unidades de monosacárido. Un “polisacárido” es un polímero de monosacárido que tiene una longitud mayor que la del oligosacárido (es decir, que contiene más de 30 unidades de monosacárido). Además, según lo utilizado en la presente, el término “polisacárido” también esta dirigida a un polímero de monosacárido que contiene dos o más monosacáridos unidos. Para evitar cualquier ambigüedad, la segunda definición ha de aplicarse en todos los casos, a menos que existan
30 indicaciones explícitas en contrario. Típicamente, los monosacáridos están unidos por enlaces glicosídicos. Tanto los polisacáridos naturales de longitud completa como los fragmentos de los mismos están abarcados por la definición. Los términos también incluyen modificaciones, tales como supresiones, adiciones y sustituciones a una secuencia de polisacárido nativa, por ejemplo, de modo que el polisacárido mantenga la capacidad de producir una respuesta inmunológica en un sujeto al que se le administre el polisacárido.

35 Un “monosacárido” es un alcohol polihidroxilado (es decir, un alcohol que además comprende un grupo aldehído (caso en el que el monosacárido es una aldosa) o un grupo ceto (caso en el que el monosacárido es una cetosa). Típicamente, los monosacáridos contienen 3-10 carbonos. Además, los monosacáridos típicamente tienen la fórmula empírica $(CH_2O)_n$, en la que n es un número entero de tres o más, típicamente 3-10. Los ejemplos de aldosas de 3-
40 6 carbonos incluyen gliceraldehído, eritrosa, treosa, ribosa, 2-desoxirribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa y talosa. Los ejemplos de cetosas de 3-6 carbonos incluyen dihidroxiacetona, eritruosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, fructosa, sorbosa, y tagatosa. Los monosacáridos naturales normalmente se hallan en la forma de isómero D, en oposición a la forma L.

45 De acuerdo con lo utilizado en la presente, el término “sacárido” abarca monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Una “especie que contiene sacárido” es una molécula en la que al menos una porción es un sacárido. Los ejemplos incluyen antígenos de sacáridos, antígenos que comprenden sacáridos conjugados a péptidos transportadores, etc.

50 Los términos “polipéptido” y “proteína” esta dirigida a un polímero de residuos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima del producto. Así, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares, se incluyen dentro de la definición. La definición abarca tanto proteínas de longitud completa como fragmentos de las mismas. Los términos también incluyen modificaciones, tales como supresiones, adiciones y sustituciones (en general, de naturaleza conservadora), a una secuencia nativa, por ejemplo, de modo que la proteína mantenga la capacidad de producir una
55 respuesta inmunológica o de tener un efecto terapéutico sobre un sujeto al que se le administre la proteína.

Una “especie que contiene polipéptido” es una molécula, en la que al menos una porción es un polipéptido. Los ejemplos incluyen polipéptidos, proteínas que incluyen glicoproteínas, antígenos de sacáridos conjugados a proteínas transportadoras, etc.

60 Por “antígeno” se entiende una molécula que contiene uno o más epitopos con capacidad para estimular un sistema inmune de un huésped para producir una respuesta celular inmune antígeno-específica cuando se presenta el antígeno, o una respuesta de un anticuerpo humoral. Un antígeno puede ser capaz de generar una respuesta celular y/o humoral por sí mismo o cuando está presente en combinación con otra molécula.

65 Un “epitopo” es aquella porción de una molécula antigénica o complejo antigénico que determina su especificidad inmunológica. Un epitopo se encuentra dentro del alcance de la presente definición de antígeno. Normalmente, un epitopo es un polipéptido o polisacáridos en un antígeno natural. En antígenos artificiales, puede ser una sustancia

de bajo peso molecular tal como un derivado del ácido arsánico. Un epítopo reaccionará específicamente *in vivo* o *in vitro* con, por ejemplo, anticuerpos homólogos o linfocitos T. Los descriptores alternativos son un determinante antigénico, una agrupación estructural antigénica y una agrupación hapténica.

5 Un epítopo polipeptídico puede incluir, por ejemplo, entre aproximadamente 5-15 aminoácidos. Pueden identificarse epítopos de un antígeno dado utilizando una de numerosas técnicas de mapeo de epítopos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ej., Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Por ejemplo, pueden determinarse epítopos lineales, por ejemplo, sintetizando en forma concurrente grandes cantidades de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a
10 porciones de la molécula proteica, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos aún están unidos a los soportes. Tales técnicas son conocidas en la técnica y se describen, por ej., en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.708.871; Geysen *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen *et al.* (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. En forma similar, los epítopos conformacionales son fácilmente identificados determinando la conformación espacial de los aminoácidos mediante, por ej., cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ej., *Epitope Mapping Protocols, supra*.
15

El término “antígeno”, según lo utilizado en la presente, denota tanto antígenos de subunidades, es decir antígenos que son separados y discretos de un organismo entero con el que el antígeno está asociado en la naturaleza, como bacterias, virus, parásitos muertos, atenuados o inactivados u otros agentes patógenos o células tumorales. Los anticuerpos tales como anticuerpos anti-idiotipo, o fragmentos de los mismos, y los mimotopos de péptidos sintéticos, que pueden imitar a un antígeno o determinante antigénico, también están abarcados por la definición de antígeno utilizada en la presente.
20

En forma similar, un oligonucleótido o polinucleótido (los oligonucleótidos son polinucleótidos con un peso molecular relativamente bajo, que típicamente contienen de 2 a 100 nucleótidos) que expresa una proteína inmunogénica, o un determinante antigénico *in vivo*, tal como en aplicaciones de inmunización con ácidos nucleicos, también se incluye en la presente definición de antígeno.
25

Además, a los fines de la presente invención, un “antígeno” esta dirigida a una proteína, que incluye modificaciones, tales como supresiones, adiciones y sustituciones (en general, de naturaleza conservadora), a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la capacidad de generar una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, tal como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de huéspedes que producen los antígenos.
30

Una “respuesta inmunológica” a un antígeno o composición es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmune humoral y/o celular a moléculas presentes en la composición de interés. A los fines de la presente invención, una “respuesta inmune humoral” esta dirigida a una respuesta inmune mediada por moléculas de anticuerpos, mientras que una “respuesta inmune celular” es una mediada por linfocitos T y/u otras células leucocitarias. Un aspecto importante de la inmunidad celular incluye una respuesta antígeno-específica por células T citolíticas (“CTL”). Las CTL tienen especificidad por antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y que se expresan sobre las superficies de las células. Las CTL ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de los microbios intracelulares, o la lisis de las células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular incluye una respuesta antígeno-específica por células T ayudantes. Las células T ayudantes actúan para ayudar a estimular la función, y enfocar la actividad, de células efectoras no específicas contra células que despliegan antígenos peptídicos en asociación con moléculas del MHC sobre su superficie. Una “respuesta inmune celular” también esta dirigida a la producción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas semejantes producidas por células T activadas y/u otras células leucocitarias, que incluyen las derivadas de células T CD4+ y CD8+. Una composición tal como una composición o vacuna inmunogénica que genere una respuesta inmune celular puede servir para sensibilizar a un individuo vertebrado mediante la presentación de antígenos en asociación con moléculas del MHC en la superficie celular. La respuesta inmune mediada por células se dirige a, o cerca de, células que presentan antígenos en su superficie. Además, pueden generarse linfocitos T antígeno- específicos para permitir la futura protección de un huésped inmunizado. La capacidad de un antígeno o composición particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por una célula puede determinarse mediante numerosos ensayos, tales como ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos con células CTL citotóxicas, valorando los linfocitos T específicos para el antígeno en un individuo sensibilizado, o por medición de la producción de citocinas por células T en respuesta a la re-estimulación con antígeno. Tales ensayos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ej., Erickson *et al.*, J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doe *et al.*, Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376. El antígeno de interés también puede generar una respuesta inmune mediada por un anticuerpo. Por lo tanto, una respuesta inmunológica puede incluir uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos por células B; y/o la activación de células T supresoras y/o células T γδ específicamente dirigidas a un antígeno o antígenos presentes en la composición o vacuna de interés. Estas respuestas pueden servir para neutralizar la infectividad, y/o mediar el complemento del anticuerpo o la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) para proporcionar protección a un huésped inmunizado. Tales respuestas pueden determinarse utilizando inmunoensayos y ensayos de neutralización estándares, bien conocidos en la técnica, por ejemplo radioinmunoensayos y ensayos ELISA.
35
40
45
50
55
60
65

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención muestran “inmunogenicidad aumentada” cuando poseen una mayor capacidad de generar una respuesta inmune que la respuesta inmune generada por una cantidad equivalente del antígeno en una composición diferente. Por lo tanto, una composición puede mostrar “inmunogenicidad

aumentada”, por ejemplo, dado que la composición genera una respuesta inmune más intensa, o dado que es necesaria una dosis inferior de antígeno para lograr una respuesta inmune en el sujeto al que se le administra. Tal inmunogenicidad aumentada puede determinarse, por ejemplo, administrando las composiciones de la invención, y controles de antígeno, a animales, y comparando los resultados de los ensayos de los dos.

5 De acuerdo con lo utilizado en la presente, “tratamiento” (que incluye variaciones, por ejemplo, “tratar” o “tratado/a”) esta dirigida a una cualquiera de: (i) la prevención de un agente patógeno o trastorno en cuestión (por ej., cáncer o una infección patógena, como en una vacuna tradicional), (ii) la reducción o eliminación de síntomas, y (iii) la eliminación sustancial o completa del agente patógeno o trastorno en cuestión. El tratamiento puede llevarse a cabo
10 en forma profiláctica (previo al arribo del agente patógeno o trastorno en cuestión) o terapéutica (después del arribo del mismo).

Los términos “cantidad efectiva” o “cantidad farmacéuticamente efectiva” de una composición inmunogénica de la presente invención esta dirigida a una cantidad suficiente de la composición inmunogénica para tratar una afección
15 de interés. La cantidad exacta requerida variará de individuo a individuo, dependiendo, por ejemplo, de la especie, edad y estado general del individuo; de la severidad de la afección que se trata; del antígeno de interés particular; en el caso de una respuesta inmunológica, de la capacidad del sistema inmune del sujeto para sintetizar anticuerpos, por ejemplo, y del grado de protección deseado; y del modo de administración, entre otros factores. Una cantidad “efectiva” adecuada en cualquier caso individual puede ser determinada por una persona con experiencia ordinaria en
20 la técnica. Así, “una cantidad terapéuticamente efectiva” típicamente caerá parte en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos de rutina.

Por “individuo vertebrado” o “animal vertebrado” se entiende cualquier miembro del *subphylum cordata*, que incluye, sin limitación, mamíferos tales como vacunos, ovejas, cerdos, cabras, caballos y seres humanos; animales
25 domésticos tales como perros y gatos; y aves, que incluyen aves domésticas, salvajes y de caza, tales como gallos y gallinas, que incluyen pollos, pavos y otras aves gallináceas. El término no denota una edad particular. Por lo tanto, quedan abarcados animales adultos y recién nacidos.

Por “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable” se entiende un material que no es no deseable biológicamente ni bajo ningún otro punto de vista, es decir que el material puede administrarse a un individuo
30 sin causar ningún efecto biológico excesivamente no deseable en el mismo, ni interactuar en forma excesivamente perjudicial con ninguno de los componentes de la composición en la que está contenido.

El término “excipiente” esta dirigida a cualquier sustancia esencialmente accesorio que puede estar presente en la forma de dosificación final. Por ejemplo, el término “excipiente” incluye vehículos, aglutinantes, desintegrantes,
35 materiales para relleno (diluyentes), lubricantes, deslizantes (mejoradores de la fluidez), auxiliares de compresión, colorantes, edulcorantes, conservantes, agentes de suspensión/dispersantes, formadores de película/revestimientos, saborizantes y tintas de impresión.

40 “pH fisiológico” o un “pH en el intervalo fisiológico” significa un pH en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 8,0 inclusive, más típicamente en el rango de aproximadamente 7,2 a 7,6 inclusive.

De acuerdo con lo utilizado en la presente, el término “construcción de vector” en general esta dirigida a cualquier montaje con capacidad de dirigir la expresión de una(s) secuencia(s) de ácido nucleico o de un(os) gen(es) de
45 interés. Típicamente, una construcción de vector incluye un promotor/potenciador transcripcional o elemento(s) de definición del locus, u otros elementos que controlan la expresión del gen por otros medios tales como empalme alternativo, exportación nuclear de ARN, modificación pos-traduccionales de mensajero, o modificación pos-transcripcional de proteína. Además, la construcción de vector típicamente incluye una secuencia que, una vez transcrita, se une operativamente a la(s) secuencia(s) o gen(es) de interés y actúa como una secuencia de iniciación de la traducción.
50 También, la construcción de vector puede opcionalmente incluir una señal que dirija la poliadenilación, un marcador seleccionable, así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de la traducción; Además, si la construcción de vector se coloca en un retrovirus, la construcción de vector puede incluir una señal de empaque, repeticiones de terminales largos (LTR), y sitios de unión al cebador de hebra positiva y negativa, adecuados al retrovirus utilizado (en caso de que no estén ya presentes).

55 Una “construcción de vector de ADN” esta dirigida a una molécula de ADN con capacidad de dirigir la expresión de una(s) secuencia(s) de ácido nucleico o de gen(es) de interés.

Un tipo específico de construcción de vector de ADN es un plásmido, que es una molécula de ADN episomal circular con capacidad de replicación autónoma dentro de una célula huésped. Típicamente, un plásmido es un bucle de
60 ADN circular bicatenario en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. El pCMV es un plásmido específico que es bien conocido en la técnica. Un vector pCMV preferido es aquel que contiene el potenciador/promotor inmediato-temprano del CMV y un terminador de la hormona de crecimiento bovina. Se describe en detalle en Chapman, B. S., *et al.* 1991. “Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells”. *Nucleic Acids Res.* 19:3979-86.

Se conocen otras construcciones de vector de ADN, que se basan en virus de ARN. Típicamente, estas construcciones de vector de ADN comprenden un promotor que funciona en una célula eucariota, 5’ de una secuencia de ADN

para la que el producto de transcripción es una construcción de vector de ARN (por ej., un replicón del vector del ARN del alfavirus), y una región de terminación 3'. Preferiblemente, la construcción del vector de ARN comprende un genoma de ARN de un picornavirus, togavirus, flavivirus, coronavirus, paramixovirus, virus de la fiebre amarilla o alfavirus (por ej., virus Sindbis, virus Semliki, virus Forest, virus de la encefalitis equina venezolana, o virus de Ross River), que ha sido modificado por reemplazo de uno o más genes de proteínas estructurales con una secuencia heteróloga de ácido nucleico seleccionada que codifica un producto de interés. Las construcciones de vector de ARN pueden obtenerse por la transcripción *in vitro* de un ADN molde. Los ejemplos específicos incluyen plásmidos basados en el virus Sindbis (pSIN), tales como pSINCP, descrito, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.814.482 y 6.015.686, así como en las Solicitudes de Patente Internacional WO 97/38087, WO 99/18226 y en la WO 02/26209 del solicitante. La construcción de tales vectores se describe en general en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.814.482 y 6.015.686.

Otros ejemplos de construcciones de vectores incluyen construcciones de vectores de ARN (por ej., construcciones de vectores del alfavirus) y similares. De acuerdo con lo utilizado en la presente, "construcción de vector de ARN", "replicón de vector de ARN" y "replicón" esta dirigida a una molécula de ARN que es capaz de dirigir su propia amplificación o auto-replicación *in vivo*, típicamente dentro de una célula blanco. La construcción de vector de ARN se utiliza directamente, sin requerir la introducción de ADN en una célula y el transporte al núcleo donde ocurriría la transcripción. Utilizando el vector de ARN para la administración directa en el citoplasma de la célula huésped, se produce eficientemente la replicación y traducción autónoma de la secuencia heteróloga de ácido nucleico.

B. Procedimientos Generales

1. Composiciones de Micropartículas

Los polímeros útiles para formar las composiciones de micropartículas inmunogénicas descritas en la presente incluyen homopolímeros, copolímeros y mezclas de polímeros obtenidas a partir de los siguientes: ácido polihidroxibutírico (también conocido como polihidroxibutirato); ácido polihidroxivalérico (también conocido como polihidroxivalerato); ácido poliglicólico (PGA) (también conocido como poliglicolida); ácido poliláctico (PLA) (también conocido como polilactida); polidioxanona; policaprolactona; poliortoéster; y polianhídrido. Son más comunes los poli(α -hidroxiácidos), tales como poli(L-lactida), poli(D,L-lactida) (ambos denominados en la presente "APLA"), poli(hidroxibutiratos), copolímeros de lactida y glicolida, tales como poli(D,L-lactida-co-glicolida) (denominados en la presente "PLG"), o copolímeros de D,L-lactida y caprolactona.

Los polímeros anteriores se encuentran disponibles en una variedad de pesos moleculares, y el peso molecular adecuado para un uso dado es determinado con facilidad por aquellos con experiencia en la técnica. Así, por ejemplo, un peso molecular adecuado para PLA puede estar en el orden de aproximadamente 2000 a 5000. Un peso molecular adecuado para PLG puede oscilar entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 200.000, típicamente entre aproximadamente 15.000 y aproximadamente 150.000.

Cuando se utilizan copolímeros, pueden encontrarse disponibles copolímeros con una variedad de relaciones de monómeros. Por ejemplo, cuando se utiliza PLG para formar las micropartículas, se utilizará una variedad de relaciones molares de lactida-glicolida, y la relación es principalmente una cuestión de elección, dependiendo en parte de alguna especie adsorbida y/o atrapada coadministrada y de la velocidad de degradación deseada. Por ejemplo, un polímero PLG 50:50, que contiene 50% de D,L-lactida y 50% de glicolida, proveerá un copolímero de resorción rápida mientras que el PLG 75:25 se degrada más lentamente, y 85:15 y 90:10, aún más lentamente, debido al aumento del componente lactida. También, pueden encontrar uso aquí mezclas de micropartículas con relaciones variables de lactida:glicolida para lograr una cinética de liberación deseada. También puede controlarse la velocidad de degradación de las micropartículas de la presente invención por factores tales como el peso molecular del polímero y la cristalinidad del polímero.

Los copolímeros PLG con relaciones variables de lactida:glicolida y pesos moleculares variables se encuentran disponibles en el comercio de fuentes que incluyen Boehringer Ingelheim, Alemania y Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL. Algunos copolímeros PLG representativos incluyen: (a) RG 502, un PLG que tiene una relación molar de lactida/glicolida 50:50 y un peso molecular de 12.000 Da; (b) RG 503, un PLG que tiene una relación molar de lactida/glicolida 50:50 y un peso molecular de 34.000 Da; (c) RG 504, un PLG que tiene una relación molar de lactida/glicolida 50:50 y un peso molecular de 48.000 Da, (d) RG 752, un PLG que tiene una relación molar de lactida/glicolida 75:25 y un peso molecular de 22.000 Da; y (e) RG 755, un PLG que tiene una relación molar de lactida/glicolida 75:25 y un peso molecular de 68.000 Da. También pueden sintetizarse polímeros PLG por simple policondensación del componente ácido láctico utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, tales como las descritas en Tabata *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. (1988) 22:837-858.

Donde se utilizan, los polímeros poli(D,L-lactida-co-glicolida) son típicamente los que tienen una relación molar de lactida/glicolida que oscila entre 20:80 y 80:20, más típicamente 40:60 y 60:40, y que tienen un peso molecular que oscila entre 10.000 y 100.000 Daltons, más típicamente entre 20.000 Daltons y 70.000 Daltons.

Se preparan micropartículas utilizando cualquier procedimiento bien conocido en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente, pueden utilizarse técnicas de doble emulsión/evaporación de disolvente, tales como las descritas en la Patente de los Estados Unidos Núm. 3523907 y Ogawa *et al.*, Chem. Pharm. Bull. (1988) 36:1095-

1103, para preparar las micropartículas. Estas técnicas implican la formación de una emulsión primaria que consiste en gotitas de una solución polimérica, que posteriormente se mezcla con una fase acuosa continua que contiene un estabilizador de partículas/tensioactivo.

5 En otras realizaciones, también pueden formarse micropartículas utilizando secado por aspersión y coacervación de acuerdo con lo descrito en, por ej., Thomasin *et al.*, J. Controlled Release (1996) 41:131; Patente de los Estados Unidos Núm. 2800457; Masters, K. (1976) Spray Drying 2nd Ed. Wiley, New York; técnicas de revestimiento por suspensión en aire, tal como revestimiento en bandeja y revestimiento Wurster, de acuerdo con lo descrito por Hall *et al.*, (1980) The AWurster Process@ in Controlled Release Technologies: Methods, Theory, and Applications (A.F. Kydonieus, ed.), Vol. 2, pp. 133-154 CRC Press, Boca Raton, Florida and Deasy, P.B., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. (1988) S(2):99-139; y gelación iónica de acuerdo con lo descrito, por ej., por Lim *et al.*, Science (1980) 210: 908-910.

15 En realizaciones preferidas, puede utilizarse un sistema de evaporación de disolvente de agua-en-aceite-en-agua (w/o/w) para formar las micropartículas, junto con lo descrito por O'Hagan *et al.*, Vaccine (1993) 11:965-969, PCT/US99/17308 (WO 00/06123) a O'Hagan *et al.*, y Jeffery *et al.*, Pharm. Res. (1993) 10:362.

20 En general, se disuelve un polímero de interés tal como PLG en un disolvente orgánico, tal como acetato de etilo, cloruro de dimetilo (también denominado cloruro de metileno y diclorometano), acetonitrilo, acetona, cloroformo y similares. Típicamente, el polímero se proveerá en una solución aproximadamente 1-30%, más típicamente aproximadamente 2-15%, aún más típicamente aproximadamente 3-10% y más típicamente aproximadamente 4-8%, en disolvente orgánico. Después, la solución polimérica se combina con un primer volumen de solución acuosa y se emulsiona para formar una emulsión o/w. La solución acuosa puede ser, por ejemplo, agua desionizada, solución salina normal, una solución tamponada, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato (PBS) o una solución 25 tampón de citrato de sodio/ácido etilendiamintetraacético (citrato de sodio/EDTA). Las últimas soluciones pueden (a) proveer una tonicidad, es decir, osmolalidad, que es esencialmente la misma que la de los fluidos fisiológicos normales y (b) mantener un pH compatible con las condiciones fisiológicas normales. Alternativamente, la tonicidad y/o características del pH de las composiciones de la presente invención pueden ajustarse después de la formación de las micropartículas y antes de la administración. Preferiblemente, la relación de volumen de la solución polimérica a la 30 solución acuosa oscila entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 20:1, con más preferencia, aproximadamente 10:1. La emulsificación se realiza utilizando cualquier equipamiento adecuado para esta tarea, y es típicamente un dispositivo de alto cizallamiento, tal como, por ej., un homogeneizador.

35 En algunas realizaciones, uno o más componentes adicionales están atrapados dentro de las micropartículas. Por ejemplo, puede introducirse antígeno adicional y/o los componentes suplementarios descritos a continuación añadiendo los mismos (a) a la solución polimérica, en caso de estar en forma soluble en aceite o dispersable en aceite o (b) a la solución acuosa, en caso de estar en forma hidrosoluble o hidrodispersable.

40 Después, se combina un volumen de la emulsión o/w con un segundo volumen mayor de una solución acuosa, que típicamente contiene un tensioactivo. La relación de volumen de la solución acuosa a la emulsión o/w típicamente oscila entre aproximadamente 2:1 y 10:1, más típicamente aproximadamente 4:1. Los ejemplos de los tensioactivos adecuados para la práctica de la invención se enumeran con anterioridad. Aquellos con experiencia ordinaria en la técnica pueden seleccionar con facilidad tensioactivos adecuados para el tipo de especie a ser adsorbida. Por ejemplo, las micropartículas fabricadas en presencia de tensioactivos cargados, tales como tensioactivos aniónicos o catiónicos, 45 pueden dar micropartículas con una superficie que tiene una carga negativa neta o una carga positiva neta, que puede adsorber una amplia variedad de moléculas. Por ejemplo, las micropartículas fabricadas con tensioactivos aniónicos, tales como dodecil sulfato de sodio (SDS), por ej. micropartículas SDS-PLG, adsorben especies cargadas positivamente, por ejemplo especies que contienen polipéptidos tales como proteínas. En forma similar, las micropartículas producidas con tensioactivos catiónicos, tales como CTAB, por ej. micropartículas PLG/CTAB, adsorben especies cargadas negativamente, por ejemplo especies que contienen polinucleótidos tales como ADN. Cuando las especies a ser 50 adsorbidas tienen regiones de carga positiva y negativa, pueden ser adecuados los tensioactivos catiónicos o aniónicos o no iónicos. Ciertas especies pueden adsorberse más fácilmente a micropartículas que tienen una combinación de tensioactivos. Además, en algunos ejemplos, puede ser deseable añadir un tensioactivo a la solución orgánica anterior.

55 Cuando se utiliza un tensioactivo catiónico tal como CTAB, típicamente se provee en solución aproximadamente 0,00025-1%, más típicamente, en solución aproximadamente 0,0025-0,1%. Cuando se utiliza un tensioactivo aniónico tal como DSS, típicamente se provee en solución aproximadamente 0,00001-0,25%, más típicamente, en solución aproximadamente 0,0001-0,0025%. Cuando se utiliza un tensioactivo no iónico tal como PVA, típicamente se provee en solución aproximadamente 2-15%, más típicamente, en solución aproximadamente 4-10%. Para un tensioactivo catiónico, típicamente se utiliza una relación de peso-a-peso tensioactivo-a-polímero en el intervalo de aproximadamente 0,00001:1 a aproximadamente 0,5:1; más típicamente, de aproximadamente 0,001:1 a aproximadamente 0,1:1, e incluso más típicamente, de aproximadamente 0,0025:1 a aproximadamente 0,05:1; para un tensioactivo aniónico tal como DSS, típicamente se utiliza una relación de peso-a-peso tensioactivo-a-polímero en el intervalo de aproximadamente 0,00001:1 a aproximadamente 0,025:1, más típicamente, de aproximadamente 0,0001:1 a aproximadamente 0,0025:1; 65 para un tensioactivo no iónico tal como PVA, típicamente se utiliza una relación de peso-a-peso tensioactivo-a-polímero en el intervalo de aproximadamente 0,001:1 a aproximadamente 0,1:1, más típicamente, de aproximadamente 0,0025:1 a aproximadamente 0,05:1.

Después, esta mezcla se homogeneiza para producir una emulsión doble a/a/a estable. Típicamente, cada una de las etapas de homogenización anteriores se lleva a cabo a temperatura ambiente (es decir, 25°C) o menor, más típicamente, por ejemplo, mientras se enfría dentro de un baño de hielo.

5 Después, se evaporan los disolventes orgánicos. Posteriormente a la preparación, las micropartículas pueden utilizarse en el estado en que se encuentran o, por ejemplo, pueden liofilizarse para un uso futuro.

10 Los parámetros de formulación pueden manipularse para permitir la preparación de micropartículas pequeñas en el orden de 0,05 μm (50 nm) a micropartículas más grandes de 50 μm o incluso más grandes. Véase, por ej., Jeffery *et al.*, Pharm. Res. (1993) 10: 362-368; McGee *et al.*, J. Microencap. (1996). Por ejemplo, la agitación reducida típicamente da lugar a micropartículas más grandes, al igual que lo hacen un aumento en la fase interna y un aumento en la concentración de polímero. Típicamente, las partículas pequeñas se producen por aumento de la agitación así como por un volumen bajo de la fase acuosa, concentraciones elevadas de estabilizadores de la emulsión y una disminución de la concentración de polímero.

15 El tamaño de las partículas puede determinarse, por ej., por dispersión de luz láser utilizando, por ejemplo, un espectrómetro que incorpora un láser de helio-neón. En general, el tamaño de las partículas se determina a temperatura ambiente e incluye análisis múltiples de la mezcla en cuestión (por ej., 5-10 veces) para dar un valor promedio para el diámetro de las partículas. El tamaño de las partículas también se determina con facilidad utilizando microscopia electrónica de barrido (SEM).

20 Después de la preparación, puede mezclarse una variedad de componentes con las micropartículas, que incluyen un antígeno toxoide y/o un antígeno que contiene polisacáridos, cualquier antígeno adicional, y cualquier componente suplementario tal como los descritos a continuación, y, si se desea, la formulación resultante puede liofilizarse antes del uso. Típicamente, estos componentes se añaden a las micropartículas como una solución o dispersión acuosa. En algunos casos, estas especies se adsorberán a la superficie de las micropartículas (véase, por ej., los Ejemplos presentados a continuación en los que se adsorben antígenos toxoides a la superficie de las micropartículas). El contenido de las especies adsorbidas puede determinarse utilizando técnicas estándar.

30 Por lo tanto, las micropartículas poliméricas divulgadas en la presente pueden tener una variedad de componentes adsorbidos a las mismas, así como una variedad de componentes atrapados o encapsulados en su interior. Por ejemplo, aquellos con experiencia ordinaria en la técnica pueden preparar, de acuerdo con la divulgación, micropartículas que tengan antígenos y/o adyuvantes inmunológicos adsorbidos, además del antígeno toxoide y/o antígeno que contiene polisacáridos adsorbido. Aquellos con experiencia ordinaria en la técnica también pueden preparar, de acuerdo con la divulgación, micropartículas que tengan componentes encapsulados, tales como antígenos y/o adyuvantes inmunológicos, además del antígeno toxoide y/o antígeno que contiene polisacáridos adsorbidos.

2. Antígenos

40 La presente divulgación utiliza numerosos antígenos que incluyen antígenos toxoides del toxoide del tétanos, toxoide de la difteria, o ambos. Un toxoide es una toxina que ha sido tratada con el fin de reducir o eliminar su toxicidad, reteniendo una inmunogenicidad adecuada. Normalmente, los toxoides se preparan tratando toxinas producidas por una bacteria que causa enfermedades con altas temperaturas y/o productos químicos. Por ejemplo, los toxoides purificados de difteria y tétanos se encuentran disponibles en el comercio habiendo sido preparados por tratamiento con formalina de exotoxinas de *Corynebacterium diphtheriae* y *Clostridium tetani*, respectivamente.

La presente invención también encontrará uso para estimular una respuesta inmune contra una amplia variedad de antígenos, además de los antígenos toxoides.

50 Por ejemplo, los antígenos de la familia de los virus de la hepatitis, que incluyen el virus de la hepatitis A (HAV), el virus de la hepatitis B (HBV), el virus de la hepatitis C (HCV), el virus de la hepatitis delta (HDV), el virus de la hepatitis E (BEV) y el virus de la hepatitis G (HGV), pueden utilizarse convenientemente en las técnicas descritas en la presente. A modo de ejemplo, la secuencia genómica viral del HCV es conocida, y existen procedimientos para obtenerla. Véanse, por ej., las Publicaciones Internacionales Nos. WO 89/04669, WO 90/11089 y WO 90/14436. El genoma del HCV codifica diversas proteínas virales, que incluyen E1 (también conocida como E) y E2 (también conocida como E2/NSI) y una proteína de nucleocápside del N-terminal (denominada "núcleo") (véase, Houghton *et al.*, Hepatology (1991) 14:381-388, para una discusión de las proteínas del HCV, que incluyen E1 y E2). Cada una de estas proteínas, así como los fragmentos antigénicos de las mismas, encontrará uso en la presente composición y procedimientos.

60 En forma similar, se conoce la secuencia para el δ -antígeno de HDV (véase, por ej., la Patente de los Estados Unidos No. 5378814) y este antígeno puede utilizarse convenientemente en la presente composición y procedimientos. Además, los antígenos obtenidos a partir del HBV, tales como el antígeno nuclear, el antígeno superficial, sAg, así como las secuencias de pre-superficie, pre-S1 y pre-S2 (anteriormente denominadas pre-S), así como las combinaciones de los anteriores, tales como sAg/pre-S1, sAg/pre-S2, sAg/pre-S1/pre-S2, y pre-S1/pre-S2, se utilizarán en la presente. Véase, por ej., AHBV Vaccines - from the laboratory to license: a case study@ en Mackett, M. y Williamson, J.D., Human Vaccines and Vaccination, pp. 159-176, para una discusión de la estructura del HBV; y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4722840, 5098704, 5324513, incorporadas en la presente en su totalidad como referencia;

Beames *et al.*, J. Virol. (1995) 69:6833-6838, Birnbaum *et al.*, J. Virol. (1990) 64:3319-3330; y Zhou *et al.*, J. Virol. (1991) 65:5457-5464.

Los antígenos de la familia de los virus herpes, que incluyen proteínas obtenidas a partir del virus del herpes simple (HSV) de tipo 1 y 2, tales como las glicoproteínas gB, gD y gH del HSV-1 y HSV-2; antígenos obtenidos a partir del virus de la varicela zoster (VZV), el virus Epstein-Barr (EBV) y el citomegalovirus (CMV), que incluyen gB y gH del CMV; y antígenos obtenidos a partir de otros virus herpes humanos tales como HHV6 y HHV7, también pueden utilizarse convenientemente en conexión con la presente invención. (Véase, por ej., Chee *et al.*, Cytomegaloviruses O.K. McDougall, ed., Springer-Verlag 1990) pp. 125-169, para una revisión del contenido codificador de proteínas del citomegalovirus; McGeoch *et al.*, J. Gen. Virol. (1988) 69:1531-1574, para una discusión de las diversas proteínas codificadas por HSV-1; la Patente de los Estados Unidos No. 5171568 para una discusión de las proteínas gB y gD del HSV-1 y HSV-2 y los genes que codifican las mismas; Baer *et al.*, Nature (1984) 310:207-211, para la identificación de las secuencias codificadoras de proteínas en un genoma de EBV; y Davison y Scott, J. Gen. Virol. (1986) 67:1759-1816, para una revisión del VZV).

Los antígenos obtenidos a partir de otros virus también se utilizarán en las composiciones y procedimientos de la presente invención, tales como, sin limitación, proteínas de los miembros de las familias Picornaviridae (por ej., virus de la polio, etc.); Caliciviridae; Togaviridae (por ej., virus de la rubéola, virus del dengue, etc.); Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae; Birnaviridae; Rhabdoviridae (por ej., virus de la rabia, etc.); Filoviridae; Paramyxoviridae (por ej., virus de las papeas, virus del sarampión, virus sincicial respiratorio, etc.); Orthomyxoviridae (por ej., virus de la gripe de tipos A, B y C, etc.); Bunyaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (por ej., HTLV-I; HTLV-II; HIV-1 (también conocidos como HTLV-III, LAV, ARV, hTLR, etc.)), que incluyen, pero sin limitación, antígenos de los aislados de HTVIIIb, MVSF2, HIVLAV, MVLAI, HIVMN); HIV-1_{CM235}, HIV-1_{US4}; HIV-2; virus de inmunodeficiencia en simios (SIV) entre otros. Además, los antígenos pueden también obtenerse a partir del virus del papilomavirus humano (HPV) y del virus de la encefalitis transmitida por la garrapata. Véase, por ej. Virology, 3rd Edition (W.K. Joklik ed. 1988); Fundamental Virology, 2nd Edition (B.N. Fields y D.M. Knipe, eds. 1991), para una divulgación de estos y otros virus.

Más en particular, las proteínas de envoltura gp120 o gp140 de cualquiera de los aislados de VIH anteriores, que incluyen miembros de los diversos subtipos genéticos del VIH, son conocidas y fueron informadas (véase, por ej., Myers *et al.*, Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico (1992); Myers *et al.*, Human Retroviruses and Aids, 1990, Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory; y Modrow *et al.*, J. Virol. (1987) 61:570-578, para una comparación de las secuencias de envoltura de una variedad de aislados de VIH), y antígenos obtenidos a partir de cualquiera de estos aislados se utilizarán en los procedimientos de la presente. Además, la invención es igualmente aplicable a otras proteínas inmunogénicas obtenidas a partir de cualquiera de los diversos aislados de VIH, que incluyen cualquiera de las proteínas de envoltura tales como gp160 y gp41, antígenos gag tales como p24gag y p55gag, así como proteínas obtenidas de las regiones pol y tat.

El virus de la gripe es otro ejemplo de un virus para el que la presente invención será particularmente útil. Específicamente, las glicoproteínas de envoltura HA y NA de la gripe A tienen un interés particular para generar una respuesta inmune. Se han identificado numerosos subtipos HA de la gripe A (Kawaoka *et al.*, Virology (1990) 179:759-767; Webster *et al.*, "Antigenic variation among type A influenza viruses", p. 127-168. En: P. Palese y D.W. Kingsbury (ed.), Genetics of influenza viruses. Springer-Verlag, New York). Por lo tanto, las proteínas obtenidas a partir de cualquiera de estos aislados también pueden utilizarse en las composiciones y procedimientos descritos en la presente.

Las composiciones y procedimientos descritos en la presente también se utilizarán con numerosos antígenos bacterianos, tales como los derivados de organismos que causan difteria (discutidos con mayor detalle con anterioridad), cólera, ántrax, tuberculosis, tétanos (discutido con mayor detalle con anterioridad), tos ferina, meningitis, y otros estados patogénicos que incluyen, sin limitación, *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis* (A, B, C, Y), *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori* y *Haemophilus influenzae*. *Haemophilus influenzae* de tipo B (HIB), *Helicobacter pylori* y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de antígenos de *Neisseria meningitidis* B se desvelan en las siguientes Solicitudes de Patente compartidas: WO99/57280; WO99/24578; y WO99/36544. Los ejemplos de antígenos parasitarios incluyen los derivados de organismos que causan malaria y enfermedad de Lyme.

Otros antígenos incluyen antígenos dirigidos a la peste, fiebre de las Montañas Rocosas, viruela, tifoidea, tifus, virus de la leucemia felina y fiebre amarilla.

Antígenos adicionales para utilizar con la invención, que no son necesariamente excluyentes de los enumerados en esta solicitud, incluyen los siguientes: (a) un antígeno proteico del serogrupo B de *N. meningitidis*, tal como los de las Referencias 1 a 7 a continuación; (h) una preparación de vesículas de membranas externas (OMV) del serogrupo B de *N. meningitidis*, tal como las divulgadas en las Referencias 8, 9, 10, 11, etc., a continuación; (c) un antígeno sacárido del serogrupo A, C, W135 y/o Y de *N. meningitidis*, tal como el oligosacárido desvelado en la Referencia 12 a continuación a partir del serogrupo C (véase también la Referencia 13); (d) un antígeno sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ej., Referencias 14, 15, 16], (e) un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ej., Referencias 1, 2, 3]; (e) un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ej., Referencias 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]; (f) un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ej., Referencia 24]; (g) un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como un virus inactivado [por ej., Referencias 25, 26]; (h) un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o núcleo [por ej., Referencias 26, 27]; (i) un antígeno del virus de la hepatitis C [por ej., Referencia 28]; (j) un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como la holotoxina de la tos ferina (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*,

opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinogenes 2 y 3 [por ej., Referencias 29 & 30]; (k) un antígeno de la difteria, tal como un toxoide de la difteria [por ej., capítulo 3 de la Referencia 31], por ej. la mutante CRM₁₉₇ [por ej., Referencia 32] (discutido con mayor detalle con anterioridad); (l) un antígeno del tétanos, tal como un toxoide del tétanos [por ej., capítulo 4 de la Referencia 31] (discutido con mayor detalle con anterioridad); (m) un antígeno proteico de *Helicobacter pylori* tal como CagA [por ej., Referencia 33], VacA [por ej., Referencia 33], NAP [por ej., Referencia 34], HopX [por ej., Referencia 35], HopY [por ej., Referencia 35] y/o ureasa; (n) un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ej., Referencia 13]; (o) un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ej., Referencia 36]; (p) antígeno(s) de la polio [por ej., Referencias 37, 38] tales como IPV u OPV; (q) antígenos de la rabia [por ej., Referencia 39], tales como virus inactivados liofilizados [por ej., Referencia 40, RabavertTM]; (r) antígenos del sarampión, paperas y/o rubéola [por ej., capítulos 9, 10 y 11 de la Referencia 31]; (s) antígenos de la gripe [por ej., capítulo 19 de la Referencia 31], tales como las proteínas de superficie hemaglutinina y/o neuraminidasa; (t) un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ej., tiempo 41]; (u) un antígeno de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo grupo B) [por ej., Referencias 42, 43]; (v) un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo Grupo A) [por ej., Referencias 43, 44, 45]; (w) un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ej., Referencia 46]; y (x) composiciones que comprenden uno o más de estos antígenos. Cuando se utiliza un antígeno de sacárido o carbohidrato, este preferiblemente se conjuga a una proteína transportadora para aumentar la inmunogenicidad [por ej., Referencias 47 a 56]. Las proteínas transportadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como toxoides de la difteria o del tétanos. En particular, se prefiere el toxoide de la difteria CRM₁₉₇. Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen una proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [por ej., Referencia 57], péptidos sintéticos [por ej., Referencias 58, 59], proteínas de choque térmico [por ej., Referencia 60], proteínas de la tos ferina [por ej., Referencias 61, 62], proteína D de *H. influenzae* [por ej., Referencia 63], toxina A o B de *C. difficile* [por ej., Referencia 64], etc. Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares de ambos serogrupos A y C, se prefiere que la relación (p/p) sacárido MenA:sacárido MenC sea mayor que 1 (por ej., 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor). Sacáridos de diferentes serogrupos de *N. meningitidis* pueden conjugarse a las mismas o diferentes proteínas transportadoras. Puede utilizarse cualquier reacción de conjugación adecuada con cualquier conector adecuado, cuando sea necesario. Los antígenos proteicos tóxicos pueden detoxificarse cuando sea necesario (por ej., detoxificación de toxina de tos ferina por medios químicos [Referencia 30]. Véase: Solicitud de Patente Internacional 99/24578 [Referencia 1]; Solicitud de Patente Internacional WO99/36544 [Referencia 2]; Solicitud de Patente Internacional WO99/57280 [Referencia 3]; Solicitud de Patente Internacional WO00/22430 [Referencia 4]; Tettelin *et al.*, (2000) *Science* 287:1809-1815 [Referencia 5]; Solicitud de Patente Internacional WO96/29412 [Referencia 6]; Pizza *et al.* (2000) *Science* 287:1816-1820 [Referencia 7]; Solicitud de Patente Internacional WO01/52885 [Referencia 8]; Bjune *et al.* (1991) *Lancet* 338 (8775):1093-1096 [Referencia 9]; Fukasawa *et al.* (1990) *Vaccine* 17:2951-2958 [Referencia 10]; Rosenqvist *et al.* (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333 [Referencia 11]; Costantino *et al.* (1992) *Vaccine* 10:691-698 [Referencia 12]; Costantino *et al.* (1999) *Vaccine* 17:1251-1263 [Referencia 13]; Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332 [Referencia 14]; Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47: 269-285, v [Referencia 15]; Jedrzejas (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207 [Referencia 16]; Solicitud de Patente Internacional presentada el 3 de julio de 2001 que reivindica la prioridad de GB-0016363.4 [Referencia 17]; Kalman *et al.*, (1999) *Nature Genetics* 21:385-389 [Referencia 18]; Road *et al.* (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406 [Referencia 19]; Shirai *et al.* (2000) *J. Infect. Dis.* 181 (Suppl 3):S524-S527 [Referencia 20]; Solicitud de Patente Internacional WO99/27105 [Referencia 21]; Solicitud de Patente Internacional WO00/27994 [Referencia 22]; Solicitud de Patente Internacional WO00/37494 [Referencia 23]; Solicitud de Patente Internacional WO99/28475 [Referencia 24]; Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188 [Referencia 25]; Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326 [Referencia 26]; Gerlich *et al.* (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80 [Referencia 27]; Hsu *et al.* (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915 [Referencia 28]; Gustafsson *et al.* (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355 [Referencia 29]; Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9: 232-238 [Referencia 30]; Vaccines (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0 [Referencia 31]; Del Giudice *et al.* (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70 [Referencia 32]; Solicitud de Patente Internacional WO93/18150 [Referencia 33]; Solicitud de Patente Internacional WO99/53310 [Referencia 34]; Solicitud de Patente Internacional WO98/04702 [Referencia 35]; Ross *et al.* (2001) *Vaccine* 19:4135-4142 [Referencia 36]; Sutter *et al.* (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308 [Referencia 37]; Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126 [Referencia 38]; Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6 [Referencia 39]; *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 ENE 16;47(1):12, 19 [Referencia 40]; McMichael (2000) *Vaccine* 19 Supl 1:S101-107 [Referencia 41]; Schuchat (1999) *Lancet* 353 (9146):51-6 [Referencia 42]; Solicitud de Patente de GB 0026333.5, 0028727.6 & 0105640.7 [Referencia 43]; Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii [Referencia 44]; Ferretti *et al.* (2001) *PNAS USA* 98:4658-4663 [Referencia 45]; Kuroda *et al.* (2001) *Lancet* 357 (9264):1225-1240; véanse también las páginas 1218-1219 [Referencia 46]; Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251): 195-196 [Referencia 47]; Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36 [Referencia 48]; Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physician London* 34:163-168 [Referencia 49]; Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii [Referencia 50]; Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567 [Referencia 51]; Patente Europea 0477508 [Referencia 52]; Patente de los Estados Unidos Núm. 5306492 [Referencia 53]; Solicitud de Patente Internacional WO98/42721 [Referencia 54]; *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse *et al.*) ISBN 3805549326, en particular vol. 10:48-114 [Referencia 55]; Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 & 012342335X [Referencia 56]; Solicitud de Patente Europea 0372501 [Referencia 57]; Solicitud de Patente Europea 0378881 [Referencia 58]; Solicitud de Patente Europea 0427347 [Referencia 59]; Solicitud de Patente Internacional WO93/17712 [Referencia 60]; Solicitud de Patente Internacional WO98/58668 [Referencia 61]; Solicitud de Patente Europea 0471177 [Referencia 62]; Solicitud de Patente Internacional WO00/56360 [Referencia 63]; Solicitud de Patente Internacional WO00/61761 [Referencia 64].

3. Componentes Suplementarios

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención incluyen en forma opcional una variedad de componentes suplementarios.

5 Tales componentes suplementarios incluyen: (a) productos farmacéuticos tales como antibióticos y agentes antivirales, fármacos antiinflamatorios no esteroides, analgésicos, vasodilatadores, fármacos cardiovasculares, psicotrópicos, neurolépticos, antidepresivos, fármacos antiparkinsonianos, bloqueadores beta, bloqueadores de canales de calcio, inhibidores de la bradiquinina, inhibidores de ACE, vasodilatadores, inhibidores de la prolactina, esteroides, antagonistas de hormonas, antihistamínicos, antagonistas de la serotonina, heparina, agentes quimioterapéuticos, antineoplásicos y factores de crecimiento, que incluyen, pero sin limitación, PDGF, EGF, KGF, IGF-1 e IGF-2, FGF, 10 (b) hormonas, que incluyen hormonas peptídicas tales como insulina, proinsulina, hormona de crecimiento, GHRH, LHRH, EGF, somatostatina, SNX-111, BNP, insulintropina, ANP, FSH, LH, PSH y hCG, hormonas esteroides gonadales (andrógenos, estrógenos y progesterona), hormona estimulante de la tiroides, inhibina, colecistoquinina, ACTH, 15 CRF, dinorfinas, endorfinas, endotelina, fragmentos de fibronectina, galanina, gastrina, insulintropina, glucagón, fragmentos de proteínas de unión a GTP, guanilina, las leucoquininas, manganina, mastoparinas, dermaseptina, sistemina, neuromedinas, neurotensina, pancreastatina, polipéptido pancreático; sustancia P, secretina, timosina y similares, (c) 20 enzimas, (d) mediadores de la transcripción o traducción, (e) intermediarios en vías metabólicas, (f) inmunomoduladores, tales como cualquiera de las diversas citocinas que incluyen interleuquina-1, interleuquina-2, interleuquina-3, interleuquina-4 e interferón gamma, y (g) adyuvantes inmunológicos suplementarios tales como los descritos a continuación.

Tales componentes suplementarios pueden ser, por ejemplo, adsorbidos sobre la superficie de las micropartículas, estar atrapados dentro de las micropartículas, estar disueltos o dispersos en solución no estando unidos a las micropartículas, ser adsorbidos o estar atrapados dentro de otro grupo de micropartículas, etc.

Los adyuvantes inmunológicos suplementarios pueden utilizarse para aumentar la efectividad de las composiciones inmunogénicas. Por ejemplo, tales adyuvantes inmunológicos pueden administrarse en forma concurrente con las composiciones inmunogénicas de la presente invención, por ej., en la misma composición o en composiciones separadas. En forma alternativa, tales adyuvantes pueden administrarse antes o después de las composiciones inmunogénicas de la presente invención.

Los adyuvantes inmunológicos suplementarios incluyen, pero sin limitación: (1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc., aunque se destaca que las sales de aluminio están asociadas con reacciones locales discutidas con anterioridad y, por lo tanto, son menos preferidas en algunas realizaciones de la invención; (2) otras formulaciones de emulsión aceite-en-agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (véase más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo (a) MF59 (Publicación Internacional Núm. WO90/14837; Cap. 10 en Vaccine design: the subunit adjuvant approach, Eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995), que contiene Escualeno 0,5%, Tween 80 0,5%, y Span 85 0,5% (que opcionalmente contiene diversas cantidades de MTP-PE (véase a continuación), aunque no se requiere) formulado en partículas submicrónicas utilizando un microfluidizador tal como un microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene Escualeno 10%, Tween 80 0,4%, polímero L121 bloqueado por plurónico 5%, y thr-MDP (véase a continuación), ya sea microfluidizado en una emulsión submicrónica o agitado por vórtex para generar una emulsión con un tamaño de partícula mayor, y (c) un sistema adyuvante Ribij (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene Escualeno 2%, Tween 80 0,2% y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforilípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y un esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (DetoxJ) (para una mayor discusión de emulsiones submicrónicas aceite-en-agua adecuadas para utilizar en la presente, véase la Solicitud de Patente del solicitante No. 09/015736, presentada el 29 de junio de 1998); (3) pueden utilizarse adyuvantes de saponina, tales como Quil A, o QS21 (por ej., StimulonJ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA)) o partículas generadas a partir de los mismos tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes), pudiendo IosISCOM estar desprovistos de detergente adicional, por ej., WO00/07621, (4) Adyuvante Completo de Freund (CFA) y Adyuvante Incompleto de Freund (IFA); (5) citocinas, tales como interleuquinas (por ej., IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (WO99144636), etc.), interferones (por ej., interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (6) fosfolípidos adyuvantes, que incluyen lipopolisacáridos y adyuvantes de fosfato liposacáridos, por ejemplo, monofosforilípido A (MPL), MPL 3-0-desacilado (3dMPL), por ej. GB-2220221, EP-A-0689454, opcionalmente en ausencia sustancial de alumbre cuando se utiliza con sacáridos neumocócicos, por ej. WO00/56358; así como compuestos de tipo fosfato de aminoalquil glucosamina tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 6355257; (7) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones aceite-en-agua, por ej. EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (8) oligonucleótidos que comprenden motivos CpG (Roman *et al.*, Nat. Med., 1997, 3, 849-854; Weiner *et al.*, PNAS USA, 1997, 94, 10833-10837; Davis *et al.*, J. Immunol. 1988, 160, 870-876; Chu *et al.*, J. Exp. Med., 1997, 186, 1623-1631; Lipford *et al.*, Eur. J. Immunol. 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu *et al.*, Vaccine, 1988, 16, 1216-1224, Krieg *et al.*, Nature, 1995, 374, 546-549; Klinman *et al.*, PNAS USA, 1996, 93, 2879-2883; Bailas *et al.*, J. Immunol., 1996, 157, 1840-1845; Cowdery *et al.*, J. Immunol., 1996, 156, 4570-4575; Halpern *et al.*, Cell. Immunol., 1996, 167, 72-78; Yamamoto *et al.*, Jpn. J. Cancer Res., 1988, 79, 866-873; Stacey *et al.*, J. Immunol., 1996, 157, 2116-2122; Messina *et al.*, J. Immunol., 1991, 147, 1759-1764; Yi *et al.*, J. Immunol., 1996, 157, 4918-4925; Yi *et al.*, J. Immunol., 1996, 157, 5394-5402; Yi *et al.*, J. Immunol., 1998, 160, 4755-4761; e Yi *et al.*, J. Immunol., 1998, 160, 5898-5906; Solicitudes de Patente Internacional WO96/02555,

WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 y WO98/52581), es decir que contienen al menos un dinucleótido CG (un nucleótido de citosina seguido por un nucleótido de guanosina), utilizándose 5-metilcitosina en forma opcional en lugar de citosina; (9) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno, por ej. WO99/52549; (10) un tensioactivo de éster de polioxietileno-sorbitán en combinación con un octoxinol (WO01/21207) o un tensioactivo de polioxietileno alquil éter o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (WO01/21152); (11) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulante (por ej., un oligonucleótido CpG) (WO00/62800); (12) un inmunoestimulante y una partícula de una sal metálica, por ej., WO00/23105; (13) una saponina y una emulsión aceite-en-agua, por ej. WO99/11241; (14) una saponina (por ej., QS21) + 3dM-PL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide), por ej. WO98/57659; (15) mutantes detoxificadas de una toxina bacteriana ADP-ribosilante tal como una toxina del cólera (CT), una toxina de tos ferina (PT) o una toxina de *E. coli* lábil al calor (LT), en particular LT-K63 (en la que la lisina sustituye al aminoácido de tipo salvaje en la posición 63), LT-R72 (en la que la arginina sustituye al aminoácido de tipo salvaje en la posición 72), CT-S109 (en la que la serina sustituye al aminoácido de tipo salvaje en la posición 109), y PT-K9/G129 (en la que la lisina sustituye al aminoácido de tipo salvaje en la posición 9 y la glicina sustituye en la posición 129) (véase, por ej., Publicación Internacional No. WO93/13202 y WO92/19265); (16) 4-fosfatos de aminoalquil glucosaminida (AGP), véase, por ej., Johnson, D.A. *et al.*; Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999 Ago 2; 9 (15):2273-8, (17) imidazoquinolinas tales como imiquimod (R-837) y resiquimod (R-848), véase, por ej., Vasilakos, J.P. *et al.*; Cell. Immunol. 2000 Ago 25; 204(1):64-74, (18) miméticos de lipopolisacáridos (que incluyen miméticos de monofosforilípido A), tales como fosfolípidos no sacáridos (por ej., análogos de lípido A simplificados que carecen de un disacárido) descritos en Hawkins, L.D. *et al.*; J. Pharmacol. Exp. Ther., febrero de 2002; 300(2):655-61 y la Patente de los Estados Unidos No. 6290973; (19) adyuvantes que comprenden ARN bicatenario natural o sintético ("ARNds"), que en general se prepara a partir de pares de bases de ácido riboguanílico-ácido ribocitidílico intermitente ([rG-rC]) y de ácido riboadenílico-ácido polirribouridílico ([rA-rU]); para mayor información, véase, por ej., el documento PCT/US02/30423 del solicitante; y (20) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para aumentar la efectividad de la composición.

Los péptidos de muramilo incluyen, pero sin limitación, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicerol-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

Por ejemplos adicionales de adyuvantes, véase Vaccine Design, The Subunit and the Adjuvant Approach, Powell, M.F. y Newman, M.J., eds., Plenum Press, 1995).

4. Formulación y Administración

En general, las composiciones de la presente invención incluirán uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, pueden utilizarse vehículos tales como agua, solución salina, glicerol, polietilenglicol, ácido hialurónico, etanol, etc. Pueden estar presentes otros excipientes, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tampón biológicas, y similares. Un tampón biológico puede ser prácticamente cualquier solución farmacéuticamente aceptable que provea la formulación con el pH deseado, es decir un pH en el intervalo fisiológico. Los ejemplos incluyen solución salina, diversos tampones que incluyen tampones de fosfato, tampones de borato, tampones de succinato y tampones de histidina, así como combinaciones de tampón de solución salina, que incluyen solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Glic, solución salina tamponada de Inc. y similares.

Dependiendo de la forma de dosificación final, pueden introducirse otros excipientes conocidos en la técnica, que incluyen aglutinantes, desintegrantes, materiales para relleno (diluyentes), lubricantes, deslizantes (mejoradores de la fluidez), auxiliares de compresión, colorantes, edulcorantes, conservantes, agentes de suspensión/dispersantes, formadores de películas/revestimientos, saborizantes y tintas de impresión.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse por vía parenteral, por ej. por inyección (que puede llevarse a cabo sin aguja). Las composiciones pueden inyectarse en forma subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intradérmica o intramuscular, por ejemplo. Otros modos de administración incluyen administración nasal, a través de mucosas, intraocular, rectal, vaginal, oral y pulmonar, supositorios, y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas.

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para una administración dirigida a un sitio específico. Por ejemplo, la administración intravenosa de las composiciones puede utilizarse para acceder al pulmón, hígado, bazo, circulación sanguínea o médula ósea.

El tratamiento puede llevarse a cabo de acuerdo con un cronograma de dosis única o un cronograma de dosis múltiples. Un cronograma de dosis múltiples es aquel en el que puede darse un curso primario de administración, seguido por una o más dosis adicionales dadas a intervalos de tiempo posteriores, seleccionados para mantener y/o reforzar la respuesta terapéutica. El régimen de dosificación también será determinado, al menos en parte, por la necesidad del sujeto y dependerá del criterio del profesional a cargo.

De acuerdo con lo indicado con anterioridad, la presente invención esta dirigida a composiciones farmacéuticas inmunogénicas, que comprenden micropartículas poliméricas biodegradables que tienen adsorbidas a las mismas antígenos que contienen toxoides y/o polisacáridos. Como también se indicó, las composiciones son aplicables a un amplio espectro de vacunas, que incluyen vacunas dirigidas a un amplio grupo de agentes patógenos o tumores.

ES 2 328 697 T3

Por lo tanto, las composiciones beneficiosas incluyen aquellas que contienen los siguientes antígenos, ya sea en forma separada o en diversas combinaciones: antígeno del tétanos (por ej., antígeno toxoide del tétanos), antígeno de la difteria (por ej., antígeno toxoide de la difteria), antígenos de la hepatitis (que incluyen antígenos de HAV, HBV, HCV, HDV, HEV y HGV), antígenos del virus de la varicela (varicela), antígenos del sarampión, antígenos de las paperas, antígenos de la rubéola, antígenos de la gripe, antígenos meningocócicos (que incluyen antígenos de la meningitis A, meningitis B, meningitis C, meningitis W y meningitis Y), antígenos de la difteria, antígenos de la tos ferina, antígenos del tétanos, antígenos de Hib y antígenos neumocócicos.

Muchos de tales antígenos se encuentran actualmente disponibles, por ejemplo: (A) se dispone de antígenos de la hepatitis B con ADN Recombinante (HbsAg), que se preparan por introducción de una porción del genoma HBV en levadura. (B) se dispone de antígenos del virus de la varicela zoster, normalmente preparados a partir de virus de la varicela liofilizado, vivo y atenuado, denominado cepa Oka. (C) Se dispone de antígenos del virus de la polio, correspondientes a virus de la polio ya sea inactivados o vivos, prefiriéndose típicamente los antígenos del virus de la polio inactivados (IPV). Típicamente, los antígenos IPV son productos inactivados con formalina, que se producen sobre las células, por ej. células Vero o células diploides humanas, y normalmente corresponden a tres tipos de virus salvajes de la polio. (D) Con frecuencia, se preparan antígenos del virus del sarampión vivo a partir de cepas Edmonston B que se han atenuado aún más a partir de la cepa original (por ej., cepas Moraten, Edmonston-Zagreb, Schwarz y Connaught). Normalmente, se preparan antígenos del sarampión en cultivos de fibroblastos de pollo o en fibroblastos humanos. (E) Típicamente, los antígenos del virus de las paperas son antígenos de virus vivos, atenuados. Con frecuencia, se preparan a partir de la cepa del virus atenuado Jeryl Lynn y se cultivan en un cultivo celular de embriones de pollo. (F) Típicamente, los antígenos del virus de la rubéola también son antígenos de virus vivos, atenuados. Un antígeno del virus de la rubéola actualmente conocido corresponde a la cepa del virus vivo atenuado RA 27/3, y se prepara en cultivo de células diploides humanas. (G) Con frecuencia, el antígeno de la gripe se prepara a partir de virus de la gripe propagados en embriones de pollo. El virus se inactiva, purifica y trata con un disolvente orgánico para eliminar glicoproteínas de superficie. Normalmente, los antígenos se seleccionan de dos cepas de la gripe A y una cepa de la gripe B. Típicamente, las cepas de los virus seleccionados para la inclusión en la vacuna contra la gripe se revisan una vez al año para asegurarse que incluyan los antígenos sobre los que se espera que provean la mejor protección durante el invierno siguiente. Los antígenos de la gripe también incluyen antígenos de virus vivos atenuados y antígenos obtenidos a partir de cultivos tisulares. (H) Los antígenos meningocócicos disponibles incluyen antígenos de polisacáridos capsulares purificados (Men-Ps) y antígenos conjugados proteína-polisacárido (Men-conjugado), que incluyen antígeno en el que se conjuga el C-polisacárido O-acetilado a la proteína CRM₁₉₇ (Material de Reacción Cruzada 197), y antígenos en los que se conjuga el C-polisacárido des-O-acetilado a toxoides del tétanos. (I) Los antígenos de la tos ferina disponibles incluyen antígenos de tos ferina de células enteras y acelulares. Los antígenos acelulares se han desarrollado para reducir la frecuencia y severidad de las reacciones adversas tanto locales como sistémicas asociadas con antígenos de tos ferina de células enteras. Los antígenos celulares de tos ferina incluyen, por ejemplo, toxoide de tos ferina, hemaglutinina filamentosa y pertaotina. (J) Los antígenos de Hib disponibles incluyen antígenos de polisacárido y antígenos conjugados polisacárido-proteína, que pueden tener la ventaja de producir mayores respuestas inmunes en bebés y niños en comparación con un antígeno de polisacárido purificado. Los antígenos conjugados de Hib disponibles difieren de varias maneras, que incluyen el tamaño de la proteína y el polisacárido. Los ejemplos incluyen antígenos de HbOC, PRY-OMP, PRTT y PRP-D. (K) Típicamente, los antígenos neumocócicos se encuentran disponibles como antígenos de polisacáridos o como antígenos conjugados. Una vacuna neumocócica de polisacárido disponible contiene antígenos de polisacáridos capsulares de cada uno de los 23 tipos de neumococos (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F, nomenclatura danesa). Una vacuna neumocócica conjugada (PCV) contiene polisacáridos purificados de los antígenos capsulares de siete serotipos de *S. pneumoniae* (serotipos 4, 9V, 14, 18C, 19F, 23F y 6B), individualmente conjugados a CRM₁₉₇.

Los ejemplos de combinaciones de antígenos para utilizar según lo desvelado en la presente incluyen todas las combinaciones posibles de los anteriores, por ejemplo todas las combinaciones posibles de DT, DPT, Hib, Hep, PV, Men, Pnu, Var y MMR, algunos ejemplos específicos de los cuales se incluyen a continuación:

DT
DT-Hep
DT-Men
DT-Hep-Men
DPT
DPT-Hib
DPT-Hep
DPT-PV
DPT-Pnu

ES 2 328 697 T3

DPT-Men
DPT-MMR
5 DPT-Var

DPT-Hib-Hep
10 DPT-Hib-PV
DPT-Hib-Pnu
DPT-Hib-Var DPT-Hib-MMR
15 DPT-Hep-PV
DPT-Hep-Pnu
20 DPT-Hep-Var
DPT-Hep-MMR
DPT-PV-Pnu
25 DPT-PV-Var
DPT-PV-MMR
30 DPT-Men-Hib
DPT-Men-Hep
DPT-Men-PV
35 DPT-Men-Pnu
DPT-Men-Var
40 DPT-Men-MMR
DPT-Var-MMR
DPT-Var-Pnu
45 DPT-MMR-Pnu

DPT-Hib-Hep-PV
50 DPT-Hib-Hep-Pnu
DPT-Hib-Hep-MMR
55 DPT-Hib-Hep-Var
DPT-Hib-PV-Pnu
DPT-Hep-PV-Pnu
60 DPT-Hib-PV-MMR
DPT-Hib-PV-Var
65 DPT-Men-Hib-Hep
DPT-Men-Hib-PV

ES 2 328 697 T3

- DPT-Men-Hib-Pnu
- DPT-Men-Hib-MMR
- 5 DPT-Men-Hib-Var
- DPT-Men-Hep-PV
- 10 DPT-Men-Hep-Pnu
- DPT-Men-Hep-MMR
- DPT-Men-Hep-Var
- 15 DPT-Men-PV-Pnu
- DPT-Men-PV-MMR
- DPT-Men-PV-Var
- 20 DPT-Hib-Var-Pnu
- DPT-Hib-Var-MMR
- 25 DPT-Hep-Var-PV
- DPT-Hep-Var-Pnu
- DPT-Hep-Var-MMR
- 30 DPT-Men-Var-Pnu
- DPT-Men-Var-MMR
- 35 DPT-PV-Var-Pnu
- DPT-PV-Var-MMR
- DPT-PnuVar-MMR
- 40 DPT-Hib-Pnu-MMR
- DPT-Hep-PV-MMR
- 45 DPT-Hep-Pnu-MMR
- DPT-Men-Pnu-MMR
- DPT-PV-Pnu-MMR
- 50 DPT-Hib-Hep-PV-Pnu
- DPT-Hep-PV-Pnu-Men
- 55 DPT-Hib-PV-Pnu-Men
- DPT-Hib-Hep-Pnu-Men
- 60 DPT-Hib-Hep-PV-Men
- DPT-Hib-Hep-PV-Pnu-Men
- 65 DPT-Hib-Hep-PV-Pnu-Men-Var-MMR,

en los que DT=antígeno toxoide de la difteria y antígeno toxoide del tétanos; DTP=antígeno toxoide de la difteria, antígeno toxoide del tétanos, y antígeno de la tos ferina (que incluye antígenos de la tos ferina de células enteras y

ES 2 328 697 T3

acelulares, típicamente acelulares); *Hib*=antígeno de *Haemophilus influenzae* tipo b (que incluye antígenos de polisacáridos y conjugados); *Hep*=antígeno de la hepatitis (que incluye antígeno de HAV, antígeno de HBV, antígeno de HCV, antígeno de HDV, antígeno de HEV, antígeno de HGV y combinaciones de los mismos, por ej., antígeno HAV-antígeno HBV); *PV*= antígeno de polio (que incluye antígenos inactivados o vivos, por ej., antígenos inactivados de tres cepas de polio); *Men*=antígeno meningocócico (*Neisseria meningitidis*) (que incluye antígenos conjugados y de polisacáridos, típicamente antígenos conjugados, e incluye antígenos de Men A, B, C, W, Y y combinaciones, por ej., antígenos Men A,C, antígenos Men A,B,C, antígenos Men A,C,W,Y, y antígenos Men A,B,C,W,Y); *Pnu*=antígenos neumocócicos (*Streptococcus pneumoniae*) (que incluyen antígenos conjugados y de polisacáridos, típicamente antígenos conjugados); *Var*=antígeno del virus de la varicela zoster (por ejemplo, virus de la varicela vivo, atenuado);
10 *MMR*=antígenos del sarampión, paperas y rubéola (por ejemplo, antígenos de los virus del sarampión, paperas y rubéola vivos, atenuados).

Se dispone de cronogramas recomendados para la administración de vacunas que contienen diversos antígenos mencionados con anterioridad. Como ejemplo específico, el U.S. Department of Health and Human Services, Centers
15 for Disease Control and Prevention, National Immunization Program (Departamento de Salud y Servicios Humanos, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Programa Nacional de Vacunación), ha publicado sus cronogramas de vacunación recomendados para niños y adolescentes. Los cronogramas actuales para los Estados Unidos en 2003 se ilustran, en parte, en la Fig. 1 y se resumen a continuación:

Los cronogramas a seguir están basados en el Recommended Childhood and Adolescent Immunization Schedule-
20 United States 2003 (Cronograma de Vacunación Recomendado para Niños y Adolescentes de los Estados Unidos de 2003) del U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National immunization Program (Departamento de Salud y Servicios Humanos, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Programa Nacional de Vacunación).

Hepatitis B. (A) Primera Dosis. Desde el nacimiento a los dos meses de edad. Se recomienda que los niños cuyas
25 madres sean positivas para el antígeno de superficie de la hepatitis B o cuyo estatus del antígeno de superficie de la hepatitis B sea desconocido, reciban esta dosis dentro de las primeras 12 horas de vida. Se recomienda que todos los bebés reciban la primera dosis de la vacuna contra la hepatitis B poco después de nacer y antes de abandonar el hospital; la primera dosis también puede administrarse a los dos meses de edad si la madre del bebé es negativa para el antígeno
30 de superficie de la hepatitis B. Actualmente, sólo se recomienda la vacuna monovalente contra la hepatitis B para la dosis en el nacimiento. Puede utilizarse una vacuna monovalente o combinada que contenga Hep B para completar la serie; si se utiliza la vacuna combinada, pueden administrarse cuatro dosis de vacuna. Se recomienda que los bebés nacidos de madres positivas para el antígeno de superficie de la hepatitis B, reciban la vacuna contra la hepatitis B y
35 0,5 mililitros de inmunoglobulina de la hepatitis B (H BIG) dentro de las 12 horas posteriores al nacimiento en sitios separados. Se recomienda que los bebés nacidos de madres cuyos estatus del antígeno de superficie de la hepatitis B sean desconocidos, reciban la primera dosis de la serie de vacunas contra la hepatitis B dentro de las 12 horas de vida. Se recomienda extraer una muestra de sangre materna al momento del parto para determinar el estatus del antígeno de superficie de la hepatitis B de la madre; si el resultado de la prueba es positivo, se recomienda que el bebé reciba
40 H BIG lo más pronto posible (no más de una semana después). (B) Segunda Dosis. Uno a cuatro meses de edad, pero al menos 4 semanas después de la primera dosis. Se recomienda que la segunda dosis se administre al menos 4 semanas después de la primera dosis. No se recomienda la administración de vacunas que contengan Hib antes de las 6 semanas de edad. Para los bebés nacidos de madres positivas para el antígeno de superficie de la hepatitis B, se recomienda que la segunda dosis se administre a los 1-2 meses de edad y que la serie de vacunaciones (tercera o
45 cuarta dosis) se complete a los 6 meses de edad. (c) Tercera Dosis: seis a dieciocho meses de edad, pero al menos 16 semanas después de la primera dosis y al menos 8 semanas después de la segunda dosis. En general, se recomienda que la última dosis en la serie de vacunaciones (tercera o cuarta dosis) no se administre antes de los 6 meses de edad. Sin embargo, para los bebés nacidos de madres positivas para el antígeno de superficie de la hepatitis B, se recomienda que la serie de vacunaciones se complete (tercera o cuarta dosis) a los 6 meses de edad. (D) Cronograma adicional
50 para niños desde los 4 meses hasta los 6 años de edad. Se recomienda que todos los niños y adolescentes que no hayan sido inmunizados contra la hepatitis B comiencen la serie de vacunaciones contra la Hep B durante cualquier visita. Se recomienda a los prestadores de salud llevar a cabo esfuerzos especiales para inmunizar a los niños que hayan nacido en, o cuyos padres hayan nacido en, áreas del mundo en las que la infección por el virus de la hepatitis B sea moderada o altamente endémica. Intervalo Mínimo entre la Dosis Uno y la Dosis Dos: 4 semanas. Intervalo
55 Mínimo entre la Dosis Dos y la Dosis Tres: 8 semanas (y 16 semanas después de la primera dosis). (E) Cronograma adicional para niños desde los 7 hasta los 18 años de edad. Intervalo Mínimo entre la Dosis Uno y la Dosis Dos: 4 semanas. Intervalo Mínimo entre la Dosis Dos y la Dosis Tres: 8 semanas (y 16 semanas después de la primera dosis).

Difteria, Tétanos, Tos Ferina (DTaP). (A) Primera Dosis: Dos meses. (B) Segunda Dosis: Cuatro meses. (C) Tercera dosis: Seis meses. (D) Cuarta Dosis: 15 a 18 meses. La cuarta dosis de DTaP puede administrarse tan pronto
60 como a los 12 meses de edad, con la condición de que hayan transcurrido 6 meses desde la tercera dosis, y es poco probable que el niño regrese a los 15 a 18 meses de edad. (E) Quinta Dosis: 4 a 6 años. (F) Cronograma adicional para niños desde los 4 meses hasta los 6 años de edad. Intervalo Mínimo entre la Dosis Uno y la Dosis Dos: 4 semanas.
65 Intervalo Mínimo entre la Dosis Dos y la Dosis Tres: 4 semanas. Intervalo Mínimo entre la Dosis Tres y la Dosis Cuatro: 6 meses. Intervalo Mínimo entre la Dosis Cuatro y la Dosis Cinco: 6 meses. La quinta dosis no es necesaria si se cuarto dosis se administró luego del cuarto cumpleaños.

ES 2 328 697 T3

Tétanos y Difteria. (A) Se recomienda a los 11 a 12 años de edad, si al menos han transcurrido 5 años desde la última dosis de la vacuna que contiene toxoides del tétanos y de la difteria. Se recomiendan refuerzos de Td de rutina posteriores cada 10 años. (B) Cronograma adicional para niños desde los 7 hasta los 18 años de edad. Intervalo Mínimo entre la Dosis Uno y la Dosis Dos: 4 semanas. Intervalo Mínimo entre la Dosis Dos y la Dosis Tres: 6 meses.
5 Intervalo Mínimo entre la Dosis Tres y la Dosis de Refuerzo: 6 meses, si la primera dosis se administró a una edad menor que los 12 meses y si la edad actual es menor que los 11 años; 5 años, si la primera dosis se administró a los 12 meses de edad o más y si la tercera dosis se administró a una edad menor a los 7 años y si la edad actual es 11 años o más; 10 años, si la tercera dosis se administró a los 7 años de edad o más. (Nota: para los niños con edades desde los 7 a los 10 años, el intervalo entre la tercera dosis y la dosis de refuerzo se determina por la edad en que se administró la primera dosis. Para los adolescentes desde los 11 a 18 años de edad, el intervalo se determina por la edad en que se administró la tercera dosis).

Haemophilus Influenzae de Tipo b. (A) Primera Dosis: Dos meses. (B) Segunda Dosis: Cuatro meses. (C) Tercera Dosis: Seis meses. Si se administra PRP-OMP a los 2 y 4 meses de edad, no se requiere una dosis a los 6 meses de edad. (D) Cuarta Dosis: 12 a 15 meses. (E) Cronograma adicional para niños desde los 4 meses hasta los 6 años de edad. (Nota: La vacuna en general no se recomienda para niños de 5 años de edad o mayores). Intervalos Mínimos entre la Dosis Uno y la Dosis Dos: 4 semanas, si la primera dosis se administró a una edad menor que los 12 meses de edad; 8 semanas (como dosis final), si la primera dosis se administró a los 12 a 14 meses de edad; si la primera dosis se administró a los 15 meses de edad o más, entonces no se recomiendan más dosis. Intervalos Mínimos entre la Dosis Dos y la Dosis Tres: 4 semanas, si la edad actual es menor que los 12 meses; 8 semanas (como dosis final), si la segunda dosis se administró a una edad menor que los 15 meses y si la edad actual es de 12 meses o más; si la segunda dosis se administró a una edad de 15 meses o más, no se necesitan más dosis. (Si la edad actual es menor que los 12 meses y las primeras 2 dosis fueron PRP-OMP, se recomienda que la tercera dosis y la final se administren a una edad de 12 a 15 meses y al menos 8 semanas después de la segunda dosis). Intervalos Mínimos entre la Dosis Tres y la Dosis Cuatro: 8 semanas (como dosis final). Esta dosis sólo se recomienda para niños desde los 12 meses hasta los 5 años de edad que hayan recibido 3 dosis antes de los 12 meses de edad.

Polio Inactivada. (A) Primera Dosis: Dos meses. (B) Segunda Dosis: Cuatro meses. (C) Tercera Dosis: 6 a 18 meses. (D) Cuarta Dosis: 4 a 6 años. (E) Intervalo Mínimo entre la Dosis Uno y la Dosis Dos: 4 semanas. Intervalo Mínimo entre la Dosis Dos y la Dosis Tres: 4 semanas. Intervalo Mínimo entre la Dosis Tres y la Dosis Cuatro: 4 semanas. Para los niños que hayan recibido una serie toda de IPV o toda de OPV, no es necesaria una cuarta dosis si la cuarta dosis se administró a los 4 años de edad o más. Si la OPV e IPV se administraron como parte de una serie, se recomienda que se administre un total de 4 dosis, sin reparar en la edad actual del niño. (D) Cronograma adicional para niños desde los 7 hasta los 18 años. (Nota: esta vacuna en general no recomienda para personas de 18 años de edad o mayores). Intervalo Mínimo entre la Dosis Uno y la Dosis Dos: 4 semanas. Intervalo Mínimo entre la Dosis Dos y la Dosis Tres: 4 semanas.

Sarampión, Paperas, Rubéola. (A) Primera Dosis: 12 a 15 meses. (B) Segunda Dosis: 4 a 6 años. La segunda dosis de MMR se recomienda rutinariamente a los 4 a 6 años de edad, pero puede administrarse durante cualquier visita, con la condición de que hayan transcurrido al menos 4 semanas desde la primera dosis y de que ambas dosis se administren al comenzar o después de los 12 meses de edad. Se recomienda que aquellos que no hayan recibido previamente la segunda dosis completen el cronograma en la visita de los 11 a 12 años de edad. (C) Cronograma adicional para niños desde los 4 meses hasta los 6 años de edad. Edad mínima: 12 meses. Intervalo Mínimo entre la Dosis Uno y la Dosis Dos: 4 semanas. Se recomienda que la segunda dosis de MMR se administre rutinariamente a los 4 a 6 años de edad, pero, si se desea, puede administrarse antes. (D) Cronograma adicional para niños desde los 7 hasta los 18 años de edad. Intervalo Mínimo entre la Dosis Uno y la Dosis Dos: 4 semanas.

Varicela. 12 a 18 meses. La vacuna contra la varicela se recomienda en cualquier visita a los 12 meses de edad, o después de esa edad, para niños susceptibles (es decir, aquellos que carecen de antecedentes confiables en relación con la varicela). Se recomienda que las personas susceptibles de 13 años de edad o más, reciban 2 dosis, administradas al menos con 4 semanas de diferencia. Cronograma adicional para niños desde los 7 hasta los 18 años. Intervalo Mínimo entre la Dosis Uno y la Dosis Dos: 4 semanas.

Vacuna Neumocócica Conjugada. La vacuna neumocócica conjugada heptavalente (PCV) se recomienda para todos los niños desde los 2 a los 23 meses de edad y para ciertos niños desde los 24 a los 59 meses. (A) Primera Dosis: Dos meses. (B) Segunda Dosis: Cuatro meses. (C) Tercera Dosis: Seis meses. (D) Cuarta Dosis: 12 a 15 meses. (E) Cronograma adicional para niños desde los 4 meses hasta los 6 años de edad. (Nota: esta vacuna en general no se recomienda para niños de 5 años de edad o mayores). Intervalos Mínimos entre la Dosis Uno y la Dosis Dos: si la primera dosis se administró a una edad menor que 12 meses y si la edad actual es menor que 24 meses, entonces 4 semanas; si la primera dosis se administró a una edad de 12 meses o más o si la edad actual es de 24 a 59 meses, entonces 8 semanas (como dosis final); si la primera dosis se administró a una edad de 24 meses o más, entonces no se requieren más dosis para los niños sanos. Intervalos Mínimos entre la Dosis Dos y la Dosis Tres: si la segunda dosis se administró a una edad menor que 12 meses, entonces 4 semanas; si la segunda dosis se administró a una edad de 12 meses o más, entonces 8 semanas (como dosis final); si la segunda dosis se administró a una edad de 24 meses o más, entonces no se requieren más dosis para los niños sanos. Intervalos Mínimos entre la Dosis Tres y la Dosis Cuatro: 8 semanas (como dosis final). Esta dosis sólo es necesaria para niños desde los 12 meses hasta los 5 años de edad que hayan recibido 3 dosis antes de los 12 meses de edad.

ES 2 328 697 T3

Vacuna Neumocócica de Polisacáridos (PPV). Se recomienda además de la PCV para ciertos grupos de alto riesgo.

5 *Hepatitis A*. La serie de la hepatitis A puede administrarse a niños de dos años de edad o mayores. La vacuna contra la hepatitis A se recomienda para su uso en estados y regiones seleccionados, y para ciertos grupos de alto riesgo.

10 *Gripe*. La vacuna contra la gripe se recomienda anualmente para niños de 6 meses de edad o mayores con ciertos factores de riesgo (que incluyen, pero sin limitación, asma, enfermedad cardíaca, enfermedad drepanocítica, VIH y diabetes), y puede administrarse a todos aquellos que deseen obtener inmunidad. Se recomienda que los niños de 12 años de edad o menos reciban la vacuna en una dosis adecuada a su edad. Se recomienda que los niños de 8 años de edad o menos que estén recibiendo vacunas contra la gripe por primera vez, reciban dos dosis separadas por al menos 4 semanas.

15 Estos cronogramas están dirigidos a niños hasta los 18 años de edad. En general, se recomienda que cualquier dosis no administrada a la edad recomendada se administre en un momento posterior, cuando se indique y sea posible. Por supuesto, pueden establecerse cronogramas adicionales para las diversas vacunas enumeradas.

20 En ciertas realizaciones, los tiempos de administración para una vacuna desvelados en la presente se basan en el cronograma recomendado ilustrado en la Fig. 1 o descrito con anterioridad. Por ejemplo, un tiempo para la administración de una vacuna de acuerdo con la divulgación puede seleccionarse tomando como base el cronograma recomendado para una vacuna que contenga uno (o más) antígenos hallados dentro de la vacuna de la divulgación.

25 Como ejemplo específico, las composiciones para vacunas divulgadas en la presente que contienen antígenos de difteria, tos ferina y tétanos (y opcionalmente uno o más antígenos adicionales) pueden administrarse en cualquiera de las siguientes edades: dos meses, cuatro meses, seis meses, 15 a 18 meses y 4 a 6 años, entre otros. Como otro ejemplo específico, una vacuna que contiene DTP/HepB/Hib/PV/Pnu (o cualquier combinación de los mismos) puede administrarse a los 2 meses, 4 meses, 6 meses o 15 meses, entre otros. Como otro ejemplo específico, una vacuna que contiene DTP/HepB/PV (o cualquier combinación de los mismos) puede administrarse a los 4-6 años, entre otros. Como otro ejemplo específico, una vacuna que contiene DTP/HepB/Hib/PV/Pnu/MMRNar (o cualquier combinación de los mismos) puede administrarse a los 15 meses, entre otros. Como otro ejemplo específico, composiciones para vacunas que contienen antígenos de la difteria y el tétanos (y opcionalmente uno o más antígenos adicionales) pueden administrarse a los 11- 18 años (y más), entre otros. Como otro ejemplo específico, una vacuna que contiene DT/HepB puede administrarse a los 11-18 años (y más), entre otros. Incluso como otro ejemplo específico, una vacuna que contiene DT/HepB/MMRNar (o cualquier combinación de los mismos) puede administrarse a los 11-18 años (y más), entre otros. Y así sucesivamente.

40 *C. Parte Experimental*

Se presentan a continuación ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente divulgación. Los ejemplos se ofrecen sólo con fines ilustrativos, y no deben considerarse bajo ningún concepto como una limitación al alcance de la invención reivindicada. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión respecto a los números utilizados (por ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, deben permitirse algunos errores y desviaciones experimentales.

Ejemplo 1

50 *Eficiencia de la Adsorción del Toxoide del Tétanos y del Toxoide de la Difteria a partículas de PLG*

Se preparan micropartículas utilizando una solución 6% p/p de polímero RG503 (un Polímero PLG que tiene una relación molar lactida/glicolida 50:50 y un peso molecular de aproximadamente 34 kDaltons, disponible de Boehringer Ingelheim) en cloruro de metileno. Se homogenizan 10 ml de esta solución con 2,5 ml de PBS utilizando una sonda de 10 mm de un homogenizador (Ultra-Turrax T25 IKA-Labortechnik, Alemania) durante tres minutos a 23.000 rpm, formando así una emulsión agua-en-aceite. Después, esta emulsión se añade a 50 ml de agua destilada que contiene 6 µg/ml de dioctil sulfosuccinato de sodio (DSS) (disponible de Sigma, USA) y se homogeniza a una velocidad muy elevada utilizando un homogenizador con una sonda de 20 mm (ES-15 Omni International, GA, USA) durante 25 minutos en un baño de hielo. Esto dio lugar a una emulsión agua-en-aceite-en-agua, que se agitó a 1.000 rpm durante 12 horas a temperatura ambiente, permitiendo la evaporación del cloruro de metileno. Las micropartículas resultantes contienen 0,05% p/p de DSS. La distribución de tamaños de la suspensión de micropartículas resultante se determina utilizando un analizador de tamaño de partículas (Master Sizer, Malvern Instruments, Reino Unido), y se encuentra entre 0,8 y 1,2 µm.

65 Los toxoides del tétanos y de la difteria, TT y DT, se adsorben a las partículas de PLG con 0,05% de DSS en diversos tampones con valores de pH diferentes. La adsorción se lleva a cabo incubando 100 mg de la suspensión de micropartículas anterior con 1 mg o 0,5 mg de DT o TT, respectivamente, en tampón 10 mM hasta el día siguiente,

ES 2 328 697 T3

mientras se agita a 4°C. Los tampones son los siguientes: PBS pH 7, fosfato pH 7, Citrato pH 5, Borato pH 9, Succinato pH 5,5, Succinato pH 5 e Histidina pH 5.

La suspensión se centrifuga al día siguiente y el sobrenadante se evalúa para determinar por HPLC la concentración de proteína no unida (para establecer el % de eficiencia de adsorción por depleción). La proteína sobre las partículas se evalúa lavando en primer lugar las mismas con agua para eliminar la proteína no unida, seguido de liofilización. La cantidad de proteína adsorbida se determina hidrolizando 10 mg de partículas liofilizadas con 2 ml de NaOH 0,2N y SDS 5% durante 4 horas seguido de una valoración de proteínas BCA (para establecer el % de eficiencia de adsorción sobre las partículas. Los resultados se presentan en las Tablas 1A y 1B a continuación.

TABLA 1A

| Tampón | % de Carga Buscada p/p | % de Eficiencia de adsorción de TT por depleción | % de Eficiencia de adsorción de TT sobre las partículas |
|------------------|------------------------|--|---|
| PBS pH 7 | 1% | 0 | 0 |
| Fosfato pH 7 | 1% | 10 | 0 |
| Citrato pH 5 | 1% | 93 | 81 |
| Borato pH 9 | 1% | 0 | 0 |
| Succinato pH 5,5 | 1% | 60 | 68 |
| Succinato pH 5 | 1% | 89 | ND |
| Succinato pH 5 | 0,5 | 88 | ND |
| Histidina pH 5 | 0,5 | ND | 60 |

TABLA 1B

| Tampón | % de Carga Buscada p/p | % de Eficiencia de adsorción de DT por depleción | % de Eficiencia de adsorción de DT sobre las partículas |
|------------------|------------------------|--|---|
| PBS pH 7 | 1% | 0 | 0 |
| Fosfato pH 7 | 1% | 0 | 0 |
| Citrato pH 5 | 1% | 70 | 68 |
| Borato pH 9 | 1% | ND | ND |
| Succinato pH 5,5 | 1% | 17 | 0 |
| Succinato pH 5 | 1% | 35 | ND |
| Succinato pH 5 | 0,5 | 32 | ND |
| Histidina pH 5 | 0,5 | ND | 52 |

Ejemplo 2

Adsorción y Liberación del Toxide del Tétanos y del Toxide de la Difteria a/desde partículas de PLG

Se preparan micropartículas de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 1. Las proteínas DT y TT se adsorben a micropartículas a una carga buscada de 0,25%, 0,5% o 1% incubando 100 mg de la suspensión de micropartículas anterior con una cantidad adecuada de DT o TT en tampón de Histidina 10 mM hasta el día siguiente, mientras se agita a 4°C. La suspensión se centrifuga al día siguiente y el sobrenadante se evalúa para determinar por HPLC la concentración de proteína no unida para establecer el % de eficiencia de adsorción por depleción. Los resultados se presentan en la columna 2 de la Tabla 2 a continuación y en la Fig. 2.

ES 2 328 697 T3

La cantidad de proteína liberada de las micropartículas se determinó incubando 10 mg de partículas liofilizadas, no lavadas, con 1 ml de agua y se dejó en agitación a 4°C durante una hora, se centrifugó, y el sobrenadante se analizó por HPLC para determinar la proteína liberada, de acuerdo con lo mencionado con anterioridad. Los resultados se presentan en la columna 3 de las Tablas 2A y 2B a continuación y en la Fig. 2.

TABLA 2A

| Formulación | % adsorbido por depleción | % liberado en 1 hora |
|-------------|---------------------------|----------------------|
| DT 0,25% | 74,1 | 9,7 |
| DT 0,50% | 68,5 | 16,1 |
| DT 1,00 | 67,6 | 19,8 |

TABLA 2B

| Formulación | % adsorbido por depleción | % liberado en 1 hora |
|-------------|---------------------------|----------------------|
| TT 0,25% | >96,7 | <1,6 |
| TT 0,50% | >97 | <1,6 |
| TT 1,00 | 98,6 | 1,2 |

Ejemplo 3

Adsorción y Liberación de conjugados meningocócicos proteína-polisacárido a/desde partículas de PLG (RG503/DSS 0,05%)

Se preparan micropartículas que contienen DSS 0,05% p/p de acuerdo con el Ejemplo 1 anterior. Antígenos conjugados proteína-polisacárido meningocócicos en los que antígenos de polisacáridos capsulares purificados de Men-A, Men-B, Men-C o Men-W se adsorben a las micropartículas.

Antígenos conjugados meningocócicos se adsorben a micropartículas a una carga buscada de 1% incubando 100 mg de las micropartículas con 1 mg de antígeno conjugado meningocócico en tampón de Histidina 10 mM hasta el día siguiente, mientras se agitan a 4°C. La suspensión se centrifuga al día siguiente y el sobrenadante se evalúa para determinar por HPLC la concentración de antígeno conjugado no unido para establecer el % de eficiencia de adsorción por depleción. Los resultados se presentan en la columna 2 de la Tabla 3 a continuación.

El antígeno conjugado adsorbido a las partículas se evalúa lavando en primer lugar las partículas con agua para eliminar el antígeno conjugado no unido, seguido de liofilización. La cantidad de antígeno conjugado adsorbido se determina por hidrólisis de las partículas liofilizadas, seguido de una valoración de proteínas BCA de acuerdo con lo mencionado con anterioridad. Los resultados se presentan en la columna 3 de la Tabla 3 y en la Fig. 3.

Para determinar la cantidad de proteína liberada de las partículas, se liofiliza sin lavar una alícuota de la suspensión de partículas-antígeno y después se incuban 10 mg de las partículas liofilizadas con 1 ml de agua y se dejan en agitación a 4°C durante 1 hora. Los resultados se presentan en la columna 4 de la Tabla 3 a continuación y en la Fig. 3.

TABLA 3

| Formulación | % adsorbido por depleción | % adsorbido por hidrólisis | % liberado en 1 hora |
|-------------|---------------------------|----------------------------|----------------------|
| MenA-CRM | 38 | 31 | 60,2 |
| MenC-CRM | 29 | 25 | 78,1 |
| MenY-CRM | 34 | 40 | 53,5 |
| MenW-CRM | 25 | 29 | 60,2 |

ES 2 328 697 T3

Ejemplo 4

Inmunogenicidad del Toxoide del Tétanos (TT) y del Toxoide de la Difteria (DT) formulados con partículas de PLG

5 Estudio en ratones

Para el estudio, se prepara una suspensión de micropartículas de PLGIDSS de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 1. Los toxoides del Tétanos y la Difteria, DT y TT, se adsorben a las micropartículas a una carga buscada de 0,5% o 1% incubando 100 mg de la suspensión de micropartículas anterior con una cantidad adecuada de DT o TT en tampón de Histidina 10 mM hasta el día siguiente, mientras se agita a 4°C. Después, cada formulación se ensayó individualmente (PLG/TT o PLG/DTT) o en combinación (PLG/DT+PLG/TT). Las formulaciones equivalentes de Alumbre (Alumbre/TT o Alumbre/DTT, y (Alumbre/DTT + Alum/TT)) también se incluyeron en el estudio para la comparación. Los ratones se inyectaron en el músculo tibial anterior con 50 µl por pata el día 0 y el día 14. Se recolectaron sueros el día 28 por sangrado del seno orbital.

15 Ensayo de ELISA

Se determinó la presencia de anticuerpo IgG para cada ratón ensayando ocho diluciones seriadas de suero comenzando en 1/50 sobre placas que fueron revestidas con antígeno de DT-CRM o IT. Se ensayó un control positivo y una referencia de suero de ratón positivo sobre cada placa para un control adecuado al sistema. La presencia de anticuerpos en suero se detectó con un segundo anticuerpo conjugado a Peroxidasa de Rábano en combinación con un sustrato colorimétrico, que adsorbe a 450 nm. Los títulos se definieron como la recíproca de la dilución del suero que dio una densidad óptica de absorbancia por ELISA de 0,5. Los títulos se obtuvieron por interpolación de un ajuste de curvas de cuatro parámetros de absorbancia versus dilución. Se calcularon las medias geométricas de los títulos (GMT) y los ratones con un título ≥ 50 se informaron como sensibles al tratamiento. Los resultados se presentan en las Tablas 4A-C a continuación. Como puede observarse a partir de estos resultados: (1) No se halló diferencia en los títulos logrados con micropartículas de PLG preparadas a una carga buscada de 0,5% o 1% para ambos antígenos TT y DT. (2) La combinación de ambos antígenos formulada con PLG o Alumbre aumentó las respuestas a TT en ~ 2 veces. (3) En términos globales, tomando como base estos resultados, las respuestas generadas con PLG/TT y PLG/DT son comparables a las de Alumbre/TT y Alumbre/DT.

35 TABLA 4A

| Títulos del anticuerpo 2wp2 de DT | | | |
|--|------------------------------------|------------|------------|
| | GMT # de Animales Sensibles | LCL | UCL |
| 40 PLG/DT (0,5%) | 17.277 | 11.718 | 25.473 |
| 45 PLG/DT (1,0%) | 23.938 | 13.184 | 43.464 |
| PLG/DT + PLG/TT | 17.786 | 9.389 | 33.695 |
| Alumbre/DT | 54.166 | 40.022 | 73.308 |
| 50 Alumbre/DT + Alumbre/TT | 39.635 | 24.696 | 63.609 |

55 LCL/CTCL = Límites de Confianza 95% = Promedio \pm (t x SEM). Todos los cálculos se llevaron a cabo utilizando valores de títulos transformados en logaritmos; las medias geométricas finales de los títulos y los Límites de Confianza del 95% que se muestran se obtuvieron tomando el antilogaritmo

ES 2 328 697 T3

TABLA 4B

| Títulos 2wp2 de anticuerpo TT | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|--------|---------|
| | GMT # de Animales Sensibles | LCL | UCL |
| PLG/TT (0,5%) | 32.182 | 20.408 | 50.750 |
| PLG/TT (1,0%) | 41.431 | 34.842 | 49.265 |
| PLG/DT + PLG/TT | 61.992 | 36.882 | 104.199 |
| Alumbre/TT | 36.860 | 26.672 | 50.939 |
| Alumbre/DT + Alumbre/TT | 70.825 | 55.538 | 90.322 |

LCL/CTCL = Límites de Confianza 95% = Promedio ± (t x SEM). Todos los cálculos se llevaron a cabo utilizando valores de títulos transformados en logaritmos; las medias geométricas finales de los títulos y los Límites de Confianza del 95% que se muestran se obtuvieron tomando el antilogaritmo

Ejemplo 5

Immunogenicidad de conjugados meningocócicos formulados con partículas de PLG (RG503/DSS 0,05%) y Alumbre

Se preparan micropartículas que contienen DSS 0,05% p/p de acuerdo con el Ejemplo 1 anterior. Antígenos conjugados proteína-polisacárido meningocócicos en los que antígenos de polisacáridos capsulares purificados de Men-C se conjugan o bien al toxoide de la difteria CRM₁₉₇ o a ADH, obtenidos de Chiron Vaccines, Siena, Italia, se adsorben a las micropartículas. Antígenos conjugados meningocócicos se adsorben a micropartículas a una carga buscada de 1,0% incubando 100 mg de las micropartículas con 1,0 mg de antígeno conjugado meningocócico en PBS a pH 7,0 hasta el día siguiente, mientras se agitan a 4°C. Los ratones se inyectaron en el músculo tibial anterior con 50 µl por pata el día 0 y el día 14. Se recolectaron sueros el día 28 por sangrado del seno orbital.

Se determinó la presencia de anticuerpo IgG para cada ratón ensayando ocho diluciones seriadas de suero comenzando en 1/50 sobre placas que fueron revestidas con antígeno Men-C ADH o MEN-C CRM. Se ensayó un control positivo y una referencia de suero de ratón positivo sobre cada placa para un control adecuado al sistema. La presencia de anticuerpos de suero se detectó con un segundo anticuerpo conjugado a Peroxidasa de Rábano en combinación con un sustrato colorimétrico, que adsorbe a 450 nm. Los títulos se definieron como la recíproca de la dilución del suero que dio una densidad óptica de absorbancia por ELISA de 0,5. Los títulos se obtuvieron por interpolación de un ajuste de curvas de cuatro parámetros de absorbancia versus dilución. Las medias geométricas de los títulos (GMT) se calcularon para IgG total e IgG1 (para Men-C CRM). Los resultados se presentan en las Tablas 5 a continuación. Como puede observarse a partir de estos resultados, el antígeno formulado con PLG se compara favorablemente con el antígeno formulado con alumbre.

TABLA 5

| Formulación | MenC ADH (corte: 0,5) | | | MenC CRM (corte: 0,5) | | | MenC CRM (corte: 0,5) | | |
|------------------|-----------------------|----------|----------|-----------------------|----------|----------|-----------------------|----------|----------|
| | IgG total | | | IgG total | | | IgG1 | | |
| | GMT | inferior | superior | GMT | Inferior | superior | GMT | Inferior | superior |
| MenC CRM/PLG | 205 | 176 | 238 | 1.553 | 1.427 | 1.691 | 33.664 | 29.782 | 38.053 |
| MenC CRM/Alumbre | 82 | 59 | 114 | 1.381 | 1.244 | 1.533 | 33.017 | 30.372 | 35.892 |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica que comprende: (a) micropartículas poliméricas que comprenden un polímero biodegradable; (b) un antígeno toxoide de la difteria y un antígeno toxoide del tétanos adsorbidos a las micropartículas; y (c) un excipiente farmacéuticamente aceptable.
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, que además comprende uno o más antígenos adicionales.
- 10 3. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, en la que el antígeno adicional es adsorbido a la superficie de las micropartículas o está atrapado dentro de las micropartículas.
- 15 4. La composición inmunogénica de la reivindicación 2 o de la reivindicación 3, en la que el antígeno adicional es un antígeno que contiene un polipéptido, un antígeno que contiene un polisacárido, un antígeno conjugado, un antígeno que contiene un polinucleótido o se obtiene a partir de una célula tumoral.
- 20 5. La composición inmunogénica de la reivindicación 2 o de la reivindicación 3, en la que el antígeno adicional se obtiene a partir de un organismo patógeno seleccionado de un virus tal como el virus de la hepatitis, varicela, virus de la polio, sarampión, paperas, rubéola, virus de la gripe, *Neisseria meningitidis*, tos ferina, *Haemophilus Influenzae* de tipo B, VIH y *Streptococcus pneumoniae*, una bacteria, un hongo y un parásito.
- 25 6. La composición inmunogénica de la reivindicación 5, en la que el antígeno adicional es un organismo patógeno muerto o atenuado.
7. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición inmunogénica además comprende un tensioactivo.
- 30 8. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que las micropartículas tienen un diámetro entre 500 nanómetros y 20 micrómetros.
- 35 9. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que el polímero biodegradable se selecciona de un poli(α -hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido y un policianoacrilato.
- 40 10. La composición inmunogénica de la reivindicación 9, en la que el polímero biodegradable es una poli(lactida-glicolida) que tiene una relación molar lactida:glicolida que oscila de 40:60 a 60:40.
- 45 11. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, que además comprende un adyuvante inmunológico suplementario.
12. La composición inmunogénica de la reivindicación 11, en la que el adyuvante inmunológico suplementario es adsorbido a la superficie de las micropartículas, o está atrapado dentro de las micropartículas.
- 50 13. La composición inmunogénica de la reivindicación 11 o de la reivindicación 12, en la que el adyuvante inmunológico suplementario se selecciona de oligonucleótidos de CpG, ARN bicatenario, toxinas de *E. coli* lábiles al calor, compuestos fosfato liposacáridos, miméticos de fosfato liposacáridos y emulsiones submicrónicas que comprenden escualeno, un éster de sorbitán y un éster de polioxitilensorbitán.
- 55 14. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición inmunogénica es una composición inyectable.
15. Uso de (a) micropartículas poliméricas que comprenden un polímero biodegradable y (b) un antígeno adsorbido a las micropartículas, según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la fabricación de un medicamento para estimular una respuesta inmune en un animal huésped vertebrado.
- 60 16. Uso según se reivindica en la reivindicación 15 en la fabricación de un medicamento para inmunizar a un animal huésped vertebrado contra la infección por un organismo patógeno.
17. Uso según se reivindica en la reivindicación 15 o en la reivindicación 16, en el que el animal huésped vertebrado es un ser humano.
- 65 18. Un procedimiento para producir la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 que comprende: (a) formar una emulsión agua-en-aceite-en-agua que comprende agua, disolvente orgánico y polímero biodegradable; (b) eliminar el disolvente orgánico de la emulsión para formar las micropartículas poliméricas; y (c) adsorber el antígeno toxoide de la difteria y el antígeno toxoide del tétanos a las micropartículas.
19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que la emulsión además comprende un tensioactivo aniónico.

Cronograma de Vacunación Recomendado en Niños y Adolescentes - Estados Unidos, 2003

| Vacuna | Edad | rango de edades recomendado | | | | vacunación adicional | | | | estudios en pre-adolescentes | | |
|----------------------------------|------|---|-------|---------|---------|----------------------|----------|----------|----------|------------------------------|----------|----------------------|
| | | nacimiento | 1 mes | 2 meses | 4 meses | 6 meses | 12 meses | 15 meses | 18 meses | 24 meses | 4-6 años | 11-12 años |
| Hepatitis B | | HepB #1: solo si la madre es HBsAg(-) | | | | HepB #2 | | | | HepB #3 | | |
| Difteria, Tétanos, Tos Ferina | | | DTaP | DTaP | DTaP | | DTaP | | | DTaP | | Td |
| Haemophilus Influenzae de tipo B | | | Hib | Hib | Hib | | Hib | | | | | |
| Polio inactivada | | | IPV | IPV | | | IPV | | | IPV | | |
| Sarampión, Paperas, Rubéola | | | | | | | MMR #1 | | | MMR #2 | | MMR #2 |
| Varicela | | | | | | | Varicela | | | Varicela | | |
| Neumocóccicas | | | PCV | PCV | PCV | | PCV | | | PCV | | PPV |
| Hepatitis A | | las vacunas por debajo de esta línea son para poblaciones seleccionadas | | | | | | | | | | serie de Hepatitis A |
| Gripe | | | | | | | | | | | | gripe (anual) |

Este cronograma indica las edades recomendadas para la administración rutinaria de vacunas actualmente autorizadas para aplicación en niños, a partir del 1 de diciembre de 2002, para niños de hasta 18 años. Cualquier dosis no administrada a la edad recomendada debería administrarse en cualquier visita posterior, cuando se indique y sea posible. [hatched box] indica los grupos etarios que garantizan esfuerzos especiales para administrar las vacunas no administradas con anterioridad. Durante el año, pueden autorizarse y recomendarse vacunas adicionales. Pueden utilizarse vacunas combinadas autorizadas en cualquier caso en el que se indique cualquier componente de la combinación y siempre que los otros componentes de la vacuna no estén contraindicados. Los prestadores deben consultar el prospecto provisto por el fabricante por recomendaciones detalladas.

Fig. 1

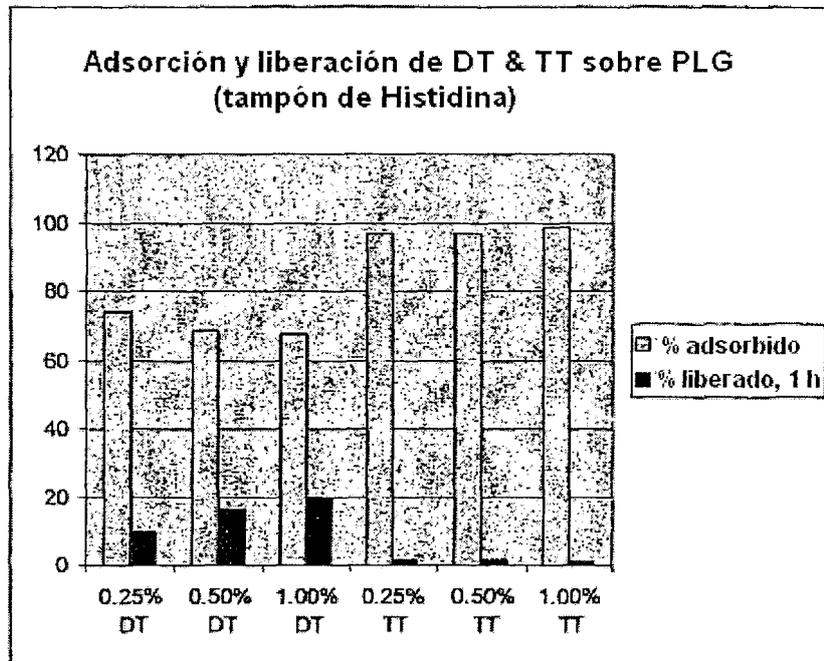


Fig. 2

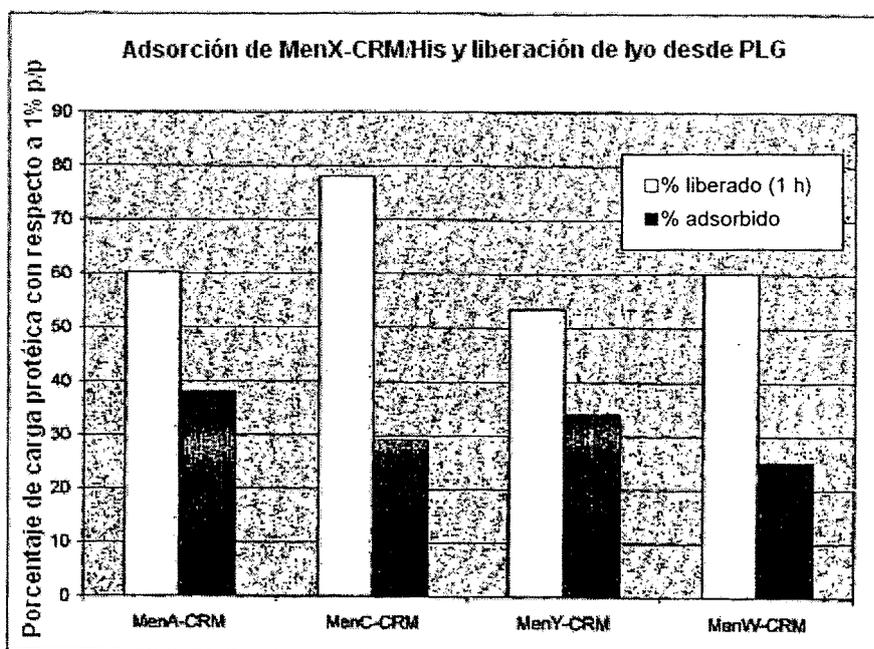


Fig. 3