

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 481**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/39** (2006.01)  
**A61K 39/205** (2006.01)  
**A61P 31/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05751955 .5**  
96 Fecha de presentación: **08.06.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1898948**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2008**

54 Título: **Sustancias inmunogénicas que comprenden un adyuvante a base de ácido poliinosínico y ácido policitidílico**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.05.2012**

73 Titular/es:  
**Yisheng Biopharma (Singapore) Pte. Ltd.  
Serangoon Central Post Office PO Box 584  
Singapore 915503, SG**

72 Inventor/es:  
**LIN, Hai Xiang,Feng Tai District ,Ma Jia Bao**

74 Agente/Representante:  
**Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 380 481 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCION

Sustancias inmunogénicas que comprenden un adyuvante a base de ácido poliinosínico y ácido policitidílico.

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención generalmente se refiere a composiciones y procedimientos adyuvantes, de su uso para potenciar una respuesta inmunitaria, más en particular, a compuestos, vacunas y procedimientos para potenciar la inmunogenicidad de un antígeno y, más en particular, a composiciones y vacunas con adyuvantes polinucleotídicos que comprenden las composiciones adyuvantes polinucleotídicos. La invención también se refiere a dichas composiciones y vacunas adyuvantes polinucleotídicas para su uso en procedimientos según se reivindica.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

## 15 1. Descripción de la técnica relacionada

[0002] El sistema inmunitario puede mostrar tanto inmunidad específica como no específica. En general, los linfocitos B y T, que muestran receptores específicos en su superficie celular para un antígeno determinado, producen inmunidad específica. El sistema inmunitario puede responder a diferentes antígenos de dos formas: 1) inmunidad humoral, que incluye la estimulación de las células B y la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas, células presentadoras de antígeno (APC) y células T colaboradoras (Th1 y Th2) y 2) inmunidad mediada por células (IMC) que generalmente implica a las células T incluyendo los linfocitos T citotóxicos (CTL), aunque también están implicadas otras células en la generación de una respuesta CTL (p. ej., células Th1 y / o Th2 y APC).

[0003] La inmunidad no específica abarca diversas células y mecanismos como la fagocitosis (la acción de engullir partículas o antígenos extraños) por macrófagos o granulocitos y la actividad de las células citotóxicas naturales (NK), entre otras. La inmunidad no específica depende de mecanismos menos avanzados evolutivamente y no muestra la naturaleza adquirida de especificidad y memoria, que son ejemplos de rasgos característicos de una respuesta inmunitaria específica. Las diferencias claves entre la inmunidad específica y no específica se basan en la especificidad de las células B y T. Estas células predominantemente adquieren su sensibilidad tras la activación con un antígeno específico y tienen mecanismos para mostrar memoria en el caso de futuras exposiciones a este antígeno específico. Como resultado, la vacunación (que supone especificidad y memoria) es un protocolo eficaz como protección frente a patógenos dañinos.

[0004] Generalmente, los adyuvantes son compuestos, que cuando se administran con un antígeno (mezclado con el antígeno o administrado antes de la administración de este) potencia o modifica la respuesta inmunitaria frente a este antígeno en particular.

[0005] Entre los ejemplos de adyuvantes que se han usado para potenciar una respuesta inmunitaria se incluyen compuestos de aluminio (generalmente referidos todos como "alumbre"), emulsiones de aceite en agua (el adyuvante completo de Freund (ACF) es una emulsión de aceite en agua que contiene organismos *Mycobacterium tuberculosis* muertos por calor liofilizados), saponina (aislada de la corteza de *Quillaja saponaria*, el componente activo del adyuvante conocido como Quile A), CpG ODP (oligodeoxinucleótido sintético que contiene dinucleótidos CpG no metilados), MPL (derivado del lipopolisacárido de *Salmonella minnesota* Re595), liposomas (normalmente fabricadas con materiales biodegradables como fosfolípidos) y microesferas de polímeros biodegradables (fabricados con diversos polímeros como PLGA, polifosfaceno y polianhídridos). Las propiedades adyuvantes de estos compuestos se han evaluado con cada adyuvantes que han mostrado ventajas y desventajas.

[0006] El principal problema con el uso de adyuvantes para vacunas humanas, especialmente vacunas rutinarias para niños, es la toxicidad y los efectos secundarios adversos de la mayoría de las formulaciones adyuvantes. La aplicación de nuevas tecnologías al desarrollo de vacunas está llevando a antígenos purificados, subunidades y sintéticos que tienden a ser poco inmunogénicos. El desarrollo de nuevos adyuvantes, para mejorar la inmunogenicidad / eficacia y reducir los efectos secundarios, representa uno de los principales desafíos de la investigación y desarrollo de vacunas. Se han estudiado diversas aplicaciones para los complejos polinucleotídicos incluyendo su actuación como adyuvantes. Los ARN de cadena doble (ARNcd) son modificadores biológicos muy potentes que puede ejercer una profunda influencia sobre las células a concentraciones nanomolares. Entre los efectos moduladores de los ARNcd incluyen un amplio espectro de acciones a los niveles molecular y celular.

[0007] A nivel molecular, los ARNcd pueden mostrar efectos biológicos, como la síntesis de interferón, inducción de proteína quinasa, potenciación del antígeno de histocompatibilidad e inhibición del metabolismo. Y a nivel celular, el ARNcd puede mostrar efectos biológicos como pirogenicidad, mitogenicidad, activación de macrófagos, activación

de la inmunidad medida por células e inducción del estado antivírico. Un potencial prometedor de los ARNcd es su efecto inmunomodulador en tratamientos antimicrobianos. En la patente de EE. UU. 4.124.702 se describe que los polinucleótidos de cadena doble inducen la inducción del interferón en células animales vivas. En la patente de EE. UU. N° 3.906.092 se describe que la respuesta anticorporeal a una vacuna de tipo adyuvante aumentaba incorporando a la vacuna un polinucleótido o un complejo de polinucleótidos. Houston y col., establecieron que los PICLC (complejo de ácido poliinosínico, ácido policitidílico y poli-L-lisincarcboximetilcelulosa) como un potente adyuvante aumentando la respuesta anticorporeal primaria sin la ayuda de un adyuvante adicional. Houston y col., en *Infection and Immunity*, 14: 318-9, 1976C. Se encontró que el ARNcd micoviral potenciaba significativamente la respuesta anticorporeal hemaglutinante sobre glóbulos rojos de cordero (GRc). Wright y Adler-Moore, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 131: 949-45, 1985.

**[0008]** Sin embargo, PIC (ácido poliinosínico ácido policitidílico) muestra toxicidad aguda cuando se utiliza en animales. Por ejemplo, Phillips y col. notificaron que se observaban manifestaciones tóxicas graves en perros tras la administración subcrónica de PIC a dosis de 2,0 mg / kg. La toxicidad se caracterizó por una disminución espontánea de la actividad, mala coordinación, vómitos, anorexia, pérdida de peso, cambios hematológicos que reflejaban disminución de la hematopoyesis, aumento de las actividades fosfatasa alcalina y transaminasa, degeneración de timo, destrucción de la médula ósea, dilatación de los capilares sinusoidales hepáticos en las áreas centrolobulares, necrosis de las células hepáticas, colapso de las estructuras hepáticas y una artritis generalizada. Véase, Phillips y col., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 18: 220-30, 1971.

**[0009]** PIC, uno de los complejos polinucleotídicos más estudiados, no fue eficaz cuando se usó en ratones y humanos debido a su inestabilidad en el organismo tras la administración. Por tanto, PIC ha sido modificado de muchas formas para superar una u otra deficiencia. Por ejemplo, un complejo de ácido polirribonucleosídico polirribocitidílico con bromhidrato de poli-L-lisina es aproximadamente de 5 a 15 veces más resistente a la hidrólisis por la ribonucleasa pancreática que el PIC original. Otro ejemplo es el ARNcd polilICLC, o PICLC abreviado, que se encontró era muy eficaz como agente antivírico o antitumoral. PICLC es un ARNcd sintético compuesto de cadenas de ácido polirribonucleosídico y ácido polirribocitidílico (PIC). Aunque PICLC es un inmunomodulador prometedor que tiene un gran potencial en las terapias antimicrobianas y antineoplásicas, se ha encontrado que producen efectos secundarios graves en humanos, especialmente cuando el fármaco se administra en múltiples dosis altas. Algunos de los efectos secundarios notificados son fiebre, hipotensión, leucopenia, mialgia, trombocitopenia y poliartalgia. Debe superarse el problema inherente de toxicidad para hacer que PICLC sea seguro para su uso en humanos. Además, la eficacia terapéutica del poli ICLC está limitada por su estabilidad *in vivo*.

**[0010]** Para tratar las infecciones víricas se usa un fármaco antivírico compuesto de ácido poliinosínico-ácido policitidílico (Poli I: C), kanamicina y calcio (Av-PICKCa). Se ha demostrado que Av-PICKCa es capaz de inducir la producción de interferón e interleuquina-2. Av-PICKCa administrado sólo como fármaco antivírico estimula una respuesta inmunitaria no específica, es decir, estimula una forma de interferón que no es específica de ningún antígeno en particular. Esta respuesta antivírica es profundamente diferente de la respuesta inmunitaria específica de antígeno generada cuando se administra un adyuvante junto con un antígeno.

**[0011]** Más importante, el inventor de la presente invención descubrió que Av-PICKCa tenía las propiedades de un adyuvante, es decir, la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria específica cuando se administraba con un antígeno. Adicionalmente, el inventor además descubrió que Av-PICKCa era un adyuvante eficaz cuando se usaba junto con antígenos de la rabia y de la fiebre hemorrágica. Lin y col. describieron que Av-PICKCa puede usarse como adyuvante (Lin, y col., *A new immunostimulatory complex (PICKCa) in experimental rabies: antiviral and adjuvant effects*, *Arch Virol*, 131: 307-19, 1993 y la patente china N° 93105862.7). La patente china N° 93105862.7 proporciona el uso de la composición general de Poli I: C, kanamicina y calcio (PICKCa) como adyuvante en una vacuna de aplicación en humanos y mamíferos.

**[0012]** Lin y col. (1993) describen que la actividad de PICKCa se probó en profilaxis experimental antirrábica. PICKCa protegía a los ratones frente a la infección periférica tanto con cepas del virus de la rabia fijas como salvajes. También potenciaba la actividad protectora de una vacuna antirrábica experimental inyectada antes o después de la infección con el virus de la rabia. PICKCa potenciaba tanto las respuestas inmunitarias no específicas como la inmunidad específica, que incluye la producción de anticuerpos y la inmunidad mediada por células según se valora por la producción de interleuquina-2.

**[0013]** Las muestras de Av-PICKCa con heterogéneas con respecto al tamaño y al peso de las moléculas. Av-PICKCa se describe en la literatura en términos de un valor medio o intervalo del valor del coeficiente de sedimentación medido en Svedbergs, S. El fármaco antivírico Av-PICKCa existe en una realización de 5S a 8S (fuente A); véase Zhung J.C., *Research recollection of polyinosinic-policitidílico (PIC)*. El papel de la quinta Conferencia china sobre aplicación clínica y teoría del interferón, *Siam* 1985, págs. 23-28. En otras realizaciones,

Av-PICKCa existe con un coeficiente de sedimentación de 4S a 12S con una media de 6S (fuente B), 5S a 12S con una media de 7S (fuente C) o 8S a 10S (fuente D); véase Hu Q.G., Tianjin Av-PICKCa's laboratory research and clinical application, Fujian Medical Journal, 1983.12; (6): 28-30 y Hu Q.G. Chinese Medical and Pharmaceutical Industry Journal, 1983 (9) 3134.

5

**[0014]** El coeficiente de sedimentación de esta colección heterogénea de moléculas en Av-PICKCa puede convertirse en un peso molecular equivalente (Pm en Daltons) usando la fórmula de conversión  $pm = 1.100 \times S^{2.2}$  (véase Su B.X. y col; Introduction of Biochemical Technology, 1ª Edición, Universidad de Zhongshan, 1978, 356-357). Los resultados de la conversión en Daltons se presentan en la siguiente tabla:

10

**Tabla A: características de Av-PICKCa**

Fuente de Av-PICKCa	Coeficiente de sedimentación S			Peso molecular Daltons		
	Min.	Máx.	Media	Min.	Máx.	Media
A	5	8	*	38.000	107.000	*
B	4	12	6	23.000	260.000	57.000
C	5	12	7	38.000	260.000	79.000

(continuación)

Fuente de Av-PICKCa	Coeficiente de sedimentación S			Peso molecular Daltons		
	Min.	Máx.	Media	Min.	Máx.	Media
D	8	10	*	107.000	174.000	*

\* datos no citados en la referencia

**[0015]** La investigación original sobre Av-PICKCa como adyuvante por Lin y col., fue con una muestra que tenía moléculas con características similares a la fuente A, es decir, un coeficiente de sedimentación de 5S a 8S, que es un peso molecular equivalente de moléculas que oscilan de 38.000 Daltons a 107.000 Daltons. (véase Lin y col., *supra*).

**[0016]** Se consideraba que todas las formas de PICKCa eran igualmente seguras y eficaces dado que Av-PICKCa es esencialmente una forma de PICKCa y dado, además, el uso histórico de Av-PICKCa como un fármaco antivírico. Sin embargo, se ha comprobado que este no es el caso. La investigación realizada por el inventor demuestra que la eficacia y toxicidad de PICKCa cuando se usa como un adyuvante en combinación con un antígeno, actualmente varía con pesos moleculares diferentes. El invento encuentra que Av-PICKCa no proporciona el perfil de eficacia / seguridad óptimo para su uso como adyuvante y que PICKCa no induce efectos secundarios adversos no aceptables en determinadas condiciones. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de un adyuvante que es más adecuado para su uso en humanos y que es seguro y eficaz proporcionando el efecto inmunogénico deseado. La invención actual aborda esta necesidad y proporciona otras ventajas que serán aparentes en referencia a la descripción detallada.

### 30 **BIBLIOGRAFÍA**

**[0017]** Las siguientes referencias pueden ser de interés:

- Documento JP 10935440A2;
- 35 • Patente de EE.UU. Nº 4.124.702
- Patente de EE.UU. Nº 3.692.899
- Patente de EE.UU. Nº 3.906.092
- Patente de EE.UU. Nº 4.389.395
- Patente de EE.UU. Nº 4.349.538
- 40 • Patente de EE.UU. Nº 4.024.241
- Patente de EE.UU. Nº 3.952.097
- Houston y col., Infection and Immunity, 14: 318-9, 1976C
- Wright y Adler-Moore, Biochemical and Biophysical Research Communications, 131: 949-45, 1985
- Phillips y col., Toxicology and Applied Pharmacology, 18: 220-30, 1971
- 45 • Lin, y col., A new immunostimulatory complex (PICKCa) in experimental rabies: antiviral and adjuvant effects, Arch Virol, 131: 307-19, 1993
- Patente china 93105862.7
- Zhung J.C., Research recollection of polyinosinic-polycytidylic acid (PIC). The paper of fifth Chinese interferon conference in clinical application and theory, Siam 1985, págs. 23-28
- 50 • Hu Q.G., Tianjin Av-PICKCa's laboratory research and clinical application, Fujian Medical Journal, 1983.12; (6): 28-30

- Hu Q.G. Chinese Medical and Pharmaceutical Industry Journal, 1983 (9) 3134.
- Su B.X. y col.; Introduction of Biochemical Technology, 1ª Edition, Universidad de Zhongshan, 1978, 356-357
- Gupta R.K. y col., Adjuvants - a balance between toxicity and adjuvanticity, Vaccine, 11: 293-306, 1993
- Arnon, R. (Ed.) Synthetic Vaccines 1: 83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1987
- 5 • Sela, M., Science 166: 1365-1374 (1969)
- Patente de EE.UU. N° 6.008.200
- Ellouz y col., Biochem. & Biophys. Res. Comm., 59: 1317, 1974
- Patente de EE.UU. N° 4.094.971
- Patente de EE.UU. N° 4.101.536
- 10 • Patente de EE.UU. N° 4.153.684
- Patente de EE.UU. N° 4.235.771
- Patente de EE.UU. N° 4.323.559
- Patente de EE.UU. N° 4.327.085
- Patente de EE.UU. N° 4.185.089
- 15 • Patente de EE.UU. N° 4.082.736
- Patente de EE.UU. N° 4.369.178
- Patente de EE.UU. N° 4.314.998
- Patente de EE.UU. N° 4.082.735
- Patente de EE.UU. N° 4.186.194
- 20 • Patente de EE.UU. N° 6.468.558
- New Trends and Developments in Vaccines, editado por Voller y col., University Park Press, Baltimore, Md., EE. UU., 1978
- Klein, J., y col., Immunology (2nd), Blackwell Science Inc., Boston (1997)
- Gupa R.K. y Siber G.R., Adjuvants for human vaccines - current status, problems and future prospects, Vaccine, 25 13 (14): 1263-1276, 1995
- Richard T Kenney y col. Meeting Retort - 2nd meeting on novel adjuvants currently in / close to human clinical testing, Vaccine 20 2155-2163, 2002
- Laboratory Techniques in Rabies Edited by F X Meslin, M M Kaplan, H Koprowski 4ª Edición ISBN 92 4 1544

### 30 RESUMEN DE LA INVENCION

[0018] La presente invención proporciona una composición adyuvante polinucleotídica y una composición adyuvante polinucleotídica y vacunas para su uso en procedimientos como los que se reivindican. La presente invención también proporciona una composición inmunogénica que comprende la composición adyuvante polinucleotídica junto con un antígeno (p. ej., como en una vacuna). Las composiciones adyuvantes de la invención tienen propiedades físicas particulares (p. ej., peso molecular, tamaño, concentración y pH) que abordan la necesidad de un adyuvante eficaz y seguro para inducir una respuesta inmunitaria potenciada. La presente invención además contempla estas composiciones adyuvantes para su uso para desencadenar una respuesta inmunitaria frente a un compuesto antigénico.

40

[0019] En una realización, la invención proporciona una composición adyuvante polinucleotídica que comprende ácido polirribonucleotídico-polirribocitidílico (PIC), un antibiótico y un ión positivo, donde el antibiótico es kanamicina y el ión positivo es calcio. La presente invención también proporciona una composición inmunogénica que comprende la composición adyuvante polinucleotídica junto con un antígeno o una vacuna.

45

[0020] La presente invención sirve para avanzar el cuerpo del conocimiento definiendo una nueva composición que puede usarse con seguridad y eficacia como adyuvante para potenciar y / o modificar la respuesta inmunitaria en un huésped animal o humano. Mientras que descripciones previas mostraron la aplicación del fármaco antivírico Av-PICKCa para su uso como adyuvante, se observó que esta forma de PICKCa desencadenaba sólo una respuesta inmunitaria específica limitada cuando se administraba con un antígeno. Adicionalmente, se encontró que PICKCa desencadenaba efectos secundarios adversos inaceptables en determinadas condiciones.

[0021] La presente invención aborda estos problemas proporcionando una composición adyuvante, referido generalmente en este documento como "PIKA" que puede administrarse de forma más eficaz y segura como adyuvante en animales, incluso en humanos.

[0022] PIKA es una composición que comprende un polinucleótido, kanamicina y un ión de calcio que se ha desarrollado específicamente como adyuvante. En la invención se incluyen composiciones que tienen los atributos del producto exclusivos que las hace más adecuadas para su uso como adyuvante en una composición inmunogénica para su administración a animales y / o humanos.

60

**[0023]** Más específicamente, la presente invención proporciona una composición adyuvante polinucleotídica que comprende un polinucleótido, un antibiótico y un ión positivo, donde el polinucleótido puede ser ácido polirribonucleotídico-polirribocitidílico (PIC), el antibiótico es kanamicina y el ión positivo es calcio.

5

**[0024]** Más específicamente, la presente invención proporciona la especificación, incluyendo el peso molecular, la concentración y el pH de la composición que comprende un polinucleótido, kanamicina y un ión de calcio que aborda la necesidad de un adyuvante seguro que desencadena la respuesta inmunitaria máxima deseada.

10 **[0025]** La presente invención también proporciona una composición inmunogénica que comprende la composición adyuvante polinucleotídica y un antígeno o una vacuna.

**[0026]** En determinadas realizaciones, la presente invención está en forma de un kit que comprende el adyuvante polinucleotídico y un compuesto inmunogénico.

15

**[0027]** La descripción proporciona un procedimiento para potenciar las respuestas inmunitarias frente a un compuesto antigénico administrando a un huésped la composición inmunogénica. El huésped puede ser un ser humano o un animal. La administración puede realizarse mediante inyección, como inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea, o mediante inhalación. En otras realizaciones, la composición

20 inmunogénica puede administrarse por vía rectal, vaginal, nasal, oral, oftálmica, tópica, transdérmica o intradérmica.

**[0028]** Por consiguiente, la presente invención proporciona un adyuvante y una composición inmunogénica que puede usarse de forma segura en humanos y animales.

25 **[0029]** Por consiguiente, en un aspecto la invención presenta una composición adyuvante polinucleotídica que comprende un ácido polirribonucleotídico-polirribocitidílico (PIC), kanamicina y un ión de calcio, donde la composición contiene moléculas del adyuvante heterogéneas en cuanto al peso molecular, con un peso molecular de entre aproximadamente 66.000 a 1.200.000 Daltons.

30 **[0030]** En realizaciones relacionadas, las moléculas de la composición adyuvante polinucleotídica en la composición son de peso molecular heterogéneo, donde el peso molecular es de aproximadamente 300.000 a 1.200.000 Daltons, o de aproximadamente 66.000 a 660.000 Daltons, o de aproximadamente 300.000 a 660.000 Daltons, o de aproximadamente 300.000 a 2.000.000 Daltons, o de aproximadamente 300.000 a 4.000.000 Daltons, o de aproximadamente 500.000 a 1.000.000 Daltons, o de aproximadamente 1.000.000 a 1.500.000 Daltons, o de

35 aproximadamente 1.500.000 a 2.000.000 Daltons, o de aproximadamente 2.000.000 a 2.500.000 Daltons, o de aproximadamente 2.500.000 a 3.000.000 Daltons, o de aproximadamente 3.000.000 a 3.500.000 Daltons, o de aproximadamente 3.500.000 a 4.000.000 Daltons, o de aproximadamente 4.000.000 a 4.500.000 Daltons o de aproximadamente 4.500.000 a 5.000.000 Daltons.

40 **[0031]** En realizaciones relacionadas, las moléculas de la composición adyuvante polinucleotídica en la composición tiene un peso molecular medio igual o superior a 150.000 Daltons, o igual o superior a 250.000 Daltons, o igual o superior a 350.000 Daltons, o igual o superior a 500.000 Daltons, o igual o superior a 650.000 Daltons, o igual o superior a 750.000 Daltons, o igual o superior a 1.000.000 Daltons, o igual o superior a 1.200.000 Daltons, o igual o superior a 1.500.000 Daltons o igual o superior a 2.000.000 Daltons.

45

**[0032]** Por consiguiente, en un aspecto la invención presenta una composición adyuvante polinucleotídica que comprende un ácido polirribonucleotídico-polirribocitidílico (PIC), kanamicina y un ión de calcio, donde la composición contiene moléculas del adyuvante de tamaño molecular heterogéneo que tienen un coeficiente de sedimentación de Svedbergs (S) de aproximadamente 6,43S a 24,03S.

50

**[0033]** En realizaciones relacionadas, las moléculas de la composición adyuvante polinucleotídica en la composición tiene un tamaño molecular heterogéneo, donde el tamaño molecular es de aproximadamente 12,8S a 24,03S, o de aproximadamente 6,43S a 18,31S, o de aproximadamente 12,8S a 18,31S, o de aproximadamente 12,8S a 30,315S, o de aproximadamente 12,8S a 41,54S, o de aproximadamente 13,5S, a 18,31S, o de

55 aproximadamente 13,5S a 24,03S, o de aproximadamente 16,14S a 22,12S, o de aproximadamente 22,12S a 26,6S, o de aproximadamente 26,6S a 30,31S, o de aproximadamente 30,31S a 33,55S, o de aproximadamente 33,55S a 36,45S, o de aproximadamente 36,45S a 39,1S, o de aproximadamente 39,1S a 41,54S, o de aproximadamente 41,54S a 43,83S, o de aproximadamente 43,83S a 45,95S.

**[0034]** En otras realizaciones relacionadas, la composición adyuvante polinucleotídica tiene un coeficiente de sedimentación medio (Svedbergs) mayor de 9, o mayor de 12, o mayor de 13,5, o mayor de 15, o mayor de 16, o mayor de 17, o mayor de 18, o mayor de 19, o mayor de 20, o mayor de 21, o mayor de 22, o mayor de 25 o mayor de 30.

5

**[0035]** La fuente de iones de calcio puede ser, por ejemplo, cloruro cálcico, carbonato cálcico, fluoruro cálcico, hidróxido cálcico, fosfatos de calcio o sulfato cálcico.

**[0036]** En un aspecto de interés especial, la invención proporciona una composición adyuvante polinucleotídica que comprende un ácido polirribonucleotídico-polirribocitidílico (PIC), kanamicina y un ión de calcio, donde la composición incluye moléculas del adyuvante de peso molecular heterogéneo que tienen un peso molecular de entre aproximadamente 66.000 a 1.200.000 Daltons.

**[0037]** En realizaciones relacionadas, el ácido polirribonucleotídico-polirribocitidílico (PIC), kanamicina y las moléculas de calcio tienen un peso molecular de aproximadamente 300.000 a 1.200.000 Daltons, o de aproximadamente 66.000 a 660.000 Daltons, o de aproximadamente 300.000 a 660.000 Daltons, o de aproximadamente 300.000 a 2.000.000 Daltons, o de aproximadamente 300.000 a 4.000.000 Daltons, o de aproximadamente 500.000 a 1.000.000 Daltons, o de aproximadamente 1.000.000 a 1.500.000 Daltons, o de aproximadamente 1.500.000 a 2.000.000 Daltons, o de aproximadamente 2.000.000 a 2.500.000 Daltons, o de aproximadamente 2.500.000 a 3.000.000 Daltons, o de aproximadamente 3.000.000 a 3.500.000 Daltons, o de aproximadamente 3.500.000 a 4.000.000 Daltons, o de aproximadamente 4.000.000 a 4.500.000 Daltons o de aproximadamente 4.500.000 a 5.000.000 Daltons.

**[0038]** En otras realizaciones relacionadas, el ácido polirribonucleotídico-polirribocitidílico (PIC), kanamicina y las moléculas de calcio del adyuvante de peso molecular heterogéneo que tiene un peso molecular medio igual o superior a 150.000 Daltons, o igual o superior a 250.000 Daltons, o igual o superior a 350.000 Daltons, o igual o superior a 500.000 Daltons, o igual o superior a 650.000 Daltons, o igual o superior a 750.000 Daltons, o igual o superior a 1.000.000 Daltons, o igual o superior a 1.200.000 Daltons, o igual o superior a 1.500.000 Daltons o igual o superior a 1.500.000 Daltons.

30

**[0039]** En un aspecto de interés especial, la invención proporciona una composición adyuvante polinucleotídica que comprende un ácido polirribonucleotídico-polirribocitidílico (PIC), kanamicina y un ión de calcio, donde la composición incluye moléculas del adyuvante de tamaño molecular heterogéneo que tienen un coeficiente de sedimentación en Svedbergs (S) de aproximadamente 6,43S a 24,03S.

35

**[0040]** En realizaciones relacionadas, las moléculas de la composición adyuvante polinucleotídica en la composición tienen un peso molecular heterogéneo, donde el tamaño molecular es de aproximadamente 12,85S a 24,03S, o de aproximadamente 6,43S a 18,31S, o de aproximadamente 12,8S a 18,31S, o de aproximadamente 12,8S a 30,31S, o de aproximadamente 12,8S a 41,54S, o de aproximadamente 13,5S, a 18,31S, o de aproximadamente 13,5S a 24,03S, o de aproximadamente 16,14S a 22,12S, o de aproximadamente 22,12S a 26,6S, o de aproximadamente 26,6S a 30,31S, o de aproximadamente 30,31S a 33,55S, o de aproximadamente 33,55S a 36,45S, o de aproximadamente 36,45S a 39,1S, o de aproximadamente 39,1S a 41,54S, o de aproximadamente 41,54S a 43,83S o de aproximadamente 43,83S a 45,95S.

**[0041]** Aún en otras realizaciones relacionadas, el ácido polirribonucleotídico-polirribocitidílico (PIC), kanamicina y calcio tienen un coeficiente de sedimentación medio mayor de 9, o mayor de 12, o mayor de 13,5, o mayor de 15, o mayor de 16, o mayor de 17, o mayor de 18, o mayor de 19, o mayor de 20, o mayor de 21, o mayor de 22, o mayor de 25 o mayor de 30.

**[0042]** En algunas realizaciones la invención proporciona una composición adyuvante polinucleotídica que comprende ácido polirribonucleotídico-polirribocitidílico (PIC), kanamicina y calcio, donde puede ser preferible para la composición excluir moléculas, especialmente a un nivel tal que se excluyan moléculas que no tienen efecto inmunogénico significativo, donde las moléculas excluidas tienen un peso molecular de aproximadamente o inferior a 30.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 40.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 50.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 60.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 70.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 80.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 90.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 100.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 150.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 200.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 250.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 300.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 350.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 400.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 450.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 500.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 600.000 Daltons,

aproximadamente o inferior a 700.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 800.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 900.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 1.000.000 Daltons.

5 **[0043]** En algunas realizaciones la invención proporciona una composición adyuvante polinucleotídica que comprende ácido polirribonucleotídico-polirribocitidílico (PIC), kanamicina y calcio, donde puede ser preferible para la composición excluir moléculas, especialmente a un nivel tal que se excluyan moléculas que no tienen un efecto inmunogénico significativo, donde las moléculas excluidas tienen un tamaño molecular de aproximadamente o inferior a 4,49S, aproximadamente o inferior a 5,12S, aproximadamente o inferior a 5,67S, aproximadamente o inferior a 6,16S, aproximadamente o inferior a 6,6S, aproximadamente o inferior a 7,02S, aproximadamente o inferior a 7,4S, aproximadamente o inferior a 7,77S, aproximadamente o inferior a 9,34S, aproximadamente o inferior a 10,64S, aproximadamente o inferior a 11,78S, aproximadamente o inferior a 12,8S, aproximadamente o inferior a 13,73S, aproximadamente o inferior a 14,59S, aproximadamente o inferior a 15,39S, aproximadamente o inferior a 16,14S, aproximadamente o inferior a 17,54S, aproximadamente o inferior a 18,81S, aproximadamente o inferior a 19,99S, aproximadamente o inferior a 21,09S, aproximadamente o inferior a 22,12S.

15

**[0044]** En un aspecto de interés especial, la invención proporciona una composición inmunogénica para potenciar la antigenicidad de un compuesto antigénico que comprende la composición adyuvante polinucleotídica.

20 **[0045]** En realizaciones relacionadas, la composición inmunogénica comprende el adyuvante polinucleotídico y un antígeno.

**[0046]** En realizaciones relacionadas, la fuente del antígeno es un antígeno humano, un antígeno animal no humano, un antígeno vegetal, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno vírico, un antígeno de parásito o un antígeno cancerígeno.

25

**[0047]** En realizaciones relacionadas, la composición inmunogénica comprende la composición adyuvante polinucleotídica y un antígeno del virus de la rabia.

30 **[0048]** En determinadas realizaciones, los antígenos pueden estar haber sido purificados a partir de una fuente natural, sintetizado mediante síntesis en fase sólida o puede obtenerse mediante tecnología de genética recombinante. El antígeno puede comprender un fragmento de una proteína que comprenda una o más regiones inmunogénicas de la molécula. Los antígenos también pueden estar proporcionados por células o microorganismos completos (p. ej., partículas víricas completas) que pueden estar vivos, atenuados o truncados, o muertos.

35 **[0049]** En otras realizaciones, los antígenos incluyen uno o más agentes de agentes infecciosos, un antígeno vegetal, agentes cancerígenos, agentes alérgicos y otro antígeno humano como para el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias. En otras realizaciones, los antígenos incluyen uno o más agentes infecciosos de cualquier virus, bacterias, de *Mycobacterium*, fúngicos y de parásitos.

40 **[0050]** La composición adyuvante polinucleotídica de la presente invención también puede utilizarse para potenciar la respuesta inmunitaria frente a antígenos producida por el uso de vacunas de ADN. Las secuencias de ADN en estas vacunas que codifican el antígeno puede ser "desnudas" o contener un sistema de administración, como liposomas.

45 **[0051]** Aún en otras realizaciones relacionadas, el antígeno del virus de la rabia se selecciona entre la vacuna de células diploides humanas (HDCV) o vacuna antirrábica purificada inactivada obtenida en células de riñón de hámster (HKC-IPRV) o vacuna antirrábica sin procesar inactivado obtenida en células de riñón de hámster (HKC-ICRV) o vacuna antirrábica purificada obtenida en células vero (PVRV) o purificada obtenida en células de embrión de pollo (PCEC) o vacuna purificada obtenida en embrión de pato (PDEV) o antígeno antirrábico purificado  
50 inactivado obtenido en células de riñón de hámster (HKC-IPRA) o antígeno antirrábico sin procesar inactivado obtenido en células de riñón de hámster (HKC-ICRA).

**[0052]** En un aspecto de interés especial, la invención proporciona una composición inmunogénica para potenciar la antigenicidad de un compuesto antigénico que comprende la composición adyuvante polinucleotídica que es  
55 capaz de inducir una respuesta inmunitaria mediada por células específicas de antígeno.

**[0053]** En un aspecto de interés especial, la invención proporciona una composición inmunogénica para potenciar la antigenicidad de un compuesto antigénico que comprende la composición adyuvante polinucleotídica que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria de células B específica de antígeno.

**[0054]** En un aspecto de interés especial, la invención proporciona una composición inmunogénica para potenciar la antigenicidad de un compuesto antigénico que comprende la composición adyuvante polinucleotídica que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria combinada de células T y B específica de antígeno.

5

**[0055]** En un aspecto de interés especial, la invención proporciona una composición inmunogénica para potenciar la antigenicidad de un compuesto que comprende la composición adyuvante polinucleotídica y un antígeno antirrábico purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster, donde la presencia del antígeno antirrábico debería alcanzar una cantidad mínima, como más de una unidad internacional (UI).

10

**[0056]** En realizaciones relacionadas, la composición inmunogénica comprende la composición adyuvante polinucleotídica y el antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster donde la presencia del antígeno del virus de la rabia debería alcanzar una cantidad mínima, como más de 0,25 unidades internacionales, es más de 0,5 unidades internacionales, es más de 1,2 unidades internacionales, es más de 1,4 unidades internacionales, es más de 1,6 unidades internacionales, es más de 1,8 unidades internacionales, es más de 2,0 unidades internacionales, es más de 2,2 unidades internacionales, es más de 2,4 unidades internacionales, es más de 2,6 unidades internacionales, es más de 2,8 unidades internacionales, es más de 3,0 unidades internacionales, es más de 3,2 unidades internacionales, es más de 3,4 unidades internacionales, es más de 3,6 unidades internacionales, es más de 3,8 unidades internacionales o es más de 4,0 unidades internacionales.

20

**[0057]** En un aspecto de interés especial, la invención proporciona una composición inmunogénica para potenciar la antigenicidad de un compuesto que comprende la composición adyuvante polinucleotídica y un antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster, donde la presencia del adyuvante y del antígeno del virus de la rabia está en una proporción de aproximadamente 1 a 1.

25

**[0058]** En realizaciones relacionadas, la composición inmunogénica comprende la composición adyuvante polinucleotídica y un antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster donde la presencia del adyuvante y el antígeno del virus de la rabia está en una proporción de menos de 1 a 10, de aproximadamente 1 a 9, de aproximadamente 1 a 8, de aproximadamente 1 a 7, de aproximadamente 1 a 5, de aproximadamente 1 a 4, de aproximadamente 1 a 3, de aproximadamente 1 a 2, de aproximadamente 2 a 1, de aproximadamente 3 a 1, de aproximadamente 4 a 1, de aproximadamente 5 a 1, de aproximadamente 6 a 1, de aproximadamente 7 a 1, de aproximadamente 8 a 1, de aproximadamente 9 a 1, de aproximadamente 10 a 1, o superior a 10 a 1.

30

**[0059]** En un aspecto de interés especial, la invención proporciona una composición adyuvante o una composición inmunogénica donde la composición inmunogénica, o la composición adyuvante contenida en la composición inmunogénica, está en forma sólida o líquida o en solución o en suspensión.

35

**[0060]** En un aspecto de interés especial, la invención proporciona una composición adyuvante o una composición inmunogénica que comprende una composición adyuvante donde la composición adyuvante o la composición inmunogénica está liofilizada.

40

**[0061]** En realizaciones relacionadas la invención proporciona un kit que comprende la composición adyuvante y un compuesto antigénico.

45

**[0062]** En un aspecto de interés especial, la invención proporciona el uso de una composición adyuvante polinucleotídica para la preparación de un medicamento para potenciar la respuesta inmunogénica de un huésped.

**[0063]** En un aspecto de interés especial, la invención proporciona un procedimiento para potenciar respuestas inmunitarias frente a un compuesto antigénico, que comprende administrar a un huésped una composición inmunogénica para potenciar la antigenicidad de un compuesto antigénico que comprende la composición adyuvante polinucleotídica.

50

**[0064]** En realizaciones relacionadas, el procedimiento de administración a un huésped de la composición inmunogénica puede ser por una vía seleccionada entre un grupo que incluye inyección parenteral, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inhalación, administración por vía rectal, administración vaginal, administración nasal, administración oral, administración oftálmica, administración tópica, administración transdérmica o administración intradérmica.

55

**[0065]** La descripción proporciona un procedimiento para potenciar respuestas inmunitarias frente a un compuesto antigénico, que comprende administrar a un huésped una composición inmunogénica para potenciar la antigenicidad de un compuesto antigénico comprendiendo la composición un adyuvante polinucleotídica donde el huésped es humano.

5

**[0066]** En un aspecto de interés especial, la invención proporciona un procedimiento para potenciar respuestas inmunitarias frente a un compuesto antigénico, que comprende administrar a un huésped una composición inmunogénica para potenciar la antigenicidad de un compuesto antigénico comprendiendo la composición un adyuvante polinucleotídica, donde el huésped es un animal.

10

**[0067]** Estas y otras características y ventajas de la invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la misma en conexión con las figuras acompañantes.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

**[0068]**

En la Figura 1 se muestra el peso molecular relativo para las muestras de Av-PICKCa y PIKA.

En la Figura 2 se muestra que PIKA induce una producción dependiente de dosis de una citoquina interferón gamma específica.

20

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS EJEMPLOS DE REALIZACIONES DE LA INVENCION

**[0069]** La presente invención puede entenderse más fácilmente en referencia a la siguiente descripción detallada de determinadas realizaciones de la invención y a los Ejemplos incluidos en este documento.

25

**[0070]** Siempre que no se defina de lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse en la práctica o ensayo de la presente invención cualesquiera procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento, aquí se describen los procedimientos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en este documento se incorporan por referencia para descubrir y describir los procedimientos y / o materiales en conexión con las publicaciones que se citan.

30

**[0071]** Debería apreciarse que, según se usa en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un / una" y "el / la" incluyen los referentes plurales siempre que el contexto no dicte lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a "un texto" incluye una diversidad de dichos textos y la referencia "al segmento" incluye la referencia a uno o más segmentos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la materia y así sucesivamente. Además se apreciará que las reivindicaciones pueden definirse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, se pretende que esta declaración sirva como antecedente básico para el uso de terminología exclusiva como "exclusivamente", "solo" y similares en conexión con la redacción de los elementos de las reivindicaciones, o el uso de una limitación "negativa".

35

40

### DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

**[0072]** Antes de establecer detalles adicionales de la presente invención puede ser útil para la comprensión de la misma describir las definiciones de los diversos términos que se usan en este documento.

45

**[0073]** El término "adyuvante" según se usa en este documento, se refiere a cualquier sustancia o mezcla de sustancias que aumenta o diversifica la respuesta inmunitaria de un huésped frente a un compuesto antigénico. Específicamente:

50

1. El término "PICKCa" generalmente se refiere a una composición de poli I: C, kanamicina o calcio independientemente de las propiedades físicas e inmunogénicas especiales.

55

2. "Av-PICKCa" se refiere a una forma de PICKCa utilizado en el mercado como fármaco antivírico.

3. "PIKA" se refiere a una composición de la invención que comprende poli I: C, un anticuerpo (kanamicina) y un ión positivo (calcio), donde PIKA se caracteriza por características físicas (p. ej., peso molecular, tamaño y similares como se describe en este documento) de modo que tras su administración, PIKA muestra características de un adyuvante con efectos secundarios adversos reducidos (p. ej., toxicidad reducida) en relación, por ejemplo, con PICKCa, y una potencia mayor (p. ej., estimula una respuesta inmunitaria potenciada) en relación con, por ejemplo, Av-PICKCa.

60

- 5 **[0074]** "Molécula que contiene PIC" o "compuesto que contiene PIC" se refiere a, sin limitación, PIC que opcionalmente puede estar formando complejos o combinado de otra forma con al menos uno o ambos de un anticuerpo (p. ej., kanamicina) y un ión positivo (p. ej., calcio) presentes en una composición que contiene la molécula que contiene PIC.
- 10 **[0075]** "Heterogéneo" según se usa en este documento en el contexto de las composiciones adyuvantes de la invención indica que los componentes de la composición, p. ej., las moléculas que contienen PIC, no son uniformes con respecto a una característica física de peso molecular, tamaño o ambos.
- 15 **[0076]** El término "animal" incluye a humanos y a todos los mamíferos y aves domésticos y salvajes, incluyendo sin limitaciones, ganado vacuno, caballos, vacas, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, conejos, ciervo, visón, patos, gansos, pavos, gallinas y similares.
- 20 **[0077]** El término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de estos anticuerpos que se unen al compuesto antigénico que incluyen fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fc, Fv y derivados de cadena sencilla de los mismos. Además, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos de origen natural así como anticuerpos no naturales como, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, bifuncionales y humanizados, e isoformas sintéticas relacionadas.
- 25 **[0078]** Según se usa en este documento, el término "compuesto antigénico" se refiere a cualquier sustancia que puede ser reconocida por el sistema inmunitario (p. ej., unirse a un anticuerpo o ser procesado de forma que induzca una respuesta inmunitaria celular) en las condiciones apropiadas.
- 30 **[0079]** Un "antígeno" se refiere a una sustancia, incluyendo composiciones en forma de vacuna en las que la vacuna en sí comprende un compuesto antigénico y puede o no comprende un adyuvante distinto a PIKA, el cual cuando se administra por una vía apropiada (p. ej., por vía parenteral), induce una respuesta inmunitaria, por ejemplo, la formación de anticuerpos, incluso anticuerpos que específicamente se unen al antígeno. Dos de las características de los antígenos son su inmunogenicidad, es decir, su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria *in vivo*, y su antigenicidad, es decir, su capacidad para ser reconocidos selectivamente por anticuerpos cuyo origen son los antígenos.
- 35 **[0080]** Los términos "inmunidad mediada por células" y "respuesta inmunitaria mediada por células" pretenden hacer referencia a la defensa inmunológica proporcionada por los linfocitos, tal como la defensa proporcionada por los linfocitos T cuando están próximos a sus células víctima. Una respuesta inmunitaria mediada por células normalmente incluye proliferación de linfocitos. Cuando se mide la "proliferación de linfocitos", se mide la capacidad de los linfocitos para proliferar en respuesta a un antígeno específico. La proliferación de los linfocitos pretende referirse a la proliferación de células B, células T colaboradoras o linfocitos T citotóxicos (CTL).
- 40 **[0081]** Una "cantidad eficaz de un compuesto antigénico" se refiere a una cantidad de un compuesto antigénico que, en combinación opcional con un adyuvante, hará que el sujeto produzca una respuesta inmunológica específica al compuesto antigénico.
- 45 **[0082]** La expresión "respuesta inmunitaria potenciada" o similar, significa que la respuesta inmunitaria está elevada, mejorada o potenciada para el beneficio del huésped en relación con el estado previo de respuesta inmunitaria, por ejemplo, antes de la administración de una composición inmunogénica de la invención.
- 50 **[0083]** Los términos "inmunidad humoral" y "respuesta inmunitaria humoral" se refieren a la forma de inmunidad en la que se producen moléculas de anticuerpo en respuesta a la estimulación antigénica.
- 55 **[0084]** El término "respuesta inmunitaria" se refiere a cualquier respuesta a un compuesto antigénico por el sistema inmunitario de un sujeto vertebrado. Entre los ejemplos de respuesta inmunitaria se incluyen, pero sin limitación, una inmunidad celular, así como humoral, local y sistémica, como respuestas CTL, incluyendo inducción específica de antígeno de CTL CD8 + , respuestas de células T colaboradoras que incluyen respuestas proliferativas de células T y liberación de citoquinas y respuestas de células B que incluyen respuesta anticorpal.
- [0085]** El término "desencadenando una respuesta inmunitaria" se usa en este documento generalmente abarca la inducción y / o potenciación de una respuesta inmunitaria.
- 60 **[0086]** El término "induciendo una respuesta inmunitaria" se refiere a una respuesta inmunitaria que es estimulada, iniciada o inducida.

**[0087]** El término "potenciando una respuesta inmunitaria" se refiere a una respuesta inmunitaria preexistente que es mejorada, promovida, suplementada, ampliada, potenciada, aumentada o prolongada.

**[0088]** El término "Poli I: C" o "PIC" se refiere a una composición que contiene ácidos nucleicos polirribonucleicos y polirribocitidílicos que también pueden ser referidos como ácido poliinosínico-ácido policitidílico, respectivamente.

**[0089]** El término "cantidad inmunogénica" se refiere a una cantidad de compuesto antigénico suficiente para estimular una respuesta inmunitaria, cuando se administra con la composición de la invención, en comparación con la respuesta inmunitaria observada en ausencia del adyuvante polinucleotídico.

**[0090]** El término "cantidad inmunopotenciadora" se refiere a la cantidad del adyuvante necesario para efectuar un aumento en el valor del anticuerpo y / o en la inmunidad mediada por células cuando se administra con un compuesto antigénico en una composición de la invención, en comparación con el aumento en el nivel de inmunidad mediada por anticuerpos y / o células en ausencia del adyuvante polinucleotídico.

**[0091]** Según se usa en este documento, el término "mezclado" incluye cualquier procedimiento para combinar los componentes de la composición; entre estos procedimientos se incluyen, pero sin limitaciones, mezclar, dispersar, disolver, emulsionar, coagular, suspender o combinar físicamente de cualquier otra forma los componentes de la composición.

**[0092]** Una "sal farmacéuticamente aceptable" de un compuesto significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto parental. Entre estas sales se incluyen: (1) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, o formado con ácidos orgánicos como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maléico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzóico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanolsulfónico, ácido benzenosulfónico, ácido 4-clorobenzenosulfónico, ácido 2-naftalensulfónico, ácido 4-toluensulfónico, ácido canforsulfónico, ácido glucoheptónico, ácido 4,4'-metilbis-(3-hidroxi-2-en-1) carboxílico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido lauril sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftóico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares o (2) sales formada cuando se presenta un protón ácido en el compuesto original tanto si está sustituido por un ión metálico, p. ej., un ión de metal alcalino, un ión alcalinotérreo o un ión de aluminio, o coordinado con una base orgánica como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares.

**[0093]** El término "tratamiento" abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un animal vertebrado, especialmente un humano, e incluye: (i) prevenir la aparición de una enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesta a dicha enfermedad pero que aún se haya diagnosticado que la tiene; (ii) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo o (iii) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la misma.

**[0094]** El término "forma de unidad de dosificación", como se usa en este documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para humanos y / o animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuestos de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, transportador o vehículo farmacéutica / fisiológicamente aceptable.

### **VISIÓN GENERAL DE LA INVENCION**

**[0095]** La presente invención va dirigida a compuestos y procedimientos útiles para potenciar una respuesta inmunitaria que puede ser humoral y / o estar mediada por células, en un humano, animal o cultivo celular. En general, la composición comprende una composición inmunogénica que contiene un adyuvante. La presencia del adyuvante potencia o modifica la respuesta inmunitaria. Por tanto, las respuestas inmunitarias humoral y / o mediada por células son más eficaces con la presencia del adyuvante. Adicionalmente, el adyuvante puede alterar la calidad de la respuesta inmunitaria afectando a las subclases (isotipos) de las inmunoglobulinas y citoquinas producidas.

**[0096]** Las características clave del adyuvante son su capacidad para estimular un nivel deseado y tipo de respuesta inmunitaria sin inducir efectos secundarios adversos. Actualmente existe solo un número limitado de adyuvantes aprobados para su uso en humanos que tienen esta combinación de características. Los patrones de seguridad para sustancias inmunogénicas y, especialmente, vacunas son estrictos y se aplican de forma rigurosa. Por tanto, una limitación significativa para el desarrollo de un adyuvante eficaz es el desarrollo de un producto que sea suficientemente potente como para provocar una respuesta inmunitaria apropiada sin inducir efectos secundarios adversos.

**[0097]** La realización preferida de la invención es un adyuvante polinucleotídico en el que el polinucleótido es ácido polirribonucleotídico-polirribocitidílico (PIC). Se ha demostrado que PIC solo es un adyuvante eficaz pero muestra un perfil de seguridad inaceptable y es inestable en humanos y primates. La invención actual proporciona una composición de PIC combinada con un antibiótico y un ión positivo que potencia los atributos inmunogénicos deseados de un adyuvante mientras se mejora el perfil de seguridad y estabilidad.

**[0098]** La presente invención además se base en el descubrimiento de que las características físicas y biológicas de las moléculas PIKA de la composición adyuvante influyen sobre las características de la respuesta inmunitaria y en los efectos secundarios adversos. En el transcurso de los estudios de investigación se descubrió de forma inesperada que ajustando determinadas características del adyuvante polinucleotídico este se vuelve más o menos potente y / o más o menos tóxico en las formas descritas en detalle a continuación Por tanto, definiendo la composición del adyuvante en términos de sus características físicas es posible describir de forma más precisa los atributos de la composición adyuvante que proporciona una respuesta inmunogénica preferible y un perfil de seguridad / estabilidad preferible.

**[0099]** El adyuvante de la presente invención, denominado en este documento por conveniencia como el adyuvante PIKA, se define por tanto, completamente por una combinación de su composición química más los atributos físicos fundamentales de las moléculas que componen el adyuvante. Así, la forma particular de PIKA que muestra propiedades inmunogénicas significativamente superiores al tiempo que es segura para su uso en animales y humanos se define mejor por uno o más, normalmente una combinación, atributos específicos como composición, peso molecular, tamaño molecular, concentración y pH.

**[0100]** PIKA comprende generalmente un polinucleótido, un antibiótico y un ión positivo, donde el polinucleótido es ácido polirribonucleotídico-polirribocitidílico (PIC) y el antibiótico es el aminoglucósido (kanamicina) y el ión es calcio.

**[0101]** Los antibióticos "aminoglucósidos" hacen referencia a antibióticos cuya estructura contiene azúcares amino unidos a un anillo aminociclitol (núcleo de hexosa) mediante enlaces glucosídicos. Los antibióticos aminoglucósidos derivan de diversas especies de *Streptomyces* y *Micromonospora* o se producen mediante síntesis. Por ejemplo, la kanamicina es un antibiótico aminoglucósido obtenido a partir de la bacteria del suelo *Streptomyces kanamycetis*, usado en el tratamiento de diversas infecciones, especialmente aquellas producidas por bacterias gram negativa.

**[0102]** La composición PIKA se produce mediante la mezcla de ácido poliinosínico, ácido policitidílico, un antibiótico y la fuente de un ión positivo en una solución de cloruro sódico / tampón fosfato que tiene un pH entre pH 6 y pH. El ácido poliinosínico y el ácido policitidílico generalmente se proporciona a una concentración de 0,1 a 10 mg / ml, preferiblemente de 0,5 a 5 mg / ml y, más preferiblemente, de 0,5 a 2,5 mg / ml. El valor de hipercromicidad debería ser superior al 10 %, preferiblemente superior al 15 % y, más preferiblemente, superior al 20 %. La preparación del PIC y la combinación con la kanamicina y el calcio preferiblemente se realiza bajo estándares de calidad de acuerdo con el Proceso de buena fabricación internacional.

**[0103]** En determinadas realizaciones de la presente invención, la kanamicina en la composición adyuvante polinucleotídica puede usarse junto a otros antibióticos, o sustituida por uno o más antibióticos, seleccionados entre el grupo que incluye tobramicina, antraciclinas, sulfato de butirosina, gentamicinas, higromicina, amikacina, dibekacina, nebramicina, metrzamida, neomicina, puromicina, estreptomycinina y estreptozocina. El antibiótico (p. ej., kanamicina y similares) en la composición adyuvante polinucleotídica de la invención generalmente se proporciona a una concentración de aproximadamente 10 a 100.000 unidades / ml, preferiblemente de aproximadamente 100 a 10.000 unidades / ml y, más preferiblemente, de aproximadamente 500 a 5.000 unidades / ml.

**[0104]** El ión positivo (calcio) puede proporcionarse en la composición de la invención a una concentración en el intervalo de aproximadamente 10  $\mu$ moles a 10 mmoles / ml, preferiblemente de aproximadamente 50  $\mu$ moles a 5 mmoles / ml y, más preferiblemente de aproximadamente 100  $\mu$ moles a 1 mmoles / ml.

**[0105]** Como se indica anteriormente, el ión positivo puede proporcionarse en forma de cualquier sal o complejo orgánico adecuado, incluyendo, pero no necesariamente de forma limitada, sales cloruro, fluoruro, hidróxido, fosfato o sulfato. Por ejemplo, cuando el ión positivo es calcio, dicho ión puede estar en forma de carbonato cálcico, cloruro cálcico, fluoruro cálcico, hidróxido cálcico, fosfatos de calcio o sulfato cálcico.

**[0106]** Cuando el ión positivo en la composición adyuvante de la invención es calcio, puede estar en combinación con, o sustituido por, otros iones positivos, incluyendo cadmio, litio, magnesio, cerio, cesio, cromo, cobalto, deuterio, galio, yodo, hierro y cinc, donde los iones pueden estar en forma de sales inorgánicas o complejos orgánicos.

5 **[0107]** La composición resultante se transforma adicionalmente en PIKA mediante un proceso de fabricación adicional que supone el aislamiento de moléculas de un tamaño y / o peso molecular definidos. La separación de las moléculas del polinucleótido de características especiales usando filtración, cromatografía, tratamiento térmico, separación por centrifugación, electroforesis y procedimientos similares que son procesos estándar, es conocida por los expertos en la materia.

10

**[0108]** En determinadas realizaciones de la presente invención, la composición adyuvante polinucleotídica se define adicionalmente por el atributo físico del peso molecular. En el transcurso de la investigación se encontró sorprendentemente que existe una correlación positiva entre el peso molecular y la eficacia de la composición adyuvante polinucleotídica. El nivel de potencia observado de una composición inmunogénica que contiene la  
15 composición adyuvante polinucleotídica, que incluye la capacidad para desencadenar la producción de inmunoglobulinas y citoquinas, aumenta si aumenta el peso molecular de la composición adyuvante polinucleotídica. El peso molecular del adyuvante polinucleotídico puede determinarse mediante electroforesis en gel de agarosa como se describe en el ejemplo 1.

20 **[0109]** Como se muestra en la sección de Ejemplos a continuación, el inventor ha descubierto que las composiciones de vacunas que contienen un adyuvante PIKA de diversos pesos moleculares mostraban una correlación directa entre el peso molecular y la potencia protectora específica de antígeno (véase el Ejemplo 2). Asimismo, el inventor ha descubierto que existe una correlación directa entre el peso molecular de las composiciones adyuvantes PIKA y la capacidad para desencadenar la producción de interferón gamma cuando se  
25 administra a un huésped en combinación con un antígeno del virus de la rabia (véase el Ejemplo 3).

**[0110]** El inventor además identificó, durante los ensayos clínicos en humanos de 1996 en China usando una vacuna antirrábica con un adyuvante que contenía PICKCa de una especificación de peso molecular particularmente elevado, de modo que la composición resultante sorprendentemente presentó un nivel inaceptable de efectos  
30 secundarios adversos. Los resultados de los ensayos clínicos de 1996 que no se habían publicado previamente se presentan en el Ejemplo 4. La investigación dentro del peso molecular se presenta en los Ejemplos 5 y 6. El estudio se realizó según la jurisdicción de la Chinese Food and Drug Administration (Agencia china de medicamentos). Por tanto, el adyuvante no debería haberse administrado a humanos en un entorno controlado de un ensayo clínico si se hubieran previsto estos efectos secundarios en base al conocimiento en aquel momento.

35

**[0111]** El inventor ha encontrado que las composiciones adyuvantes PIKA de la invención en estudios preclínicos con pesos moleculares de hasta  $1,0 \times 10^5$  y las composiciones de vacunas que incluyen las composiciones adyuvantes PIKA con pesos moleculares de hasta  $5,5 \times 10^5$  han mostrado un margen de seguridad más amplio en las pruebas de toxicidad específicas (véase el Ejemplo 7). Se ha utilizado con éxito en investigación preclínica PIKA  
40 con un peso molecular máximo de  $1,2 \times 10^6$  (véase el Ejemplo 3). Investigaciones adicionales realizadas por el inventor demuestran la seguridad de PIKA cuando se usa junto con un compuesto antigénico en forma de vacuna (véase el Ejemplo 8).

**[0112]** Los resultados de un experimento posterior realizado por el inventor en año 2002 en China también muestran que el uso de PIKA proporciona un adyuvante seguro y eficaz en humanos. Los resultados de este experimento, no publicados previamente, se presentan en el Ejemplo 9.

**[0113]** En base a las observaciones anteriores, la realización preferida de PIKA comprende por tanto moléculas que tienen características físicas de peso y / o tamaño molecular que proporcionan beneficios para aumentar la  
50 potencia y eficacia mientras se proporciona un grado adecuado de margen de seguridad de modo que no se induce ningún efecto secundario adverso. Las moléculas presentes en Av-PICKCa, en el extremo inferior del intervalo de peso molecular, pueden ser eficaces como composición antivírica pero son significativamente menos eficaces que la composición molecular de PIKA cuando se usa como adyuvante en una composición inmunogénica. Adicionalmente, se ha demostrado que PIKA tiene un perfil de seguridad que es preferible al de PICKCa.

55

**[0114]** Un aspecto de la presente invención es, por tanto, el peso molecular de PIKA, la composición de la invención.

**[0115]** La composición de la invención de PIKA generalmente comprende una colección o población de moléculas,  
60 donde las moléculas tienen características físicas de, por ejemplo, peso y / o tamaño molecular, que proporcionan

un efecto deseado de desencadenar una respuesta inmunitaria mientras, preferiblemente, se mitigan o evitan los efectos secundarios adversos (como aquellos asociados con la administración de PICKCa). Generalmente, las moléculas de PIKA son heterogéneas en cuanto a peso y / o tamaño molecular.

5 **[0116]** Como generalmente se utiliza en este documento y siempre que no se indique específicamente otra cosa, PIKA, la composición adyuvante de la invención, incluye PIC que puede estar formando complejos con el antibiótico (kanamicina) y un ión positivo (calcio). Las moléculas en PIKA son heterogéneas en peso molecular (p. ej., según se evalúa mediante la determinación de los Daltons) o tamaño (p. ej., según se evalúa mediante el coeficiente de sedimentación).

10

**[0117]** Cuando se utiliza un intervalo en referencia a una característica heterogénea de las moléculas de PIKA (p. ej., peso o tamaño molecular), la referencia a dicho intervalo en este documento indica los límites inferior y superior aproximados de los pesos o tamaños moleculares de las moléculas de PIKA en la composición, pero no supone ni pretende que la composición contenga una molécula de PIKA con un peso o tamaño molecular que sea representativo de cualquier peso o tamaño molecular del intervalo. Por tanto, por ejemplo, un intervalo de peso molecular de aproximadamente 66.000 a 1.200.000 Daltons indica que las moléculas de PIKA de aproximadamente 66.000 Daltons y aproximadamente 1.200.000 Daltons están contenidas en la composición, pero no es necesario que haya en la composición moléculas de PIKA de 88.000 Daltons (aunque, de hecho, estas pueden estar presentes).

20

**[0118]** Cuando una característica física de las moléculas de PIKA en la composición de la invención se define por un intervalo de pesos moleculares, las moléculas de PIKA son heterogéneas en cuanto a su peso molecular, donde el intervalo de peso molecular es de aproximadamente 300.000 a 660.000 Daltons, de aproximadamente 300.000 a 1.200.000 Daltons, de aproximadamente 66.000 a 660.000 Daltons o de aproximadamente 66.000 a 1.200.000 Daltons.

25

**[0119]** La invención también contempla composiciones que tienen moléculas de PIKA de peso molecular heterogéneo, donde en intervalo de peso molecular es de aproximadamente 300.000 a 2.000.000 Daltons, de aproximadamente 300.000 a 4.000.000 Daltons, de aproximadamente 500.000 a 1.000.000 Daltons, de aproximadamente 1.000.000 a 1.500.000 Daltons, de aproximadamente 1.500.000 a 2.000.000 Daltons, de aproximadamente 2.000.000 a 2.500.000 Daltons, de aproximadamente 2.500.000 a 3.000.000 Daltons, de aproximadamente 3.000.000 a 3.500.000 Daltons, de aproximadamente 3.500.000 a 4.000.000 Daltons, de aproximadamente 4.000.000 a 4.500.000 Daltons o de aproximadamente 4.500.000 a 5.000.000 Daltons. Las moléculas de PIKA que tienen pesos moleculares en los límites superior e inferior de estos intervalos, así como dentro de estos intervalos, están presentes en la composición.

30

**[0120]** Cuando una característica física de las moléculas de PIKA en la composición de la invención se define por el peso molecular medio, las moléculas de PIKA puede tener un peso molecular medio igual o superior a 150.000 Daltons, igual o superior a 250.000 Daltons, igual o superior a 350.000 Daltons, igual o superior a 500.000 Daltons, igual o superior a 650.000 Daltons, igual o superior a 750.000 Daltons, igual o superior a 1.000.000 Daltons, igual o superior a 1.200.000 Daltons, igual o superior a 1.500.000 Daltons o igual o superior a 2.000.000 Daltons.

40

**[0121]** Cuando una característica física de las moléculas PIKA en la composición de la invención está definida por el coeficiente de sedimentación, que es una medida de peso y tamaño molecular, las moléculas de PIKA pueden tener un coeficiente de sedimentación superior a 9, o superior a aproximadamente 12, o superior a aproximadamente 13,5, o superior a 15, o superior a 16, o superior a 17, o superior a 18, o superior a 19, o superior a 20, o superior a 21, o superior a 22, o superior a 25 o superior a 30.

45

**[0122]** En algunas realizaciones la invención proporciona una composición adyuvante polinucleotídica que comprende ácido polirribonucleotídico-polirribocitidílico (PIC), kanamicina y calcio, donde la composición excluye una cantidad detectable de moléculas que tienen un peso molecular de aproximadamente o inferior a 30.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 40.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 50.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 60.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 70.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 80.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 90.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 100.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 150.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 200.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 250.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 300.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 350.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 400.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 450.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 500.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 600.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 700.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 800.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 900.000 Daltons, aproximadamente o inferior a 1.000.000 Daltons. En esta realización, la exclusión de estas moléculas de

60

bajo peso molecular es especialmente de interés hasta un nivel tal que la exclusión de dichas moléculas no tiene efecto inmunogénico significativo.

**[0123]** El inventor ha demostrado que PIKA que comprende moléculas de un peso molecular de hasta  $1,0 \times 10^6$  Daltons es seguro en animales en pruebas de toxicidad específicas (véase el Ejemplo 7). PIKA que comprende moléculas de un peso molecular de hasta  $1,2 \times 10^6$  Daltons se ha usado de forma segura en estudios preclínicos (véase el Ejemplo 3). También se ha demostrado que PIKA es seguro cuando se usa en una composición inmunogénica (véase el Ejemplo 8). Esta composición de PIKA proporciona beneficios en términos de eficacia. PIKA que comprende moléculas de un peso molecular de hasta  $6,6 \times 10^5$  Daltons también desencadena una respuesta inmunitaria eficaz con un margen más amplio de seguridad cuando se utiliza en humanos y animales. Elevando el peso molecular de las moléculas más pequeñas presentes hasta  $6,6 \times 10^5$  Daltons y, preferiblemente, hasta  $3,0 \times 10^5$  Daltons mejora la eficacia del adyuvante sin comprometer los estándares de seguridad.

**[0124]** Se ha descubierto adicionalmente que la concentración de la composición adyuvante polinucleotídica puede afectar al peso molecular de las moléculas contenidas en la composición. Se ha demostrado que el peso molecular de PICKCa aumenta si aumenta la concentración de la composición del adyuvante (véase el Ejemplo 5). El inventor ha observado que el aumento de la concentración del adyuvante polinucleotídico puede producir la coalescencia (o agregación) de las moléculas de PICKCa, lo que da lugar a moléculas con un peso molecular mayor. Se ha demostrado que este proceso es irreversible. Por tanto, la dilución posterior de la composición adyuvante polinucleotídica en un medio adecuado no da lugar a una reducción en el peso molecular de las moléculas de adyuvante. Como se observa en el Ejemplo 6, cuando la forma molecular más grande concentrada de la composición adyuvante polinucleotídica se combina con el antígeno del virus de la rabia, el resultado es una composición que retiene su intervalo de peso molecular alto. Una vacuna antirrábica obtenida de esta forma mostraba efectos secundarios adversos en ensayos clínicos humanos (véase el Ejemplo 4).

**[0125]** En este documento puede usarse la composición PIKA de la invención proporcionada en cualquier tampón fisiológicamente aceptable aunque se prefieren tampones fosfato. Pueden usarse como sustitutos de los tampones fosfato otros tampones aceptables, como acetato, tris, bicarbonato, carbonato y similares.

**[0126]** El pH del componente acuoso estará preferiblemente entre 4,0 y 10,0, aunque es preferible ajustar el pH del sistema entre 6 y 8,5, donde este pH no reduzca significativamente la estabilidad de otros componentes de la composición y no sea fisiológicamente inadecuado de ninguna otra forma. En determinadas realizaciones, la porción acuosa de la composición inmunogénica está en una solución salina tamponada. Cuando se pretende que estas composiciones sean para administración parenteral, es preferible hacer dichas soluciones de modo que la tonicidad, es decir, la osmolaridad, sea esencialmente la misma de los líquidos fisiológicos normales para prevenir la inflamación postadministración o la absorción rápida de la composición debido a las concentraciones iónicas diferenciales entre la composición y los líquidos fisiológicos.

**[0127]** La cantidad de solución salina tamponada empleada en estas composiciones será la cantidad necesaria para elevar el valor de la composición a la unidad. Es decir, una cantidad de solución salina tamponada suficiente para completar el 100 % se mezclará con otros componentes para completar el volumen de la composición.

**[0128]** En determinadas realizaciones, los antígenos pueden haberse purificados a partir de una fuente natural, sintetizarse mediante síntesis en fase sólida o pueden obtenerse mediante tecnología de genética recombinante. El antígeno puede comprender un fragmento de una proteína que comprenda una o más regiones inmunogénicas de la molécula. Los antígenos también pueden ser proporcionados por células o microorganismos completos (p. ej., partículas víricas completas) que puede estar vivas, atenuadas o truncadas, o muertas.

**[0129]** En otras realizaciones, los antígenos incluyen uno o más agentes de agentes infecciosos, un antígeno vegetal, agentes cancerígenos, agentes alérgicos y otro antígeno humano, como para el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias. En otras realizaciones, los antígenos incluyen uno o más agentes infecciosos de cualquier de los virus, bacterias, de *Mycobacterium*, fúngicos y de parásitos.

**[0130]** La composición adyuvante polinucleotídica de la presente invención también puede utilizarse para potenciar la respuesta inmunitaria frente a antígenos producidos por el uso de vacunas de ADN. Las secuencias de ADN en estas vacunas que codifican el antígeno pueden estar "desnudas" o contener un sistema de administración, como liposomas.

**[0131]** En determinadas realizaciones, la composición adyuvante polinucleotídica puede usarse en combinación con vacunas. No importa si la vacuna contiene adyuvantes o no. Las clases de vacunas incluidas son enfermedades antiinfecciosas, anticancerígenas, antialérgicas, anti-enfermedades autoinmunitarias e inmunoanticoncepción.

5 **[0132]** La invención también contempla el uso del adyuvante polinucleotídico de la invención en combinación con cualquier antígeno del virus de la rabia adecuado.

**[0133]** En determinadas realizaciones, el antígeno del virus de la rabia puede ser antígeno del virus de la rabia sin procesar inactivado como un antígeno del virus de la rabia sin procesar inactivado obtenido en células de riñón de hámster (HKC-ICRA) o un antígeno del virus de la rabia purificado inactivado como un antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster (HKC-IPRA).

10

**[0134]** En determinadas realizaciones, la composición adyuvante polinucleotídica puede usarse con una vacuna antirrábica. Hay vacunas antirrábicas adecuadas disponibles en el mercado o en investigación entre las que se incluyen vacunas inactivada, subunidades recombinantes y peptídicas como la vacuna de células diploides humanas (HDCV), o vacuna antirrábica purificada inactivada obtenida en células de riñón de hámster (HKC-IPRV) o vacuna antirrábica sin procesar inactivada obtenida en células de riñón de hámster (HKC-ICRV) o vacuna antirrábica purificada obtenida en células vero (PVRV) o purificada obtenida en células de embrión de pollo (PCEC) o vacuna purificada obtenida en embrión de pato (PDEV). Sin embargo, no todas las vacunas antirrábicas inducen una respuesta inmunitaria mediada por células, lo cual es importante en las inmunizaciones pre y postexposición. Cuando la composición adyuvante polinucleotídica (p. ej., PIKA) se administra con la vacuna antirrábica, la respuesta inmunitaria inducida incluye: respuestas no específicas (p. ej., aumento de las funciones de macrófagos), respuestas humorales (p. ej., aumento de la producción de anticuerpos específicos) y respuestas mediadas por células (p. ej., producción de citoquinas incluyendo interferón e interleuquina-2).

15  
20

25 **[0135]** En determinadas realizaciones la invención proporciona un kit que comprende el adyuvante polinucleotídico y un compuesto antigénico.

**[0136]** Una composición inmunogénica que incluye PIKA es capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica por dos vías: i) inmunidad humoral, que incluye la estimulación de las células B y la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas (otras células también están implicadas en la generación de una respuesta anticorpal, p. ej., células presentadoras de antígeno (APC, incluyendo macrófagos) y células T colaboradoras (Th1 y Th2)) y ii) inmunidad mediada por células, que generalmente implica a las células T incluyendo los linfocitos T citotóxicos (CTL), aunque también están implicadas otras células en la generación de una respuesta CTL (p. ej., células Th1 y / o Th2 y APC). Los procedimientos para evaluar las respuestas inmunitarias humoral y / o celular en un individuo son bien conocidos en la técnica (véanse los Ejemplos 10, 11, 12 y 13).

30  
35

**[0137]** Adicionalmente, la composición adyuvante polinucleotídica puede alterar la calidad de la respuesta inmunitaria afectando a las subclases (isotipos) de las inmunoglobulinas producidas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 para las IgG humanas; IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 para las IgG de ratón) así como sus afinidades.

40

**[0138]** Una respuesta regulada por las células Th1 en ratones inducirá IgG1, IgG2a, IgG2b y, en menor grado, IgG3, y también favorecerá una respuesta inmunitaria mediada por células frente a un antígeno. Si la respuesta IgG frente a un antígeno está regulada por las células de tipo Th2, potenciará predominantemente la producción de IgG1 e IgA.

45

**[0139]** Las pruebas de potencia del NIH usando una composición del adyuvante PIKA y un antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster sorprendentemente mostraron que la potencia inmunogénica de la composición requiere una presencia mínima del antígeno del virus de la rabia (véase el Ejemplo 14). La potencia de la composición aumenta rápidamente en relación con la presencia de antígeno del virus de la rabia adicional que exceda de 1 UI de antígeno. Por tanto, se observó que la velocidad de incremento en la potencia de la composición era mayor con aproximadamente de 1,5 UI a 2,5 UI del antígeno del virus de la rabia presente en la composición. La prueba de potencia del NIH se describe en: Laboratory Techniques in Rabies, editado por F X Meslin, M M Kaplan, H Koprowski 4ª Edición ISBN 92 4 1544 1.

50  
55

**[0140]** Las pruebas usando una composición del adyuvante PIKA y un antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster demostraron que la potencia inmunogénica de la composición aumentaba al tiempo que la cantidad de adyuvante presente excedía la cantidad de antígeno presente. La potencia aumentaba cuando la relación entre PIKA y el antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster aumentaba siendo la proporción preferida mayor a 3: 1 (véase el Ejemplo 15).

60

5 **[0141]** La invención contempla procedimientos de uso del adyuvante polinucleotídico de la invención con un antígeno para, por ejemplo, inducir una respuesta humoral específica del antígeno y / o una respuesta celular específica (p. ej., células T) en un sujeto. La respuesta inmunitaria desencadenada puede ser una respuesta a un antígeno en un sujeto no expuesto anteriormente al antígeno o puede servir para potenciar una respuesta inmunitaria existente (p. ej., como durante una reinmunización).

10 **[0142]** En determinadas realizaciones, la composición adyuvante PIKA y una composición inmunogénica que comprende el adyuvante PIKA y un compuesto antigénico pueden estar secas por congelación (liofilizadas) para una estabilidad a largo plazo y su conservación en forma sólida. El procedimiento de liofilización es conocido por los expertos en la técnica. La reconstitución de la composición inmunogénica que contiene PIKA y un compuesto antigénico demostró un nivel mantenido de eficacia (véase el Ejemplo 16).

15 **[0143]** La composición inmunogénica puede prepararse como una solución líquida, suspensión o emulsión inyectables. La preparación de formulaciones de una composición inmunogénica deseada se describe generalmente en *New Trends and Developments in Vaccines*, editado por Voller y col., University Park Press, Baltimore, Md., EE. UU., 1978. La composición inmunogénica de la presente invención puede emplearse en formas tales como cápsulas, soluciones líquidas, emulsiones, suspensiones o elixires para su administración oral, o formas líquidas estériles como soluciones, emulsiones o suspensiones. Se utiliza preferiblemente cualquier vehículo inerte, como  
20 una solución salina, o solución salina tamponada con fosfato, o cualquier vehículo en el que los compuestos utilizados en el procedimiento de la presente invención tiene propiedades de solubilidad adecuadas para su uso en los procedimientos de la presente invención.

25 **[0144]** La composición inmunogénica de la presente invención puede administrarse a un sujeto usando diversos procedimientos conocidos en la técnica. En determinadas realizaciones, la composición inmunogénica puede administrarse por vía parenteral, mediante inyección, como inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea, o mediante inhalación. En otras realizaciones, la composición inmunogénica puede administrarse por vía rectal, vaginal, nasal, oral, oftálmica, tópica, transdérmica o intradérmica. Cuando el modo de administración es mediante inyección, el compuesto antigénico encapsulado puede permanecer en el sitio de inyección hasta dos  
30 semanas, proporcionando, por tanto, un depósito de antígeno que aporte una liberación mantenida o una liberación pulsátil *in vivo*. Este sistema de administración puede permitir formulaciones inmunogénicas de una única descarga para producir compuestos antigénicos que, de otro modo, podrían requerir inyecciones múltiples para inducir una respuesta inmunitaria.

35 **[0145]** Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debería estar adecuadamente tamponada si es necesario y haciendo primero el líquido diluyente isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas en particular son especialmente adecuadas para administración intravenosa e intraperitoneal. En relación con lo anterior, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos para los expertos en la materia a la vista de la presente descripción. Entre los ejemplos de medios de  
40 inyección que pueden usarse en la presente invención se incluyen un tampón con o sin agentes dispersantes y / o conservantes y aceite comestible, aceite mineral, aceite de hígado de bacalao, mono, di o triglicéridos y una mezcla de los mismos.

45 **[0146]** La cantidad exacta requerida de estas composiciones variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad, peso y condiciones generales del sujeto, la gravedad de la enfermedad, infección o afección que se está tratando o previniendo, el compuesto en concreto utilizado, su modo de administración y similares. Un experto en la material puede determinar la cantidad apropiada usando sólo experimentación de rutina según las descripciones de este documento. Tras una administración inicial, los sujetos pueden recibir una o más inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas.

50

**[0147]** La descripción anterior describe en general la presente invención. Los siguientes ejemplos ayudarán al entendimiento de la presente invención. Estos ejemplos se describen exclusivamente con propósitos de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención. Los cambios en la forma y la sustitución de equivalentes se contemplan como circunstancias que pueden sugerir o dar lugar a un expediente. Aunque se han utilizado términos  
55 específicos se pretende que estos términos tengan un sentido descriptivo y no sean limitantes.

**EJEMPLOS****EJEMPLO 1: DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE PIKA Y Av-PICKCa**

5 [0148] En este ejemplo se muestra cómo puede determinarse el peso molecular del adyuvante PIKA en comparación con Av-PICKCa.

[0149] Los expertos en la materia conocen la electroforesis en gel de agarosa, por lo que en esta invención sólo se describen los pormenores en este documento. El gel de agarosa usado en la presente invención tenía una  
10 concentración de agarosa al 1,5 %. Los marcadores de peso molecular fueron ADN de 100 pb escalonados de 100 pb a 1.000 pb que se corresponden con un intervalo de peso molecular de  $6,6 \times 10^4$  a  $6,6 \times 10^5$  Daltons. Las muestras de carga fueron 4  $\mu$ l a 1 mg / ml. En la Figura 1 se muestra una imagen representativa del resultado de las  
muestras en el gel de agarosa siguiendo las indicaciones de este párrafo. Los cinco (5) lotes diferentes probados mostraron un amplio intervalo de distribución de sus pesos moleculares. Los límites superiores de sus pesos  
15 moleculares oscilaban de  $2,3 \times 10^5$  Daltons para Av-PICKCa a  $5,28 \times 10^5$  Daltons para PIKA.

**EJEMPLO 2: EFICACIA INMUNITARIA DE PIKA EN COMPARACIÓN CON Av-PICKCa**

[0150] En este ejemplo se muestra la diferencia entre la potencia de Av-PICKCa con un peso molecular máximo de 230.000 Daltons y muestras de PIKA con un peso molecular máximo de hasta 528.000 Daltons.

[0151] Se mezclaron tres lotes del adyuvante PIKA de diferente peso molecular y un lote con moléculas del peso molecular correspondiente al de Av-PIKA con el antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster (HKC-IPRA). Las composiciones resultantes se sometieron a la prueba de eficacia del  
25 NIH.

[0152] La prueba del NIH es un estudio comparativo riguroso y extenso entre la vacuna antirrábica en investigación y una vacuna antirrábica estandarizada. Los ratones vacunados se infectan con una cepa del virus de la rabia vivo y se determina su tasa de supervivencia. Se administraron diferentes diluciones de la vacuna antirrábica  
30 a los diferentes grupos de ratones. Una comparación de las tasas de supervivencia entre los grupos de ratones expuestos a las vacunas experimental y estandarizada determina la potencia de la vacuna experimental (Laboratory Techniques in Rabies, Editado por F X Meslin, M M Kaplan H Koprowski, 4ª Edición, ISBN 92 4 1544 1).

[0153] La eficacia de cada vacuna combinada se ha normalizado en relación con la vacuna no combinada estándar donde la eficacia de la no combinada se designó como 1, y la eficacia relativa se designó como las veces que aumentaba la eficacia de la combinada con respecto a la no combinada. En la tabla 1 se resumen los resultados. Como puede verse en la Tabla 1, cuanto mayor es el peso molecular del adyuvante PICKCa, mayor es la  
35 eficacia de aumento del valor de la vacuna antirrábica.

**Tabla 1. Efectos del peso molecular sobre la potencia de la vacuna de la antirrábica**

Tipo de adyuvante	Antígeno	Nº de muestra	Límite superior de peso molecular del adyuvante	ED <sub>50</sub>	Potencia (UI / ml)
PIKA	HKC-IPRA	20000304	$5,28 \times 10^5$	2,10	5,00
PIKA	HKC-IPRA	20000907	$4,62 \times 10^5$	2,00	3,98
PIKA	HKC-IPRA	990202	$3,96 \times 10^5$	1,98	3,80
Av-PICKCa	HKC-IPRA	000703	$2,30 \times 10^5$	1,88	3,00
	HKC-IPRA	Vacuna control		1,40	1,00

40

**EJEMPLO 3: COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN ENTRE PIKA Y Av-PICKCa**

[0154] En este ejemplo se muestran la diferencia en la capacidad para provocar la producción de interferón entre muestras de Av-PICKCa con un peso molecular máximo de 230.000 Daltons y muestras de PIKA con un peso  
45 molecular máximo de hasta 1.200.000 Daltons.

[0155] Se compararon dos lotes de PIKA con límites superior de peso molecular de  $1,2 \times 10^6$  Daltons y  $4,6 \times 10^5$  Daltons con un lote de Av-PICKCa con un límite de peso molecular superior de  $2,3 \times 10^5$  Daltons.

[0156] Las composiciones de PIKA y Av-PICKCa se combinaron con un antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster (HKC-IPRA). Las composiciones se inyectaron por vía subcutánea en los ratones. Después de dos horas, se determinó la presencia de interferón en cada ratón. El procedimiento general para determinar el interferón es conocido por los expertos en la técnica. Brevemente, en una placa de 96 pocillos, se inoculó cada pocillo con células L929 a 0,15 ml / pocillo con aproximadamente 30.000  
55 células. Después de tres (3) días cuando las células habían crecido hasta la confluencia, se añadieron muestras de

los sueros (0,1 ml / pocillo) a los pocillos en las que los sueros se habían diluido de 1: 20 a 1: 640. Se usaron tres pocillos para cada muestra diluida. Los pocillos se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Las muestras de suero se eliminaron mediante lavado. Se usaron partículas del virus de la estomatitis vesicular (VSV) para detectar la producción de interferón. En la Tabla 2 se muestra la producción de interferón inducida por las mezclas. Como se puede observar en la Tabla 2, cuanto mayor es el peso molecular de las muestras de PIKA, mejor es la inducción de producción de interferón.

**Tabla 2. Relación entre el peso molecular y la producción de interferón**

Tipo de adyuvante	Nº de lote	Intervalo superior de peso molecular en Daltons	Nº de lote de HKC-IPRA	Relación PIKA: HKC-IPRA	Valor de producción de interferón
PIKA	20010601	1,20 x 10 <sup>6</sup>	20001205	4: 1	868,6
PIKA	200009-7	4,62 x 10 <sup>5</sup>	20001205	4: 1	530,6
Av-PICKCa	000703	2,30 x 10 <sup>5</sup>	20001205	4: 1	46,4

#### **EJEMPLO 4: ENSAYO CLÍNICO DE VACUNA HUMANA DE 1996 (CON EFECTOS SECUNDARIOS TÓXICOS)**

10

**[0157]** En este ejemplo se demuestra que el adyuvante PICKCa cuando se combina con una vacuna genera un nivel inaceptable de efectos secundarios cuando se administra para su uso en humanos.

**[0158]** El objetivo del estudio era evaluar la seguridad y la respuesta inmunitaria de una vacuna antirrábica que comprende el adyuvante PICKCa a una concentración de 11,95 mg / ml y una masa molar de 69.700 (tenga en cuenta que, en este caso, la masa molar no es equivalente a los Daltons; véase el Ejemplo 5) y un antígeno del virus de la rabia sin procesar inactivado obtenido en células de riñón de hámster (HKC-ICRA). Los resultados y conclusiones del ensayo clínico anterior no se han presentado previamente en público.

**[0159]** Los 40 pacientes participantes en el ensayo clínico se dividieron en dos grupos de 20 personas. Cada grupo recibió cinco (5) dosis de 2 ml administrados por vía intramuscular el día 1, día 3, día 7 y día 30. Un grupo recibió el antígeno del virus de la rabia con el adyuvante PICKCa y el otro grupo recibió el antígeno del virus de la rabia con un adyuvante de alumbre.

**[0160]** Desde una perspectiva de seguridad, se realizaron observaciones de la temperatura corporal y de los síntomas locales y sistémicos a las 24 horas, 48 horas y 72 horas después de cada inyección. Se hicieron las siguientes observaciones:

**Tabla 3. Efectos secundarios tras la inyección de HKC-ICRA con alumbre o PICKCa**

Efecto secundario	Grupo	Número de voluntarios	Número con efecto secundario
Local	PICKCa plus HKC-ICRA	20	6
	Alumbre más HKC-ICRAx5	20	2
Sistémico	PICKCa más HKC-ICRA	20	4
	Alumbre más HKC-ICRAx5	20	0

30

**[0161]** Entre los efectos adversos sistémicos se incluyen: fiebre (1), exantema (2), dolor articular (2), ganglios linfáticos (1), edema de garganta (1). Entre los efectos adversos locales se incluyen: enrojecimiento de la piel en el sitio de inyección (6).

**[0162]** La investigación posterior del inventor atribuyó los efectos secundarios observados al tamaño molecular de las moléculas del adyuvante (véanse los Ejemplos 5 y 6).

#### **EJEMPLO 5. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE PICKCA Y SU PESO MOLECULAR**

**[0163]** En este ejemplo se demuestra que el aumento de la concentración del adyuvante PICKCa da lugar a una composición con un aumento del peso molecular.

**[0164]** PICKCa puede hacerse en concentraciones diferentes. Se ha planteado la hipótesis de que el PICKCa podría existir como un complejo de polímeros en formas diferentes cuando se preparó en diferentes concentraciones. Se usó para este fin dispersión de luz láser. La dispersión de luz láser se ha utilizado ampliamente para determinar la masa molar del peso medio (Mp) y el radio de giro (Rg). Los equipos están disponibles en el mercado y el proceso es conocido por los expertos en la técnica. En la Tabla 4 se muestra que el peso molecular observado de PICKCa por dispersión de luz láser se correlaciona con su concentración.

50

**Tabla 4. Peso molecular observado mediante dispersión de luz láser**

Concentración de PICKCa (mg / ml)	Masa molar del peso medio
-----------------------------------	---------------------------

11,95	$6,97 \times 10^4$
2,00	$7,30 \times 10^3$
1,00	$2,00 \times 10^3$

#### **EJEMPLO 6. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN PREVIA DE PICKCa Y EL PESO MOLECULAR DE LA VACUNA**

5 **[0165]** En este ejemplo se demuestra una correlación entre el aumento del peso molecular del adyuvante PICKCa y el peso molecular resultante de la composición que incluye el adyuvante PICKCa y un antígeno del virus de la rabia sin procesar inactivado obtenido en células de riñón de hámster.

10 **[0166]** También se sospecho que la concentración previa a la combinación de las muestras de PICKCa podría afectar a los antígenos en las vacunas. Las muestras de PICKCa se combinaron con un antígeno del virus de la rabia sin procesar inactivado obtenido en células de riñón de hámster. Se usó para este fin dispersión de luz láser. La dispersión de la luz láser se ha utilizado ampliamente para determinar la masa molar del peso medio (Mp) y el radio de giro (Rg). Los equipos están disponibles en el mercado y el proceso es conocido por los expertos en la técnica. En la Tabla 5 se muestra que un aumento de las concentraciones previas a la combinación de PICKCa daba  
15 lugar a un aumento del Mp de las vacunas antirrábicas.

**Tabla 5. Relación entre la concentración previa a la combinación de PICKCa y el Pm de las vacunas antirrábicas**

Concentración de PICKCa (mg / ml)	Masa molar del peso medio	Radio de giro
11,95	$29,6 \times 10^4$	$17,2 \times 10^2$
4,00	$22,2 \times 10^4$	$15,0 \times 10^2$
2,00	$13,8 \times 10^4$	$11,8 \times 10^2$
1,00	$5,60 \times 10^4$	$7,55 \times 10^2$
1,00	$5,29 \times 10^4$	$6,50 \times 10^2$

#### **EJEMPLO 7: PRUEBA DE TOXICIDAD DE PIKA**

**[0167]** En este ejemplo se demuestra la característica de seguridad del adyuvante PIKA cuando existe una limitación en el peso molecular máximo.

25 **[0168]** Se realizó una prueba de toxicidad según las previsiones de la *China National Drug Standard (WS1-XG-050-2000)*. Brevemente, se inyectaron cinco (5) ratones con un peso corporal de aproximadamente 18-22 gramos por vía intravenosa con 0,5 ml / ratón de una solución de cloruro sódico que contenía 0,3 mg de un adyuvante PIKA que tiene un peso molecular superior de aproximadamente 525.000 a aproximadamente 1.000.000 Daltons. Los ratones inyectados se observan durante 7 días y se pesan al final de la observación. En la Tabla 6 se resumen los  
30 resultados que demuestran que el peso molecular del adyuvante PIKA debería ser como máximo de  $1,0 \times 10^6$  Daltons sin toxicidad obvia.

**Tabla 6. Prueba de toxicidad del adyuvante PIKA**

Nº de lote	Intervalo superior de peso molecular (Daltons)	Peso de los ratones antes de la prueba (g)	Cantidad inyectada en la vena de la cola	Estado de los ratones al final de la prueba	Peso de los ratones después de la prueba	Observaciones
20000304	$5,25 \times 10^5$	18-19	0,5 ml / ratón	Sanos	23-26	Satisfactorio
20010103	$5,20 \times 10^5$	18-19	0,5 ml / ratón	Sanos	22-25	Satisfactorio
20010816	$5,20 \times 10^5$	18-19	0,5 ml / ratón	Sanos	23-25	Satisfactorio
20010511	$1,00 \times 10^6$	18-20	0,5 ml / ratón	Sanos	24-26	Satisfactorio

#### **EJEMPLO 8: PIKA EN EL ESTUDIO DE TOXICIDAD DE LA COMPOSICIÓN DE VACUNA**

35

**[0169]** El objetivo de este experimento es validar la seguridad del adyuvante PIKA.

**[0170]** El adyuvante PIKA (peso molecular de 66.000 Daltons a 660.000 Daltons) se combinó con el antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster (HKC-IPRA) en una proporción de  
40 PIKA: HKC-IPRA de 4: 1.

**[0171]** La composición de vacuna de PIKA y HKC-IPRA se compararon con una vacuna antirrábica purificada inactivada (IPRV) disponible en el mercado que incluye un adyuvante alumbre.

[0172] Se administraron cinco (5) dosis de la composición de vacuna a los ratones el día 0, día 3, día 7, día 14 y día 28. La dosis administrada era equivalente a aproximadamente 300 veces la dosis de un humano adulto bajo un régimen de inmunización antirrábica humana normal.

5 [0173] Los resultados de las observaciones de toxicidad se presentan en la tabla 7 a continuación:

**Tabla 7: Observaciones de la seguridad tras la administración de la vacuna antirrábica**

Formulaciones	Efecto	Día 0	Día 3	Día 7	Día 14 1	Día 28
HKC-IPRA más PIKA	Alergia	0 / 20	0 / 20	0 / 20	0 / 20	2 / 20
HKC-IPRA más PIKA	Muerte	0 / 20	0 / 20	0 / 20	0 / 20	0 / 20
IPRV (incluyendo alumbre)	Alergia	0 / 20	0 / 20	0 / 20	5 / 20	?
IPRV (incluyendo alumbre)	Muerte	0 / 20	0 / 20	0 / 20	2 / 20	7 / 20

Clave: (aparición observada) / (número total)

10

[0174] La conclusión obtenida es que la combinación PIKA / HKC-IPRA es más segura que la IPRV disponible en el mercado.

**EJEMPLO 9. USO SEGURO DEL ADYUVANTE PIKA EN HUMANOS**

15

[0175] En 2002, se inmunizó a cinco (5) voluntarios con una composición de PIKA (peso molecular de 66.000 a 660.000 Daltons) y el antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster (HKC-IPRA). La composición de vacuna se le administró a voluntarios el día 0, día 3, día 7, día 14 y día 30.

20 [0176] No se observaron efectos secundarios locales o sistémicos en ninguno de los pacientes después de cada una de las vacunaciones.

[0177] La potencia de la vacuna se determinó usando la prueba del NIH estándar con los resultados presentados a continuación en la Tabla 8:

25

**Tabla 8: Observaciones de la potencia de la vacuna antirrábica**

Día	ED <sub>50</sub>	Anticuerpo neutralizante UI / ml
0	0	0
14	> 1,9	> 1,84
45	2,35	5,17

[0178] Los resultados indican que la composición de vacuna de PIKA y HKC-IPRA induce una respuesta inmunitaria específica y desencadena la producción de anticuerpos neutralizantes protectores.

30

**EJEMPLO 10: PRUEBA POSTERIOR A LA EXPOSICIÓN (INMUNIDAD MEDIADA POR CÉLULAS)**

[0179] La prueba posterior a la exposición es la prueba más definitiva de que la vacuna tiene la capacidad de erradicar los patógenos del cuerpo del huésped tras la infección. Por tanto, es una indicación de la respuesta inmunitaria mediada por células inducida por la vacuna.

35

[0180] En las pruebas posteriores a la exposición se infectó a ratones con una cepa silvestre del virus de la rabia y, posteriormente, se les inoculó con: un antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster (HKC-IPRA) en combinación con adyuvante PIKA (intervalo de peso molecular de  $1,65 \times 10^5$  a  $1,2 \times 10^6$  Daltons) o HKC-IPRA en combinación con un adyuvante de hidróxido de aluminio (alumbre), una vacuna antirrábica purificada obtenida en células vero comercial (PVRV) o solución de tampón fosfato (PBS). Los resultados muestran de forma conclusiva que el adyuvante PIKA mejoraba las tasas de supervivencia, véase la Tabla 9.

40

**Tabla 9. Prueba de estimulación tras la exposición**

9.1 Tasa de muerte tras el tratamiento		
Grupos	Dosis predeterminada del 80 % de muerte	Dosis predeterminada del 50 % de muerte
PIKA más HKC-IPRA	2 / 20	0 / 20
Alumbre más HKC-IPRA	10 / 20	9 / 20
PVRV	16 / 20	3 / 20
Control (PBS)	15 / 20	14 / 20
9.2 Tasa de supervivencia tras el tratamiento		

	Predeterminado al 80 %	Predeterminado al 50 %
Grupos	Dosis de muerte	Dosis de muerte
PIKA más HKC-IPRA	90,00 %	100,00 %
Alumbre más HKC-IPRA	50,00 %	55,00 %
PVRV	20,00 %	85,00 %
Control (PBS)	25,00 %	30,00 %

[0181] Los ratones infectados con una inyección subcutánea de virus de la rabia vivo se trataron con la vacuna a la 6 horas, 1 día, 2 días y 3 días tras la infección.

5 **EJEMPLO 11. PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN GAMMA EN LA RESPUESTA INMUNITARIA MEDIADA POR CÉLULAS ESPECÍFICA DE ANTÍGENO**

[0182] La producción de interferón gamma es un indicador de la actividad de la inmunidad mediada por células.

10 [0183] En este experimento, se tomaron muestras de sangre de dos pacientes del ensayo clínico y dos individuales control. Los pacientes voluntarios habían sido vacunados con la vacuna antirrábica PIKA, que contenía PIKA (intervalo de peso molecular de 66.000 a 660.000 Daltons) y el antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster (HKC-IPRA) 2,5 años antes de la recogida de las muestras de sangre.

15 [0184] Los resultados en la Figura 2 muestran la diferencia significativa en el interferón gamma producida por los dos pacientes del ensayo clínico cuando se comparan con los controles individuales.

20 [0185] Los monocitos aislados de las muestras de sangre se incubaron con la misma HKC-IPRA que se usó en el ensayo clínico original. Después de 3 días de incubación, se recogieron los sobrenadantes sin células y se determinó el interferón gamma en los sobrenadantes mediante ELISPOT específico de citoquina. Se observó un efecto dependiente de dosis.

25 [0186] Las conclusiones de la observación anterior son:

- la vacuna antirrábica que incluía el adyuvante PIKA de la invención tenía la capacidad de inducir la producción de interferón gamma y, en consecuencia, para desencadenar una respuesta inmunitaria mediada por células
- la respuesta de interferón gamma es específica (es decir, la respuesta está dirigida frente al antígeno del virus de la rabia en oposición a una reacción no específica). Si la respuesta de interferón gamma no fuera específica no se observaría variación en el nivel de producción de interferón gamma en la sangre de los pacientes vacunados mientras que aumenta la concentración del antígeno estimulante

35 **EJEMPLO 12: PRUEBA DE EFICACIA DE PIKA**

[0187] El objeto de este experimento es demostrar la capacidad de PIKA para desencadenar la producción de interferón gamma e interleuquina 12 (IL-12).

40 [0188] Las muestras de esplenocitos de ratones sanos normales se incubaron durante un periodo de tres días en presencia de PIKA (intervalo de peso molecular entre 66.000 y 660.000) en un entorno limpio. Al final del periodo, el nivel de citoquinas en los sobrenadantes se comprobó con pruebas de ELISA específicas para IL-12(p40) e interferón gamma. Los resultados del experimento se presentan a continuación en la Tabla 10.

**Tabla 10: Prueba *in vitro* de producción de citoquinas**

PIKA µg / ml	IFN-gamma pg / ml	IL-12P40 pg / ml
0	3	0
0,4	23	91
2	22	98
10	30	134
50	179	186
100	559	N / A
250	1.340	N / A

45 [0189] La conclusión del experimento anterior es que PIKA desencadena una producción dependiente de dosis de las citoquinas interferón gamma e IL-12 y por tanto, induce una respuesta inmunitaria mediada por células.

[0190] En un experimento adicional, se administraron a cuatro (4) ratones 500 µg / rañ de PIKA (intervalo de peso molecular de 66.000 a 660.000 Daltons) mediante inyección peritoneal. Se usó una solución de tampón fosfato como prueba control negativa. Cinco horas después de la inyección se extrajo una muestra de sangre y se preparó el suero. El nivel de citoquinas en el suero se comprobó con pruebas de ELISA específicas de IL-12(p40) e interferón gamma. Los resultados del experimento se presentan a continuación en la Tabla 11.

**Tabla 11: Prueba *in vivo* para la producción de citoquinas**

Grupo	IFN-gamma pg / ml	IL-12P40 pg / ml
PBS	4	2
PIKA	410	40

[0191] La conclusión del experimento anterior es que PIKA es eficaz a la hora de estimular una respuesta inmunitaria mediada por células.

**EJEMPLO 13: USO DE PIKA CON ANTÍGENO DEL VIRUS DE LA RABIA PURIFICADO INACTIVADO OBTENIDO EN CÉLULAS VERO**

15 [0192] El objetivo de este experimento es evaluar la eficacia de PIKA en combinación con una vacuna antirrábica purificada inactivada obtenida en células vero (PVRV).

[0193] PIKA con un intervalo de peso molecular de 66.000 a 660.000 Daltons se combinó con PVRV para formar una vacuna antirrábica. La prueba del NIH se usó para evaluar la potencia de la composición de vacuna resultante. 20 Los resultados se presentan a continuación en la tabla 12.

**Tabla 12: Resultados de la prueba del NIH para PIKA y la vacuna antirrábica purificada inactivada obtenida en células vero**

Composición de vacuna	Antígeno	Adyuvante	Potencia de la composición (UI / ml)
PVRV	0,02 UI / ml	n / a	0,46
PVRV más PIKA	0,02 UI / ml	PIKA	3,68

25 [0194] La conclusión obtenida es que PIKA aumenta la potencia de la vacuna antirrábica purificada inactivada en células vero.

**EJEMPLO 14. DOSIS DEL ANTÍGENO**

30 [0195] En este experimento se demuestra el requisito de tener una cantidad mínima de antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster (HKC-IPRA) presente en la composición junto con el adyuvante PIKA (intervalo de peso molecular de 66.000 a 660.000 Daltons) para desencadenar un niveles sustancialmente potenciado de respuesta inmunitaria específica. Se añadieron cantidades crecientes de antígeno del virus de la rabia a una cantidad constante de 0,1 mg de adyuvante PIKA. La potencia se midió usando la prueba 35 de potencia de la vacuna antirrábica estándar del NIH. Tras un aumento inicial predecible en la potencia, se observó un aumento claro y drástico antes de que la potencia se estabilizara como se esperaba con la adición del antígeno (véase la Tabla 13).

**Tabla 13: Potencia de la vacuna con cantidades crecientes de antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster**

40

HKC-IPRA (UI)	HKC-IPRA más 0,1 mg de PIKA (UI)	Aumento marginal de la potencia (UI)
0,25	0,42	-
0,51	1,43	3,88
1,01	2,73	2,60
1,40	6,07	8,56
2,07	19,78	20,46
2,91	21,38	1,90

[0196] El aumento marginal en la potencia es el aumento en la potencia de la vacuna HKC-IPRA / PIKA observado para la adición de una UI de la presente HKC-IPRA.

45 [0197] La conclusión obtenida es que es necesaria una presencia mínima de antígeno antes de inducir una respuesta inmunitaria sustancial. Además, una cantidad de antígeno excesivo superior al punto desencadenante produce sólo un aumento marginal de la potencia.

**EJEMPLO 15. RELACIÓN ANTÍGENO ADYUVANTE**

[0198] Este experimento demuestra que la mezcla óptima del antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster (HKC-IPRA) y el adyuvante PIKA (intervalo de peso molecular de 66.000 a 660.000).

[0199] Se mezclaron diversas cantidades de antígeno con diversas cantidades de adyuvante con PBS añadido para garantizar un volumen total reproducible. La potencia de las vacunas resultantes se determinó usando la prueba de potencia del NIH. Los resultados se presentan en la Tabla 14.

[0200] La consideración de los resultados combinados de la prueba indica que la combinación de vacuna óptima es una proporción de PIKA con respecto al antígeno en el intervalo de al menos 3 a 1.

**Tabla 14: Potencia de la vacuna antirrábica a distintas proporciones de antígeno con respecto al adyuvante**

Muestras	HKC-IPRA (ml)	PIKA (ml)	PBS (ml)	Proporción (PIKA: HKC -IPRA)	ED <sub>50</sub>	Potencia (UI / ml)
A	0,20	0,80	-	4,0 a 1	2,65	7,84
B	0,20	0,70	0,10	3,5 a 1	2,46	5,20
C	0,20	0,60	0,20	3,0 a 1	2,40	4,22
D	0,20	-	0,80	0 a 1	1,85	1,43
Estándar			na	na	2,52	6,70

15

**EJEMPLO 16. CONSERVACIÓN LIOFILIZADA DE PIKA Y PIKA COMBINADOS CON LA VACUNA ANTIRRÁBICA**

[0201] En este ejemplo se demuestra que PIKA es estable en forma liofilizada.

20

[0202] La tecnología de liofilización se ha utilizado para la conservación a largo plazo de las vacunas antirrábicas durante un máximo de tres años. El inventor buscaba comprobar si la conservación liofilizada de PIKA (de intervalo de peso molecular de 66.000 a 660.000) y de las vacunas antirrábicas que contenían PIKA podría ser beneficiosa. Se usaron las siguientes composiciones para la prueba de conservación liofilizada: i) se añadió PIKA descongelado a un antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster liofilizado y descongelado (HKC-IPRA), ii) composición liofilizada de PIKA reconstituida más HKC-IPRA, iii) una vacuna antirrábica comercial liofilizada reconstituida (sin añadir PIKA) y iv) una vacuna antirrábica comercial descongelada. En la Tabla 15 se muestra que PIKA liofilizado y las vacunas antirrábicas que contienen PIKA eran ideales para la conservación a largo plazo de las vacunas antirrábicas.

25

**Tabla 15. Efectos de la conservación liofilizada sobre la potencia de las vacunas antirrábicas**

Muestra	ED <sub>50</sub>	Potencia relativa	UI / ml
i) Vacunas antirrábicas liofilizadas diluidas con PIKA	2,89	2,34	15,71
ii) Vacunas antirrábicas que contienen PIKA liofilizadas diluidas en PBS	3,00	3,00	20,23
iii) Vacunas antirrábicas comerciales PIKA liofilizadas diluidas en PBS	1,85	0,21	1,43
iv) Vacunas antirrábicas estándar descongeladas	2,52	1,00	6,70

30

## REIVINDICACIONES

1. Una composición adyuvante polinucleotídica que comprende un ácido polirribonucleotídico (PIC), kanamicina y un ión de calcio, en la que la composición adyuvante polinucleotídica tiene un peso molecular medio superior a 138.000 Daltons o un tamaño molecular medio superior a 9 Svedbergs.  
5
2. La composición adyuvante de la reivindicación 1 en la que la composición adyuvante polinucleotídica tiene un peso molecular medio igual o superior a 150.000 Daltons o un tamaño molecular medio igual o superior a 9,3 Svedbergs.  
10
3. La composición adyuvante de la reivindicación 1 en la que la composición adyuvante polinucleotídica tiene un peso molecular medio igual o superior a 250.000 Daltons o un tamaño molecular medio igual o superior a 11,8 Svedbergs.  
15
4. La composición adyuvante de la reivindicación 1 en la que la composición adyuvante polinucleotídica tiene un peso molecular medio igual o superior a 337.386 Daltons o un tamaño molecular medio igual o superior a 13,5 Svedbergs.  
20
5. La composición adyuvante de la reivindicación 1 en la que la composición adyuvante polinucleotídica tiene un peso molecular medio igual o superior a 13,5 Svedbergs.  
25
6. La composición adyuvante de la reivindicación 1, en la que la composición adyuvante polinucleotídica tiene un peso molecular medio igual o superior a 350.000 Daltons o un tamaño molecular medio igual o superior a 15,3 Svedbergs.  
30
7. La composición adyuvante de la reivindicación 1 en la que la composición adyuvante polinucleotídica tiene un peso molecular medio igual o superior a 500.000 Daltons o un tamaño molecular medio igual o superior a 16,14 Svedbergs.  
35
8. Una composición adyuvante polinucleotídica que comprende un ácido polirribonucleotídico (PIC), kanamicina y un ión de calcio, en la que la composición contiene moléculas heterogéneas en la composición adyuvante polinucleotídica en cuanto al peso molecular, donde el intervalo de peso molecular es de 66.000 a 1.200.000 Daltons o de tamaño es de 6,4 a 24,0 Svedbergs.  
40
9. La composición adyuvante de la reivindicación 8, en la que la composición adyuvante polinucleotídica tiene un intervalo de peso molecular de 300.000 a 1.200.000 Daltons o un intervalo de tamaño molecular de 12,8 a 24,0 Svedbergs.  
45
10. La composición adyuvante de la reivindicación 8, en la que la composición adyuvante polinucleotídica tiene un intervalo de peso molecular de 337.000 a 1.200.000 Daltons o un intervalo de tamaño molecular de 13,5 a 24,0 Svedbergs.  
50
11. La composición adyuvante de la reivindicación 8, en la que la composición adyuvante polinucleotídica tiene un intervalo de tamaño molecular de 13,5 a 24,0 Svedbergs.  
55
12. La composición adyuvante de la reivindicación 8, en la que la composición adyuvante polinucleotídica tiene un intervalo de peso molecular de 66.000 a 660.000 Daltons o un intervalo de peso tamaño de 6,4 a 18,3 Svedbergs.  
60
13. La composición adyuvante de la reivindicación 8, en la que la composición adyuvante polinucleotídica tiene un intervalo de peso molecular de 300.000 a 660.000 Daltons o un intervalo de tamaño molecular de 12,8 a 18,3 Svedbergs.  
65
14. La composición adyuvante de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la fuente de iones de calcio es cloruro cálcico, carbonato cálcico, fluoruro cálcico, hidróxido cálcico, fosfatos de calcio o sulfato cálcico.  
70
15. La composición adyuvante de las reivindicaciones 1 a 13, en la que kanamicina es sulfato de kanamicina y el ión de calcio es proporcionado por cloruro cálcico.  
75
16. Una composición inmunogénica que comprende la composición adyuvante polinucleotídica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un antígeno.  
80
17. La composición inmunogénica de la reivindicación 16, en la que la fuente del antígeno es un humano, un animal no humano, vegetal, bacteriano, fúngico, un parásito o un cáncer.  
85

18. La composición inmunogénica de la reivindicación 16, en la que el antígeno es un antígeno del virus de la rabia.
19. La composición inmunogénica de la reivindicación 18, en la que el antígeno es un antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster.
20. La composición inmunogénica de la reivindicación 19, en la que la presencia del antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster es superior a 1 unidad internacional.
- 10 21. La composición inmunogénica de la reivindicación 19, en la que la proporción entre la composición adyuvante polinucleotídica y el antígeno del virus de la rabia purificado inactivado obtenido en células de riñón de hámster es superior a 3 a 1.
22. Una composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21 en un tampón fisiológicamente aceptable.
- 15
23. La composición inmunogénica de una cualquiera de la reivindicaciones 16 a 22 en la que la composición inmunogénica es una vacuna.
- 20 24. La composición adyuvante o composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición inmunogénica o la composición adyuvante está en forma sólida o líquida, en solución o en suspensión.
25. La composición adyuvante o composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en la que la composición adyuvante y / o la composición inmunogénica están liofilizadas.
- 25
26. La composición adyuvante o composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en un procedimiento desencadenamiento o potenciación de una respuesta inmunitaria frente a un antígeno en un huésped.
- 30
27. La composición adyuvante o la composición inmunogénica para su uso según la reivindicación 26 en la que el procedimiento comprende administrar el adyuvante junto con un antígeno.
28. Una composición adyuvante, una composición inmunogénica o una vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1-25 para su uso en un procedimiento de desencadenamiento o potenciación de una respuesta inmunitaria en un humano.
- 35
29. Uso de un compuesto adyuvante polinucleotídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la preparación de un medicamento para potenciar la respuesta inmunogénica de un huésped.
- 40
30. El uso de la reivindicación 29 en el que el huésped es humano.
31. El uso de la reivindicación 29 en el que el huésped es un animal.
- 45 32. Un kit que comprende la composición adyuvante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un compuesto antigénico.

Figura 1

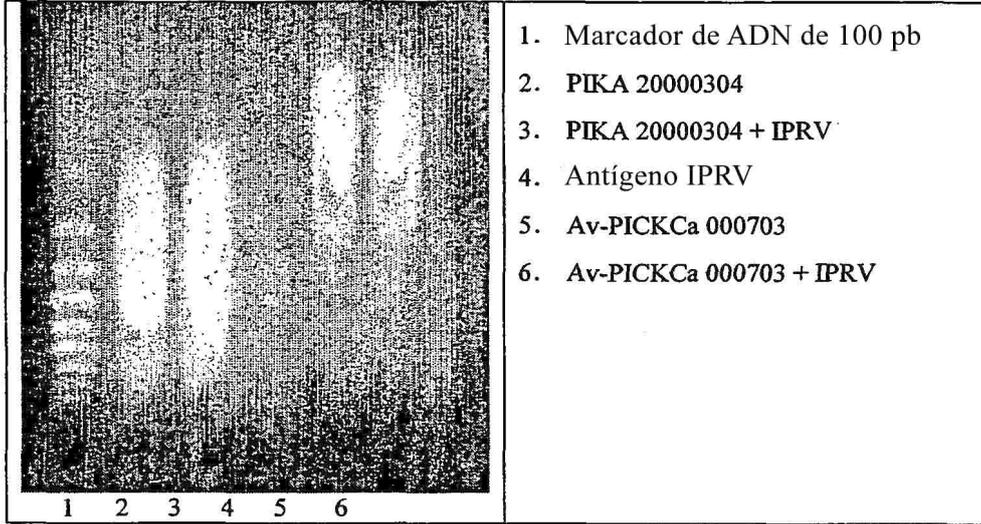


Figura 2

Producción de interferón gamma *in vitro*

