

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 172**

51 Int. Cl.:
A61K 39/40 (2006.01) **A61M 36/14** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/38 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/21 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
A61K 9/68 (2006.01)
A61K 51/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03709134 .5**
96 Fecha de presentación: **14.02.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1572074**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **Sistema de suministro de inmunógeno sintético estabilizado**

30 Prioridad:
14.02.2002 US 76674
31.01.2003 US 355161

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.06.2012

73 Titular/es:
UNITED BIOMEDICAL, INC.
25 DAVIDS DRIVE
HAUPPAUGE, NEW YORK 11788, US

72 Inventor/es:
SOKOLL, Kenneth, K.

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 383 172 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistema de suministro de inmunógeno sintético estabilizado.

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con un complejo inmunoestimulador estabilizado y un método para preparar el complejo inmunoestimulador estabilizado. Más específicamente, la presente invención proporciona complejos inmunoestimuladores sintéticos estabilizados que son útiles en sistemas de suministro de vacuna con respuestas inmunes mejoradas *in vivo*. Estos complejos inmunoestimuladores también son útiles para preparar formulaciones de vacuna diseñadas para funcionar como un depósito para la liberación controlada del complejo inmunoestimulador. El complejo inmunoestimulador también se puede incorporar en formulaciones diseñadas para 10 dirigir los tipos celulares específicos para mejorar sinérgicamente la calidad de las respuestas inmunes provocadas.

Antecedentes de la invención

Se han empleado exitosamente vacunas durante muchos años en composiciones profilácticas para la prevención de enfermedades infecciosas y más recientemente en composiciones terapéuticas para el tratamiento de cánceres y enfermedades no infecciosas.

15 Tradicionalmente las vacunas se han derivado de patógenos bacterianos o víricos muertos o atenuados y se han probado que son muy efectivas contra enfermedades tales como virus de polio y *Bordetella pertussis*. A pesar de este éxito, existen crecientes preocupaciones sobre la seguridad de tales vacunas. Esto ha conducido al desarrollo de vacunas subunitarias derivadas de componentes de estos patógenos o inmunógenos de péptido completamente sintéticos.

20 Ejemplos de vacunas subunitarias incluyen toxoide del Tétano y antígeno de superficie de hepatitis B. Estos antígenos son a menudo pobremente inmunogénicos y requieren adyuvantes para mejorar las respuestas inmunes obtenidas. También los compuestos biológicamente activos caracterizados tales como péptidos sintéticos son los sustratos preferidos para inducir respuestas biológicas, para propósitos reguladores y de seguridad. Sin embargo, estos inmunógenos no son óptimos, e inducen respuestas protectoras parciales o insignificantes en modelos de 25 animal. Los péptidos sintéticos requieren estabilización y adyuvantación para la inducción de una respuesta inmune efectiva *in vivo*.

Se han empleado diversos métodos para proteger los inmunógenos de péptido sintéticos contra la degradación *in vitro* e *in vivo*, mediada por diversos procesos que incluyen las rutas químicas y físicas.¹ (Los números en superíndice se refieren a publicaciones, que describen más completamente el estado de la técnica a la que pertenece esta invención. La descripción de estas referencias se incorpora aquí como referencia. La cita de cada referencia se encuentra al final de esta sección).

30

Se han empleado diversos métodos para mejorar la solubilidad del péptido o proteger un péptido contra la degradación *in vivo*.² Estos incluyen de manera general procedimientos simples como modificar la concentración de sal y/o el pH de la solución. También se han modificado químicamente los péptidos mediante conjugación con 35 compuestos solubles en agua como polietilenglicol (PEG) u óxido de polietileno (PEO) para mejorar su solubilidad acuosa y tiempo de circulación *in vivo*.³ Se ha documentado que los adyuvantes derivados de PEG o PEO pueden regular por disminución el sistema inmune.⁴ Así, no se esperaría que los péptidos modificados PEG o PEO funcionen efectivamente como adyuvantes. La adición de múltiples lisinas para agregar carga a un péptido puede mejorar su solubilidad acuosa pero no resultan de manera general en inmunogenicidad mejorada.

40 El objetivo de estas diversas estrategias es mejorar el tiempo de circulación *in vivo* o minimizar o eliminar los problemas de inmunogenicidad asociados con las condiciones físicas (por ejemplo sal, pH, temperatura, tipo de regulador) y/o incompatibilidades químicas cuando se emplean péptidos en una formulación de vacuna.

Los copolímeros de bloque de poliéter, que comprenden polímeros policatiónicos, se describen por Kabanov et al., Patente Estadounidense No. 5,656,611⁵ para estabilizar polinucleótidos u oligonucleótidos. Se emplean los 45 complejos de polinucleótido- copolímero de bloque de poliéter para facilitar el transporte del polinucleótido a través de una membrana celular para actividad biológica mejorada. Sin embargo, estos copolímeros de bloque poliéter- polinucleótido no son inmunogénicos y no son adecuados como vacunas.

Allcock et al., patente Estadounidense No. 5,562, 9096 describe un inmunoadyuvante derivado de polielectrolitos fosfazeno. El inmunoadyuvante se mezcla directamente con un antígeno en la solución y se puede preparar como 50 micropartículas al secar por rociado una solución del polímero y el antígeno o mediante un proceso descrito por Cohen en la patente Estadounidense No. 5,149, 543.⁷ Aunque, se muestra adyuvantividad aumentada para estos

sistemas, existen dificultadas en la preparación de composiciones microparticulares debido a los procesos mecánicos complicados empleados, que serían difíciles de aumentar a escala para producción comercial. Adicionalmente, la estabilidad del complejo de polímero-antígeno así formado es altamente dependiente de la concentración de sal y las condiciones de pH.

5 Un método diferente se describe en Moss et al. WO91/04052⁸, en donde se prepara una composición de vacuna sólida de un antígeno, que puede ser un péptido, una saponina y un adyuvante policatiónico tal como DEAE-dextrano. Las vacunas formuladas a partir de esta combinación proporcionan longevidad mejorada, haciendo tales combinaciones adecuadas para uso como implantes. Sin embargo, el antígeno primero se puede conjugar químicamente con una molécula portadora y se purifica exhaustivamente. El antígeno-portador purificado luego se
10 combina con una saponina y un adyuvante policatiónico para proporcionar una composición sólida. Este proceso no proporciona control sobre las propiedades físicas, tal como tamaño de partícula, del producto.

Se han desarrollado numerosos adyuvantes y/o sistemas de suministro transdérmico, de mucosa, o parenterales basados en depósito destinados para el uso con vacunas humanas o veterinarias para mejorar la respuesta inmune. Estas incluyen el uso de sales minerales, emulsiones agua en aceite (w/o), liposomas, micropartículas poliméricas, nanopartículas y geles/hidrogeles.⁹ Se han conducido un gran número de ensayos clínicos que emplean diversas composiciones de emulsión (w/o).
15

A pesar de este inmenso conjunto de investigación clínica, las formulaciones parenterales típicas, administradas subcutáneamente o intramuscularmente, se preparan con adyuvantes derivados de sales de aluminio, tales como fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio. Las sales de alumbre son adecuadas y efectivas para muchas vacunas con base en patógenos atenuados, patógenos muertos y antígenos subunitarios derivados de agentes biológicos. Sin embargo, los adyuvantes con base en aluminio son a menudo totalmente inefectivos para inmunógenos con base en péptido sintético debido a la gran dosis de péptido requerido y a la necesidad de adyuvantación mucho más fuerte. La combinación de una gran dosis de inmunógeno con un alumbre que funciona débilmente como adyuvante en una composición de vacuna no es ideal cuando puede conducir a tolerancia al inmunógeno y reactogenicidad, es decir, reacciones colaterales indeseadas, tales como inflamación y enrojecimiento en el sitio de la inyección.
20
25

El adyuvante completo de Freund (FCA), una suspensión de micobacterias de *M. tuberculosis* muertas con calor en aceite mineral que contiene un tensoactivo, se ha reconocido como uno de los adyuvantes más poderosos. Sin embargo, se han documentado las reacciones adversas severas, varían de irritación menor a las lesiones y abscesos estériles en el sitio de inyección. Debido a estas reacciones adversas, se ha excluido el FCA de las aplicaciones humanas y veterinarias.
30

Así, subsiste una clara necesidad de desarrollar adyuvantes que son seguros sin problemas toxicológicos y/o reactogénicos asociados con alumbre o FCA y pueden mejorar efectivamente la inmunogenicidad y prolongar la efectividad de los inmunógenos de péptido para evitar el problema de tolerancia asociado con alumbre. También es más deseable desarrollar composiciones y métodos, que pueden, estabilizar un inmunógeno de péptido y las respuestas inmunes de adyuvante en una composición única.
35

Jones *et al.*¹⁰ ha descubierto dos oligonucleótidos CpG específicos que se pueden co-administrar con una vacuna de malaria con base en péptido en monos Aotus para mejorar las respuestas inmunes. En el estudio de Jones, el punto de ionización (IP) del péptido utilizado es 5.96. Esto corresponde al pH al que el péptido tendrá una carga teórica cero.¹¹ Por virtud de su composición de aminoácido, el péptido utilizado no se cargaría efectivamente en pH fisiológico en el solvente acuoso seleccionado. Así, no puede tener lugar la complejación con los dos oligómeros CpG. La mezcla resultante cuando se formula en una emulsión w/o se espera que sea adyuvada de forma transitoria. Para lograr un nivel útil de inmunogenicidad, se requerirán múltiples inyecciones y una gran cantidad de adyuvante. Adicionalmente, la estabilidad a largo plazo de tal composición es cuestionable. De hecho, Jones et al. describe que es necesario emplear una gran dosis del oligonucleótido CpG, 500 µg por inyección. Adicionalmente,
40
45 los métodos, empleados para preparar las emulsiones w/o, no se pueden fácilmente aumentar a escala para las aplicaciones comerciales. Cabe notar que Jones et al. enseña que diferentes oligómeros CpG son útiles para diferentes especies de mamífero. Por ejemplo, un oligómero CpG, CpG ODN 1826 es mitogénico para los ratones y un primate inferior, pero no para los chimpancés o humanos y no es predecible el efecto.

Krieg et al., patente Estadounidense No. 6,194,388 B1¹² describe el oligonucleótido CpG no metilado particularmente útil para aplicaciones terapéuticas con base en su capacidad para estimular las respuestas inmunes cuando se mezcla con un antígeno. Krieg et al., US 6,207,646 B1¹³ describe adicionalmente el uso del oligonucleótido CpG no metilado para redirigir la respuesta Th2 a una respuesta The. En ambas, la efectividad del oligómero CpG se muestra por la estimulación de célula B en donde las células B se cultivan con oligómeros CpG modificados con fosforotioato. No existe descripción o sugerencia sobre cómo se pueden utilizar los oligómeros CpG para proporcionar un complejo inmunoestimulador estabilizado o una vacuna.
50
55

Otra área de interés e investigación intensa se ha enfocado en métodos para formular los inmunógenos sintéticos para alternar las rutas de suministro, tales como de mucosa, transdérmicamente, u oralmente. La inmunidad de

5 mucosa está mediada por la inducción de inmunoglobulina secretora (slgA) encontrada en secreciones externas (por ejemplo, lavados intestinales, bronquiales o nasales). Se considera que el suministro transdérmico o de mucosa de las vacunas sería efectivo contra una mayor parte de organismos patogénicos, que gana entrada por medio de las superficies de mucosa. Por ejemplo, una vacuna para el cólera administrada oralmente ha mostrado ser muy superior a la del análogo administrado parenteralmente.¹⁴

10 Friede et al., WO99/5254915 enseña que las composiciones de vacuna destinadas para uso mucosal se pueden derivar de una combinación de un antígeno con un polioxietileno éter o polioxietileno éster como el adyuvante principal. Se sugiere que el antígeno objetivo puede ser un péptido sintético. Friede et al. también sugiere la adición de los oligonucleótidos CpG dentro de la composición de vacuna para proporcionar respuestas mejoradas. Estas muestran que una combinación de polioxietileno éter o polioxietileno éster con un oligonucleótido CpG puede mejorar las respuestas de mucosas cuando se co-administran con un antígeno. Sin embargo, los resultados muestran una carencia de cualquier adyuvancia de mezclas simples de los oligonucleótidos CpG con el antígeno descrito.

15 Las vacunas transdérmicamente administradas representan un área de interés reciente. Idealmente, los dispositivos, es decir, parches o inyectores a chorro libre de aguja se pueden emplear para dirigir las células Langerhan intradérmicas, es decir, células dendríticas. Estas células especializadas son sensibles al procesamiento efectivo y presentación de un inmunógeno y se pueden utilizar para inducir directamente las respuestas sistémicas humorales y las respuestas celulares. En algunos casos, se logra inmunización intramuscular mediante métodos transdérmicos.¹⁶ Por ejemplo, un trabajo reciente describe una vacuna de difteria administrada como un parche. Se encuentran anticuerpos sistémicos para el toxoide de difteria para una variedad de composiciones cuando se co-administra con adyuvantes.¹⁷

Aunque la técnica anterior ha ilustrado el potencial de diversas formulaciones de vacuna, existe un número de limitaciones prácticas para el desarrollo de las formulaciones de vacuna con base en péptido sintético para el suministro mucoso o transdérmico. Estas incluyen:

- 25 1) degradación de inmunógeno mediante fluidos o secreciones de mucosa y/o enzimas proteolíticas en la superficie mucosa o dentro de la intradermis;
- 2) la adsorción omsignificante a través del epitelio mucoso o a través de las capas intradérmicas; y
- 3) dilución del inmunógeno en una concentración por debajo de aquella requerida para inducir un nivel adecuado de respuestas inmunes.

30 Existen pocas estrategias que estabilizan y adjuvantan un inmunógeno con base en el péptido sintético en una composición única de vacuna. Tal composición sería esencial para el desarrollo de vacunas con base en péptido parenterales, de mucosa o transdérmicas altamente eficaces.

35 También es deseable prolongar la duración de respuestas inmunogénicas con el fin de reducir el número de administraciones requeridas. Esto resultaría en cumplimiento mejorado y reduciría el coste general para la vacunación.

40 Se pueden emplear diversos métodos para adyugar los inmunógenos con base péptido sintético, pero normalmente se requiere un portador o sistema de depósito para respuestas inmunogénicas efectivas a largo plazo. Ejemplos notables incluyen adsorber el inmunógeno en una sal mineral o gel. Por ejemplo, la encapsulación de un inmunógeno de péptido dentro de una matriz polimérica (matriz monolítica) o gel, o la formación en capas de un material polimérico alrededor de un inmunógeno de péptido (cubierta de núcleo) puede ser una estrategia efectiva. O, se puede incorporar un inmunógeno en una formulación tipo liposoma o vesicular, con el inmunógeno ya sea embebido en la matriz de lípido o atrapado físicamente en la fase acuosa interna. Otra estrategia puede emplear un aceite con base en mineral, con base en vegetal o con base en animal, con una solución acuosa del inmunógeno en diversas proporciones, para preparar una emulsión agua en aceite (w/o) o una emulsión doble agua en agua (w/o/w)¹⁸.

45 Diversos tamaños de partícula, morfologías, hidrofobicidad de superficie y carga de superficie residual son posibles variables dependientes de formulación para consideración. Se sabe que el control de estos parámetros es importante para la fagocitosis de particulados en tamaño de micras por medio de la administración parenteral^{19, 20} y para la retoma de particulados en células M especializadas de los Parches Peyers dentro del tracto intestinal^{21, 22} para el suministro oral. De forma similar, se muestra que estos parámetros son importantes para el acceso al tejido linfoide asociado nasal del tracto nasofaríngeo, un objetivo de suministro intranasal.^{23, 24}

Krone et al., U.S. Patente No. 5,70D,45925 describe el uso de complejos de polielectrolito en forma microparticulada derivada de poliácidos y polibases, en los que el agente complejante es un polímero. Se describen diversos usos

para estos complejos e incluyen composiciones de vacuna que comprenden antígenos o péptidos antigénicos. Algunas de las composiciones son formulaciones de liberación controlada que emplean materiales potencialmente biodegradables. En uno de los ejemplos, se describe un método para incorporar un antígeno en micropartículas de complejo de polielectrolito. Sin embargo, el proceso mecánico descrito para preparar micropartículas al moler la mezcla de partículas a tamaño 100 μM a aproximadamente 1-4 μM , es complicado. Este no se aumentaría a escala fácilmente para producción comercial.

Eldridge *et al.*²⁶ desarrolla microesferas biodegradables poliméricas fabricadas de copolímero poli-D,L-lacturo-coglicolidas para la liberación controlada de un antígeno *in vivo*. Los polímeros descritos por ser útiles para encapsular un antígeno en micropartículas incluyen poli-D,L-lacturo, poliglicolida, policaprolactona, polianhídridos, poliortoésteres y poli(ácido α -hidroxibutírico).

Aunque la liberación controlada de un antígeno se logra en la técnica anterior, se encuentran dificultades cuando las micropartículas se fabrican mediante los métodos descritos. Los métodos descritos son difíciles de aumentar a escala. Más aún, la exposición de los materiales biológicos a solventes orgánicos y el procesamiento mecánico puede conducir a desnaturalización y disminuir las eficiencias de encapsulación modestas. Adicionalmente, los antígenos hidrófilos se encapsulan de forma ineficiente en los procesos descritos.

Henry, et al., Patente Estadounidense Nos. 5,12-6,141 y 5,135,75127,²⁸ describe composiciones de gel térmicamente reversibles acuosas formadas de un polímero poloxialquileno y un polisacárido iónico para la aplicaciones a áreas lesionadas del cuerpo para evitar adhesión. Rosenberg, et al., WO93/0128629 describe el uso del mismo tipo de polímeros poloxialquileno para el suministro local de oligonucleótidos antisentido a la superficie quirúrgicamente expuesta de los vasos sanguíneos para el tratamiento de reestenosis. Ni Henry et al. ni Rosenberg et al. enseñan o sugieren el uso de una composición de gel como una vacuna.

Dunn et al., U.S. Patentes Nos. 4,938,763 y 5,702,71630,³¹ describe composiciones poliméricas para la liberación controlada de materiales biológicamente activos. Se utiliza un solvente biocompatible para preparar soluciones o suspensiones de antígeno para inyección parenteral directa, después de lo cual la gelificación *in-situ* resulta en formación de implante. Se reivindica la utilidad para una variedad de antígenos que incluyen inmunógenos con base en péptido sintético pequeño. Sin embargo, Dunn et al., US 5,702,71631, indica que las composiciones de liberación controlada requieren hasta 15 % en peso de un agente que retarda el índice de gel. Se agregan agentes de retardo para modular el índice de gelificación y se necesitan para mayores eficiencias de atrapamiento para antígenos, que se extraen fácilmente *in vivo*. Como la extracción de solvente se rige principalmente mediante difusión, esta presenta más de un problema para los inmunógenos sintéticos pequeños que para la subunidad mayor o antígenos con base en proteína.

Ni la US 4,938,763³⁰ ni la US 5,702,716³¹ enseñan o sugieren el inmunógeno con base en el péptido sintético sugerido estabilizado como un complejo inmunoestimulador suspendido dentro de un solvente biocompatible. Adicionalmente, ni la US 4,938,76330 ni la US5,702,71631 enseñan ni sugieren composiciones que sean auto-adyuvantes y puedan aumentar las respuestas inmunes en las fases de sensibilización y refuerzo.

A partir de la WO01/22972 se conocen las composiciones de ácido nucleico inmunoestimulador, que se relacionan en parte con ácidos inmunoestimuladores ricos en pirimidina (ricos en Py) y en algunas realizaciones ricos en timidina (Th) y que no requieren la presencia de un motivo CpG. La invención se basa en parte en el hallazgo inesperado de las secuencias de ácido nucleico que no contienen los motivos CpG son inmunoestimuladores.

La WO 01/93903 describe las composiciones antigénicas que comprenden un péptido policatiónico e inosina y citosina. En particular la composición comprende un epítipo de célula T o una mezcla de epítopos de célula T, un péptido policatiónico y un ácido nucleico con base en inosina o citosina y su uso como vacuna.

La WO 94/25060 se relaciona con las construcciones de péptido LHRH que comprenden un epítipo de célula T auxiliar y LHRH.

En la US 6,090,388 también se conocen péptidos que comprenden una secuencia homóloga a una porción de CDR-2 como el dominio de CD4, ligado covalentemente a un epítipo de linfocito T cooperador u otras secuencias inmunoestimuladoras.

Es un objeto de esta invención desarrollar complejos inmunoestabilizadores estables de inmunógenos de péptido sintéticos y moléculas estabilizantes, que poseen propiedades auto adyuvantes 753287 v1 *in vivo*. Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un método simple para estabilizar un péptido sintético inmunógeno *in vitro* e *in vivo*.

Todavía es un objeto adicional de la presente invención proporcionar vehículos de liberación controlada o sostenida compatibles con estos complejos inmunoestimuladores con base en péptido sintético estabilizado.

Aún es un objeto adicional de la invención desarrollar formulaciones utilizando una combinación de complejos inmunoestimuladores con base en el péptido sintético estabilizado e inmunógenos no complejados en un sistema de suministro de liberación controlada para lograr una mejora sinérgica de la respuesta inmune que incluye respuestas protectoras.

5 Resumen de la invención

La presente invención se dirige a un complejo inmunoestimulador estabilizado que comprende un péptido catiónico y molécula aniónica o oligonucleótido o polinucleótido y un método para estabilizar un péptido catiónico mediante complejación con una molécula aniónica o oligonucleótido o polinucleótido por medio de asociación electrostática. El complejo inmunoestimulador estabilizado se puede incorporar en una composición farmacéutica como un sistema de suministro de inmunógeno.

Un "péptido catiónico" como se describe aquí se refiere a un péptido, que se carga positivamente a un pH en el rango de 5.0 a 8.0. La carga neta sobre los cócteles de péptido o el péptido se calcula al asignar una carga +1 para cada lisina (K), arginina (R) o histidina (H), una carga -1 para cada ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E) y una carga de 0 para el otro aminoácido dentro de la secuencia. Las contribuciones de carga de los grupos de extremo de amina de terminal N (+1) y carboxilato de terminal C (-1) de cada péptido se cancela efectivamente entre sí cuando no se sustituye. Las cargas se suman para cada péptido y se expresan como la carga promedio neta. Un inmunógeno de péptido adecuado tiene una carga positiva promedio neta de +1. Preferiblemente, el inmunógeno de péptido tiene una carga positiva neta en el rango que es mayor de +2.

El inmunógeno de péptidos comprende los epítomos de célula B y los epítomos Th. Los epítomos Th pueden ser intrínsecos para el péptido o se agregan a estos como se describe en la técnica anterior. Los inmunógenos de péptido adecuados se describen aquí adelante.

Una "molécula aniónica" como se describe aquí se refiere a moléculas, que se cargan negativamente a un pH en el rango de 5.0-8.0. La carga negativa neta en el oligómero o polímero se calcula al asignar una carga -1 para cada grupo fosfodiéster o fosforotioato en el oligómero. Un oligonucleótido aniónico adecuado es una molécula de ADN de hebra sencilla con 8 a 64 bases de nucleótido, con el número de repeticiones del motivo CpG en el rango de 1 a 10. Preferiblemente, las moléculas de ADN de hebra sencilla inmunoestimulador CpG contienen 18-48 bases de nucleótido, con el número de repeticiones del motivo CpG en el rango de 3 a 8.

Más preferiblemente el oligonucleótido aniónico se representa por la fórmula: 5' X¹CGX² 3' en donde C y G no son metilados; y X¹ se selecciona del grupo que consiste de A (adenina), G (guanina) y T (timina); y X² es C (citocina) o T (timina). O, el oligonucleótido aniónico se representa por la fórmula: 5' (X³)₂CG(X⁴)₂ 3' en donde C y G no son metilados; y X³ se selecciona de los grupos que consisten de A, T o G; y X⁴ es C o T.

Más preferiblemente, el oligonucleótido CpG se selecciona de un grupo que consiste de 5' TCG TCG TTT CGT CGT TTT GTC GTT TTG TCG TT 3' (CpG1) SEQ ID NO: 1, un oligómero de longitud base 32, y 5'nTC GTC GTT TTG TCG TTT TGT TGT T 3' (CpG2) SEQ ID NO: 2, un oligómero de longitud base 24 más un grupo fosforotioato (designado como n en el extremo 5').

El complejo inmunoestimulador resultante está en la forma de partículas con un tamaño típicamente en el rango de 1-50 micras y es una función de muchos factores que incluyen la estequiometría de carga relativa y el peso molecular de las especies que interactúan.³² El complejo inmunoestimulador particulado tiene la ventaja agregada de proporcionar adyuvancia y regulación por incremento de respuestas inmunes específicas *in vivo*. Adicionalmente, el complejo inmunoestimulador estabilizado es adecuado para preparar formulaciones de vacuna mediante diversos procesos que incluyen emulsión agua en aceites, suspensiones de sal mineral y geles poliméricos.

El término "estabilizar" como se utiliza aquí se puede llevar a cabo mediante el uso de cualquier material, que protege el inmunógeno de péptido sintético contra la degradación *in vitro* o *in vivo*. Esto se puede llevar a cabo por virtud de la modificación química y/o asociación física. Un estabilizante puede aumentar las propiedades fisiológicas de un inmunógeno de péptido sintético, un glicopéptido modificado con oligosacárido o un péptido lipidado para proporcionar una formulación más eficaz.

El término "adyuvante" como se describe aquí se refiere a cualquier material, que puede mejorar o aumentar las respuestas inmunes provocadas por un inmunógeno en humanos o animales. El adyuvante en sí mismo puede o no inducir una respuesta inmunogénica.

El estabilizante también puede funcionar preferiblemente en una vacuna como un adyuvante, regulando por aumento efectivamente las respuestas inmunes. El estabilizante puede actuar como un adyuvante al facilitar activamente la presentación del inmunógeno a las células de procesamiento profesional del sistema inmune, tales

como macrófagos y células dendríticas. En la presente invención, cuando se administra el complejo inmunoestimulador estabilizado permanece idealmente como una unidad integral en la solución.

5 El complejo inmunoestimulador estabilizado también se puede formular para liberación controlada y permanece como un complejo en una forma concentrada en un "depósito" cerca al sitio de administración. Estas formulaciones combinan sinérgicamente los beneficios de un inmunógeno adyuvado estabilizado acoplado con una liberación local sostenida de inmunógeno para las células efectoras inmunes. En algunas composiciones la función del adyuvante en sí mismo también puede implicar atraer las células del sistema inmune a la vecindad del depósito de inmunógeno y estimular tales células para provocar una respuesta inmune.

10 En un segundo aspecto de esta invención, se proporciona un método para preparar una composición de vacuna que contiene un complejo inmunoestimulador. En una realización preferida el complejo inmunoestimulador tiene la ventaja agregada de ser un inmunógeno con base en péptido sintético estabilizado *in vitro* y al mismo tiempo es auto-adyuvante con regulación por incremento de las respuestas inmunes específicas *in vivo*.

15 En un tercer aspecto de esta invención, se proporciona un método para preparar una composición de vacuna del complejo inmunoestimulador. El complejo inmunoestimulador o una mezcla del complejo inmunoestimulador con el inmunógeno no complejado se puede formular como una suspensión en la solución, una emulsión agua en aceite, una suspensión en combinación con una suspensión de sal mineral o una suspensión reconstituida en una solución biocompatible. El complejo inmunoestimulador solo o en una mezcla con el inmunógeno no complejado también se puede co-formular en un solvente biocompatible en un gel polimérico.

20 Esta invención está dirigida adicionalmente a la producción de sistemas de suministro de inmunógeno útiles para la administración mediante diversas rutas, que incluyen las rutas parenteral, oral, intranasal, rectal, bucal, vaginal y transdérmica.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se entiende adicionalmente con referencia a los dibujos.

25 La Figura 1 es un esquema que muestra el proceso de complejación de los inmunógenos de péptido catiónico y los oligonucleótidos CpG.

La Figura 2 muestra la distribución de tamaño típico para el complejo inmunoestimulador estabilizado preparado de los inmunógenos del péptido LHRH y los oligonucleótidos CpG1 en diversas proporciones como se determina por medición de difracción láser.

30 La Figura 3 es un esquema del proceso para preparar una emulsión agua en aceite (w/o) que emplea técnicas de homogenización o extrusión.

La Figura 4 muestra una fotomicrografía típica para una emulsión w/o preparada por medio de la homogenización de ISA Montanide® 51 y los complejos inmunoestimuladores LHRH:CpG1, en donde LHRH:CpG1 es 4:1 en una concentración de péptido total final fija de 100 µg/mL.

35 La Figura 5 muestra una fotomicrografía típica para una emulsión w/o preparada por medio de la extrusión de ISA Montanide® 720 y los complejos inmunoestimuladores LHRH:CpG1, en donde LHRH:CpG1 es 4:1, en una concentración de péptido LHRH final fija de 200 µg/mL.

La Figura 6 es un esquema que detalla el proceso de gel de polímero in situ que emplea reconstitución.

La Figura 7 muestra las respuestas IgG en suero en conejillos de indias inmunizados intramuscularmente (I.M.) de acuerdo con los protocolos de inmunización descritos en el Ejemplo 7.

40 La Figura 8 muestra las respuestas IgG en suero en conejillos de indias inmunizados intramuscularmente (I.M.) de acuerdo con los protocolos de inmunización descritos en el Ejemplo 7. No se obtienen sueros de los animales inmunizados con el complejo inmunoestimulador derivado de los péptidos CD4 y CpG2 en la semana 17. Esto se indica por un asterisco en la Figura 8.

45 La Figura 9 muestra las respuestas IgG en suero en conejillos de indias inmunizados intramuscularmente (I.M.) de acuerdo con los protocolos de inmunización descritos en el Ejemplo 7.

La Figura 10 muestra las respuestas IgG en suero en conejillos de indias inmunizados intramuscularmente (I.M.) de acuerdo con los protocolos de inmunización descritos en el Ejemplo 7. No se obtienen sueros de los animales

inmunizados con el complejo inmunoestimulador derivado de los péptidos CD4 y CpG2 en la semana 17. Esto se indica por un asterisco en la Figura 10.

La Figura 11 muestra las respuestas IgG en suero en conejillos de indias inmunizados intramuscularmente (I.M.) de acuerdo con los protocolos de inmunización descritos en el Ejemplo 8.

- 5 La Figura 12 muestra las respuestas IgG en suero en conejillos de indias inmunizados intramuscularmente (I.M.) de acuerdo con los protocolos de inmunización descritos en el Ejemplo 8.

La Figura 13a muestra las respuestas IgG en suero y 13b muestra la testosterona en suero total en ratas macho inmunizadas intramuscularmente (I.M.) de acuerdo con los protocolos de inmunización como se describe en el Ejemplo 10.

- 10 La Figura 14a muestra las respuestas IgG en suero y 14b y 14c muestra la testosterona en suero total en babuinos macho inmunizados intramuscularmente (I.M.) de acuerdo con los protocolos de inmunización como se describe en el Ejemplo 11.

- 15 La Figura 15a muestra la respuesta de IgG en suero, 15b muestra la testosterona en suero total y 15c muestra la ganancia de peso promedio por grupo en jabalís inmunizados intramuscularmente (I.M.) durante el periodo del ensayo de acuerdo con los protocolos de inmunización como se describe en el Ejemplo 13.

La Figura 16 es un esquema que detalla el proceso para preparar una suspensión mezclada del complejo inmunoestimulador y una sal mineral.

Descripción detallada de la invención

- 20 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, un inmunógeno de péptido catiónico se compleja con un ADN de hebra sencilla aniónico para formar un complejo inmunoestimulador estable.

- 25 El inmunógeno de péptido catiónico es un péptido con una carga positiva neta a un pH en un rango de 5.0 a 8.0. La carga neta sobre los cócteles de péptido o el péptido se calcula al asignar una carga +1 para cada lisina (K), arginina (R) o histidina (H), una carga -1 para cada ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E) y una carga de 0 para los otros aminoácidos en la secuencia. Las contribuciones de carga de los grupos de extremo amina de terminal N (+1) y carboxilato de terminal C (-1) de cada péptido se cancela efectivamente entre sí cuando no se sustituye. Las cargas se suman para cada péptido y se expresan como la carga promedio neta. Preferiblemente, la carga promedio neta del inmunógeno de péptido es por lo menos +2.

- 30 El inmunógeno de péptido catiónico puede tener intrínsecamente una carga positiva neta como se calculó anteriormente con base en su secuencia de aminoácidos. Esto se puede hacer por tener una carga positiva por la adición de una lisina, una arginina o una histidina o una mezcla de estos aminoácidos al terminal N o terminal C del inmunógeno de péptido. También se pueden agregar otras unidades estructurales sintéticas, tales como polietilenoimina o poliaminas, que proporciona una carga positiva al inmunógeno de péptidos en solución acuosa.

- 35 El inmunógeno de péptido catiónico comprende un epítipo Th y un epítipo de célula B objetivo. El epítipo Th puede ser intrínseco para el péptido o se puede agregar sintéticamente a un péptido, que funciona como un epítipo de célula B objetivo. Los inmunógenos de péptido adecuados incluyen péptidos que provocan las respuestas inmunes protectoras o terapéuticas y se derivan de patógenos o proteínas conocidas por provocar enfermedades. Estas incluyen: los péptidos IgE de humano o animal para la inmunoterapia de alergias, por ejemplo, los inmunógenos de péptido IgE descritos en la WO 99/67293⁵¹; péptidos de VIH para inmunidad protectora e inmunoterapia para infección por VIH descrita en la US 5,763,160⁵²; los péptidos CD4 para inmunidad protectora de VIH e inmunoterapia de infección por VIH y trastornos inmunes descritos en la US 6,090,388⁵³; los péptidos de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) para inmunoterapia de tumores dependientes de andrógeno y estrógeno, anticoncepción e inmunocastración, y eliminación del olor sexual descrita en la US5,749,551⁵⁴ y US6,025, 468; péptidos β -amiloides para la prevención e inmunoterapia de Enfermedad de Alzheimer descrita en USSN 09/865,29456; péptidos del virus de la enfermedad de la fiebre aftosa para inmunidad protectora contra la enfermedad de la fiebre aftosa descrita en la US 6,107,02157; péptidos de pilosidades bacterianas para inmunidad protectora de infección del tracto urinario descrita en la USSN 09/74780258; péptidos *Plasmodium* para inmunidad protectora de malaria descrita en la WO 99/6695759; y péptidos somatostatina para la promoción del crecimiento en el ganado descrito en la WO99/66950.60 Los inmunógenos de péptido específicos denominados aquí son ejemplos solo para propósitos de ilustración

- 50 El "ADN de hebra sencilla aniónica" es un polinucleótido o oligonucleótido que se carga negativamente a un pH en el rango de 5.0-8.0. La carga negativa neta sobre el polinucleótido u oligonucleótido se calcula al asignar una carga -1 para cada grupo fosfodiéster o fosforotioato en el oligómero. Un oligonucleótido aniónico adecuado es una molécula

de ADN de hebra sencilla con 8 a 64 bases de nucleótido, con un motivo repetido CpG y el número de repeticiones del motivo CpG está en el rango de 1 a 10. Preferiblemente, las moléculas de ADN de hebra sencilla inmunoestimuladoras CpG contienen 18-48 bases de nucleótido, con el número de repeticiones del motivo CpG en el rango de 3 a 8.

5 Preferiblemente, el oligonucleótido aniónico se representa por la fórmula: 5' X¹CGX² 3' en donde C y G no son metilados; y X¹ se selecciona del grupo que consiste de A (adenina), G (guanina) y T (timina); y X² es C (citosina) o T (timina). El oligonucleótido CpG se puede modificar en el extremo 5' con un glicopolímero fosforotiorati o tiolacetamido.³⁴

10 Más preferiblemente, el oligonucleótido CpG se selecciona de un grupo que consiste de 5' TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT TTG TCG TT 3' (CpG1) SEQ ID NO: 1, un oligómero de longitud base 32, y 5' nTC GTC GTT TTG TCG TTT TGT CGT T 3' (CpG2) SEQ ID NO: 2, un oligómero de longitud base 24 más un grupo de puente fosforotioato (designado como n en el extremo 5').

15 Más aún, se sabe que las secuencias de ADN derivadas de dinucleótidos citosina-guanina (CpG) no metilados activan los linfocitos y pueden mejorar las respuestas inmunes de un sujeto, que incluye las respuestas IL-6, TNF- α IL-12, IFN- γ ³³. Estas moléculas representan sustratos complementarios preferidos 753287 v1 que pueden estabilizar los inmunógenos sintéticos de péptido catiónico y proporcionan un sistema de suministro de inmunógeno novedoso, con base en estos hallazgos. Los complejos inmunoestabilizadores estabilizantes de la presente invención también proporcionan auto-adyuvantación de las respuestas inmunes in vivo sin dilución significativa en el sitio de la inyección.

20 La formación de complejos inmunoestimuladores discretos derivados de inmunogénesis de péptido catiónico principalmente una función de neutralización de carga. Se espera que se puedan formar complejos estables de moléculas de ADN inmunoestimuladoras que contienen CpG derivadas de las secuencias de nucleótido naturales o sintéticamente modificadas. Adicionalmente, las mejoras en la estabilidad de un complejo inmunoestimulador se pueden realizar al aumentar la carga catiónica que reside en el inmunógeno de péptido. Estas incluyen extender los péptidos con lisina, arginina o histidina adicional u otras unidades estructurales sintéticas, que proporcionan una
25 carga positiva para el péptido modificado en una solución acuosa como se describió anteriormente.

Se espera que identifiquen secuencias inmunoestimuladoras que no contienen CpG (ISS) y se contempla que estos sustratos de ADN de hebra sencilla probarían que son materiales útiles para formar complejos inmunoestimuladores de cuando se combina con los inmunógenos sintéticos de péptido catiónico en solventes acuosos apropiados.

30 También se contemplan motivos CpG modificados, cuando un ADN de hebra sencilla aniónico definido se ha conjugado químicamente con otra moléculas biológicamente funcional, tales como lecitinas, azúcares o lípidos para mejorar la retoma específica de célula y se dirige, o polímeros, copolímeros y copolímeros de injerto tales como PEG para circulación mejorada *in vivo*. El ADN químicamente conjugado puede ser polianiónico y se puede someter a complejación posteriormente con un inmunógeno de péptido catiónico para proporcionar un complejo
35 inmunoestimulador modificado con propiedades físicas o biológicas potencialmente novedosas.^{34,35}

Se contempla que los co-polímeros de bloque o injerto derivados de oligómeros polianiónicos y polietilenglicol representan otra clase de moléculas aniónicas, que también puede proporcionar estabilidad mejorada y adyuvantividad mejorada.

40 En otro aspecto de esta invención un complejo inmunoestimulador se puede preparar a partir de un oligonucleótido CpG modificado, en donde un fosforotioato adicional u otro grupo puente se ha agregado en el extremo 5' del oligómero para complejación mejorada.

Preferiblemente, los complejos inmunoestimuladores tienen una distribución de tamaño de partícula agregado promedio en el rango de aproximadamente 1 a 50 μ M. Más preferiblemente, los complejos inmunoestimuladores tienen una distribución de tamaño de partícula de agregado promedio en el rango de aproximadamente 1 a 30 μ M.
45 Más preferiblemente, los complejos inmunoestimuladores tienen una distribución de tamaño de partícula de agregado promedio en el rango de aproximadamente 1 a 15 μ M.

50 Existe evidencia que requiere el número de las repeticiones del motivo CpG influencia el grado de adyuvantividad intrínseca y estimulación inmune, con un número mínimo de repeticiones CpG. Más aún, existe evidencia fuerte que la selección para flanquear las bases de nucleótido adyacentes al CpG es muy importante, cuando esto parece impactar directamente adyuvantividad en una forma específica de especie.^{10,36} Por ejemplo, se demuestra por Kreig *et al.* 13 que la actividad inmunoestimuladora mejorada de las células humanas ocurre cuando los oligonucleótidos que contienen los motivos CpG se representan por la fórmula X¹X²-CGX³X⁴ en donde C y G no se metilan, y X¹X² se seleccionan de los grupos GpT, GpG, GpA y ApA y/o X³X⁴ se seleccionan de los grupos TpT, CpT y GpT.

Aunque el oligonucleótido CpG puede funcionar como mitógenos de célula B³⁷ y son adyuvantes útiles, se ha mostrado que las respuestas inmunes de manera general 2 semanas pico después de administración para un antígeno mezclado con el oligonucleótido CpG en una forma soluble. Esto necesita múltiples inyecciones repetidas para mantener altos títulos de anticuerpo para asegurar la protección.³⁸ Así, se desea fuertemente un método para suministrar efectivamente las construcciones con estos oligonucleótidos en una formulación de liberación controlada.

Con respecto a la estabilidad, los enlaces fosfodiéster en la estructura principal CpG son sensibles para degradación mediante nucleasas *in vivo*³⁹. Así para mejorar la duración de la respuesta inmune, los grupos fosfato se pueden modificar a grupos fosforotioato.

El complejo inmunoestimulador de la presente invención se puede formular para el suministro mediante numerosas rutas que incluyen parenteral, de mucosa y transdérmica. El complejo inmunoestimulador de la presente invención es particularmente deseable para formulaciones de vacuna en las que los oligonucleótidos CpG en el complejo son adyuvantes útiles para aumentar las respuestas parenterales y de mucosa *in vivo*.^{40,41}

Los resultados de nuestros experimentos muestran que el tamaño de partícula agregado del complejo inmunoestimulador varía con base en la relación del inmunógeno de péptido al oligonucleótido CpG. La estabilidad intrínseca del complejo inmunoestimulador y la capacidad de controlar el tamaño de la composición aumenta el potencial para fagocitosis mediante una ruta parenteral.¹⁹ La inmunización de mucosa mediante células específicas objetivo, tales como células M ubicadas en los Parches de Peyer por medio de la ruta oral 21 o el tejido linfoide asociado nasal (NALT) por medio de la ruta intranasal²³ se facilita de manera similar por el uso del inmunógeno estabilizado de la presente invención.

El complejo inmunoestimulador de la presente invención se prepara mediante procesos de autoensamble controlados en donde el oligonucleótido CpG aniónico en la solución acuosa se agrega a una solución acuosa del inmunógeno de péptido catiónico. Las soluciones acuosas adecuadas para la preparación de un complejo inmunoestimulador se seleccionan del grupo que consiste de agua desionizada destilada (DDW), solución salina normal (NS) o solución salina regulada con fosfato (PBS). El agua desionizada destilada y la solución salina normal exhiben típicamente un pH de aproximadamente 5.5, mientras que en PBS, el pH se controla en un rango de 7.2-7.4. El proceso de complejación es una función de las relaciones de carga, el peso molecular de los electrolitos que interactúan, pH y la resistencia iónica del medio.³²

Múltiples moléculas aniónicas cargadas, tales como los oligómeros CpG cortos poseen una carga negativa neta cuando el pH está en el rango de 5.5-7.4 en las soluciones acuosas. La carga neta en el inmunógeno de péptido es dependiente de la composición de aminoácido del péptido y se puede afectar por el pH de la solución acuosa. Así, el medio acuoso se selecciona para asegurar una carga positiva neta para complejación eficiente. Un examen del punto de ionización (IP) o punto de carga cero para los péptidos individuales pueden guiar el proceso de selección. En general, el IP se determina mediante el movimiento de la molécula a través de un gradiente de pH en un experimento enfocado isoelectrónico.¹¹ Para asegurar que un péptido se carga positivamente, el pH del medio acuoso seleccionado debe ser menor que el punto isoelectrónico para el péptido en cuestión.

Para preparar un complejo inmunoestimulador se siguen las siguientes etapas. Primero, se determina la contribución de carga positiva molar promedio para un inmunógeno de péptido deseado o para un cóctel de inmunógenos de péptido con base en las relaciones molares de los péptidos mezclados y la contribución de carga de cada componente de péptido en la composición de vacuna final. En segundo lugar, la contribución de carga negativa molar se determina para el oligonucleótido complejante con base en la relación molar del oligómero y la contribución de carga de este componente en la composición de vacuna final. En tercer lugar, la cantidad de inmunógeno de péptido, con base en la carga positiva molar promedio total, es dependiente de la cantidad de oligonucleótido empleada para complejación y la carga negativa molar total del mismo. Esta relación se utiliza para definir las cantidades relativas de inmunógenos de péptido y oligonucleótidos que se van a combinar en un solvente acuoso para formar un complejo inmunoestimulador. Un exceso del inmunógeno de péptido catiónico se puede emplear para proporcionar una mezcla del complejo inmunoestimulador y un exceso del péptido no complejado. O, también se puede emplear un exceso del oligonucleótido para proporcionar un exceso del oligonucleótido. Las cantidades relativas del inmunógeno de péptido y el oligonucleótido seleccionadas se basan en la formulación de vacuna deseada.

Finalmente, la cantidad calculada del oligonucleótido aniónico en un solvente acuoso compatible se agrega con mezcla a las cantidades calculadas de los inmunógenos de péptido catiónico disueltos de forma similar en un solvente acuoso compatible. La cantidad en nmol del inmunógeno de péptido catiónico utilizado está de manera general en un rango para proporcionar 8 cargas positivas a 0.5 cargas positivas a la cantidad en nmol del oligonucleótido aniónico para proporcionar una carga negativa. Esto se denomina como la relación de carga. Cuando la relación de carga es 8:1, existe un gran exceso del inmunógeno de péptido. Cuando la relación de carga es 1:2, existe un exceso moderado del oligonucleótido aniónico. El complejo se forma espontáneamente en la forma de una suspensión en la solución. La estimación de las cantidades residuales de inmunógenos de péptido o oligonucleótidos se puede hacer al separar el complejo de la solución y evaluar las soluciones de sobrenadante

mediante espectrofotometría ultravioleta (UV) o mediante cromatografía de alto de desempeño de fase inversa (RP-HPLC).

5 El complejo inmunoestimulador cuando se prepara como una suspensión se puede utilizar como una composición de vacuna. Si el complejo inmunoestimulador se inyecta parenteralmente, se seleccionan solventes acuosos de tal manera que la composición de vacuna final es isotónica y adecuada para tal propósito. En casos en donde primero se forma el complejo en agua desionizada destilada, los reguladores acuosos de concentración de sal adecuada se agregan para asegurar la composición de vacuna final es isotónica.

10 Se puede liofilizar el complejo inmunoestimulador preparado como una suspensión o solución. La composición liofilizada luego se puede reconstituir e incorporar en diferentes formulaciones de vacuna de acuerdo con el modo de suministro deseado. El complejo inmunoestimulador de la presente invención también se puede formular como una emulsión agua en aceite, en combinación con una suspensión de sal mineral o un gel polimérico biocompatible.

15 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, la invención describe un proceso para aislar el complejo inmunoestimulador estabilizado como partículas estables por medio de liofilización. La reconstitución del complejo inmunoestimulador estabilizado como una suspensión en solventes acuosos o solventes biocompatibles no muestra esencialmente cambios en la distribución del tamaño de partícula o potencia *in vivo*. Esto representa una ventaja importante sobre las formulaciones que requieren refrigeración para mantener la eficacia, tal como composiciones de vacuna con base en alumbre. Esta característica extiende la utilidad potencial de estos sistemas para incluir la reconstitución directa antes de inmunización y modos alternativos de suministro que requieren las formas de dosificación de estado sólido estables, tal como un aerosol en polvo seco o nebulización para el suministro pulmonar o intranasal.⁴²

20 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, la invención proporciona diversos procesos para preparar emulsiones agua en aceite estables⁴³ que comprenden el complejo inmunoestimulador estabilizado de la presente invención. En tal emulsión, preferiblemente la fase acuosa comprende el complejo inmunoestimulador o una mezcla del complejo inmunoestimulador con el inmunógeno de péptido no complejado; y la fase de aceite continua comprende un aceite sintético, mineral, animal o vegetal. Adicionalmente, la fase de aceite también puede comprender un emulsificante inmunoestimulador, un componente biocompatible o metabolizable.

25 En particular, los aceites útiles para preparar las emulsiones agua en aceite de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aceites sintéticos (por ejemplo isopropil miristato), aceites vegetales (por ejemplo aceite de cacahuate), aceites minerales (por ejemplo Drakeol™ o Marcol™), aceites de animal metabolizables (por ejemplo escualeno o escualano), y una mezcla de los mismos. Se prefieren los aceites minerales. Los emulsificantes con base en aceite útiles para estabilizar las emulsiones incluyen, pero no se limitan a, la familia de oleatos manida y derivados de los mismos.

30 La cantidad relativa de emulsificante requerido es una función del balance de hidrófilo-lipófilo (HLB) y la estabilidad intrínseca de la emulsión agua en aceite producida bajo condiciones específicas. Los métodos para seleccionar aceites y combinaciones de emulsificantes se conocen bien por aquellos expertos en la técnica.

35 La emulsión w/o puede comprender entre 10 v/v% y 80 v/v% de agua en la fase acuosa interna. Para la mayoría de propósitos, la concentración de agua óptima está en el rango de 30 v/v% y 50 v/v%. La fase acuosa interna se comprende característicamente de gotas muy finas con tamaños típicamente en el rango de 1-10 mM, preferiblemente 1-5 mM. Las preparaciones son estables cuando se mantienen a temperatura ambiente o se refrigeran.

40 También se pueden utilizar otros agentes estabilizantes para preparar la emulsión. Estos incluyen tensoactivos, partículas coloidales, proteínas, y otros agentes estabilizantes y polimerizantes conocidos por aquellos expertos en la técnica.

45 La emulsión w/o puede comprender adicionalmente por lo menos un adyuvante lipófilo soluble en agua tal como 3-O-desacil-4'-monofosforil de lípido A (MPL), *N*-acetil-muramyl-L-alanil-D-isoglutamina (MDP), bromuro de dimetildioctadecilamonio (.DDA), *N,N*-dioctadecil-*N,N*-bis(2-hidroxiethyl) propanodiamina (Avridina), *N*-(2-Desoxi-2-1-leucilamino-β-Dglucopiranosil)-*N*-octadecil-dodecanoilamida hidroacetato (BAY-1005), 3β-[*N*-(*N,N*-dimetilaminoetano)-carbamoil] colesterol (DC-Chol), NAc-Mur-L-Thr-D-isoGln-sn-glicerol dipalmitoil (Murapalmitina) y mezclas o derivados de los mismos. La emulsión w/o también puede comprender en la fase dispersa por lo menos un adyuvante soluble en agua, por ejemplo, poli[di(carboxilatofenoxi)] fosfaceno (PCPP), *Quillaja* saponina (QS-21), Holotoxina del Cólera (CT) o subunidad de Toxina del Cólera B (CTB), Enterotoxina lábil al calor de *E. Coli* (LT) o subunidad de Enterotoxina B lábil al calor de *E. Coli* (LTB) y citoquinas tales como Interleuquina-1β (IL-1β), Interleuquina-2 (IL-2), Interleuquina-12 (IL-12), interferón-γ (IFN-γ) y mezclas y derivados de los mismos. El adyuvante soluble en agua puede ser sintético o natural. La presencia de un adyuvante soluble en agua con propiedades que forman película, tales como un oligómero o polímero, pueden servir adicionalmente para estabilizar

la emulsión. La emulsión w/o puede facilitar la exposición de los inmunógenos al sistema inmune para proporcionar una vacuna más eficaz.

5 Una emulsión agua en aceite que comprende un complejo inmunoestimulador, o una mezcla de los mismos con inmunógeno no complejado se puede preparar como sigue. En primer lugar, un complejo inmunoestimulador se prepara a partir de un inmunógeno de péptido y un oligonucleótido en una relación para asegurar la formación del complejo inmunoestimulador solo o en una mezcla con exceso de inmunógeno de péptido residual en una solución acuosa. En segundo lugar, la solución acuosa se mezcla con un aceite que contiene emulsificantes y se homogeniza para proporcionar una emulsión agua en aceite en donde la fase acuosa se dispersa en una fase de aceite continua. La emulsión agua en aceite como tal es adecuada para inyección parenteral.

10 La emulsificación de las fases acuosas y de aceite se puede llevar a cabo mediante homogenización o mediante transferencia entre dos jeringas o al extrudir los componentes a través de un filtro de membrana de un tamaño de poro controlado. Los métodos semi-manuales de baja energía son rápidos. Sin embargo, debido a que existe considerablemente menos corte que otros procesos, la emulsión producida no es tan fina como aquella producida utilizando sistemas mecánicos de alto corte. Ejemplos de sistemas de alto corte incluyen rotoestatores, 15 microfluidizadores, y sonificadores. También se pueden emplear otros dispositivos similares a estos sistemas de alto corte que son bien conocidos para emulsificación.

20 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, la invención proporciona diversos procesos para preparar suspensiones fisiológicamente aceptables de sales minerales que comprenden el complejo inmunoestimulador estabilizado de la presente invención. En tal sistema mezclado, la fase acuosa comprende una suspensión de combinación de sal mineral y complejo inmunoestimulador, que puede contener adicionalmente 25 inmunógenos de péptido no unidos, residuales en la solución.

25 En particular, las sales minerales útiles para preparar las suspensiones completas con base en acuoso de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, Hidróxido de aluminio (por ejemplo, Alhidrogel®, Rehydragel HPA®, Rehydragel LV®), Fosfato de aluminio (por ejemplo, Adju-phos® o Rehyraphos®) o fosfato de calcio (por ejemplo, Calphos®), y mezclas de los mismos.

Los métodos para seleccionar sales minerales y determinar la concentración preferida de la sal mineral para emplear o combinaciones de la misma se conocen bien por aquellos expertos en la técnica.

30 También se pueden utilizar otros agentes estabilizantes para preparar la suspensión de sal mineral. Estos incluyen tensoactivos, antioxidantes, reguladores fisiológicos aceptables, tonificantes, conservantes y otros agentes conocidos por aquellos expertos en la técnica.

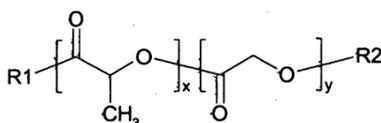
35 La suspensión de sal mineral puede comprender adicionalmente por lo menos un adyuvante adicional (por ejemplo MPL, MDP, DDA, N, N-Avridina, BAY-1005, DC-Chol, Murapalmitina, PCPP, QS-21, CT o CTB, LT o LTB y citoquinas tales como IL-1 β , IL- 2, IL-12, IFN- γ y mezclas y derivados de los mismos). La sal mineral puede facilitar la exposición de los inmunógenos al sistema inmune en la forma de un depósito o atrae las células específicas del sistema inmune mediante un proceso conocido como quimiotaxis.

40 Una suspensión de sal mineral que comprende un complejo inmunoestimulador, o una mezcla del complejo inmunoestimulador en combinación con inmunógenos no complejados residuales se puede preparar como sigue. En primer lugar un complejo inmunoestimulador se prepara a partir de un inmunógeno de péptido y un oligonucleótido en una relación de carga para asegurar la complejación completa de todos los inmunógenos de péptido y el oligonucleótido en la solución. Alternativamente, se prepara un complejo inmunoestimulador a partir de un 45 inmunógeno de péptido y un oligonucleótido en una relación de carga para asegurar la complejación parcial de los inmunógenos de péptido y componentes de oligonucleótido en la solución; en segundo lugar, la suspensión acuosa se combina con una suspensión de sal mineral con mezcla para proporcionar una suspensión acuosa completa de todos los componentes. La combinación de suspensión como tal es adecuada para inyección parenteral.

45 En un método complementario, se puede preparar una suspensión de sal mineral que comprende un complejo inmunoestimulador, o una mezcla de los mismos con inmunógenos de péptido no complejados como sigue. En primer lugar, el inmunógeno de péptido se mezcla con una suspensión de sal mineral. Dependiendo de las propiedades físicas de la sal mineral, de los inmunógenos de péptido y del regulador acuoso diversas proporciones de inmunógeno se pueden absorber directamente mediante la sal mineral en esta etapa; en segundo lugar, a esta 50 suspensión se agrega un oligonucleótido con agitación. Resulta la complejación completa o parcial de los inmunógenos de péptido no unidos residuales en la solución. La combinación de suspensión como tal es adecuada para inyección parenteral. En la Figura 16, se muestran ambos métodos de preparación.

De acuerdo con otro aspecto de esta invención, se proporciona un proceso para preparar un polímero biodegradable gelificante *in-situ* en el que se dispersa un complejo inmunoestimulador estabilizado o una mezcla de un complejo

5 inmuoestimulador estabilizado y inmunógeno no complejado. El complejo inmuoestimulador se puede dispersar en la solución o como una suspensión dentro de un solvente biocompatible. El solvente biocompatible puede comprender adicionalmente un adyuvante soluble que es sintético o natural. La solución o suspensión en el polímero gelificante biodegradable se diseña para el suministro del inmunógeno a un anfitrión. El polímero gelificante *in-situ* es biodegradable y es un copolímero de poli-D,L-lacturo-coglicolida (PLG) y ácido poli-D,L-láctico-ácido co-glicólico (PLGA) con un peso molecular en el rango de aproximadamente 2,000 a aproximadamente 100,000 daltons y una viscosidad inherente de aproximadamente 0.2 a 1.0 dl/g. La fórmula del polímero gelificante en sitio es:



R1= OAlquilo (PLG) u OH (PLGA)

10 R2= H

en donde R1 es OH o alcoxi que tiene 1 a 5 carbonos y R2 es H; x:y es la relación de cada unidad de monómero del copolímero con $x + y = 1$. En el caso de PLG, R1 es alcoxi y las unidades de monómero son lacturo y glicolida y en el caso de PLGA, R1 es OH y las unidades de monómero son ácido láctico y ácido glicólico.

15 El complejo inmuoestimulador estabilizado o una mezcla del mismo con el inmunógeno no complejado con el polímero gelificante *in situ* se puede preparar como una fase única o como una suspensión en un solvente biocompatible.

20 El solvente biocompatible útil en la presente invención se selecciona del grupo que consiste de dimetil sulfóxido (DMSO), N-metil pirrolidina (NMP), triacetina y glicerina. Se prefiere DMSO. El DMSO tiene una alta capacidad para solubilizar una gran cantidad en porcentaje en peso del polímero. Se ha utilizado ampliamente como un solvente para gelificación *in-situ* de los polímeros. También se puede utilizar DMSO para preparar una suspensión del complejo inmuoestimulador estabilizado de la presente invención.

Es importante destacar que se ha demostrado en modelos de animal que existe una alta tolerancia para DMSO cuando se utiliza en cantidades pequeñas.⁴⁴ Así, los problemas de toxicidad son mínimos cuando las composiciones que comprenden DMSO se administran por medio de una ruta parenteral.

25 Los polímeros biodegradables adecuados para la presente invención incluyen, pero no se limitan a, la familia PLA o PLGA de poliésteres. Estos materiales se pueden disolver en diversos solventes biocompatibles en una concentración en un rango de 5 p/p%-50 p/p%. Diversos factores físicos pueden influenciar la cantidad práctica del polímero, que se puede disolver en el solvente biocompatible. Estos incluyen la constitución, peso molecular, viscosidad intrínseca y cristalinidad del polímero. Para la serie PLG/PLGA de copolímeros, estos factores son altamente variables. Por ejemplo, los homopolímeros de ácido poli D,L-láctico (PLA) o poli D,L-lacturo (PL) y copolímeros de PLG o PLGA con bloques largos del componente de monómero de ácido láctico son materiales altamente cristalinos con viscosidades intrínsecas relativamente altas.

35 El porcentaje en peso relativo de estos materiales cristalinos que se pueden solubilizar es claramente inferior que los análogos amorfos PLG o PLGA, en donde la relación de los componentes de ácido láctico a ácido glicólico es aproximadamente igual, 1:1. Se contempla que la diferencia en la cantidad total de polímero, que se puede administrar mediante inyección, tendrá un impacto dramático en el índice de degradación de matriz y afecta las cinéticas de liberación para inmunógenos encapsulados. Se prevé que es posible variar las mezclas de polímeros y copolímeros físicamente compatibles con diversas propiedades físicas en solventes biocompatible para lograr efectos biológicos novedosos.

40 Otros polímeros biodegradables adecuados para la presente invención se contemplan e incluyen, pero no se limitan a, policaprolactonas, polianhídridos, poliortoésteres y poli(ácido α -hidroxibutírico). Estos polímeros se pueden solubilizar en solventes biocompatibles en porcentajes en peso útiles y proporciona sustratos que forma matriz útiles.

45 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una preparación de vacuna de liberación controlada o retrasada en forma estable junto con un método para elaborar tal preparación de vacuna. La matriz de gel de la composición de vacuna de liberación controlada o retrasada comprende un polímero biodegradable seleccionado del grupo que consiste de poli-D, L-lacturo-co- glicolida (PLG) y ácido poli-D,L-láctico-ácido co-glicólico (PLGA), policaprolactonas, polianhídridos, poliortoésteres y poli(ácido α -hidroxibutírico), un solvente biocompatible y un complejo inmuoestimulador estabilizado.

El gel polimérico puede comprender adicionalmente por lo menos un adyuvante adicional, por ejemplo, MPL, MOP, DDA, N,N- Avridina, BAY-1005, DC-Chol, Murapalmitina, PCPP, QS-21, CT o CTB, LT o LTB o una citoquina tal como IL-1 β , IL-2, IL-12, IFN- γ y mezclas y un derivado de los mismos.

Las ventajas de la composición de liberación controlada de la presente invención incluyen:

- 5 (a) una formulación en gel completamente biodegradable y biocompatible;
- (b) una liberación sostenida del inmunógeno para la exposición a las células efectoras inmunes que resulta en inmunogenicidad mejorada;
- (c) una alta carga de gel con un inmunógeno deseado en una composición estable; y
- 10 (d) un modo flexible de suministro que incluye una suspensión de un complejo inmunoestimulador estabilizado que es auto-adyuvante.

15 El peso molecular y cristalinidad del polímero impacta directamente la eficiencia de atrapamiento *in vivo*. El material gelificante polimérico es miscible en solventes apróticos polares tales como DMSO. Sin embargo, luego de inyección intramuscular o subcutánea, se extrae DMSO en los tejidos corporales circundantes con agua que penetra reversiblemente la solución rica en polímero. Este proceso sirve como el mecanismo principal que controla la formación de gel *in-situ*. El índice en que procede este proceso afecta directamente la ráfaga inicial de liberación del inmunógeno durante el intervalo de tiempo cuando el solvente biocompatible se extrae activamente en el tejido corporal y se intercambia con soluciones fisiológicas y antes del atrapamiento del inmunógeno mediante la formación del gel.⁴⁵ Se sabe que controlar el proceso de cristalización es un mecanismo clave importante por el cual se puede mejorar la retención de los inmunógenos dentro del gel.⁴⁶ Este se relaciona íntimamente con la morfología interna del gel formado que limita las rutas difusionales por las que se pueden liberar los inmunógenos.

20 Los complejos inmunoestimuladores retenidos o atrapados se liberan posteriormente del gel en cantidades limitadas en una forma sostenida con un mayor refuerzo liberado cuando se erosiona la mayor parte de la matriz que forma el polímero. Esto varía dependiendo de muchas de las mismas condiciones que influyen la gelificación, tal como peso molecular, grado de cristalinidad, constitución, hidrofobicidad, y la presencia de aditivos.

25 El potencial para una respuesta toxicológica adversa para el solvente DMSO se ha abordado en un estudio reciente⁴⁴ en donde un dispositivo que contiene una hormona de péptido suspendida en DMSO se implanta subcutánea y quirúrgicamente en un perro y en un humano. El volumen del DMSO empleado en el estudio es 150 μ L. El implante se diseña para liberar el péptido durante el curso de 1 año y se retira quirúrgicamente al final del estudio. Ni en el perro ni en el humano se observan reacciones de tejido adversas. La liberación controlada de la mezcla de péptido/DMSO del implante en tejidos fisiológicos es útil como un modelo para evaluar la toxicidad potencial que se relaciona con la composición poliméricamente gelificante *in-situ* completamente biodegradable. Se contempla que la cantidad de DMSO útil en la presente invención es esencialmente igual como aquella utilizada en el estudio.

35 Se espera que exista una extracción inicial del complejo inmunoestimulador en DMSO en el tejido corporal antes que se excede el límite de solubilidad del polímero. Tiene lugar la solidificación, retardando la liberación del complejo inmunoestimulador estabilizado. Posteriormente, el complejo inmunoestimulador estabilizado se libera junto con el DMSO mediante rutas controladas por difusión o retenidas en el gel con un índice liberado que es una función de las propiedades del polímero. Es evidente que la difusividad de estas moléculas dentro del gel se rija por diversos factores, tales como la morfología interna de gel y porosidad, el grado de penetración mediante agua en gel y la hidrólisis de la masa del polímero.⁴⁵

40 En el caso del complejo inmunoestimulador estabilizado de la presente invención, que se dispersa como una suspensión a través del gel, la extracción inicial es mayor que aquella de DMSO con una cantidad pequeña del complejo inmunoestimulador ubicado cerca del frente gelificante. Así, la cantidad pequeña del complejo inmunoestimulador, no atrapada efectivamente durante la fase gelificante inicial, debería ser sensible a la cebado inicial de la respuesta inmune *in vivo*. Después de esto, se espera que el DMSO continúe siendo liberado mediante difusión, con la masa del complejo inmunoestimulador que permanece atrapada en la matriz de gel hasta que la masa del polímero se ha hidrolizado suficientemente por resultar en una liberación completa del complejo inmunoestimulador encapsulado.

50 Específicamente, los geles poliméricos formulados de mayor peso molecular y los polímeros más cristalinos derivados de ácidos α -hidroxi se degradan durante un periodo más largo que los análogos amorfos de menor peso molecular. Se sabe que este fenómeno se relaciona con la accesibilidad del agua para los enlaces de éster hidrolíticamente inestables.⁴⁶

Se ha establecido que los copolímeros amorfos aleatorios compuestos de 50 % de D,L-lacturo y 50 % de glicolida con un peso molecular en el rango de 8,000-50,000 daltons exhiben mayores índices de degradación. 50 % en peso o menos del polímero permanece después de aproximadamente 6-8 semanas, cuando se sumerge en un regulador PBS.⁴⁷

5 Es deseable modificar los parámetros que controlan el índice de gelificación, las cinéticas de liberación de inmunógeno y la morfología interna de gel. Específicamente, el uso de diversos agentes formadores de poro, plastificantes, y estabilizantes tales como tensoactivos, azúcares, proteínas, polímeros y otros excipientes conocidos por aquellos expertos en la técnica son útiles para este propósito.

10 Las preparaciones son estables cuando se refrigera o a temperatura ambiente. La composición de vacuna de la presente invención que emplea DMSO se congelará cuando se refrigera debido a que el punto de congelamiento de DMSO es aproximadamente 18° C. Se ha encontrado que el descongelamiento no provoca cambio en la eficacia de la vacuna *in vivo*.

15 De acuerdo con la presente invención, el polímero biodegradable gelificante *in-situ* y el complejo inmunoestimulador estabilizado se puede formular separadamente. El polímero gelificante *in-situ* se puede solubilizar en un solvente biocompatible en un frasco, y el complejo inmunoestimulador estabilizado en forma seca en un frasco separado. El complejo inmunoestimulador en forma seca se puede preparar mediante secado por rociado, o preferiblemente, liofilización.^{48, 49} Los complejos inmunoestimuladores secos luego se pueden reconstituir en un solvente biocompatible, y se suministran mediante jeringa como una solución o como una suspensión dentro de la solución de polímero biodegradable. La mezcla luego se utiliza inmediatamente o poco después para inmunización.

20 Emplear frascos separados tiene una ventaja agregada de minimizar cualesquier problemas de estabilidad potenciales. Estos incluyen degradación de polímero en la presencia del inmunógeno de péptido, que puede tener cadenas laterales funcionales reactivas, tales como, grupos amina libres o grupos de carboxilato,⁵⁰ o la oxidación de aminoácidos selectivos, tales como cisteína y triptofano en el inmunógeno de péptido en la presencia de OMSO.1

25 Para preparar una composición de polímero gelificante reconstituible *in-situ que contiene* un complejo inmunoestimulador, un complejo inmunoestimulador se prepara como se describió anteriormente. Luego, esta solución acuosa se liofiliza para formar una composición seca. La composición seca luego se reconstituye como una suspensión en un solvente biocompatible que contiene un porcentaje en peso calculado de un polímero gelificante biodegradable. La composición de vacuna final representa un polímero gelificante *in situ* y es adecuada para inyección parenteral.

30 Se contemplan que las composiciones de la presente invención son útiles como vacunas o para propósitos terapéuticos. Otros materiales biológicos que se pueden modificar para poseer carga catiónica a pH que varían de manera general a 4.0-8.0 para complejación eficiente con el oligonucleótido CpG, puede incluir proteínas, imitadores de proteína, bacterias, lisados bacterianos, virus, lisados celulares infectados con virus, antígenos, anticuerpos, agentes farmacológicos, antibióticos, carbohidratos, lípidos, citoquinas, quimioquinas, aminoácidos lipidados, glicolípidos, haptenos y combinaciones y mezclas de los mismos.

35 Estas composiciones se pueden administrar parenteralmente por medio de inyección subcutánea o intramuscular. Cuando se administra, parenteralmente, la respuesta inmune puede ser una respuesta mediada por célula o una respuesta de anticuerpo local de suero para proporcionar los anticuerpos neutralizantes. Para composiciones administradas mucosalmente, las respuestas inmunes incluirían adicionalmente una respuesta de anticuerpo secretora local.

40 Será fácilmente evidente para aquellos expertos en la técnica que los complejos inmunoestimuladores también se pueden mezclar en emulsiones con base en aceite en agua (o/w). Otras posibilidades incluyen la encapsulación de complejos inmunoestimuladores estabilizados dentro de las emulsiones dobles agua en aceite en agua (w/o/w), micropartículas de polímero biodegradables, vesículas de lípido o estructuras de liposoma. La mayor parte de estos sistemas de suministro son atractivos para el desarrollo de formulaciones de liberación sostenida.

45 Preferiblemente, el complejo inmunoestimulador de péptido de la presente invención se puede emplear en emulsiones con base en w/o que emplea adyuvante con base en aceite SEPPIC, en combinación con sales minerales tales como Hidróxido de aluminio, Fosfato de aluminio y Fosfato de calcio o en una liberación controlada de dosis única de formulación gelificante *in-situ* con base en copolímeros biodegradables poli-D,L-lacturo-co-glicolida (PLG) o ácido poli-D,L-láctico-ácido co-glicólico (PLGA).

Más preferiblemente, las composiciones de vacuna de la presente invención comprenden un complejo inmunoestimulador estabilizado del inmunógeno de péptido con un oligonucleótido CpG mezclado con el inmunógeno de péptido no complejado.

Es claramente evidente para un experto en la técnica, que las diversas realizaciones de la presente invención tienen muchas aplicaciones en los campos de la medicina y en particular la vacunación, el diagnóstico y tratamiento de infecciones con patógenos que incluyen bacterias y virus. Se describen adelante los usos adicionales de la presente invención.

5 Preparación de Vacunas

La composición inmunogénica, adecuada para ser utilizada como vacuna, se puede preparar a partir de un complejo inmunoestimulador de la presente invención, como una emulsión w/o, como una suspensión en combinación con una suspensión de sal mineral o como un polímero gelificante *in situ* o una combinación de estos sistemas como se describe aquí. La composición inmunogénica que contiene el complejo inmunoestimulador es útil para provocar una respuesta inmune por el anfitrión al cual se administra. La respuesta inmune incluye la producción de anticuerpos por parte del anfitrión.

La composición inmunogénica se puede preparar como soluciones o suspensiones inyectables, líquidas, como polvos o emulsiones liofilizadas o secadas por rociado. La composición que comprende el complejo inmunoestimulador se puede mezclar con reguladores fisiológicamente aceptables o excipientes, tales como, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La vacuna puede contener adicionalmente sustancias adicionales tales como agentes emulsificantes o humectantes, agentes reguladores de pH, o adyuvantes para mejorar adicionalmente la efectividad de los mismos. La vacuna puede contener adicionalmente sustancias biocompatibles adicionales, específicamente en conjunto con los polímeros gelificantes *in-situ* tales como dimetil sulfóxido (DMSO), Nmetil pirrolidina (NMP), triacetina, glicerina, y poli vinil pirrolidona (PVP).

La vacuna de la presente invención se puede administrar parenteralmente, por ejemplo, mediante inyección subcutáneamente, intramuscularmente o transdérmicamente. Las vacunas de la presente invención se pueden administrar mucosalmente por medio de las rutas oral, intranasal, rectal, vaginal u ocular.

Las vacunas se administran en una forma compatible con la formulación, y en tal cantidad cuando es terapéuticamente efectiva, protectora e inmunogénica. La cantidad que se va a administrar depende del sujeto o especie que se va a tratar, que incluye, por ejemplo, la capacidad del sistema inmune del sujeto o de la especie para sintetizar los anticuerpos, y si se necesita, para producir respuestas inmunes mediadas por células.

Las cantidades precisas de aceites emulsificantes, sales minerales o polímeros gelificantes y material que tiene actividad biológica requerida para ser administrado para efecto depende del juicio del médico o veterinario. Sin embargo, los rangos de dosificación adecuados son fácilmente determinables por un experto en la técnica y puede ser del orden de microgramos a miligramos. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis de refuerzo también son variables, pero pueden incluir una administración inicial seguido por administraciones posteriores. La dosificación de la vacuna también puede depender de la ruta de administración y así varía de un anfitrión o especie a otra.

EJEMPLOS

La anterior descripción de manera general describe la presente invención. Se puede obtener una comprensión más completa mediante referencia a los siguientes Ejemplos específicos. Estos Ejemplos se describen únicamente para propósitos de ilustración y no están destinados a limitar el alcance de la invención. Los cambios en la forma y la sustitución de los equivalentes se contemplan como circunstancias que pueden sugerir cuando sea necesario alcanzar una meta particular Aunque se han empleado aquí términos específicos, tales términos están destinados en un sentido descriptivo y no para propósitos de limitaciones.

Se utilizan métodos de química, química orgánica, química de polímero, bioquímica de proteína e inmunología pero no se describen explícitamente en esta descripción y estos Ejemplos se reportan ampliamente en la bibliografía científica y se encuentran dentro de la capacidad de aquellos expertos en la técnica.

Preparación del complejo inmunoestimulador

En general, un complejo inmunoestimulador de un inmunógeno de péptido sintético y un oligonucleótido CpG en soluciones acuosas se prepara por la adición en forma de gotas de una solución de péptido patrón en un solvente acuoso apropiado en un frasco que contiene una solución patrón agitada gentilmente del oligonucleótido CpG disuelto en un solvente acuoso apropiado. El modo inverso de adición es igualmente efectivo. Los solventes acuosos compatibles incluyen, pero no se limitan a, agua desionizada destilada, solución salina normal (NS = 0.9 % de NaCl) o solución salina regulada con fosfato (PBS = 10 mM Regulador de fosfato, 0.9% NaCl) o mezclas de los mismos. El proceso de complejación no se afecta mayormente por reguladores fisiológicos, proporcionando flexibilidad cuando se selecciona un sistema de solvente compatible para el inmunógeno de péptido sintético y el oligonucleótido CpG.

5 El complejo se forma inmediatamente y se puede identificar visualmente mediante la observación de un precipitado fino suspendido en la solución. La cantidad de suspensión así formada es una función de las cantidades relativas del oligonucleótido CpG al péptido catiónico en la solución. El proceso de precipitación se controla mediante neutralización electrostática de las moléculas con carga opuesta. En un proceso termodinámicamente favorable, el ADN de hebra sencilla polianiónico altamente cargado se une con el inmunógeno de péptido catiónico cargado positivamente.

10 El oligonucleótido CpG se selecciona de un grupo que consiste de 5' TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT TTG TCG TT 3' (CpG1) SEQ ID NO: 1, un oligómero de longitud base 32, y 5' nTC GTC GTT TTG TCG TTT TGT CGT T 3' (CpG2) SEQ ID NO: 2, un oligómero de longitud base 24 más un grupo fosforotioato (designado como n en el extremo 5'). Los oligonucleótidos GpG se sintetizan mediante Oligo's Etc. (Wilsonville, Oregon), y se obtienen en un estado seco liofilizado. Estos materiales se reconstituyen en el solvente acuoso apropiado antes de uso. El CpG1 posee un motivo CpG secuestrado dentro de una secuencia de 8 bases de nucleótido y puede proporcionar adyuvancia más fuerte *in vivo* y *estabilidad mejorada* al unir péptidos catiónicos con mayores afinidades, que oligonucleótidos más cortos. Un grupo fosforotioato modificado en el extremo 5' de CpG2 aumenta la densidad de carga negativa molar y promueve potencialmente la unión mejorada.

20 Los inmunógenos de péptido se sintetizan y el regulador acuoso apropiado se utiliza para asegurar que el péptido es catiónico en la solución. Esta es una consideración importante en las vacunas cuando se desea la complejación del inmunógeno de péptido al oligonucleótido CpG. El punto de ionización o IP para cada inmunógeno de péptido y el pH del medio se utiliza para guiar la selección del regulador apropiado. El pH para una mezcla acuosa de una solución de péptido patrón disuelto en agua desionizada destilada o solución salina normal (NS) es aproximadamente 5.5, mientras que en la solución salina regulada con fosfato (PBS) el pH de la solución de péptido patrón es significativamente mayor a aproximadamente 7.2. La selección cuidadosa de los sistemas de solvente acuosos se hace para asegurar la protonación completa para los péptidos derivados de aminoácidos con cadenas laterales débilmente básicas, notablemente Histidina.

25 La Tabla 1 enumera las propiedades físicas de los inmunógenos de péptido sintéticos y el oligonucleótido CpG utilizado para formar los complejos inmunoestimuladores. Se describen tres objetivos de inmunógeno de péptido de ejemplo en la Tabla 1. Un cóctel de dos o tres inmunógenos de péptido o en el caso de una colección combinatoria de péptidos que contienen los análogos del péptido que se han empleado para preparar cada vacuna. Cada inmunógeno de péptido comprende dos segmentos, un epítipo objetivo de célula B y un epítipo cooperador T. El epítipo Th se incluye para mejorar la inmunogenicidad del inmunógeno de péptido.

35 Los epítopos de célula B y los epítopos auxiliares T se seleccionan después de detectar colecciones de péptidos en los modelos apropiados de animal. La información detallada con respecto a la identificación y composición de estas construcciones se puede encontrar con referencia a la patente Estadounidense Nos. 6,090,388⁵³, Patente Estadounidense No. 5,759,551⁵⁴ y WO99/67293⁵¹ y US 6,107,021.⁵⁷ La SEQ ID NOS: 7-9 en la Tabla 1 comprende los péptidos de inmunógeno LHRH y son útiles en una vacuna para inmunoterapia de cáncer de próstata, diseñada para tratamiento de ablación hormonal. Las SEQ ID NOS: 10-11 son útiles en una vacuna inmunoterapéutica anti-IgE para el tratamiento de alergia. Las SEQ ID NOS: 4-6 son útiles en una vacuna inmunoterapéutica anti-CD4 para el tratamiento de infección por VIH. Las SEQ ID NOS: 12-13 comprenden una colección combinatoria de péptidos FMD y son útiles en una vacuna anti-FMD para inmunidad protectora contra la enfermedad de la fiebre aftosa.

40 El complejo inmunoestimulador de la presente invención se puede preparar con diversas relaciones de péptidos catiónicos para los oligonucleótidos CpG para proporcionar diferentes propiedades físicas, tal como el tamaño de los complejos microparticulados. La Tabla 2 muestra la carga positiva molar promedio calculada y el peso de la fórmula promedio para el inmunógeno de péptido en la mezcla. La Tabla 2 también proporciona la contribución de la carga negativa molar promedio calculada de CpG1 (SEQ ID NO: 1) y CpG2 (SEQ ID NO: 2), respectivamente.

45 **Ejemplo 1: Preparación del Complejo Inmunoestimulador de LHRH, Inmunógenos y Oligonucleótidos CpG1**

Este Ejemplo ilustra la preparación de complejo inmunoestimulador a partir de los inmunógenos de péptido LHRH y los oligonucleótidos CpG1 en diversas proporciones. Un diagrama de flujo del proceso de formación de complejo como se describe aquí se muestra en la Figura 1.

50 Todos los artículos de vidrio, barras de agitación y puntas de pipeta se someten a autoclave durante 40 minutos a 121° C antes de uso. Todos los reactivos se pesan, se suministran, se transfieren o se agregan a los recipientes de reacción en una cámara de flujo laminar para evitar la contaminación.

55 Una solución patrón de inmunógeno de péptido, LHRH se prepara al mezclar una relación molar 1:1:1 de los péptidos de la SEQ ID NOS: 7-9 en una concentración de 3 mg/ml en agua desionizada destilada. Se agrega 33 µL de la solución patrón (100 µg de los inmunógenos de péptido) a cada una de una serie de frascos de 2 mL equipados con micro barras de agitación. A esta solución se agrega 0.5 mL de agua desionizada destilada como un diluyente. Una

solución patrón de 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del oligonucleótido CpG1 se prepara en agua desionizada destilada. Diversas cantidades de la solución patrón de oligonucleótido CpG1 se agregan a cada frasco para formar el complejo inmunoestimulador. La cantidad de oligonucleótido CpG1 agregada a cada frasco se determina mediante el cálculo para proporcionar una relación de carga de LHRH:CpG1 que varía de 8:1, con un gran exceso de LHRH, a 1:2 con un exceso de CpG1. Las cantidades respectivas de CpG1 utilizadas para preparar estas composiciones se muestran en la Tabla 3. Cabe notar que la relación de LHRH:CpG1 se representa como relaciones de carga molar y se basa en los cálculos mostrados en la Tabla 3.

Se hacen adiciones a temperatura ambiente con agitación continua y se equilibran durante 30 min. En todos los casos, se observa un enturbiamiento inmediato de la mezcla de reacción luego de la adición de la solución patrón de oligonucleótido CpG. Después de completar la adición del oligonucleótido CpG1, se observa una suspensión particulada blanca fina. Las partículas gradualmente se sedimentan y se pueden resuspender fácilmente con agitación gentil.

Los complejos microparticulados sólidos se pueden retirar esencialmente después de sedimentación y dejar que las soluciones de sobrenadante separadas sean analizadas mediante espectroscopía ultravioleta para inmunógenos de péptido no complejados residuales (a $\lambda = 280 \text{ nm}$) o para oligonucleótido residual CpG1 (a $\lambda = 260 \text{ nm}$). Para los complejos inmunoestimuladores preparados utilizando un exceso de LHRH, en donde LHRH:CpG1 = 8:1, 4:1 o 2:1, se detectan cantidades en excesos de péptidos.

El resultado obtenido mediante espectroscopía ultravioleta es un estimado y puede ser $\pm 20 \%$ del número obtenido por las siguientes razones. Los cromóforos de péptido tiene coeficientes de extinción más pequeños en tamaño cuando se compara con los oligonucleótidos CpGs y la longitud de onda máxima utilizada para detectar los péptidos y CpG1 están bastante cerca entre sí. Así, los estimados para el péptido residual libres posiblemente se pueden exagerar. Adicionalmente, una cantidad pequeña de nanopartículas del complejo de péptido CpG puede estar presente en el sobrenadante. La interpretación de estos resultados se complica adicionalmente por la observación de que al aumentar cantidad en exceso del inmunógeno de péptido con relación a CpG resulta de manera general en agregados de complejo con tamaños de partícula promedio más pequeños.

Se puede observar de la Figura 2 que la clasificación de los complejos LHRH/CpG1 con respecto a la distribución de tamaño de partícula de agregado promedio está en el orden de LHRH:CpG1 2:1 > 4:1 > 8:1. Se espera que la eficiencia del proceso de complejación varíe con base en las propiedades físicas de los inmunógenos de péptido y los oligonucleótidos CpGs seleccionados y la relación relativa de cada uno en la composición de vacuna. Para el sistema LHRH:CpG1, los niveles residuales del péptido no complejado como se determina por el rango de espectroscopía UV varían de 60-90 % (LHRH:CpG1 = 8:1), 40-80 % (LHRH:CpG1 = 4:1) y 25-65 % LHRH:CpG1 = 2:1) sobre los antecedentes, respectivamente. Para el complejo LHRH:CpG1 preparado en una relación de carga 1:1 existe muy poca concentración detectable del inmunógeno de péptido residual, $\sim 3 \%$, o el oligonucleótido CpG residual, $\sim 2 \%$. El gran aumento en el tamaño del agregado de este complejo que se acopla con la complejación esencialmente completa del inmunógeno es consistente, con el comportamiento esperado del polielectrolito en carga neutro. Para el complejo inmunoestimulador la relación de carga LHRH:CpG1 = 1:2, un exceso de CpG1, 48 % de nivel de CpG se encuentra a $\lambda = 260 \text{ nm}$. Esta cantidad de CpG1 residual aproxima la cantidad de CpG1 esperada si el primer equivalente de CpG1 se compleja completamente con el inmunógeno de péptido en la solución.

Los resultados del método UV demuestran que las composiciones de complejo inmunoestimulador preparados con un alto exceso de péptido a oligonucleótido (por ejemplo relación de carga LHRH:CpG1 = 8:1) resulta en una cantidad significativa de péptido libre en la solución. De forma similar, los complejos inmunoestimuladores preparados a partir de un exceso moderado de oligonucleótido a péptido (por ejemplo relación de carga LHRH:CpG1 = 1:2) resulta en composiciones con exceso de oligonucleótido libre. La presencia del exceso de oligonucleótido puede servir para estabilizar agregados más pequeños como se muestra en la Figura 2.

Este Ejemplo demuestra que no pueden haber ventajas prácticas para preparar el complejo inmunoestimulador con un alto exceso de LHRH, la relación de carga LHRH:CpG1 = 8:1, en donde una cantidad significativa de péptido permanece libre en la solución. De forma similar, no existe ventaja práctica para el complejo inmunoestimulador preparado con un exceso moderado de CpG1, relación de carga LHRH:CpG1 = 1:2, en donde es razonable asumir que después de la complejación completa en el punto de neutralidad eléctrica, el exceso de oligonucleótido solo puede servir para estabilizar los agregados como se muestra en la Figura 2. Este resultado revela que las moléculas aniónicas compatibles y/o polímeros se pueden agregar secuencialmente a un complejo eléctricamente neutro desarrollado 1:1 con el fin de reducir el tamaño de partícula efectivo de la composición. Esto presenta una estrategia novedosa para el complejo inmunoestimulador completo acoplado con el control del tamaño de partícula.

Es un objeto de esta invención unir efectivamente los inmunógenos de péptido en la solución para ciertas aplicaciones para maximizar la estabilidad de la vacuna *in vivo*. Así se prefiere el complejo inmunoestimulador preparado con relaciones de carga de inmunógenos de péptido a los oligonucleótidos CpG que varía de 4:1 a 1:1

respectivamente. Es otro objeto de esta invención maximizar la adyuvanticidad del complejo inmunoestimulador *in vivo* al utilizar partículas discretas más pequeñas (~10 micras o menos) para exposición al sistema inmune.

5 Se ha encontrado que la presencia del péptido no complejado y libre residual es más deseable para formulaciones de vacuna más complejas tales como aceites emulsión en agua o absorción en sales minerales. En estas formulaciones, adyuvantación de las respuestas inmunes puede resultar a partir de inmunógenos unidos como el complejo inmunoestimulador y también de inmunógenos no complejados dispersos dentro de la emulsión w/o o adsorbidos en la sal mineral directamente. Así, los complejos inmunoestimuladores preparados con relaciones de carga de inmunógenos de péptido al oligonucleótido CpG que varía de 8:1 a 2:1 se encuentra que son útiles para estas aplicaciones.

10 Más preferiblemente, una combinación de complejación máxima de péptido para estabilidad y tamaño de partícula pequeño para mejorar adyuvanticidad se encuentra para los complejos inmunoestimuladores preparados con relaciones de carga de inmunógenos de péptido al oligonucleótido CpG que varía de 4:1 a 2:1.

15 Los complejos inmunoestimuladores más preferidos son aquellos preparados por poseer propiedades físicas, que los hace más adecuados para modalidades de suministro alternativas. Específicamente, los tamaños de partícula promedio en el orden de 10 micras o menos son deseables en particular para el suministro rectal, vaginal, oral y nasal.

Ejemplo 2: Cuantificación del Inmunógeno de péptido y Eficiencia de Complejación de Oligonucleótido mediante RP-HPLC

20 Este Ejemplo ilustra un método preferible para determinar la eficiencia de complejación con respecto al inmunógeno de péptido y los componentes de vacuna de oligonucleótido que emplean cromatografía líquida de alto desempeño de fase inversa (RP-HPLC). Esta técnica permite la cuantificación de cada péptido individual no complejado residual en una mezcla de cóctel de péptido que se va a separar e identificar (a $\lambda = 226$ nm) y se puede utilizar para verificar la complejación completa del oligonucleótido CpG (at $\lambda = 260$ nm). Los complejos microparticulados sólidos se pueden separar de la solución de sobrenadante mediante centrifugación seguido por filtración. Se hacen correr dos programas RP-HPLC separados en las muestras de sobrenadante para identificar y cuantificar los inmunógenos residuales de péptido LHRH y los oligonucleótidos CpG1 en la solución.

30 Los péptidos se resuelven mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) utilizando la columna Vydac 4.6 x 250 mm C-18, número de Cat. 218TP54, con un gradiente de 95 % de la solución A (0.05 % de TFA en agua grado HPLC) y 5 % de solución B (0.05 % de TFA en acetonitrilo grado HPLC) a 24 % de la solución A y 76 % de la solución B en 40 minutos en el índice de flujo de 1 mL/minuto. Se supervisa la absorbancia de longitud de onda UV a 226 nm. La identidad de péptido se determina mediante el tiempo de retención, utilizando péptidos estándar.

35 Los oligonucleótidos se resuelven mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) utilizando la columna Perceptive Biosystem 4.6 x 100 mm Oligo R3, número de Cat. R330-050, con un gradiente de 95 % de la solución A (TEAA 0.1 M en agua grado HPLC, pH=8) y 5 % de la solución B (acetonitrilo grado HPLC) a 24 % de la solución A y 76 % de la solución B en 40 minutos en el índice de flujo de 1 mL/minuto. La absorbancia de la longitud de onda UV se supervisa a 260 nm. La identidad de péptido se determina mediante el tiempo de retención, utilizando el oligonucleótido estándar.

40 Los complejos inmunoestimuladores de LHRH y CpG1 que varía de 8:1 a 1:1 se preparan para este estudio como se describe en el Ejemplo 1 y Ejemplo 11. Las cantidades respectivas de CpG1 utilizadas para preparar estas composiciones se muestran en la Tabla 3 y la Tabla 9. Cabe notar que la relación de LHRH:CpG1 se representa como relaciones de carga molar y se basa en los cálculos mostrados en la Tabla 3 y la Tabla 9.

45 Para los complejos inmunoestimuladores preparados utilizando un exceso de LHRH, en donde LHRH:CpG1 = 8:1, 4:1 o 2:1, se detectan cantidades no equivalentes del péptido residual por RP-HPLC en las soluciones de sobrenadante que indica que el proceso de complejación es selectivo. Esta técnica permite una clasificación de inmunógenos del péptido LHRH con preferencias para el oligonucleótido CpG1 en la solución con base en afinidad de unión. En todos los casos no se puede detectar el oligonucleótido CpG1 no complejado residual mediante RP-HPLC, lo que indica la complejación completa de este componente.

50 Para el complejo inmunoestimulador preparado utilizando una cantidad equivalente de LHRH a oligonucleótido CpG1 con base en una relación de carga (LHRH:CpG1 = 1:1), esencialmente no se detecta el péptido y ni el CpG1 mediante RP-HPLC lo que indica la complejación completa de todos los componentes.

El conjunto completo de los resultados para este análisis se describe en la Tabla 8. Es claro que la unión de los inmunógenos del péptido LHRH con oligonucleótido CpG1 se puede clasificar como p607E > p667 > p500. Los tres péptidos tiene puntos de ionización casi idénticos y todos los tres se cargan positivamente como se calcula en la

Tabla 1. La preferencia del oligonucleótido CpG1 para p607E (carga +4) sobre p667 (carga +5) ambos de los cuales se prefieren para p500 (carga +4) se relaciona probablemente con el peso molecular y la distribución de las cargas dentro de estos péptidos.

Ejemplo 3: Preparación del Complejo Inmunoestimulador Seco

5 Este Ejemplo ilustra el procedimiento utilizado para preparar un complejo inmunoestimulador en un estado seco.

Las suspensiones de los complejos LHRH/CpG1, preparadas como se describe en el Ejemplo 1, en 0.5-1.0mL en solvente acuoso, agua desionizada destilada, solución salina normal o solución salina regulada con fosfato, se colocan en un baño de hielo seco/acetona y se congela durante 15 minutos. Las muestras congeladas luego se colocan en un secador de congelamiento (Vertis 25LEZ) y el agua se elimina mediante sublimación a 200 millitorr durante tres días. Este procedimiento proporciona un producto acabado vítreo casi transparente en el frasco. La aparición del sólido residual recuperado depende del solvente acuoso utilizado y puede variar de un vidrio casi transparente a un sólido esponjoso blanco.

La reconstitución de los materiales secos en el mismo volumen de solvente acuoso regenera una suspensión de partículas discretas. Las distribuciones del tamaño de partícula, determinadas como se describe en el Ejemplo 2, esencialmente no muestran cambio.

Esto demuestra que el proceso de resuspensión y secado no afecta las propiedades físicas de los complejos inmunoestimuladores preparados. Así, una composición de vacuna que comprende los complejos inmunoestimuladores de la presente invención se pueden proporcionar en la forma de una suspensión, un polvo sólido o seco.

20 Ejemplo 4a: Preparación de Emulsiones Agua en Aceite Utilizando Homogenización de Alto Corte

Este Ejemplo ilustra el proceso para preparar una emulsión agua en aceite (w/o) de los péptido catiónicos derivados de inmunógenos del péptido LHRH (SEQ ID NOS: 7-9 en una relación molar 1:1:1 en la solución), los inmunógenos de péptido IgE (SEQ ID NO: 10-11 en una relación molar 2:1 en la solución) inmunógenos de péptido CD4 (SEQ ID No: 4-6 en una relación molar 2:1:1 en la solución) o complejo inmunoestimulador derivado de LHRH, los inmunógenos IgE o CD4 y los oligonucleótidos CpG1 o CpG2 en diversas proporciones utilizando técnicas de homogenización. Un diagrama de flujo que ilustra el proceso de la formación de emulsión por medio de homogenización como se describe aquí se muestra en la Figura 3.

Todos los artículos de vidrio, barras de agitación y puntas de pipeta se someten a autoclave durante 40 minutos a 121° C antes de uso. Todos los reactivos se pesan, se suministran, se transfieren o se agregan a los recipientes de reacción en una cámara de flujo laminar para evitar la contaminación.

Se optimizan las emulsiones w/o para estabilidad con respecto a la relación de volumen de las fases de aceite a acuosa requeridas. Para las composiciones que emplean aceites Montanide® ISA 720 (SEPPIC, Inc) la relación de agua a aceite es 30:70 por volumen. Para las composiciones que emplean aceites ISA Montanide® 51 o ISA Montanide® 50v (SEPPIC, Inc.) la relación de agua a aceite es 50:50 por volumen.

35 Ejemplo 4b: Preparación de Emulsiones Agua en Aceite de ISA Montanide® 720 y Complejo Inmunoestimulador

A un recipiente de 10 mL, se agrega 3,333 µg de inmunógenos de péptido disuelto en un regulador acuoso apropiado (1,111 µL, 3 mg/mL) o un complejo inmunoestimulador preparado de 3,333 mg de inmunógenos de péptido disuelto en un regulador acuoso apropiado (1,111 mL, 3 mg/mL) y cualquiera de los oligonucleótidos CpG1 o CpG2. La Tabla 3 y la Tabla 4, muestran los cálculos para determinar las cantidades relativas de cada reactivo empleado.

Específicamente, para preparar un complejo inmunoestimulador de los inmunógenos del péptido LHRH en una relación de carga 4:1 de LHRH:CpG1, se utilizan 244 µg de oligonucleótido CpG1 (122 µL, 2.0 µg/mL).

Específicamente, para preparar un complejo inmunoestimulador de los inmunógenos de péptido IgE en una relación de carga de 4:1 IgE:CpG1, se utilizan 387 µg del oligonucleótido CpG1 (193.5 µL, 2.0 µg/µL). Para formar un complejo neutro 1:1 de IgE: CpG1, se utilizan 1,548 µg del oligonucleótido CpG1 (774.0 µL, 2.0 µg/µL).

Específicamente, para preparar un complejo inmunoestimulador de los inmunógenos de péptido CD4 en una relación de carga de 2:1 CD4:CpG2, se utilizan 402 µg de oligonucleótido CpG2 (201 µL, 2.0 µg/µL). Para formar en una relación de carga de 1:2 CD4:CpG2, se utilizan 1608 µg del oligonucleótido CpG2 (804 µL, 2.0 µg/µL).

A cada uno de los recipientes se agrega solvente acuoso de diluyente adicional de tal manera que el volumen final de la fase acuosa se fija a 3.0 mL para la preparación de emulsiones w/o ISA Montanide® 720 respectivamente.

Se encuentra que para los péptidos LHRH o IgE, la solución salina normal o PBS son adecuadas para complejación. El IP calculado para cada inmunógeno de péptido es mayor de 9.0 (Tabla 1), mucho mayor que el pH del solvente acuoso seleccionado.

En el caso de los péptidos CD4 ha probado ser importante la elección del solvente acuoso. Luego de dilución con solución salina normal o PBS se observa un precipitado sólido que se forma rápidamente en la solución. Esta inestabilidad precluirá el uso de esta combinación de inmunógeno mediante rutas parenterales. Un examen de los inmunógenos de péptido revela que la secuencia de péptido ID No: 6 (Tabla 1) tiene un punto de ionización calculado en 6.91. En PBS (pH ~ 7.2), este péptido tenderá a agregar y se espera que exhiba inestabilidad. Una solución para este problema se encuentra al preparar primero el complejo inmunoestimulador en agua desionizada destilada seguido por dilución con solución salina o PBS de suficiente resistencia iónica para asegurar que la suspensión sea isotónica y adecuada para inyección.

Este Ejemplo demuestra las ventajas de estabilizar los inmunógenos en la solución en la forma de un complejo inmunoestimulador de los péptidos LHRH, IgE o CD4.

Las soluciones acuosas o suspensiones diluidas luego se agregan lentamente a un recipiente de reacción seco de 25 mL cargado con 7.0 mL de ISA Montanide® 720. Se hacen adiciones mientras se homogeniza (Mezclador de Laboratorio de Alto Corte, Unidad Sellada, Silverson) se mezcla a bajas velocidades (2,000-3,000 rpm) para generar una emulsión gruesa. Esta velocidad de procesamiento se mantiene hasta que la muestra acuosa se ha agregado completamente y se continúa 2 minutos completos para asegurar la premezcla uniforme de las fases de aceite y acuosa. La velocidad de homogenización luego se incrementa (5,000-8,000 rpm) y se mantiene durante 5 a 10 minutos lo que resulta adicionalmente en la formación de una emulsión w/o finamente dispersa blanca homogénea.

La concentración final de los inmunógenos una vez formulada como suspensiones o en emulsiones agua en aceite como se describió anteriormente es 200 µg/mL.

Ejemplo 4c: Evaluación de Estabilidad para Emulsiones Agua en Aceite Preparadas Mediante Métodos de Homogenización.

La consistencia y estabilidad de las emulsiones w/o preparadas mediante homogenización se revisa mediante una variedad de métodos. Para probar que la emulsión es agua en aceite (w/o) y no aceite en agua (o/w) o agua en aceite en agua (w/o/w), se agrega una gota de la composición a un beaker que contiene agua desionizada destilada. Una gota de una emulsión w/o flotará sobre la superficie y no se dispersará en agua. Por el contrario, una gota de una emulsión o/w se dispersará instantáneamente en agua y una gota de una emulsión doble w/o/w se dispersará sobre la superficie y en el volumen de la fase acuosa. Se observa que las gotas de las emulsiones preparadas de ISA Montanide® 720 flotan en la superficie con dispersión mínima y se observa que las gotas de las emulsiones preparadas de aceites ISA Montanide® 51 fluyen sobre la superficie sin estar esencialmente disperso. Estos resultados indican que las emulsiones son w/o y que adicionalmente la tendencia hacia la dispersión es mayor para la emulsión w/o preparada de ISA Montanide® 720. Esto se relaciona con la viscosidad inicial de los aceites en sí mismos y la viscosidad de las emulsiones resultantes. Esta es una consideración importante para maximizar el depósito potencial de la formulación de vacuna resultante.

Se revisa la viscosidad final evidente de las emulsiones y aceites (viscómetro rotacional Brookfield DV-1+) para consistencia lote a lote y para ensayos de estabilidad a largo plazo. ISA Montanide® 720 tiene una viscosidad de -15 mPa a 25° C mientras que la emulsión w/o preparada de ISA Montanide® 720 tiene una viscosidad de -45-50 mPa a 25° C. Esto proporciona un producto bastante fluido, lo que es deseable para facilitar la manipulación, y suministro de la vacuna con una jeringa.

En contraste, ISA Montanide® 51 tiene una viscosidad de ~50 mPa a 20° C mientras que las emulsiones w/o preparadas de ISA Montanide® tienen una viscosidad de -1,500-2,900 mPa a 25° C. La variación amplia en la viscosidad se encuentra que es una función de selección del regulador. (PBS = -2,900 mPa, NS = -2,500 mPa y agua desionizada destilada = -1,500 mPa). El material de esta alta viscosidad puede presentar algunas dificultades con respecto a la transferencia y suministro con una jeringa. Sin embargo, se mejora la estabilidad a largo plazo de estas composiciones. La estabilidad a largo plazo de la emulsión se evalúa al poner 1 mL de cada emulsión en un frasco eppendorf de 1.5 mL y se centrifugan los contenidos bajo alta velocidad (5,000 rpm) durante 10 minutos. Estas condiciones no simulan las condiciones de almacenamiento actuales pero se pueden utilizar para predecir la resistencia de la emulsión hasta separación. En el caso de ISA Montanide® 720, 5-10 % del volumen separado con una fase de aceite amarillo paja o claro se observa sobre la superficie. En el caso de ISA Montanide® 51, 0-2 % del volumen separado con una fase de aceite amarillo paja o claro se observa sobre la superficie. La viscosidad mayor

de los productos de emulsión ISA Montanide® 51 cuenta para la estabilidad mayor para sedimentación y resistencia hasta separación.

5 El tamaño de partícula y la distribución para la emulsión w/o se caracteriza adicionalmente mediante microscopía óptica (Nikon DIAPHOT 200). Una fotomicrografía de cada composición se obtiene y se hace un estimado del rango de tamaño de las partículas utilizando una escala generada por ordenador. La escala en sí misma se referencia externamente contra los estándares de los tamaños de partícula conocidos (micropartículas trazables NIST - Duke Scientific). Para las emulsiones w/o preparadas de ISA Montanide® 720 o ISA Montanide® 51 y los inmunógenos de péptido, los tamaños de partícula son esencialmente iguales (c.a. 1-2 micras) con agregación o coalescencia mínima. Para emulsiones w/o preparadas de ISA Montanide® 720 o ISA Montanide® 51 y los tamaños de partícula del complejo inmunoestimulador son ligeramente mayores (c.a. 1-3 micra) con agregación o coalescencia mínima. La Figura 4 es una fotomicrografía obtenida de una emulsión w/o preparada por medio de la homogenización de ISA Montanide® 51 y un complejo inmunoestimulador derivado de 100 µg de inmunógenos del péptido LHRH, con LHRH: CpG1 en una relación de carga final de 4:1.

15 El tamaño de partícula promedio inicial está solo en el orden de 10 micras. El proceso para homogenizar una suspensión acuosa de los complejos inmunoestimuladores bajo alto corte resulta en un tamaño de partícula agregado promedio más pequeño. Se obtiene una emulsión w/o estable con gotas de tamaño en el rango de 1-3 micras.

Ejemplo 5a: Preparación General de Emulsiones Agua en Aceite Utilizando Extrusión Bajo de Corte

20 Este Ejemplo ilustra el proceso de la formación de emulsión w/o de péptidos catiónicos derivados de LHRH, IgE o inmunógenos CD4 o el complejo inmunoestimulador derivado de LHRH, IgE o inmunógenos CD4 y los oligonucleótidos CpG1 o CpG2 en diversas proporciones utilizando técnicas de extrusión. La Tabla 3 y la Tabla 4, muestran los cálculos generales para determinar las cantidades relativas de cada reactivo empleado. Un diagrama de flujo que ilustra el proceso de la formación de emulsión por medio de extrusión como se describe aquí se muestra en la Figura 3.

25 Todos los artículos de vidrio, barras de agitación y puntas de pipeta y el mecanismo extrusor completo se someten a autoclave durante 40 minutos a 121° C antes de uso. Todos los reactivos se pesan, se suministran, se transfieren o se agregan a los recipientes de reacción en una cámara de flujo laminar para evitar la contaminación.

30 El proceso de extrusión implica pasar repetidamente una fase acuosa cargada en una jeringa en una fase de aceite cargada en una segunda jeringa a través de un tubo con agujero angosto que une las dos jeringas. La emulsificación ocurre cuando los fluidos se conducen a través del agujero angosto bajo presión, típicamente 100 psi. En contraste, un sistema homogenizador típicamente opera a una presión que es mayor de 1,000 psi. El número de pasajes de regreso necesarios para el proceso de extrusión anterior frecuentemente excede 20 a 30 antes que se genera una emulsión w/o visualmente uniforme. Este proceso de extrusión manual no puede generar corte significativo y el número de intercambios requeridos para producir eficientemente una emulsión w/o es altamente variable. Las propiedades físicas de las emulsiones w/o son inconsistentes y la estabilidad general y posteriormente la potencia *in vivo* típicamente son altamente irreproducibles. A pesar de estos problemas, existe un número de posibles aplicaciones para los productos producidos por este proceso.

40 Para abordar estos inconvenientes se ha desarrollado un mecanismo extrusor (LiposoFast™ Basic, Avestin, Inc., Ottawa, Canadá). El dispositivo consiste de dos jeringas (0.5 mL o 1.0 mL) fijadas por medio de cerraduras luer con un pasaje de agujero angosto conectado a un soporte con una membrana de policarbonato de un tamaño de poro definido puesto entre las dos jeringas. El dispositivo como se designó originalmente es para la preparación de liposomas de un tamaño controlado.⁶³ Parece no haberse contemplado la aplicación de tal dispositivo con un producto con base en aceite compatible para la preparación de emulsiones w/o. Se puede seleccionar el tamaño de poro de membrana (Whatman Nucleopore, 0.05 µM - 10 µM). El tamaño de poro más pequeño permite la extrusión de dispersiones bajo corte aumentado. El tamaño de poro mayor se puede seleccionar para formular cuando las partículas son de tamaño más grande. Utilizando este dispositivo, se aumenta la eficiencia de emulsificación. Se requieren pocos pasajes de regreso para proporcionar un producto más uniforme y estable. Se predice que la potencia *in vivo* de tal preparación es más reproducible. Sin embargo, aún existen limitaciones debido al volumen máximo pequeño, c.a. 1.0 mL, que se puede emplear prácticamente y las restricciones prácticas en la elección del componente de aceite.

50 El proceso trabaja bien para la preparación de emulsiones w/o derivadas de ISA Montanide® 720. Sin embargo, las mayores viscosidades de las emulsiones derivado de ISA Montanide® 51 resulta en contrapresión significativa, que precluye el uso de este dispositivo de extrusión. Como tal, este método se puede ver mejor como un proceso para preparar emulsiones w/o actuales de aceites con viscosidades evidentes de menos de 1,500 mPa.

En particular, cuando los costes asociados con almacenamiento y estabilidad de las vacunas son de preocupación o cuando el cumplimiento del paciente es un problema o se implica la aplicación como una medicina paliativa, este método de suministro puede ser efectivo en costes y práctico. En forma ideal, los practicantes entrenados tales como doctores o farmacéuticos puedan confiar en la preparación de formulaciones w/o instantáneas en el sitio para uso general.

5

Se puede utilizar este dispositivo y protocolo para la preparación de microemulsiones o/w, y w/o/w instantáneas para las que se requieren corte controlado y extrusión, o para la preparación de productos refinados.

Ejemplo 5b: Preparación de Emulsiones Agua en Aceite de ISA Montanide® 720

10 A una jeringa de vidrio de 1.0 mL (hermética), se agrega 333 µg de LHRH, los inmunógenos de péptido IgE o CD4 disueltos en un regulador acuoso apropiado (111 µL, 3 mg/mL) o un complejo inmunoestimulador (con una relación de carga 4:1) preparada de 333 µg de los inmunógenos de péptido LHRH o IgE o un complejo inmunoestimulador (con una relación de carga 2:1) preparada de 333 µg de los inmunógenos de péptido CD4 disueltos en un solvente acuoso apropiado (111 µL, 3 mg/mL) y los oligonucleótidos CpG1 o CpG2 en relaciones apropiadas como se describe en las Tablas 3 y la Tabla 4, respectivamente.

15 Específicamente, para preparar el complejo inmunoestimulador de inmunógenos de péptido LHRH en una relación de carga de LHRH: CpG1 de 4:1, se agregan 29.3 µg de oligonucleótido CpG1 (12.2 µL, 2.0 µg/mL).

Para preparar el complejo inmunoestimulador de los inmunógenos IgE de péptido en una relación de carga de IgE:CpG1 de 4:1, se agregan 38.7 µg del oligonucleótido CpG1 (19.4 µL, 2.0 µg/µL) o para formar un complejo neutro 1:1 de IgE:CpG1, se agregan 154.8 µg del oligonucleótido CpG1 (77.4 µL, 2.0 µg/µL).

20 Para preparar el complejo inmunoestimulador de los inmunógenos de péptido CD4 en una relación de carga de CD4:CpG2 de 2: 1, se agregan 40 µg de CpG2 oligonucleótido (20 µL, 2.0 µg/µL) o para formar un complejo en una relación de carga de CD4:CpG2 de 1:2, se agregan 160 µg del oligonucleótido CpG2 (80 µL, 2.0 µg/µL).

Se agrega solvente acuoso de diluyente adicional de tal manera que el volumen final de la fase acuosa es 300 µL.

25 A una segunda jeringa de vidrio de 1.0 mL (hermética), se agrega 700 µL de ISA Montanide® 720. Las jeringas se conectan por medio de a una unidad de carcasa-extrusión que contiene un soporte de membrana y soporte para el filtro de membrana de policarbonato. Los filtros de membrana con tamaños de poro 3 µm o 5 µm se seleccionan para las emulsiones w/o que se van a preparar con los inmunógenos de péptido en la fase acuosa. Mientras que, los filtros de membrana con tamaños de poro 5 µm o 10 µm se seleccionan para la preparación de emulsiones w/o con el complejo inmunoestimulador suspendido en la fase acuosa. La fase acuosa luego se pasa primero a través de la membrana en la fase de aceite, típicamente con mayor facilidad. Los intercambios posteriores requieren presión adicional con la contrapresión aumentada generada durante los procesos de emulsión. Después de 8-12 pasajes se ha ecualizado la contrapresión luego de extrusión y se obtiene típicamente una emulsión blanca homogénea.

30

35 La concentración final de los inmunógenos una vez formulados como soluciones o como complejo inmunoestimulador en emulsiones agua en aceite como se describió anteriormente es 200 µg/mL.

Ejemplo 5c: Evaluación de Estabilidad para Emulsiones Agua en Aceite Preparadas mediante Extrusión

40 Las pruebas de estabilidad similares a aquellas conducidas en el Ejemplo 4c, preparadas mediante los procesos de extrusión confirman que estas composiciones son emulsión w/o. Se observa que las gotas puestas sobre la superficie del agua desionizada destilada flotan con mínima dispersión. Las viscosidades de las emulsiones resultantes se encuentra que varían de -35-40 mPa, una ligera reducción cuando se compara con el sistema homogenizado de alta energía en el Ejemplo 4c. La distribución del tamaño de la gota de emulsión es mayor que los sistemas homogenizados análogos. Aproximadamente 1-3 micras para emulsiones w/o preparadas de inmunógenos de péptido o 2-5 micras para emulsiones w/o preparadas de complejo inmunoestimulador. Para comparación, la Figura 5 es una microfotografía obtenida de una muestra de emulsión w/o preparada por medio de la extrusión de ISA Montanide® 720 y un complejo inmunoestimulador derivado de 200 µg de inmunógenos del péptido LHRH y los oligonucleótidos CpG1 en una relación de carga final de LHRH:CpG1 de 4:1.

45

50 En general, el tamaño de las gotas obtenidas por el proceso de extrusión de baja energía como se muestra en la Figura 5 es mayor y más altamente agregado que la alta energía de las gotas homogenizadas como se muestra en la Figura 4. En general, estas emulsiones instantáneas w/o son suficientemente estables para uso diario igual o inmediato.

Ejemplo 6a: Preparación de Geles Poliméricos In-situ

- Este Ejemplo ilustra el proceso de formación de matriz de gel *in-situ* y encapsulación del complejo inmunoestimulador derivado de IgE o inmunógenos CD4 y oligonucleótidos CpG1 o CpG.2 en diversas proporciones utilizando técnicas de reconstitución directa. Un diagrama de flujo que muestra el proceso para preparar una formulación en gel *in-situ* con inmunógenos de péptido o complejo inmunoestimulador por medio de reconstitución como se describe aquí se muestra en la Figura 6.
- 5
- Todos los artículos de vidrio, barras de agitación y puntas de pipeta se someten a autoclave durante 40 minutos a 121° C antes de uso. Todos los reactivos se pesan, se suministran, se transfieren o se agregan a los recipientes de reacción en una cámara de flujo laminar para evitar la contaminación.
- 10
- En general, varios porcentajes en peso de los copolímeros PLG o PDGA (Boehringer Ingelheim) se disuelven en solventes biocompatibles tales como dimetil sulfóxido anhidro (DMSO, Aldrich). El proceso de solubilización requiere agitación vigorosa para polímeros de mayor peso molecular con agitación continua mantenida durante 4-6 horas para asegurar la disolución completa. La solución de polímero luego se filtra a través de una membrana compatible con el solvente orgánico de tamaño de poro de 0.45 micras (Phenomenex, PTFE). A esto se agrega una solución de
- 15
- los inmunógenos de péptido catiónico o más preferiblemente una suspensión del complejo inmunoestimulador en un solvente biocompatible apropiado. El inmunógeno de péptido o complejo de péptido/ CpG o una mezcla de los mismos primero se liofiliza (como se describe en el Ejemplo 3) y posteriormente se disuelve o se resuspende en un solvente biocompatible apropiado, tal como DMSO.
- 20
- El uso de solventes apróticos polares, tales como DMSO, puede presentar algunos problemas con respecto a la estabilidad del péptido a largo plazo. Se sabe que el DMSO es un agente oxidante poderoso y los péptidos que contienen aminoácidos sensibles tales como cisteína y triptofán pueden ser químicamente incompatibles en estas soluciones. Así, los inmunógenos de péptido que contienen estos residuos se pueden haber reconstituido en el sitio para uso inmediato.
- 25
- Los inmunógenos de péptido liofilizados o el complejo inmunoestimulador o una mezcla de los mismos se reconstituye directamente en el frasco en una solución de polímero en DMSO al momento de uso, evitando por lo tanto la exposición prologada de los inmunógenos de péptido a DMSO. La disolución del inmunógeno de péptido o la resuspensión del complejo inmunoestimulador o una mezcla del complejo inmunoestimulador con inmunógenos de péptido es rápida, lo que requiere agitación gentil para asegurar la uniformidad de la muestra.
- 30
- Existe estabilidad mínima y problemas de fabricación esperados por estas composiciones genéticas. Las soluciones de polímero en DMSO anhidro no son susceptibles a la degradación hidrolítica cuando se compara con inmunógenos de péptido disueltos o suspendidos en soluciones acuosas. La solución de polímero se puede congelar (DMSO se congela a c.a. 18° C) sin cambios detectables en las propiedades físicas luego de descongelamiento. El péptido o complejo inmunoestimulador aislado en el estado seco liofilizado se esperaría que exhiba la estabilidad aumenta en la ausencia de agua.
- 35
- La mezcla de polímero e inmunógenos de péptido o complejo inmunoestimulador como tal constituye una solución de fase única o una suspensión adecuada para inyección subcutánea o intramuscular.
- De importancia para cualquier sistema es la viscosidad de la solución o suspensión. Esto influencia directamente la capacidad de la jeringa e inyectar las composiciones mediante una ruta subcutánea o intramuscular.
- 40
- La viscosidad evidente de estos sistemas es una función de diversos factores que incluyen la constitución, peso molecular, cristalinidad y viscosidad intrínseca de los copolímeros PLG o PLGA. Estos factores delimitan la cantidad útil por peso para cada polímero que se puede disolver mientras se mantienen las características prácticas de flujo. La Tabla 5 muestra las propiedades físicas para los polímeros PLG o PLGA seleccionados y la cantidad correspondiente en porcentajes en peso que se pueden disolver en DMSO para obtener las viscosidades de la solución de uso práctico. La viscosidad evidente de estas soluciones se determina mediante un viscosímetro
- 45
- rotacional Brookfield DV-1+.
- Se selecciona arbitrariamente 100 mPa como el límite superior deseado para estas composiciones. En la mayoría de los casos una solución o suspensión formulada como una solución de polímero gelificante *in situ* con una viscosidad evidente de menos de 200 mPa se puede suministrar uniformemente a través de jeringas convencionales.
- 50
- Una solución de polímero/DMSO con polímero a solvente en exceso del que se requiere para proporcionar una viscosidad evidente de 100 mPa sería un valor para el suministro mediante una modalidad alternativa, que incluye métodos de jeringa o de aguja convencionales. El comportamiento gelificante luego de inyección y la liberación de ráfaga del inmunógeno se relaciona en parte con la concentración del polímero en la composición. Posteriormente,

maximizar el índice de gelificación y reducir la liberación de ráfaga del inmunógeno sería dos parámetros de diseño adicionales para consideración en el desarrollo de una composición de liberación controlada de única dosis opcional.

Ejemplo 6b: Preparación de Geles de Polímeros de PLGA Resomer®-RG 503H o RG 504H

5 A dos matraces de 25 mL separados equipados con barras de agitación se agrega 2,200 mg de RG 504H o 2,750 mg de RG 503H respectivamente. A cada matraz se agrega 10.0 mL de DMSO anhidro (1.1 gm/mL) mediante pipeta de transferencia. Las mezclas se agitan vigorosamente durante c.a. 2-3 horas a temperatura ambiente después de lo cual los copolímeros se solubilizan completamente. Después que se completa la disolución las soluciones patrón se filtran a través de un filtro de membrana estable de solvente orgánico 0.45 µM (Phenomenex, PTFE). El porcentaje en peso final del polímero RG 504H y RG 503H al solvente DMSO es 20 % y 25 % respectivamente.

10 Luego se agrega 10 mL de la solución de polímero/DMSO así preparada por medio de jeringa en frasco que contienen inmunógenos de péptido IgE o CD4 liofilizados (2,000 µg) o el complejo inmunoestimulador liofilizado (relación de carga 4:1 IgE:CpG1 o relación de carga 2:1 CD4:CpG2) derivado de 2,000 µg de los péptidos IgE mezclados con 232 µg del oligonucleótido CpG1 (116 µL, 2.0 µg/µL) o 2,000 µg de los péptidos CD4 mezclados con 241 µg del oligonucleótido CpG2 (120.5 mL, 2.0 µg/µL). La concentración final del inmunógeno en la solución o en la
15 forma de un complejo inmunoestimulador en suspensión es 200 µg/mL. El inmunógeno o complejo inmunoestimulador se reconstituye inmediatamente en la solución o suspensión con agitación gentil para asegurar uniformidad en el contenido.

Las viscosidades evidentes de las soluciones preparadas de estos polímeros en las relaciones en peso especificadas se encuentran cerca de 100 mPa. (ver Tabla 5). Las concentraciones para Resomer® RG 503H, Resomer® RG 504H y Resomer® RG 756 para una viscosidad de la solución de alrededor de 100 mPa son críticas, Resomer® RG 503H y Resomer® RG 504H tienen viscosidades inherentes mucho menores y ambos se derivan de PLGA con carácter amorfo, en donde la composición de monómero está alrededor de 50 % de D,L-lacturo y 50 % de glicolida. Se esperaría que estos materiales degraden en un índice de 6-8 semanas para 50 % del polímero in vivo. Así, los componentes encapsulados tienen un perfil de liberación de dos a tres meses con geles preparados de Resomer®RG503H o Resomer®RG504H. Los geles preparados de estos materiales serían más adecuados para aplicaciones de liberación controlada de dosis única a corto plazo. Por el contrario, Resomer® RG 756 es un polímero más cristalino compuesto de residuos de 75 % de D,L-lacturo a 25 % de glicolida. Esto puede requerir de 4-6 meses para 50 % del polímero para degradar in vivo y el índice de liberación para los componentes encapsulados sería posteriormente más prolongada. Se esperaría que el Resomer® RG 756 sea más deseable para
30 aplicaciones de liberación controlada de dosis única a largo plazo.

Ejemplo 7: La Inmunogenicidad de los Inmunógenos IgE y CD4 de péptido Formulados como el Complejo inmunoestimulador o como Emulsión w/o o en Combinaciones

Este Ejemplo ilustra la inmunogenicidad de los inmunógenos de péptido IgE y C4 formulados como complejos inmunoestimuladores con oligonucleótidos CpG1 o CpG2, como una emulsión w/o o como el complejo
35 inmunoestimulador disperso en una emulsión w/o en conejillos de indias, que se inmunizan intramuscularmente.

Las emulsiones w/o se preparan mediante homogenización como se describe en el Ejemplo 4a/4b o mediante extrusión como se describe en el Ejemplo 5a/5b.

Los grupos de tres, conejillos de indias hembra de 6 a 8 semanas de edad (Covance Research Products Inc., Denver, PA) se inmunizan intramuscularmente (I.M.) en la semana 0, 3 y 6 con las siguientes composiciones: 100 µg de los péptidos IgE /CpG1 del complejo inmunoestimulador (relación de carga 4:1 y relación de carga 1:1) preparado como se describe en la Tabla 4 suspendido en un volumen final de 250 µL de PBS, pH 7.4; los péptidos CD4/CpG2 de complejos inmunoestimuladores (relación de carga 2:1 y relación de carga 1:2) preparados como se describe en la Tabla 4 en 75 µL suspendido en un volumen final de 250 µL de PBS, pH 7.4; los péptidos IgE en 75 µL de PBS, pH 7.4 emulsificados con ISA Montanide® 720 (175 µL); los péptidos CD4 en 75 µL de agua desionizada destilada emulsificada con ISA Montanide® 720 (175 µL); péptido IgE /CpG1 complejo inmunoestimulador en 75 µL de PBS, pH 7.4 preparado como se describe en la Tabla 4 (relación de carga 4:1 y relación de carga neutra 1:1) emulsificado con ISA Montanide® 720 (175 µL), o los péptidos CD4/CpG2 de complejo inmunoestimuladores preparados como se describe en la Tabla 4 en 75 µL de agua desionizada destilada (relación de carga 2:1 y relación de carga 1:2) emulsificada con ISA Montanide® 720 (175 µL).

50 Los conejillos de indias no muestran lesiones macroscópicas o cambios en el comportamiento después de recibir los complejos inmunoestimuladores, emulsiones w/o que contienen inmunógenos de péptido o emulsiones w/o que contienen los complejos inmunoestimuladores. Se obtienen sueros en las semanas +3, +5, +9, +11 y +17 y se evalúan para la presencia de anticuerpos anti-IgE en el caso de inmunógenos IgE o anticuerpos anti-CD4 en el caso de inmunógenos CD4, mediante ELISA específicas de inmunógeno.

Medición de anticuerpos anti-IgE

Se determinan los títulos de péptido anti-IgE mediante el ELISA de péptido IgE y las reactividades cruzadas para el IgE humano mediante el IgE ELISA humano. Los péptidos ELISA para la determinación de la reactividad del péptido anti-IgE se conducen en placas de microtítulo cubiertas con el péptido de sitio de antígeno objetivo sin el sitio cooperador T, como se describe⁶⁴. Para la determinación de la reactividad cruzada anti-humana de IgE, los ELISA IgE humano se conducen en placas de microtítulo cubiertas en forma similar con una proteína humana de mielanoma IgE (American Biosystems, Inc. cat. no. A113) a 5 µg/ml.

Se detectan anticuerpos anti-péptido o anti-IgE capturados mediante el anti-anticuerpo de cabra IgG de conejillo de indias marcado con peroxidasa de rábano. Los títulos ELISA, expresados como log₁₀ de dilución recíproca, se calculan con base en análisis de regresión lineal de las absorbancias, con corte A₄₉₂ establecido a 0.5. Este valor de corte es riguroso, como los valores para las muestras de control de conejillos de indias diluidos normales que corren con cada ensayo son menos de 0.15. Se utiliza antisuero de inmunógeno de péptido anti-IgE de conejillos de indias hiperinmunes como un control positivo. El suero preinmune se utiliza como controles negativos.

Medición de Anticuerpos anti-CD4

Los ELISA para la unión a CD4 recombinante soluble se hacen en placas de microtítulo de 96 pozos recubiertas con rsCD4 (American BioTechnologies) a 0.25 µg/mL, utilizando 100 µL por pozo en regulador de NaHCO₃ 10mM, pH 9.5. Los pozos se bloquean con 250 µL de 3 % de gelatina, se lavan con 0.05 % de TWEEN 20 en solución salina regulada con fosfato (PBS) y se secan. Los pozos de prueba se hacen reaccionar con 100 µL de suero inmune diluido durante 1 hora a 37 C. Los pozos se lavan con 0.05 % de TWEEN 20 en PBS, se hacen reaccionar con 100 µL de IgG antiratón de cabra marcado con peroxidasa de rábano (Pierce) diluido 1:1000 en 1 % de suero de cabra, 0.05% de TWEEN@20 en PBS, y se lavan. Se agrega 100 µL del sustrato ortofenilenodiamina (OPD) a 0.04 % en peso (Pierce) y 0.12 % de H₂O₂ en regulador de citrato de sodio, pH 5.0, durante 15 minutos. Las reacciones se detienen mediante la adición de 100 µL de H₂SO₄ 1.0 M y se determina A₄₉₂. Se utiliza antisuero de inmunógeno de péptido anti-CD4 de conejillos de indias hiperinmunes como un control positivo. Se utilizan suero preinmune como control negativo.

Medición de Antigenicidad Funcional mediante ELISA Competitivos

En este ELISA competitivo, se cuantifica la antigenicidad funcional para los inmunógenos CD4 al probar los anticuerpos evocados para la capacidad de inhibir competitivamente un anticuerpo monoclonal funcional, mAb 84, cuya especificidad conocida es para el complejo CD4 en la superficie de la célula anfitriona que une HIV. Este anticuerpo monoclonal de sitio anti-unión es bien caracterizado por su alta afinidad para el complejo de unión HIV, para la unión al dominio 1 del CD4 soluble recombinante (rsCD4), y por su capacidad de neutralizar los aislados principales HIV-1.⁶⁵

El anticuerpo monoclonal de anti-unión a sitio se purifica mediante cromatografía de afinidad de proteína A y conjugado con peroxidasa de rábano. El conjugado mAb B4-HRP se utiliza en el ensayo como un trazador, en una concentración de 0.5 mg/ml. Se recubren las placas de microtítulo de 96 pozos con la proteína recombinante soluble CD4, 1 µg/ml en regulador de carbonato de sodio 0.1 M, pH 9.5, con incubación durante la noche. Se hacen reacciones en los pozos en microtítulo en 100 µl de volumen total de PBS/suero de cabra/gelatina/TWEEN@ 20, con suero inmune serialmente diluido (conejillos de indias, cerdo, o babuino) y 30 µl de la solución patrón de trabajo mAb B4-HRP. El suero diluido y el mAb B4-HRP se preincuban antes de agregar la mezcla al pozo. El control positivo para la competición ELISA es 5 µl del mAb del sitio de anti-unión no marcado a 0.5 µg/ml en suero normal, el control negativo es suero normal. La mezcla de dilución de suero/anticuerpo, se agrega 100 µl a un pozo cubierto y se incuba durante una hora a 37°. Las placas se drenan y se lavan y el mAb B4-HRP vinculado se detecta mediante reacción con un cromógeno. El cromógeno es 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y se detecta el conjugado TMB-mAb B4 unido a A₄₅₀. Se obtiene una curva de calibración con mAb B4 purificado serialmente diluido de 10 µg/ml en suero normal de las especies apropiadas con el fin de obtener un valor equivalente mAb para las diluciones de suero inmune que inhiben competitivamente la unión al C4 recombinante soluble humano del mAb B4-HRP.

Ensayo de Neutralización de Virus

El ensayo de microplaca MT-2 se lleva a cabo como se describe⁶⁶ excepto que el suero inactivado por calor se diluye serialmente en 50 % de DMEM alto en glucosa con 15 % de FBS, antibióticos, 2 % de glutamina y regulador de bicarbonato, y 50 % pooled, plasma humano normal defibrinado. En este ensayo, se incuba suero diluido con 20 pfu de HIV en pozos de microtítulo. Se agregan células MT-2 sensibles a HIV y se forman en monocapas mediante fuerza centrífuga bajo agarosa fundida. Se detecta infectividad de virus residual mediante la presencia de placas teñidas con yoduro de propidio una semana después. El punto final es la dilución en suero en la existe 50 % o 90 % de reducción en el conteo de placas.

Resultados de Inmunogenicidad

5 Los títulos de anticuerpo de suero luego de inmunización de los inmunógenos IgE se muestran en la Figura 7 (sistemas homogenizados) y la Figura 9 (sistemas extrudidos) y para los inmunógenos CD4 se muestran en la Figura 8 (sistemas homogenizados) y la Figura 10 (sistemas extrudidos). La Tabla 6 compara la inhibición competitiva de un anticuerpo B4 monoclonal evaluado en suero obtenido del estudio de péptido CD4 (sistemas de emulsión homogenizada y extrudida w/o) en la semana 9, semana 11 y semana 17, respectivamente. LKa Tabla 7 compara la actividad de neutralización de virus (50 % y 90 % de inhibición respectivamente) evaluada en suero obtenido del estudio de péptido CD4 (sistemas de emulsión homogenizada y extrudida w/o) en la semana 9 y semana 11, respectivamente. Los experimentos de control demuestran que el péptido no adyuvado no es
10 inmunogénico o débilmente inmunogénico en todos los casos.

Para las vacunas IgE y CD4, los resultados de las inmunizaciones indican que los complejos inmunoestimuladores se adyuvantan y los títulos en la semana 9 son ligeramente menores de o comparables con aquellos obtenidos con emulsiones w/o, independiente de si las emulsiones se preparan por las técnicas de homogenizado o extrudido como se muestra en las Figuras 7-10.

15 Los sistemas de combinación con el complejo inmunoestimulador disperso como emulsiones w/o preparadas por el método consistentemente proporcionan las respuestas inmunes sostenidas mayores. Como se describe en las Figuras 7-10, los títulos de anticuerpos provocados de la semana 11 a la semana 17, para los inmunógenos IgE y CD4 se encuentra que son del orden de una unidad log o los títulos de anticuerpo mayores obtenidos con el complejo inmunoestimulador solo o las emulsiones w/o con péptido solo. La única excepción de esto es las emulsiones w/o CD4 preparadas mediante homogenización, cuando esta separación no se encuentra en la semana
20 17.

Esta observación se soporta adicionalmente por los datos obtenidos de la inhibición competitiva del péptido CD4 y los estudios de neutralización de virus destacados en las Tablas 6 y 7, en donde el suero inmune para los sistemas de combinación de emulsión w/o con el péptido CD4 / oligonucleótidos CpG (relación de carga CD4:CpG2 = 2:1) inhibe competitivamente el nivel mayor de anticuerpo B4 monoclonal comparado con el suero inmune para las emulsiones w/o simples o el complejo inmunoestimulador con los péptidos CD4 solos. Más aún, las mismas formulaciones se muestra que son más efectivas en provocar la actividad neutralizante contra el virus infeccioso.
25

Se notan diferencias pequeñas entre las preparaciones homogenizadas o extrudidas e incluyen el índice con el cual los títulos provocados por los inmunógenos IgE o CD4 obtenidos por ELISA se observan en su punto máximo. Las respuestas inmunes alcanzan su punto máximo más antes (semana 9) para las emulsiones w/o extrudidas, aunque la duración de las respuestas obtenidas es buena (esencialmente equivalente en la semana 11 y ligeramente reducido en la semana 17). El sistema homogenizado homólogo alcanza su punto máximo un poco después (semana 11) y proporciona respuestas sostenidas como se puede ver mediante los altos títulos que persisten en la semana 17.
30

35 Este intento también está soportado por los datos obtenidos del ensayo de inhibición competitivo de péptido CD4 /mAb B4-HRP y los estudios de neutralización de virus se destacan en las Tablas 6 y 7.

En la semana 9, los ensayos en suero obtenidos de animales inmunizados por el sistema de emulsión w/o preparado de los péptidos CD4 no complejados por medio de homogenización (87.2 %) o mediante extrusión (88.6 %) se ha mostrado que inhiben competitivamente altos niveles del anticuerpo monoclonal B4. Se encuentra que estos son del mismo orden de magnitud (dentro del error experimental) como para el suero obtenido de animales inmunizados con los sistemas de combinación de emulsión w/o de péptido CD4/ oligonucleótidos CpG2 (2:1) preparados por medio de homogenización (70.1 %) o mediante extrusión (94.9 %). En la semana 17, los ensayos en suero obtenidos de animales inmunizados por el sistema de emulsión w/o preparado de los péptidos CD4 no complejados por medio de homogenización (11.2%) o mediante extrusión (42.6 %) inhibe competitivamente
40 dramáticamente niveles inferiores del anticuerpo B4 monoclonal. El grado de inhibición no es más largo de manera general comparable con aquellos obtenidos del suero de animales inmunizados con los sistemas de combinación de emulsión w/o del péptido CD4/ oligonucleótidos CpG2 (2:1) preparados por medio procesos de homogenización (85.0 %) o mediante extrusión (77.2 %).
45

Más aún, se muestra el mismo intento para el suero obtenido de formulaciones de los péptidos CD4 cuando se evalúa para neutralización del virus infeccioso VIH-1.
50

En la semana 9, los ensayos en suero obtenidos de animales inmunizados por el sistema de emulsión w/o preparado de los péptidos no complejados CD4 por medio de homogenización (73 % para 50 % de neutralización de virus o 27 % para 90 % de neutralización de virus) o mediante extrusión (31 % para 50 % de neutralización de virus o 12 % para 90 % de neutralización de virus) neutralizado esencialmente en los mismos porcentajes de virus infeccioso de VIH -1 (dentro del error experimental). Los ensayos en suero obtenidos de animales inmunizados con
55

los sistemas de combinación de emulsión w/o del péptido CD4/ oligonucleótidos CpG2 (2:1) preparados por medio de homogenización (12 % para 50 % de neutralización de virus o < 10 % para 90 % de neutralización de virus) o mediante extrusión (103 % para 50 % de neutralización de virus o 33 % para 90 % de neutralización de virus) ha mostrado que el sistema homogenizado es significativamente menos efectivo en generar anticuerpos neutralizantes contra el virus infeccioso de VIH-1 en este punto de tiempo. En la semana 11, los ensayos en el suero obtenido de los animales inmunizados por el sistema de emulsión w/o preparado de los péptidos CD4 no complejados, mediante homogenización (57 % para 50 % de neutralización de virus o 17% para 90 % de neutralización de virus) o mediante extrusión (< 10 % para 50 % de neutralización de virus o < 10% para 90 % de neutralización de virus) demuestra que la capacidad para neutralizar el virus infeccioso de VIH-1 se reduce o elimina (dentro del error experimental). Los ensayos en suero obtenidos de animales inmunizados con los sistemas de combinación de emulsión w/o del péptido CD4/ oligonucleótidos CpG (2:1) preparados por medio de homogenización (40% para 50 % de neutralización de virus o 30% para 90 % de neutralización de virus) o mediante extrusión (120% para 50 % de neutralización de virus o 39% para 90 % de neutralización de virus) ha mostrado claramente que los sistemas homogenizados y extrudidos ahora son efectivos en provocar respuestas de anticuerpo neutralizantes contra VIH infeccioso. La respuesta para el sistema homogenizado se muestra que se retrasa con relación a la composición extrudida.

Una posible explicación para estas tendencias puede ser que las emulsiones w/o preparadas por medio de procesos de extrusión de energía baja pueden interactuar o presentar inmunógenos complejados más efectivamente en puntos de tiempo más tempranos a las células efectoras inmunes, mientras que el proceso de homogenización de alta energía, proporciona una emulsión más uniforme y actúa esencialmente como un depósito más eficiente. Las respuestas inmunes obtenidas mediante tal sistema se anticiparían para ser retrasadas y potencialmente más sostenibles.

La combinación del complejo inmunoestimulador y los péptidos residuales no complejados dispersos en emulsiones w/o se encuentra que mejoran sinérgicamente los títulos generales para los inmunógenos IgE y CD4. El método de preparación puede influenciar las cinéticas y la duración de las respuestas, con homogenización y extrusión que muestra es compatible para preparar una vacuna eficaz.

Adicionalmente, en un estudio separado examinamos el efecto de la dosis CpG en las respuestas inmunes. Para los inmunógenos IgE y CD4, los complejos inmunoestimuladores se preparan de diversas dosis de oligonucleótidos CpG1 o CpG2 (es decir IgE:CpG1 = 4:1 o 1:1 y CD4:CpG2 = 2:1 o 1:2) y administradas en un regulador acuoso o se dispersan en una emulsión w/o. Se encuentra que todas las composiciones son inmunogénicas, sin embargo, en ambos estudios la dosis relativa de oligonucleótido (exceso de inmunógeno de péptido sintético a oligonucleótido) provoca respuestas inmunes superiores en términos de título absoluto y de duración. En el caso de péptidos IgE / oligonucleótidos CpG1 la clasificación sigue el orden relación de carga 4:1 > relación de carga neutra 1:1 mientras que para los péptidos CD4/ oligonucleótidos CpG2 la clasificación sigue el orden relación de carga 2:1 > relación de carga 1:2. Más frecuentemente la adyuvancia mejorada se puede correlacionar con dosis aumentadas de adyuvantes. En estos Ejemplos, demostramos que las ventajas inesperadas de co-formular el complejo inmunoestimulador estabilizado y el péptido no complejado para máxima sinergia de las respuestas inmunes.

Así, se puede concluir que el complejo inmunoestimulador preparado de los inmunógenos IgE o CD4 como se describe en este Ejemplo puede adyuvantar efectivamente las respuestas inmunes in vivo. Las respuestas obtenidas son comparables con aquellas encontradas en los mismos inmunógenos dispersos en emulsiones w/o, sin embargo, se anticipa que pocos problemas de reactividad resultarían de uso del complejo inmunoestimulador dispersable completamente acuoso de inmunógenos sintéticos cuando se opone a dispersar inmunógenos sintéticos como emulsiones w/o.

En este Ejemplo demostramos que el suministro de los inmunógenos IgE o CD4 como complejos inmunoestimuladores en combinación con péptidos no complejados dispersos dentro de un vehículo emulsión agua en aceite que proporcionan presentación más efectiva de inmunógeno al sistema inmune. Las respuestas inmunes obtenidas para el sistema combinado son significativamente mayores que la suma de las respuestas inmunes obtenidas para cada sistema independientemente.

Adicionalmente, los ensayos de suero obtenidos de animales inmunizados con combinaciones de complejo inmunoestimulador de inmunógenos CD4 e inmunógenos CD4 no complejados dispersados dentro de un vehículo de emulsión agua en aceite se muestra que son más efectivos que las emulsiones w/o simples de los inmunógenos CD4 no complejados al inhibir competitivamente el anticuerpo B4 monoclonal. Más aún estos mismos sistemas se muestra que son más efectivos en neutralizar el virus infeccioso de VIH- 1.

En el modelo de conejillos de indias, la cantidad y longevidad de las respuestas inmunes obtenidas indica que el complejo inmunoestimulador derivado de IgE/CpG1 y se prefieren combinaciones de CD4/CpG2. Se determina experimentalmente que las composiciones derivadas de los pares alternativos de IgE/CpG2 y CD4/CpG1 se adyuvantan, aunque no al mismo grado.

La posibilidad de pocos y menores regímenes de dosificación (inmunógeno/adyuvante) se indica por estos resultados. En casos donde la reactogenicidad es un problema el sistema de combinación abre la posibilidad de administrar un volumen más pequeño de emulsión con niveles similares o mayores de inmunogenicidad.

5 Específicamente, este Ejemplo indica fuertemente el potencial de estas nuevas formulaciones basadas en combinación para el desarrollo como formas de dosificación eficaces.

Ejemplo 8: La Inmunogenicidad de Inmunógenos de Péptido IgE y CD4 Formulados como el Complejo inmunoestimulador o como Soluciones del Polímero Gelificante *In-situ* o en Combinaciones

10 Este Ejemplo ilustra la inmunogenicidad de inmunógenos de péptido IgE y CD4 formulados como el complejo inmunoestimulador con oligonucleótidos CpG1 o CpG2 o como polímeros gelificantes *in-situ* y solventes biocompatibles o como el complejo inmunoestimulador suspendido en polímeros gelificantes *in-situ* y solventes biocompatibles en conejillos de indias, que se inmunizan intramuscularmente. Los inmunógenos de péptido liofilizados o el complejo inmunoestimulador derivado de inmunógenos de péptido y los oligonucleótidos CpG se preparan como se describe en el Ejemplo 3.

Los polímeros gelificantes *in-situ* se preparan como se describe en el Ejemplo 6a/6b.

15 Para examinar la inmunogenicidad de IgE y los inmunógenos de péptido C4 formulados como polímeros gelificantes *in-situ* (Resomer® RG 504H) o como complejos inmunoestimuladores con oligonucleótidos CpG1 o CpG2 suspendidos en polímeros gelificantes *in-situ* (Resomer® RG 504H) formado de acuerdo con la presente invención, grupos de tres, conejillos de indias hembra de 6 a 8 semanas de edad (Covance Research Products Inc, Denver, PA) se inmunizan intramuscularmente (I.M.) con las siguientes cantidades de inmunógeno en la semana 0: 300 µg de los péptidos IgE / complejo inmunoestimulador CpG1 inmunizado (relación de carga 4: 1) se reconstituyen y se suspenden en un volumen final de 200 µL de PBS (pH 7.4), preparados como se describe en la Tabla 4, o 300 µg de los péptidos CD4/ complejo inmunoestimulador CpG2 (relación de carga 2:1) reconstituidos y suspendidos en un volumen final de 200 µL de PBS (pH 7.4), preparado como se describe en la Tabla 4, o 300 µg de los péptidos IgE reconstituidos y suspendidos en 200 µL de Resomer® RG 504H (20 % en peso) disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) o 300 µg de los péptidos CD4 reconstituidos y suspendidos en 200 µL de Resomer® RG 504H (20 % en peso) disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) o 300 µg de los péptidos IgE / complejo inmunoestimulador CpG1 liofilizados (relación de carga 4:1), preparado como se describe en la Tabla 4, reconstituido y suspendido en 200 µL de Resomer® RG 504H (20 % en peso) disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) o 300 µg de los péptidos CD4/ complejo inmunoestimulador CpG2 liofilizados (relación de carga 2:1), preparados como se describe en la Tabla 4, reconstituidos y suspendidos en 200 µL de Resomer®RG504H (20 % en peso) disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO).

Los conejillos de indias no muestran lesiones macroscópicas o cambios de comportamiento después de recibir el complejo inmunoestimulador, polímeros gelificantes *in-situ* en DMSO que contienen inmunógenos de péptido o polímeros gelificantes *in-situ* en DMSO que contienen el complejo inmunoestimulador. Se obtienen sueros en las semanas +3, +6, +9, +12 y se evalúan para la presencia de los anticuerpos anti- IgE en el caso de inmunógenos IgE o anticuerpos anti-CD4 en el caso de inmunógenos CD4, mediante ELISA específicas de inmunógeno siguiendo los procedimientos descritos en el Ejemplo 7.

Resultados de Inmunogenicidad

40 Los títulos de anticuerpo de suero luego de inmunización de dosis única de los inmunógenos IgE se muestran en la Figura 11 y para los inmunógenos CD4 se muestran en la Figura 12. Los experimentos de control demuestran que el péptido no adyuvado no es inmunogénico o débilmente inmunogénico en cada caso. En ambos estudios, los resultados de las inmunizaciones indican que el complejo inmunoestimulador solo se adyuvante moderadamente con los títulos que alcanzan su punto máximo en la semana 9. Por el contrario, los inmunógenos no complejados suspendidos en polímeros gelificantes *in-situ* también se adyuvantan débilmente con respuestas pico observadas en la semana 12.

45 Para los inmunógenos IgE y CD4, los complejos inmunoestimuladores derivados suspendidos como un polímero gelificante *in situ* provoca las respuestas inmunes mayores. Se ve que estas respuestas alcanzan su punto máximo alrededor de la semana 9 y son sostenibles a través de la semana 12. La cantidad y duración de las respuestas inmunes obtenidas no se encuentra con el complejo inmunoestimulador solo o con inmunógenos no complejados administrados en una composición que incluye el polímero gelificante *in-situ* solo.

50 Se espera que los inmunógenos de peso molecular pequeño tales como los péptidos se puedan difundir fácilmente a través de implantes de polímero y geles que resultan en grandes cantidades de liberación en ráfaga luego de inyección. Los factores físicos que controlan la gelificación se pueden ajustar para retardar este proceso; sin embargo, la masa de péptido así liberado es esencialmente no adyuvado y se somete a los procesos de degradación estándar que se experimentan normalmente *in vivo*. Adicionalmente, las cantidades pequeñas de

material restante encapsulado no se puede esperar que sean suficiente para un refuerzo eficiente una vez el polímero se degrada, necesitando dosis mucho más grandes de péptido. El DMSO residual atrapado dentro de la matriz también presenta problemas de estabilidad, en donde los aminoácidos sensibles contenidos en los péptidos se pueden oxidar. Adicionalmente se establece bien que el agua puede penetrar estos materiales en índices que varían dependiendo de diversos factores tales como micromorfología de gel, hidrofobicidad de polímero y cristalinidad^{45, 46}. El agua que penetra la matriz promoverá hidrólisis de masa, el mecanismo de degradación de cebado que opera en los copolímeros PLG/PLGA *in vivo*. Este proceso se conoce por estar acompañado por cambios dramáticos locales en el pH, que puede reducir esencialmente el pH a 2 o 367. Los péptidos solubilizados no complejados libres no pueden ser estables en tal ambiente, y esto limita adicionalmente el potencial para estos sistemas. Los agentes reguladores de ácido se pueden emplear para ayudar a contrarrestar estos problemas, pero no se puede considerar ideal. Encapsular una suspensión de inmunógenos de péptido en la forma de un complejo inmunoestimulador imparte un número de ventajas de estabilidad y adyuvantación para este sistema. Una vez se hace inyección de gel de polímero, las cantidades pequeñas del complejo no se encapsulan efectivamente en el gel (presumiblemente la superficie ubicada cerca al frente gelificante) puede servir para iniciar o cebar la respuesta inmune más efectivamente que inmunógeno de péptido no complejado solo. El oligonucleótido CpG permanece en contacto cercano con el inmunógeno de péptido y en la forma de un particulado complejo puede proteger adicionalmente y estabilizar el inmunógeno de péptido de digestión enzimática *in vivo* o de inestabilidades químicas que se pueden deber al solvente DMSO contenido dentro de la matriz.

Adicionalmente, los inmunógenos de péptido permanecen atrapados en la matriz en una forma particulada se esperaría que proteja mejor contra el proceso de acidificación que los péptidos no complejados libres. Se puede esperar que los inmunógenos presentados en esta forma proporcionen un refuerzo más eficiente de inmunógeno al sistema inmune que provoca respuestas inmunes finales más fuertes y más largas que de otra forma posibles en una formulación de liberación controlada de dosis única.

En los experimentos de control, se determina que las soluciones de inmunógenos de péptido no complejados disueltos en composiciones de polímero de RG 504H (20 % en peso) en DMSO gelificado rápidamente cuando se pone en contacto con soluciones de PBS. Separar la solución de la fase de gel para estas muestras y analizar las soluciones mediante espectroscopía ultravioleta (at $\lambda = 280$ nm) revela que las cantidades importantes del péptido no complejado (c.a. 50-70 %) se co-extraen con el DMSO.

La combinación del complejo inmunoestimulador y los inmunógenos de péptido no complejados suspendidos en polímeros gelificantes *insitu* se ha encontrado que mejora sinérgicamente los títulos generales para los inmunógenos IgE y CD4 en estas preparaciones de liberación controlada.

Un estudio separado que examina el efecto de la dosis de oligonucleótido CpG en las respuestas inmunes no se conduce en este estudio. Se esperaría que la mejora adicional en los títulos absolutos se puede obtener al emplear el complejo inmunoestimulador empleado preparado casi en neutralidad eléctrica o con un exceso de carga negativa suministrada por el oligonucleótido CpG o alternativamente un excipiente compatible adicional. En estas composiciones la mayor parte del inmunógeno de péptido se une como un complejo inmunoestimulador y el proceso de gelificación luego de inyección no resulta en pérdidas principales de péptido no adyuvado por virtud de co-extracción en el solvente biocompatible.

Así, se puede concluir que el complejo inmunoestimulador puede estabilizar los inmunógenos de péptido como el complejo inmunoestimulador y que estas composiciones cuando se combinan con un polímero gelificante *in situ* puede adyugar efectivamente las respuestas inmunes *in vivo*. Esto es particularmente importante para estos sistemas de polímero que están destinados para uso de dosis única. El suministro de los inmunógenos como complejo inmunoestimulador suspendido dentro de un vehículo de polímero gelificante *in situ* proporciona la exposición más eficiente de inmunógeno al sistema inmune. Las respuestas obtenidas para el sistema combinado son significativamente mayores que la suma de las respuestas inmunes obtenidas para cada sistema independientemente y son sostenibles, a diferencia de los geles *in-situ* preparados mediante reconstitución simple de inmunógenos de péptido no complejados de los polímeros en solventes biocompatibles.

En el modelo de conejillos de indias, la cantidad y longevidad de las respuestas obtenidas indican que se prefieren los complejos inmunoestimuladores derivados de las combinaciones IgE/CpG1 y CD4/CpG2. Se determina experimentalmente que las composiciones derivadas de los pares alternativos de IgE/CpG2 y CD4/CpG1 were adyuvanting, aunque no al mismo grado.

La posibilidad de un régimen de dosis única se indica por estos resultados. Específicamente, este Ejemplo indica fuertemente el potencial de estas nuevas formulaciones con base en combinación instantáneamente reconstituidas para desarrollar como una forma de dosificación de liberación controlada eficaz.

55

Ejemplo 9: Preparación de la Combinación del Complejo inmunoestimulador y las Suspensiones de Sal Mineral

5 Este Ejemplo ilustra el proceso para preparar una suspensión de sal mineral de péptidos catiónicos derivados de inmunógenos del péptido LHRH (SEQ ID NOS: 7-9 en una relación molar 1:1:1 en la solución) o un complejo inmunoestimulador derivado de inmunógenos LHRH y oligonucleótido CpG1 en diversas proporciones. Un diagrama de flujo que ilustra el proceso para preparar una suspensión mezclada como se describe aquí se muestra en la Figura 16.

10 Todos los artículos de vidrio, barras de agitación y puntas de pipeta se someten a autoclave durante 40 minutos a 121° C antes de uso. Todos los reactivos se pesan, se suministran, se transfieren o se agregan a los recipientes de reacción en una cámara de flujo laminar para evitar la contaminación.

A un frasco de vidrio de 5.0 mL equipado con una barra de agitación, se agrega 100 µg (250 µL, 0.4 mg/mL) o 1,600 µg (534 µL, 3.0 mg/mL) de inmunógenos del péptido LHRH disueltos en una solución acuosa. Los complejos inmunoestimuladores con una de dos relaciones de carga (es decir 4:1 o 1.5:1) se preparan a partir de inmunógenos LHRH y los oligonucleótidos CpG1 en agua desionizada destilada.

15 Específicamente, la preparación de un complejo 4:1 de 100 µg o 1,600 µg de los inmunógenos LHRH requeridos 7.3 µg o 116.8 µg del oligonucleótido CpG1 (2.0 mg/mL), mientras que la preparación de un complejo 1.5:1 de 1,600 µg de los inmunógenos LHRH requeridos 350.4 µg del oligonucleótido CpG1 (2.0 mg/mL), respectivamente.

20 La Tabla 9 muestra los cálculos empleados para determinar la cantidad relativa del oligonucleótido CpG1 requerido para complejación con inmunógenos del péptido LHRH para una dosificación final fija de 25 µg/0.5 mL o 400 µg/0.5 mL con respecto a las relaciones de carga especificadas.

A un segundo frasco de vidrio de 5.0 mL, se agrega 1.0 mL de suspensión de sal mineral Alhidrogel® (3.2 mg de Aluminio (Al)/mL) en agua desionizada destilada. La suspensión de la solución patrón Alhidrogel® empleada primero ajusta el pH a pH 7.1-7.4 mediante la adición de NaOH 0.1 N. Las mediciones de pH se hacen a través del uso de bandas indicadoras de pH con unidades de resolución de +/- 0.3 de pH.

25 La suspensión de sal mineral se agrega al frasco que contiene el complejo inmunoestimulador y los inmunógenos no unidos residuales y equilibrados con agitación durante 30 minutos.

A la mezcla de Alhidrogel® y el complejo inmunoestimulador se agrega 90 µL de 20 % de NaCl para tonicidad, 5.0 µL del conservante 2-fenoxi-etanol (2-PE) (en casos seleccionados) y agua desionizada destilada adicional para asegurar el volumen final de la formulación igual a 2.0 mL.

30 La concentración final de los inmunógenos una vez formulados como una suspensión de complejo inmunoestimulador combinado con sal mineral como se describió anteriormente es 25 µg/0.5 mL o 400 µg/0.5 mL respectivamente. La concentración final de Alhidrogel® preparado es dependiente de las especies objetivo. Las formulaciones destinadas para los roedores se preparan a 0.4 mg Al/0.5 mL mientras que las formulaciones destinadas para primates diferentes a los humanos se preparan a 0.8 mg Al/0.5 mL. En todos los casos las formulaciones terminadas se ajustan para tonicidad (0.9 % NaCl) y aquellas empleadas para primates diferentes a los humanos contienen un conservante (0.25 % v/v, 2-PE).

Ejemplo 10: La Inmunogenicidad de los Inmunógenos del Péptido LHRH Formulados como una suspensión del Complejo Inmunoestimulador con Sal Mineral en los Roedores

40 Este Ejemplo ilustra la inmunogenicidad de los inmunógenos del péptido LHRH formulados como complejos inmunoestimuladores con los oligonucleótidos CpG1 en combinación con sales minerales, que se inmunizan intramuscularmente, en ratas macho. La suspensión de sales minerales se preparan como se describe en el Ejemplo 9.

45 Los grupos de cuatro, ratas macho Sprague-Dawley de 6 a 8 semanas de edad se inmunizan intramuscularmente (I.M.) en la semana 0, 4 y 8 con las siguientes composiciones: 25 µg de los péptidos LHRH se suspende en un volumen de 500 µL de agua desionizada destilada; 25 µg de los péptidos LHRH se suspende en un volumen de 250 µL de agua desionizada destilada y se agrega 250 µL de Alhidrogel® (1.6 mg Al/mL); 25 µg de péptidos LHRH / complejo inmunoestimulador CpG1 (relación de carga 4:1) preparado como se describe en la Tabla 9 se suspende en un volumen de 500 µL de agua desionizada destilada; 25 µg de péptidos LHRH / complejo inmunoestimulador CpG1 (relación de carga 4:1) preparado como se describe en la Tabla 9 se suspende en un volumen de 250 µL de agua desionizada destilada y se agrega 250 µL de Alhidrogel® (1.6 mg Al/mL). A cada formulación se agrega 45 µL de una solución salina al 20 % y 455.0 µL de agua desionizada destilada. El volumen final de cada formulación es 1.0 mL.

Las ratas no muestran lesiones macroscópicas o cambios de comportamiento después de recibir sales minerales que contienen inmunógenos de péptido o sales minerales que contienen el complejo inmunoestimulador. Los sueros se obtienen en las semanas +0, +4, +6, +8 y +12 y se evalúan para la presencia de anticuerpos anti-LHRH mediante ELISA específico de inmunógeno y para testosterona en suero mediante inmunoensayo RIA.

5 Medición de anticuerpos anti-LHRH

Se determinan las actividades de anticuerpo mediante ELISA utilizando placas de microtítulo de 96 pozos cubiertas con el péptido LHRH⁵⁴ como inmunoadsorbente.

10 Se incuban alícuotas (100 µL) de la solución de inmunógeno de péptido en una concentración de 5 µg/ml durante 1 hora a 37° C. Los pozos se bloquean posteriormente con una solución de 3 % de gelatina/PBS durante 1 hora a 37° C. Las placas luego se secan y se utilizan para el ensayo. Se agregan alícuotas (100 µL) del suero inmune de prueba, partiendo con una dilución 1:100 en un regulador de dilución de muestra y diluciones seriales de 10 veces después de esto, a las placas cubiertas con péptido. Las placas se incuban durante 1-1.5 horas a 37° C. Las placas se lavan seis veces con 0.05 % de TWEEN 20 en PBS. 100 µL de IgG antirata de cabra marcado con peroxidasa de rábano (Cappel) para ensayos desarrollados en sueros de rata, 100 µL de IgG marcado con peroxidasa de rábano anti-cerdo de cabra (Pierce) para ensayos desarrollados en suero de cerdo o 100 µL de IgG antihumano de cabra marcado con peroxidasa de rábano (Anogen) para ensayos desarrollados en suero de babuino se agrega a las diluciones apropiadas en el regulador de dilución conjugada (PBS que contiene 0.5M NaCl y suero de cabra normal). Las placas se incuban durante 1 hora a 37° C y se lavan como se describió anteriormente. Se agregan alícuotas (100 µL) del sustrato ortofenilendiamina (OPD) a 0.04 % en peso (Pierce) y 0.12 % de H₂O₂ en regulador de citrato de sodio, pH 5.0, se agrega durante 15 minutos. Se detienen las reacciones mediante la adición de 50 µL de 2NH₂SO₄ y el A492 se determina para cada pozo.

Se calculan títulos ELISA con base en análisis de regresión lineal de las adsorbancias, con corte A₄₉₂, fijadas a 0.5. Este corte es riguroso, como los valores para las muestras de control normal diluidas que corren con cada ensayo son menos de 0.15.

25 Medición de Testosterona en Suero

Se evalúan los inmunógenos para eficacia mediante RIA para valores de testosterona en suero. Se miden los niveles de testosterona en suero utilizando un equipo RIA de Diagnostic Products (Los Angeles, Calif.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El límite de detección menor para la testosterona varía de 0.01 a 0.03 nMol/L. Cada muestra se analiza en duplicado.

30 Las muestras de suero se clasifican cuando está el nivel de castración cuando el nivel de testosterona está por debajo del límite de detección y cuando "casi castración" a < 0.1 nMol/L.

Resultados de Inmunogenicidad

Los títulos de anticuerpo de suero luego de inmunización de inmunógenos LHRH se muestran en la Figura 13a. Los niveles de testosterona en suero correspondientes se muestran en la Figura 13b.

35 Los títulos de anticuerpo determinados del suero obtenido de ratas macho en este estudio prueban que ni la composición de los péptidos LHRH en el regulador ni los péptidos LHRH en combinación con las sales minerales Alhidrogel® son inmunogénicas. Por el contrario, ambas composiciones derivadas de del complejo inmunoestimulador LHRH/CpG1 solo o en combinación con la sal mineral Alhidrogel® se muestran que son inmunogénicos como se describe en la Figura 13a.

40 Las respuestas de anticuerpo de estos dos últimos grupos prueban ser similares durante las primeras 8 semanas. En la semana 12, los títulos de anticuerpo encontrados para el sistema combinado del complejo inmunoestimulador LHRH y sal mineral Alhidrogel® son solo marginalmente mejores (es decir - 0.5 unidades log) que aquellos determinados para el complejo inmunoestimulador LHRH solo.

45 Los niveles de testosterona en suero correspondientes se determinan para las composiciones de los péptidos LHRH en regulador y los péptidos LHRH en combinación con las sales minerales Alhidrogel® que demuestran de forma similar que ni el péptido LHRH ni el péptido LHRH péptido con formulaciones de sal mineral son capaces de lograr inmunocastración en ratas macho.

50 Por el contrario, el complejo inmunoestimulador derivado de péptidos/ LHRH CpG1 solos y la combinación de péptidos LHRH / oligonucleótido CpG1 con sal mineral Alhidrogel® inmunocastran efectivamente todas las ratas en cada grupo como se muestra en la Figura 13b.

La inmunocastración completa para cada rata en la composición derivada del complejo inmunoestimulador LHRH combinado con la sal mineral Alhidrogel® se logra en la semana 6 (2 semanas después del primer refuerzo). Un nivel similar de inmunocastración para la composición derivada del complejo inmunoestimulador LHRH solo no se logra hasta la semana 10 (2 semanas después del segundo refuerzo).

- 5 En este Ejemplo demostramos un régimen de vacunación novedoso para obtener inmunocastración efectiva (como se mide por testosterona en suero) con una composición preparada del complejo inmunoestimulador LHRH (en una estrategia de inmunización de 3 dosis) o un complejo inmunoestimulador LHRH en combinación con una sal mineral (en una estrategia de inmunización de dos dosis).

- 10 La sal mineral Alhidrogel® administrada solo con inmunógenos del péptido LHRH prueba ser un adyuvante inefectivo. Sin embargo, una vez formulada con los inmunógenos LHRH en la forma de un complejo inmunoestimulador la combinación proporciona resultados sinérgicamente muy superiores. La sal mineral en sí misma puede actuar en dos modos. La primera puede ser para proporcionar un depósito que localiza el complejo inmunoestimulador en el sitio de inyección y en segundo lugar al reclutar las células especializadas del sistema inmune que puede facilitar la presentación del inmunógeno al sistema inmune.

- 15 Se conducen experimentos simultáneos con sal mineral alternativa, Adju-phos® (derivado de Fosfato de aluminio) y se logra inmunocastración completa en todas las ratas en la semana 8 únicamente para el sistema derivado del complejo inmunoestimulador LHRH en combinación con la sal mineral Adju-phos®.

Ejemplo 11: La Inmunogenicidad de los Inmunógenos del Péptido LHRH Formulados como una Suspensión del Complejo Inmunoestimulador con Sal Mineral en Babuinos

- 20 Este Ejemplo ilustra la inmunogenicidad de inmunógenos del péptido LHRH formulado como complejos inmunoestimuladores con los oligonucleótidos CpG1 en diversas relaciones en combinación con sales minerales, que se inmunizan intramuscularmente, en babuinos macho. Las suspensiones de sales minerales se preparan como se describe en el Ejemplo 9.

- 25 Se inmunizan grupos de dos, babuinos macho de 2 años de edad intramuscularmente (I.M.) en la semanas 0,4 y 8 con las siguientes composiciones: 400 µg de péptidos LHRH / complejo inmunoestimulador CpG1 (relación de carga 4:1 o 1.5:1) preparado como se describe en la Tabla 9 suspendida en un volumen de 500 µL de agua desionizada destilada; se agrega 400 µg de péptidos LHRH / complejo inmunoestimulador CpG1 (relación de carga 4:1 o 1.5:1) preparado como se describe en la Tabla 9 suspendido en un volumen de 250 µL de agua desionizada destilada y 250 µL de Alhidrogel® (3.2 mg Al/mL). A cada formulación se agrega 45 µL de una solución salina al 20 %, 2.5 µL de 2-fenoxi-etanol y 452.5 mL de agua desionizada destilada. El volumen final de cada formulación es 1.0 mL.

Los babuinos no muestran lesiones macroscópicas o cambios en el comportamiento después de recibir el complejo inmunoestimulador en relación o en combinación con la sal mineral Alhidrogel®. Se obtienen sueros en la semanas +0, +4, +6, +8, +12 y +14 (solo para los complejos 1.5:1) y se evalúan para la presencia de los anticuerpos anti-LHRH mediante ELISA específico en inmunógeno y para testosterona en suero mediante inmunoensayo RIA.

- 35 Resultados de Inmunogenicidad

Los títulos de anticuerpo en suero luego de la inmunización de los inmunógenos LHRH se muestran en la Figura 14a. Los niveles de testosterona en suero correspondientes para cada babuino se muestran en la Figura 14b y 14c, respectivamente.

- 40 Los títulos de anticuerpo determinados del suero obtenidos de babuinos macho inmunizados por los complejos inmunoestimuladores LHRH preparados en una relación de carga 4:1 o 1:5:1 o una combinación de péptido LHRH de complejos inmunoestimuladores y sal mineral Alhidrogel® preparada en una relación de carga 4:1 o 1:5:1 que indica que todas las composiciones son inmunogénicas como se muestra en la Figura 14a.

- 45 Se encuentran títulos de anticuerpo marginalmente mayores para ambos sistemas preparados en la relación de carga 4:1 con relación a los títulos de anticuerpo obtenidos para el sistema 1.5:1 independiente de sí la sal mineral de Alhidrogel® está presente o no.

Los niveles de testosterona en suero correspondientes determinados del suero obtenido de babuinos macho inmunizados con los complejos inmunoestimuladores LHRH preparados en la relación de carga 4:1 sin sal mineral Alhidrogel® prueban ser totalmente inefectivos para ambos babuinos en el ensayo como se muestra en la Figura 14b.

- 50 El sistema formulado de los complejos inmunoestimuladores LHRH preparados en la relación de carga 1.5:1 sin sal mineral Alhidrogel® se muestra que regula por disminución más efectivamente la respuesta de testosterona en

suero para uno de los babuinos en el ensayo, sin embargo no se alcanza inmunocastración completa como se muestra en la Figura 14c.

5 Para la composición preparada de un péptido complejo inmunoestimulador LHRH (relación de carga 4:1) en combinación con inmunocastración completa Alhidrogel® se obtiene en un babuino en la semana 10 y se demuestra que es sostenible a lo largo de la semana 14 como se muestra en la Figura 14b. Se obtienen niveles de castración cercanos de testosterona en suero en el otro babuino en este grupo, aunque esta respuesta prueba ser transitoria como se muestra en la Figura 14b.

10 Para la composición preparada de un complejo inmunoestimulador LHRH (relación de carga 1.5:1) en combinación con Alhidrogel® ambos babuinos en el estudio se inmunocastran exitosamente (un babuino que logra esto en la semana 8 y el otro en la semana 10) y este efecto prueba ser sostenible a través de la semana 14 como se muestra en la Figura 14c.

15 Para formulaciones derivadas de los complejos inmunoestimuladores LHRH preparados en una relación de carga 4:1 o 1.5:1 (concentración de péptido LHRH = 400 mg), la cantidad actual de inmunógenos del péptido LHRH unido en la forma de un complejo inmunoestimulador varía significativamente. La Tabla 8 muestra la proporción del inmunógeno LHRH administrado en esta forma como una función de varias relaciones de carga. Se unen aproximadamente 16 % (~ 63 µg) de los inmunógenos LHRH en la solución en la forma de un complejo inmunoestimulador cuando se prepara en una relación de carga 4:1, mientras que aproximadamente 86 % (~ 344 µg) se unen cuando se prepara en la relación 1.5:1.

20 La presentación de la mayor parte de los inmunógenos LHRH en la forma de un complejo inmunoestimulador como en el sistema de relación 1.5:1 proporciona respuestas de inmunocastración tempranas y finales más largas en babuinos. Hemos determinado experimentalmente que la sal mineral Alhidrogel® adsorbe un adicional de 10 % de los inmunógenos LHRH no unidos libres en la solución luego adición. Así es probable que el mecanismo por el que se proporciona sal mineral mejora la eficacia de la vacuna cuando se combina con el complejo inmunoestimulador se liga probablemente a efectos inmunomoduladores indirectos.

25 Se conducen experimentos simultáneos con una sal mineral alternativa, se demuestra que Adju-phos® (derivado de Fosfato de aluminio) y la inmunocastración completa en un babuino en la semana 10 mientras que el otro babuino en el ensayo demuestra niveles de castración cercanos de testosterona en suero en este punto de tiempo.

30 En este Ejemplo hemos demostrado que un complejo inmunoestimulador LHRH en combinación con una sal mineral es una vacuna efectiva para lograr inmunocastración (cuando se mide por testosterona en suero) en un primate diferente a humano.

Adicionalmente mostramos que las cinéticas de formulación de la respuesta de inmunocastración es una función de la relación de carga inicial de los inmunógenos LHRH al oligonucleótido CpG1 y la selección de la sal mineral.

Específicamente, este Ejemplo indica el potencial de estas nuevas formulaciones con base en combinación para el desarrollo de vacunas seguras útiles para ablación hormonal en animales o humanos.

35 Más aún, este Ejemplo indica fuertemente el potencial de estas nuevas formulaciones basadas en combinación para el desarrollo de vacunas seguras adecuadas para el tratamiento de cáncer de próstata sensible a andrógeno en humanos.

Ejemplo 12: Preparación de Emulsiones Agua en Aceite de ISA Montanide® 50v, Complejo inmunoestimulador Derivado de LHRH en la presencia de un Fragmento de Péptido Derivado de IL-1β

40 A un recipiente de 10 mL, se agrega 1,000 µg de LHRH, inmunógenos de péptido (SEQ ID NOS: 7-9 en una relación molar 1:1:1 en la solución), disuelto en un regulador acuoso apropiado (2,500 µL, 0.4 mg/mL) y oligonucleótido CpG1 para preparar un complejo inmunoestimulador (relación de carga 16:1) o 1,000 µg de inmunógenos de péptido disuelto en un regulador acuoso apropiado (2,500 µL, 0.4 mg/mL) más un péptido derivado de IL-1β (SEQ ID NO: 14, C*VQGEESNDKIPC*- CO₂H.HCl (cuando C* indica la ciclización entre las dos cisteínas) en la solución; o 1,000 mg de inmunógenos de péptido disueltos en un regulador acuoso apropiado (2,500 µL, 0.4 mg/mL) se agrega a una mezcla de péptido CpG1 y IL-1β para preparar una combinación de complejo inmunoestimulador LHRH (relación de carga 16:1) y péptido IL-1β. La Tabla 9 muestra los cálculos empleados para determinar la cantidad relativa del oligonucleótido CpG1 requerido para complejación con inmunógenos del péptido LHRH para una dosis fija final de 100 µg/1.0 mL con respecto a la relación de carga especificada.

50 Se sabe que los fragmentos basados en péptido derivados de IL-1β poseen propiedades adyuvantes.⁶⁹ El péptido IL-1β empleado aquí es relativamente pequeño (FW = 1421.5) y se carga negativamente cuando se disuelve en reguladores fisiológicos estándar. Emplear los cálculos descritos en el Ejemplo 2, un nMol de péptido IL-1β

contribuye con 2 nMols de carga negativa. Como tal, esta molécula no predeciría que interactúa físicamente con los inmunógenos LHRH y no se encuentra evidencia de complejación en la forma de un precipitado luego de mezcla.

5 Específicamente, para preparar un complejo inmunoestimulador de los inmunógenos del péptido LHRH en una relación de carga 16:1 de LHRH:CpG1, se utilizan 18.3 µg de oligonucleótido CpG1 (9.2 µL, 2.0 µg/mL). Para preparar una solución de inmunógenos del péptido LHRH y IL-1β, se agregan 10 µg de IL-1β (5.0 µL, 2.0 µg/mL) en un regulador acuoso apropiado. Para preparar un complejo inmunoestimulador de inmunógenos del péptido LHRH en una relación de carga 16:1 de LHRH:CpG1 más IL-1β, se mezclan 18.3 µg de oligonucleótido CpG1 (9.2 µL, 2.0 µg/mL) y 10 µg de péptido IL-1β (5.0 µL, 2.0 mg/mL).

10 A cada uno de los recipientes se agrega diluyente de solvente acuoso adicional de tal manera que el volumen final de la fase acuosa se fija a 5.0 mL para la preparación de emulsiones w/o ISA Montanide® 50v respectivamente.

Para la preparación del grupo placebo, se emplea 5.0 mL de solución salina normal para la fase acuosa.

Para los inmunógenos del péptido LHRH, se encuentra que la solución salina normal es adecuada para complejación. El IP calculado para cada péptido es mayor de 9.0 (Tabla 1), mayor que el pH del solvente acuoso seleccionado.

15 Este Ejemplo demuestra las ventajas de estabilizar los inmunógenos en la solución en la forma de un complejo inmunoestimulador. Se ha mostrado que el proceso de complejación es compatible en la presencia de inmunomoduladores adicionales.

20 Las suspensiones acuosas diluidas de inmunógenos LHRH o solución de placebo luego se agregan lentamente a un recipiente de reacción seco de 25 mL cargado con ISA Montanide® 50v (5.0 mL). Se hacen adiciones mientras que se homogeniza (Mezclador de Laboratorio de Alto Corte, Unidad Sellada, Silverson) la mezcla a bajas velocidades (2,000-3,000 rpm) para generar una emulsión gruesa. Esta velocidad de procesamiento se mantiene hasta que la muestra acuosa se ha agregado completamente y se continúa 2 minutos completos para asegurar pre-mezcla uniforme de las fases de aceite y acuosa. La velocidad de homogenización luego se incrementa (5,000-8,000 rpm) y se mantiene durante 5 a 10 minutos que resulta adicionalmente en la formación de una emulsión w/o finamente dispersa blanca homogénea.

25 La concentración final de los inmunógenos una vez formulados como emulsiones agua en aceite como se describió anteriormente es 100 µg/mL.

30 **Ejemplo 13: La Inmunogenicidad y Efectos que Promueven el Crecimiento de Inmunógenos del Péptido LHRH Formulado como un Complejo Inmunoestimulador con el Péptido IL-1β o como una combinación de un Complejo Inmunoestimulador con el Péptido IL-1β en una Emulsión w/o**

35 Este Ejemplo ilustra la inmunogenicidad de inmunógenos del péptido LHRH formulado; como complejos inmunoestimuladores con los oligonucleótidos CpG1 en combinación con una emulsión w/o o con un inmunomodulador (péptido IL-1β) en combinación con emulsiones w/o o como complejos inmunoestimuladores combinados con un inmunomodulador adicional (péptido IL-1β) en una emulsión w/o, que se inmunizan intramuscularmente, en jabalís. Las emulsiones w/o se preparan mediante homogenización como se describe en el Ejemplo 4a y Ejemplo 12.

40 Se inmunizan intramuscularmente grupos de cinco, jabalís de 8 semanas de edad (30 Kg cada uno) (I.M.) en la semana 0 y 8 con las siguientes composiciones: 100 µg de péptidos LHRH / complejo inmunoestimulador CpG1 (relación de carga 16:1) preparadas como se describe en la Tabla 9 suspendidas en un volumen final de 500 µL de NaCl y dispersas con ISA Montanide® 50v (500 µL); péptidos LHRH / péptido IL-1β (1 µg) se suspende en un volumen final de 500 µL de NaCl y se dispersa con ISA Montanide® 50v (500 µL); o péptidos LHRH / (CpG1 + péptido IL-1β (1 mg)) complejo inmunoestimulador (relación de carga 16:1) preparado como se describe en la Tabla 9 se suspende en un volumen final de 500 µL de NaCl disperso con ISA Montanide® 50v (500 µL). Se prepara un grupo de control placebo de 500 µL de NaCl disperso con ISA Montanide® 50v (500 µL) y se castra quirúrgicamente un grupo de control no inmunizado incluido en el estudio.

50 Los jabalís no muestran lesiones macroscópicas o cambios de comportamiento después de recibir emulsiones w/o placebo, emulsiones w/o que contienen inmunógenos de péptido en combinación con el péptido IL-1β o emulsiones w/o que contienen el complejo inmunoestimulador o complejo inmunoestimulador en combinación con el péptido IL-1β. Se obtienen sueros en las semanas +0, +8, +10, +12 y +14 y se evalúan para la presencia de anticuerpos anti-LHRH mediante ELISAS específicas de inmunógeno, para testosterona en suero mediante inmunoensayo RIA y para ganancia de peso.

Resultados de Inmunogenicidad

- 5 Los títulos de anticuerpo en suero luego de inmunización de los inmunógenos LHRH se muestran en la Figura 15a. Los niveles de testosterona en suero correspondientes se muestran en la Figura 15b. Los efectos de inmunocastración luego de inmunización de los inmunógenos LHRH versus castración quirúrgica en la ganancia en peso durante el periodo del ensayo se muestran en la Figura 15c. Los experimentos de control demuestran que el péptido no adyuvado no es inmunogénico o débilmente inmunogénico en todos los casos.
- 10 Los títulos de anticuerpo determinados del suero obtenido de jabalís macho inmunizadas por los complejos inmunoestimuladores LHRH, los péptidos LHRH adyuvado por una citoquina, o por un complejo inmunoestimulador LHRH co-formulado con una citoquina administrada como emulsiones w/o indica que todas las tres composiciones son inmunogénicas. Los títulos obtenidos en todos los puntos de tiempos durante el periodo del ensayo prueban ser comparables. Los grupos placebo y de control negativo quirúrgicamente castrados regresan sin título como se muestra en la Figura 15a.
- 15 Los niveles de testosterona en suero correspondientes determinados del suero obtenido de jabalís inmunizadas por LHRH, complejo inmunoestimulador en una emulsión w/o o los péptidos LHRH adyuvado por el péptido IL-1 β en una emulsión w/o o por una combinación del complejo inmunoestimulador LHRH y el péptido IL-1 β administrado como emulsión w/o indican que los jabalís macho en estos grupos se inmunocastran efectivamente en la semana 12.
- 20 Notablemente, las composiciones derivadas del complejo inmunoestimulador LHRH en una emulsión w/o y los péptidos LHRH adyuvado por el péptido IL-1 β en una emulsión w/o no logra mantener este nivel de testosterona en suero. En la semana 14, se muestran que los niveles de testosterona en suero de ambos grupos rebotan y ningún grupo se describirá como inmunocastrado.
- 25 La vacuna LHRH formulada como una combinación de complejo inmunoestimulador y el péptido IL-1 β como una emulsión w/o prueba mantener más efectivo el mismo nivel de inmunocastración sin indicación de rebote temprano como se muestra en la Figura 15b.
- El grupo de control negativo placebo fluctúa ampliamente los valores de testosterona en suero en varios puntos de tiempo evaluados de acuerdo con las variaciones esperadas en niveles de hormona mensualmente. Los grupos de control positivos quirúrgicamente castrados regresan niveles de testosterona en suero en todos los puntos de tiempo durante el periodo de ensayo como se muestra en la Figura 15b.
- 30 El nivel de testosterona en suero en jabalís antes de sacrificio se ha correlacionado directamente con la calidad de la comida producida. Los altos niveles de testosterona surgen en productos de sabor desagradable (olor sexual) y que así controlan esta propiedad es una consideración comercial importante. El método estándar para asegurar la testosterona insignificante ha sido la castración quirúrgica. Un método de vacuna viable se puede probar efectivo sobre el intervalo de tiempo cuando los jabalís normalmente se llevan al mercado. El punto en el que se ha alcanzado un peso entre 110-130 KGs.
- 35 La promoción del crecimiento de los jabalís inmunizadas en 8 semanas de edad en este estudio se localiza durante 14 semanas. Los jabalís se inmunocastran por el complejo inmunoestimulador LHRH en una emulsión w/o o mediante los péptidos LHRH adyuvado solamente por el péptido IL-1 β en una emulsión w/o publica las ganancias de peso, que el grupo quirúrgicamente castrado en paralelo. Estos alcanzan en promedio 110 KGs en la semana 14 como se muestra en la Figura 15c.
- 40 Inesperadamente, el grupo inmunizado por la vacuna LHRH formulada como una combinación del complejo inmunoestimulador LHRH y el péptido IL-1 β en una emulsión w/o prueba ser considerablemente más efectivo. Todas los jabalís de este grupo responden rápidamente a reportar las ganancias de peso promedio mayores en todos los puntos de tiempos evaluados en comparación con los otros grupos en el ensayo. Los jabalís de este grupo alcanza un peso promedio ligeramente por debajo de 120 KGs en la semana 12 y alcanza 130 KGs en la semana 14 como se muestra en la Figura 15c.
- 45 La disparidad entre este grupo y los otros en el ensayo se puede deber a la combinación sinérgica de los efectos obtenidos cuando el complejo inmunoestimulador de LHRH/CpG1 se presenta al sistema inmune en combinación con el péptido IL-1 β y el péptido LHRH no complejado libre en una emulsión w/o.
- La formulación de combinación prueba ser efectiva con muy pequeñas cantidades del complejo inmunoestimulador LHRH/CpG1 presente en la suspensión. En este Ejemplo una relación de carga LHRH:CpG1 de 16:1 proporciona respuestas significativas en todos los cerdos.
- 50 El grupo de control placebo es más pobre en promover el crecimiento durante el periodo del ensayo. La ganancia de peso promedio para este grupo se reduce significativamente con relación a los otros como se muestra en la Figura 15c.

Las mejoras marginales en ganancia en peso como una consecuencia de inmunocastración con relación a los controles placebo se ha observado en el pasado⁷⁰, sin embargo en este Ejemplo demostramos un método novedoso para obtener inmunocastración efectiva para la eliminación de olor sexual (como se mide por testosterona en suero) y obtiene promoción superior del crecimiento (cuando se mide por ganancia en peso) durante el periodo del ensayo con respecto al método estándar de castración quirúrgica.

5 Adicionalmente, los jabalís se inmunocastran por las vacunas LHRH formuladas como una combinación de un complejo inmunoestimulador y péptido IL-1 β en una emulsión w/o podrían ir al mercado 2 semanas más temprano que los jabalís macho inmunizadas por la formulación alternativa, o el presente método de preferencia, castración quirúrgica.

10 Específicamente, los ahorros monetarios en términos de evitar pérdidas debido a trauma quirúrgico, reduce los costes de alimentación y almacenamiento y mejora el volumen de ventas en términos de tiempo para comercializar sería significativo, demostrando las ventajas de método de inmunocastración mejorado y promoción del crecimiento.

Ejemplo 14: Preparación de Emulsiones Agua en Aceite de ISA Montanide® 50v y Complejo Inmunoestimuladores Derivados de FMD

15 A un recipiente de 20 mL, se agrega 4,000 μ g de inmunógenos de péptido FMD (SEQ ID NOS: 12-13 en la solución), disuelto en un regulador acuoso apropiado (2,000 μ L, 2.0 mg/mL) o se agrega 4,000 μ g de inmunógenos de péptido disuelto en un regulador acuoso apropiado (2,000 μ L, 2.0 mg/mL) y oligonucleótido CpG1 para preparar un complejo inmunoestimulador (relación de carga 4:1). La Tabla 9 muestra los cálculos empleados para determinar la cantidad relativa del oligonucleótido CpG1 requerido para complejación con los inmunógenos de péptido FMD para una dosificación final fija de 200 mg/ 1.0 mL con respecto a la relación de carga específica.

20 Específicamente, para preparar un complejo inmunoestimulador de los inmunógenos de péptido FMD en una relación de carga de 4:1 FMD:CpG1, se utilizan 125 μ g de oligonucleótido CpG1 (62.5 μ L, 2.0 μ g/mL).

A cada uno de los recipientes se agrega diluyente de solvente acuoso adicional de tal manera que el volumen final de la fase acuosa se fija a 10.0 mL para preparación de emulsiones w/o ISA Montanide® 50v respectivamente.

25 Para la preparación del grupo placebo, se emplea 10.0 mL de solución salina normal para la fase acuosa.

Para la colección de solución salina normal de inmunógenos de péptido FMD se encuentra que es adecuado para complejación. El IP calculado promedio para cada péptido derivado de un análogo posicional en la colección es mayor de 9.0 (Tabla 1), mayor que el pH del solvente acuoso seleccionado.

30 Las suspensiones acuosas diluidas de los inmunógenos FMD o solución placebo luego se agregan lentamente a un recipiente de reacción de 25 mL seco cargado con ISA Montanide® 50v (10.0 mL). Se hacen adiciones mientras se homogeniza (Mezclador de Laboratorio de Alto Corte, Unidad de Sellado, Silverson) la mezcla a bajas velocidades (2,000-3,000 rpm) para generar una emulsión gruesa. Esta velocidad de procesamiento se mantiene hasta que la muestra acuosa se ha agregado completamente y se continúa 2 minutos adicionales para asegurar pre-mezcla uniforme de las fases de aceite y acuosa. La velocidad de homogenización luego se aumenta (5,000-8,000 rpm) y se mantiene durante 5 a 10 minutos que resulta adicionalmente en la formación de una emulsión w/o finamente dispersa blanca homogénea.

35 La concentración final de los inmunógenos una vez formulados como emulsiones agua en aceite como se describió anteriormente es 200 μ g/mL.

Ejemplo 15: La Inmunogenicidad y Protección de los Inmunógenos FMD del Péptido Formulado como un Complejo Inmunoestimulador en una Emulsión w/o

Este Ejemplo ilustra la inmunogenicidad de los inmunógenos FMD del péptido formulado como una emulsión w/o o como los complejos inmunoestimuladores FMD en combinación con una emulsión w/o, que se inmunizan intramuscularmente en ganado. Las emulsiones w/o se preparan mediante homogenización como se describe en el Ejemplo 4a y Ejemplo 14.

45 Se inmunizan intramuscularmente grupos de tres adultos de ganado (I.M.) en la semana 0 y 3 con las siguientes composiciones: 400 μ g de los péptidos FMD suspendidos en un volumen final de 1,000 μ L de NaCl y dispersos con ISA Montanide® (1,000 μ L); o péptidos FMD / complejo inmunoestimulador CpG1 (relación de carga 4:1) preparados como se describe en la Tabla 9 suspendida en un volumen final de 1,000 μ L de NaCl y dispersos con ISA Montanide® 50v (1,000 μ L). Se prepara un grupo de control placebo control de 1,000 μ L de NaCl emulsificado con ISA Montanide® 50v (1,000 μ L).

50

5 El ganado no muestra lesiones macroscópicas o cambios en el comportamiento después de recibir emulsiones w/o placebo o emulsiones w/o que contienen los inmunógenos de péptido FMD o los complejos inmunoestimuladores FMD. Los sueros obtenidos en la semana +5 se evalúan para la presencia de anticuerpos neutralizantes FMD y en la semana +6 el ganado se expone con el virus vivo para determinar el nivel de protección en un ensayo que finaliza en 14 días.

Medición de Anticuerpos anti-FMD – Ensayo de Neutralización

10 El ensayo de neutralización cuantitativo (NA) para el anticuerpo FMD se realiza con células BHK-21 en placas de microtítulo de grado de tejido de cultivo de fondo plano. La prueba es una prueba de volumen igual en cantidades de 50 µL. Partiendo de una dilución de 1:4, se diluyen sueros en una serie de dilución de dos veces en duplicado. Las muestras de suero que se van a probar se mezclan con un volumen igual del serotipo FMDV O_{Manisa} (200 TCID₅₀/0.05 mL) y se incuban durante una hora a 37° C. Una suspensión celular de 10⁶ células/ml se prepara en un medio que contiene 10 % de suero bovino. Se agrega un volumen de 50 µL de suspensión celular a cada pozo. Las placas se sellan y se incuban a 37° C durante 2-3 días.

15 El examen microscópico es factible después de 48 horas. Se efectúa fijación con 10 % de formol/solución salina durante 30 minutos. Para tinción las placas se sumergen en 0.05 % de azul de metileno en 10 % de formalina durante 30 minutos. Los pozos positivos (cuando el virus se ha neutralizado y las células permanecen intactas) se ve que contienen células teñidas de azul. Son vacíos los pozos negativos. Los títulos se expresan como la dilución final del suero presente en la mezcla de suero/virus al punto final de 50 %.

Protocolo de Ensayo de Exposición de Ganado

20 En el día 35, todo el ganado, que recibió vacuna o controles placebo en el día 0 y día 21 se separan por los grupos en cuartos en contenedores separados. En el día 42, cada animal se expone intradermolingualmente (IDL) con un total de 10⁴ BID₅₀ FMDV o se inyectan en dos sitios en la superficie dorsal de la lengua.

25 Después de exposición, se observa el ganado para el desarrollo de signos clínicos de FMD durante 14 días y se registra diariamente la temperatura corporal. Los animales no protegidos muestran lesiones en los sitios diferentes a la lengua. Los animales de control muestran desarrollo de una infección generalizada como se muestra por lesiones en por lo menos tres pies para la exposición del virus que se considera válido.⁷¹

Resultados de Inmunogenicidad

Los títulos de anticuerpo neutralizante (N.A.) luego de inmunización de los inmunógenos FMD y los resultados de protección correspondientes se muestran en la Tabla 10.

30 Los títulos N.A. determinados del suero obtenido de ganado (semana +5) inmunizados por los inmunógenos de péptido FMD o por los complejos inmunoestimuladores FMD administrados como emulsiones w/o indican que las composiciones son inmunogénicas. Los títulos obtenidos en el punto de tiempo de la semana 5 son altamente variables, pero en todos los casos se muestra que son mayores que 16. El requerimiento mínimo para prueba de potencia para una vacuna de la enfermedad de la fiebre aftosa como se establece por Office International des Epizooties (OIE) es un título N.A. de 16.71 Cada novillo en el grupo de control negativo placebo vuelve insignificante los títulos N.A., todos los cuales son menores de 16 como se muestra en la Tabla 10.

La prueba concluyente para protección se puede obtener mediante exposición de los grupos inmunizados con el virus vivo de título específico. El virus vivo se administra intradermolingualmente (IDL) con un total de 10⁴ BID₅₀ FMDV O se inyecta en dos sitios en la superficie dorsal de la lengua.

40 Se inicia el protocolo de exposición en la semana 6, una semana después los títulos N.A. se establecen para todos los grupos y los resultados en la Tabla 10 prueban que la formulación derivada de péptidos FMD / complejos inmunoestimuladores CpG1 en combinación con los péptidos FMD no unidos administrados como una emulsión w/ow superior (3/3 protegido) para la formulación derivada de los péptidos FMD administrados como una emulsión w/o sola (1/3 protegido).

45 El grupo de control placebo confirma que el virus vivo empleado para la exposición es suficientemente virulento como todos los tres bovinos en este grupo se infectan y muestran signos de enfermedad dentro de 14 días después de protección (-0/3 protegido) como se muestra en la Tabla 10.

Ambos grupos formulados con los inmunógenos FMD o un complejo inmunoestimulador FMD en una emulsión w/o obtiene títulos de anticuerpo N.A. significativos en la semana +5.

De forma sorprendente, el estudio de exposición demuestra que la formulación de eficacia superior se deriva de la formulación que comprende el complejo inmunoestimulador FMD en la emulsión w/o. Es probable que esta composición mejore simultáneamente las respuestas N.A. y es más efectiva en regular por aumento un tipo específico de respuesta inmune importante para combatir las infecciones víricas.

5 Específicamente, el complejo inmunoestimulador derivado de FMD y CpG1 presentado en la forma de una emulsión w/o puede aumentar efectivamente el brazo Th1 arm de la respuesta inmune (por ejemplo IFN-gama). Esta función para el oligonucleótido CpG se ha establecido bien en otros modelos y IFN-gama en sí mismo se ha mostrado que es un inmunomodulador efectivo que logra protección inmune contra el virus de la influenza.⁷²

10 El control de enfermedad de la fiebre aftosa, una vez que un brote se ha identificado a menudo es controlado al sacrificar el rebaño infectado y vecino. La pérdida económica de mercancías importantes como ganado, cerdos y ovejas es frecuentemente significativa. Las estrategias de vacuna existentes emplean virus muertos, que son en algunos casos localmente producidos y de calidad inferior. La fabricación de virus vivos tiene diversos problemas con relación a la producción asociada con esto y los productos en sí mismos representan un riesgo de seguridad potencial. Una estrategia con base en inmunógenos derivados de péptido sintético representa un método mejorado para inmunización efectiva, y se deben considerar de bajo riesgo.

15 Específicamente, este Ejemplo demuestra que una estrategia de vacuna basada en péptido sintético puede proteger seguramente y efectivamente el ganado contra la enfermedad de la fiebre aftosa.

Adicionalmente, este Ejemplo demuestra adicionalmente la utilidad de este método de vacuna para la protección general del ganado doméstico importante susceptible a enfermedad de la fiebre aftosa.

Tabla 1

Inmunógenos de péptido sintéticos y Oligonucleótidos				
Vacuna	SEQ ID No:	Secuencia	IP	FW
Vacuna VIH (CD4)	4	ISITEIKGVIVHRIETILF- (εK) CNQGSFLTKGPKLNDRADS- RRSLMDQGN	9.30	5646
	5	KKKTDRVIEVLQRAGRAIL- (εK) CNQGSFLTKGPKLNDRADS- RRSLMDQGN	10.30	5659
	6	ISIT EIKCVIIRIETIL F- (εK) CHASIYDFGSC	6.91	3493
Vacuna de Cáncer de próstata (LHRH)	7	KKQYIKANSKFIGITELHWSYGLRPG	9.70	3164
	8	TAKSKKFPSYATYQFGGFFLLTRILTIPOSLEGGHEHWSYGLRPG	9.70	5052
	9	TAKSKKFPSYATYQFGGLSEIKGVIVHRLEGVGGEHWSYGLRPG	9.60	4910
Vacuna de alergia (IgE)	10	KKKIITRIITITID- (εK) CGETYQSRVTHPHLPRALMRSSTTKC	10.31	5068
	11	ISITEIKGVIVHRIETILF- (εK) CGETYQSRVTHPHLPRALMRSSTTKC	9.69	5165
Vacuna de Fiebre aftosa (FMD)	12	ISISEIKGVIVHRIETILF- (εK) YNGSCKYSDARVSNVRGDLQR- T RT TR	~9.39	6759-6851
	13	GDLQVLAQKAEKRCLEPSSFNHYGAIK T		
Oligonucleótido		Secuencia	Tm	FW
SEQ ID No :1		5' - TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT TTG TCG TT -3' 5'-nTC GTC GTT TTG TCG TTT TGT CGT T -3'	77.1° C	10.295
SEQ ID No: 2		Grupo n fosforotioato	70.9° C	7.400
IP = Potencial de Ionización Teórico, (ref. 68) FW = Peso de la Fórmula, Tm = Cebador para el Tm objetivo (mediante % de GC)				

Tabla 2

Cálculos de Carga Molar de Inmunógenos de Péptidos Sintéticos y Oligonucleótidos							
Vacuna	SEQ No:	ID	Carga Neta Calculada ¹	% de Contribución Molar de Péptido en Vacuna	Prom. Total de Equivalentes Molares +'ve Carga ²	FW	Prom. total de Péptido FW ³
<i>Vacuna CD4</i>	4		4 +'ve	50 %	1 nmol = 4.3 nmol +carga 've	5646	5280.6
	5		7 +'ve	25 %		5659	
	6		2 +'ve	25 %		3493	
<i>Vacuna IgE</i>	10		7 +'ve	66.6 %	1 nmol = 7.7 nmol +carga 've	5068	5132.1
	11		9 +'ve	33.3 %		5165	
<i>Vacuna LHRH</i>	7		4 +'ve	33.3 %	1 nmol = 4.3 nmol +carga 've	3164	4543.9
	8		5 +'ve	33.3 %		5052	
	9		4 +'ve	33.3 %		4910	
<i>Vacuna FMD</i>	12		~ 3.5 +'ve	Colección de Péptido ⁴	1 nmol ~ 3.5 +carga 've	6759-6851	6805 ⁵

1) Carga neta: Calculado al asignar un carga +1 para cada lisina (K), arginina (R) o histidina (H), una carga -1 para cada ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E) y una carga de 0 para cada otro aminoácido dentro de la secuencia. Las cargas se suman para cada péptido y se expresan como la carga promedio neta.

2) Equivalentes Molares Totales Promedio de +carga 've de los Péptidos: Estimados de la carga promedio de la mezcla de péptido combinado se calculan al sumar la contribución de carga molar general para cada componente dentro de la mezcla y tomar la media.

3) Peso de la Fórmula del Péptido Total Promedio (FW): Estimados del péptido total promedio FW se calculan al sumar la contribución de masa molar general para cada componente dentro de la mezcla y tomar la media.

4) La vacuna FMD se deriva de una colección de péptidos. La contribución molar de cada componente se asume equivalente y los equivalentes molares totales promedio de la +carga 've se calcula de forma similar.

5) Para la vacuna FMD el peso de la fórmula de péptido total promedio se obtiene al sumar el FW mayor y menor encontrado para los diversos péptidos FMD en la colección y tomar la media.

Equivalentes Molares de -carga 've de los Oligonucleótido CpG: Cada grupo fosforotioato contribuye -1 carga. CpG1 (32 bases oligómero) - 1 nmol CpG1 = 31.0 nmol -carga 've CpG2 (24 bases oligómero + fosforotioato). - 1 nmol CpG2 = 24.0 nmol -carga 've

Tabla 3

Relaciones de Carga Molares Calculadas Utilizadas para Preparar Complejos de Inmunógenos del péptido LHRH y los Oligonucleótidos CpG1			
Relación de carga final (LHRH: CpG1)	nmols de LHRH mediante Carga para la Relación de Carga Final de LHRH:CpG1 (LHRH de Masa Fija) ¹ (nmols +carga 've)	nmol Teórico de CpG1 Requerido ²	Masa Actual (nmols) de CpG1 Utilizado FW = 10,295 mg/mmol (Tabla 1) (CpG1 – Solución patrón A = 2.0 mg/mL)
8:1	$94.6/8 = 11.8$ (relación ~ 8:1)	$11.8/31 = 0.38$ nmols CpG1	3.6 mg (0.37 nmols)
4:1	$94.6/4 = 23.7$ (relación ~ 4:1)	$23.7/31 = 0.76$ nmols CpG1	7.3 mg (0.84 nmols)
2:1	$94.6/2 = 47.3$ (relación ~ 2:1)	$47.3/31 = 1.53$ nmols CpG1	14.7 mg (1.45 nmols)
1:1	$94.6/1 = 94.6$ (relación ~ 1:1)	$94.6/31 = 3.05$ nmols CpG1	29.3 mg (2.96 nmols)
1:2	$94.6/0.5 = 189.4$ (relación ~ 1:2)	$189.4/31 = 6.11$ nmols CpG1	58.6 mg (5.91 nmols)

1) Carga molar +'ve total calculada 100 ug de los péptidos LHRH:

FW Prom. = 4543.9 mg/mmol (Tabla 2),.

Péptidos LHRH de carga molar total +'ve = 4.3 nmol +carga 've/nmol de péptido LHRH (Tabla 2)

En 100 mg los péptidos LHRH existen $100 \text{ mg} / 4543.9 \text{ mg/mmol} = 22.0$ nmol de la carga molar de inmunógeno LHRH Total +'ve = $22.0 \text{ nmol} \times 4.3 \text{ nmols +carga de los péptidos LHRH 've/nmol} = 94.6$ nmols +carga 've

2) Cálculo de la muestra:

Relación de carga molar final 8:1 del inmunógeno LHRH al oligonucleótido CpG1.

100 mg de LHRH contribuye a 94.6 nmols de +carga 've.

Para establecer una relación de carga molar 8:1 de LHRH a CpG1 en la solución la cantidad requerida de LHRH que se va a neutralizar por CpG1 se calcula como $94.6 \text{ nmols +carga 've}/8 = 11.8$ nmols +carga 've.

Así 11.8 nmols +carga 've contribuye por LHRH se puede neutralizar por 11.8 nmols de carga -'ve contribuida por CpG1. $1 \text{ nmol de CpG1} = 31 \text{ nmol -carga 've}$ (Tabla 2).

Así los nmols totales de CpG1 se requieren para contribuir $11.8 \text{ nmols de -carga 've} = 11.8/31 = 0.38$ nmols CpG1.

Tabla 4

Cálculos de Relación de Carga Molar IgE, Inmunógenos de Péptido CD4 y Oligonucleótidos CpG				
Formulación	Dosis Péptido	Nmols calculados de la Carga CpG Requerida para el Péptido Específico: Relación de carga CpG nmols IgE: nmols CpG1 (+/-)1 nmols CD4: nmols CpG2 (+/-) ²	Nmol teórico de CpG1 o CpG2 (por Masa) Requerida ³	Masa Actual (nmols) de CpG1 o CpG2 Utilizado (CpG1 – Solución patrón A = 2.0 mg/mL) (CpG2 – Solución patrón B= 2.0 mg/mL)
IgE- emulsiones w/o	100 µg	150:150.0 ~ 1:1, neutral relación de carga	150/31 = 4.8 nmols CpG1	50 mg CpG1 (4.9 nmols)
	100 µg	150:37.5 ~ 4:1, +ve relación de carga	37.5/31 =1.2 nmols CpG1	11.1mgCpG1(1.1 nmols)
IgE – geles de polímero	300 µg	451:451 ~ 1:1 neutral relación de carga	451/31 =14.5 nmols CpG1	150 mg CpG1 (14.6 nmols)
	300 µg	451:112.8 ~ 4:1, +ve relación de carga	112.8/31 = 3.5 nmols CpG1	33.3 mg CpG1(3.2 nmols)
CD4 – emulsiones w/o	100 µg	81.3:163 ~ 1:2, -'ve relación de carga	163/24 = 6.8 nmols CpG2	50 mg CpG2 (6.7 nmols)
	100 µg	81.3 :40.7 ~ 2:1, +ve relación de carga	40.7/24 =1.7 nmols CpG2	11.1 mg CpG2(1.5 nmols)
CD4- geles de polímero	300 µg	244.2:488.4 ~ 1:2, -'ve relación de carga	488.4/24 = 20.4 nmols CpG2	150 mg CpG2(20.2 nmols)
	300 µg	244.2:122.1 ~, 2:1 +ve relación de carga	122.1/24 = 5.0 nmols CpG2	33.3 mg CpG2(4,5 nmols)
<p>1) Carga total calculada +ve molar para 100 mg o 300 mg de los péptidos IgE:</p> <p>FW prom. = 5132.1 g/ mol (Tabla 2); Carga total +ve molar de los péptidos IgE = 7.7 nmol +carga 've/nmol de los péptidos IgE (Tabla 2)</p> <p>En 100 g de los péptidos IgE existe 100 g /5132.1 g/ mol = 19.5 nmol de inmunógeno IgE de carga total +ve molar = 19.5 nmol x 7.7 nmols +carga 've/nmol de los péptidos IgE = 150.1 nmols +carga 've</p> <p>En 300 g de los péptidos IgE existen 300 g /5132.1 g/ mol = 58.5 nmol de carga molar del inmunógeno IgE Total +ve = 58.5 nmol x 7.7 nmols +carga 've/nmol los péptidos IgE = 450.5 nmols +carga 've</p> <p>2) Carga total calculada +ve molar para 100 mg o 300 mg de los péptidos CD4:</p>				

FW prom. = 5280.6 g/ mol (Tabla 2);

Carga total +ve molar de los péptidos CD4 = 4.3 nmol +carga 've/nmol de los péptidos CD4 (Tabla 2)

En 100 g los péptidos CD4 existen $100 \text{ g} / 5280.6 \text{ g/ mol} = 18.9 \text{ nmol}$ de carga molar de inmunógeno CD4
 Total +ve = $18.9 \text{ nmol} \times 4.3 \text{ nmols +carga 've/nmol de los péptidos CD4} = 81.3 \text{ nmols +carga 've}$

En 300 g de los péptidos CD4 existen $300 \text{ g} / 5280.6 \text{ g/ mol} = 56.8 \text{ nmol}$ de la carga molar de inmunógeno CD4
 Total +ve = $56.8 \text{ nmol} \times 4.3 \text{ nmols +carga 've/nmol de los péptidos CD4} = 244.2 \text{ nmols +carga 've}$

3) # nmol de -carga 've contribuye por CpG1 o CpG2: Carga total calculada -'ve molar para los oligonucleótidos CpG1/CpG2 nmol de CpG1 = 31 nmol -carga 've, FW = 10,295 g/ mol (Tabla 1)

1 nmol de CpG2 = 24 nmol-carga 've, FW = 7,400 g/ mol (Tabla 1)

Tabla 5

Comparación de las Propiedades Físicas de Copolímeros PLG/PLGA Disueltos en DMSO Como una Función del Porcentaje en Peso en la Solución			
Identidad de Polímero (relación D,L-lacturo: glicolida)	Propiedades de Polímero de peso Molecular (g/mol) Viscosidad Inherente (dl/g)	% en peso de Polímero en DMSO	Viscosidad (mPa)
RG 502H (50:50)	Mw = 8,033, I.V. = 0.2	44.0 %	86.7
RG 503H (50:50)	Mw = 25,760, I.V. = 0.3	30.0 %	226.2
RG 503H (50:50)	Mw = 25,760, I.V. = 0.3	24.0 %	99.6
RG 503H (50:50)	Mw = 25,760, I.V. = 0.3	20.0 %	55.1
RG 503H (50:50)	Mw = 25,760, I.V. = 0.3	17.3 %	34.0
RG 504H (50:50)	Mw = 43,110, I.V. = 0.4	30.4 %	418.4
RG 504H (50:50)	Mw = 43,110, I.V. = 0.4	24.5 %	187.5
RG 504H (50:50)	Mw = 43,110, I.V. = 0.4	20.5 %	104.3
RG 504H (50:50)	Mw = 43,110, I.V. = 0.4	17.6 %	63.3
RG 504H (50:50)	Mw = 43,110, I.V. = 0.4	15.4 %	44.5
RG 756 (75:25)	Mw = 81,970, I.V. = 0.8	33.0 %	-----

ES 2 383 172 T3

RG 756 (75:25)	Mw = 81,970, I.V. = 0.8	24.5 %	-----
RG 756 (75:25)	Mw = 81,970, I.V. = 0.8	19.4 %	252.0
RG 756 (75:25)	Mw = 81,970, I.V. = 0.8	16.0 %	138.3
RG 756 (75:25)	Mw = 81,970, I.V. = 0.8	13.6 %	102.2
RG 756 (75:25)	Mw = 81,970, I.V. = 0.8	11.9 %	68.0
Polímero	Porcentaje en peso requerido para una solución con viscosidad evidente de - 100 mPa		
RG-503H	~ 24 %		
RG-504H	~ 20.5 %		
RG-756	~ 13.6 %		

Tabla 6

Ensayo de Inhibición B4-HRP de Suero Obtenido de Péptidos CD4, Complejos inmunoestimuladores CD4/CpG2 o Combinaciones en Emulsiones w/o			
Formulación	% de Inhibición* (semana 9)	% de Inhibición* (semana 11)	% de Inhibición* (semana 17)
péptido CD4 no adyuvado	5 %	49.1%**	8.2 %
CD4/CpG2 (2:1)	12.8 %	2.7 %	N.D.
CD4/emulsión (w/o)***	87.2 %	87.5 %	11.2 %
CD4/CpG2 (2:1)/emulsión (w/o)***	70.1 %	92.1 %	85.0 %
CD4/emulsión (w/o)****	88.6 %	61.4 %	42.6 %
CD4/CpG2 (2:1)/emulsión (w/o)****	94.9 %	95.3 %	77.2 %

ES 2 383 172 T3

Controles Positivos			
mAb B4, 20mg/mL	63 %	63 %	48.7 %
mAb B4, 2.0 mg/mL	23.5 %	11.7 %	11.7 %
<p>* - N.D. – las muestras no se evalúan</p> <p>** - El valor de 49.1 % en la semana 11 para el péptido CD4 no adyuvado no se espera y probablemente se debe a error experimental.</p> <p>*** - Emulsión agua en aceite preparada con ISA 720 por medio de técnicas de homogenización</p> <p>**** - Emulsión agua en aceite preparada con ISA 720 por medio de técnicas de extrusión</p>			

Tabla 7

Neutralización de la Cepa VIH-1 VL135 Mediante Suero Inmune para los Péptidos CD4 CD4/ Complejos Inmunoestimuladores CpG2 o Combinaciones en Emulsiones w/o (ensayo de microplaca MT-2)				
Formulación	Cepa de VIH-1 VL135 50 % de Inhibición* (semana 9)	Cepa de VIH-1 VL135 50 % de Inhibición* (semana 11)	Cepa de VIH-1 VL135 90 % de Inhibición* (semana 9)	Cepa de VIH-1 VL135 90% de Inhibición* (semana 11)
péptido CD4 no adyuvado	< 10 %	< 10 %	< 10 %	< 10 %
CD4 /emulsión (w/o)**	73 %	27 %	57 %	17 %
CD4 /CpG2 (2:1 relación de carga) / emulsión (w/o)***	12 %	40 %	<10 %	30 %
CD4 /emulsión (w/o)***	31 %	10 %	< 10 %	< 10 %
CD4 /CpG2 (2:1 relación de carga) / emulsión (w/o)***	103 %	120 %	33 %	39 %
Controles Positivos				
mAb B4	0.078 mg/mL	0.13 mg/mL	0.27 mg/mL	0.32 mg/mL

ES 2 383 172 T3

mAb B4	0.18 mg/mL	0.13 mg/mL	0.32 mg/mL	0.31 mg/mL
<p>* - Título recíproco antes de la adición de un volumen igual de virus que contiene 1-1.3 logs</p> <p>** - Emulsión agua en aceite preparado con ISA 720 mediante técnicas de homogenización</p> <p>*** - Emulsión agua en aceite preparada con ISA 720 mediante técnicas de extrusión</p>				

Tabla 8

Eficiencia de Complejación Como una Función del Péptido LHRH: Relación de Carga CpG1 Molar Mediante RP-HPLC (Masa del Cóctel de Péptido LHRH Fijo @ 400 g)			
Relación molar de carga LHRH, Péptido/CpG1	% de cada péptido unido 500:667:607E ¹	% General del Complejo LHRH/CpG presente en la mezcla ²	Dosis efectiva del LHRH unido en la forma de un Complejo LHRH/CpG
~ 8:1	500 - 0.8 % 667 - 3.7 % 607E - 13.8 %	6.1 %	24.4 µg
~ 4:1	500 - 7.8 % 667 - 12.7 % 607E - 27.2 %	15.8 %	63.2 µg
~ 2:1	500 - 23.3 % 667 - 50.3 % 607E - 97.8 %	57.1 %	228.4 µg
~ 1.5:1	500 - 69.5 % 667 - 89.5 % 607E - 100 %	% 85.9 %	343.6 µg
~ 1:1	500 - 93.5 % 667 - 99.2 % 607E - 100 %	97.6 %	390.4 µg
<p>1) Porcentaje de péptidos unidos se calcula al comparar las áreas pico RP-HPLC con relación a la composición de control LHRH evaluada en la ausencia del oligonucleótido CpG1.</p> <p>2) Porcentajes para la cantidad general del péptido complejado LHRH/CpG1 se calculan al sumar las áreas pico totales RPHPLC obtenidas y comparar que con las áreas pico RP-HPLC sumadas totales obtenidas de la composición de control se examinan en la ausencia del oligonucleótido CpG1.</p>			

Tabla 9.

Cálculos de la Relación Molar de Carga				
Inmunógenos de Péptido LHRH y FMD y Oligonucleótidos CpG				
Formulación	Péptido de Dosis	Nmols Calculados de la Carga CpG Requerida para el Péptido Específico:CpG Relación de carga nmols IgE: nmols CpG1 (+/-)1 nmols CD4: nmols CpG2 (+/-) ²	Nmol Teórico de CpG1 o CpG2 (por Masa) Requerida ³	Masa Actual (nmols) de CpG1 o CpG2 Utilizados (CpG1 – Solución patrón A = 2.0 mg/mL)
LHRH - sales minerales	25 mg	23.7:5.9 ~ 4:1, +ve relación de carga	5.9/31 = 0.2 nmols CpG1	1.83 mg CpG1 (0.1 nmols)
	400 mg	378.4:252.3 ~ 1.5:1, +ve relación de carga	252.3/31 = 8.2 nmols CpG1	87.6 mg CpG1 (8.5 nmols)
LHRH - emulsiones w/o	100 mg	94.6:11.8 ~ 16:1, +ve relación de carga	5.7/31 = 0.2 nmols CpG1	1.83g mg CpG1 (0.2 nmols)
FMD - emulsiones w/o	400 mg	205.8:51.4 ~ 4:1, +ve relación de carga	51.4/31=1.6 nmols CpG1	12.5 mg CpG1 (1.3 nmols)

1) Carga molar total calculada +ve para 25 g, 100 g o 400 g de los péptidos LHRH:

FW prom. = 4543.9 g/ mol (Tabla 2); Péptidos LHRH de carga molar total +ve = 4.3 nmol +carga 've/nmol de los péptidos LHRH (Tabla 2)

En 25 g de los péptidos LHRH existen 25 g /4543.9 g/ mol = 5.5 nmol de la carga molar de inmunógeno total LHRH +ve = 5.5 nmol x 4.3 nmols +carga 've/nmol de los péptidos LHRH = 23.7 nmols +carga 've

En 100 g de los péptidos LHRH existen 100 g /4543.9 g/ mol = 22.0 nmol de la carga molar de inmunógeno LHRH, carga molar total +ve = 22.0 nmol x 4.3 nmols +carga 've/nmol de los péptidos LHRH = 94.6 nmols +carga 've

En 400 g de los péptidos LHRH existen 400 g /4543.9 g/ m o 1 = 88.0 nmol de la carga molar de inmunógeno LHRH Total +ve = 88.0 nmol x 4.3 nmols +carga 've/nmol de los péptidos LHRH = 378.4 nmols +carga 've

2) Carga molar total calculada +ve molar para 400 g de los péptidos FMD:

FW prom. = 6805 g/ mol (Tabla 2); carga molar total +ve de los péptidos LHRH - 3.5 nmol +carga 've/nmol de los péptidos FMD (Tabla 2)

En 400 g de los péptidos FMD existen 400 g/6805 g/ mol = 58.8 nmol de la carga molar de inmunógeno FMD Total +ve = 58.8 nmol x 3.5 nmols +carga 've/nmol de los péptidos FMD = 205.8 nmol +carga 've

3) # nmol de -carga 've contribuida por CpG1: Carga molar total calculada -ve para los oligonucleótidos CpG1 1 nmol de CpG1 = 31 nmol -carga 've, FW = 10,295 g/ mol (Tabla 1)

Tabla 10.

Neutralización de Títulos de Anticuerpo y Protección de Datos Obtenidos en Ganado Inmunizado con las Vacunas FMD.				
Grupo de Animal #	Formulación	Título de Anticuerpo Neutralizante (WPI)	Título de Virus (ID ₅₀) (Fecha de exposición 6 WPI) ¹	Número de Ganado Protegido (8 WPI)
1	FMD/ISA 50v	724 256 64	10 ⁴	1/3
2	FMD/CpG1 (4:1) /ISA 50v	256 128 512	10 ⁴	3/3
3	Placebo (ISA 50v)	3 3 8	10 ⁴	0/3
1 Exposición intradermolingualmente (IDL) con un total de 10 ⁴ BID ₅₀ FMDV O inyectado en dos sitios en la superficie dorsal de la lengua.				

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Sokoll, Kenneth K. Sokoll, Kenneth K.

<120> Sistema de Suministro de Inmunógeno Sintético Estabilizado

5 <130> Sistema de Suministro de Inmunógeno

<150> US 10/076674

<151> 2002-02-14

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

10 <210> 1

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 1

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgttttgtcg tt
 32

<210> 2

5 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (1)

<223> n indica el grupo fosforotioato

<400> 2

15 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt
 24

<210> 3

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 3

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt
 24

<210> 4

25 <211> 50

<212> PRT

<213> Humano

<220>

<221> misc_feature

30 <222> (20) .. (20)

ES 2 383 172 T3

<223> Xaa indica epsilon-Lys

<400> 4

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe Xaa Cys Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser
20 25 30

Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly
35 40 45

Asn Cys
50

<210> 5

5 <211> 50

<212> PRT

<213> Humano

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (20) .. (20)

<223> Xaa indica epsilon-Lys

<400> 5

Lys Lys Lys Thr Asp Arg Val Ile Glu Val Leu Gln Arg Ala Gly Arg
1 5 10 15

Ala Ile Leu Xaa Cys Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser
20 25 30

Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly
35 40 45

Asn Cys
50

<210> 6

15 <211> 31

<212> PRT

<213> Humano

<220>

<221> misc_feature

20 <222> (20) .. (20)

<223> Xaa indica epsilon-Lys

<400> 6

ES 2 383 172 T3

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe Xaa Cys His Ala Ser Ile Tyr Asp Phe Gly Ser Cys
20 25 30

<210> 7

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Humano

<400> 7

Lys Lys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu
1 5 10 15

Leu Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 8

<211> 45

10 <212> PRT

<213> Humano

<400> 8

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
1 5 10 15

Gly Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
20 25 30

Glu Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
35 40 45

<210> 9

15 <211> 45

<212> PRT

<213> Humano

<400> 9

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
1 5 10 15

Gly Gly Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly
20 25 30

Val Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
35 40 45

20 <210> 10

<211> 44

<212> PRT

<213> Humano

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (19) .. (19)

<223> Xaa indica epsilon-Lys

<400> 10

Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr
1 5 10 15

Ile Asp Xaa Cys Gly Glu Thr Tyr Gln Ser Arg Val Thr His Pro His
20 25 30

Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Cys
35 40

10 <210> 11

<211> 45

<212> PRT

<213> Humano

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (20) .. (20)

<223> Xaa indica epsilon-Lys

<400> 11

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe Xaa Cys Gly Glu Thr Tyr Gln Ser Arg Val Thr His Pro
20 25 30

His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Cys
35 40 45

20 <210> 12

<211> 65

<212> PRT

<213> Virus de enfermedad de la fiebre aftosa

<400> 12

ES 2 383 172 T3

Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe Lys Tyr Asn Gly Ser Cys Lys Tyr Ser Asp Ala Arg Val
20 25 30

Ser Asn Cys Arg Gly Asp Leu Gln Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala
35 40 45

Gln Lys Ala Glu Arg Cys Leu Pro Ser Ser Phe Asn Tyr Gly Ala Ile
50 55 60

Lys
65

<210> 13

<211> 65

<212> PRT

5 <213> Virus de enfermedad de la fiebre aftosa

<400> 13

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe Lys Tyr Asn Gly Ser Cys Lys Tyr Ser Asp Ala Arg Val
20 25 30

Ser Asn Val Arg Gly Asp Leu Gln Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala
35 40 45

Gln Lys Ala Glu Arg Cys Leu Pro Thr Ser Phe Asn Tyr Gly Ala Ile
50 55 60

Lys
65

Referencias Citadas

1. Manning MC, et al. *Pharmaceutical Research*, 1989, 6:903-918.
2. Monfardini C, et al., *Bioconjugate Chem.*, 1998, 9:418-450.
3. Roberts MJ, et al., *J Pharm Sci*, 1998, 87:1440-1445.
- 5 4. Hilbert AK, et al., *Vaccine*, 1999, 17:1065-1073.
5. Kabanov AV, et al., U.S. 5,656,611, 1997.
6. Allcock HR, et al., U.S. Patent No. 5,562,909, 1996.
7. Cohen S, et al., U.S. Patent No. 5,149,543, 1992.
8. Moss BA, et al., WO 91/04052, 1991.
- 10 9. Cox JC, et al. *Vaccine*, 1997, 15:248-256.
10. Jones TR, et al., *Vaccine*, 1999, 17:3065-3071.
11. Bjellqvist B, et al., *Electrophoresis*, 1993, 14:1023-1031.
12. Kreig AM, et al., U.S. Patent No. 6,194,388 B1, 2001.
13. Kreig AM, et al., US Patent No. 6,207,646 B1, 2001.
- 15 14. Suharyono, et al. *Lancet*, 1992, 340:689-694.
15. Freide M, Hermand P., WO 99/52549, 1999.
16. Aguiar JC, et al. *Vaccine*, 2002, 20:275-280.
17. Scharton-Kersten T, et al. *Infect Immun*, 2000, 68:5306-5313.
18. Powell MF, et al., *Pharmaceutical Biotechnology*, Vol. 6, Plenum Press, New York, 1995.
- 20 19. Ikada Y, et al., *J Bioactive Compat Polim*, 1986, 1:32-46.
20. Kreuter J, et al. *Vaccine*, 1986, 4:125-129.
21. Jepson MA, et al. *J Drug Targeting*, 1993, 1:245-249.
22. Moldoveanu Z, et al., *J Infect Dis*, 1993, 167:84-90.
23. Matsuo K, et al. *Vaccine*, 2000, 18:1344-1350.
- 25 24. Higaki M, et al., *Vaccine*, 1998, 16:741-745.
25. Krone V, et al., U.S. Patent No. 5,700,459, 1997.
26. Eldridge JH, et al., *Mol Immunol*, 1991, 28:287-297.
27. Henry RL, U.S. Patent No. 5,126,141, 1992.
28. Henry RL, U.S. Patent No. 5,135,751, 1992.
- 30 29. Rosenberg RD, et al., WP 93/01286, 1993.
30. Dunn RL, et al., U.S. Patent No. 4,938,763, 1990.

31. Dunn RL, et al., U.S. Patent No. 5,702,716, 1997.
32. Papisov IM, et al., *Advances in Polímeros Science*, 1988, 90, 1988,139-177.
33. Chu RS, et al., *J Exp Med*, 1997, 186:1623-1631.
34. Akasaka T, et al., *Bioconjugate Chem.*, 2001, 12:776-785.
- 5 35. Ballico M, et al., *Bioconjug Chem*, 2001, 12:719-725.
36. Klinman DM, et al., *Vaccine*, 1999, 17:19-25.
37. Krieg AM, et al., *Nature* 1995, 374:546-549.
38. Klinman DM, et al., *Infect Immun*, 1999, 67:5658-5663.
39. Nagel KM, et al., *Pharmacotherapy*, 1993, 13:177-188.
- 10 40. Weeratna RD, et al., *Vaccine*, 2000, 18:1755-1762.
41. McCluskie MJ, et al., *Vaccine*, 2000, 18:231-237.
42. LiCalsi C, et al., *Vaccine*, 1999, 17:1796-1803.
43. Romera SA, et al., *Vaccine*, 2001, 19:132-141.
44. Wright JC, et al., *J Controlled Release*, 2001, 75:1-10.
- 15 45. Graham PD, et al., *J Controlled Release*, 1999, 58:233-245.
46. DesNoyer JR, et al., *J Controlled Release*, 2001, 70:285-294.
47. Aguado MT, et al., *Immunobiol*, 1992, 184:113-125.
48. Visscher GE, et al., *J Biomed Master Res*, 1985, 19:349-365.
49. Forbes RT, et al., *J Pharm Sci*, 1998, 87:13161321.
- 20 50. Overcashier DE, et al., *J Pharm Sci*, 1999, 88:688-695.
51. Wang CY, et al., WO 99/67293, 1999.
52. Wang CY, U.S. Patent No. 5,763,160, 1998.
53. Wang CY, U.S. Patent No. 6,090,388, 2000.
54. Ladd AE, et al., U.S. Patent No. 5,759,551, 1998.
- 25 55. Wang CY, U.S. 6,025,468, 2000.
56. Wang CY, USSN 09/865,294, 2001.
57. Wang CY, et al., U.S. Patent No. 6,107,021, 2000.
58. Wang CY, USSN 09/747802, 2001.
59. Wang CY, WO 99/66957, 1999.
- 30 60. Wang CY, WO 99/66950, 1999.
61. Mascotti DP, et al., *Proc Nat Acad Sci, USA*, 1990, 87:3142-3146.

62. Kabanov AV, et al., *Bioconjug chem*, 1995, 6:7-20.
63. MacDonald RC, et al., *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1061:297-303.
64. Shen F, et al., *Vaccine*, 1999, 17:3039-3049.
65. Wang CY, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 1999, 96:10367-10372.
- 5 66. Hanson CV, et al., *J. Clin Microbiol*, 1990, 28:2030-2034.
67. Park TG, et al., *J Controlled Release*, 1995, 33:211-222.
68. www.expasy.ch/tools/pi_tool.html
69. Hakim, I, et al. *J Immunol*, 1996, 157:5503-5511.
70. Zeng, XY, et al., *Theriogenology*, 2002, 58:1315-1326.
- 10 71. Office International des epizooties (OIE). *Fiebre aftosadisease. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. Paris (France): OIE, 1996, p. 47-56 (chapter 2.1.1]
72. Proietti, E, et al., *J. of Immunol*, 2002, 375-383.

REIVINDICACIONES

1. Un complejo microparticulado inmunoestimulador estabilizado que comprende un inmunógeno de péptido catiónico en donde
- 5 el inmunógeno de péptido comprende un antígeno de célula B objetivo o un epítipo CTL y un epítipo de célula cooperador T y un oligonucleótido CpG aniónico en donde el inmunógeno de péptido catiónico tiene una carga positiva neta a un pH en el rango de 5.0 a 8.0 calculado al asignar una carga +1 para cada lisina (K), arginina (R) o histidina (H), una carga -1 para cada ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E) y una carga de 0 para todos los otros aminoácidos en el inmunógeno de péptido y
- 10 en donde el oligonucleótido CpG aniónico tiene una carga negativa neta a un pH en el rango de 5.0-8.0 y es un ADN de hebra sencilla que comprende 8 a 64 bases de nucleótido con una repetición de un motivo de citosina-guanidina y el número de repeticiones del motivo CpG está en el rango de 1 a 10, y en donde el inmunógeno de péptido catiónico : la relación de carga de oligonucleótido CpG varía de 8:1 a 1:2.
2. El complejo microparticulado inmunoestimulador de la reivindicación 1, en donde el inmunógeno de péptido catiónico es una mezcla de inmunógenos de péptido sintéticos.
- 15 3. El complejo microparticulado inmunoestimulador de la reivindicación 1, en donde la carga positiva neta del inmunógeno de péptido sintético catiónico es por lo menos +2.
4. El complejo microparticulado inmunoestimulador de la reivindicación 2, en donde la carga positiva neta promedio de la mezcla de inmunógenos de péptido sintéticos es por lo menos +2.
- 20 5. El complejo microparticulado inmunoestimulador de la reivindicación 3 o 4, en donde la carga negativa neta del oligonucleótido aniónico es por lo menos -2.
6. El complejo microparticulado inmunoestimulador de la reivindicación 1, en donde el oligonucleótido CpG es una molécula de ADN de hebra sencilla con 18 - 48 bases de nucleótido y el número de repeticiones del motivo CpG allí en el rango de 3 a 8.
- 25 7. El complejo microparticulado inmunoestimulador de la reivindicación 1, en donde el oligonucleótido CpG tiene la fórmula: 5' X¹CGX² 3' en donde C y G no son metilados; y X¹ se selecciona del grupo que consiste de A (adenina), G (guanina) y T (timina); y X² es C (citosina) o T (timina).
- 30 8. El complejo microparticulado inmunoestimulador de la reivindicación 1, en donde el oligonucleótido CpG se selecciona de un grupo que consiste de 5' TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT TTG TCG TT 3' (CpG1) SEQ ID NO: 1, un oligómero de longitud base 32, y 5'nTC GTC GTT TTG TCG TTT TGT CGT T 3' (CpG2) SEQ ID NO: 2, un oligómero de longitud base 24 más un grupo fosforotioato designado como n.
9. El complejo microparticulado inmunoestimulador de la reivindicación 8, en donde el oligonucleótido CpG es 5' TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT TTG TCG TT 3' (CpG1) SEQ ID NO: 1.
10. El complejo microparticulado inmunoestimulador de la reivindicación 8, en donde el inmunógeno de péptido catiónico es un péptido sintético conjugado con un epítipo de célula cooperador T.
- 35 11. El complejo microparticulado inmunoestimulador de la reivindicación 10, en donde el inmunógeno de péptido catiónico se selecciona del grupo que consiste de SEQ ID NO: 7, 8 y 9 y una mezcla de los mismos.
12. El complejo microparticulado inmunoestimulador de la reivindicación 1, en donde el inmunógeno de péptido catiónico: la relación de carga de oligonucleótido CpG varía de 4:1 a 1:1.
- 40 13. Un proceso para preparar un complejo inmunoestimulador estabilizado de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las etapas de:
- (a) disolver o dispersar el inmunógeno de péptido catiónico en una fase acuosa seleccionada del grupo que consiste de agua desionizada destilada, solución salina, PBS y una mezcla de los mismos con la condición que el pH de la fase acuosa es menor que el punto de ionización del inmunógeno de péptido;
- 45 (b) disolver el oligonucleótido CpG aniónico en una fase acuosa seleccionada del grupo que consiste de agua desionizada destilada, solución salina, PBS y una mezcla de los mismos;

(c) agregar el oligonucleótido CpG en la fase acuosa en forma de gotas a la solución o dispersión del inmunógeno de péptido catiónico en una cantidad para formar un complejo inmunoestimulador estabilizado del inmunógeno de péptido y el oligonucleótido CpG en una relación de carga del inmunógeno de péptido catiónico al oligonucleótido CpG en el rango de 16:1 a 1:1.

- 5 14. El proceso de la reivindicación 13, que comprende adicionalmente la etapa de retirar la fase acuosa de la suspensión del complejo inmunoestimulador obtenido.
15. El proceso de la reivindicación 14, en donde la fase acuosa se retira mediante liofilización, o secado por rociado.
16. El proceso de la reivindicación 13, en donde el complejo inmunoestimulador tiene un tamaño de partícula promedio en el rango de 1 a 50 μM .
- 10 17. El proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la cantidad del inmunógeno de péptido y el oligonucleótido CpG agregado está en una relación de carga en el rango de 16:1 del inmunógeno de péptido catiónico al nucleótido CpG.
- 15 18. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la cantidad del inmunógeno de péptido y el oligonucleótido CpG agregado está en una relación de carga en el rango de 16:1 del inmunógeno de péptido catiónico al nucleótido CpG.
19. El proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la cantidad del inmunógeno de péptido y el oligonucleótido CpG agregado está en una relación de carga en el rango de 4:1 del inmunógeno de péptido catiónico al nucleótido CpG.
- 20 20. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la cantidad del inmunógeno de péptido y el oligonucleótido CpG agregado está en una relación de carga en el rango de 4:1 del inmunógeno de péptido catiónico al nucleótido CpG.
21. El proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la cantidad del inmunógeno de péptido y el oligonucleótido CpG agregado está en una relación de carga en el rango de 2:1 del inmunógeno de péptido catiónico al nucleótido CpG.
- 25 22. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la cantidad del inmunógeno de péptido y el oligonucleótido CpG agregado está en una relación de carga en el rango de 2:1 del inmunógeno de péptido catiónico al nucleótido CpG.
- 30 23. El proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la cantidad del inmunógeno de péptido y el oligonucleótido CpG agregado está en una relación de carga en el rango de 1.5:1 del inmunógeno de péptido catiónico al nucleótido CpG.
24. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la cantidad del inmunógeno de péptido y el oligonucleótido CpG agregado está en una relación de carga en el rango de 1.5:1 del inmunógeno de péptido catiónico al nucleótido CpG.
- 35 25. El proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la cantidad del inmunógeno de péptido y el oligonucleótido CpG agregado está en una relación de carga en el rango de 1:1 del inmunógeno de péptido catiónico al nucleótido CpG.
26. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la cantidad del inmunógeno de péptido y el oligonucleótido CpG agregado está en una relación de carga en el rango de 1:1 del inmunógeno de péptido catiónico al nucleótido CpG.
- 40 27. Un proceso para preparar una emulsión agua en aceite que comprende un complejo inmunoestimulador de la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- (a) preparar un complejo inmunoestimulador en fase acuosa seleccionada del grupo que consiste de agua desionizada destilada, solución salina y solución salina regulada con fosfato;
- 45 (b) agregar el complejo inmunoestimulador en la fase acuosa en una fase de aceite continua seleccionada del grupo que consiste de un aceite sintético, un aceite vegetal, un aceite mineral, un aceite de animal metabolizable y una mezcla de los mismos;

(c) dispersar bajo corte mecánico el complejo inmunoestimulador en la fase acuosa en una fase de aceite continua para formar una emulsión agua en aceite homogénea

28. Un proceso para preparar a emulsión agua en aceite de acuerdo con la reivindicación 27, en donde la etapa (c) comprende:

5 (a) cargar una primera jeringa con la fase acuosa que contiene un complejo inmunoestimulador;

(b) cargar una segunda jeringa con la fase de aceite que tiene una viscosidad inherente de menos de 1,500 mPa;

(c) conectar la primera y segunda jeringas a través de un tubo con orificio angosto a un soporte de membrana que aloja una membrana de tamaño de poro controlado 0.05-20 mM;

10 (d) extrudir la fase acuosa en la fase de aceite mediante intercambios repetidos a través de la membrana hasta que se forma la emulsión w/o homogénea.

29. El proceso de la reivindicación 27, en donde la fase de aceite se selecciona del grupo que consiste de un aceite metabolizable o no metabolizable seleccionado del grupo que consiste de Montanide® ISA 720, Montanide® ISA 51, Montanide® ISA 50v o una mezcla de los mismos.

15 30. El proceso de la reivindicación 28, en donde la fase de aceite se selecciona del grupo que consiste de un aceite metabolizable o no metabolizable seleccionado del grupo que consiste de Montanide® ISA 720, Montanide® ISA 51, Montanide® ISA 50v o una mezcla de los mismos.

31. El proceso de la reivindicación 27, en donde la fase acuosa puede comprender adicionalmente un tensoactivo, un estabilizante de emulsión, o una combinación de los mismos.

20 32. El proceso de la reivindicación 28, en donde la fase acuosa puede comprender adicionalmente un tensoactivo, un estabilizante de emulsión, o una combinación de los mismos.

33. El proceso de la reivindicación 31, en donde el estabilizante de emulsión se selecciona del grupo que consiste de un mannida-oleato y un derivado de los mismos.

34. El proceso de la reivindicación 32, en donde el estabilizante de emulsión se selecciona del grupo que consiste de un mannida-oleato y un derivado de los mismos.

25 35. El proceso de la reivindicación 27, en donde la fase de aceite comprende adicionalmente un adyuvante seleccionado del grupo que consiste de MPL, MDP, DDA, Avridina, BAY-1005, DC-Chol, Murapalmitina y un derivado de los mismos.

30 36. El proceso de la reivindicación 28, en donde la fase de aceite comprende adicionalmente un adyuvante seleccionado del grupo que consiste de MPL, MDP, DDA, Avridina, BAY-1005, DC-Chol, Murapalmitina y un derivado de los mismos.

37. El proceso de la reivindicación 27, en donde la fase acuosa comprende adicionalmente un adyuvante soluble acuoso seleccionado del grupo que consiste de PCPP, una saponina, una Toxina del Cólera, una Enterotoxina lábil al calor de *E. Coli* y una citoquina, seleccionada del grupo que consiste de IL-1 β , IL-2, IL-12, IFN- γ y un derivado de los mismos.

35 38. El proceso de la reivindicación 37, en donde el derivado de citoquina es un fragmento de péptido derivado de IL-1 β , SEQ ID NO: 14.

40 39. El proceso de la reivindicación 28, en donde la fase acuosa comprende adicionalmente un adyuvante soluble acuoso seleccionado del grupo que consiste de PCPP, una saponina, una Toxina del Cólera, una Enterotoxina lábil al calor de *E. Coli* y una citoquina seleccionada del grupo que consiste de IL-1 β , IL-2, IL-12, IFN- γ y un derivado de los mismos.

40. El proceso de la reivindicación 39, en donde el derivado de citoquina es el fragmento de péptido derivado de IL-1 β , SEQ ID NO: 14.

41. Un proceso de la reivindicación 14 que comprende adicionalmente las etapas:

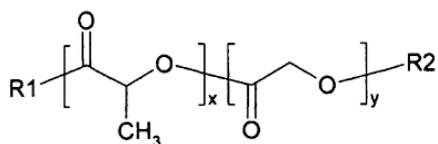
(a) preparar una solución de un polímero gelificante in situ seleccionado del grupo que consiste de copolímero poli-D,L-lacturocoglicolida, copolímero de ácido poli-D,L-láctico-ácido co-glicólico, policaprolactona, polianhídrido, poliortoéster, y poli(ácido α -hidroxibutírico) en un solvente biocompatible seleccionado del grupo que consiste de dimetil sulfóxido (DMSO), N-metil pirrolidina (NMP), triacetina y glicerina;

5 (b) reconstituir el complejo inmunoestimulador en forma seca en la solución del polímero gelificante in situ en el solvente biocompatible.

42. El proceso de la reivindicación 41, en donde en la etapa (b) el complejo inmunoestimulador en forma seca utilizado se obtiene mediante liofilización.

43. El proceso de la reivindicación 41 en donde el polímero biodegradable es

10

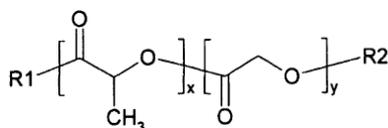


R1= OAlquilo (PLG) o OH (PLGA)

R2= H

en donde R1 es OH o alcoxi que tiene 1 a 5 carbonos y R2 es H; x;y es la relación de cada unidad de monómero del copolímero con x+y = 1.

15 44. El proceso de la reivindicación 42, en donde dicho polímero biodegradable es



R1= OAlquilo (PLG) o OH (PLGA)

R2= H

20 En donde R1 es OH o alcoxi que tiene 1 a 5 carbonos y R2 es H; x;y es la relación de cada unidad de monómero del copolímero con x+y = 1.

45. El proceso de la reivindicación 43, en donde el copolímero tiene un peso molecular en el rango de 2,000-100,000 daltons y una viscosidad inherente de 0.1-1.0 dl/g.

46. El proceso de la reivindicación 44, en donde el copolímero tiene un peso molecular en el rango de 2,000-100,000 daltons y una viscosidad inherente de 0.1-1.0 dl/g.

25 47. El proceso de la reivindicación 41, en donde el peso del polímero gelificante in situ biodegradable disuelto en el solvente biocompatible está en el rango de 5 p/p % a 50 p/p%.

48. El proceso de la reivindicación 42, en donde el peso del polímero gelificante in situ biodegradable disuelto en el solvente biocompatible está en el rango de 5 p/p % a 50 p/p%.

30 49. El proceso de la reivindicación 41, en donde la etapa (c) comprende adicionalmente disolver un adyuvante soluble en aceite seleccionado del grupo que consiste de 3-O-desacil-4'-monofosforil de lípido A (MPL), N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (MDP), Bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA), N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxi-etil) propanodiamina (Avridina), hidroacetato N-(2-Desoxi-2-1-leucilamino- β -D-glucopiranosil)-N-octadecil-dodecanoilamida (BAY- 1005), 3 β -[N-(N,N'-dimetilaminoetano)-carbamoil] colesterol (DC-Chol), NAc-Mur-L-Thr-D-isoGln-sn-glicerol dipalmitoil (Murapalmitina) y una citoquina seleccionada del grupo que consiste de IL-1 β , IL-2, IL-12, IFN- γ y un derivado de los mismos en el solvente biocompatible.

35

50. El proceso de la reivindicación 42, en donde la etapa (c) comprende adicionalmente disolver un adyuvante soluble en aceite seleccionado del grupo que consiste de 3-O-desacil-4'-monofosforil de lípido A (MPL), N-acetil-

- 5 muramil-L-alanil-D-isoglutamina (MDP), Bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA), *N,N*-dioctadecil-*N,N*-bis(2-hidroxi-etil) propanodiamina (Avridina), hidroacetato *N*-(2-Desoxi-2-1-leucilamino- β -D-glucopiranosil)-*N*-octadecil-dodecanoilamida (BAY- 1005), 3β -[*N,N'*-dimetilaminoetano]-carbamoil] colesterol (DC-Chol), NAc-Mur-L-Thr-D-isoGln-sn-glicerol dipalmitoil (Murapalmitina) y una citoquina seleccionada del grupo que consiste de IL-1 β , IL-2, IL-12, IFN- γ y mezclas y derivados de los mismos en el solvente biocompatible.
51. Un proceso para preparar una suspensión que comprende un complejo inmunoestimulador que comprende las etapas de:
- (a) preparar un complejo inmunoestimulador de la reivindicación 1 en una fase acuosa seleccionada del grupo que consiste de agua desionizada destilada, solución salina y solución salina regulada con fosfato;
- 10 (b) preparar una suspensión de una sal mineral seleccionada del grupo que consiste de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, y fosfato de calcio, en una fase acuosa seleccionada del grupo que consiste de agua desionizada destilada, solución salina y solución salina regulada con fosfato;
- (c) agregar el complejo inmunoestimulador en la fase acuosa en una fase acuosa que contiene la suspensión de sal mineral;
- 15 (d) mezclar el complejo inmunoestimulador con la suspensión de sal mineral para formar una suspensión mezclada.
52. Un proceso para preparar una suspensión que comprende un complejo inmunoestimulador que comprende las etapas de:
- (a) preparar una solución de un inmunógeno de péptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 3-13 en una fase acuosa seleccionada del grupo que consiste de agua desionizada destilada, solución salina y solución salina regulada con fosfato;
- 20 (b) preparar una suspensión de una sal mineral seleccionada del grupo que consiste de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato de calcio en una fase acuosa seleccionada del grupo que consiste de agua desionizada destilada, solución salina y solución salina regulada con fosfato;
- (c) agregar la solución de péptido a la suspensión de la sal mineral con mezcla;
- 25 (d) agregar un nucleótido CpG seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 con mezcla para formar una suspensión mezclada de un complejo inmunoestimulador y una sal mineral.
53. El proceso de la reivindicación 51, en donde la sal mineral se selecciona del grupo que consiste de fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio y una mezcla de los mismos.
- 30 54. El proceso de la reivindicación 52, en donde la sal mineral se selecciona del grupo que consiste de fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio y una mezcla de los mismos.
55. El proceso de la reivindicación 51, en donde la fase acuosa puede comprender adicionalmente un tensoactivo, un tónico, un conservante o cualquier combinación de los mismos.
56. El proceso de la reivindicación 52, en donde la fase acuosa puede comprender adicionalmente un tensoactivo, un tónico, un conservante o cualquier combinación de los mismos.
- 35 57. El proceso de la reivindicación 55, en donde la fase acuosa comprende un tónico seleccionada del grupo que consiste de PBS o solución salina y una mezcla de los mismos.
58. El proceso de la reivindicación 56, en donde la fase acuosa comprende un tónico seleccionada del grupo que consiste de PBS o solución salina y una mezcla de los mismos.
- 40 59. El proceso de la reivindicación 55 que comprende adicionalmente agregar a la fase acuosa un conservante seleccionado del grupo que consiste de 2-fenoxi-etanol y un derivado de los mismos.
60. El proceso de la reivindicación 56 que comprende adicionalmente agregar a la fase acuosa un conservante seleccionado del grupo que consiste de 2-fenoxi-etanol y un derivado de los mismos.
61. El proceso de la reivindicación 51 que comprende adicionalmente agregar a la fase acuosa un adyuvante seleccionado del grupo que consiste de MPL, MDP, DDA, Avridina, BAY-1005, DC-Chol, Murapalmitina, PCPP, una

saponina, una Toxina del Cólera, una Enterotoxina lábil al calor de *E. Coli* y una citoquina seleccionada del grupo que consiste de IL-15, IL-2, IL-12, IFN- γ y un derivado de los mismos.

5 62. El proceso de la reivindicación 52 que comprende adicionalmente agregar a la fase acuosa un adyuvante seleccionado del grupo que consiste de MPL, MDP, DDA, Avridina, BAY-1005, DC-Chol, Murapalmitina, PCPP, una saponina, una Toxina del Cólera, una Enterotoxina lábil al calor de *E. Coli* y una citoquina seleccionada del grupo que consiste de IL-18, IL-2, IL-12, IFN- γ y un derivado de los mismos.

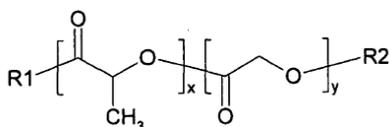
63. Una composición farmacéutica que comprende una suspensión de un complejo inmunoestimulador de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en un solvente acuoso seleccionado del grupo que consiste de agua desionizada destilada, solución salina y solución salina regulada con fosfato.

10 64. Una composición farmacéutica que comprende a emulsión agua en aceite de un complejo inmunoestimulador de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

15 65. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 63 que comprende adicionalmente un adyuvante seleccionado del grupo que consiste de MPL, MDP, DDA, Avridina, BAY-1005, DC-Chol, Murapalmitina, PCPP, una saponina, una Toxina del Cólera, una Enterotoxina lábil al calor de *E. Coli* y una citoquina seleccionada del grupo que consiste de IL-1 β , IL-2, IL-12, IFN- γ y un derivado de los mismos.

20 66. Una composición farmacéutica que comprende un gel de un complejo inmunoestimulador de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en donde el gel se forma *in situ* al agregar el complejo inmunoestimulador en forma seca a una solución de un polímero biocompatible gelificante *in situ* seleccionado del grupo que consiste de copolímero poli-D,L-lacturo-coglicolida, copolímero de ácido poli-D,L-láctico-ácido co-glicólico, policaprolactona, polianhídrido, poliortoéster, y poli(ácido α -hidroxibutírico) en un solvente biocompatible seleccionado del grupo que consiste de dimetil sulfóxido (DMSO), N-metil pirrolidina (NMP), triacetina y glicerina.

67. La composición farmacéutica de la reivindicación 66, en donde el polímero biodegradable es



R1= OAlquilo (PLG) o OH (PLGA)

25 R2= H

en donde R1 es OH o alcoxi que tiene 1 a 5 carbonos y R2 es H; x;y es la relación de cada unidad de monómero del copolímero con $x+y = 1$.

68. La composición farmacéutica de la reivindicación 67 en donde el polímero biodegradable tiene un peso molecular en el rango de 2,000-100,000 daltons y una viscosidad inherente de 0.1-1.0 dl/g.

30 69. Una composición farmacéutica que comprende una suspensión acuosa de una sal mineral y un complejo inmunoestimulador de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en donde la sal mineral se selecciona del grupo que consiste de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, fosfato de calcio.

70. La composición farmacéutica de la reivindicación 69, en donde la fase acuosa se selecciona del grupo que consiste de agua desionizada destilada, solución salina, PBS y una mezcla de los mismos.

35 71. La composición farmacéutica de la reivindicación 69 que comprende adicionalmente un conservante seleccionado del grupo que consiste de 2-fenoxi-etanol y un derivado de los mismos en la fase acuosa.

72. Una composición de acuerdo con 63 para uso como una sustancia farmacéutica activa.

Figura 1
Esquema de Proceso de Comparación

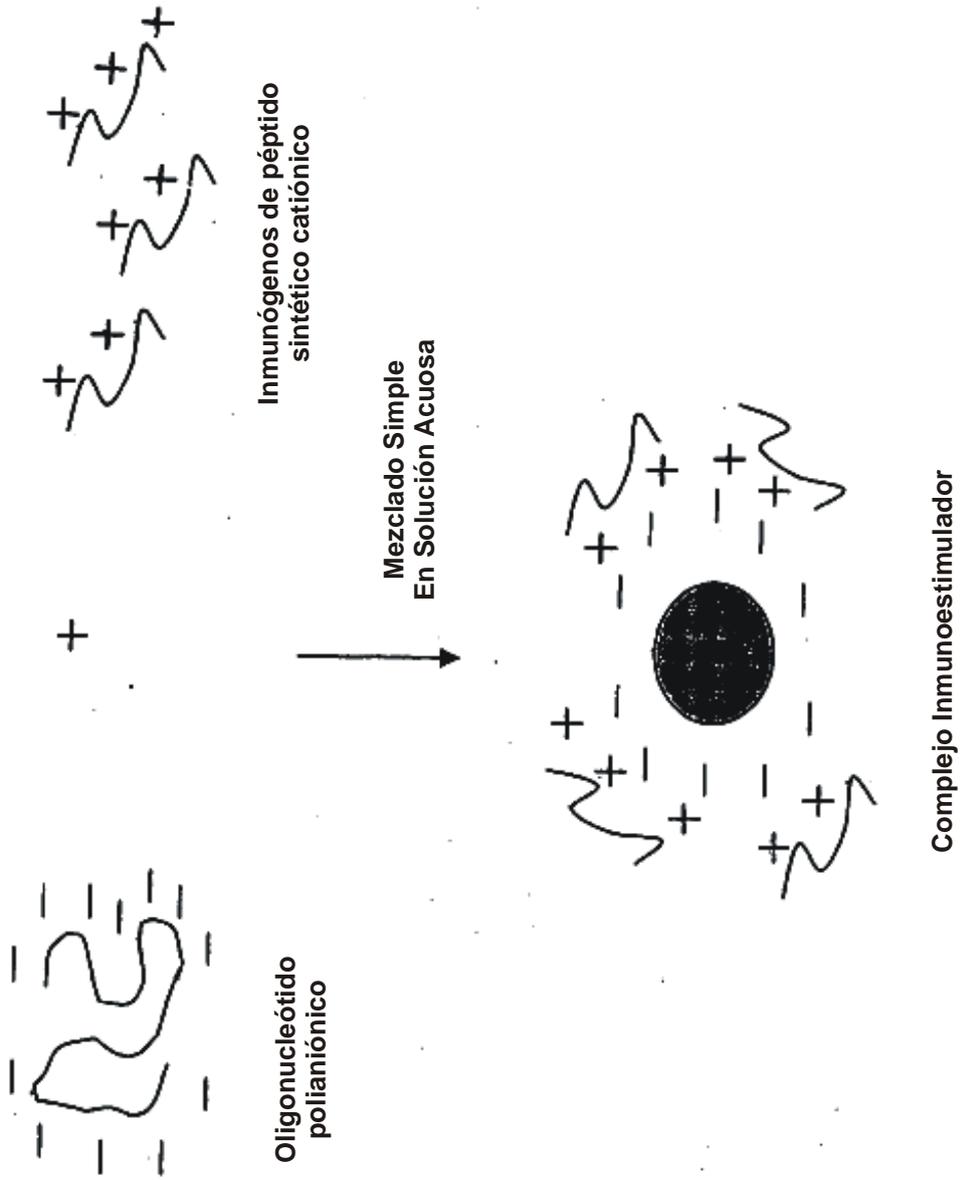


Figura 2
Inmunógenos Sintéticos LHRH: Complejos de Oligonucleótido
Distribución de Tamaño de Partícula Vs. Relación de Carga Molar Relativa

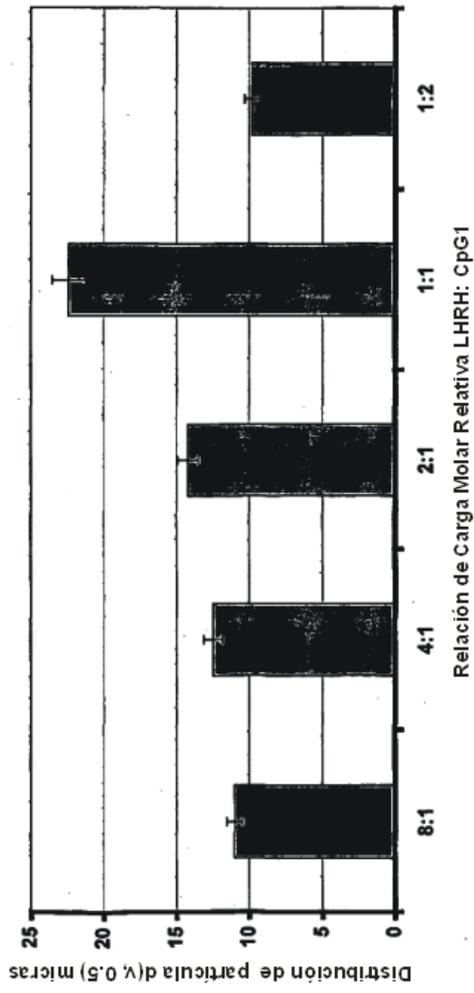


Figura 3
Esquema de Proceso de Emulsión W/O por medio de Homogenización o Extrusión

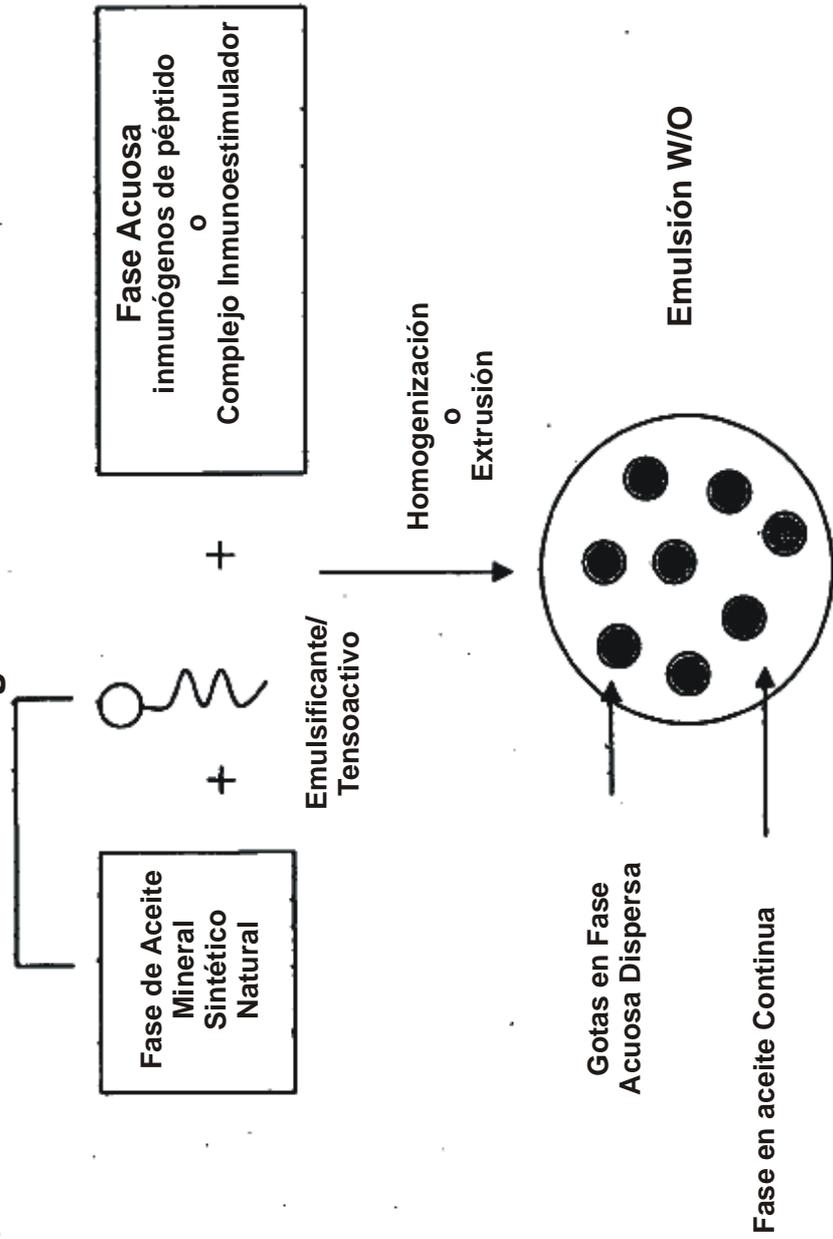
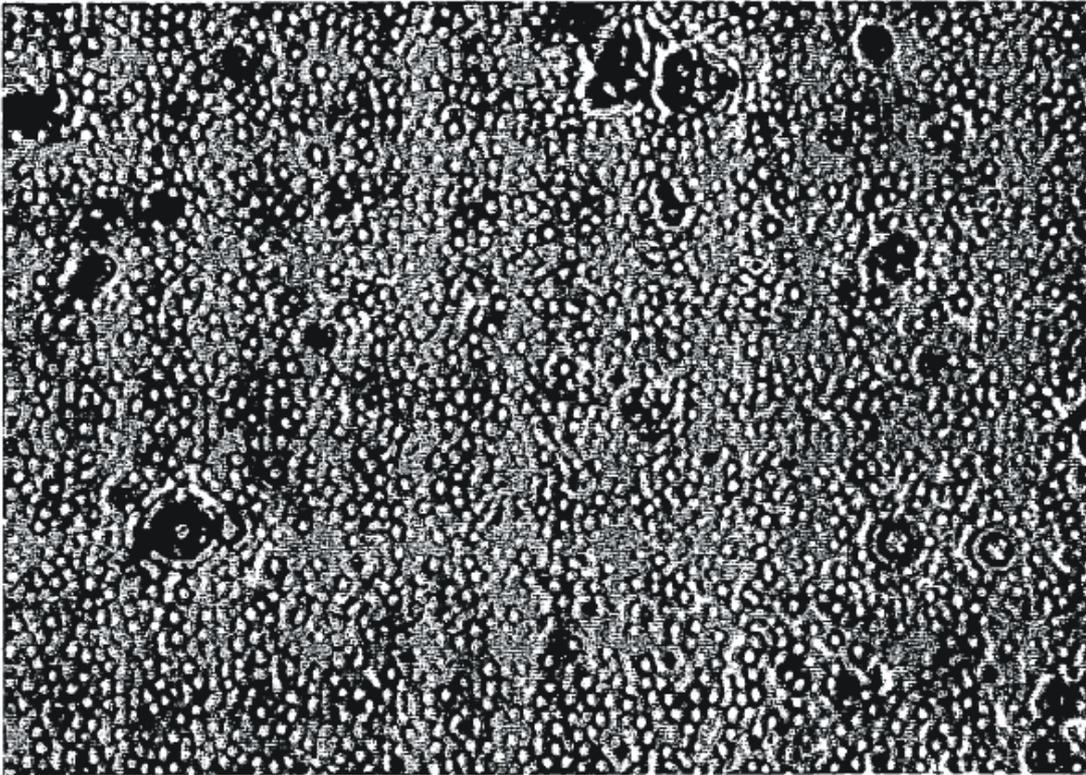


Figura 4

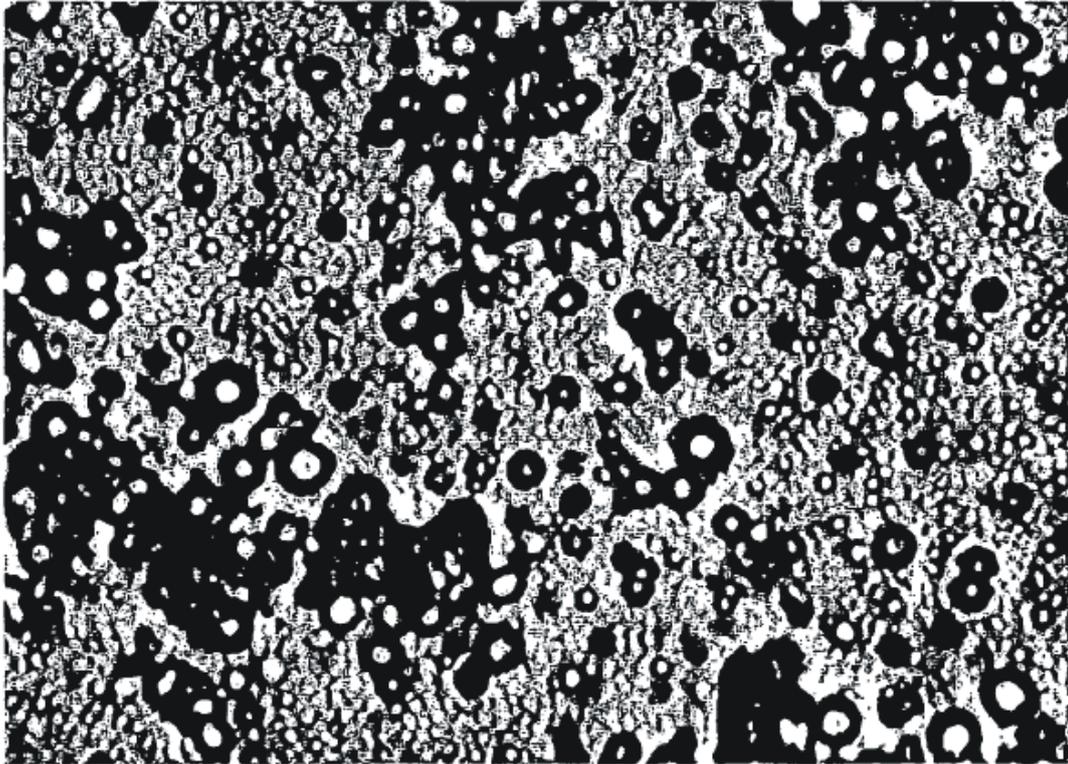
Emulsión W/O Homogenizada
Péptidos LHRH: Oligonucleótidos CpG1 (relación 4.1)



200x 5um

Figura 5

Emulsión W/O Extrudida
Péptidos LHRH: Oligonucleótidos CpG1 (relación 4.1)




200x 5um

Figura 6

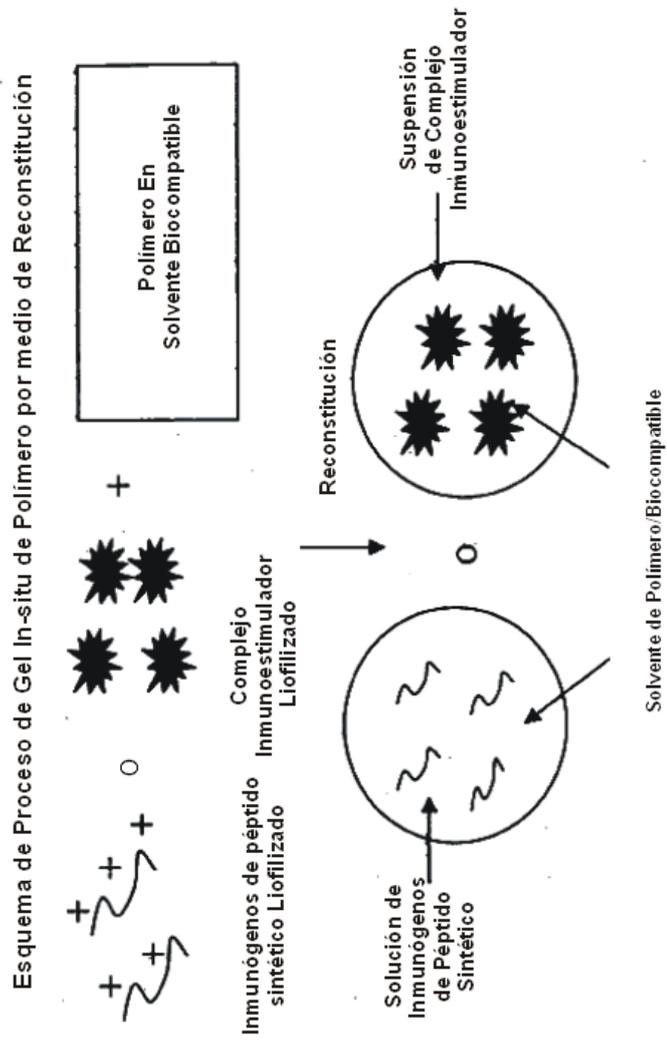


Figura 7
 (Péptidos IgE/Complejos de CpG1 + Emulsiones W/O homogenizadas)
 3 inmunizaciones (semana 0, 3, 6), Hemorragias (semana 3, 5, 9, 11, 17)

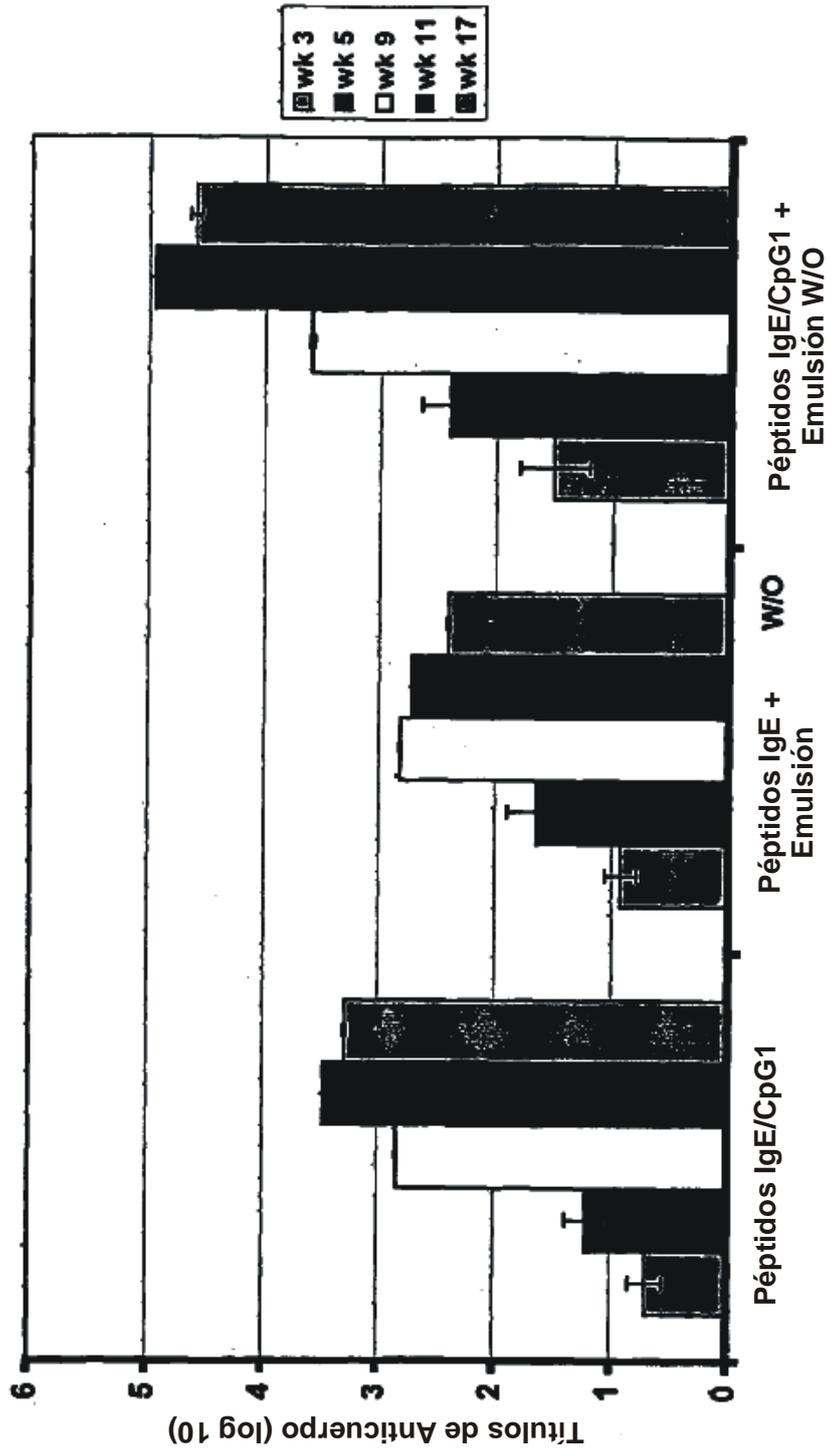


Figura 8
(Péptidos CD4/Complejos de CpG2 + Emulsiones W/O homogenizadas)
3 inmunizaciones (semana 0, 3, 6), Hemorragias (semana 3, 5, 9, 11, 17)

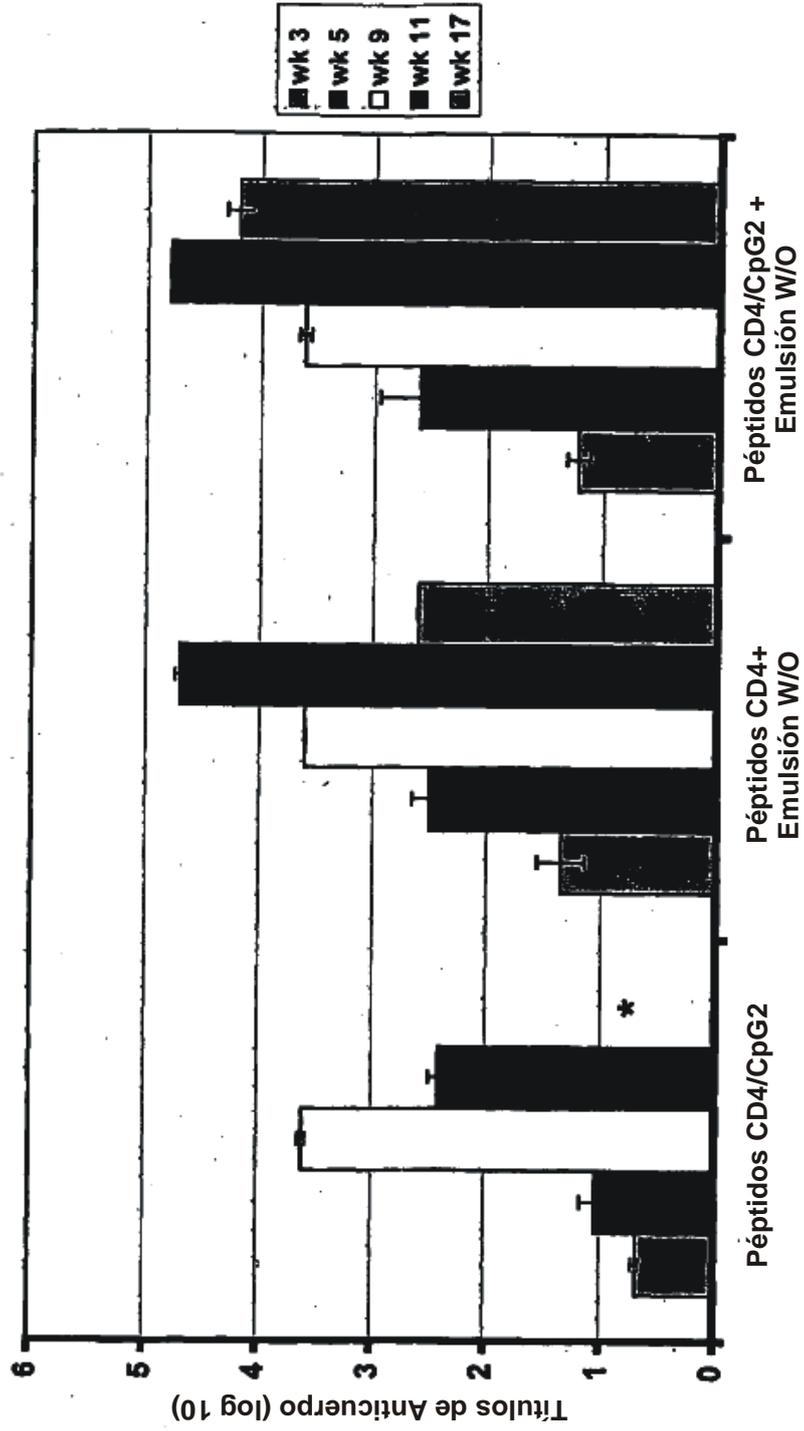


Figura 9
 (Péptidos IgE/Complejos de CpG1 + Emulsiones W/O Extrudidas)
 3 inmunizaciones (semana 0, 3, 6), Hemorragias (semana 3, 5, 9, 11, 17)

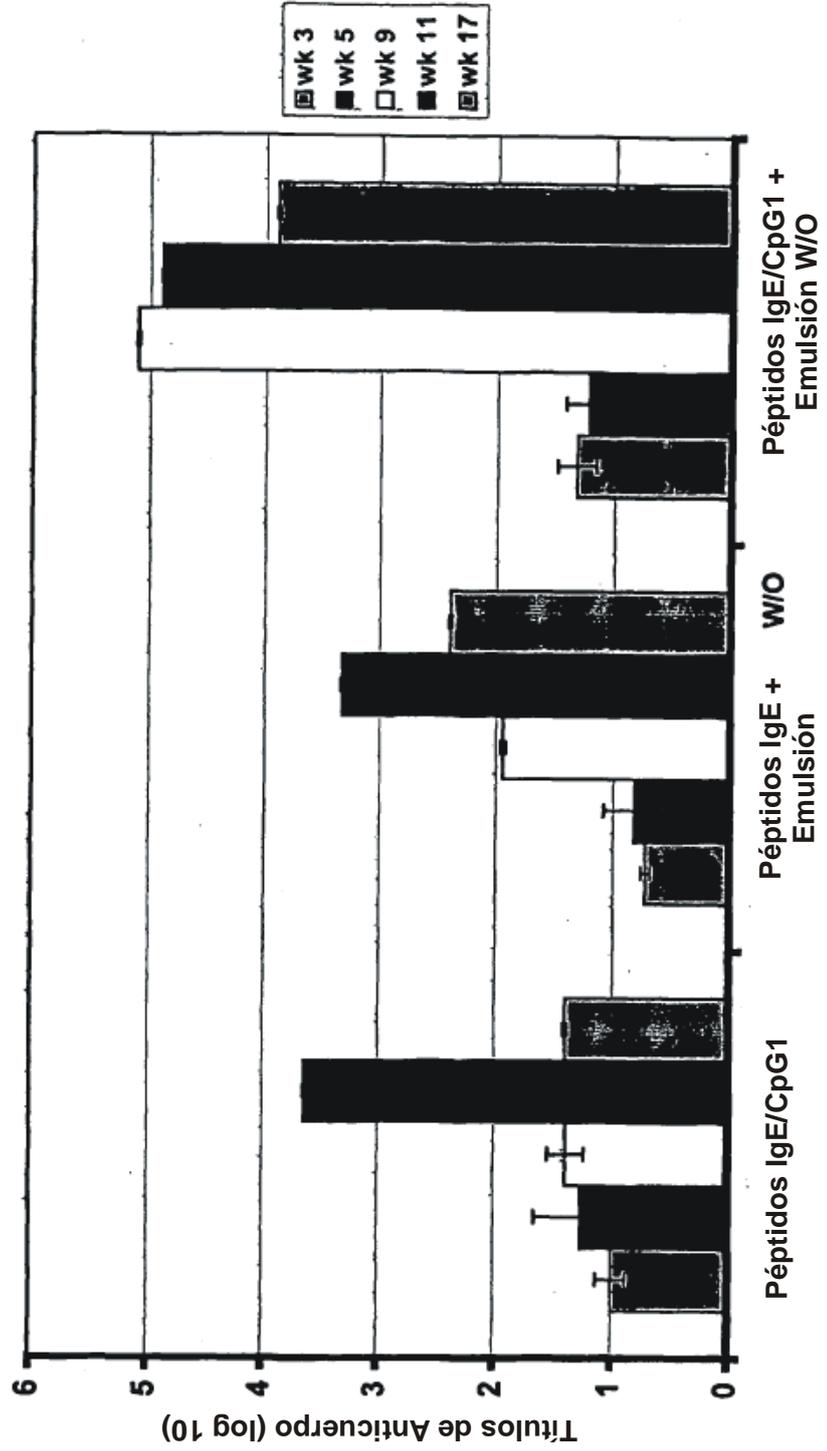


Figura 10
 (Péptidos CD4/Complejos de CpG2 + Emulsiones W/O Extrudidas
 3 inmunizaciones (semana 0, 3, 6), Hemorragias (semana 3, 5, 9, 11, 17)

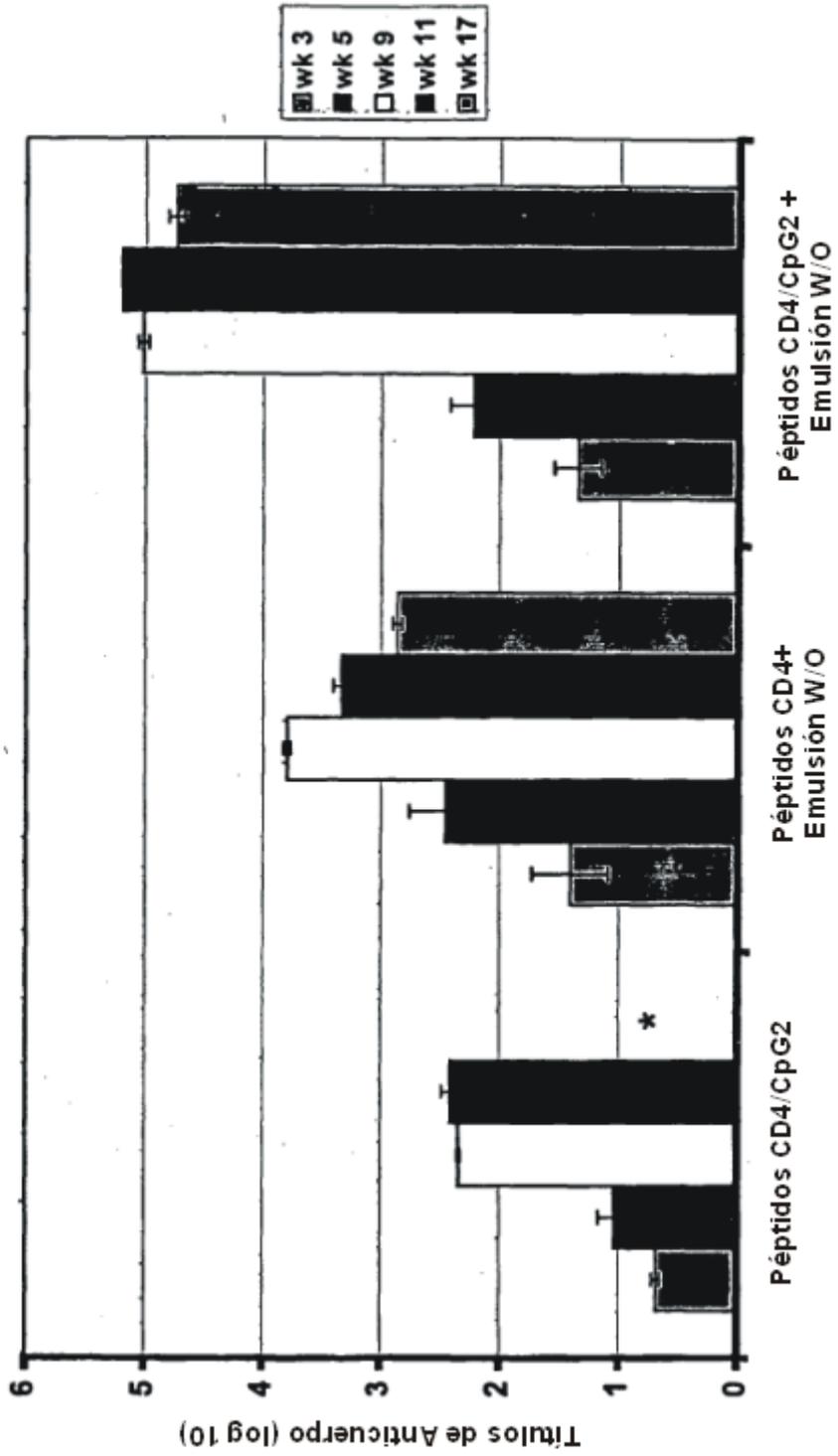


Figura 11
 (Péptidos IgE/Complejos de CpG1 + Geles PLGA/DMSO
 Inmunización de Dosis Única, Hemorragias (semana 3, 6, 9, 12)

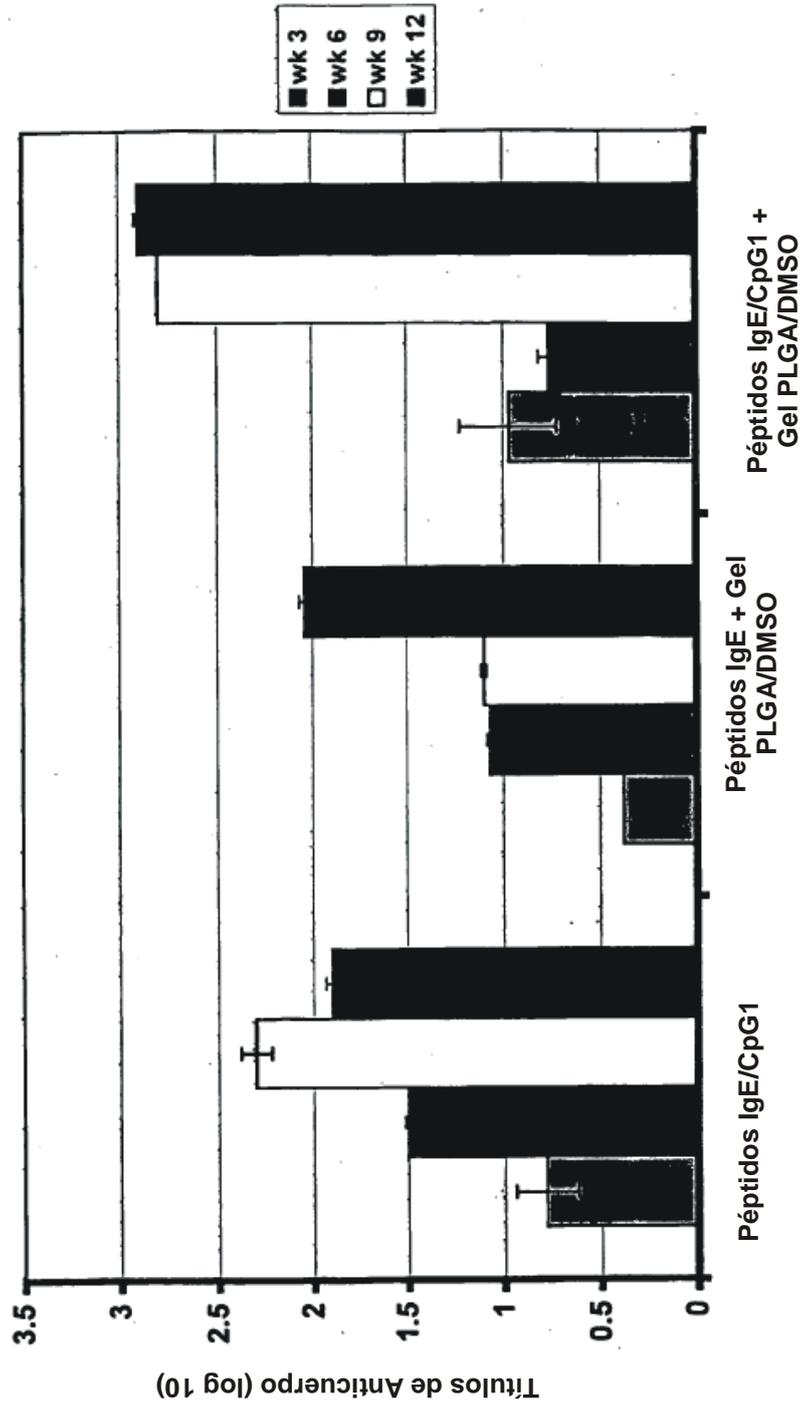


Figura 12
 (Péptidos CD4/Complejos de CpG2 + Geles PLGA/DMSO
 Inmunización de Dosis Única, Hemorragias (semana 3, 6, 9, 12)

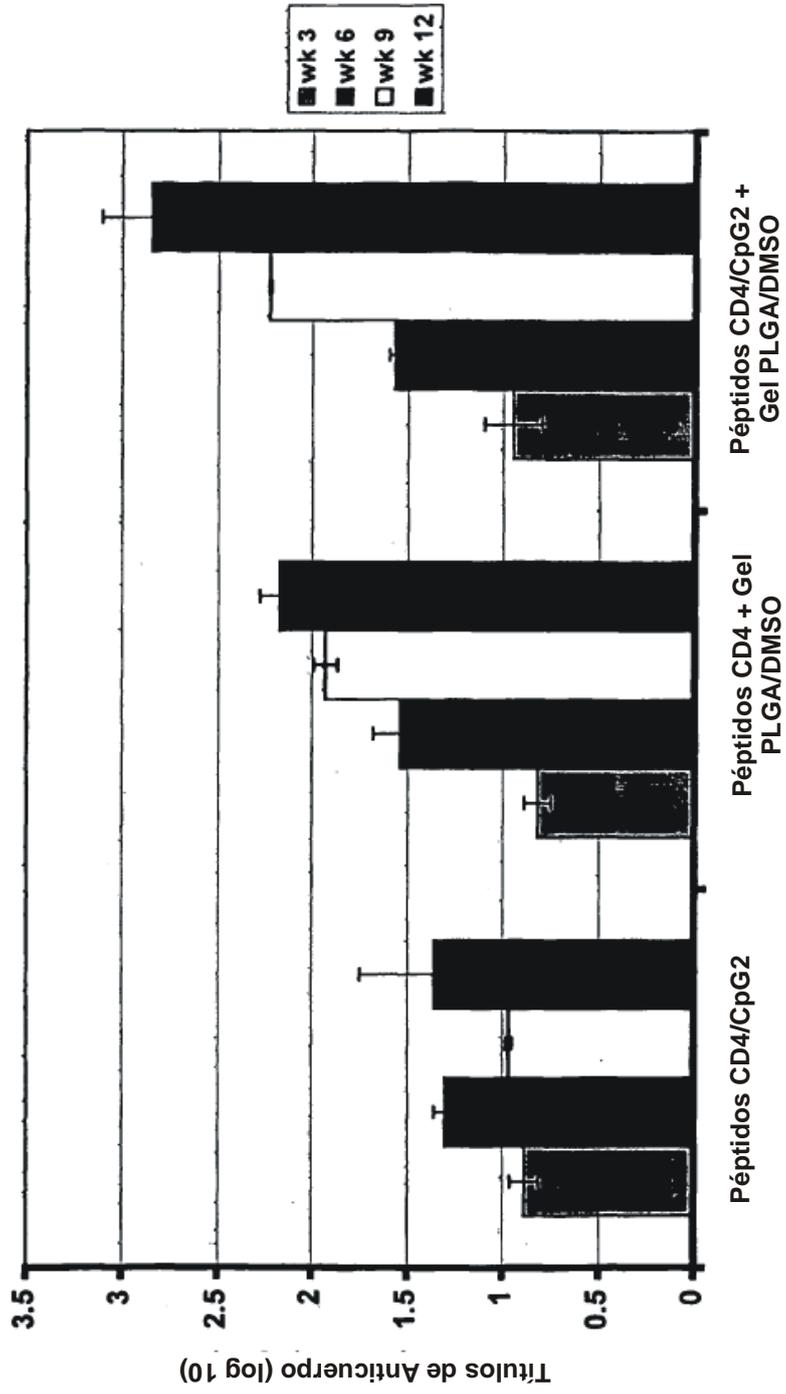


Figura 13a
Péptidos LHRH/Complejos de CpG1 (4:1) + Sal Mineral
3 inmunizaciones (semana 0, 4, 8), Hemorragias (semana 0, 4, 6, 8, 12) en ratas

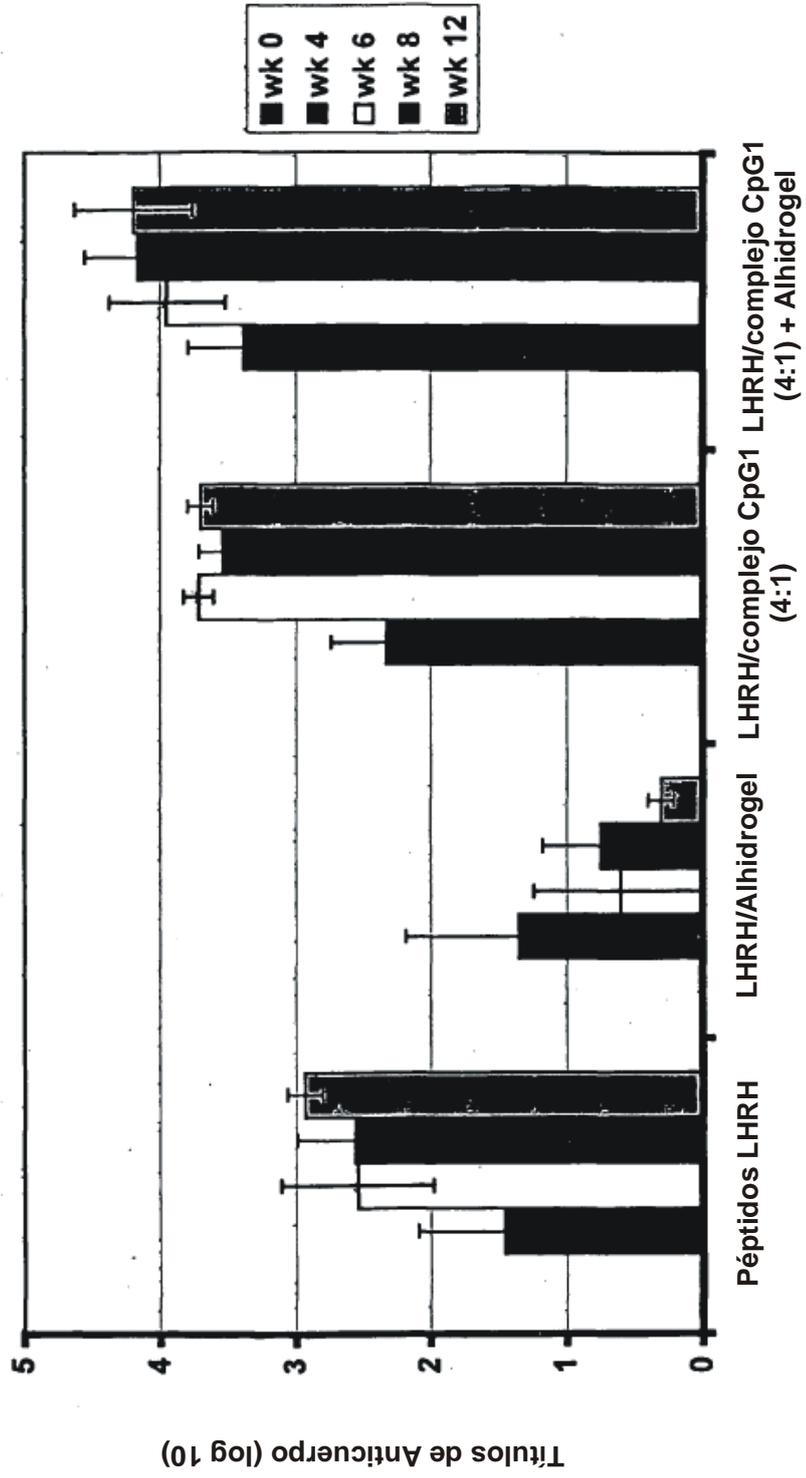


Figura 13b
 Péptidos LHRH/Complejos de CpG1 (4:1) + Sal Mineral
 3 inmunizaciones (semana 0, 4, 8), Hemorragias (semana 0, 4, 6, 8, 12) en ratas

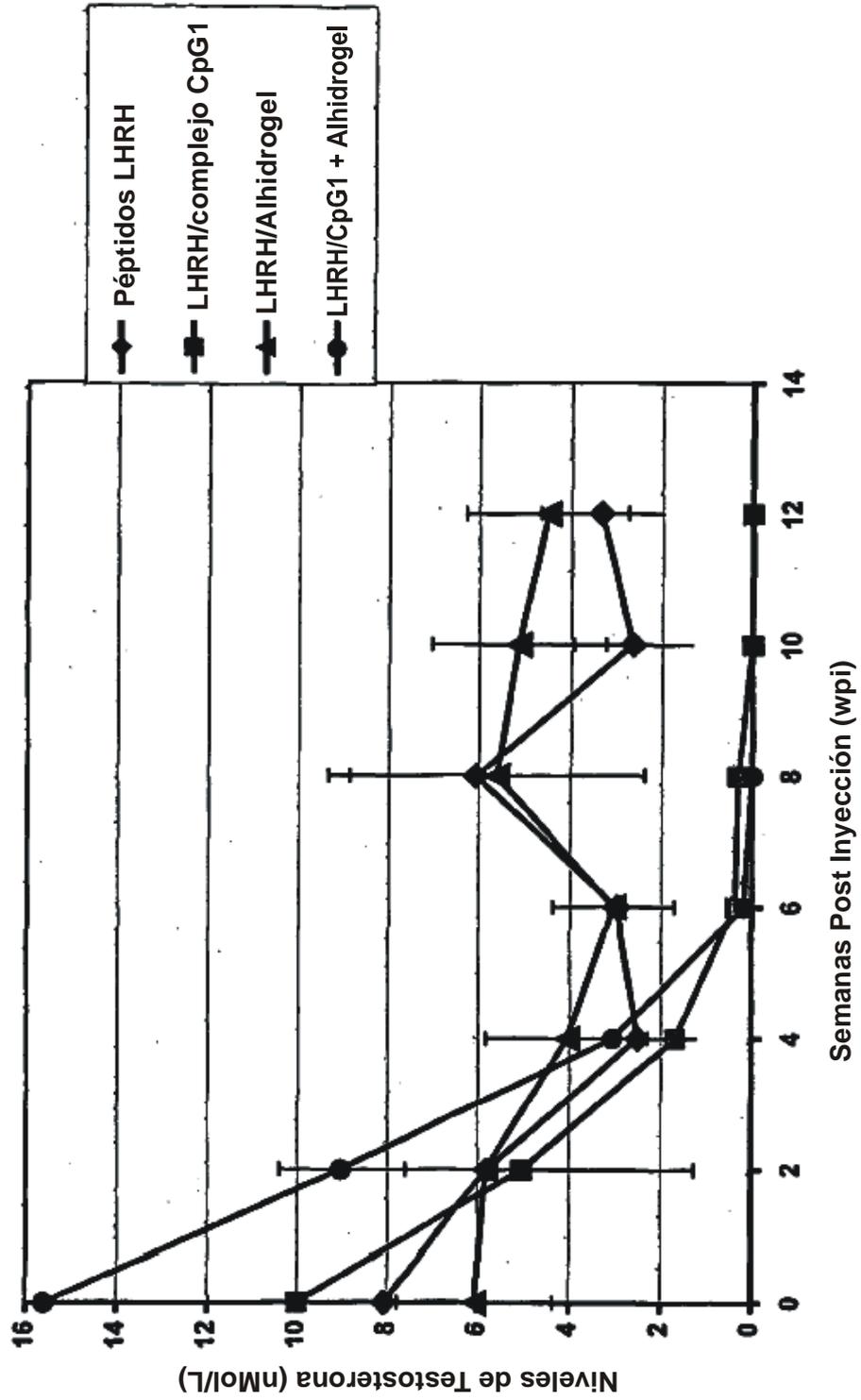


Figura 14a
 Péptidos LHRH/Complejos de CpG1 (4:1) + Sal Mineral
 3 inmunizaciones (semana 0, 4, 8), Hemorragias (semana 0, 4, 6, 8, 12) en babuinos

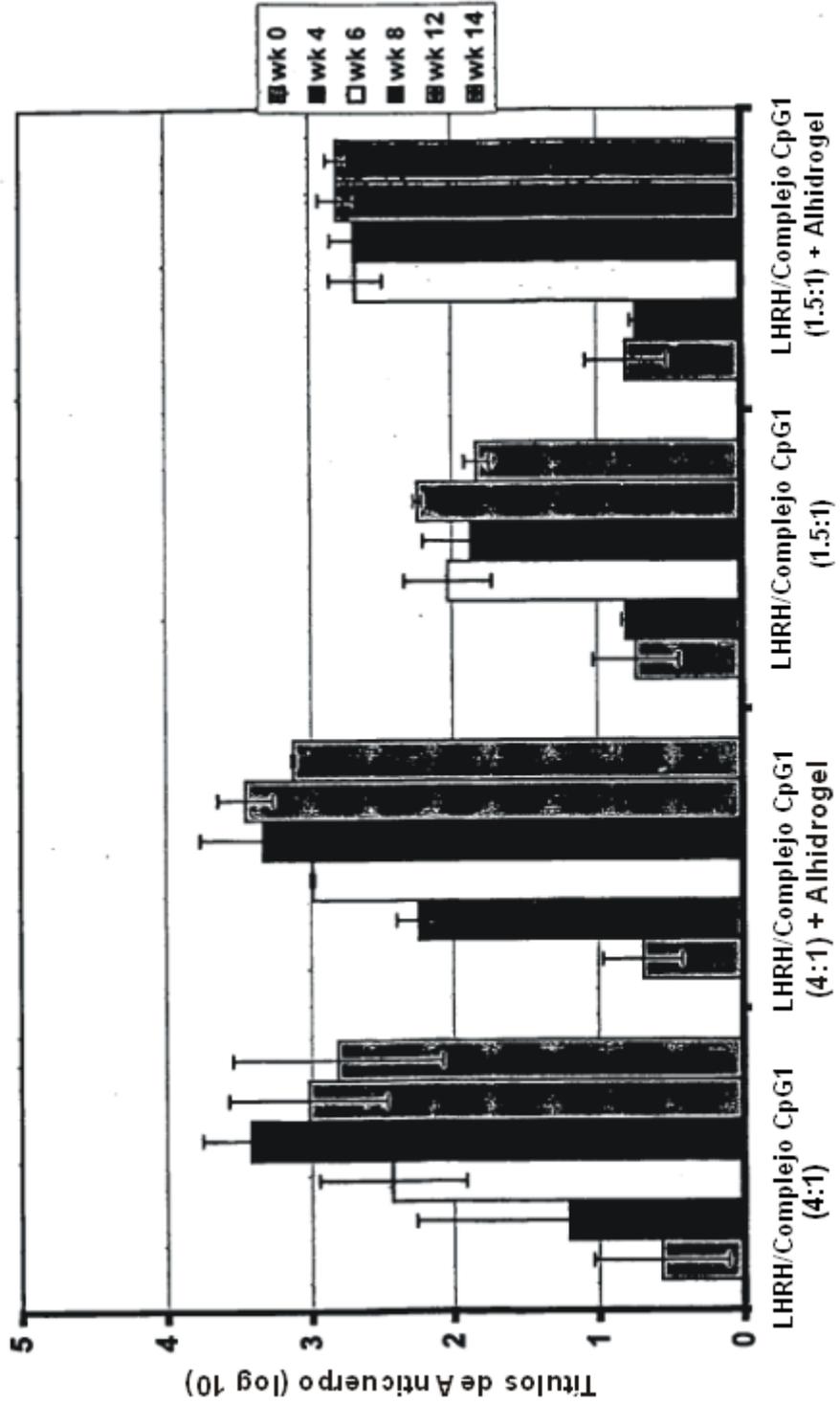


Figura 14b

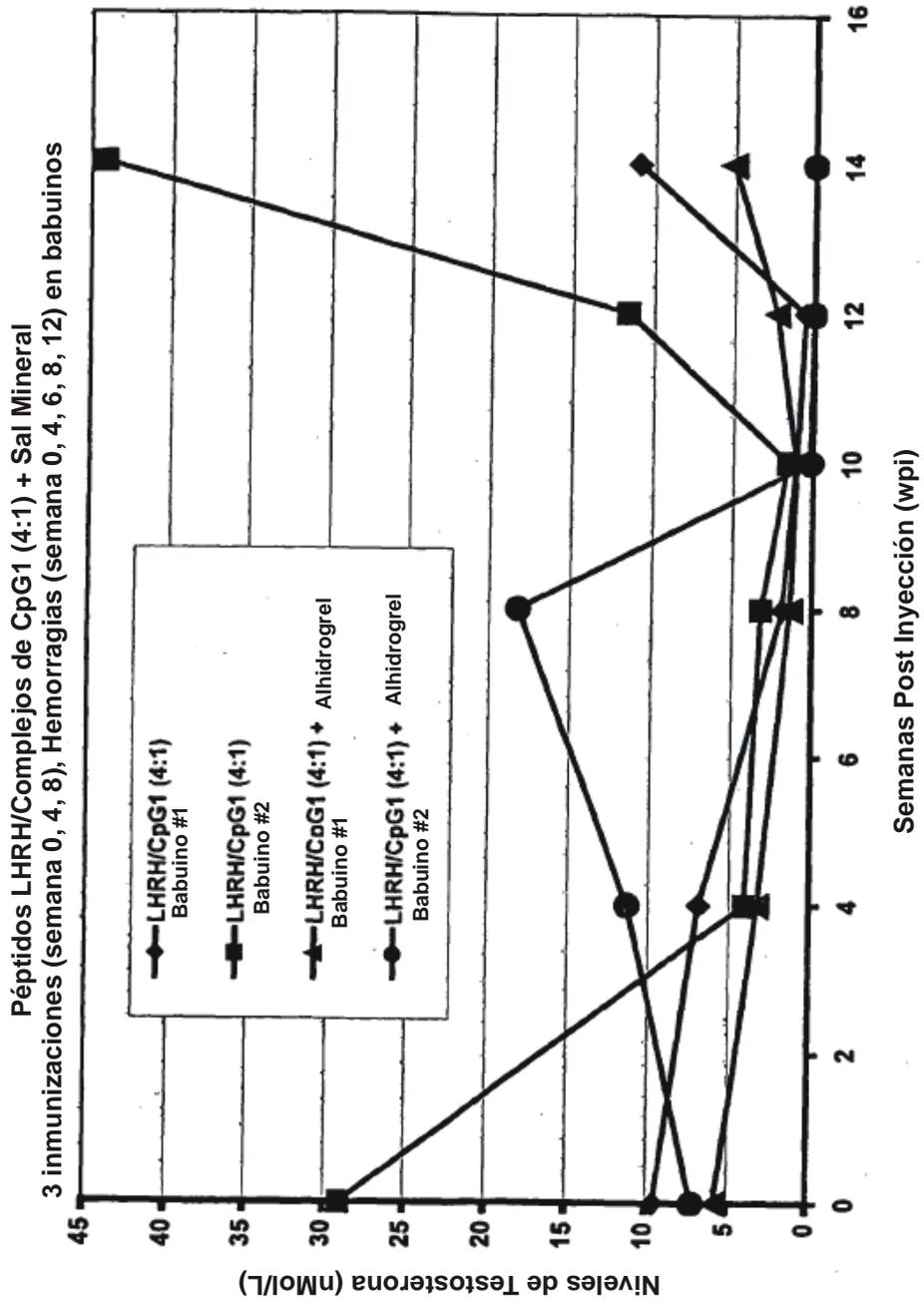


Figura 14c

Péptidos LHRH/Complejos de CpG1 (1.5:1) + Sal Mineral
 3 inmunizaciones (semana 0, 4, 8), Hemorragias (semana 0, 4, 6, 8, 12, 14) en Babuinos

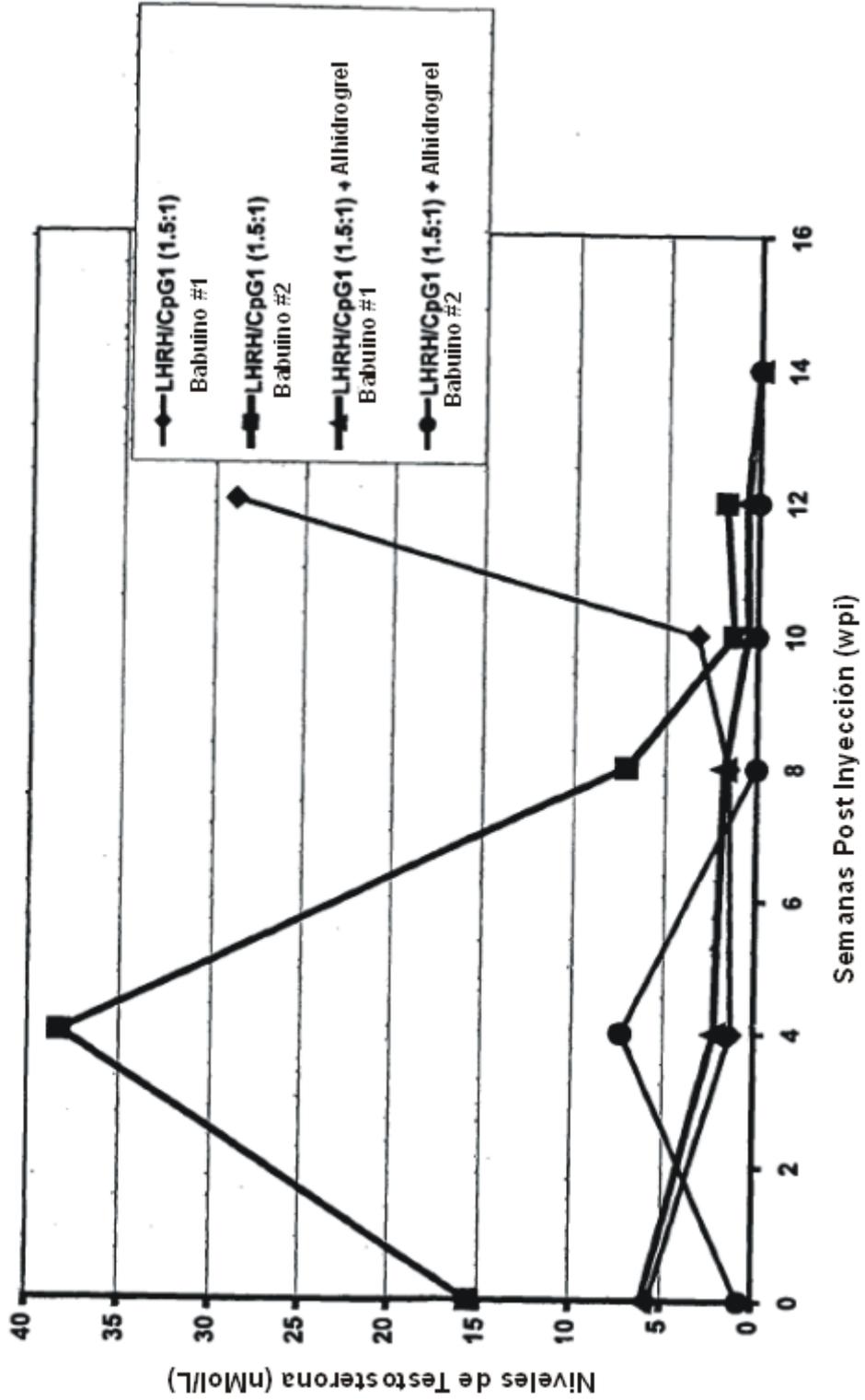


Figura 15a
 LHRH/Complejos de CpG1, LHRH + Péptido IL-1B o combos en emulsiones
 2 inmunizaciones (semana 0, 8), Hemorragias (semana 0, 8, 10, 12, 14)

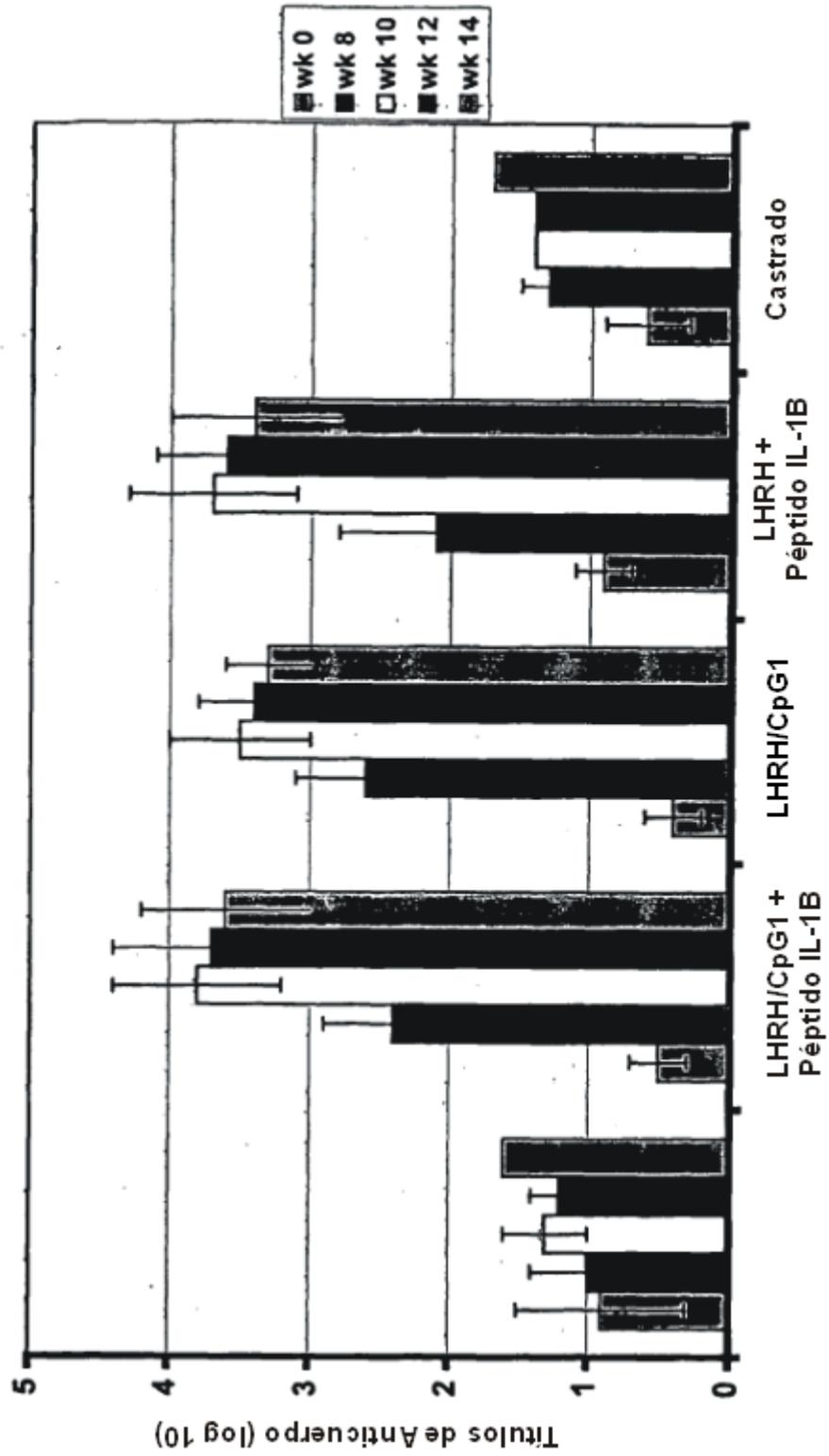


Figura 15b
 LHRH/Complejos de CpG1, LHRH + Péptido IL-1B o combos en Emulsiones
 2 inmunizaciones (semana 0, 8). Hemorragias (semana 0, 8, 10, 12, 14)

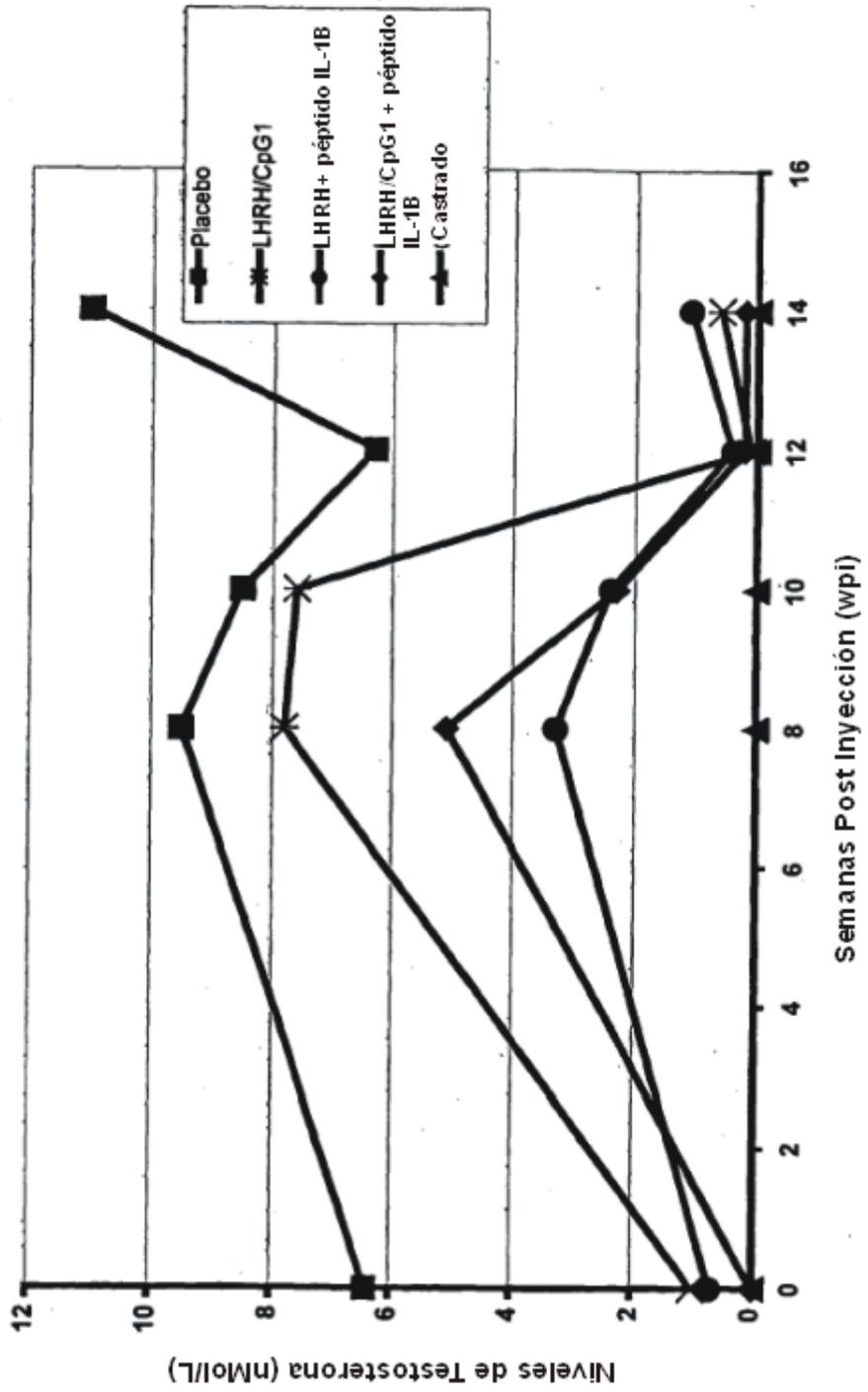


Figura 16
Esquema de un Complejo Inmunoestimulador y Suspensión de Sal Mineral

