

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 565**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/39** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 9/16** (2006.01)  
**A61K 9/107** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03800259 .8**  
96 Fecha de presentación: **29.12.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1585542**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.10.2005**

54 Título: **Composiciones inmunogénicas que contienen fosfolípidos**

30 Prioridad:  
**27.12.2002 US 436919 P**  
**21.10.2003 US 513075 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.09.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.09.2012**

73 Titular/es:  
**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.**  
**4560 HORTON STREET**  
**EMERYVILLE, CA 94608, US**

72 Inventor/es:  
**O'HAGAN, Derek**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 387 565 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Composiciones inmunogénicas que contienen fosfolípidos

**Decoración de las solicitudes relacionadas**

5 La presente solicitud reivindica beneficio de prioridad respecto de la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº 60/436.919, presentada el 27 de diciembre de 2002. La presente solicitud también reivindica beneficio de prioridad respecto de la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº 60/513.075, presentada el 21 de octubre de 2003.

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a composiciones farmacéuticas. En concreto, la invención se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden fosfolípidos como adyuvantes.

10 **Antecedentes**

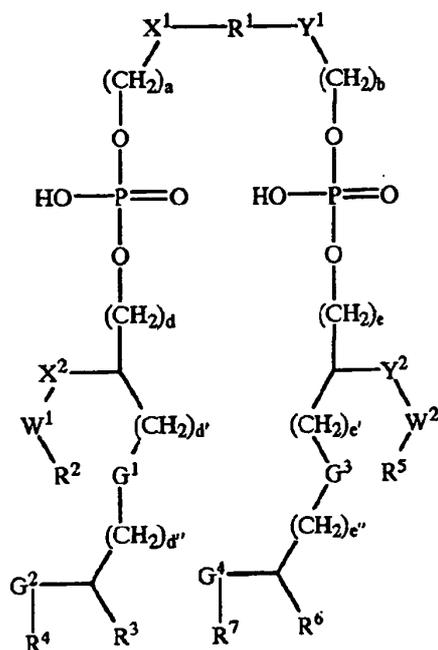
La aparición de vacunas por subunidades creadas mediante tecnología de ADN recombinante ha intensificado la necesidad de composiciones que contienen adyuvantes seguras y eficaces. Las vacunas de subunidades, aunque ofrecen ventajas significativas sobre las vacunas tradicionales con microorganismos vivos y muertos en términos de seguridad y costes de producción, en general presentan al sistema inmunológico polipéptidos aislados o mezclas de polipéptidos aislados, que tienen una inmunogenicidad limitada en comparación con, por ejemplo, virus enteros, bacterias y etc. Como resultado, estas vacunas en general se benefician de los adyuvantes con capacidades inmunoestimuladoras significativas, que les ayudan a alcanzar su potencial completo en el tratamiento de la enfermedad.

20 Por otro lado, las vacunas tradicionales con organismos vivos no suelen requerir adyuvantes. Además, las vacunas con microorganismos muertos son, en general, más inmunogénicas que las vacunas de subunidades y normalmente no requieren adyuvantes. No obstante, estas vacunas, como las vacunas de subunidades, pueden también beneficiarse de adyuvantes que tienen capacidades inmunoestimuladoras significativas.

**Sumario de la invención**

25 La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden adyuvantes que tienen capacidades inmunoestimuladoras significativas y, en concreto, composiciones que comprenden adyuvantes fosfolípidos.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona una composición inmunogénica que comprende: (a) un excipiente farmacéuticamente aceptable; (b) una micropartícula polimérica que comprende un polímero biodegradable, por ejemplo un polímero seleccionado de un poli(α-hidroxiácido), un ácido polihidroxiбутírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido y un policianoacrilato; (c) un antígeno adsorbido en la micropartícula; y (d) un compuesto fosfolípido, por ejemplo un compuesto fosfolípido sintético de la fórmula siguiente:



en la que:

R<sup>1</sup> está seleccionado del grupo que consiste en

- 5 (a) C(O);  
 (b) C(O)-alquilo C<sub>1-14</sub>-C(O), en el que el alquilo C<sub>1-14</sub> está opcionalmente sustituido con hidroxilo, alcoxi C<sub>1-5</sub>, alquilendioxi C<sub>1-5</sub>, alquilamino C<sub>1-5</sub>, o alquilo C<sub>1-5</sub>-arilo en el que el resto arilo del alquilo C<sub>1-5</sub>-arilo está opcionalmente sustituido con alcoxi C<sub>1-5</sub>, alquilamino C<sub>1-5</sub>, alcoxi C<sub>1-5</sub>-amino, alquilamino C<sub>1-5</sub>, alcoxi C<sub>1-5</sub>, -O-alquilamino C<sub>1-5</sub>, alcoxi C<sub>1-5</sub>, -O-alquilamino C<sub>1-5</sub>-C(O)-alquilo C<sub>1-5</sub> C(O)OH, -O-alquilamino C<sub>1-5</sub>-C(O)-alquilo C<sub>1-5</sub>-C(O)alquilo C<sub>1-5</sub>;  
 10 (c) alquilo de C<sub>2</sub> a C<sub>15</sub> de cadena lineal o ramificada sustituida opcionalmente con hidroxilo o alcoxi; y  
 (d) -C(O)-arileno C<sub>6-12</sub>-C(O)-, en el que el arileno está opcionalmente sustituido con hidroxilo, halógeno, nitro o amino;

a y b son, de forma independiente, 0, 1, 2, 3 o 4;

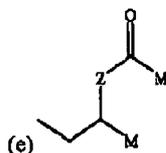
d, d', d'', e, e' y e'' son, de forma independiente, un número entero de 1 a 4;

- 15 X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, Y<sup>1</sup> e Y<sup>2</sup> se seleccionan, de forma independiente, del grupo que consiste en cero, oxígeno, NH y N(C(O)alquilo C<sub>1-4</sub>) y N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>;

W<sup>1</sup> y W<sup>2</sup> están seleccionados, de forma independiente, del grupo que consiste en carbonilo, metileno, sulfona y sulfóxido;

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> están seleccionados, de forma independiente, del grupo que consiste en:

- 20 (a) alquilo de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o de cadena ramificada que está sustituida opcionalmente con oxo, hidroxilo o alcoxi,  
 (b) alqueno o dialqueno de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o de cadena ramificada que está sustituida opcionalmente con oxo, hidroxilo o alcoxi,  
 (c) alcoxi de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o de cadena ramificada que está sustituida opcionalmente con oxo,  
 25 (d) -NH-alquilo de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o de cadena ramificada en el que el grupo alquilo está sustituido opcionalmente con oxo, hidroxilo o alcoxi; y



- 30 en el que Z está seleccionado del grupo que consiste en O y NH, y M y N se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste de alquilo, alqueno, alcoxi, aciloxi, alquilamino y acilamino de C<sub>2</sub> y C<sub>20</sub> de cadena lineal o de cadena ramificada;

R<sup>3</sup> y R<sup>6</sup> están seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en alquilo o alqueno de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o de cadena ramificada, sustituido opcionalmente con flúor u oxo;

- 35 R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> están seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en C(O) alquilo o alqueno de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o ramificada; alquilo de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o ramificada; alcoxi de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o ramificada; alqueno de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o ramificada; en los que los grupos alquilo, alqueno o alcoxi están sustituidos independiente u opcionalmente con hidroxilo, flúor o alcoxi de C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>;

- 40 G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup> y G<sup>4</sup> se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en oxígeno, metileno, amino, tiol, NHC(O)- y -N(C(O)alquilo C<sub>1-4</sub>)-; o G<sup>2</sup> R<sup>4</sup> o G<sup>4</sup> R<sup>7</sup> pueden juntos se un átomo de hidrógeno o hidroxilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención también proporciona una composición inmunogénica para usar en un procedimiento para liberar una cantidad terapéutica de un antígeno a un animal huésped vertebrado.

- 45 La invención también proporciona una composición inmunogénica para usar en un procedimiento de tratar a un animal huésped que tiene una infección por organismos patógenos o un tumor.

La invención también proporciona una composición inmunogénica para usar en un procedimiento de inmunizar a un animal huésped contra un tumor o una infección por un organismo patógeno.

La invención también proporciona una composición inmunogénica para usar en un procedimiento de estimular una respuesta inmunitaria en un animal huésped.

La invención también proporciona una composición inmunogénica para uso en terapia.

5 La invención también proporciona el uso de una composición inmunogénica en la fabricación de un medicamento para: liberar una cantidad terapéutica de un antígeno a un animal huésped vertebrado; tratar a un animal huésped que tiene una infección por un organismo patógeno o tumor; inmunizar a un animal huésped contra un tumor o infección por un organismo patógeno; o estimular una respuesta inmunitaria en un animal huésped.

10 En muchas realizaciones, las micropartículas se forman a partir de un poli ( $\alpha$ -hidroxiácido), tal como una poli(lactida) ("PLA"), un copolímero de lactida y glicólido, tal como poli(D,L-lactida-co-glicólido) ("PLG") o un copolímero de D,L-lactida y caprolactona. Los polímeros de poli(D,L-lactida-co-glicólido) incluyen los que tienen una proporción molar lactida/glicólico que varía de, por ejemplo, 20:80 a 80:20, 25:75 a 75:25, 40:60 a 60:40, o 55:45 a 45:55, y que tiene un peso molecular que varía de, por ejemplo, 5.000 a 200.00 Daltons, de 10.000 a 100.000 Daltons, de 20.000 a 70.000 Daltons o de 40.000 a 50.000 Dalton.

15 El antígeno, el fosfolípidos y varios componentes suplementarios opcionales pueden estar, de forma independiente, por ejemplo: (a) adsorbidas en la superficie de las micropartículas, (b) atrapadas dentro de las micropartículas, (c) en solución, (d) adsorbidas en distintas poblaciones de micropartículas y/o (e) atrapadas dentro de distintas poblaciones de micropartículas.

Los componentes suplementarios se puede incluir dentro de las diversas composiciones de la presente invención, incluidos productos farmacéuticos, hormonas, enzimas, mediadores de la transcripción o la traducción, intermedios de las vías metabólicas, inmunomoduladores, adyuvantes inmunológicas adicionales y combinaciones de los mismos.

20 Los antígenos pueden ser, por ejemplo, antígenos que contienen polipéptidos o antígenos que contienen polinucleótidos. Ejemplos de antígenos que contienen polinucleótido incluyen, por ejemplo, (a) secuencias de ácido nucleico que codifican directamente antígenos que contienen polipéptido (p. ej., una molécula de ARNm) y (b) construcciones de vectores que codifican indirectamente antígenos que contienen polipéptido, por ejemplo construcciones de vectores que expresan secuencias de ácido nucleico heterólogos, que, a su vez, codifican antígenos que contienen polipéptido (p. ej., construcciones de vector de ADN y construcciones de vector de ARN).

25 Los antígenos que contienen polipéptido pueden ser, por ejemplo, antígenos tumorales y antígenos de organismos patogénicos, tales como virus, bacterias, hongos y parásitos. Por tanto, en algunas realizaciones, el antígeno que contiene polipéptido procede de un virus tal como, por ejemplo, el virus de la hepatitis A (VHA), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC), el virus del herpes simple (VHS), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), citomegalovirus (CMV), el virus de la gripe (p. ej., el virus de la gripe A) y el virus de la rabia. En otras realizaciones, el antígeno que contiene polipéptido procede de una bacteria tal como, por ejemplo, cólera, difteria, tétanos, estreptococos (p. ej., estreptococos A y B), pertussis, *Neisseria meningitidis* (p. ej., meningitis A, B, C, W, Y), *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori* y *Haemophilus influenza* (p. ej., *Haemophilus Influenza* de tipo B). En otras realizaciones más, el antígeno que contiene polipéptido procede de un parásito tal como, por ejemplo, un parásito del paludismo.

Otras realizaciones de la invención están dirigidas a usos en procedimientos de liberar antígenos a un animal huésped, que comprende administrar al animal huésped cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento. Preferentemente, el animal huésped es un animal vertebrado, más preferentemente un mamífero e incluso más preferentemente un ser humano.

40 La presente invención también esta dirigida a usos en procedimientos de estimular una respuesta inmunológica humoral y/o una respuesta inmunológica celular, incluido una respuesta inmunológica Th1 o una respuesta CTL o linfoproliferación o producción de citocinas, dentro de un animal huésped en un animal huésped, que comprende administrar al animal cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento en una cantidad eficaz para inducir la respuesta inmunitaria humoral y/o celular.

45 En otras realizaciones, la invención está dirigida a usos en procedimientos de inmunización, que comprenden administrar a un animal huésped una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento.

50 La presente invención está también dirigida a usos en procedimientos de inmunización de un animal huésped, por ejemplo contra un tumor o una infección vírica, bacteriana o parasitaria, que comprende administrar al animal cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en una cantidad eficaz para inducir una respuesta protectora.

La liberación de las composiciones inmunogénicas de la invención puede realizarse mediante cualquier procedimiento, incluida la inyección directa (p. ej., por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular).

55 Por tanto, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención se proporcionan composiciones y usos en procedimientos que tratan, incluido inmunizan profiláctica y/o terapéuticamente, un animal huésped, por ejemplo contra infecciones víricas, fúngicas, micoplasmas, bacterianas o protozoicas, así como contra tumores. Los usos en

los procedimientos de la presente invención son útiles para conferir inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un animal huésped, preferentemente un ser humano. Los usos en los procedimientos de la presente invención también se pueden practicar sobre animales que no son seres humanos, incluidas aplicaciones de investigación biomédica.

- 5 Una ventaja concreta de las composiciones inmunogénicas de la presente invención es la capacidad para generar respuestas inmunitarias en un sujeto vertebrado. Además de una respuesta de anticuerpos convencional, las composiciones que se describen en el presente documento pueden proporcionar, por ejemplo, la asociación de los antígenos expresados con moléculas del MHC de clase I de modo que se puede montar una respuesta inmunitaria celular in vivo al antígeno de interés, que estimula la producción de linfocitos T citotóxicos ("LTC") para permitir el futuro reconocimiento del antígeno. Además, se puede provocar una respuesta específica de antígeno de los linfocitos T colaboradores. De acuerdo con esto, los procedimientos de la presente invención encontrarán utilidad en provocar respuestas inmunitarias celulares y/o humorales a varios antígenos. Como ejemplo específico, los antígenos derivados de patógenos víricos pueden inducir anticuerpos, epítomos de linfocitos T colaboradores y epítomos de linfocitos T citotóxicos. Dichos antígenos incluyen los codificados por virus humanos y animales, y pueden corresponder a proteínas estructurales o no estructurales.
- 10
- 15 Estas y otras realizaciones, aspectos y ventajas de la presente invención serán fáciles para los expertos en la técnica a la luz de la divulgación del presente documento.

### **Descripción detallada de la invención**

- La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, química de polímeros, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la literatura. Véase por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences. 18ª Edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989); Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S., ed, CRC Press, 1997) y Seymour/Carraher's Polymer Chemistry (4ª edición, Marcel Dekker Inc., 1996).
- 20
- 25

Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "uno", "una" y "el", "la" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, el término "micropartícula" se refiere a una o más micropartículas y similares.

- A menos que se indique lo contrario, todos los porcentajes y proporciones del presente documento se proporcionan en base al peso.
- 30

#### **A. Definiciones**

Al describir la presente invención se emplearán los términos siguientes y se pretende definirlos como se indica a continuación.

- El término "micropartícula", como se usa en el presente documento, se refiere a una partícula de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$  de diámetro, más normalmente de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  de diámetro e incluso más normalmente de aproximadamente 500 a aproximadamente 10-20  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las micropartículas de la presente invención se pueden agregar en masas más grandes en algunas circunstancias. Como ejemplo, las micropartículas de la presente invención que tienen ADN adsorbido puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,5-2  $\mu\text{m}$  de diámetro antes de la liofilización, mientras que las mismas partículas pueden estar en, por ejemplo, agregados que tienen un diámetro de aproximadamente 5-15  $\mu\text{m}$  de diámetro después de la liofilización. En general, la micropartícula tendrá un diámetro que permite la administración parenteral o mucosa sin obstruir las agujas ni los capilares. El tamaño de la micropartícula se determina fácilmente mediante técnicas bien conocidas en la materia, tal como espectroscopia de correlación de fotones, difracción láser y/o microscopia electrónica de barrido. El término "partícula" también se puede usar para indicar una micropartícula como se define en el presente documento.
- 35
- 40
- 45

- Las micropartículas poliméricas para usar en el presente documento normalmente se forman a partir de materiales que son esterilizables, sustancialmente no tóxicos y biodegradables. Dichos materiales incluyen polímeros biodegradables, tales como poli( $\alpha$ -hidroxiácidos), ácidos polihidroxibutíricos, policaprolactonas, poliortoésteres, poliandhridos y policianoacrilatos (p. ej., polialquicianoacrilato o "PACA"). Más normalmente, las micropartículas para usar con la presente invención son micropartículas poliméricas derivadas de poli ( $\alpha$ -hidroxiácidos), por ejemplo de una poli(lactida) ("PLA") o un copolímero de lactida y glicólido, tal como poli(D,L-lactida-co-glicólido) ("PLG") o un copolímero de D,L-lactida y caprolactona. Las micropartículas poliméricas pueden proceder de cualquiera de diversos materiales de partida poliméricos que tienen una variedad de pesos moleculares y, en el caso de los copolímeros tales como PLG, una diversidad de proporciones de monómeros (p. ej., lactida:glicólido), cuya selección será en gran medida cuestión de elección en función, en parte, de la especie coadministrada. Estos parámetros se tratan adicionalmente a continuación.
- 50
- 55

- 5 El término “tensioactivo”, como se usa en el presente documento, incluye detergentes, agentes de dispersión, agentes de suspensión y estabilizantes de emulsión. Tensioactivos catiónicos para usar en las composiciones de micropartículas poliméricas de la presente invención incluyen, entre otros, bromuro de cetiltrimetilamonio o "CTAB" (p. ej., cetrimida), cloruro de benzalconio, DDA (bromuro de dietildioctodecilamonio), DOTAP (dioleoil-3-trimetilamonio-propano), y similares. Los tensioactivos aniónicos incluyen, entre otros, SDS (dodecilsulfato sódico), SLS (laurilsulfato sódico), DSS (disulfosuccinato), alcoholes grasos sulfatados y similares. Tensioactivos no iónicos incluyen, entre otros, PVA, povidona (también conocida como polivinilpirrolidona o PVP), ésteres de sorbitano, polisorbatos, glicolmonoéteres polioxietilados, alquilfenoles polioxietilados, poloxámeros y similares.
- 10 El término “producto farmacéutico” se refiere a compuestos biológicamente activos tales como antibióticos, agentes antivirales, factores de crecimiento, hormonas, antígenos y similares.
- El término “adyuvante” se refiere a cualquier sustancia que ayuda o modifica la acción de un producto farmacéutico, incluidos, entre otros, adyuvantes inmunológicos, que aumenta o diversifican la respuesta inmunitaria a un antígeno. Por tanto, los adyuvantes inmunológicos son compuestos capaces de potenciar una respuesta inmunitaria a antígenos. Los adyuvantes inmunológicos pueden potenciar la inmunidad humoral y/o celular.
- 15 Un “polinucleótido” es un polímero de ácido nucleico. Un polinucleótido incluye tan pocos como 5 6 7 u 8 nucleótidos. Adicionalmente, un “polinucleótido” puede incluir secuencias mono y bicatenarias y se refiere a, entre otros, ADNc de ARNm, viral, procariota o eucariota, ARN genómico y secuencias de ADN de ADN viral (p. ej., virus de ARN y ADN y retrovirus) o procariota, y secuencias de ADN sintético. El término también captura secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN. El término incluye además modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservadoras) en una secuencia nativa, por ejemplo, en la que la molécula de ácido nucleico codifica una proteína antigénica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como las realizadas mediante mutagénesis dirigida al sitio, o puede ser accidental, tal como acontecimientos mutacionales de huéspedes que producen antígenos.
- 20 Como se usa en el presente documento, la expresión “ácido nucleico” se refiere a ADN, ARN o quimeras formadas a partir de ellos.
- Una “especie que contiene polinucleótido” es una molécula, al menos un porción de la cual es un polinucleótido. Ejemplos incluyen construcciones de vectores de ARN, construcciones de vectores de ADN etc.
- Los términos “polipéptido” y “proteína” se refieren a un polímero de residuos de aminoácido y no están limitados a una longitud mínima del producto. Por tanto, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares están incluidos dentro de la definición. Tanto las proteínas de longitud completa como fragmentos de las mismas están dentro de la definición. Los términos también incluyen modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservadora, pero que pueden ser no conservadoras), en una secuencia nativa, preferentemente tal que la proteína mantiene la capacidad de provocar una respuesta inmunológica o tiene un efecto terapéutico en un sujeto al cual se administra la proteína.
- 30 Una “especie que contiene polipéptido” es una molécula, al menos un porción de la cual es un polipéptido. Ejemplos incluyen polipéptidos, proteínas que incluyen glicoproteínas, antígenos sacáridos conjugados a proteínas vehículo etc.
- Por “antígeno” se quiere decir una molécula que contiene uno o más epítopos capaces de estimular el sistema inmunitario de un huésped para provocar una respuesta inmunitaria celular específica de antígeno cuando se presenta el antígeno, o una respuesta humoral de anticuerpos. Un antígeno puede ser capaz de producir una respuesta celular y/o humoral por sí mismo o cuando está presente en combinación con otra molécula.
- 40 Un “epítipo” es la porción de una molécula antigénica o complejo antigénico que determina su especificidad inmunológica. Un epítipo está dentro del alcance de la presente definición de antígeno. Habitualmente, un epítipo es un polipéptido o polisacárido en un antígeno natural. En antígenos artificiales puede ser una sustancia de peso molecular bajo, tal como un derivado de ácido arsánico. Un epítipo reaccionará específicamente *in vivo* o *in vitro* con, por ejemplo, anticuerpos homólogos o linfocitos T. Descriptores alterativos son determinantes antigénicos, agrupamiento estructural antigénico y agrupamiento hapténico.
- 45 Normalmente, un epítipo incluirá entre aproximadamente 5-15 aminoácidos. Epítopos de una proteína dada se pueden identificar usando cualquier número de técnicas de mapeo de epítopos bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Por ejemplo, se pueden determinar epítopos lineales mediante, por ejemplo, síntesis concurrente de números elevados de péptidos sobre soportes sólidos, en los que los péptidos corresponden a porciones de la molécula proteica y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos siguen unidos a los soportes. Dichas técnicas se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.08.871; Geysen y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen y col. (1986) Molec. Immunol. 23: 709-715. De forma similar, los epítopos conformacionales se identifican con facilidad determinando la conformación espacial de los aminoácidos, tal como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, anteriormente.
- 50
- 55

El término “antígeno”, como se usa en el presente documento, indica antígenos de subunidades, es decir antígenos que están separados y aparte de un organismo entero con el que el antígeno está asociado en la naturaleza, además de bacterias, virus, parásitos u otros patógenos muertos, atenuados o inactivados, o células tumorales. Los anticuerpos, tales como anticuerpos antiidiotipo, o fragmentos de los mismos, y mimotopos peptídicos sintéticos, que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico, también entran dentro de la definición de antígeno tal como se usa en el presente documento.

De forma similar, en la definición de antígeno del presente documento también se incluye un oligonucleótido o polinucleótido que expresa una proteína inmunogénica, o determinante antigénico in vivo, tal como en aplicaciones de inmunización con ácido nucleico.

De forma adicional, para los fines de la presente invención un “antígeno” se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservadora), en la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la capacidad para provocar una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como las realizadas mediante mutagénesis dirigida al sitio, o puede ser accidental, tal como acontecimientos mutacionales de huéspedes que producen los antígenos.

Una “respuesta inmunológica” a un antígeno o composición es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular a moléculas presentes en la composición de interés. Para los fines de la presente invención, una “respuesta inmunitaria humoral” se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por moléculas de anticuerpo, mientras que una “respuesta inmunitaria celular” es una mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por los linfocitos T citolíticos (“LTC”). Los LTC tienen especificidad por antígenos peptídicos que se presentan en asociación con las proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y se expresan sobre las superficies de las células. Los LTC ayudan a inducir y estimular la destrucción intracelular de microbios intracelulares o la lisis de las células infectadas con dichos microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por los linfocitos T colaboradores. Los linfocitos T colaboradores actúan ayudando a estimular la función y a centrar la actividad de las células efectoras inespecíficas contra las células que muestran antígenos peptídicos en asociación con moléculas del MHC sobre su superficie. Una “respuesta inmunitaria celular” también hace referencia a la producción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas de este tipo producidas por los linfocitos T activados y/u otros glóbulos blancos, incluidos los derivados de los linfocitos T CD4+ y CD8+.

Una composición tal como una composición inmunogénica o vacuna que produce una respuesta inmunitaria celular puede servir para sensibilizar a un sujeto vertebrado mediante la presentación del antígeno en asociación con moléculas de MHC en la superficie celular. La respuesta inmunitaria mediada por células está dirigida a, o cerca de, células presentadoras del antígeno en su superficie. Además, se pueden generar linfocitos T específicos de antígeno para permitir la futura protección de un huésped inmunizado.

La capacidad de un antígeno o composición concretos para estimular una respuesta inmunológica mediada por células puede venir determinada por una serie de ensayos, tales como ensayos de linfoproliferación (actividad de linfocitos), ensayos de linfocitos citotóxicos LTC, analizando los linfocitos T específicos del antígeno en un sujeto sensibilizado o mediante medición de producción de citocinas por los linfocitos T en respuesta a la reestipulación con antígeno. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Erickson y col., J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doe et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376; y los ejemplos siguientes.

El antígeno de interés puede también provocar una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos. Por tanto, una respuesta inmunológica puede incluir uno o más de los efectos siguientes. La producción de anticuerpos por los linfocitos B; y/o la activación de los linfocitos T supresores y/o los linfocitos T  $\gamma\delta$  dirigidos específicamente a un antígeno o antígenos presentes en la composición o vacuna de interés. Estas respuestas pueden servir para neutralizar la capacidad de infección y/o mediar el complemento del anticuerpo o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) para proporcionar protección a un huésped inmunizado. Dichas respuestas se pueden determinar usando inmunoensayos estándar y ensayos de neutralización bien conocidos en la técnica, por ejemplo radioinmunoensayos y ELISA.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención muestran “inmunogenicidad potenciada” cuando poseen una mayor capacidad para producir una respuesta inmunitaria que la respuesta inmunitaria provocada por una cantidad equivalente del antígeno en una composición diferente. Por tanto, una composición puede mostrar “inmunogenicidad potenciada”, por ejemplo, porque la composición genera una respuesta inmunitaria más fuerte o porque es necesaria una dosis menor de antígeno para alcanzar una respuesta inmunitaria en el sujeto al que se le administra. Dicha inmunogenicidad potenciada se puede determinar, por ejemplo, administrando las composiciones de la invención y controles antigénicos a los animales y comparando los resultados del ensayo de los dos.

Como se usa en el presente documento, “tratamiento” (incluidos variaciones del mismo, por ejemplo “tratar” o “tratado” se refiere a cualquiera de (i) la prevención de un patógeno o trastorno en cuestión (p. ej., cáncer o infección patogénica como en una vacuna tradicional), (ii) la reducción o eliminación de los síntomas y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o trastorno en cuestión. El tratamiento se puede efectuar profilácticamente

(antes de la llegada del patógeno o trastorno en cuestión) o terapéuticamente ( tras la llegada de los mismos).

Las expresiones "cantidad eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" de una composición inmunogénica de la presente invención hacen referencia en el presente documento a una cantidad suficiente de la composición inmunogénica para tratar o diagnosticar una afección de interés. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de, por ejemplo, la especie, la edad y la afección general del sujeto; la gravedad de la afección a tratar; el antígeno concreto de interés; en el caso de una respuesta inmunológica, la capacidad del sistema inmunitaria del sujeto para sintetizar anticuerpos, por ejemplo, y el grado de protección deseada y el modo de administración, entre otros factores. Un experto en la técnica puede determinar una cantidad "eficaz" adecuada en cualquier caso individual. Por tanto, una "cantidad terapéuticamente eficaz" normalmente entrará en un abanico relativamente amplio que se puede determinar mediante ensayos rutinarios.

Por "sujeto vertebrado" o "animal vertebrado" se quiere decir cualquier miembro del subfilo cordados, incluidos, sin limitaciones, mamíferos tales como ganado vacuno, ganado ovino, cerdos, cabras, caballos y seres humanos; animales domésticos tales como perros y gatos; y aves, incluidas aves domésticas, salvajes y de caza, tales como gallos y gallinas, incluidos pollos, pavos y otras aves gallináceas. El término no indica ninguna edad concreta. Por tanto, cubren los animales adultos y neonatos.

Por "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se quiere decir un material que no es biológicamente, o de otro modo, indeseable, es decir, el material se puede administrar a un individuo sin producir ningún efecto biológico excesivamente indeseable en el individuo o interaccionar de un modo excesivamente perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

El término "excipiente" se refiere a cualquier sustancia esencialmente accesoria que puede estar presente en la forma de dosificación terminada. Por ejemplo, el término "excipiente" incluye vehículos, aglutinantes, disgregantes, cargas (diluyentes), lubricantes, deslizantes (potenciadores de flujo), auxiliares de compresión, colores, edulcorantes, conservantes, agentes de suspensión/dispersión, formadores de película/revestimientos, aromas y tintas de impresión.

Por "pH fisiológico" o un "pH en el intervalo fisiológico" se quiere decir un pH en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 8,0 incluidos, más normalmente en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 7,6 incluidos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "construcción de vector" generalmente se refiere a cualquier ensamblaje que es capaz de dirigir la expresión de una o más secuencias de ácido nucleico o gen(es) de interés. Normalmente, una construcción de vector incluye promotor/potenciador de la transcripción o elemento(s) que definen el locus, u otros elementos que controlan la expresión génica por otros medios, tales como corte y empalme alternativo, exportación de ARN nuclear, modificación postraduccionnal del mensajero o modificación postraduccionnal de la proteína. Además, normalmente, la construcción de vector incluye una secuencia que, cuando se transcribe, está operablemente unida a la(s) secuencia(s) o gen(es) de interés y actúa como secuencia de iniciación de la traducción. La construcción de vector puede también incluir, opcionalmente, una señal que dirige la poliadenilación, un marcador seleccionable, así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de la traducción. Además, si la construcción de vector se introduce en un retrovirus, la construcción de vector puede incluir una señal de empaquetamiento, repeticiones terminales largas (LTR) y sitios de unión al cebador de hebra positiva y negativa adecuados para el retrovirus usado (si estos todavía no están presentes).

Una "construcción de vector de ADN" se refiere a una molécula de ADN que es capaz de dirigir la expresión de una o más secuencias de ácido nucleico o gen(es) de interés.

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

Se conocen otras construcciones de vector de ADN que se basan en virus de ARN. Estas construcciones del vector de ADN normalmente comprenden un promotor que funciona en una célula eucariótica, en 5' de una secuencia de ADNc para la que el producto de transcripción es una construcción de vector de ARN (p. ej., un replicón del vector de ARN de alfavirus) y una región de terminación en 3'. La construcción del vector de ARN comprende preferentemente un genoma de ARN de un picornavirus, togavirus, flavivirus, coronavirus, paramixovirus, virus de la fiebre amarilla o alfavirus (p. ej., virus de Sindbis, virus del bosque Semliki, virus de la encefalitis equina de Venezuela o el virus de río Ross), que se ha modificado mediante la sustitución de uno o más genes de proteínas estructurales con una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un producto de interés. Las construcciones del vector de ARN se pueden obtener mediante transcripción *in vitro* a partir de un molde de ADN. Ejemplos específicos incluyen plásmidos basados en el virus Sindbis (pSIN) tal como pSINCP, descrito, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 5,814,482 y 6,015,696, así como en las solicitudes de patente internacional WO

97/38087, WO 99/18226 y el documento de propiedad conjunta. La construcción de dichos vectores, en general, se describe en las patentes de EE.UU. 5,814,482 y 6,015,696.

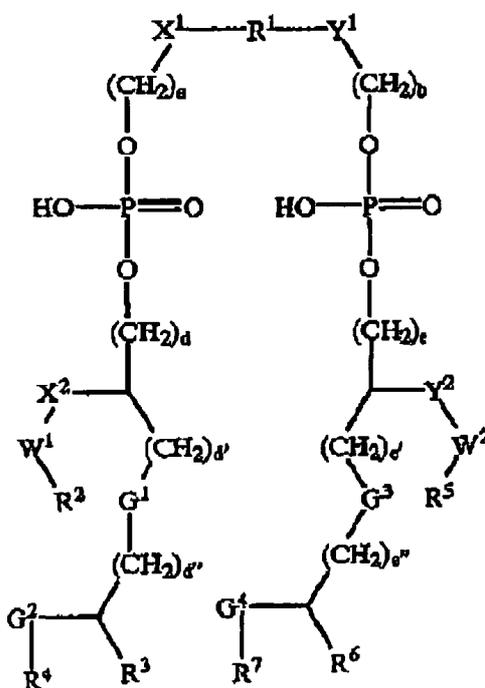
Otro ejemplo de las construcciones de vector incluyen construcciones de vector de ARN (p. ej., construcciones de vector de alfavirus) y similares. Como se usa en el presente documento, "construcción de vector de ARN", "replicón del vector de ARN" y "replicón" se refiere a una molécula de ARN que es capaz de dirigir su propia amplificación o autorreplicación in vivo, normalmente dentro de una célula diana. La construcción de vector de ARN se usa directamente, sin el requisito de la introducción de ADN en una célula y transporte al núcleo en el que se va a producir la transcripción. Usando el vector de ARN para liberación directa en el citoplasma de la célula huésped, la replicación autónoma y la traducción de la secuencia de ácido nucleico heterólogo se produce con eficiencia.

10 B. Procedimientos generales

1. Fosfolípidos

Los compuestos de fosfolípidos se usan en relación con la presente invención.

La familia de los compuestos de fosfolípidos para usar en la presente invención es de la fórmula siguiente:



15 en la que:

R<sup>1</sup> está seleccionado del grupo que consiste en

- (a) C(O);
- (b) C(O) alquilo C<sub>1-14</sub>-C(O), en el que el alquilo C<sub>1-14</sub> está opcionalmente sustituido con hidroxilo, alcoxi C<sub>1-5</sub> alquilendioxi C<sub>1-5</sub>, alquilamino C<sub>1-5</sub> o alquilo C<sub>1-5</sub>-arilo, en el que el resto arilo del alquilo C<sub>1-5</sub>-arilo está opcionalmente sustituido con alcoxi C<sub>1-5</sub>, alquilamino C<sub>1-5</sub>, alcoxi C<sub>1-5</sub>-amino, alquilamino C<sub>1-5</sub>-alcoxi C<sub>1-5</sub>, O alquilamino C<sub>1-5</sub>-alcoxi C<sub>1-5</sub>, O alquilamino C<sub>1-5</sub>-C(O) alquilo C<sub>1-5</sub> C(O)OH, O acilamino C<sub>1-5</sub>-C(O) alquilo C<sub>1-5</sub>-C(O) alquilo C<sub>1-5</sub>;
- (c) alquilo de C<sub>2</sub> a C<sub>1</sub> de cadena lineal o ramificada sustituido opcionalmente con hidroxilo o alcoxi; y
- (d) C(O) arileno C<sub>6-12</sub>-C(O) en el que el arileno está opcionalmente sustituido con hidroxilo, halógeno, nitro o amino;

25 a y b son, de forma independiente, 0, 1, 2, 3 o 4;

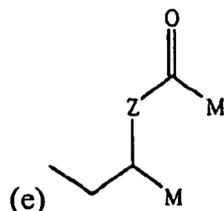
d, d', d'', e, e' y e'' son, de forma independiente, un número entero de 1 a 4;

X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, Y<sup>1</sup> e Y<sup>2</sup> están seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en un cero, oxígeno, NH y N(C(O)alquilo C<sub>1-4</sub>) y N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>;

30 W<sup>1</sup> y W<sup>2</sup> están seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en carbonilo, metileno, sulfona y sulfóxido;

R<sup>2</sup> y R<sup>5</sup> están seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en:

- (a) alquilo de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o ramificada que está sustituido opcionalmente con oxo, hidroxilo o alcoxi,  
 (b) alqueno o dialqueno de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o ramificada que está sustituido opcionalmente con oxo, hidroxilo o alcoxi,  
 (c) alcoxi de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o ramificada que está sustituido opcionalmente con oxo, hidroxilo o alcoxi;  
 5 (d) NH-alquilo de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o ramificada, en el que el grupo alquilo está sustituido opcionalmente con oxo, hidroxilo o alcoxi; y



10 en la que Z está seleccionado del grupo que consiste en O y NH, y M y N están seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en alquilo, alqueno, alcoxi, aciloxi, alquilamino y acilamino de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o ramificada;

R<sup>3</sup> y R<sup>6</sup> están seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en alquilo o alqueno de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o de cadena ramificada, opcionalmente sustituido con flúor u oxo;

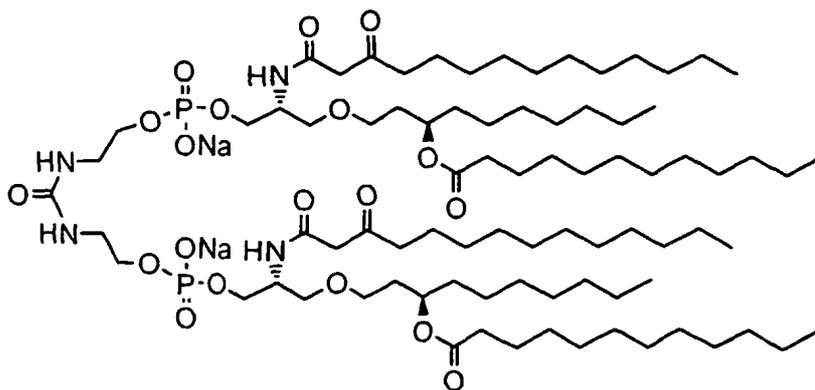
15 R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> están seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en C(O)-alquilo o alqueno de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> cadena lineal o de cadena ramificada; alquilo de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o de cadena ramificada; alcoxi de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o de cadena ramificada; alqueno de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> cadena lineal o de cadena ramificada; en el que los grupos alquilo, alqueno o alcoxi están independiente y opcionalmente sustituidos con hidroxilo, flúor o alcoxi de C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>;

G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup> y G<sup>4</sup> están seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en oxígeno, metileno, amino, tiol, NHC(O) y N(C(O)alquilo C<sub>1-4</sub>); o G<sup>2</sup> R<sup>4</sup> o G<sup>4</sup> R<sup>7</sup> pueden juntos ser un átomo de hidrógeno o hidroxilo;

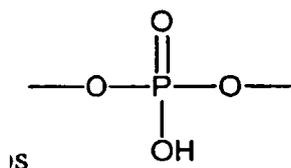
20 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En algunas realizaciones específicas, R<sup>1</sup> es C(O); a, b, d, d', e' y e'' son, de forma independiente, 1 o 2; X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, Y<sup>1</sup> e Y<sup>2</sup> son NH; W<sup>1</sup> y W<sup>2</sup> son carbonilo; R<sup>2</sup> y R<sup>5</sup> son alquilo de C<sub>10</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal que está sustituido con oxo; R<sup>3</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo de C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> de cadena lineal; R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> son C(O)alquilo de C<sub>8</sub>-C<sub>11</sub> de cadena lineal; y G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup> y G<sup>4</sup> son oxígeno.

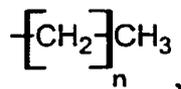
25 Un ejemplo de un compuesto específico para usar en relación con la presente invención es el compuesto siguiente:



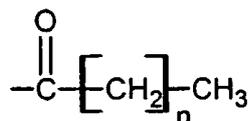
30 El compuesto ilustrado está en la forma enantiomérica (R,R,R,R), pero también son deseables otras formas enantioméricas incluyendo la forma (R, S,S,R). Estos compuestos son compuestos sintéticos de Eisai Co. Ltd., Tokyo, Japón y se denominan ER804057 and ER804053. Son miembros de la familia anterior de fosfolípidos, en forma de sal de sodio, en la que: R<sup>1</sup> es C(O); a y b son 2; d, d' e y e' son 1; d'' y e'' son 2; X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, Y<sup>1</sup> e Y<sup>2</sup> son NH; W<sup>1</sup> y W<sup>2</sup> son carbonilo; R<sup>2</sup> y R<sup>5</sup> son alquilo de C<sub>13</sub> de cadena lineal que está sustituido con oxo en la posición 2; R<sup>3</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo de C<sub>7</sub> de cadena lineal; R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> son C(O)alquilo de C<sub>11</sub> de cadena lineal; y G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup> y G<sup>4</sup> son oxígeno. Este compuesto no comprende ningún grupo sacárido; es un compuesto difosfolípido, ya que comprende dos grupos fosfodiéster



(aquí en la forma de sal de sodio). Este compuesto también comprende seis grupos alcano lineales,

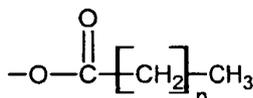


en los que n es, de forma independiente 6 o 10. Cuatro de los grupos alcano corresponden a grupos alcanoilo,

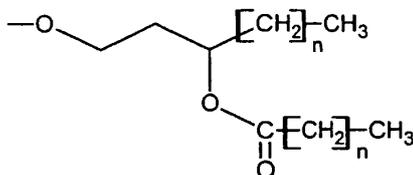


5

en los que n es 10. Dos de estos grupos alcanoilo corresponden a grupos alcanoiloxi,



que además corresponden a grupos alcanoiloxialcoxi,



10 Información adicional sobre los compuestos anteriores y su preparación se puede encontrar en, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6,290,973 de Eisai Co., Ltd.

## 2. Antígenos

La presente invención encontrará uso para estimular una respuesta inmunitaria contra una amplia variedad de antígenos, incluidos antígenos asociados con patógenos y tumores.

15 Los antígenos de la familia del herpesvirus, incluidas las proteínas derivadas del virus del herpes simple (VHS) de tipos 1 y 2, tal como las glicoproteínas del VHS-1 y el VHS-2 gB, gD y gH; antígenos derivados del virus de varicela zóster (VZV), virus de Epstein-Barr (EBV) y citomegalovirus (CMV), incluidas gB and gH de CMV; y antígenos derivados de otros herpesvirus humanos tales como HHV6 and HHV7 se pueden usar de forma conveniente en relación con la presente invención. (Véase, por ejemplo, Chee y col., Cytomegaloviruses (J.K. McDougall, ed., Springer-Verlag 1990) pág. 125-169, para una revisión del contenido de codificación de las proteínas del citomegalovirus; McGeoch y col., J Gen. Virol. (1988) 69:1531-1574, para un debate sobre las diversas proteínas codificadas en el VHS-1; la patente de EE.UU. nº 5,171,568 para un debate sobre las proteínas gB and gD del VHS-1 y VHS-2 y los genes que las codifican; Baer y col., Nature (1984) 310:207-211, para la identificación de secuencias de codificación de proteínas en un genoma del EBV; y Davison y Scott, J. Gen. Virol. (1986) 67:1759-1816, para una revisión de VZV.)

25 Los antígenos de la familia de virus de la hepatitis, incluidos el virus de la hepatitis A (VHA), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la hepatitis delta (VHD), el virus de la hepatitis E (VHE) y el virus de la hepatitis G (VHG), también se pueden usar de forma conveniente en las técnicas descritas en el presente documento. A modo de ejemplo, se conoce la secuencia genómica viral del VHC, como lo son los procedimientos para obtener la secuencia. Véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales nº WO 89/04669; WO 90/11089; and WO 90/14436. El genoma del VHC codifica varias proteínas virales, incluidas E1 (también conocido como E) y E2 (también conocido como E2/NSI) y una proteína de la nucleocápsida en N-terminal (denominado "núcleo") (véase, Houghton y col., Hepatology (1991) 14:381-388, para un debate sobre las proteínas del VHC, incluidas E1 y E2). Cada una de estas proteínas, así como fragmentos antigénicos de las mismas, encontrará uso en la presente

30

composición y procedimientos.

De un modo similar, se conoce la secuencia para el antígeno  $\delta$  del VHD (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5,378,814) y este antígeno se puede usar de forma conveniente en la presente composición y procedimientos. Adicionalmente, los antígenos derivados del VHB, tal como el antígeno del núcleo, el antígeno de la superficie, sAg, así como las secuencias presuperficie, pre-S1 y pre-S2 (anteriormente denominadas pre-S), así como combinaciones de los anteriores, tales como sAg/pre-S1, sAg/pre-S2, sAg/pre-S1/pre-S2, y pre-S1/pre-S2, encontrarán uso en el presente documento. Véase, por ejemplo, "HBV Vaccines - from the laboratory to license: a case study" en Mackett, M. y Williamson, J.D., Human Vaccines and Vaccination, pág. 159-176, para un debate de la estructura del VHB; y las patentes de EE.UU. N° 4,722,840, 5,098,704, 5,324,513, incorporadas en el presente documento en su totalidad; Beames y col., J. Virol. (1995) 69:6833-6838, Birnbaum y col., J. Virol. (1990) 64:3319-3330; y Zhou y col., J. Virol. (1991) 65:5457-5464.

Los antígenos derivados de otros virus también encontrarán uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención, tal como, sin limitaciones, proteínas de miembros de las familias Picornaviridae (p.ej., poliovirus, etc.); Caliciviridae; Togaviridae (p. ej., virus de la rubéola, virus del dengue, etc.); Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae; Bimaviridae; Rhabdoviridae (p. ej., virus de la rabia, etc.); Filoviridae; Paramyxoviridae (p. ej., virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial etc.); Orthomyxoviridae (p. ej., virus de la gripe de los tipos A, B y C, etc.); Bunyaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (p. ej., HTLV-I; HTLV-II; VIH-1 (también conocido como HTLV-III, LAV, ARV, hTLR, etc.)), incluidos, entre otros, antígenos procedentes de los aislamientos HIVIIIb, HIVSF2, HIV/LAV, HIVLAI, HIVMN); HIV-1CM235, HIV-1US4; HIV-2; el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS), entre otros. Adicionalmente, los antígenos también pueden proceder del papilomavirus humano (VPH) y los virus de la encefalitis transmitida por garrapatas. Véase, por ejemplo, Virology, 3ª Edición (W.K. Joklik ed. 1988); Fundamental Virology, 2ª Edición (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds. 1991), para una descripción de estos y otros virus.

Más particularmente, las proteínas de la cubierta gp120 o gp140 de cualquiera de los aislamientos del VIH anteriores, incluidos los miembros de los diversos subtipos genéticos del VIH, se conocen y comunican (véase, por ejemplo, Myers y col., Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico (1992); Myers y col., Human Retroviruses and Aids, 1990, Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory; y Modrow y col., J. Virol. (1987) 61:570-578, para una comparación de las secuencias de la cubierta de una diversidad de aislamientos del VIH) y los antígenos procedentes de estos aislamientos encontrarán uso en los presentes procedimientos. Además, la invención es igualmente aplicable a otras proteínas inmunogénicas procedentes de cualquiera de los diversos aislamientos del VIH, incluidas cualquiera de las diversas proteínas de la cubierta tales como gp160 and gp41, antígenos gaga tales como p24gag y p55gag, así como proteínas procedentes de las regiones pol y tat.

El virus de la gripe es otro ejemplo de un virus para el cual la presente invención será particularmente útil. Específicamente, las glicoproteínas de la cubierta HA y NA de la gripe A son de particular interés para generar una respuesta inmunitaria. Se han identificado numerosos subtipos de HA de la gripe A (Kawaoka y col., Virology (1990) 179:759-767; Webster y col., "Antigenic variation among type A influenza viruses," p. 127-168. En: P. Palese and D.W. Kingsbury (ed.), Genetics of influenza viruses. Springer-Verlag, New York). Por tanto, también se pueden usar proteínas derivadas de estos aislamientos en las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento.

Las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento también encontrarán uso con numerosos antígenos bacterianos, tales como los procedentes de organismos que producen difteria, cólera, tuberculosis, tétanos, pertussis, meningitis y otros estados patogénicos, incluidos, entre otros, *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis* (A, B, C, Y), *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori* y *Haemophilus influenzae*. *Hemophilus influenzae* de tipo B (HIB), *Helicobacter pylori*, y combinaciones de los mismos. Ejemplos de antígenos de *Neisseria meningitidis* B se divulgan en las siguientes solicitudes de patentes de propiedad conjunta: PCT/US99/09346; PCT IB98/01665 y PCT IB99/00103. Ejemplos de antígenos de parásitos incluyen los procedentes de organismos que producen el paludismo y la enfermedad de Lyme.

Antígenos adicionales para usar con la invención, que no necesariamente son exclusivos de los indicados en otro punto de la presente solicitud, incluyen los siguientes: (a) un antígeno proteico de *N. meningitidis* serogrupo B, tal como los de las Refs. 1 a y 7 a continuación; (b) una preparación de vesícula de membrana externa (OMV) de *N. meningitidis*, serogrupo B, tal como las descritas en las referencias 8, 9, 10, 11 etc. más adelante; (c) un antígeno sacárido de *N. meningitidis*, serogrupo A, C, W135 y/o Y, tal como el oligosacárido divulgado en la referencia 12 más adelante del serogrupo C (véase también la referencia 13); (d) un antígeno sacárido de o *Streptococcus pneumoniae* [p. ej., Referencias 14, 15, 16]. € un antígeno de *N. gonorrhoeae* [p. ej., las referencias 1, 2, 3]; (e) un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [p. ej., las referencias 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]; (f) un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [p. ej., la referencia 24]; (g) un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como el virus inactivado [p. ej., las referencias 25, 26]; (h) un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o del núcleo [p. ej., las referencias 26, 27]; (i) un antígeno del virus de la hepatitis C [p. ej., la referencia 28]; (j) un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como la holotoxina de pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentososa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [p. ej., referencias 29 y 30]; (k) un antígeno de difteria, tal como el toxoide diftérico [p. ej., capítulo 23 de la referencia 31] p. ej. el mutante CRM197 [p.

ej., Ref. 32]; (l) un antígeno del tétanos, tal como un toxoide del tétanos [p. ej., capítulo 4 de la referencia 31]; (m) un antígeno proteico de *Helicobacter pylori* tal como CagA [p. ej. Referencia 33], VacA [p. ej. Referencia 33], NAP [p. ej. Referencia 34], HopX [p. ej. Referencia 35], HopY [p. ej. Referencia 35] y/o ureasa; (n) un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B [p. ej. Referencia 13]; (o) un antígeno de *Porphyramonas gingivalis* [p. ej. Referencia 36]; (p) antígeno(s) de la polio [p. ej. Referencias 37, 38] tales como IPV u OPV; (q) antígeno(s) de la rabia [p. ej. Referencia 39] tal como el virus inactivado liofilizado [p. ej. Referencia 40, Rabavert™]; (r) los antígenos de las paperas, el sarampión y/o la rubéola [p. ej., capítulos 9, 10 y 11 de la Referencia 31]; (s) antígeno(s) de la gripe [p. ej. capítulo 19 de la Referencia 31], tal como las proteínas de superficie hemaglutinina y/o neuraminidasa; (t) un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [p. ej., time 41]; (u) un antígeno *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del Grupo B) [p. ej. Referencias. 42, 43]; (v) un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del Grupo A) [p. ej. Referencias 43,44, 45]; (w) un antígeno de *Staphylococcus aureus* [p. ej. Referencia 46]; y (x) composiciones que comprenden uno o más de estos antígenos. Cuando se usa un antígeno sacárido o de hidrato de carbono, preferentemente se conjuga con una proteína transportadora con el fin de potenciar la inmunogenicidad [p. ej., referencias 47 a 56]. Las proteínas transportadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como los toxoides de la difteria o del tétanos. El toxoide de difteria CRM<sub>197</sub> es particularmente preferido. Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen la proteína de la membrana externa de *N. meningitidis* [p. ej., Referencia 57], péptidos sintéticos [p. ej., referencias 58, 59], proteínas del shock térmico [p. ej., Referencia 60], proteínas de pertussis [p. ej., Referencias 61, 62], proteína D de *H. Influenzae* [p. ej., Referencia 63], toxina A o B de *C. difficile* [p. ej., Referencia 64], etc. Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares de los serogrupos A y C, se prefiere que la proporción (p/p) del sacárido MenA:sacárido MenC es mayor que 1 (p.ej. 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor). Los sacáridos de diferentes serogrupos de *N. meningitidis* se pueden conjuga a las mismas proteínas transportadoras o a otras diferentes. Se puede usar cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier ligador adecuado cuando sea necesario. Los antígenos de proteínas tóxicas se pueden destoxifica cuando sea necesario (p. ej., destoxicación de la toxina de pertussis por medios químicos y/o genéticos [Referencia 30]). Véase: Solicitud de patente internacional 99/24578 [Referencia 1]; solicitud de patente internacional WO99/36544 [Referencia 2]; Solicitud de patente internacional WO99/57280 [Referencia 3]; Solicitud de patente internacional WO00/22430 [Referencia 4]; Tettelin y col., (2000) Science 287:1809-1815 [Referencia 5]; Solicitud de patente internacional WO96/29412 [Referencia 6]; Pizza y col. (2000) Science 287:1816-1820 [Ref. 7]; Solicitud de patente internacional PCT/IB01/00166 [Referencia 8]; Bjune y col. (1991) Lancet 338(8775):1093-1096 [Referencia 9]; Fukasawa y col. (1990) Vaccine 17:2951-2958 [Referencia 10]; Rosenqvist y col. (1998) Dev. Biol. Stand. 92:323-333 [Ref. 11]; Costantino y col. (1992) Vaccine 10:691-698 [Referencia 12]; Costantino y col. (1999) Vaccine 17:1251-1263 [Referencia 13]; Watson (2000) Padiatr Infect Dis J 19:331-332 [Referencia 14]; Rubin (2000) Padiatr Clin North Am 47:269-285, v [Referencia 15]; Jedrzejas (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207 [Referencia 16]; Solicitud de patente internacional presentada el 3 de julio de 2001 que reivindica prioridad sobre el documento GB-0016363.4 [Referencia 17]; Kalman y col. (1999) Nature Genetics 21 :385-389 [Referencia 18]; Read y col. (2000) Nucleic Acids Res 28:1397-406 [Referencia 19]; Shirai y col. (2000) J. Infect. Dis. 181(Suppl 3):S524-S527 [Ref. 20]; Solicitud de patente internacional WO99/27105 [Referencia 21]; Solicitud de patente internacional presentada WO00/27994 [Referencia 22]; Solicitud de patente internacional WO00/37494 [Referencia 23]; Solicitud de patente internacional WO99/28475 [Referencia 24]; Bell (2000) Padiatr Infect Dis J 19: 1187-1188 [Ref. 25]; Iwarson (1995) APMIS 103:321-326 [Referencia 26]; Gerlich y col. (1990) Vaccine 8 Suppl:S63-68 & 79-80 [Referencia 27]; Hsu y col. (1999) Clin Liver Dis 3:901-915 [Referencia 28]; Gustafsson y col. (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355 [Referencia 29]; Rappuoli y col. (1991) TIBTECH 9:232-238 [Referencia 30]; Vaccines (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0 [Ref. 31]; Del Guidice y col. (1998) Molecular Aspects of Medicine 19:1-70 [Ref. 32]; Solicitud de patente internacional WO93/18150 [Referencia 33]; Solicitud de patente internacional WO99/53310 [Referencia 34]; Solicitud de patente internacional WO98/04702 [Ref. 35]; Ross y col. (2001) Vaccine 19:4135-4142 [Referencia 36]; Sutter y col. (2000) Padiatr Clin North Am 47:287-308 [Referencia 37]; Zimmerman & Spann (1999) Am Fam Physician 59:113-118, 125-126 [Referencia. 38]; Dreesen (1997) Vaccine 15 Suppl:S2-6 [Referencia 39]; MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998 Jan 16;47(1):12, 19 [Referencia 40]; McMichael (2000) Vaccine 19 Suppl 1:S101-107 [Referencia 41]; Schuchat (1999) Lancet 353(9146):51-6 [Referencia 42]; solicitudes de patente de GB 0026333.5, 0028727.6 & 0105640.7 [Referencia 43]; Dale (1999) Infect Dis Clin North Am 13:227-43, viii [Referencia 44]; Ferretti y col. (2001) PNAS USA 98:4658-4663 [Referencia 45]; Kuroda y col. (2001) Lancet 357(9264):1225-1240; véase también las páginas 1218-1219 [Referencia 46]; Ramsay y col. (2001) Lancet 357(9251):195-196 [Ref. 47]; Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-36 [Referencia 48]; Buttery & Moxon (2000) J R Coll Physicians London 34:163-168 [Ref. 49]; Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-133, vii [Ref. 50]; Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567 [Ref. 51]; patente europea 0 477 508 [Referencia 52]; patente de EE.UU. nº 5,306,492 [Referencia 53]; solicitud de patente internacional WO98/42721 [Referencia 54]; Conjugate Vaccines (eds. Cruse y col.) ISBN 3805549326, particularmente el vol. 10:48-114 [Referencia 55]; Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 0123423368 & 012342335X [Referencia 56]; solicitud de patente europea 0372501 [Referencia 57]; solicitud de patente europea 0378881 [Ref 58]; solicitud de patente europea 0427347 [Referencia 59]; solicitud de patente europea WO93/17712 [Ref. 60]; solicitud de patente internacional WO98/58668 [Referencia 61]; solicitud de patente europea 0471177 [Ref. 62]; solicitud de patente internacional WO00/56360 [Ref. 63]; solicitud de patente internacional WO00/61761 [Referencia 64].

Quando un antígeno de difteria está incluido en la composición, también se prefiere incluir los antígenos del tétanos y de pertussis. De forma similar, cuando un antígeno del tétanos está incluido, también se prefiere incluir los antígenos de difteria y de pertussis. De forma similar, cuando un antígeno de pertussis está incluido, también se

prefiere incluir los antígenos de difteria y del tétanos.

Antígenos adicionales incluyen antígenos dirigidos a plagas, fiebre moteada de las montañas rocosas, viruela, tifus, virus de la leucemia felina y la fiebre amarilla.

#### 4. Composiciones inmunogénicas de micropartículas

5 Polímeros biodegradables útiles para formar las composiciones inmunogénicas de micropartícula descritas en el presente documento incluyen homopolímeros, copolímeros y mezclas de polímeros derivados de los siguientes: ácido polihidroxibutírico (también conocido como polihidroxibutirato), ácido polihidroxivalérico (también conocido como polihidroxivalerato), ácido poliglicólico (PGA) (también conocido como poliglicólido), ácido poliláctico (PLA) (también conocido como polilactida), polidioxanona, policaprolactona, poliortesteer y polianhídrido. Más típicos son los poli( $\alpha$ -hidroxiácidos), tales como poli(L-lactida), poli(D,L-lactida) (ambas conocidas como "PLA" en el presente documento), poli(hidroxibutiratos), copolímeros de lactida y glicólido, tales como poli(D,L-lactida-co-glicólidos) (designados como "PLG" en el presente documento) o copolímeros de D,L-lactida y caprolactona.

15 Los polímeros anteriores están disponibles en diversos pesos moleculares y un experto en la técnica determina fácilmente el peso molecular adecuado para un uso dado. Por tanto, por ejemplo, un peso molecular adecuado para PLG puede ser del orden de aproximadamente 2.000 a 5.000. Un peso molecular adecuado para PLG puede variar de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 200.000, normalmente de aproximadamente 15.000 a aproximadamente 150.000.

20 Cuando se usan copolímeros, pueden estar disponibles los copolímeros con diversas proporciones de monómeros. Por ejemplo, cuando se usa PLG para formar las micropartículas, diversas proporciones molares de lactida:glicólido encontrarán uso en el presente documento, y la proporción es, en gran medida, cuestión de elección en función, en parte, de cualquier especie coadministrada adsorbida y/o atrapada y la velocidad de degradación deseada. Por ejemplo, un polímero de PLG 50:50, que contiene 50 % de D,L-lactida y 50% de glicólido, proporcionará un copolímero de resorción rápida, mientras que PLG a 75:25 se degrada más despacio y a 85:15 y 90:10, incluso más despacio, debido a incremento del componente lactida. Mezclas de micropartículas con varias proporciones de lactida:glicólido también pueden encontrar uso en el presente documento con el fin de alcanzar la cinética de liberación deseada. La velocidad de degradación de las micropartículas de la presente invención también se puede controlar con factores tales como el peso molecular del polímero y la cristalinidad del polímero.

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

40 Cuando se usan, los polímeros de poli(D,L-lactida-co-glicólido) normalmente son aquéllos que tienen una proporción molar lactida/glicólico que varía de 20:80 a 80:20, más normalmente de 40:60 a 60:40, y que tienen un peso molecular que varía de 10.000 a 100.000 Daltons, más normalmente de 20.000 a 70.000 Daltons.

45 Las micropartículas se preparan usando cualquiera de varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, técnicas de evaporación de disolvente/emulsión doble, como las descritas en la patente de EE.UU. nº 3,523,907 y Ogawa y col., Chem. Pharm. Bull. (1988) 36:1095-1103, se pueden usar en el presente documento para fabricar las micropartículas. Estas técnicas implican la formación de una emulsión primaria que consiste en gotas de solución polimérica, que después se mezcla con una fase acuosa continua que contiene un estabilizante de partículas/tensioactivo.

50 En otras realizaciones, las micropartículas también se pueden formar usando liofilización y coacervación, como se describe en, por ejemplo, Thomasin y col., J. Controlled Release (1996) 41:131; patente de EE.UU. nº 2,800,457; Masters, K. (1976) Spray Drying 2ª Ed. Wiley, New York; técnicas de recubrimiento en suspensión de aire, tales como recubrimiento en bombo y recubrimiento Wurster, como se describe en, por ejemplo, Hall y col., (1980) The "Wurster Process" in Controlled Release Technologies Methods, Theory, and Applications (A.F. Kydonieus, ed.), Vol. 2, págs. 133-154 CRC Press, Boca Raton, Florida and Deasy, P.B., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. (1988) S(2):99-139; y gelación iónica, como se describe en, por ejemplo, Lim y col., Science (1980) 210:908-910.

55 En realizaciones preferidas se puede usar un sistema de evaporación de disolvente de agua en aceite en agua (a/a/a) para formar las micropartículas, de conformidad con lo descrito por O'Hagan y col., Vaccine (1993) 11:965-969, la patente PCT/US99/17308 (WO 00/06123) de O'Hagan y col. y Jeffery y col., Pharm. Res. (1993) 10:362.

En general, un polímero de interés, tal como PLG, se disuelve en un disolvente orgánico, tal como acetato de etilo, dimetilcloruro (también denominado cloruro de metileno y diclorometano), acetonitrilo, acetona, cloroformo y similares. Normalmente, el polímero se proporcionará en una solución de aproximadamente 1-30%, más normalmente de aproximadamente 2-15%, incluso más normalmente de aproximadamente un 3-10 % y lo más normalmente de aproximadamente 4-8%, en disolvente orgánico. La solución polimérica se combina después con un primer volumen de solución acuosa y se emulsiona para formar una emulsión de a/a. La solución acuosa puede ser, por ejemplo, agua desionizada, solución salina normal, una solución tamponada, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o una solución tampón de citrato sódico/ácido etilendiaminotetraacético (citrato sódico/EDTA). Las últimas soluciones se pueden (a) proporcionar una tonicidad, es decir osmolalidad, que esencialmente es la misma que la de los fluidos fisiológicos normales, y (b) mantener un pH compatible con las condiciones fisiológicas normales. Como alternativa, la tonicidad y/o las características del pH de las composiciones de la presente invención se pueden ajustar tras la formación de las micropartículas y antes de la administración. Preferentemente, la proporción en volumen de la solución polimérica y la solución acuosa varía de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1, más preferentemente de aproximadamente 10:1. La emulsificación se realiza usando cualquier equipo adecuado para esta tarea y normalmente es un dispositivo de alta cizalladura, tal como, por ejemplo, un homogeneizador.

En algunas realizaciones, uno o más componentes adicionales quedan atrapados dentro de las micropartículas. Por ejemplo, el antígeno, el fosfolípidos y/o los componentes suplementarios opcionales descritos más adelante se pueden introducir añadiendo la misma (a) a la solución polimérica, si está en forma de soluble en aceite o dispersable en aceite o (b) a la solución acuosa si está en forma soluble en agua o dispersable en agua.

Un volumen de la emulsión de a/a se combina después con un segundo volumen más grande de una solución acuosa, que normalmente contiene un tensoactivo. La proporción en volumen de la solución acuosa y la emulsión de a/a normalmente varía de aproximadamente 2:1 a 10:1, más normalmente de aproximadamente 4:1. Ejemplos de tensoactivos adecuados para la práctica de la invención se enumeran anteriormente. Los expertos en la técnica pueden seleccionar fácilmente los tensoactivos adecuados para el tipo de especie que se va a adsorber. Por ejemplo, las micropartículas fabricadas en presencia de tensoactivos cargados, tales como tensoactivos aniónicos o catiónicos, pueden dar micropartículas con una superficie que tiene una carga neta positiva o neta negativa, que puede adsorber una amplia variedad de moléculas. Por ejemplo, las micropartículas fabricadas con tensoactivos aniónicos, tales como dodecilsulfato sódico (SDS), por ejemplo micropartículas de SDS-PLG, adsorben especies cargadas positivamente, por ejemplo especies que contienen polipéptido, tal como proteínas. De un modo similar, las micropartículas fabricadas con tensoactivos catiónicos, tales como CTAB, por ejemplo micropartículas de (PLG/CTAB), adsorben especies cargadas negativamente, por ejemplo especies que contienen polinucleótido, tal como ADN. Cuando la especie que se va a adsorber tiene regiones de cargas positivas o negativas, pueden ser adecuados los tensoactivos, ya sean catiónicos, aniónicos o no iónicos. Ciertas especies se pueden adsorber más fácilmente en micropartículas que tienen una combinación de tensoactivos. Además, en algunos casos, puede ser deseable añadir tensoactivo a la solución orgánica anterior.

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

Esta mezcla se homogeneiza después para producir una emulsión doble de a/a/a estable. Cada una de las anteriores etapas de homogeneización normalmente se lleva a cabo a temperatura ambiente (es decir, 25 °C) o menos, más normalmente, por ejemplo, al tiempo que se enfría en un baño de hielo.

Los disolventes orgánicos se evaporan después. Tras la preparación se pueden usar las micropartículas como tales o se liofilizan para uso futuro.

Los parámetros de formulación se pueden manipular para permitir la preparación de micropartículas pequeñas del orden de 0,05  $\mu\text{m}$  (50 nm) a micropartículas más grandes de 50  $\mu\text{m}$  o incluso mayores. Véase, por ejemplo, Jeffery et al., Pharm. Res. (1993) 10:362-368; McGee et al., J. Microencap. (1996).. Por ejemplo, la reducción de la agitación normalmente tiene como resultado micropartículas más grandes, como también un incremento en el volumen de la fase interna y un incremento en la concentración del polímero. Normalmente, las partículas pequeñas se producen mediante incremento de la agitación así como con bajos volúmenes de la fase acuosa, concentraciones

elevadas de estabilizantes de emulsión y una disminución de la concentración del polímero.

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

Tras la preparación se pueden mezclar diversos componentes con las micropartículas, incluidos el antígeno, el fosfolípidos y los componentes suplementarios opcionales, tales como los descritos más adelante, y la formulación resultante se puede liofilizar antes de usar si se desea. Normalmente, estos componentes se añaden a las micropartículas como solución acuosa o dispersión. En algunos casos, estas especies se adsorberán en la superficie de las micropartículas (véase, por ejemplo, los Ejemplos siguientes en los que los antígenos polipeptídicos se adsorben en la superficie de las micropartículas). El contenido de la especie adsorbida se puede determinar usando técnicas estándar.

Por tanto, las micropartículas poliméricas de la presente invención pueden tener diversos componentes atrapados o encapsulados en su interior, así como una diversidad de componentes adsorbidos en el mismo. Por ejemplo, un experto en la técnica puede preparar de acuerdo con la invención micropartículas que tienen componentes adsorbidos, además del antígeno adsorbido. Un experto en la técnica puede preparar también, de acuerdo con la invención, micropartículas que tienen componentes encapsulados, tales como antígeno, fosfolípido y/o cualquiera de los componentes suplementarios que se describen más adelante.

## 5. Componentes suplementarios

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden incluir una amplia variedad de componentes suplementarios opcionales. Dichos componentes suplementarios incluyen:

(a) productos farmacéuticos, tales como antibióticos y agentes antivirales, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, analgésicos, vasodilatadores, fármacos cardiovasculares, piscotrópico, neurolépticos, antidepresivos, fármacos antiparkinsonianos, beta bloqueantes, bloqueantes de los canales de calcio, inhibidores de bradiquinina, inhibidores de la ECA, vasodilatadores, inhibidores de la prolactina, esteroides, antagonistas hormonales, antihistamínicos, antagonistas de la serotonina, heparina, agentes quimioterapéuticos, factores antineoplásicos y de crecimiento, incluidos, entre otros, PDGF, EGF, KGF, IGF-1 and IGF-2, FGF, (b) hormonas, incluidas hormonas peptídicas tales como insulina, proinsulina, hormona del crecimiento, GHRH, LHRH, EGF, somatostatina, SNX-111, BNP, insulínotropina ANP, FSH, LH, PSH y hCG, hormonas esteroideas gonadales (andrógenos, estrógenos y progesterona), hormona estimulante del tiroides, inhibina, colecistoquinina, ACTH, CRF, id hormona (andrógenos, estrógenos, progesterona) hormona estimulante del tiroides, inhibina, colecistoquinina, ACTH, CRF, dinorfinas, endorfinas, endotelina, fragmentos de fibronectina, galanina, gastrina, insulínotropina, glucagón, fragmentos proteicos de unión a GTP, guanilina, las leucocininas, magainina, mastoparans, dermaseptina, sistemina, neuromedinas, neurotensina, pancreastatina, polipéptido pancreático, sustancia P, secretina, timosina, y similares, (c) enzimas, (d) mediadores de la transcripción o de la traducción, (e) intermedios de las vías metabólicas, (f) inmunomoduladores, tales como cualquiera de las diversas citocinas, incluidas interleucina-1, interleucina-2, interleucina-3, interleucina-4 e interferón gamma y (g) adyuvantes inmunológicos suplementarios, tales como los descritos más adelante.

En el caso de composiciones inmunogénicas de micropartículas, dichos componentes suplementarios pueden ser, por ejemplo, adsorbidos sobre la superficie de las micropartículas, atrapadas dentro de las micropartículas, disueltas o dispersas en solución al tiempo que no están unidas a las micropartículas adsorbidas o atrapadas dentro de otro grupo de partículas etcétera.

En el caso de las composiciones inmunogénicas en emulsión, dichos componentes suplementarios pueden estar, por ejemplo, disueltos o dispersos en la fase acuosa de la emulsión etcétera.

Los adyuvantes inmunológicos suplementarios se pueden usar para potenciar la eficacia de las composiciones inmunogénicas. Por ejemplo, dichos adyuvantes inmunológicos se pueden administrar a la vez con las composiciones inmunogénicas de la presente invención, por ejemplo en la misma composición o en composiciones distintas. Como alternativa, dichos adyuvantes se pueden administrar antes o después de las composiciones inmunogénicas de la presente invención.

Dichos adyuvantes inmunológicos suplementarios incluyen, entre otros: (1) sales de aluminio (alumbre), tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio etc.; (2) adyuvantes de saponina, tales como Quil A, o QS21 (p. ej., Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA)) se pueden usar o partículas generadas a partir de ellas, tales como ISCOM (complejos de inmunoestimulación), en el que los ICOMS pueden estar desprovistos del detergente adicional, por ejemplo el documento WO00/07621; (3) Adyuvante completo de Freund (CFA) y Adyuvante Incompleto de Freund (IFA); (4) citocinas, tales como interleucinas (p.ej. IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (WO99/44636) etc.), interferones (p. ej., interferones gamma), factor estimulante de las colonias de

- macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (5) oligonucleótidos que comprenden motivos de CpG (Roman et al., Nat. Med., 1997, 3, 849-854; Weiner et al., PNAS USA, 1997, 94, 10833-10837; Davis et al., J. Immunol. 1988, 160, 870-876; Chu et al., J. Exp. Med., 1997, 186, 1623-1631; Lipford et al., Eur. J. Immunol. 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu et al., Vaccine, 1988, 16, 1216-1224, Krieg et al., Nature, 1995, 374, 546-549; Klinman et al., PNAS USA, 1996, 93, 2879-2883; Ballas et al., J. Immunol., 1996, 157, 1840-1845; Cowdery et al., J. Immunol., 1996, 156, 4570-4575; Halpern et al., Cell. Immunol., 1996, 167, 72-78; Yamamoto et al., Jpn. J. Cancer Res., 1988, 79, 866-873; Stacey et al., J. Immunol., 1996, 157, 2116-2122; Messina et al., J. Immunol., 1991, 147, 1759-1764; Yi et al., J. Immunol., 1996, 157, 4918-4925; Yi et al., J. Immunol., 1996, 157, 5394-5402; Yi et al., J. Immunol., 1998, 160, 4755-4761; and Yi et al., J. Immunol., 1998, 160, 5898-5906; solicitudes de patente internacional WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100 WO98/55495, WO98/37919 and WO98/52581), es decir oligonucleótidos que contienen al menos el dinucleótido CG (un nucleótido de citosina seguido por un nucleótidos de guanosina), usándose la 5-metilcitosina opcionalmente en lugar de citosina; (6) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno, por ejemplo el documento WO99/52549; (7) un tensioactivo de éster de polioxietilensorbitano en combinación con un octoxinol (WO01/21207) o un tensioactivo de éster de polioxietilenaquiléter o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como octoxiol (WO01/21152); (8) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulador (p. ej., un oligonucleótidos de CpG) (WO00/62800); (9) un inmunoestimulador y una película de sal metálica, por ejemplo WO00/23105; (10) una saponina y una emulsión de aceite en agua, por ejemplo el documento WO99/11241; (11) una saponina (p. ej. QS21) + 3dMPL +IL-12 (opcionalmente + un estero), por ejemplo el documento WO98/57659; (12) mutantes destoxificados de una toxina bacteriana de ribosilación del ADP tal como una toxina del cólera (TC), una toxina de pertussis o una toxina termolábil de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63 (en el que la lisina está sustituida por el aminoácido salvaje en la posición 63), LT-R72 (en el que la arginina está sustituida por el aminoácido salvaje en la posición 72), CT-S109 (en el que la serina está sustituida por el aminoácido salvaje en la posición 109) y PT-K9/G129 (en el que la lisina está sustituida por el aminoácido salvaje en la posición 9 y la glicina sustituida en la posición 129) (véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales nº WO93/13202 y WO92/19265); (13) adyuvantes que comprende ADN bicatenario natural o sintético ("dsRNA"), que normalmente está formado por pares de bases de ácido riboguanílico-ácido ribocitídilico ([rG-rC]) y ácido riboadenílico ácido polirribouridílico ([rA-rU]); para más información véase, por ejemplo, el documento de propiedad conjunta PCT/US02/30423.; y (14) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores para potenciar la eficacia de la composición.
- Los péptidos de muramilo incluyen, entre otros, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina MTP-PE), etc.

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

## 35 6. Administración

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

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención se pueden usar para liberación dirigida específica de sitio. Por ejemplo, la administración intravenosa de las composiciones se puede usar para dirigirlas a los pulmones, el hígado, el bazo, la circulación sanguínea o la médula ósea.

Como se puede ver a partir de lo anterior, las composiciones de la presente invención incluirán, en general, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, se pueden usar vehículos tales como agua, solución salina, glicerol, polietilenglicol, ácido hialurónico etc. Pueden estar presentes otros excipientes, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tampón biológicas y similares. Un tampón biológico puede ser prácticamente cualquier solución que sea farmacológicamente aceptable y que proporciona la formulación con el pH deseado, es decir un pH dentro del intervalo fisiológico. Ejemplos incluyen solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris, solución salina tamponada con Hank y similares. Dependiendo de la forma de dosificación final, también pueden introducirse otros excipientes conocidos en la técnica, incluidos aglutinantes, disgregantes, cargas (diluyentes), lubricantes, deslizantes (potenciadores del flujo), auxiliares de la compresión, colores, edulcorantes, conservantes, agentes de suspensión/dispersión, formadores de película/recubrimientos y tintas de impresión.

El tratamiento se puede realizar de acuerdo con un calendario de dosis única o un calendario de múltiples dosis. Un calendario de múltiples dosis es uno en el que se puede administrar un ciclo primario de administración, por ejemplo con 1-10 dosis separadas, seguidas de otras dosis administradas a intervalos de tiempo, escogidos para mantener y/reforzar la respuestas terapéutica, por ejemplo a 1-4 meses para una segunda dosis y, en caso necesario, una(s) dosis posterior(es) tras varios meses. El régimen de dosificación vendrá determinada, al menos en parte, por la necesidad del sujeto y dependerá del juicio del médico responsable.

Además, si se desea la prevención de la enfermedad, las composiciones se administran, en general, antes de la llegada de la aparición principal de la infección o trastorno de interés. Si se desean otras formas de tratamiento, por ejemplo la reducción o eliminación de síntomas o recurrencias, las composiciones se administran, en general, después de la llegada de la aparición principal de la infección o trastorno de interés.

## 5 C. Sección experimental

A continuación se encuentran ejemplos de formas de realización específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos y no están destinados a limitar el ámbito de la presente invención de ningún modo.

10 Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (p. ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se permiten algunos errores y desviaciones experimentales.

### Ejemplo 1

#### Preparación y caracterización de micropartículas de PLG blanco

15 Las micropartículas se prepararon usando una solución al 6 % en peso/volumen de polímero RG504 (un polímero PLG que tiene una proporción molar de lactida/glicólido 50:50 y un peso molecular de 42-45 RG504 disponibles en Boehringer Ingelheim) en cloruro de metileno. 10 ml de esta solución se homogeneizaron con 25, ml de PBS usando una sonda de 10 mm de un homogeneizador (Ultra Turrax T25 IKA-Labortechnik, Alemania) durante tres minutos a 15.000 rpm, formando de este modo una emulsión de agua en aceite. Después, esta emulsión se añadió a 50 ml de agua destilada que contiene 6ug/ml de dioctil sulfosuccinato sódico (DSS) (disponible en Sigma, EE.UU.) y se homogeneizó a una velocidad muy alta usando un homogeneizador con una sonda de 20 mm (ES-15 Omni International, GA, EE.UU.) durante 25 minutos en un baño de hielo. Esto tuvo como resultado una emulsión de agua en aceite en agua, que se agitó a 1.000 rpm durante 12 horas a temperatura ambiente, lo que permitió la evaporación del cloruro de metileno. Las micropartículas resultantes se liofilizaron. Las micropartículas resultantes contenían 0,05 5 de DSS en peso/peso. La distribución del tamaño de las micropartículas resultantes se determinó usando un analizador del tamaño de partícula (Master Sizer, Malvern Instruments, Reino Unido) y se descubrió que era entre 0,8 y 1,2 µm.

### Ejemplo 2

#### Preparación y caracterización de

#### Micropartículas PLG con Eisai 57 o Eisai 53 atrapadas

30 Las micropartículas se prepararon homogeneizando 10 ml de solución al 6 % en peso/volumen de polímero de PLG RG504 en cloruro de metileno al cual se ha añadido (a) 3 mg de Eisai57 (ER-804057, Eisai Co., Ltd., Tokyo, JP) fosfolípido en una suspensión de cloroformo o (b) 3 mg de Eisai 53 (ER-804053, Eisai Co., Ltd., Tokyo, JP) fosfolípido en una suspensión de etanol, con 2,5 ml de PBS usando una sonda de 10 mm (Ultra-Turrax T25 IKA-Labortechnik, Alemania) durante tres minutos a 15.000 rpm, formando de este modo emulsiones de agua en aceite. Después, cada una de estas emulsiones se añadió a 50 ml de agua destilada que contiene 6ug/ml de DSS y se homogeneizó a una velocidad muy alta usando un homogeneizador con una sonda de 20 mm (ES-15 Omni International, GA, EE.UU.) durante 25 minutos en un baño de hielo. Esto tuvo como resultado emulsiones de agua en aceite en agua, que se agitaron a 1.000 rpm durante 12 horas a temperatura ambiente, al tiempo que permitió la evaporación del cloruro de metileno. Las micropartículas resultantes se liofilizaron. Las micropartículas resultantes contenían 0,05 5 de DSS en peso/peso. La distribución del tamaño de las micropartículas resultantes se determinó usando un analizador del tamaño de partícula (Master Sizer, Malvern Instruments, Reino Unido) y se descubrió que era entre 0,8 y 1,2 µm.

### Ejemplo 3

#### Preparación de composiciones inyectables

45 10 mg (es decir, 10 ml de una suspensión de 10 mg/ml) de las partículas de DSS del Ejemplo 1 se incubaron durante la noche a temperatura ambiente con 1 mg del antígeno de la meningitis B ("MenB") (véase, por ejemplo, los documentos PCT/IB02/03904; WO 01/52885; Vol. 287 Science, 1816 (2000)) en 1 ml de tampón de histidina (10 mmol, pH 5,0). La suspensión se liofilizó tras la adición del excipiente (manitol:sacarosa, 45:15 mg/ml).

50 Estas composiciones, (a) tras reconstitución en agua para inyectables, se inyectaron por vía intramuscular en ratones ("PLG/ MenB"), (b) combinadas con 0,1 ml de una solución que contiene 1,0 mg/ml de oligonucleótido CpG (disponible en Oligos Inc., EE.UU.) en tampón T.E. ("PLG/MenB + sol CPG") y se inyectaron, (c) se combinaron con 0,1 ml de una solución que contiene 1,0 mg/ml de ER-804053 en etanol ("PLG/MenB + sol Eisai53") y se inyectaron, (d) se combinaron con 0,1 ml de una solución que contiene 1,0 mg/ml de ER-804057 en etanol ("PLG/MenB + sol Eisai57") y se inyectaron, (e) se combinaron con 10 mg de partículas de DSS liofilizadas, con ER-804053 atrapadas del Ejemplo 2 ("PLG/MenB + PLG/Eisai53") y se inyectaron, o (f) se combinaron con 10 mg de partículas de DSS

5 liofilizadas atrapadas ER-804057 del Ejemplo 2 ("PLG/MenB + PLG/Eisai57") y se inyectaron Asimismo, 100 mg de partículas de DSS liofilizadas con fosfolípido atrapado del Ejemplo 2 se incubaron durante la noche a temperatura ambiente con 1,0 mg del antígeno de la meningitis B e 1 ml de tampón de histidina (pH 5,0) Cada una de estas composiciones (denominadas en el presente documento "PLG/Eisai53/MenB" o "PLG/Eisai57/MenB") se inyectó directamente por vía intramuscular en ratones.

En cada uno de los casos anteriores se reforzó a los ratones a los 21 días y a los 35 días.

#### Ejemplo comparativo 4

##### Preparación y caracterización de de la emulsión de MF59

10 En un batidor de 50 ml se introdujeron 500 µl de cloroformo y se añadieron 100 µl de Span® 85 (disponible en Sigma, EE.UU.) y 1 ml de escualeno (disponible en Sigma, EE.UU.) y se mezclaron. A 18,8 ml de agua D.I. se añadieron 100 µl de Tween® 80 (de Sigma, EE.UU.) y se mezclaron mediante agitación durante 15 minutos. La solución de Tween® se añadió a la mezcla de aceite y se homogeneizó con una sonda de 10 mm (Ultra-Turrax T25 IKA-Labortechnik, Alemania) durante 1 minuto. La mezcla emulsionada se pasó a través de un microfluidificador (modelo MI105 de Microfluidics) a 90 psi 5 veces. Se dejó evaporar el cloroformo residual durante 30 minutos. Las emulsiones se analizan según el tamaño mediante dispersión de luz dinámica, lo que dio una distribución del tamaño < 200 nm.

#### Ejemplo comparativo 5

##### Preparación y caracterización de las emulsiones Eisai57 and Eisai53 MF59

20 Se prepararon emulsiones de aceite en agua con Eisai 57 o Eisai53 incorporados en la fase oleosa. En pocas palabras, 800 µl de Eisai57 5 mg/ml en cloroformo y 800 µl de Eisai53 5 mg/ml en cloroformo se introdujeron en batidores de 50 ml distintos. Se dejó evaporar el cloroformo hasta un volumen de aproximadamente 500 µl cada uno. A cada uno se añadieron 100 µl de Span® 83 y 1 ml de escualeno. A 18,8 ml de agua D.I. se añadieron 100 µl de Tween® 80 y se mezclaron mediante agitación durante 15 minutos. La solución de Tween® se añadió a la mezcla de aceite y se homogeneizó con una sonda de 10 mm (Ultra-Turrax T25 IKA-Labortechnik, Alemania) durante 1 minuto. Cada mezcla emulsionada se pasó a través de un microfluidificador a 90 psi 5 veces. Las emulsiones se analizaron según el tamaño mediante dispersión de luz dinámica, lo que dio una distribución del tamaño < 200 nm.

#### Ejemplo comparativo 6

##### Preparación de composiciones inyectables

30 A 0,5 ml de cada una de las emulsiones formadas en los Ejemplos comparativos 4 y 5 se añadieron 0,5 ml de una solución que contiene 0,2 mg/ml de antígeno en PBS y las composiciones resultantes se mezclaron durante 5 minutos. Los antígenos usados fueron los siguientes: (a) antígeno de la meningitis B, con las composiciones inyectables resultantes a los que se hace referencia en el presente documento "MF59 + sol MenB", "MF59/Eisai53 + sol MenB" y "MF59/Eisai57 + sol MenB"; (b) proteína de la cubierta gp120 del VIH (véase, por ejemplo, los documentos WO 00/06123; WO 02/26209), con las composiciones inyectables resultantes a los que se hace referencia en el presente documento como "MF59 + sol gp120", "MF59/Eisai53 + sol gp120" y "MF59/Eisai57 + sol gp120"; (c) polipéptido E1E2 del VHC (véase, por ejemplo, PCT/US02/20676), con las composiciones inyectables resultantes a los que se hace referencia en el presente documento como "MF59 + sol E1E2" "MF59/Eisai53 + sol E1E2" and "MF59/Eisai57 + sol E1E2".

40 A 0,5 ml de la emulsión formada en el Ejemplo comparativo 4 se añadió (a) 0,5 ml de una solución que contiene 0,1 mg/ml del oligonucleótido CpG en PBS y (b) 0,5 ml de una solución que contiene 0,2 mg/ml del antígeno en PBS. Las composiciones resultantes se mezclaron durante 5 minutos. Los antígenos usados fueron los siguientes: (a) proteína de la meningitis B ("MF59 + sol MenB + sol CpG"); (b) proteína gp120 de la cubierta del VIH ("MF59 + sol gp120 + sol CpG"); (c) polipéptido E1E2 del VHC ("MF59 + sol E1E2 + sol CpG").

45 Cada una de estas composiciones se inyectó directamente por vía intramuscular en los ratones. En cada se reforzó a los ratones a los 21 días y a los 35 días.

#### Ejemplo 7

##### Evaluación *in vivo*

##### Ensayos de anticuerpos

50 Los anticuerpos de los isotipos IgG e IgG (IgG1 e IgG2a) específicos de antígeno se determinaron mediante ELISA usando detección colorimétrica basada en 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina. Las placas de ELISA (Nunc Maxisorb U96) se revistieron con 50 µl del antígeno purificado a 5 µg/ml durante la noche a 4 °C. Los pocillos revestidos se bloquearon durante 1 hora a 37 °C con 150 µl de 5 % de suero de cabra (Gibco BRL, Grand Island, NY) en solución

5 salina tamponada con fosfato (PBS). Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS/0,3 % de  
 TWEEN-20) y se secaron con golpecitos. Las muestras de suero y un suero estándar se diluyeron inicialmente en el  
 tampón de bloqueo y después de transfirieron a placas revestidas bloqueadas en las que las muestras se diluyeron  
 en serie tres veces con el mismo tampón. Las placas se lavaron tras 1 hora de incubación a 37 °C. Se usó  
 10 peroxidada de rábano conjugada con la cadena gamma específica de IgG de cabra anti-ratón (Caltag Laboratories,  
 Inc.) para determinar la IgG total y la IgG1 y la IgG2a anti-ratón se usaron para determinar los isotipos. Tras 1 hora  
 de incubación a 37 °C, las placas se lavaron para eliminar los anticuerpos no unidos. Se usó sustrato TMB para  
 desarrollar las placas y la reacción de color se bloqueó tras 15 minutos mediante la adición de HCl 2N. Los títulos de  
 los anticuerpos se expresaron como el recíproco de la dilución de la muestra, en la que la densidad óptica de la  
 muestra diluida igualó 0,5 a 450 nm. Los resultados se presentan en las Tablas 2 y 3A-3C.

Tabla 2. Títulos de GMT dos semanas después de la 3<sup>a</sup> inmunización

Formulación	IgG total
PLG/MenB	8245
PLG/MenB + sol CPG	14402
PLG/MenB + sol Eisai53	43382
PLG/MenB + sol Eisai57	72901
PLG/MenB + PLG/Eisai53	35964
PLG/MenB + PLG/Eisai57	34526
PLG/Eisai53/MenB	36310
PLG/Eisai57/MenB	44656

Tabla 3A. Títulos GMT tres semanas después de la 3<sup>a</sup> inmunización

Formulación comparativa	IgG total	IgG2a	Proporción; (IgG2a)/(MF59+sol MenB)
MF59 + sol MenB	46325	2530	1
MF59 + sol MenB + sol CpG	33985	5815	2,30
MF59/Eisai53 + sol MenB	98501	24508	9,69
MF59/Eisai57 + sol MenB	78366	19691	7,78

15

Tabla 3B. Títulos GMT tres semanas después de la 3<sup>a</sup> inmunización.

Formulación comparativa	IgG total	IgG2a	Proporción; (IgG2a)/(MF59+sol gp120)
MF59 + sol gp120	764	25	1
MF59 + sol gp120 + sol CpG	5285	1753	70,12
MF59/Eisai53 + sol gp120	5062	1941	77,64
MF59/Eisai57 + sol gp120	13307	15618	624,7

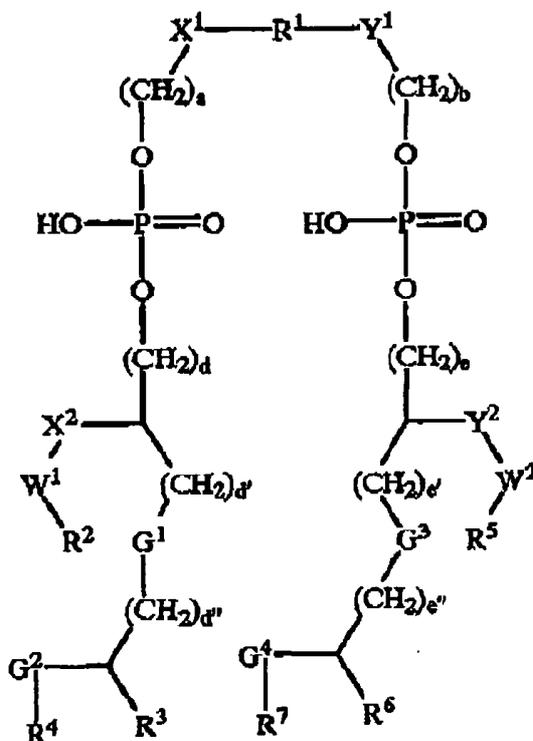
Tabla 3C. Títulos GMT tres semanas después de la 3ª inmunización.

Formulación comparativa	IgG total	IgG2a	Proporción; (IgG2a)/(MF59+sol E1E2)
MF59 + sol E1E2	1090	2	1
NiF59 + sol E1E2 + sol CpG	201	69	34
MF59/Eisai53 + sol E1E2	774	256	128
MF59/Eisai57 + sol E1E2	1205	562	281

Aunque las formas de realización preferidas de la invención sujeto se han descrito con algún detalle, debe entenderse que se pueden realizar variaciones obvias sin desviarse ámbito de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende: (a) agua; (b) una micropartícula polimérica que comprende un polímero seleccionado de un poli( $\alpha$ -hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido y un policianoacrilato; (c) un antígeno adsorbido en la micropartícula; y (d) un compuesto fosfolípidos sintético que tiene la fórmula siguiente:



en la que:

R<sup>1</sup> está seleccionado del grupo que consiste en

- (a) C(O);  
 10 (b) C(O)-alquilo C<sub>1-14</sub>-C(O), en el que el alquilo C<sub>1-14</sub> está opcionalmente sustituido con hidroxilo, alcoxi C<sub>1-5</sub>, alquilendioxi C<sub>1-5</sub>, alquilamino C<sub>1-5</sub>, o alquilo C<sub>1-5</sub>-arilo en el que el resto arilo del alquilo C<sub>1-5</sub>-arilo está opcionalmente sustituido con alcoxi C<sub>1-5</sub>, alquilamino C<sub>1-5</sub>, alcoxi C<sub>1-5</sub>-amino, alquilamino C<sub>1-5</sub>, alcoxi C<sub>1-5</sub>, -O-alquilamino C<sub>1-5</sub>, alcoxi C<sub>1-5</sub>, -O-alquilamino C<sub>1-5</sub>-C(O)-alquilo C<sub>1-5</sub> C(O)OH, -O-alquilamino C<sub>1-5</sub>-C(O)-alquilo C<sub>1-5</sub>-C(O)alquilo C<sub>1-5</sub>;  
 15 (c) alquilo de C<sub>2</sub> a C<sub>15</sub> de cadena lineal o ramificada sustituida opcionalmente con hidroxilo o alcoxi; y  
 (d) -C(O)-arileno C<sub>6-12</sub>-C(O)-, en el que el arileno está opcionalmente sustituido con hidroxilo, halógeno, nitro o amino;

a y b son, de forma independiente, 0, 1, 2, 3 o 4;

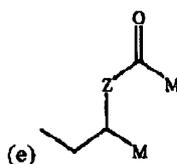
d, d', d'', e, e' y e'' son, de forma independiente, un número entero de 1 a 4;

- 20 X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, Y<sup>1</sup> e Y<sup>2</sup> están seleccionados, de forma independiente, del grupo que consiste en cero, oxígeno, NH y N(C(O)alquilo C<sub>1-4</sub>) y N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>;

W<sup>1</sup> y W<sup>2</sup> están seleccionados, de forma independiente, del grupo que consiste en carbonilo, metileno, sulfona y sulfóxido;

R<sup>2</sup> y R<sup>5</sup> están seleccionados, de forma independiente, del grupo que consiste en:

- 25 (a) alquilo de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o de cadena ramificada que está sustituido opcionalmente con oxo, hidroxilo o alcoxi,  
 (b) alqueno o dialqueno de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o de cadena ramificada que está sustituido opcionalmente con oxo, hidroxilo o alcoxi,  
 (c) alcoxi de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o de cadena ramificada que está sustituido opcionalmente con oxo, hidroxilo o alcoxi;  
 30 (d) -NH-alquilo de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o de cadena ramificada, en el que el grupo alquilo está sustituido opcionalmente con oxo, hidroxilo o alcoxi; y



en la que Z está seleccionado del grupo que consiste en O y NH, y M y N están seleccionados de forma independiente del grupo que consiste de alquilo, alquenilo, alcoxi, aciloxi, alquilamino y acilamino de C<sub>2</sub> y C<sub>20</sub> de cadena lineal o de cadena ramificada;

- 5 R<sup>3</sup> y R<sup>6</sup> están seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en alquilo o alquenilo de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o de cadena ramificada, sustituido opcionalmente con flúor u oxo;  
R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> está seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en C(O) alquilo o alquenilo de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o ramificada; alquilo de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o ramificada; alcoxi de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o ramificad; alquenilo de C<sub>2</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal o ramificada; en los que los grupos alquilo, alquenilo o alcoxi están sustituidos independiente u opcionalmente con hidroxil, flúor o alcoxi de C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>;  
10 G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup> y G<sup>4</sup> está seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en oxígeno, metileno, amino, tiol, NHC(O)- y -N(C(O)alquilo C<sub>1-4</sub>)-; o G<sup>2</sup> R<sup>4</sup> o G<sup>4</sup> R<sup>7</sup> pueden juntos se un átomo de hidrógeno o hidroxilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 15 2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que R<sup>1</sup> es C(O); a, b, d, d', d'', e, e' y e'' son, de forma independiente, 1 o 2; X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, Y<sup>1</sup> e Y<sup>2</sup> son NH; W<sup>1</sup> y W<sup>2</sup> son carbonilo; R<sup>2</sup> y R<sup>5</sup> son alquilo de C<sub>10</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal que está sustituido con oxo; R<sup>3</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo de C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> de cadena lineal; R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> son C(O)alquilo o alquinilo de C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub> de cadena lineal; y G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup> y G<sup>4</sup> son oxígeno.

- 20 3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que R<sup>1</sup> es C(O); a y b son 2, d, d' y e son 1; , d'' y e'' son, 2; X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, Y<sup>1</sup> e Y<sup>2</sup> son NH; W<sup>1</sup> y W<sup>2</sup> son carbonilo; R<sup>2</sup> y R<sup>5</sup> son alquilo de C<sub>13</sub> a C<sub>20</sub> de cadena lineal que está sustituido con oxo en la posición 2; R<sup>3</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo de C<sub>7</sub> de cadena lineal; R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> son C(O)alquilo de C<sub>11</sub> de cadena lineal; y G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup> y G<sup>4</sup> son oxígeno.

4. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el fosfolípidos está atrapado dentro de las micropartículas.

- 25 5. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el fosfolípidos están adsorbidos dentro de las micropartículas.

6. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el fosfolípidos están dispersos en la solución acuosa.

7. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dos o más antígenos están adsorbidos dentro de las micropartículas.

- 30 8. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que antígeno adicional está atrapado dentro de las micropartículas.

9. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la composición inmunogénica comprende además un tensioactivo.

- 35 10. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que las micropartículas tienen un diámetro entre 500 nanómetros y 20 micrómetros.

11. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que el poli (α-hidroxi ácido) se selecciona de poli(L-lactida), poli(D,L-lactida) y poli(lactida-co-glicólido).

12. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que el poli (α-hidroxi ácido) es poli(L-lactida)glicólido.

- 40 13. La composición inmunogénica de la reivindicación 12, en la que el poli (D,L-lactida-co-glicólido) tiene una proporción molar de lactida: glicólido de 40:60 a 60:40.

14. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que antígeno es un antígeno que contiene polipéptido.

- 45 15. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que antígeno es un antígeno que contiene polinucleótido.

16. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que antígeno deriva de una célula tumoral.
17. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que antígeno deriva de un organismo patógeno.
- 5 18. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 17, en la que el organismo patógeno está seleccionado de un virus, una bacteria, un hongo y un parásito.
19. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 17, en la que el organismo patógeno está seleccionado del virus del VIH, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, el virus de la meningitis B, *Haemophilus influenza* de tipo B, pertussis, difteria, tétanos y virus de la gripe A.
- 10 20. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 17, en la que el organismo patógeno está seleccionado del virus de la inmunodeficiencia humana, *Neisseria meningitidis* y el virus de la hepatitis.
21. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, que además comprende adyuvante inmunológico suplementario.
- 15 22. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en la que la composición inmunogénica es una composición inyectable.
23. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-22 para su uso en un procedimiento para liberar una cantidad terapéutica de un antígeno a un animal huésped vertebrado.
24. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-22 para su uso en un procedimiento de tratar a un animal huésped que tiene una infección por organismos patógenos o un tumor.
- 20 25. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-22 para su uso en un procedimiento de inmunización de un animal huésped frente a una infección por un organismo patógeno o un tumor.
26. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-22 para su uso en un procedimiento de estimular una respuesta inmunitaria en un animal huésped.
- 25 27. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 26, en la que la respuesta inmunitaria comprende una respuesta inmunitaria humoral.
28. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 26, en la que la respuesta inmunitaria comprende una respuesta inmunitaria celular.
29. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26 en la que el animal huésped es un animal vertebrado.
- 30 30. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26 en la que el animal huésped es un mamífero.
31. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26 en la que el animal huésped es un ser humano.
32. Una composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a -21 para su uso en terapia.
- 35 33. Uso de una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 para su uso en la fabricación de un medicamento para:
- 40 i) administrar una cantidad terapéutica de un antígeno a un animal huésped vertebrado;  
 ii) tratar a animal huésped que tiene una infección por un organismo patógeno o un tumor;  
 iii) inmunizar a animal huésped contra un tumor o infección producida por un organismo; o  
 iv) estimular una respuesta inmunitaria en un animal huésped.