(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 MODIFICADA TRAS OPOSICIÓN T5

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2004 PCT/US2004/017125**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2005 WO05020964**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2004 E 04776195 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **08.03.2017 EP 1631264**

(54) Título: **Composiciones inmunogénicas basadas en micropartículas que comprenden toxoide adsorbido y un antígeno que contiene un polisacárido**

(30) Prioridad:

02.06.2003 US 475010 P
21.10.2003 US 513074 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
25.07.2017

(73) Titular/es:

NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
4560 HORTON STREET
EMERYVILLE, CA 94608, US

(72) Inventor/es:

O'HAGAN, DEREK;
SINGH, MANMOHAN y
KAZZAZ, JINA

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 328 697 T5

DESCRIPCIÓN

Composiciones inmunogénicas basadas en micropartículas que comprenden toxoide adsorbido y un antígeno que contiene un polisacárido

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas inmunogénicas, en particular a composiciones de vacuna.

Antecedentes

La aparición de las vacunas de subunidades, incluyendo vacunas polipeptídicas, de polisacáridos, conjugadas y de ADN, ha intensificado la necesidad de composiciones que contengan adyuvantes seguros y eficaces.

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). Actualmente, el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Administración de Fármacos y Alimentos (FDA, siglas del inglés *Food and Drug Administration*) solo ha aprobado el alumbre para el uso en el ser humano. Por ejemplo, están disponibles diversas vacunas para difteria-tétanos en las que los toxoides diftéricos y los toxoides tetánicos están adsorbidos en sales de aluminio. Aunque los adyuvantes de aluminio tienen un perfil de seguridad demostrado desde muchos años, estos adyuvantes ocasionalmente están asociados con reacciones locales. Por ejemplo, los granulomas post vacunación son una reacción bien conocida asociada con las vacunas adsorbidas en aluminio.

En un intento por provocar respuestas inmunitarias adecuadas, se han utilizado vehículos particulados con antígenos adsorbidos o inmovilizados. Normalmente, tales vehículos presentan al sistema inmunitario múltiples copias de un antígeno proteico recombinante seleccionado y promueven la inmovilización y retención de los antígenos en ganglios linfáticos locales. Los macrófagos pueden fagocitar las partículas y pueden potenciar la presentación de antígenos a través de la liberación de citocinas.

Por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 98/33487 del mismo solicitante y la solicitud de patente de Estados Unidos N.º de serie 09/015.652, presentada el 29 de junio de 1998, en trámite junto con la presente, describe el uso de micropartículas con antígeno adsorbido y con antígeno encapsulado para estimular respuestas inmunológicas, incluyendo respuestas inmunológicas mediadas por células, así como procedimientos de fabricación de las micropartículas. Los polímeros utilizados para formar las micropartículas incluyen poli(láctido) y poli(láctido-co-glicólido), que también reciben el nombre en el presente documento de “PLG”.

La solicitud de patente internacional WO 00/06123 del mismo solicitante desvela procedimientos de fabricación de micropartículas que tienen macromoléculas adsorbidas, incluyendo ADN, polipéptidos, antígenos y adyuvantes. Las micropartículas comprenden, por ejemplo, un polímero tal como un poli(alfa-hidroxi ácido) (por ejemplo, PLG), un ácido polidroxibutírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido y similares y se forman utilizando, por ejemplo, detergentes catiónicos, aniónicos o no iónicos. Las micropartículas que contienen detergentes aniónicos, tales como micropartículas de PLG con dodecilsulfato de sodio (SDS), se proponen para el uso de macromoléculas cargadas positivamente, tales como polipéptidos. Las micropartículas que contienen detergentes catiónicos, tales como las micropartículas de PLG con CTAB (sigla del inglés: *cetyltrimethylammonium bromide*, bromuro de cetiltrimetilamonio), se proponen para el uso de macromoléculas cargadas negativamente, tales como ADN. También se desvela el uso de tales micropartículas para estimular respuestas inmunológicas, incluyendo respuestas inmunológicas mediadas por células.
El documento US 5.981.719 describe micropartículas que están compuestas de macromoléculas y polímeros entrelazados distribuidos de forma homogénea.
El documento US 6.007.845 describe nanopartículas en las cuales se incorpora un antígeno en las nanopartículas.
Peyre y col. (Proceed. In’l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., vol. 28, 2001, pág. 1077-1078) describe microesferas biodegradables con antígenos microencapsulados.
El documento US 2002/0136776 y el documento WO 02/26209 describen micropartículas que comprenden polímeros biodegradables, un primer y un segundo agente biológicamente activo, incluyendo ambos antígenos.

Sumario de la invención

La invención proporciona una composición inmunogénica que comprende: (a) micropartículas poliméricas que comprenden un polímero biodegradable; (b) antígeno del toxoide diftérico y antígeno del toxoide tetánico adsorbidos en las micropartículas y (c) un excipiente farmacéuticamente aceptable en el que el polímero biodegradable es un copolímero poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLG) que tiene una proporción molar de láctido : glicólido que varía de 40:60 a 60:40.

La invención también proporciona el uso de (a) micropartículas poliméricas que comprenden un polímero biodegradable y (b) antígeno adsorbido en las micropartículas de acuerdo con la invención, en la fabricación de un medicamento para la estimulación de una respuesta inmunitaria en un animal hospedador vertebrado, en las que el polímero biodegradable es un copolímero poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLG) que tiene una proporción molar de

láctido : glicólido que varía de 40:60 a 60:40.

La invención también proporciona un procedimiento de producción de la composición inmunogénica de acuerdo con la invención que comprende: (a) la formación de una emulsión de agua en aceite en agua que comprende agua, disolvente orgánico y polímero biodegradable; (b) la eliminación del disolvente orgánico de la emulsión, para formar las micropartículas poliméricas y (c) la adsorción del antígeno del toxoide diftérico y del antígeno del toxoide tetánico a las micropartículas, en las que el polímero biodegradable es un copolímero poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLG) que tiene una proporción molar de láctido : glicólido que varía de 40:60 a 60:40.

Otros aspectos de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

Los aspectos de la siguiente descripción que no se refieren de forma específica a la invención reivindicada son para comparación e ilustración.

Sumario de la divulgación

La presente divulgación se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden micropartículas poliméricas biodegradables que tienen adsorbidas en ellas toxoide y antígenos que contienen polisacárido.

De acuerdo con un primer aspecto de la divulgación, se proporciona una composición inmunogénica que comprende: (a) micropartículas poliméricas que comprenden un polímero biodegradable, por ejemplo, un polímero seleccionado de un poli(α-hidroxi ácido), un ácido polihidroxibutírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido y un policianoacrilato; (b) un antígeno adsorbido en las micropartículas seleccionado de (i) un antígeno toxoide, tal como un toxoide tetánico, un toxoide diftérico o una combinación de los mismos, y/o (ii) un antígeno que contiene polisacárido, tal como un antígeno polisacárido de Hib, un antígeno conjugado de Hib que comprende regiones de polisacárido y de polipéptido, un antígeno polisacárido meningocócico, un antígeno conjugado meningocócico que comprende regiones de polisacárido y de polipéptido, un antígeno polisacárido neumocócico, un antígeno conjugado neumocócico que comprende regiones de polisacárido y de polipéptido o una combinación de los mismos; y (c) un excipiente farmacéuticamente aceptable. Normalmente, las micropartículas se preparan a través de cualquiera de una variedad de técnicas, después de las cuales el antígeno se adsorbe a las micropartículas.

Los polímeros de poli(D,L-láctido-co-glicólido) incluyen los que tienen una proporción molar de láctido:glicólido que varía de 40:60 a 60:40 o de 55:45 a 45:55, y que tienen un peso molecular que varía, por ejemplo, de 5.000 a 200.00 Daltons, de 10.000 a 100.000 Daltons, de 20.000 a 70.000 Daltons, o de 40.000 a 50.000 Daltons.

En muchas realizaciones, las composiciones inmunogénicas comprenderán antígenos además de antígenos que contiene toxoide y/o polisacárido. Estos antígenos adicionales pueden estar independientemente, por ejemplo: (a) adsorbidos en la superficie de micropartículas, (b) inmovilizados dentro de micropartículas (c) en solución o suspensión, (d) adsorbidos en distintas poblaciones de micropartículas y/o (e) inmovilizados dentro de distintas poblaciones de micropartículas.

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

Los ejemplos de antígenos que contienen polinucleótidos incluyen, por ejemplo, (a) secuencias de ácido nucleico que codifican de forma directa antígenos que contienen polipéptidos (por ejemplo, una molécula de ARNm) y (b) construcciones de vector que indirectamente codifican antígenos que contienen polipéptidos, por ejemplo, construcciones de vector que expresan secuencias de ácido nucleico heterólogas, que a su vez codifican antígenos que contienen polipéptidos (por ejemplo, construcciones de vector de ADN y construcciones de vector de ARN). Los antígenos codificados que contienen polipéptidos pueden ser, por ejemplo, antígenos tumorales y/o antígenos obtenidos de organismos patógenos.

De manera similar, los antígenos que contienen polipéptido y los antígenos que contienen polisacárido pueden ser, por ejemplo, antígenos tumorales y/o antígenos de organismos patógenos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, estos antígenos se obtienen de tumores. En otras realizaciones, los antígenos se obtienen de virus, por ejemplo, virus de la hepatitis, virus del herpes simple, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la varicela, polio, sarampión, paperas, rubeola, citomegalovirus y virus de la gripe. En otras realizaciones, los antígenos se obtienen de bacterias tales como, por ejemplo, difteria, tétanos, pertussis, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* (por ejemplo, *Haemophilus influenzae* tipo b), estreptococos, *Neisseria gonorrhoeae, Helicobacter pylori* y cólera. En aún otras realizaciones, los antígenos se obtienen de hongos o de parásitos tales como, por ejemplo, el parásito de la malaria.

Los ejemplos específicos de antígenos incluyen diversas combinaciones de los siguientes: (a) antígenos de pertussis (por ejemplo, antígenos de pertussis de célula completa o acelulares), (b) antígenos de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) (por ejemplo, antígenos de polisacárido de Hib y conjugados de Hib), (c) antígenos de la hepatitis (por ejemplo, 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

ejemplo, hepatitis A-B); (d) antígenos de la polio (por ejemplo, antígenos de virus inactivado o de vivo atenuado, normalmente antígenos de la polio inactivados trivalentes); (e) antígenos meningocócicos *(Neisseria meningitidis),* que incluye antígenos de polisacárido y conjugados (por ejemplo, meningitis A, meningitis B, meningitis C, meningitis W, meningitis 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 ejemplo, antígenos de polisacárido y conjugados); (g) antígenos del virus de la varicela zoster (varicela) (por ejemplo, antígenos de virus vivo atenuado, liofilizado), (h), antígenos del virus del sarampión (por ejemplo, antígenos de virus vivo atenuado), (i) antígenos del virus de la papera (por ejemplo, antígenos de virus vivo atenuado), (j) antígenos del virus de la rubeola (por ejemplo, antígenos de virus vivo atenuado).

Las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento también pueden comprender diversos adyuvantes inmunológicos suplementarios. Como con los antígenos adicionales anteriores, estos adyuvantes inmunológicos suplementarios pueden estar, por ejemplo: (a) adsorbidos en la superficie de micropartículas, (b) inmovilizados dentro de las micropartículas, (c) en solución/suspensión, (d) adsorbidos en poblaciones distintas de micropartículas y/o (e) inmovilizados dentro de poblaciones distintas de micropartículas.

Los ejemplos de adyuvantes inmunológicos suplementarios incluyen (a) oligonucleótidos inmunoestimuladores tales como oligonucleótidos CpG, (b) ARN bicatenario, (c) toxinas termolábiles de *E. coli*, (d) compuestos de fosfato de liposacárido (por ejemplo, monofosforil lípido A y derivados) y miméticos de fosfato de liposacárido, y (e) emulsiones submicrométricas que comprenden un aceite metabolizable, tal como escualeno, y un agente emulsionante, tal como uno más derivados del sorbitán (por ejemplo, MF59).

Todavía otros componentes suplementarios pueden estar incluidos en las diversas composiciones desveladas en el presente documento, incluyendo productos farmacéuticos, hormonas, enzimas, mediadores de la transcripción o de la traducción, intermediarios de rutas metabólicas, inmunomoduladores y combinaciones de los mismos.

Las realizaciones adicionales desveladas en el presente documento están dirigidas a procedimientos de administración de antígenos a un animal hospedador, que comprende administrar al animal hospedador cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento. El animal hospedador preferentemente es un animal vertebrado, más preferentemente un mamífero y aún más preferentemente un ser humano.

La divulgación también se dirige a procedimientos para estimular una respuesta inmunitaria en un animal hospedador, que comprende administrar al animal cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento en una cantidad eficaz para inducir la respuesta inmunitaria.

La divulgación adicionalmente se dirige a procedimientos de inmunización de un animal hospedador frente a un tumor o un organismo patógeno, que comprende administrar al animal cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento en una cantidad eficaz para inducir una respuesta protectora.

La administración de las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento puede realizarse por cualquier procedimiento conocido, que incluye inyección directa (por ejemplo, por vía subcutánea, vía intraperitoneal, vía intravenosa o vía intramuscular).

Por lo tanto, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, se proporcionan composiciones y procedimientos que tratan, que incluye inmunizar de forma profiláctica y/o terapéutica, a un animal hospedador frente a infecciones virales, bacterianas, fúngicas, de micoplasma o de protozoarios, así como frente a tumores. Los procedimientos de la presente invención son útiles para otorgar inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un animal hospedador, preferentemente a un ser humano.

Otras realizaciones de la presente invención están dirigidas a procedimientos para la producción de las composiciones anteriores. Por ejemplo, las micropartículas poliméricas anteriores se pueden producir mediante un procedimiento que comprende: (a) formar una emulsión de agua en aceite en agua que comprende agua, disolvente orgánico, polímero biodegradable; (b) eliminar el disolvente orgánico de la emulsión para formar las micropartículas poliméricas y (c) adsorber a las micropartículas un antígeno toxoide, tal como un toxoide tetánico o diftérico, un antígeno que contiene polisacárido, tal como un polisacárido de Hib, meningocócico o neumocócico o conjugado, o una combinación de los mismos. En muchas realizaciones, la emulsión comprenderá adicionalmente un tensioactivo, por ejemplo, un tensioactivo aniónico.

Una ventaja de las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento es la capacidad de generar respuestas inmunitarias en un sujeto vertebrado, incluyendo respuestas de anticuerpos convencionales.

Estas y otras diversas realizaciones, aspectos y ventajas de la presente divulgación se harán fácilmente obvios para los expertos en la materia, a la vista de la divulgación del presente documento y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es el Esquema de Inmunización para la Infancia y Adolescentes Recomendada de los Estados Unidos del 2003, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Centros para el Control y la

Prevención de Enfermedades, Programa Nacional Inmunización.
La Fig. 2 es un gráfico de barras que ilustra el % de adsorción y el % de liberación para el toxoide tetánico y el toxoide diftérico de partículas de PLG en buffer Histidina.
La Fig. 3 es un gráfico de barras que ilustra el % de adsorción y el % de liberación del conjugado Men-X Crm de las partículas de PLG.

Descripción detallada

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, procedimientos convencionales dentro de las habilidades en la técnica, de química, química de polímeros, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología. Tales técnicas se explican con todo detalle en la literatura. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology, Vol. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989); Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S., ed, CRC Press, 1997) y Seymour/Carrahers Polymer Chemistry (4ª edición, Marcel Deckker Inc., 1996).

Como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en cualquiera de las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "la/el" incluyen referencias plurales al menos que el contenido estipule claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, el término "micropartícula" se refiere a una o más micropartículas, y similares.

A menos que el contexto indique otra cosa, en el presente documento todos los porcentajes y proporciones se proporcionan en función del peso.

A. Definiciones

En la descripción de la presente invención, se emplearán los siguientes términos y se pretende definirlos como se indica a continuación.

El término "micropartícula" como se utiliza en el presente documento, se refiere a una partícula de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 150 µm de diámetro, más normalmente aproximadamente 200 nm a aproximadamente 30 µm de diámetro e incluso más normalmente aproximadamente 500 nm a aproximadamente 10-20 µm de diámetro. Las micropartículas de la presente invención pueden agregarse en masas más grandes en algunas circunstancias. La micropartícula en general será de un diámetro que permita la administración parental o en las mucosas sin ocluir agujas y capilares. El tamaño de micropartícula se determina fácilmente mediante técnicas bien conocidas en la técnica, tales como espectrometría de correlación fotónica, difractometría láser y/o microscopía electrónica de barrido. El término "partícula" también puede utilizarse para indicar una micropartícula como se define en el presente documento.

Las micropartículas para su uso con la presente invención son micropartículas poliméricas obtenidas de poli(D,L-láctido-co-glicólido) ("PLG") que tienen una proporción molar de láctido : glicólido que varía de 40:60 a 60:40. Puede utilizarse una diversidad de proporciones de monómeros (láctido:glicólido), la selección de las cuales será, en gran medida, una cuestión de elección, dependiendo en parte de las especies coadministradas. Estos parámetros se discuten adicionalmente a continuación.

El término "tensioactivo", como se utiliza en el presente documento, incluye detergentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión y estabilizadores de emulsión. Los tensioactivos catiónicos incluyen, pero sin limitación, bromuro de cetiltrimetilamonio o "CTAB" (por ejemplo, cetrimida), cloruro de benzalconio, DDA (bromuro de dimetil-dioctadecil amonio), DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano) y similares. Los tensioactivos aniónicos incluyen, pero sin limitación, SDS (dodecil sulfato de sodio), SLS (lauril sulfato de sodio), DSS (disulfosuccinato), alcoholes grasos sulfatados, y similares. Los tensioactivos no iónicos incluyen, pero sin limitación, PVA, povidona (también conocida como polivinilpirrolidona o PVP), ésteres de sorbitán, polisorbatos, monoéteres glicólicos polioxietilados, alquil fenoles polioxietilados, poloxámeros, y similares.

La expresión "emulsión submicrométrica", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una emulsión de aceite en agua que comprende microgotas de aceite, las cuales sustancialmente todas varían en tamaño hasta 1000 nm, por ejemplo de 10 nm a 1000 nm.

La expresión "producto farmacéutico" se refiere a compuestos biológicamente activos tales como antibióticos, agentes antivirales, factores de crecimiento, hormonas, antígenos y similares.

El término "adyuvante" se refiere a cualquier sustancia que ayude a, o modifique, la acción de un producto farmacéutico, que incluye pero sin limitación adyuvantes inmunológicos, que aumentan o diversifican la respuesta inmunitaria contra un antígeno. Por lo tanto, los adyuvantes inmunológicos son compuestos que tienen la capacidad de potenciar una respuesta inmunitaria contra antígenos.

Un "polinucleótido" es un polímero de ácido nucleico. Un polinucleótido puede incluir tan poco como 5, 6, 7 u 8 nucleótidos. Además, un "polinucleótido" puede incluir secuencias bi o monocatenarias y se refiere a, pero sin

limitación, ADNc de ARNm viral, procariótico o eucariótico, secuencias de ARN y ADN genómicos virales (por ejemplo, virus y retrovirus de ARN y ADN) o de ADN procariótico, y secuencias de ADN sintéticas. El término también refleja secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base de ADN y ARN conocidos. El término adicionalmente incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservativa) de una secuencia nativa, por ejemplo, en donde la molécula de ácido nucleico codifica una proteína antigénica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de hospedadores que producen antígenos.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “ácido nucleico” se refiere a ADN, ARN o quimeras formadas a partir de ellos.

Una “especie que contiene polinucleótido” es una molécula de la que por lo menos una porción es un polinucleótido. Los ejemplos incluyen construcciones de vector de ARN, construcciones de vector de ADN y así sucesivamente.

Un “oligosacárido” se refiere a un polímero de monosacáridos relativamente corto, es decir, uno que contiene de 2 a 30 unidades de monosacárido. Un “polisacárido” es un polímero de monosacáridos que está más allá de la longitud de un oligosacárido (es decir, uno que contiene más de 30 unidades de monosacárido). Además, como se utiliza en el presente documento, el término “polisacárido” también se refiere a un polímero de monosacáridos que contiene dos o más monosacáridos unidos. Para evitar cualquier ambigüedad, debe aplicarse en todo momento la segunda definición, a menos que las indicaciones expliciten lo contrario. Los monosacáridos normalmente están unidos mediante uniones glucosídicas. Están abarcados en la definición tanto los polisacáridos de origen natural de longitud completa como los fragmentos de los mismos. Los términos también incluyen modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones de una secuencia de polisacárido nativa, por ejemplo, de forma que el polisacárido conserve la capacidad de provocar una respuesta inmunológica en un sujeto al cual se administra el polisacárido.

Un “monosacárido” es un alcohol polihídrico (es decir, un alcohol que adicionalmente comprende ya sea un grupo aldehído (en cuyo caso el monosacárido es una aldosa) o un grupo ceto (en cuyo caso el monosacárido es una cetosa). Los monosacáridos normalmente contienen de 3-10 carbonos. Además, los monosacáridos normalmente tienen la fórmula empírica $(CH_2O)_n$ en donde n es un número entero de 3 o mayor, normalmente 3-10. Los ejemplos de aldosas de 3-6 carbonos incluyen gliceraldeído, eritrosa, treosa, ribosa, 2-deoxirribosa, arabinosa, xilosa, lixose, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa y talosa. Los ejemplos de cetosas 3-6 carbonos incluyen dihidroxiacetona, eritrulosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, fructosa, sorbosa y tagatosa. Los monosacáridos de origen natural normalmente se encuentran en la forma D-isomérica, en contraposición a la forma L.

Como se utiliza en el presente documento el término “sacárido” abarca monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Una “especie que contiene sacáridos” es una molécula de la que por lo menos una porción es un sacárido. Los ejemplos incluyen antígenos sacárido, antígenos que comprenden sacáridos conjugados a péptidos transportadores, y así sucesivamente.

Los términos “polipéptido” y “proteína” se refieren a un polímero de restos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima del producto. Por lo tanto, los péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares están incluidos en la definición. Están abarcados en la definición tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas. Los términos también incluyen modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservativa) de una secuencia nativa, por ejemplo, de forma que la proteína conserve la capacidad de provocar una respuesta inmunológica o tener un efecto terapéutico en un sujeto al cual la proteína se administra.

Una “especie que contiene polipéptidos” es una molécula de la que por lo menos una porción es un polipéptido. Los ejemplos incluyen polipéptidos, proteínas que incluyen glucoproteínas, antígenos de sacárido conjugados a proteínas transportadoras, y así sucesivamente.

Por “antígeno” se entiende una molécula que contiene uno o más epítopos que tienen la capacidad de estimular el sistema inmunitario del huésped para fabricar una respuesta inmunitaria celular específica de antígeno cuando el antígeno se presenta o una respuesta de anticuerpos humoral. Un antígeno puede tener la capacidad de generar una respuesta celular y/o humoral por sí mismo o cuando se presenta en combinación con otra molécula.

Un “epítopo” es una parte de una molécula antigénica o de un complejo antigénico que determina su especificidad inmunológica. Un epítopo está dentro del ámbito de la presente definición de antígeno. Comúnmente, un epítopo es un polipéptido o polisacárido en un antígeno de origen natural. En antígenos artificiales, puede ser una sustancia de bajo peso molecular tal como un derivado de ácido arsanílico. Un epítopo reaccionará específicamente *in vivo* o *in vitro* con, por ejemplo, anticuerpos homólogos o linfocitos T. Los descriptores alternativos son determinante antigénico, agrupación estructural antigénica y agrupación hapténica.

Un epítopo de polipéptido puede incluir, por ejemplo, entre aproximadamente 5-15 aminoácidos. Los epítopos de un dado antígeno se pueden identificar utilizando cualquier número de técnicas de mapeo epitópico bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Por ejemplo, los epítopos lineales se pueden determinar mediante, por ejemplo, la síntesis simultánea de gran número de péptidos en soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a

partes de la molécula proteica, y haciendo reaccionar los epítopos con anticuerpos mientras los péptidos están todavía unidos a los soportes. Tales técnicas se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 4.708.871; Geysen y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 81:3998-4002; Geysen y col. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. De manera similar, los epítopos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de aminoácidos tal como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols,* citado anteriormente.

El término "antígeno" como se utiliza en el presente documento indica antígenos de subunidad, es decir, antígenos que están separados y son discretos a partir de un organismo entero con el que un antígeno está asociado en la naturaleza, así como bacterias, virus, parásitos u otros patógenos muertos, atenuados o inactivados, o células tumorales. Los anticuerpos tales como anticuerpos anti-idiotipo, o fragmentos de los mismos, y mimotopos de péptidos sintéticos, que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico, también están reflejados en la definición de antígeno como se utiliza en el presente documento.

De manera similar, también está incluido en la definición de antígeno en el presente documento un oligonucleótido o polinucleótido (los oligonucleótidos son polinucleótidos de peso molecular relativamente bajo, que normalmente contienen de 2 a 100 nucleótidos) que expresa *in vivo* una proteína inmunogénica o determinante antigénico, tal como en aplicaciones de inmunización con ácido nucleico.

Además, para fines de la presente invención, un "antígeno" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservativa) en la secuencia nativa, siempre y cuando la proteína conserve la capacidad de generar una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de los hospedadores que producen los antígenos.

Una "respuesta inmunológica" contra un antígeno o composición es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o una celular contra moléculas presentes en la composición de interés. Para fines de la presente invención, una "respuesta inmunitaria humoral" se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por moléculas de anticuerpo, mientras que "una respuesta inmunitaria celular" es una mediada por linfocitos T y/u otros leucocitos. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno mediante linfocitos T citotóxicos ("CTL"). Los CTL tienen especificidad por antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas que codifica el complejo principal de histocompatibilidad (MHC: siglas del inglés *major histocompatibility complex*) y se expresan en la superficie de las células. Los CTL ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares o la lisis de células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno mediante linfocitos T auxiliares. Los linfocitos T auxiliares actúan para ayudar a estimular la función y enfocar la actividad de células efectoras no específicas frente a células que presentan antígenos peptídicos en asociación con moléculas del MHC en su superficie. Una "respuesta inmunitaria celular" también se refiere a la producción citocinas, quimiocinas y otras de tales moléculas que producen los linfocitos T activados y/u otros leucocitos, incluyendo los derivados de linfocitos T CD4 + y CD8+. Una composición tal como una composición inmunogénica o vacuna que provoca una respuesta inmunitaria celular puede servir para sensibilizar a un sujeto vertebrado mediante la presentación del antígeno en asociación con moléculas del MHC en la superficie celular. La respuesta inmunitaria mediada por células se dirige a, o cerca, células que presentan antígeno en su superficie. Además, se pueden generar linfocitos T específicos de antígeno para permitir la futura protección de un hospedador inmunizado. La capacidad de un antígeno o composición particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células se puede determinar mediante varios ensayos, tal como mediante ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de linfocitos citotóxicos CTL, mediante el ensayo de linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado o mediante la medición de la producción de citocinas por linfocitos T en respuesta a la reestimulación con el antígeno. Tales ensayos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Erickson y col., J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doe y col., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376. El antígeno de interés también puede provocar una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos. Por lo tanto, una respuesta inmunitaria puede incluir uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos por linfocitos B y/o la activación de linfocitos T supresores y/o linfocitos T γδ dirigidos específicamente contra un antígeno o antígenos presentes en la composición o vacuna de interés. Estas respuestas pueden servir para neutralizar la infectividad y/o mediar el anticuerpo-complemento, o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) para proporcionar protección a un hospedador inmunizado. Tales respuestas se pueden determinar utilizando inmunoensayos convencionales y ensayos de neutralización bien conocidos en la técnica, por ejemplo radioinmunoensayos y ELISA.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención presentan "inmunogenicidad potenciada" cuando poseen una mayor capacidad de provocar una respuesta inmunitaria mayor que la respuesta inmunitaria generada mediante una cantidad equivalente del antígeno en una composición distinta. Por lo tanto, una composición puede presentar "inmunogenicidad potenciada", por ejemplo, debido a que la composición genera una respuesta inmunitaria más fuerte o debido a que es necesaria una dosis de antígeno más baja para lograr una respuesta inmunitaria en el sujeto al cual se administra. Tal inmunogenicidad potenciada se puede determinar, por ejemplo, administrando a animales las composiciones de la invención y antígenos de control, y comparando los resultados de los dos ensayos.

Como se utiliza en el presente documento, “tratamiento” (incluyendo variaciones del mismo, por ejemplo, “tratar” o “tratado”) se refiere a cualquiera de (i) la prevención de un patógeno o un trastorno en cuestión (por ejemplo, cáncer o una infección patogénica, como con una vacuna tradicional), (ii) la reducción o eliminación de síntomas, y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o del trastorno en cuestión. El tratamiento se puede efectuar de forma profiláctica (antes de la llegada del patógeno o trastorno en cuestión) o de forma terapéutica (después de la llegada del mismo).

Las expresiones “cantidad eficaz” o “cantidad farmacéuticamente eficaz” de una composición inmunogénica de la presente invención se refieren en el presente documento a una cantidad suficiente de la composición inmunogénica para tratar un trastorno de interés. La cantidad exacta necesaria variará de sujeto a sujeto, dependiendo, por ejemplo, de la especie, edad y estado general del sujeto; la gravedad de la afección a tratar; el antígeno particular de interés; en el caso de una respuesta inmunológica, la capacidad del sistema inmunitario del sujeto para sintetizar anticuerpos, por ejemplo, y el grado de protección deseado; y el modo de administración, entre otros factores. Alguien con habilidades ordinarias en la técnica puede determinar una cantidad “eficaz” apropiada en cualquier caso individual. Por lo tanto, una “cantidad terapéuticamente eficaz” normalmente estará incluida en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar a través de experimentos de rutina.

Por “sujeto vertebrado” o “animal vertebrado” se entiende cualquier miembro del *subfilo Chordata*, que incluye, pero sin limitación, mamíferos tales como ganado bovino, ovejas, cerdos, cabras, caballos y seres humanos; animales domésticos tales como perros y gatos; y aves, que incluyen aves domésticas, silvestres y de caza, tales como gallos y gallinas incluyendo pollos, pavos y otras aves gallináceas. El término no indica una edad particular. Por lo tanto, se incluye a animales adultos y recién nacidos.

Por “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable” se entiende un material que no es biológicamente o de otra forma no conveniente, es decir, el material se puede administrar a un individuo sin provocar en el individuo algún efecto biológico excesivamente no conveniente, o sin que interactúe de una manera excesivamente nociva con alguno de los componentes de la composición en la cual está contenido.

El término “excipiente” se refiere a cualquier sustancia esencialmente accesoria que puede estar presente en la forma de dosificación acabada. Por ejemplo, el término “excipiente” incluye vehículos, aglutinantes, disgregantes, rellenos (diluyentes), lubricantes, emolientes (potenciadores del flujo), coadyuvantes de compresión, colores, edulcorantes, conservantes, agentes de suspensión/dispersión, formadores/recubrimientos de película, saborizantes y tintas de impresión.

Por “pH fisiológico” o un “pH en el intervalo fisiológico” se entiende un pH en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 8,0 inclusive, más normalmente en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 7,6 inclusive.

Como se utiliza en el presente documento, la frase “construcción de vector” se refiere en general a cualquier conjunto que tenga la capacidad de dirigir la expresión de una secuencia (o secuencias) de ácido nucleico o de un gen (o genes) de interés. Una construcción de vector normalmente incluye un elemento (o elementos) promotor/potenciador transcripcional o de definición de locus, u otros elementos que controlen la expresión génica mediante otros medios tales como corte y empalme alternativo, exportación de ARN nuclear, modificaciones post traduccionales del mensajero, o modificaciones post transcripcionales de la proteína. Además, la construcción de vector normalmente incluye una secuencia que, cuando se transcribe, está unida operativamente a la secuencia (o secuencias) o gen (o genes) de interés y actúa como una secuencia de iniciación de la traducción. La construcción de vector puede también incluir de forma opcional una señal que dirige la poliadenilación, un marcador de selección, así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de la traducción. Además, si la construcción de vector está emplazada en un retro virus, la construcción de vector puede incluir una señal de empaquetamiento, repeticiones terminales largas (LTR) y sitios de unión de cebador en la cadena positiva y negativa apropiados para el retrovirus utilizado (si estos no están ya presentes).

Una “construcción de vector de ADN” se refiere a una molécula de ADN que tiene la capacidad de dirigir la expresión de una secuencia (o secuencias) de ácido nucleico o un gen (o genes) de interés.

Un tipo específico de construcción de vector de ADN es un plásmido, que es una molécula de ADN episomal circular que tiene la capacidad de replicación autónoma en una célula hospedadora. Normalmente, un plásmido es un ADN bicatenario circular cerrado en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. pCMV es un plásmido específico que es bien conocido en la técnica. Un vector pCMV preferente es uno que contiene el potenciador/promotor temprano inmediato del CMV y un terminador de la hormona de crecimiento bovina. Se describe en detalle en Chapman, B. S., y col. 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, las cuales son a base de virus de ARN. Estas construcciones de vector de ADN normalmente comprenden un promotor que funciona en una célula eucariótica, hacia el 5’ de una secuencia de ADNc para la que el producto de transcripción es una construcción de vector de ARN (por ejemplo, un replicón vector de ARN de alfavirus), y una región de terminación 3’. Preferentemente, la construcción de vector de ARN comprende un genoma de ARN procedente de un piconavirus, togavirus, flavivirus, coronavirus, paramyxovirus,

virus de la fiebre amarilla o alfavirus (por ejemplo, virus Sindbis, virus del bosque Semliki, virus de la encefalitis equina venezolana o virus del río Ross), que se ha modificado mediante el reemplazo de uno o más genes de proteínas estructurales por una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un producto de interés. Las construcciones de vector de ARN se pueden obtener mediante transcripción *in vitro* a partir de un molde de ADN. Los ejemplos específicos incluyen plásmidos basados en virus Sindbis (pSIN) tales como pSINCP, descrito, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 5.814.482 y 6.015.686, así como en las solicitudes de patente internacional 97/38087, WO 99/18226 y WO 02/26209 del mismo solicitante. Las construcciones de tales vectores se describen en general en las patentes de Estados Unidos 5.814.482 y 6.015.686.

Otros ejemplos de construcciones de vector incluyen construcciones de vector de ARN (por ejemplo, construcciones de vector de alfavirus) y similares. Como se utiliza en el presente documento, “construcción de vector de ARN”, “replicón vector de ARN” y “replicón” se refieren a una molécula de ARN que tiene la capacidad de dirigir su propia amplificación o su autoreplicación *in vivo,* normalmente en una célula diana. La construcción de vector de ARN se utiliza directamente, sin la necesidad de introducir ADN en una célula y del transporte al núcleo, en donde ocurriría la transcripción. Utilizando el vector de ARN para la administración directa en el citoplasma de la célula hospedadora, la replicación autónoma y la traducción de la secuencia de ácido nucleico heteróloga se produce de forma eficaz.

B. Procedimientos generales

1. Composiciones de micropartícula

Los polímeros útiles para formar las composiciones de micropartículas inmunogénicas descritas en el presente documento incluyen mezclas de homopolímeros, copolímeros y polímeros obtenidos de los siguientes: ácido polihidroxibutírico (también conocido como polihidroxibutirato); ácido polihidroxivalérico (también conocido como polihidroxivalerato); ácido poliglicólico (PGA) (también conocido como poliglicólido); ácido poliláctico (PLA) (también conocido como poliláctido); polidioxanona; policaprolactona; poliortoéster y polianhídrido. Los más típicos son los poli(α-hidroxi ácidos), tales como poli(-láctido), poli(D,L-láctido) (ambos denominados como “APLA” en el presente documento), poli(hidroxibutiratos), copolímeros de láctido y glicólido, tales como poli(D,L-láctido-co-glicólidos) (denominados como “PLG” en el presente documento), o copolímeros de D-L-láctido o caprolactona.

Los polímeros anteriores están disponibles en una diversidad de pesos moleculares y un experto en la materia determinará fácilmente el peso molecular apropiado para un dado uso. Por lo tanto, por ejemplo, un peso molecular apropiado para PLA puede estar en el orden de aproximadamente 2.000 a 5.000. Un peso molecular apropiado para PLG puede variar de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 200.000, normalmente aproximadamente 15.000 a aproximadamente 150.000.

Pueden estar disponibles copolímeros con una diversidad de proporciones de monómeros y la proporción es en gran medida una cuestión de elección, dependiendo en parte de cualquier especie coadministrada adsorbida y/o inmovilizada y de la velocidad de degradación deseada. Por ejemplo, un polímero de PLG 50:50 que contiene D,L-láctido al 50 % y glicólido al 50 %, proporcionará un copolímero de reabsorción rápida. Las mezclas de micropartículas con proporciones láctido:glicólido variables pueden también hallar uso en el presente documento para conseguir las cinéticas de liberación deseadas. La velocidad de degradación de las micropartículas de la presente invención también puede controlarse mediante factores tales como el peso molecular del polímero y la cristalinidad del polímero.

Los copolímeros de PLG con proporciones de láctido:glicólido y pesos moleculares variables están fácilmente disponibles de forma comercial de varias fuentes que incluyen Boehringer Ingelheim, Alemania y Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL. Algunos copolímeros de PLG ejemplares incluyen: (a) RG 502, un PLG que tiene una proporción molar de láctido/glicólido 50:50 y un peso molecular de 12.000 Da; (b) RG 503, un PLG que tiene una proporción molar de láctido/glicólido 50:50 y un peso molecular de 34.000 Da; (c) RG 504, un PLG que tiene una proporción molar de láctido/glicólido 50:50 y un peso molecular de 48.000 Da, (d) RG 752, un PLG que tiene una proporción molar de láctido/glicólido 75:25 y un peso molecular de 22.000 Da y (e) RG 755, un PLG que tiene una proporción molar de láctido/glicólido 75:25 y un peso molecular de 68.000 Da. Los polímeros de PLG también se pueden sintetizar mediante policondensación simple del componente de ácido láctico utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, tales como las descritas en Tabata y col., J. Biomed. Mater. Res. (1988) 22:837-858.

Los polímeros de poli(D,L-láctido-co-glicólido) pueden ser los que tienen un peso molecular que varía de 10.000 a 100.000 Daltons, más normalmente de 20.000 Daltons a 70.000 Daltons.

Las micropartículas se preparan utilizando cualquiera de los diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones en el presente documento pueden utilizarse para fabricar las micropartículas técnicas de evaporación de emulsión/disolvente doble, tales como las descritas en la patente de Estados Unidos N.º 3.523.907 y Ogawa y col., Chem. Pharm. Bull. (1988) 36:1095-1103. Estas técnicas implican la formación de una emulsión primaria que consiste en microgotas de solución de polímero, que posteriormente se mezcla con una fase acuosa continua que contiene un estabilizador/tensioactivo de partícula.

En otras realizaciones, las micropartículas también pueden formarse utilizando secado por pulverización y coacervación, como se describe en, por ejemplo, Thomasin y col., J Controlled Release (1996) 41:131; la patente de

Estados Unidos N.º 2.800.457; Masters, K. (1976) Spray Drying 2ª Ed. Wiley, New York; técnicas de recubrimiento por suspensión de aire, tal como recubrimiento por lavado y recubrimiento Wurster, como se describe en Hall y col., (1980) The A Wurster Process@ in Controlled Release Technologies Methods, Theory, and Applications (A.F. Kydonieus, ed.), Vol. 2, pág. 133-154 CRC Press, Boca Raton, Florida y Deasy, P.B., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. (1988) S (2):99-139; y gelificación iónica como se describe en, por ejemplo, Lim y col., Science (1980) 210:908-910.

En realizaciones preferentes, para formar las micropartículas se puede utilizar un sistema de evaporación de disolvente de agua en aceite en agua (a/a/a), según los criterios descritos en O'Hagan y col., Vaccine (1993) 11:965-969, el documento PCT/US99/17308 (WO 00/06123) para O'Hagan y col. y Jeffery y col., Pharm. Res. (1993) 10:362.

En general, se disuelve PLG en un disolvente orgánico, tal como acetato de etilo, dimetilcloruro (también denominado cloruro de metileno o diclorometano), acetonitrilo, acetona, cloroformo y similares. El polímero normalmente se proporcionará en una solución aproximadamente del 1-30 %, más normalmente aproximadamente del 2-15 %, incluso más normalmente aproximadamente del 3-10 % y muy normalmente, aproximadamente del 4-8 %, en disolvente orgánico. Después, la solución de polímero se combina con un primer volumen de solución acuosa y se emulsifica para formar una emulsión de aceite/agua. 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 tampón de citrato de sodio/ácido etilendiaminotetracético (citrato de sodio/EDTA). Estas últimas soluciones pueden (a) proporcionar una tonicidad, es decir, osmolalidad, que es esencialmente la misma que la de los líquidos fisiológicos normales y (b) mantener un pH compatible con las condiciones fisiológicas normales. Como alternativa, la tonicidad y/o las características de pH de las composiciones de la presente invención se pueden ajustar después de la formación de las micropartículas y antes de la administración. Preferentemente, la proporción de volumen de solución de polímero con respecto a la solución acuosa varía de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1, más preferentemente aproximadamente 10:1. La emulsificación se realiza utilizando cualquier equipo apropiado para esta tarea y normalmente es un dispositivo de alto cizallamiento tal como, por ejemplo, un homogeneizador.

En algunas realizaciones, están inmovilizados dentro de las micropartículas uno o más componentes adicionales. Por ejemplo, se puede introducir el antígeno adicional y/o los componentes suplementarios descritos a continuación añadiendo los mismos (a) a la solución de polímero, si está en forma soluble en aceite o dispersable en aceite o (b) a la solución acuosa, si está en forma soluble en agua o dispersable en agua.

Después, se combina un volumen de la emulsión de aceite/agua con un segundo volumen más grande de una solución acuosa, que normalmente contiene un tensioactivo. La proporción de volumen de solución acuosa con respecto a la emulsión a/a normalmente varía de aproximadamente 2:1 a 10:1, más normalmente aproximadamente 4:1. Los ejemplos de tensioactivos apropiados para la práctica de la invención se enumeran anteriormente. Los expertos en la materia pueden seleccionar fácilmente los tensioactivos apropiados para el tipo de especie a adsorber. Por ejemplo, las micropartículas fabricadas en presencia de tensioactivos cargados, tales como tensioactivos aniónicos o catiónicos, pueden producir micropartículas con una superficie que tengan una carga negativa neta o una carga positiva neta, las cuales pueden adsorber una amplia diversidad de moléculas. Por ejemplo, las micropartículas fabricadas con tensioactivos aniónicos, tales como dodecil sulfato de sodio (SDS), por ejemplo, micropartículas de SDS-PLG, adsorben especies cargadas positivamente, por ejemplo, especies que contienen polipéptidos tales como proteínas. De forma similar, las micropartículas fabricadas con tensioactivos catiónicos, tales como CTAB, por ejemplo, micropartículas de PLG/CTAB, adsorben especies cargadas negativamente, por ejemplo, especies que contienen polinucleótidos tales como ADN. Cuando las especies a adsorber tengan regiones de carga positiva o negativa, pueden ser apropiados tensioactivos ya sea catiónicos o aniónicos o no aniónicos. Determinadas especies pueden adsorberse más fácilmente a las micropartículas que tengan una combinación de tensioactivos. Además, en algunos casos, puede ser conveniente añadir tensioactivo a la solución orgánica anterior.

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

Después, esta mezcla se homogeniza para producir una emulsión doble a/a/a estable. Cada una de las etapas de homogeneización anteriores se realizan normalmente a temperatura ambiente (es decir, a 25 ºC) o menos, más normalmente, por ejemplo, mientras se enfría en un baño de hielo.

Después se evaporan los disolventes orgánicos. Después de la preparación, las micropartículas se pueden utilizar como están o, por ejemplo, se pueden liofilizar para su uso futuro.

Los parámetros de formulación se pueden manipular para permitir la preparación de pequeñas micropartículas en el orden de 0,05 µm (50 nm) hasta micropartículas más grandes, de 50 µm o incluso más grandes. Véase, por ejemplo, Jeffery y col., Pharm. Res. (1993) 10:362-368; McGee y col., J. Microencap. (1996). Por ejemplo, la agitación reducida normalmente da como resultado micropartículas más grandes, como lo hace un aumento del volumen de la fase interno y un aumento en la concentración del polímero. Normalmente, las partículas pequeñas se producen por el aumento de la agitación, así como por un bajo volumen de la fase acuosa, altas concentraciones de estabilizadores de emulsión y un descenso de la concentración del polímero.

El tamaño de partícula se puede determinar mediante, por ejemplo, dispersión de luz láser, utilizando, por ejemplo, un espectrómetro que incorpora un láser de helio-neón. En general, el tamaño de partícula se determina a temperatura ambiente e implica múltiples análisis de la muestra en cuestión (por ejemplo, 5-10 veces) para producir un valor promedio para el diámetro de partícula. El tamaño de partícula también se determina fácilmente utilizando microscopía electrónica de barrido (MEB).

Después de la preparación, se pueden combinar con las micropartículas una diversidad de componentes, que incluyen antígeno toxoide y/o antígeno que contiene polisacárido, cualesquiera antígenos adicionales y cualesquiera componentes suplementarios como los descritos a continuación y, si se desea, la formulación resultante se puede liofilizar antes del uso. Normalmente, estos componentes se añaden a las micropartículas como una solución o dispersión acuosa. En algunos casos, estas especies llegarán a adsorberse en la superficie de las micropartículas (véase, por ejemplo, los Ejemplos a continuación en los que los antígenos de toxoide se adsorben a la superficie de la micropartícula). El contenido de la especie adsorbida se puede determinar utilizando técnicas convencionales.

Por lo tanto, las micropartículas poliméricas desveladas en el presente documento pueden tener una diversidad de componentes adsorbidos en ellas, así como tener una diversidad de componentes inmovilizados o encapsulados dentro de ellas. Por ejemplo, un experto en la materia puede preparar, de acuerdo con la divulgación, micropartículas que tengan antígenos y/o adyuvantes inmunológicos adsorbidos, además del antígeno toxoide y/o del antígeno que contiene polisacárido adsorbido. Un experto en la materia también puede preparar, de acuerdo con la divulgación, micropartículas que tengan componentes encapsulados, tales como antígenos y/o adyuvantes inmunológicos, además del antígeno toxoide y/o del antígeno que contiene polisacárido adsorbido.

2. Antígenos

La presente divulgación utiliza numerosos antígenos que incluyen antígenos de toxoide del toxoide tetánico, toxoide diftérico o ambos. Un toxoide es una toxina que se ha tratado de forma que se reduce o elimina su toxicidad, mientras conserva una inmunogenicidad adecuada. Comúnmente, los toxoides se fabrican tratando con calor y/o productos químicos las toxinas que produce una bacteria que provoca enfermedad. Por ejemplo, están disponibles de forma comercial toxoides diftérico y tetánico purificados que se han preparado mediante tratamiento con formalina de las exotoxinas de *Corynebacterium diphtheriae* y *Clostridium tetani*, respectivamente.

La presente invención también hallará uso para estimular una respuesta inmunitaria frente a una amplia diversidad de antígenos además de los antígenos de toxoide.

Por ejemplo, pueden utilizarse de forma conveniente en las técnicas descritas en el presente documento los antígenos procedentes de la familia de virus de la hepatitis, incluyendo el virus de la hepatitis A (VHA), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la hepatitis delta (VHD), virus de la hepatitis E (HE) y virus de la hepatitis G (VHG). A modo de ejemplo, es conocida la secuencia genómica viral del VHC, como lo son los procedimientos para la obtención de la secuencia. Véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales N.º WO 89/04669; WO 90/11089 y WO 90/14436. El genoma del VHC codifica varias proteínas virales, que incluyen E1 (también conocida como E) y E2 (también conocida como E2/NSI), y una proteína de la nucleocápside N terminal (denominada “núcleo”) (véase, Houghton y col., Hepatology (1991) 14:381-388, para una discusión sobre las proteínas del VHC, que incluye a E1 y E2). Cada una de estas proteínas, así como los fragmentos antigénicos de las mismas, hallará uso en la presente composición y los procedimientos.

De manera similar, es conocida la secuencia del antígeno δ del VHD (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5.378.814) y este antígeno también puede utilizarse de forma conveniente en la presente composición y los procedimientos. De forma adicional, los antígenos obtenidos del VHB, tales como el antígeno núcleo, sAg, el antígeno de superficie, así como las secuencias de presuperficie, pre-S1 y pre-S2 (anteriormente denominadas pre-S), así como hallarán uso en el presente documento las combinaciones de los anteriores, tales como sAg/pre-S1, sAg/pre-S2, sAg/pre-S1/pre-S2 y pre-S1/pre-S2. Véase, por ejemplo, AHBV Vaccines - from the laboratory to license: a case study@ in Mackett, M. and Williamson, J.D., Human Vaccines and Vaccination, pág. 159-176, para una discusión sobre la estructura del VHB, y las patentes de Estados Unidos N.º 4.722.840, 5.098.704, 5.324.513,

incorporadas en el presente documento como referencia en su totalidad; Beames y col., J. Virol. (1995) 69:6833-6838, Birnbaum y col., J. Virol. (1990) 64:3319-3330 y Zhou y col., J. Virol. (1991) 65:5457-5464.

También se pueden utilizar de forma conveniente en conexión con la presente invención antígenos procedentes de la familia de los virus del herpes, que incluyen proteínas obtenidas del virus del herpes simple (VHS) tipos 1 y 2, tales como las glucoproteínas gB, gD y gH del VHS-1 y el VHS-2; antígenos obtenidos del virus de la varicela zoster (VVZ), virus de Epstein Barr (VEB) y citomegalovirus (CMV) que incluyen gB y gH del CMV, y antígenos obtenidos de otros virus del herpes de ser humano tales como VHH6 y VHH7. (Véase, por ejemplo, Chee y col., Cytomegaloviruses (J.K. McDougall, ed., Springer-Verlag 1990) pág. 125-169, para una revisión del contenido que codifica proteínas del citomegalovirus; McGeoch y col., J. Gen. Virol. (1988) 69:1531-1574, para una discusión sobre las diversas proteínas que codifica el VHS-1; patente de Estados Unidos N.º 5.171.568 para una discusión sobre las proteínas gB y gD del VHS-1 y el VHS-2 y los genes que codifican las mismas; Baer y col., Nature (1984) 310:207-211, para la identificación de las secuencias que codifican proteínas en un genoma del VEB, y Davison y Scott, J. Gen. Virol. (1986) 67:1759-1816, para una revisión del VZV).

También hallarán uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención antígenos obtenidos de otros virus, tales como, pero sin limitación, proteínas de miembros de las familias *Picomaviridae* (por ejemplo, poliovirus, etc.); *Caliciviridae*; *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la rubeola, virus dengue, etc.) *Flaviviridae*; *Coronaviridae*; *Reoviridae*; *Birnaviridae*; *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la rabia, etc.); *Filoviridae*; *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincicial, etc.); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe de los tipos A, B y C, etc.); *Bunyaviridae*; *Arenaviridae*; *Retroviridae* (por ejemplo, HTLV-I; HTLV-II; VHI-1 (también conocido como HTLV-III, VAL, ARV, VLTh, etc.)), incluyendo, pero sin limitación, los antígenos procedentes de los aislados VHT_{IIIb}, MS_{SF2}, VIH_{lav}, VS_{LA} VIH_{MN}); $VIH\text{-}1_{CM235}$, $VIH\text{-}1_{US4}$; VIH-2; virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS), entre otros. De forma adicional, los antígenos también pueden obtenerse del virus del papiloma humano (VPH) y de los virus de la encefalitis transmitida por garrapatas. Véase, por ejemplo, Virology, 3ª Edición (W.K. Joklik ed. 1988); Fundamental Virology, 2ª Edición (B.N. Fields y D.M. Knipe, eds. 1991), para una descripción de estos y otros virus.

De forma más particular, son conocidas y se han descrito las proteínas de la envoltura gp120 o gp140 de cualquiera de los aislados del VIH anteriores, que incluyen miembros de diversos subtipos genéticos del VIH (véase, por ejemplo, Myers y col., Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico (1992); Myers y col., Human Retroviruses and Aids, 1990, Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory y Modrow y col., J. Virol. (1987) 61:570-578, para una comparación de las secuencias de la envoltura de una diversidad de aislados del VIH) y los antígenos obtenidos de cualquiera de estos aislados hallarán uso en los presentes procedimientos. Además, la invención es igualmente aplicable a otras proteínas inmunogénicas obtenidas de cualquiera de los diversos aislados del VIH, que incluyen cualquiera de las diversas proteínas de la envoltura, tales como gp160 y gp41, antígenos gags 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 sería particularmente útil. Concretamente, las glucoproteínas de la envoltura HA y NA de la gripe A son de particular interés para la generación de una respuesta inmunitaria. Se han identificado numerosos subtipos de la HA de la gripe A (Kawaoka y col., Virology (1990) 179:759-767; Webster y col., "Antigenic variation among type A influenza viruses," pág. 127-168. en: P. Palese y D.W. Kingsbury (ed.), Genetics of influenza viruses. Springer-Verlag, New York). Por lo tanto, las proteínas obtenidas de cualquiera de estos aislados también pueden utilizarse en las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento.

Las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento también hallarán uso con numerosos antígenos bacterianos, tales como estos obtenidos de los organismos que provocan la difteria (discutido adicionalmente más adelante), cólera, carbunco, tuberculosis, tétanos (discutido adicionalmente más adelante), tos ferina, meningitis y otros estados patogénicos, que incluyen, pero sin limitación *Bordetella pertussis, Neisseria meningitides* (A, B, C, Y), *Neisseria gonorrhoeae, Helicobacter pylori* y *Haemophilus influenza. Haemophilus influenza* tipo B (HIB), *Helicobacter pylori* y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de antígenos de *Neisseria meningitides* B se desvelan en las siguientes solicitudes de patente del mismo propietario que la presente: WO99/57280; WO99/24578y WO99/36544. Los ejemplos de antígenos parasitarios incluyen los obtenidos de los organismos que provocan la malaria y la enfermedad de Lyme.

Los antígenos adicionales incluyen antígenos dirigidos a la plaga, la fiebre maculosa de las Montañas Rocosas, viruela, fiebre tifoidea, tifus, virus de la leucemia felina y la fiebre amarilla.

Los antígenos adicionales para su uso con la invención, que no necesariamente son exclusivos de los enumerados en cualquier sitio en la presente solicitud, incluyen los siguientes: (a) un antígeno de proteína de *N. meningitidis* serogrupo B, tal como los de las Ref. 1 a 7 a continuación; (b) una preparación de vesículas de membrana externa (VME) *N. meningitidis* serogrupo B, tal como los desvelados a continuación en las Ref. 8, 9, 10, 11, etc.; (c) un antígeno de sacárido de *N. meningitidis* serogrupo A, C, W135 y/o Y, tal como el oligosacárido del serogrupo C desvelado en la Ref. 12 a continuación (véase también la Ref. 13); (d) un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, las Ref. 14, 15, 16], (e) un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ejemplo, las Ref. 1, 2, 3]; (e)

un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo, las Ref. 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]; (f) un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo, la Ref. 24]; (g) un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como virus inactivado [por ejemplo, las Ref. 25, 26]; (h) un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o núcleo [por ejemplo., las Ref. 26, 27]; (i) un antígeno del virus de la hepatitis C [por ejemplo, la Ref. 28]; (j) un antígeno de *Bordetella pertussis,* tal como la holotoxina de pertussis (TP) y la hemaglutinina filamentosa (HAF) de *B. pertussis,* opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, las Ref. 29 y 30]; (k) un antígeno de difteria, tal como el toxoide diftérico [por ejemplo, capítulo 3 de la Ref. 31] por ejemplo, el mutante CRM_{197} [por ejemplo, la Ref. 32] (discutido adicionalmente anteriormente); (1) un antígeno del tétanos, tal como un toxoide tetánico [por ejemplo, capítulo 4 de la Ref. 31] (discutido adicionalmente anteriormente); (m) un antígeno de proteína de *Helicobacter pylori* tal como CagA [por ejemplo, la Ref. 33], VacA [por ejemplo, la Ref. 33], NAP [por ejemplo, la Ref. 34], HopX [por ejemplo, la Ref. 35], HopY [por ejemplo, la Ref. 35] y/o ureasa; (n) un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo, la Ref. 13]; (o) un antígeno de *Porphyramonas gingivalis* [por ejemplo, la Ref. 36]; (p) antígeno (o antígenos) de la polio [por ejemplo, las Ref. 37, 38] tal como VPI o VPO; (q) antígeno (o antígenos) de la rabia [por ejemplo, la Ref. 39] tal como virus inactivado liofilizado [por ejemplo, la Ref. 40, Rabavert™); (r) antígenos del sarampión, paperas y/o rubeola [por ejemplo, capítulos 9, 10 y 11 de la Ref. 31]; (s) antígeno (o antígenos) de la gripe [por ejemplo, capítulo 19 de la Ref. 31], tal como las proteínas de superficie hemaglutinina y/o neuraminidasa; (t) un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo, tiempo 41]; (u) un antígeno de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del Grupo B) [por ejemplo, las Ref. 42, 43]; (v) un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococus del Grupo A) [por ejemplo, las Ref. 43 ,44, 45]; (w) un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo, la Ref. 46]; y (x) composiciones que comprenden uno o más de estos antígenos. Cuando se utiliza un antígeno de sacárido o carbohidrato, preferentemente está conjugado con una proteína transportadora para potenciar la inmunogenicidad, por ejemplo, las Ref. 47 a 56]. Las proteínas transportadoras preferentes son toxinas o toxoides bacterianos, tales como los toxoides diftérico o tetánico. Es particularmente preferente el toxoide diftérico CRM_{197}. Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [por ejemplo, la Ref. 57], péptidos sintéticos [por ejemplo, la Ref. 58, 59], proteínas de choque térmico [por ejemplo, la Ref. 60], proteínas de pertussis [por ejemplo, las Ref. 61, 62], proteína D de *H. influenzae* [por ejemplo, la Ref. 63], toxina A o B de *C. difficile* [por ejemplo, la Ref. 64], etc. Cuando una mezcla comprenda sacáridos capsulares de los dos serogrupos A y C, es preferente que la proporción (p/p) de sacárido MenA:sacárido MenC sea mayor que 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o más elevado). Los sacáridos de distintos serogrupos de *N. meningitidis* pueden conjugarse a las mismas o a distintas proteínas transportadoras. Cuando sea necesario, se puede utilizar cualquier reacción de conjugación adecuada con cualquier enlazador adecuado. Cuando sea necesario, los antígenos de proteínas tóxicas pueden detoxificarse (por ejemplo, la detoxificación de la toxina de pertussis mediante medios químicos [Ref. 30]. Véase: la solicitud de patente internacional 99/24578 [Ref. 1]; solicitud de patente internacional WO99/36544 [Ref. 2]; solicitud de patente internacional WO99/57280 [Ref. 3]; solicitud de patente internacional WO00/22430 [Ref. 4]; Tettelin y col., (2000) Science 287:1809-1815 [Ref. 5]; solicitud de patente internacional WO96/29412 [Ref. 6]; Pizza y col. (2000) Science 287:1816-1820 [Ref. 7]; solicitud de patente internacional WO01/52885 [Ref. 8]; Bjune y col. (1991) Lancet 338(8775):1093-1096 [Ref. 9]; Fukasawa y col. (1990) Vaccine 17:2951-2958 [Ref. 10]; Rosenqvist y col. (1998) Dev. Biol. Stand. 92:323-333 [Ref. 11]; Costantino y col. (1992) Vaccine 10:691-698 [Ref. 12]; Costantino y col. (1999) Vaccine 17:1251-1263 [Ref. 13]; Watson (2000) Padiatr Infect Dis J 19:331-332 [Ref. 14]; Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47;269-285, v [Ref. 15]; Jedrzejas (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207 [Ref. 16]; solicitud de patente internacional presentada el 3 de julio de 2001 que reivindica la prioridad del documento GB-0016363.4 [Ref. 17]; Kalman y col. (1999) Nature Genetics 21 :385-389 [Ref. 18]; Road y col. (2000) Nucleic Acids Res 28:1397-406 [Ref. 19]; Shirai y col. (2000) J. Infect. Dis. 181 (Sup. 3):S524-S527 [Ref. 20]; solicitud de patente internacional WO99/27105 [Ref. 21]; solicitud de patente internacional WO00/27994 [Ref. 22]; solicitud de patente internacional WO00/37494 [Ref. 23]; solicitud de patente internacional WO99/28475 [Ref. 24]; Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19:1187-1188 [Ref. 25]; Iwarson (1995) APMIS 103:321-326 [Ref. 26]; Gerlich y col. (1990) Vaccine 8 Sup.:S63-68 & 79-80 [Ref. 27]; Hsu y col. (1999) Clin Liver Dis 3:901-915 [Ref. 28]; Gustafssou y col. (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355 [Ref. 29]; Rappuoli y col. (1991) TIBTECH 9:232-238 [Ref. 30]; Vaccines (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0 [Ref. 31]; Del Guidice y col. (1998) Molecular Aspects of Medicine 19:1-70 [Ref. 32]; solicitud de patente internacional WO93/18150 [Ref. 33]; solicitud de patente internacional WO99/53310 [Ref. 34]; solicitud de patente internacional WO98/04702 [Ref. 35]; Ross y col. (2001) Vaccine 19:4135-4142 [Ref. 36]; Sutter y col. (2000) Pediatr Clin North Am 47:287-308 [Ref. 37]; Zimmerman y Spann (1999) Am Fam Physician 59:113-118, 125-126 [Ref. 38]; Dreesen (1997) Vaccine 15 Sup.:S2-6 [Ref. 39]; MMWR Morb Mortal Wkly Rep 16 de enero de 1998;47(1):12, 19 [Ref. 40]; McMichael (2000) Vaccine 19 Sup. 1:S101-107 [Ref. 41]; Schuchat (1999) Lancet 353(9146):51-6 [Ref. 42]; solicitudes de patente de GB 0026333.5, 0028727.6 y 0105640.7 [Ref. 43]; Dale (1999) Infect Dis Clin North Am 13:227-43, viii [Ref. 44]; Ferretti y col. (2001) PNAS EE. UU. 98:4658-4663 [Ref. 45]; Kuroda y col. (2001) Lancet 357(9264):1225-1240; véanse también las páginas 1218-1219 [Ref. 46]; Ramsay y col. (2001) Lancet 357(9251):195-196 [Ref. 47]; Lindberg (1999) Vaccine 17 Sup. 2:S28-36 [Ref. 48]; Buttery y Moxon (2000) J R Coll Physician London 34:163-168 [Ref. 49]; Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-133, vii [Ref. 50]; Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567 [Ref. 51]; patente europea 0 477 508 [Ref. 52]; patente de Estados Unidos N.º 5.306.492 [Ref. 53]; solicitud de patente internacional WO98/42721 [Ref. 54]; Conjugate Vaccines (eds. Cruse y col.) ISBN 3805549326, en particular el vol. 10:48-114 [Ref. 55]; Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 0123423368 y 012342335X [Ref. 56]; solicitud de patente europea 0372501 [Ref. 57]; solicitud de patente europea 0378881 [Ref. 58]; solicitud de patente europea 0427347 [Ref. 59]; solicitud de patente internacional WO93/17712 [Ref. 60]; solicitud de patente internacional WO98/58668 [Ref. 61]; solicitud de

patente europea 0471177 [Ref. 62]; solicitud de patente internacional WO00/56360 [Ref. 63]; solicitud de patente internacional WO00/61761 [Ref. 64].

3. Componentes suplementarios

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención opcionalmente incluyen una diversidad de componentes suplementarios. Tales componentes suplementarios incluyen: (a) productos farmacéuticos tales como antibióticos y gentes antivirales, fármacos anti inflamatorios no esteroides, analgésicos, vasodilatadores, fármacos cardiovasculares, psicofármacos, neurolépticos, antidepresivos, fármacos contra el Parkinson, betabloqueantes, bloqueantes de los canales de calcio, inhibidores de la bradicinina, inhibidores de la ECA, 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 y IGF-2, FGF, (b) hormonas que incluyen hormonas peptídicas tales como insulina, proinsulina, hormona de crecimiento, GHRH, LHRH, EGF, somatostatina, SNX-111, BNP, insulinotropina, ANP, FSH, LH, PSH y GCh, hormonas esteroideas gonadales (andrógenos, estrógenos y progesterona), hormona estimulante de la tiroides, inhibina, colecistocinina, ACTH, CRF, dinorfinas, endorfinas, endotelina, fragmentos de fibronectina, galanina, gastrina, insulinotropina, glucagón, fragmentos de la proteína de unión a GTP, guanilina, las leucocininas, magainina, mastoparanos, dermaseptina, sistemina, neuroomedinas, neurotensina, pancreastatina, polipéptido pancreático, sustancia P, secretina, timosina y similares (c) enzimas, (d) mediadores de la transcripción o la traducción, (e) intermediarios en rutas metabólicas, (f) inmunomoduladores, tales como cualquiera de las diversas citosinas incluyendo interleucina-1, interleucina-2, interleucina-3, interleucina-4 e interferón gamma, y (g) adyuvantes inmunológicos suplementarios, tales como los descritos a continuación.

Tales componentes suplementarios pueden, por ejemplo, adsorberse en la superficie de las micropartículas, inmovilizarse dentro las micropartículas, disolverse o dispersarse en solución mientras no están unidos a las micropartículas, adsorberse a o inmovilizarse dentro de otro grupo de micropartículas, y etcétera.

Los adyuvantes inmunológicos suplementarios pueden utilizarse para potenciar la eficacia de las composiciones inmunogénicas. Por ejemplo, tales adyuvantes inmunológicos pueden administrarse simultáneamente con las composiciones inmunogénicas de la presente invención, por ejemplo, en la misma composición o en composiciones distintas. Como alternativa, tales adyuvantes se pueden administrar 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 debe indicarse que las sales de aluminio están asociadas con reacciones locales como se discutió anteriormente y por lo tanto son menos preferentes en algunas realizaciones de la invención; (2) otras formulaciones de emulsión de aceite en agua (con y sin otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como muramil péptidos (véase a continuación) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo, (a) MF59 (publicación internacional N.º WO90/14837; Capítulo 10 en Vaccine design: the subunit an adjuvant approach, Eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995), que contiene escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 80 al 0,5 % (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE (véase a continuación), aunque no es necesario) formulado en partículas submicrométricas utilizando un microfluidificador tal como el microfluidificador Model 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, polímero bloqueado por pluronic L121 al 5 % y thr-MDP (véase a continuación) ya sea microfluidificado en una emulsión submicrométrica o sometido a agitación vorticial para generar una emulsión con tamaño de partícula más grande y (c) sistema adyuvante RibiJ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 % y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de pared celular (EPC), preferentemente MPL + EPC (DetoxJ) (para una discusión adicional sobre emulsiones de aceite en agua submicrométricas adecuadas para su uso en el presente documento, véase la solicitud de patente n.º 09/015.736, del mismo solicitante, presentada el 29 de enero de 1998); (3) pueden utilizarse adyuvantes de saponina, tales como Quil A o QS21 (por ejemplo, StimulonJ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA)) o partículas generadas da partir de las mimas tales como ISCOM (complejos inmunoestimuladores), en que los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional, por ejemplo, documento WO00/07621; (4) Adyuvante Completo de Freund (ACF) y Adyuvante Incompleto de Freund (AIF); (5) citosinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (documento WO99/44636), etc.), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (6) adyuvantes de fosfolípido, que incluyen adyuvantes de fosfato de lipopolisacárido y liposacárido, por ejemplo, monofosforil lípido A (MPL), MPL 3-O-deacilado (3dMPL) por ejemplo, documentos GB-2220221, EP-A-0689454, de forma opcional en la ausencia sustancial de alumbre cuando se utiliza con sacáridos neumocócicos, por ejemplo, documento WO00/56358; así como compuestos de fosfato de aminoalquil glucosamina, tales como los descritos en la patente de Estados Unidos N.º 6.355.257; (7) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua, por ejemplo, documentos EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (8) oligonucleótidos que comprenden motivos CpG (Roman y col., Nat. Med., 1997, 3, 849-854; Weiner y col., PNAS EE. UU., 1997, 94, 10833-10837; Davis y col., J. Immunol. 1988, 160, 870-876; Chu y col., J. Exp. Med., 1997, 186, 1623-1631; Lipford y col., Eur. J. Immunol. 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu y col., Vaccine, 1988, 16, 1216-1224, Krieg y col., Nature, 1995, 374, 546-549; Klinman y col., PNAS EE. UU., 1996, 93, 2879-2883: Ballas y col., J. Immunol., 1996, 157,

1840-1845; Cowdery y col., J. Immunol., 1996, 156, 4570-4575; Halpern y col., Cell. Immunol., 1996, 167, 72-78; Yamamoto y col., Jpn. J Cancer Res., 1988, 79, 866-873; Stacey y col., J. Immunol, 1996, 157, 2116-2122; Messina y col., J. Immunol., 1991, 147, 1759-1764; Yi y col., J. Immunol., 1996, 157, 4918-4925; Yi y col., J. Immunol., 1996, 157, 5394-5402; Yi y col., J. Immunol., 1998, 160, 4755-4761; y Yi y col., 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 por lo menos un dinucleótido CG (un nucleótido citocina seguido de un nucleótido guanosina), utilizándose de forma opcional 5 metilcitosina en lugar de citocina; (9) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno, por ejemplo, documento WO99/52549; (10) un tensioactivo de éster de polioxietileno sorbitán en combinación con un octoxinol (documento WO01/21207) o un tensioactivo éter o éster de polioxietileno alquilo en combinación con por lo menos un tensioactivo no iónico adicional, tal como un octoxinol (documento WO01/21152); (11) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulador (por ejemplo, un oligonucleótido CpG) (documento WO00/62800); (12) un inmunoestimulador y una partícula de sal metálica, por ejemplo documento WO00/23105; (13) una saponina y una emulsión de aceite en agua, por ejemplo documento WO99/11241; (14) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (de forma opcional + un esterol) por ejemplo, documento WO98/57659; (15) mutantes destoxificados de una toxina riboxiladora de ADP bacteriana tal como una toxina del cólera (TC), una toxina de pertussis (TP), o una toxina termolábil de *E. coli* (LT), en particular LT-K63 (donde la lisina se sustituye por el aminoácido del tipo silvestre en la posición 63), LT-R72 (donde la arginina se sustituye por el aminoácido de tipo silvestre en la posición 72), CT-S109 (donde la serina se sustituye por el aminoácido de tipo silvestre en la posición 109), y PT-K9/G129 (donde la lisina se sustituye por el aminoácido de tipo silvestre en la posición 9 y la glicina se sustituye en la posición 129) (véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales n.º WO93/13202 y WO92/19265); (16) aminoalquil glucosaminida 4-fosfato (AGP), véase, por ejemplo, Johnson, D.A. y col.; Bioorg. Med. Chem. Lett., 2 de agosto de 1999; 9(15):2273-8, (17) imidazoquinolinas tales como imiquimod (R-837) y resiquimod (R-848), véase, por ejemplo, Vasilakos, J.P. y col.; Cell. Immunol. 25 de agosto de 2000; 204(1):64-74, (18) miméticos de lipopolisacáridos (incluyendo miméticos de monofosforil lípido A), tales como fosfolípidos no sacáridos (por ejemplo, análogos de lípido A simplificados que carecen de un disacárido) descritos en Hawkins, L.D. y col.; J. Pharmacol. Exp. Ther., febrero de 2002; 300(2):655-61 y patente de Estados Unidos n.º 6.290.973; (19) adyuvantes que comprenden ARN bicatenario ("ARNbc") natural o sintético, que en general está conformado por pares de bases discontinuas de ácido riboguanílico-ácido ribocitidílico ([rG-rC]) y ácido riboadenílico-ácido polirribouridílico ([rA-rU]); para información adicional, véase, por ejemplo, el documento PCT/US02/30423 del mismo solicitante; y (20) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores para potenciar la eficacia de la composición.

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

Para 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

Las composiciones de la presente invención en general 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 de humectación o emulsionantes, sustancias tamponadoras biológicas y similares. Un tampón biológico puede ser virtualmente cualquier solución que sea farmacológicamente aceptable y que proporcione la formulación con el pH deseado, es decir, un pH en el intervalo fisiológico. Los ejemplos incluyen solución salina, diversos tampones que incluyen tampones fosfato, tampones citrato, tampones borato, tampones succinato y tampones histidina, así como combinaciones de solución salina tamponada, que incluyen solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris, solución salina tamponada de Hank y similares.

Dependiendo de la forma de dosificación final, pueden introducirse también otros excipientes conocidos en la técnica, que incluyen aglutinantes, desintegrantes, rellenos (diluyentes), lubricantes, emolientes (potenciadores de flujo), coadyuvantes de compresión, colores, edulcorantes, conservantes, agentes de suspensión/dispersión, formadores/recubrimientos de película, saborizantes y tintas de impresión.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyección (que puede ser sin aguja). Las composiciones se pueden inyectar, por ejemplo, por vía subcutánea, vía intraperitoneal, vía intravenosa, vía intraarterial, vía intradérmica o vía intramuscular. Otros modos de administración incluyen la nasal, en las mucosas, intraocular, rectal, vaginal, oral y pulmonar, supositorios, y las aplicaciones transdérmica o transcutánea.

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para la administración que actúa sobre un sitio específico. Por ejemplo, la administración intravenosa de las composiciones puede utilizarse para actuar sobre el pulmón, hígado, bazo, torrente sanguíneo o médula ósea.

El tratamiento puede realizarse de acuerdo con un programa de única dosis o un programa de múltiples dosis. Un programa de múltiples dosis es uno en el que se puede proporcionar un ciclo primario de administración, seguido de una o más dosis adicionales proporcionadas a intervalos de tiempos posteriores, elegidos para mantener y/o reforzar la respuesta terapéutica. También, el régimen de dosificación se determinará, por lo menos en parte, por la necesidad del sujeto y dependerá del juicio del facultativo.

Como se indicó anteriormente, la presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas inmunogénicas, que comprenden micropartículas poliméricas biodegradable que tiene adsorbidas en ellas antígenos de toxoide y/o que contienen polisacárido. Como se también se indicó, las composiciones son aplicables a una amplia serie de vacunas, que incluyen vacunas dirigidas a un amplio conjunto de patógenos o tumores.

Por lo tanto, las composiciones beneficiosas incluyen las que contienen los siguientes antígenos, ya sea de forma separada o en diversas combinaciones: antígeno tetánico (por ejemplo, antígeno del toxoide tetánico), antígeno diftérico (por ejemplo, antígeno del toxoide diftérico), antígenos de la hepatitis (que incluyen antígenos de VHA, VHB, VHC, VHD, VHE y VHG), antígenos del virus de la varicela (varicela), antígenos del sarampión, antígenos de las paperas, antígenos de la rubeola, antígenos de la gripe, antígenos meningocócicos (que incluyen antígenos de meningitis A, meningitis B, meningitis C, meningitis W y meningitis Y), antígenos diftéricos, antígenos de pertussis, antígenos tetánicos, antígenos de Hib y antígenos neumocócicos.

Están actualmente disponibles numerosos de tales antígenos, por ejemplo: (A) están disponibles antígenos de hepatitis B de ADN recombinante (HbsAg), que se fabrican insertando en levaduras una parte del genoma del VHB. (B) están disponibles antígenos del virus de la varicela zoster, preparados comúnmente a partir de virus de la varicela liofilizado vivo atenuado, denominado la cepa Oka. (C) están disponibles antígenos del virus de la polio, que corresponden ya sea a virus de la polio inactivado o vivo, normalmente siendo preferentes los antígenos de virus de la polio inactivado (VPI). Los antígenos del VPI normalmente son productos inactivados por formalina que se producen en células, por ejemplo células Vero o células diploides de ser humano, y comúnmente corresponden a tres tipos silvestres del virus de la polio. (D) antígenos del virus del sarampión vivo, frecuentemente preparados a partir de las cepas Edmonston B que se han atenuado adicionalmente a partir de la cepa original (por ejemplo, cepas Moraten, Edmonston-Zagreb, Schwarz y Connaught). Los antígenos de sarampión comúnmente se preparan en cultivos celulares de fibroblastos de pollo o en fibroblastos de ser humano. (E) los antígenos del virus de las paperas son normalmente antígenos de virus normalmente vivo atenuado. Con frecuencia se preparan a partir de la cepa de virus atenuada Jeryl Lynn y con frecuencia se crecen en cultivos de células embrionarias de pollo. (F) los antígenos del virus de la rubeola normalmente también son antígenos de virus vivo atenuado. Un antígeno del virus de la rubeola actualmente conocido corresponde a la cepa de virus de vivo atenuado RA 27/3, y se prepara en cultivos de células diploides de ser humano. (G) el antígeno de la gripe se prepara con frecuencia 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 las glucoproteínas de superficie. Los antígenos comúnmente se seleccionan de dos cepas de gripe A y una cepa de gripe B. Las cepas de virus elegidas para su inclusión en la vacuna de la gripe normalmente se revisan de forma anual para asegurar que incluyen antígenos que se espera que proporcionen la mejor protección durante el siguiente invierno. Los antígenos de la gripe también incluyen antígenos de virus vivos atenuados y antígenos obtenidos de cultivo de tejido. (H) los antígenos meningocócicos disponibles incluyen antígenos de polisacárido capsular purificado (Men-Ps) y antígenos conjugados proteína-polisacárido (Men conjugado), que incluyen un antígeno en el que el C-polisacárido *O*-acetilado está conjugado con la proteína CRM197 (Cross Reacting Material 197), y antígenos en los que el C-polisacárido de-*O*-acetilado está conjugado con toxoides tetánicos. (I) los antígenos de pertussis disponibles incluyen antígenos de pertussis de célula completa o acelulares. Los antígenos acelulares se han desarrollado para reducir la frecuencia y gravedad de las reacciones adversas locales y sistémicas asociadas con los antígenos de pertussis de célula entera. Los antígenos de pertussis celulares incluyen, por ejemplo, toxoide de la pertussis, hemaglutinina filamentosa y pertactina. (J) los antígenos de Hib disponibles incluyen antígenos de polisacárido y antígenos conjugados polisacárido-proteína, que pueden tener la ventaja de producir respuestas inmunitarias mayores en lactantes y niños pequeños con respecto al antígeno de polisacárido purificado. Los antígenos conjugados de Hib disponibles difieren en diversos modos, que incluyen el tamaño de la proteína y del polisacárido. Los ejemplos incluyen los antígenos HbOC, PRY-OMP, PRT-T y PRP-D. (K) normalmente los antígenos neumocócicos están disponibles como antígenos de polisacárido o como antígenos conjugados. Una vacuna neumocócica de polisacárido disponible, contiene antígenos de polisacárido 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 conjugada neumocócica disponible (VCN) contiene polisacáridos purificados de los antígenos capsulares de siete serotipos de *S. pneumoniae* (serotipos 4, 9V, 14, 18C, 19F, 23F y 6B), conjugados de forma individual a CRM197.

Los ejemplos de combinaciones de antígenos para su uso como se desvela en el presente documento, incluyen todas las posibles combinaciones de los anteriores, por ejemplo todas las combinaciones posibles de DT, DPT, Hib, Hep, VP, Men, Ne, Var y SPR, de los que algunos ejemplos específicos son como siguen:

DT
DT-Hep
DT-Men
DT-Hep-Men

DPT
DPT-Hib
DPT-Hep
DPT-VP
DPT-Ne
DPT-Men
DPT-SPR
DPT-Var

DPT-Hib-Hep
DPT-Hib-VP
DPT-Hib-Ne
DPT-Hib-Var DPT-Hib-SPR
DPT-Hep-VP
DPT-Hep-Ne
DPT-Hep-Var
DPT-Hep-SPR
DPT-VP-Ne
DPT-VP-Var
DPT-VP-SPR
DPT-Men-Hib
DPT-Men-Hep
DPT-Men-VP
DPT-Men-Ne
DPT-Men-Var
DPT-Men-SPR
DPT-Var-SPR
DPT-Var-Ne
DPT-SPR-Ne

DPT-Hib-Hep-VP
DPT-Hib-Hep-Ne
DPT-Hib-Hep-SPR
DPT-Hib-Hep-Var
DPT-Hib-VP-Ne
DPT-Hep-VP-Ne
DPT-Hib-VP-SPR
DPT-Hib-VP-Var
DPT-Men-Hib-Hep
DPT-Men-Hib-VP
DPT-Men-Hib-Ne

DPT-Men-Hib-SPR
DPT-Men-Hib-Var
DPT-Men-Hep-VP
DPT-Men-Hep-Ne
DPT-Men-Hep-SPR
DPT-Men-Hep-Var
DPT-Men-VP-Ne
DPT-Men-VP-SPR
DPT-Men-VP-Var
DPT-Hib-Var-Ne
DPT-Hib-Var-SPR
DPT-Hep-Var-VP
DPT-Hep-Var-Ne
DPT-Hep-Var-SPR
DPT-Men-Var-Ne
DPT-Men-Var-SPR
DPT-VP-Var-Ne
DPT-VP-Var-SPR
DPT-Ne-Var-SPR
DPT-Hib-Ne-SPR
DPT-Hep-VP-SPR
DPT-Hep-Ne-SPR
DPT-Men-Ne-SPR
DPT-VP-Ne-SPR

DPT-Hib-Hep-VP-Ne
DPT-Hep-VP-Ne-Men
DPT-Hib-VP-Ne-Men
DPT-Hib-Hep-Ne-Men
DPT-Hib-Hep-VP-Men
DPT-Hib-Hep-VP-Ne-Men
DPT-Hib-Hep-VP-Ne-Men-Var-SPR

en donde, DT = antígeno toxoide diftérico y antígeno toxoide tetánico; DTP = antígeno toxoide diftérico, antígeno toxoide tetánico y antígeno de pertussis (que incluye antígenos de pertussis de célula entera y acelulares, normalmente acelulares); *Hib* = antígeno de *Haemophilus influenzae* de tipo b (que incluye antígenos de polisacárido y conjugados); Hep = antígeno de hepatitis (que incluye antígeno del VHA, antígeno del VHB, antígeno de VHC, antígeno de VHD, antígeno de VHE, antígeno de VHG y combinaciones de los mismos, por ejemplo, antígeno de VHA-antígeno de VHB); VP = antígeno de polio (que incluye antígenos inactivados o vivos, por ejemplo, antígenos inactivados de tres cepas de polio); Men = antígeno meningocócico *(Neisseria meningitidis)* (que incluye antígenos conjugados y de polisacárido, normalmente antígenos conjugados e incluye antígenos de Men A, B, C, W, Y combinaciones, por ejemplo, antígenos Men A, C, antígenos Men A, B, C, antígenos Men A, C, W, Y antígenos Men A, B, C, W, Y); Ne = antígeno neumocócico *(Streptococcus pneumoniae)* (que incluye antígenos conjugados y de polisacárido, normalmente antígenos conjugados); Var = antígeno del virus de la varicela zoster (por ejemplo, virus de la varicela vivo atenuado); SPR = antígenos de sarampión, paperas y rubeola (por ejemplo, antígenos del sarampión, de la paperas y de la rubeola vivos atenuados).

Están disponibles los programas de administración recomendados para vacunas que contienen varios de los antígenos anteriores. Como un ejemplo específico, el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Programa Nacional Inmunización, ha publicado sus programas de inmunización recomendados para la infancia y los adolescentes. Los presentes programas para los Estados Unidos en 2003 se ilustran, en parte, en la Fig. 1 y se resumen a continuación.

Los programas para seguir son a base del Programa de Inmunización Recomendado para la Infancia y Adolescentes de Estados Unidos 2003, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Programa Nacional Inmunización.

Hepatitis B. (A) Primera dosis. Del nacimiento hasta los dos meses. Se recomienda que reciban esta dosis dentro de las 12 horas tras el nacimiento, los niños cuyas madres son positivas para el antígeno de superficie de la hepatitis B o cuyo estado sobre el antígeno de superficie de la hepatitis B es desconocido. Se recomienda que todos los lactantes reciban la primera dosis de la vacuna de la hepatitis B poco después del nacimiento y antes del alta en el hospital; la primera dosis también puede proporcionarse a los 2 meses de edad si la madre del lactante es negativa para el antígeno de superficie de la hepatitis B. Actualmente solo se recomienda para la dosis al momento del nacimiento la vacuna para la hepatitis B monovalente. Se puede utilizar para complicar la serie la vacuna monovalente o de combinación que contiene Hep B; se pueden administrar cuatro dosis de la vacuna si se utiliza la vacuna de combinación. Se recomienda que los lactantes nacidos de madres positivas para el antígeno de superficie de la hepatitis B reciban la vacuna para la hepatitis B y 0,5 mililitros de inmunoglobulina para hepatitis B (H BIG) dentro de las 12 horas desde el nacimiento, en sitios separados. Se recomienda que los lactantes nacidos de madre cuyo estado sobre el antígeno de superficie de la hepatitis B es desconocido, reciban la primera dosis de la serie de la vacuna para la hepatitis B dentro de las 12 horas desde el nacimiento. Se recomienda extraer sangre materna en el momento del parto para determinar el estado sobre el antígeno de superficie de la hepatitis B de la madre; si la prueba es positiva, se recomienda que el lactante reciba H BIG tan pronto como sea posible (y no más tarde que una semana). (B) Segunda dosis. De uno a cuatro meses, pero por lo menos 4 semanas después de la primera dosis. Se recomienda que la segunda dosis se proporcione por lo menos 4 semanas después de la primera dosis. No se recomienda que la vacuna que contiene Hib se administre antes de las 6 semanas de edad. Para lactantes nacidos de madres positivas para el antígeno de superficie de la hepatitis B, se recomienda la segunda dosis a la edad de 1-2 meses y se recomienda que se complete la serie de vacunación (tres o cuatro dosis) a la edad de 6 meses. (c) Tercera dosis: de seis a 18 meses, pero por lo menos 16 semanas después de la primera dosis y por lo menos δ semanas después de la segunda dosis. En general, se recomienda que la última dosis de la serie de vacunación (tres o cuatro dosis) no se administre antes de los 6 meses de edad. Sin embargo, para lactante nacidos de madres positivas para el antígeno de superficie de la hepatitis B, se recomienda que se complete la serie de vacunación (tres o cuatro dosis) a la edad de 6 meses. (D) Programa de puesta al día para niños de 4 meses hasta 6 años edad. Se recomienda que todos los niños y adolescentes que no se hayan inmunizado frente a la hepatitis B comiencen la serie de vacunación de Hep B durante cualquier consulta. Se recomienda que los asistentes sanitarios hagan esfuerzos especiales para inmunizar niños que nacieron en, o cuyos padres nacieron en, zonas del mundo en donde la infección por virus de la hepatitis B sea moderada a elevadamente endémica. 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). (E) Programa de puesta al día para niños de 7 años hasta 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 (DTPa). (A) Primera dosis: dos meses. (B) Segunda dosis: cuatro meses. (C) Tercera dosis: seis meses. (D) Cuarta dosis: de 15 a 18 meses. La cuarta dosis de DTPa se puede administrar tan pronto a los 12 meses de edad, a condición de que hayan transcurrido 6 meses desde la tercera dosis y que sea poco probable que el niño vuelva a la edad de 15 a 18 meses. (E) Quinta dosis: 4 a 6 años. (F) Programa de puesta al día para niños de 4 meses hasta 6 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: 4 semanas. Intervalo mínimo entre la dosis tres a la dosis cuatro: 6 meses. Intervalo mínimo entre la dosis cuatro y la dosis cinco: 6 meses. La quinta dosis no es necesaria si la cuarta dosis se proporcionó después del 4º cumpleaños.

Tétanos y Difteria. (A) Recomendado a la edad de 11 a 12 años si han transcurrido por lo menos 5 años desde la última dosis de la vacuna que contiene los toxoides tetánico y diftérico. Se recomienda una rutina posterior de revacunación cada 10 años. (B) Programa de puesta al día para niños de 7 hasta 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. Intervalo mínimo entre la dosis tres y la dosis de revacunación: 6 meses, si se proporcionó la 1ª dosis a una edad menor de 12 meses y si la edad actual es de menos de 11 años; 5 años, si la primera 1ª dosis se proporcionó a la edad de 12 meses o más tarde y si la 3ª dosis se proporcionó a una edad de menos de 7 años y la edad actual es de 11 o mayor; 10 años, si la 3ª dosis se proporcionó a la edad de 7 años o mayor. (Nota: para niños de 7 a 10 años de edad, el intervalo entre la tercera dosis y la dosis de revacunación está determinado por la edad a la que se proporcionó la 1ª dosis. Para adolescentes de 11 a 18 años de edad, el intervalo se determina por la edad a la que se proporcionó 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 las edades de 2 y 4 meses, no se necesita una dosis a la edad de 6 meses. (D) Cuarta dosis: de 12 a 15 meses. (E) Programa de puesta al día para niños de 4 meses hasta 6 años de edad. (Nota: en general, la vacuna 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 se proporcionó la primera dosis a una de edad de menos de 12 meses; 8 semanas (como dosis final), si la primera dosis se proporcionó a los 12 a 14 meses de edad; si la primera dosis se proporcionó a los 15 meses de edad o mayor, entonces no se recomienda dosis adicionales. Intervalos mínimos entre la dosis dos y la dosis tres: 4 semanas, si la edad actual es de menos de 12 meses; 8 semanas (como dosis final), si la segunda dosis se proporcionó a una edad menor de 15 meses y si la edad actual es de 12 meses o mayor; si la segunda dosis se proporcionó a la edad de 15 meses o mayor, no se necesitan dosis adicionales. (Si la edad actual es de menos de 12 meses y las primeras 2 dosis fueron PRP-OMP, se recomienda que la tercera dosis y la dosis final se proporcionen a la edad de 12 a 15 meses y por lo 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 solo se recomienda para niños de 12 meses a 5 años de edad que recibieron 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 niños que recibieron toda la serie de VPI o toda de VPO, no se necesaria una cuarta dosis si la tercera dosis se proporcionó a la edad de 4 años o más. Si se proporcionaron VPO y VPI como parte una serie, se recomienda proporcionar un total de cuatro dosis, independientemente de la edad actual del niño. (D) Programa de puesta al día para niños de 7 hasta 18 años de edad. (Nota: en general, esta vacuna no se recomienda para personas de 18 años 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, Rubeola. (A) Primera dosis: de 12 a 15 meses. (B) Segunda dosis: de 4 a 6 años. La segunda dosis de SPR se recomienda de forma rutinaria a los 4 a 6 años de edad pero puede administrarse durante cualquier consulta, a condición de que hayan transcurrido por lo menos 4 semanas desde la primera dosis y de que ambas dosis se administren comenzando a, o después de, la edad de 12 meses. Para los que no hayan recibido previamente la segunda dosis, se recomienda que completar el programa en la consulta de los 11 a 12 años de edad. (C) Programa de puesta al día para niños de 4 meses hasta 6 años de edad. Edad mínima: 12 meses. Intervalo mínimo entre la dosis uno y la dosis dos: 4 semanas. La segunda dosis de SPR se recomienda de forma rutinaria a los 4 a 6 años de edad, pero se puede proporcionar tan pronto como se desee. (D) Programa de puesta al día para niños de 7 hasta 18 años de edad. Intervalo mínimo entre la dosis uno y la dosis dos: 4 semanas.

Varicela. 12 a 18 meses. La vacuna de la varicela se recomienda para niños susceptibles (es decir, los que carecen de una historia clínica fiable sobre la varicela) en cualquier consulta a, o después de, los 12 meses de edad. Se recomienda que las personas susceptibles de 13 años de edad o mayores reciban 2 dosis, proporcionadas con una diferencia de al menos 4 semanas. Programa de puesta de al día para niños de 7 hasta 18 años de edad. Intervalo mínimo entre la dosis uno y la dosis dos: 4 semanas.

Vacuna Conjugada Neumocócica. La vacuna conjugada neumocócica heptavalente (VCN) se recomienda para todos los niños de 2 a 23 meses de edad y para determinados niños de 24 a 59 meses de edad. (A) Primera dosis: dos meses. (B) Segunda dosis: cuatro meses. (C) Tercera dosis: seis meses. (D) Cuarta dosis: 12 a 15 meses. (E) Programa de puesta al día para niños de 4 meses hasta 6 años de edad. (Nota: en general, esta vacuna 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 proporcionó a una edad de menos de 12 meses y la edad actual es de menos de 24 meses, entonces, 4 semanas; si la primera dosis se proporcionó a los 12 meses de edad o mayor o si la edad actual es de 24 a 59 meses, entonces 8 semanas (dosis final); si la primera dosis se proporcionó a la edad de 24 meses o mayor, entonces para niños sanos no se necesitan dosis adicionales. Intervalos mínimos entre la dosis dos y la dosis tres: si la segunda dosis se proporcionó a la edad de menos de 12 meses, entonces, 4 semanas; si la segunda dosis se proporcionó a la edad de 12 meses o mayor, entonces, 8 semanas (como dosis final); sí la segunda dosis se proporcionó a la edad de 24 meses o mayor, entonces para niños sanos no se necesitan dosis adicionales. Intervalos mínimos entre la dosis tres y la dosis cuatro: 8 semanas (como dosis final). Esta dosis solo es necesaria para niños de 12 meses a 5 años de edad que recibieron 3 dosis antes de los 12 meses de edad.

Vacuna de polisacárido neumocócico (VPN). Recomendada además de la VCN para determinados grupos de alto riesgo.

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

Gripe. La vacuna de la gripe se recomienda de forma anual para niños de 6 meses de edad o mayores con determinados factores de riesgo (que incluyen pero sin limitación asma, cardiopatía, anemia drepaneocítica, VIH y diabetes), y se puede administrar a todos los que deseen obtener inmunidad. Se recomienda que los niños de 12 años de edad o más jóvenes reciban la vacuna en una dosificación apropiada para su edad. Se recomienda que los niños de 8 años de edad o más jóvenes que reciban la vacuna de la gripe por primera vez, reciban dos dosis separadas al menos por 4 semanas.

Estos programas conciernen a niños hasta los 18 años de edad. En general, se recomienda que cualquier dosis no proporcionada a la edad recomendada se proporcione en un momento posterior, cuando sea aconsejable y factible. Obviamente, se pueden establecer programas adicionales para las diversas vacunas enumeradas.

En determinadas realizaciones, los momentos de administración para una vacuna como se desvela en el presente documento serán a base del programa recomendado ilustrado en la Fig. 1 o descrito anteriormente. Por ejemplo, un momento para la administración de una vacuna de acuerdo con la divulgación se puede seleccionar en base al programa recomendado para una vacuna que contenga un antígeno (o más) encontrado en la vacuna de la divulgación.

Como ejemplo específico, las composiciones de vacuna, como se desvela en el presente documento, que contengan antígenos de difteria, pertussis y tétanos (y de forma opcional uno o más antígenos adicionales) se pueden administrar en cualquiera de los siguientes momentos: dos meses, cuatro meses, seis meses, 15 a 18 meses y 4 a 6 años, entre otros tiempos. Como otro ejemplo específico, las vacunas que contienen DTP/HepB/Hib/VP/Ne (o cualquier combinación de ellos), se puede administrar a los 2 meses, 4 meses, 6 meses o 15 meses, entre otros. Como otro ejemplo específico, una vacuna que contiene DTP/HepB/VP (o cualquier combinación de estos) se puede administrar a los 4-6 años, entre otros. Como otro ejemplo específico, una vacuna que contiene DTP/HepB/Hib/VP/Ne/SPR/Var (o cualquier combinación de estos) se puede administrar a los 15 meses, entre otros. Como otro ejemplo específicos, las composiciones de vacuna que contienen los antígenos diftérico y tetánico (y de forma opcional uno o más antígenos adicionales) se pueden administrar a los 11-18 años (y más), entre otros. Como otro ejemplo específico, una vacuna que contiene DT/HepB se puede administrar a los 11-18 años (y más), entre otros. Como todavía otro ejemplo específico, una vacuna que contiene DT/HepB/SPR/Var (o cualquier combinación de estos) se puede administrar a los 11-18 años (y más) entre otros. Y así sucesivamente.

C. Parte experimental

A continuación hay ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente divulgación. Los ejemplos se ofrecen solo para fines ilustrativos y no se pretenden que limiten el ámbito de la invención reivindicada en modo alguno.

Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero está claro que debería permitirse algún error experimental y desviación.

Ejemplo 1

Eficacia de adsorción del toxoide tetánico y del toxoide diftérico a las partículas de PLG

Las micropartículas se preparan utilizando una solución de polímero RG503 al 6 % p/v (un polímero de PLG que tiene una proporción molar de láctido/glicólido 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 homogeneizador (Ultra-Turrax T25 IKA-Labortechnik, Alemania) durante tres minutos a 23.000 rpm, formando de este modo una emulsión de agua en aceite. Después, esta emulsión se añade a 50 ml de agua destilada que contiene dioctil sulfosuccinato de sodio (DSS) 6 µg/ml (disponible de Sigma,

EE. UU.) y se homogeniza a muy alta velocidad utilizando un homogeneizador con una sonda de 20 mm (ES-15 Omni International, GA, EE. UU.) durante 25 minutos en un baño de hielo. Esto da como resultado una emulsión de agua en aceite en agua, que se agita a 1000 rpm durante 12 h a temperatura ambiente, permitiendo que se evapore el cloruro de metileno. Las micropartículas resultantes contienen DSS al 0,05 % p/p. La distribución de tamaños de la suspensión de micropartículas resultantes se determina utilizando un analizador de tamaño de partícula (Master Sizer, Malvern Instruments, RU), y se encuentra que es de entre 0,8 y 1,2 µm.

Los toxoides titánico y diftérico, TT y TD, se adsorben a las partículas de PLG DSS al 0,05 % en diversos tampones con distintos valores de pH. La adsorción se lleva a cabo incubando 10 mg de la suspensión de micropartículas anterior con 1 mg o 0,5 mg de TD o TT, respectivamente, en tampón 10 mM durante una noche, mientras se agita a 4 ºC. Los tampones son como sigue: PBS pH 7, tampón Fosfato pH 7, tampón Citrato pH 5, tampón Borato pH 9, tampón Succinato pH 5,5, tampón Succinato pH 5 y tampón Histidina pH 5.

El siguiente día se centrifuga la suspensión y se evalúa la concentración de proteína no unida en el sobrenadante mediante HPLC (para establecer el % de eficacia de adsorción por empobrecimiento). Las proteínas sobre las partículas se evalúan lavando en primer lugar las partículas con agua para retirar 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 al 5 % durante 4 horas, seguido de un ensayo de proteínas BCA (siglas en inglés de: *bicinchoninic acid*, ácido bicinconínico) (para establecer el % de eficacia de adsorción a las partículas). Los resultados se presentan las Tablas 1A y 1B a continuación.

Tabla 1A.

Tampón	**% de carga objetivo p/p**	**% de eficacia de adsorción de TT por empobrecimiento**	**% de eficacia de adsorción de TT sobre las partículas**
PBS pH 7	1 %	0	0
Fosfato pH 7	1 %	10	0
Citrato pH5	1 %	93	81
Borato pH 9	1 %	0	0
Succinato pH5,5	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 objetivo p/p**	**% de eficacia de adsorción de TD por empobrecimiento**	**% de eficacia de adsorción de TD sobre las partículas**
PBS pH 7	1 %	0	0
Fosfato pH 7	1 %	0	0
Citrato pH5	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 toxoide tetánico y del toxoide diftérico a/de las partículas de PLG

Las micropartículas se prepararon como se describe en el Ejemplo 1. Las proteínas TD y TT se adsorben a micropartículas a una carga objetivo del 0,25 %, 0,5 % o 1 % incubando 100 mg de la suspensión de micropartículas anterior con una cantidad apropiada de TD o TT en tampón Histidina 10 mM durante una noche, mientras se agita a 4 ºC. El siguiente día se centrifuga la suspensión y se evalúa la concentración de proteínas no unidas en el sobrenadante para mediante HPLC, para establecer el % de eficacia de adsorción mediante empobrecimiento. Estos resultados se presentan en la columna 2 de la Tabla 2 a continuación y en la Fig. 2.

La cantidad de proteína liberada a partir de las micropartículas se determinó incubando 10 mg de partículas liofilizadas no lavadas con 1 ml de agua y dejándose agitar a 4 ºC durante una hora, centrifugando y analizando la proteína liberada en el sobrenadante mediante HPLC, como anteriormente. Estos 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 empobrecimiento	% liberado en 1 hora
TD al 0,25 %	74,1	9,7
TD al 0,50 %	68,5	16,1
TD al 1,00 %	67,6	19,8

Tabla 2B.

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

Ejemplo 3 (Ejemplo de Referencia)

Adsorción y liberación de conjugados de proteína-polisacárido meningocócicos a/de las partículas de PLG RG503/DSS al 0,05 %)

Se prepararon micropartículas que contenían DSS al 0,05 % como en el Ejemplo 1 anterior. Se adsorbieron en las micropartículas los antígenos meningocócicos conjugados proteína-polisacárido en los que los antígenos de polisacárido capsular purificado de Men-A, Men-B, Men-C o Men-W.

Los antígenos conjugados meningocócicos se adsorben a micropartículas a una carga objetivo del 1 % incubando 100 mg de las micropartículas con 1 mg de antígeno conjugado meningocócico en tampón Histidina 10 mM durante una noche, mientras se agita a 4 ºC. El siguiente día se centrifuga la suspensión y se evalúa la concentración de antígeno conjugado no unido en el sobrenadante mediante HPLC, para establecer el % de eficacia de adsorción por empobrecimiento. Los resultados se presentan en la columna 2 de la Tabla 3 a continuación.

El antígeno conjugado adsorbido en las partículas se evalúa lavando primero las partículas con agua para eliminar el antígeno conjugado no unido, seguido de liofilización. La cantidad de antígeno conjugado adsorbido se determina mediante hidrólisis de las partículas liofilizadas, seguido de un ensayo de proteínas BCA, como anteriormente. 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 partícula-antígeno y después se incuban 10 mg de las partículas liofilizadas con 1 ml de agua y se deja agitando a 4 ºC durante una 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 empobrecimiento	% adsorbido por hidrólisis	% de una hora de liberación
MenA-CRM	38	31	60,2
MenC-CRM	29	25	78,1
MenY-CRM	34	40	53,5
MenW-CRM	25	29	60,2

Ejemplo 4

Inmunogenicidad del toxoide tetánico (TT) y el toxoide diftérico (TD) formulados con las partículas de PLG

Estudio en ratón.

Para el estudio, se preparó como se describe en el Ejemplo 1 una suspensión de micropartículas de PLG/DSS. Los toxoides tetánico y diftérico, TD y TT, se adsorben a las micropartículas a una carga objetivo del 0,5 % o el 1 % incubando 100 mg de la suspensión de micropartículas anterior con una cantidad apropiada de TD o TT en tampón Histidina 10 mM durante una noche, mientras se agita a 4 ºC. Después, se prueba cada formulación de forma individual (PLG/TT o PLG/TTD) o en combinación (PLG/TD + PLG/TT). Las formulaciones de Alumbre equivalentes (Alumbre/TT o Alumbre/TTD y Alumbre/TTD + Alumbre/TT) también se incluyeron en el estudio para comparación. Se inyectaron ratones en la tibial anterior con 50 µl por pata el día 0 y el día 14. Se recogió suero el día 28 mediante sangrado del seno orbital.

Ensayo de ELISA.

Se determinó para cada ratón la presencia de anticuerpos IgG analizando 8 diluciones en serie de los sueros, comenzando en 1/50, en placas que se habían recubierto con antígeno DT-CRM o TT. Se analizaron un control positivo y suero de ratón positivo de referencia en cada placa para un control adecuado del sistema. Se detectó la presencia de anticuerpos en el suero con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante en combinación con un sustrato colorimétrico, el cual adsorbe a 450 nm. Los títulos se definieron como la inversa de la dilución de suero que proporcionó una densidad óptica de 0,5 de absorbancia en ELISA. Los títulos se obtuvieron por interpolación de un ajuste de curva de 4 parámetros de absorbancia frente a dilución. Se calcularon las medias geométricas de los títulos (MGT) y los ratones que tenían un título ≥ de 50 se notificaron como respondedores. Los resultados se presentan en las Tablas 4A-C a continuación. Como puede observarse a partir de estos resultados (1) no se encontró diferencia en los títulos provocados con micropartículas de PLG preparadas a una carga objetivo del 0,5 % o el 1 % para ambos antígenos TT y TD. (2) la combinación de ambos antígenos formulados con PLG o Alumbre potenció las respuestas para TT en ~ 2 veces. (3) En conjunto, a base de estos resultados, las respuestas provocadas con PLG/TT y PLG/TD son comparables a Alumbre/TT y Alumbre/TD.

Tabla 4A.

2wp2 títulos de anticuerpos para TD			
	MGT n.º respondedores	**LCI**	**LCS**
PLG/TD (0,5 %)	17.277	11.718	25.473
PLG/TD (1,0 %)	23.938	13.184	43.464
PLG/TD + PLG/TT	17.786	9.389	33.695
Alumbre/TD	54.166	40.022	73.308
Alumbre/TD + Alumbre/TT	39.635	24.696	63.609
LCI/LCS = límites de confianza al 95 % = media ± (t x ETM) Todos los cálculos se realizaron utilizando los valores de los títulos transformados a logaritmo; las medias geométricas finales de los títulos y los límites de confianza al 95 % mostrados se obtuvieron tomando el antilogaritmo			

Tabla 4B.

2wp2 títulos de anticuerpos para TT			
	MGT n.º de respondedores	**LCI**	**LCS**
PLG/TT (0,5 %)	32.182	20.408	50.750
PLG/TT (1,0 %)	41.431	34.842	49.265
PLG/TD + PLG/TT	61.992	36.882	104.199
Alumbre/TT	36.860	26.672	50.939
Alumbre/TD + Alumbre/TT	70.825	55.538	90.322
LCI/LCS = límites de confianza al 95 % = media ± (t x ETM) Todos los cálculos se realizaron utilizando los valores de los títulos transformados a logaritmo; las medias geométricas finales de los títulos y los límites de confianza al 95 % mostrados se obtuvieron tomando el antilogaritmo.			

Ejemplos 5 (Ejemplo de Referencia)

Inmunogenicidad de los conjugados proteína-polisacárido meningocócicos formulados con partículas de PLG (RG503/DSS al 0,5 %) y Alumbre

Se prepararon micropartículas que contenían DSS al 0,05 % p/p como en el Ejemplo 1 anterior. Se adsorben a las micropartículas los antígenos meningocócicos conjugados proteína-polisacárido en los que están conjugados antígenos de polisacárido capsular purificados de Men-C a toxoide diftérico CRM_{197} o a ADH, obtenidos de Chiron Vaccines, Siena, Italia. Los antígenos conjugados meningocócicos se adsorben a las micropartículas a una carga objetivo del 1,0 % incubando 100 mg de las micropartículas con 1,0 mg de antígeno conjugado meningocócico en PBS a pH 7,0 durante una noche, mientras se agita a 4 ºC. Se inyectaron ratones en el tibial anterior con 50 µl por pata el día 0 y el día 14. El día 28 se recogió suero mediante sangrado del seno orbital.

Se determinó la presencia de anticuerpo IgG para cada ratón analizando ocho diluciones en serie de los sueros, comenzando en 1/50, en placas que se recubrieron con antígeno Men-C ADH o Men-C CRM. Se probaron en cada placa un control positivo y un suero de ratón positivo de referencia para un control adecuado para el sistema. Se detectó la presencia de anticuerpos en el suero con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano

picante en combinación con un sustrato colorimétrico, que adsorbe a 450 nm. Se definieron los títulos como la inversa de la dilución del suero que proporcionó una densidad óptica de 0,5 de absorbancia en ELISA. Se obtuvieron los títulos por interpolación de una curva de ajuste de 4 parámetros de absorbancia frente a dilución. Se calcularon las medias geométricas de los títulos (MGT) para IgG total e IgG_1 (para Men-C CRM). Los resultados se presentan en la Tabla 5 a continuación. Como puede observarse a partir de los resultados, el antígeno formulado con PLG se comparó de forma favorable con el antígeno formulado con alumbre.

Tabla 5.

	MenC ADH (límite: 0,5)			MenC CRM (límite: 0,5)			MenC CRM (límite: 0,5)		
	IgG total			IgG total			IgG1		
Formulación	MGT	inferior	superior	MGT	inferior	superior	MGT	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

1. Una composición inmunogénica que comprende: (a) micropartículas poliméricas que comprenden un polímero biodegradable; (b) antígeno del toxoide diftérico y antígeno del toxoide tetánico adsorbidos en las micropartículas y (c) un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que el polímero biodegradable es un copolímero poli(D,L-láctido-co-glicólido) (PLG que tiene una proporción molar de láctido:glicólido que varía de 40:60 a 60:40).

2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente uno o más antígenos adicionales.

3. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, en la que el antígeno adicional está adsorbido en la superficie de las micropartículas o inmovilizado dentro de las micropartículas.

4. La composición inmunogénica de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en la que el antígeno adicional es un antígeno que contiene polipéptido, un antígeno que contiene polisacárido, un antígeno conjugado, un antígeno que contiene polinucleótido o se obtiene de una célula tumoral.

5. La composición inmunogénica de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en la que el antígeno adicional se obtiene de un organismo patógeno seleccionado de un virus, tal como el virus de la hepatitis, virus de la varicela, poliovirus, del sarampión, de la paperas, de la rubéola, de la gripe, de *Neisseria meningitidis*, pertussis, *Haemophilus influenzae* tipo b, VIH y de *Streptococcus pneumoniae*, una bacteria, un hongo y un parásito.

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 comprende adicionalmente un tensioactivo.

8. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que las micropartículas tienen un diámetro de entre 500 nanómetros y 20 micrómetros.

9. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente un adyuvante inmunológico suplementario.

10. La composición inmunogénica de la reivindicación 9, en la que el adyuvante inmunológico suplementario está adsorbido en la superficie de las micropartículas o inmovilizado dentro de las micropartículas.

11. La composición inmunogénica de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en la que el adyuvante inmunológico suplementario se selecciona de oligonucleótidos CpG, ARN bicatenario, toxinas termolábiles de *E. coli*, compuestos de fosfato de liposacárido, miméticos de fosfato de liposacárido y emulsiones submicrométricas que comprenden escualeno, un éster de sorbitán y un éster de polioxietileno sorbitán.

12. La composición inmunogénica de cualquiera reivindicación precedente, en la que la composición inmunogénica es una composición inyectable.

13. Uso de (a) micropartículas poliméricas que comprenden un polímero biodegradable y (b) antígeno adsorbido en las micropartículas, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la fabricación de un medicamento para la estimulación de una respuesta inmunitaria en un animal hospedador vertebrado.

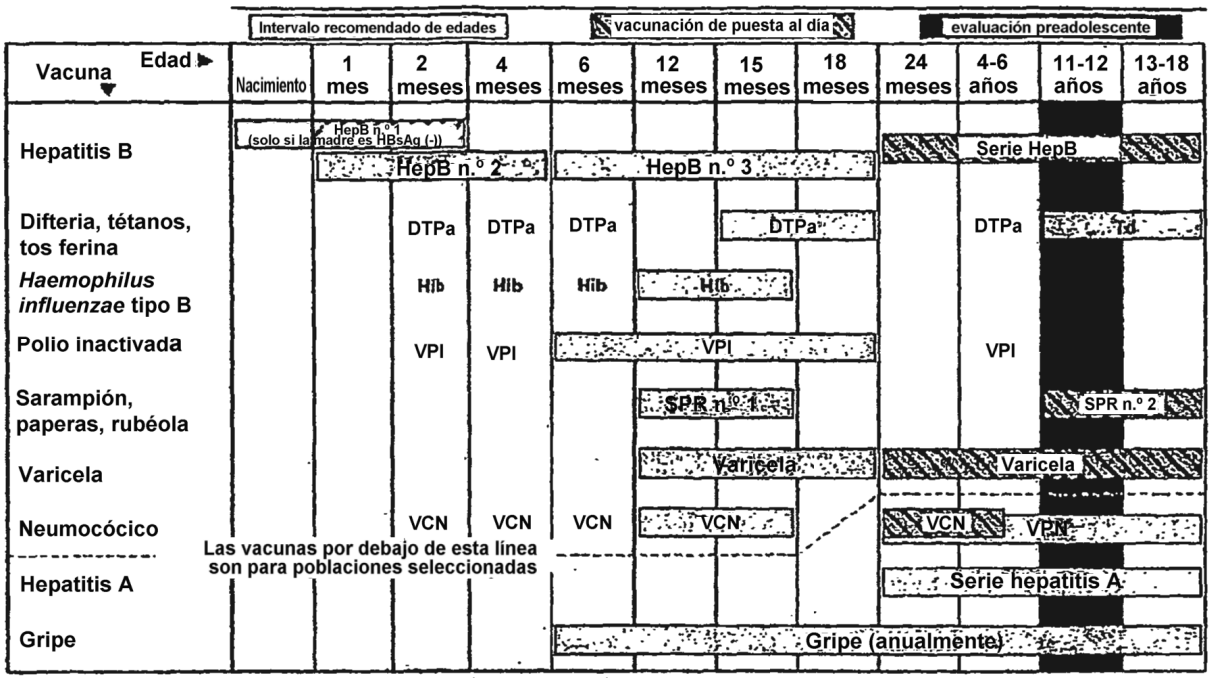
14. Uso según la reivindicación 13 en la fabricación de un medicamento para la inmunización de un animal hospedador vertebrado frente a la infección por un organismo patógeno.

15. Uso según la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en el que el animal hospedador vertebrado es un ser humano.

16. Un procedimiento de producción de la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende: (a) la formación de una emulsión de agua en aceite en agua que comprende agua, disolvente orgánico y polímero biodegradable; (b) la eliminación del disolvente orgánico de la emulsión para formar las micropartículas poliméricas y (c) la adsorción del antígeno del toxoide diftérico y el antígeno del toxoide tetánico a las micropartículas.

17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que la emulsión comprende adicionalmente un tensioactivo aniónico.

Programa recomendado de inmunización para la infancia y para adolescentes - Estados Unidos, 2003



Este programa indica las edades recomendadas para la administración de las vacunas actualmente autorizadas para la infancia a partir del 1 de diciembre de 2002, para niños hasta los 18 años. Cualquier dosis no proporcionada a la edad recomendada debería proporcionarse en cualquier consulta posterior cuando sea indicado y factible. ▨ Indica los grupos de edad para los que se garantiza un esfuerzo especial en administrar las vacunas no proporcionadas anteriormente. Se pueden autorizar y recomendar vacunas adicionales durante el año. Las vacunas combinadas autorizadas pueden utilizarse cuando cualquier componente de la combinación esté indicado y los otros componentes de la vacuna estén contraindicados. Los asistentes sanitarios deberán consultar los prospectos de envase de los fabricantes para recomendaciones detalladas.

Fig. 1

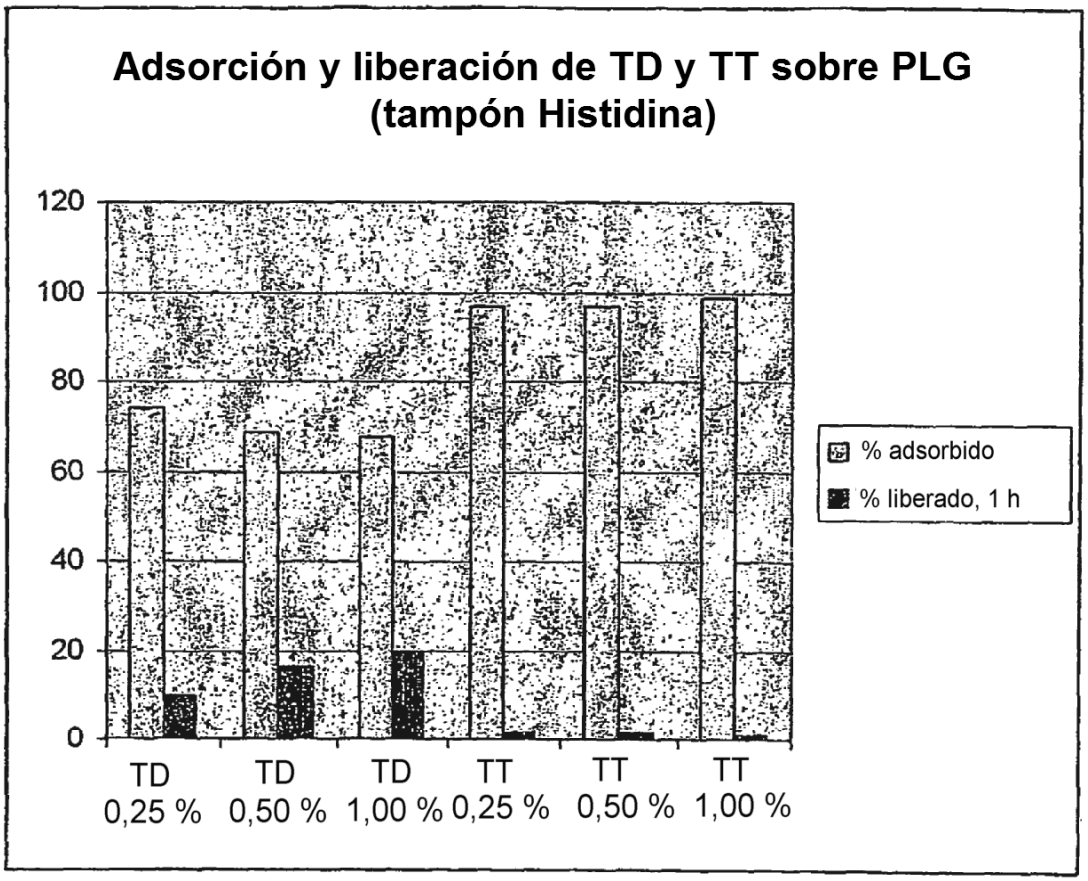

Adsorción y liberación de TD y TT sobre PLG
(tampón Histidina)
120
100
80
60
40
20
0
TD 0,25 %
TD 0,50 %
TD 1,00 %
TT 0,25 %
TT 0,50 %
TT 1,00 %
% adsorbido
% liberado, 1 h

Fig. 2

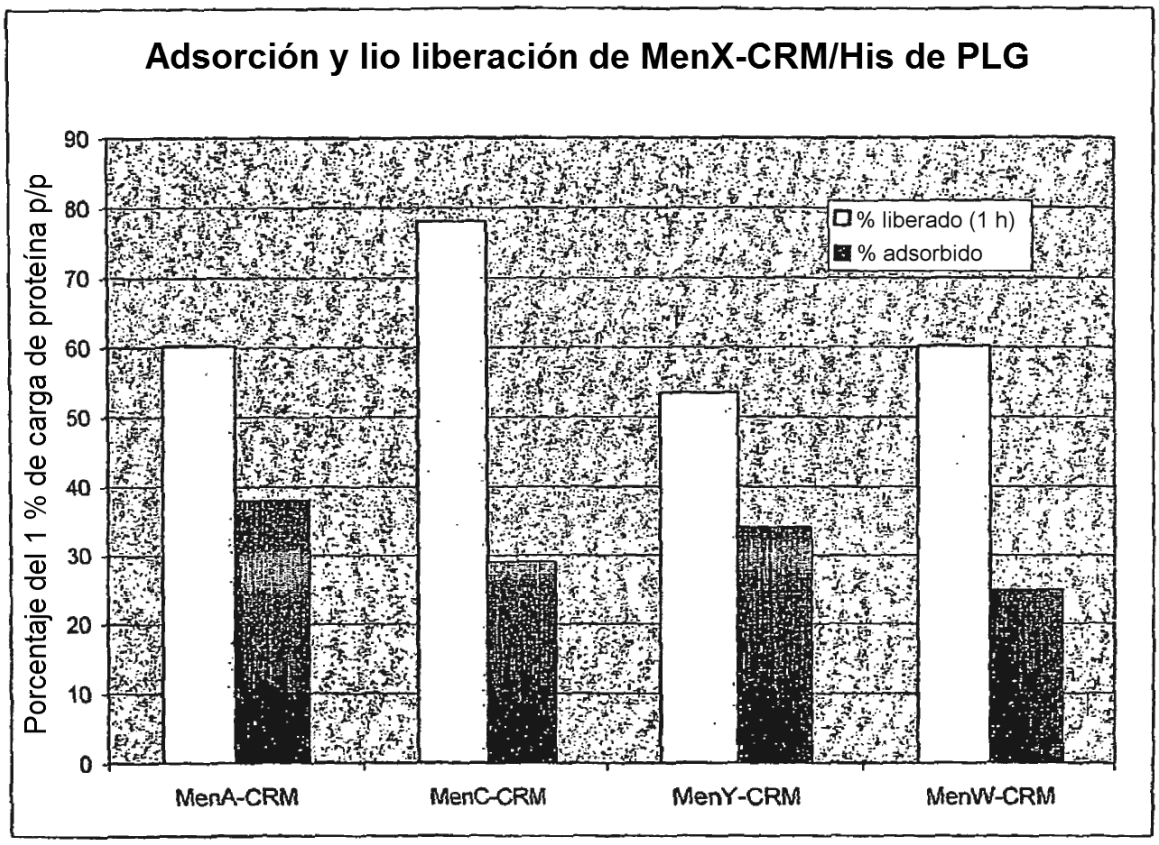

Adsorción y lio liberación de MenX-CRM/His de PLG
Porcentaje del 1 % de carga de proteína p/p
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% liberado (1 h)
% adsorbido
MenA-CRM
MenC-CRM
MenY-CRM
MenW-CRM

Fig. 3