

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 386**

51 Int. Cl.:

|                    |           |                    |           |
|--------------------|-----------|--------------------|-----------|
| <b>A61K 39/00</b>  | (2006.01) | <b>A61K 39/29</b>  | (2006.01) |
| <b>A61K 39/02</b>  | (2006.01) | <b>A61K 39/295</b> | (2006.01) |
| <b>A61K 39/09</b>  | (2006.01) | <b>A61K 47/34</b>  | (2006.01) |
| <b>A61K 39/095</b> | (2006.01) | <b>A61K 47/42</b>  | (2006.01) |
| <b>A61K 39/102</b> | (2006.01) | <b>A61K 47/48</b>  | (2006.01) |
| <b>A61K 39/116</b> | (2006.01) | <b>A61K 48/00</b>  | (2006.01) |
| <b>A61K 39/12</b>  | (2006.01) | <b>C12N 15/09</b>  | (2006.01) |
| <b>A61K 39/155</b> | (2006.01) |                    |           |
| <b>A61K 39/21</b>  | (2006.01) |                    |           |
| <b>A61K 39/245</b> | (2006.01) |                    |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2002 E 02763972 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 1372528**

54 Título: **Aumento de la inmunidad de las mucosas tras sensibilización parenteral**

30 Prioridad:

**05.04.2001 US 282389 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**01.04.2013**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**O'HAGAN, DEREK**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 399 386 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

Aumento de la inmunidad de las mucosas tras sensibilización parenteral

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere en general a la inmunización de las mucosas por uno o más antígenos tras la administración parenteral del mismo o diferentes antígenos. Se describe también el uso de estos sistemas que aumentan la inmunidad de las mucosas para inducir las respuestas inmunes posteriores.

**Antecedentes de la invención**

10 Sería deseable el desarrollo de vacunas que activasen la inmunidad, particularmente la inmunidad de las mucosas, frente a diversos patógenos. Muchos patógenos que producen enfermedades, tales como bacterias, virus, parásitos y otros microbios, se transmiten a través de superficies de las mucosas.

Un ejemplo de un virus que se piensa que se transmite a través de las superficies de las mucosas es el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). El SIDA está reconocido como uno de los mayores riesgos para la salud los que se enfrenta la medicina moderna y la transmisión sexual del VIH en todo el mundo es la principal causa de SIDA. No existen, todavía, curas o vacunas para el SIDA.

15 En 1983-1984, tres grupos identificaron de forma independiente el agente etiológico sospechoso de producir el SIDA. Véase, por ejemplo, Barre-Sinoussi y col. (1983) Science 220: 868-871; Montagnier y col., en Human T-Cell Leukemia Viruses (Gallo, Essex & Gross, eds., 1984); Vilmer y col. (1984) The Lancet 1: 753; Popovic y col. (1984) Science 224: 497-500; Levy y col. (1984) Science 225: 840-842. Estos aislados se denominaron de forma diversa como virus asociado a linfadenopatía (LAV), virus de tipo III linfotrópico de linfocitos T humanos (HTLV-III), o retrovirus asociado a SIDA (ARV). Todos estos aislados son cepas del mismo virus, y fueron denominados en conjunto posteriormente como Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Con este aislamiento de los virus relacionados que producen el SIDA, las cepas denominadas originalmente como VIH se denominan ahora VIH-1 y el virus relacionado se denomina VIH-2. Véanse, por ejemplo, Guyader y col. (1987) Nature 326: 662-669; Brun-Vezinet y col. (1986) Science 233: 343-346; Clavel y col. (1986) Nature 324: 691-695. En consecuencia, existe una necesidad en la técnica de composiciones y procedimientos adecuados para tratar y/o evitar la infección por VIH a nivel mundial.

20 Se ha recopilado una gran cantidad de información acerca del virus VIH, y se han examinado algunas dianas para el desarrollo de la vacuna que incluyen los productos de los genes *env*, *Gag*, *pol* y *tat* codificados por VIH. Se ha descrito también la inmunización con polinucleótidos naturales y sintéticos que codifican el VIH, tal como se describe, por ejemplo, en el documento PCT/US99/31245 de propiedad compartida y las referencias citadas en el anterior. Además, se han administrado polinucleótidos que codifican el VIH en diversos intentos por identificar una vacuna. (Véase, por ejemplo, Bagarazzi y col. (1999) J. Infect. Dis. 180: 1351-1355; Wang y col. (1997) Vaccine 15: 821-825). Un vector del alfavirus de la encefalitis equina de Venezuela (VEE) competente para la replicación que transporta el dominio matriz/cápsida de VIH que podría estimular respuestas CTL se ha administrado por vía subcutánea a animales (Caley y col. (1997) J. Virol. 71: 3031-3038). Además, también se ha demostrado que los vectores de alfavirus derivados del virus Sindbis estimulan respuestas específicas para gag de VIH en animales (Gardner y col. (2000) J. Virol. 74:11849-11857). De forma similar, se han administrado también péptidos de VIH a sujetos animales (Staats y col. (1997) AIDS Res Hum Retroviruses 13:9 45-952; Belyakov (1998) J. Clin. Invest. 102: 2072).

30 Un ejemplo de una bacteria que se puede transmitir a través de las superficies de la mucosa es *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis* o N.men.). *Neisseria meningitidis*, un agente causante de la meningitis bacteriana y de la sepsia. Los meningococos se dividen en grupos serológicos basándose en las características inmunológicas de los antígenos de la cápsula y de la pared celular. Actualmente, los serogrupos reconocidos incluyen A, B, C, W-135, X, Y, Z y 29E. Los polisacáridos responsables de la especificidad del serogrupo se han purificado a partir de algunos de estos grupos, incluyendo A, B, C, W-135 e Y. Véanse, también los documentos WO 00/66791; WO 99/24578; WO 00/71574; WO 99/36544; WO 01/04316; WO 99/57280; WO 01/31019; WO 00/22430; WO 00/66741; WO 00/71725; WO 01/37863; WO 45 01/38350; WO 01/52885; WO 01/64922; WO 01/64920; WO 96/29412; y WO 00/50075.

*N. meningitidis* serogrupo B (denominado "MenB" o "NmB" en el presente documento) representa un gran porcentaje de meningitis bacteriana en bebés y niños que residen en los Estados Unidos y Europa. El organismo produce también una sepsia fatal en adultos jóvenes. En adolescentes, vacunas de MenB experimentales consistentes en vesículas de proteínas de membranas externas (OMP) son algo protectoras. Sin embargo, no se ha observado protección en bebés vacunados, el grupo de edad con mayor riesgo de enfermedad. Adicionalmente, las vacunas de OMP son específicas del serotipo y el subtipo, y las cepas MenB dominantes están sujetas a una variación geográfica y temporal, lo que limita la utilidad de dichas vacunas.

55 Se han desarrollado vacunas basadas en polisacáridos capsulares eficaces contra la enfermedad meningocócica producida por los serogrupos A, C, Y y W135. Además, se ha descrito una vacuna de combinación MenB/MenC. Véase el documento WO 99/61053. Sin embargo, intentos similares para desarrollar una vacuna del polisacárido MenB han fracasado debido a la mala inmunogenicidad del polisacárido MenB de la cápsula (denominado "MenB PS" en el

presente documento). MenB PS es un homopolímero del ácido (N-acetil ( $\alpha$  2->8) neuramínico. *Escherichia coli* K1 tiene un polisacárido capsular idéntico. Los anticuerpos estimulados por MenB PS reaccionan en cruzado con el ácido polisialílico del hospedador (PSA). PSA se expresa abundantemente en tejido fetal y de recién nacido, especialmente en las moléculas de adhesión celular neural ("NCAM") que se encuentran en el tejido cerebral. PSA se encuentra también en una menor extensión en tejidos adultos, que incluyen riñón, corazón y el nervio olfatorio. De esta manera, la mayor parte de los anticuerpos dirigidos contra MenB PS son también autoanticuerpos. Dichos anticuerpos tienen por tanto el potencial para afectar de forma adversa el desarrollo del feto, o de precipitar una respuesta autoinmune.

Se han preparado derivados de MenB PS en un intento de soslayar la mala inmunogenicidad de MenB PS. Se han descrito, por ejemplo, derivados de MenB PS C3-C8 N-acil sustituidos. Véase, la Publicación EP N° 504.202 B de Jennings y col. de forma similar, la Patente de los Estados Unidos N° 4.727.136 de Jennings y col, describe una molécula de MenB PS N propionilada denominada "NPr-MenB PS" en el presente documento. Se ha notificado que ratones inmunizados con glicoconjugados de NPr-MenB PS estimulaban mayores títulos de anticuerpos de IgG. Jennings y col. (1986) J. Immunol. 137: 1708. En conejos, usando el derivado se produjeron dos poblaciones distintas de anticuerpos, supuestamente asociadas con dos diferentes epítomos, uno compartido por MenB PS natural y uno no compartido. Se encontró que la actividad bactericida en la población de anticuerpos no reaccionaba en cruzado con MenB PS. Jennings y col. (1987) J. Exp. Med. 165: 1207. La identidad del (de los) epítomo(s) de la superficie bacteriana que reaccionaban con los anticuerpos protectores estimulados por este conjugado sigue siendo desconocida. También, debido a que un subconjunto de anticuerpos estimulados por esta vacuna tiene autorreactividad con el ácido polisialílico hospedador (Granoff y col. (1998) J. Immunol. 160: 5028), la seguridad de esta vacuna en seres humanos sigue siendo indeterminada. De esta manera, es fácilmente evidente que la producción de una vacuna segura y eficaz frente a MenB sería particularmente deseable.

Los antígenos cancerosos (tumoraes) forman otra amplia clase de antígenos para los cuales sería deseable tener vacunas seguras y eficaces. (Véanse, por ejemplo, Moingeon (2000) Vaccine 19: 1305-1326; Rosenberg (2001) Nature 411: 380-384). Se han identificado diversos antígenos específicos de tumor y se han intentado desarrollar vacunas basadas en células completas o en lisados tumorales sin caracterizar. Moingeon, *más arriba*. Sin embargo, no se han demostrado actualmente vacunas para diversos cánceres.

Se han descrito algunos procedimientos de inmunización con refuerzo de la sensibilización en particular, se han descrito inmunizaciones genéticas que implican polinucleótidos (Véanse, *por ejemplo*, los documentos WO 01/81609; WO 00/11140; Cooney y col. (1993) Proc Nat'l Acad Sci USA 90(5): 1882-1886, que describen la inducción de una respuesta inmune mediante sensibilización intramuscular con un virus vaccinia recombinante (vac/env) que expresa la envuelta de VIH-1 y sensibilización intramuscular con una glicoproteína gp160 derivada de un baculovirus recombinante (rgp160); Bruhl y col. (1998) AIDS Res Hum Retroviruses 14: 401-407, que describen la sensibilización de las mucosas con vaccinia recombinante seguido por sensibilización parenteral, y Eo y col. (2001) J. Immunol. 166: 5473-5479, que describen la sensibilización de las mucosas y el refuerzo de las mucosas con virus vaccinia recombinante que expresa la proteína gB del VHS). Lee y col. (1999) Vaccine 17: 3072-3082, describen los regímenes de sensibilización de las mucosas y de refuerzo parenteral que usan la vacuna de la ureasa de *Helicobacter pylori* recombinante; Bergquist y col. (1998) APMIS 106: 800 - 806, describen inmunizaciones intranasales y subcutáneas separadas de ratones usando conjugados de polisacáridos capsulares de *Haemophilus influenzae* de tipo b.

Sin embargo, a pesar de estos y de otros estudios, sigue habiendo una necesidad de composiciones y procedimientos para aumentar la inmunidad de las mucosas y sistémica a diversos antígenos, incluyendo a patógenos o cánceres para los cuales existen actualmente pocas o no existen vacunas y/o tratamientos eficaces.

### **Resumen de la invención**

La presente invención proporciona procedimientos para generar una respuesta inmune en un mamífero mediante sensibilización parenteral seguida por refuerzo de las mucosas.

En un aspecto, se describe un procedimiento para generar una respuesta inmune en un sujeto. El procedimiento comprende (a) administrar por vía parenteral una primera composición inmunógena que comprende uno o más antígenos de sacáridos capsulares y, (b) administrar por vía de la mucosa una segunda composición inmunógena que comprende uno o más antígenos de sacáridos capsulares, induciendo por tanto una respuesta inmune en el sujeto.

La administración por la mucosa puede ser, por ejemplo, intrarectal, intravaginal o intranasal. Además, en alguno de los procedimientos descritos en el presente documento, la administración parenteral puede ser, por ejemplo, transcutánea. La primera y/o la segunda composiciones inmunógenas pueden comprender además uno o más agentes adicionales tales como adyuvantes y/o vehículos para la liberación, por ejemplo, micropartículas tales como PLG.

El antígeno se deriva de *Haemophilus influenzae*.

En cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la respuesta inmune puede ser humoral y/o celular y, además, puede ser una respuesta inmune sistémica (*por ejemplo*, producción de IgG), una respuesta inmune de la mucosa (*por ejemplo*, producción de IgA) o una combinación de respuestas sistémicas y de la mucosa.

En determinadas realizaciones, la primera y la segunda composiciones inmunógenas son las mismas. En otras realizaciones, la primera y la segunda composiciones inmunógenas son diferentes, teniendo, por ejemplo, diferentes antígenos procedentes del mismo patógeno, diferentes formas de los antígenos y/o diferentes adyuvantes.

5 Además, en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los procedimientos descritos en el presente documento comprenden además la repetición de la etapa (a) y/o la etapa (b) una o más veces. En determinados aspectos, la etapa (b) se lleva a cabo dos o más veces. El intervalo de tiempo entre las administraciones por la mucosa de la etapa (b) puede ser de horas, días, meses o años. Además, en determinadas realizaciones, se llevan a cabo etapas repetidas usando las mismas o, alternativamente, diferentes, composiciones inmunógenas.

10 De esta manera, es un objeto de la invención proporcionar procedimientos alternativos y mejorados para el refuerzo de las mucosas tras la sensibilización parenteral de una respuesta inmune. La invención proporciona un procedimiento para aumentar una respuesta inmune en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la administración parenteral de una primera composición inmunógena seguida por la administración por la mucosa de una segunda composición inmunógena. La administración por la mucosa comprende además el uso de un adyuvante de la mucosa, por ejemplo, oligos que contienen CpG, polímeros bioadhesivos, o enterotoxina térmicamente lábil de *E. coli* ("TL") o sus mutantes detoxificados o la toxina del cólera ("TC") o su mutante detoxificado o las micropartículas que se forman a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos. La administración parenteral comprende además preferiblemente el uso de un adyuvante parenteral, por ejemplo alum, y similar. En determinadas realizaciones, se usan micropartículas para la administración de la(s) composición(es) inmunógena(s).

20 La primera composición inmunógena se administra por vía parenteral. Las rutas adecuadas para la administración parenteral incluyen las rutas intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, transcutánea, o transdérmica así como la administración al espacio intersticial de un tejido. En una realización, la sensibilización parenteral es mediante la ruta intramuscular. La primera composición inmunógena se adapta preferiblemente para la administración parenteral en la forma que será normalmente estéril y exenta de pirógenos. (Véase, por ejemplo, el documento WO 99/43350). En determinadas realizaciones, la primera composición inmunógena comprende un adyuvante parenteral o inmunológico. Además, la primera composición inmunógena se puede adsorber sobre micropartículas que son biodegradables y no tóxicas. La segunda composición inmunógena se administra por vía de la mucosa. Las rutas adecuadas de administración por la mucosa incluyen las rutas oral, intranasal, intragástrica, pulmonar, intestinal, rectal, ocular y vaginal. Se prefiere la administración intranasal u oral.

30 En determinados aspectos, la segunda composición inmunógena es adaptable preferiblemente para la administración por la mucosa. Cuando la composición es para la administración oral, puede estar en la forma de comprimidos o cápsulas, opcionalmente con revestimiento entérico, líquidas, plantas transgénicas. Cuando la composición es para la administración intranasal, puede estar en la forma de un pulverizador nasal, gotas nasales, gel o polvo. En determinadas realizaciones, la segunda composición inmunógena comprende además un adyuvante de la mucosa. Adyuvantes adecuados incluyen: oligo que contiene CpG, polímeros bioadhesivos, véanse los documentos WO 99/62546 y WO 00/50078; enterotoxina térmicamente lábil de *E. coli* ("TL") o sus mutantes detoxificados o la toxina del cólera ("TC") o su mutante detoxificado o micropartículas que se forman a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos. Los mutantes TL preferidos incluyen K63 o R72. Véanse por ejemplo los documentos WO 1993/013202; WO 1997/002348 y WO 1997/029771.

40 En otros aspectos, la primera y/o la segunda composiciones inmunógenas están adsorbidas en micropartículas. En determinadas realizaciones, las micropartículas usadas en la primera o la segunda composiciones inmunógenas tienen de 100 nm a 150 nm de diámetro, de forma más preferible de 200 nm a 30  $\mu$ m de diámetro y lo más preferible de 500 nm a 10  $\mu$ m de diámetro y se preparan a partir de, por ejemplo, poli(alfa-hidroxiácido), un ácido polihidroxi-butírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 00/06123 y WO 98/33487.

45 Estos y otros aspectos de la presente invención serán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada y a los dibujos que la acompañan. Además, se muestran a continuación diversas referencias que describen con más detalle determinados procedimientos o composiciones (por ejemplo, plásmidos, etc).

### **Breve descripción de los dibujos**

50 La Figura 1 es una gráfica que representa la potenciación de las respuestas del anticuerpo en suero y en la vagina contra los péptidos de la envuelta de VIH tras la sensibilización sistémica y las inmunizaciones de refuerzo de la mucosa. Las barras rayadas diagonales muestran el anticuerpo en suero mientras que las barras grises muestran los títulos procedentes de los lavados vaginales. Los diversos modos de administración y adyuvantes se indican por debajo de las barras, en el eje horizontal.

55 La Figura 2 es una gráfica que representa los títulos de IgG en suero específicos de la envuelta del VIH (tal como se midieron mediante ELISA) con un único refuerzo de recuerdo intramuscular (IM) o intranasal (IN) 18 meses después del refuerzo de la sensibilización original. Los diversos modos de administración y adyuvantes se indican por debajo de las barras en el eje horizontal.

**Descripción detallada de la invención**

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, comprendidos dentro de los conocimientos del experto en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); y Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir y 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); Short Protocols in Molecular Biology, 4ª ed. (Ausubel y col. eds., 1999, John Wiley & Sons); Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream y col., eds., 1998, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag); Peters y Dalrymple, Fields Virology (2ª ed), Fields y col. (eds.), B.N. Raven Press, Nueva York, NY.

Tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen las referencias plurales a no ser que el contenido dicte claramente otra cosa. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "un antígeno" incluye una mezcla de dos o más de dichos agentes.

Antes de establecer la invención, se muestran las definiciones de determinados términos que se usarán a partir de ahora en el presente documento.

Un "polinucleótido" es una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína o polipéptido biológicamente activo (por ejemplo, inmunógeno o terapéutico). Dependiendo de la naturaleza del polipéptido codificado por el nucleótido, un polinucleótido puede incluir tan poco como 10 nucleótidos, por ejemplo, cuando el polinucleótido codifica un antígeno. Además, un "polinucleótido" puede incluir secuencias bicatenarias y monocatenarias y se refiere, pero no se limita a, ADNc de virus, ARNm procariota o eucariota, secuencias de ARN y ADN genómico procedentes de virus (por ejemplo, ARN y ADN de virus y retrovirus) o ADN procariota, y especialmente secuencias de ADN sintético. El término comprende también secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN, e incluye modificaciones tales como deleciones, adiciones y sustituciones (en general conservativas en la naturaleza), en la secuencia natural, siempre que la molécula de ácido nucleico codifique una proteína terapéutica o antigénica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida al emplazamiento, o pueden ser accidentales, tales como mediante mutaciones de hospedadores que producen los antígenos. Las modificaciones de los polinucleótidos pueden tener cualquiera de numerosos efectos que incluyen, por ejemplo, facilitar la expresión del producto polipeptídico en la célula hospedadora.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero de restos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima del producto. De esta manera, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros, y similares, quedan incluidos en la definición. Las proteínas de longitud completa y sus fragmentos están abarcadas por la definición. Los términos incluyen también las modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para los fines de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (en general conservativas en la naturaleza), en la secuencia natural, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como mediante mutaciones de hospedadores que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación mediante la PCR. Además, se pueden realizar modificaciones que tengan uno o más de los siguientes efectos; reducir la toxicidad; facilitar el procesamiento celular (*por ejemplo*, secreción, presentación de antígenos, etc.); y facilitar la presentación de linfocitos B y/o linfocitos T.

Una "molécula de fusión" es una molécula en la que dos o más moléculas de la subunidad se unen, preferiblemente de forma covalente. Las moléculas de la subunidad pueden ser el mismo tipo químico de molécula, o pueden ser diferentes tipos químicos de moléculas. Ejemplos de moléculas de fusión incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de fusión (por ejemplo, una fusión entre dos o más antígenos) y ácidos nucleicos de fusión (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica los polipéptidos de fusión descritos en el presente documento). Véase, también, Sambrook y col., *más arriba* y Ausubel y col., *más arriba*, para los procedimientos de preparación de moléculas de fusión.

Un "antígeno" se refiere a una molécula que contiene uno o más epítomos (tanto lineales, como conformacionales, o ambos) que estimulan el sistema inmune de un hospedador a llevar a cabo una respuesta humoral y/o celular específica del antígeno. El término se usa de forma indistinta con el término "inmunógeno". Normalmente, un epítomo incluirá entre aproximadamente 3-15, de forma general aproximadamente 5-15 aminoácidos. Un epítomo de linfocitos B tiene nominalmente aproximadamente 5 aminoácidos, pero puede ser tan pequeño como 3-4 aminoácidos. Un epítomo de linfocitos T tal como un epítomo de LTC, incluirá al menos aproximadamente 7-9 aminoácidos, y un epítomo de linfocitos T auxiliares al menos aproximadamente 12-20 aminoácidos. Normalmente, un epítomo incluirá entre aproximadamente 7 y 15 aminoácidos, tal como 9, 10, 12 o 15 aminoácidos. El término "antígeno" antígenos de ambas subunidades, (es decir, antígenos que son separados y discretos procedentes de un organismo completo con el cual el antígeno se asocia en la naturaleza), así como, bacterias, virus, hongos, parásitos u otros microbios muertos, atenuados o inactivados, así como antígenos tumorales, que incluyen dominios extracelulares de receptores superficiales celulares y porciones intracelulares que pueden contener epítomos de linfocitos T. Anticuerpos tales como anticuerpos antiidiotípicos, o sus

fragmentos, y mimotopos de péptidos sintéticos, que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico, están comprendidos también en la definición de antígeno tal como se usa en el presente documento. De forma similar, un oligonucleótido o polinucleótido que expresa un antígeno o determinante antigénico *in vivo*, tal como en aplicaciones de terapia génica e inmunización de ADN, se incluye también en la definición de antígeno del presente documento.

5 Se pueden identificar los epítomos de una proteína dada usando cualquiera de las numerosas técnicas de cartografía de epítomos, bien conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Se pueden determinar, por ejemplo, epítomos lineales mediante por ejemplo, la síntesis simultánea de grandes cantidades de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a porciones de la molécula de proteína, y hacer reaccionar los péptidos con anticuerpos a la vez que los péptidos permanecen todavía unidos a los soportes. Se conocen dichas técnicas en la materia y se describen en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 4.708.871; Geysen y col. (1984) Proc. Nat'l Acad Sci. USA 81: 3998-4002; Geysen y col. (1986) Molec. Immunol 23: 709-715.

De forma similar, se identifican fácilmente epítomos conformacionales determinando la conformación espacial de los aminoácidos tal como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols*, más arriba.

Para los fines de la presente invención, se pueden derivar antígenos a partir de tumores y/o cualquiera de diversos virus, bacterias, parásitos y hongos conocidos, tal como se describe más completamente a continuación. El término también está previsto para cualquiera de los diversos antígenos tumorales o cualquier otro antígeno para el cual se desea una respuesta inmune. Además, 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 conservativas en la naturaleza), en la secuencia natural, siempre que la proteína mantenga la capacidad de estimular una respuesta inmunológica, tal como se define en el presente documento. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como mediante mutaciones de hospedadores que producen los antígenos.

Una "respuesta inmunológica" a un antígeno o composición es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmune humoral y/o celular a un antígeno presente en la composición de interés. Para los fines de la presente invención, una "respuesta inmune humoral" se refiere a una respuesta inmune mediada por moléculas de anticuerpos, que incluyen moléculas secretoras (IgA) o moléculas de IgG, mientras que "una respuesta inmune celular" es una mediada por linfocitos T y/o glóbulos blancos de la sangre. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta específica del antígeno por los linfocitos T citolíticos ("LTC"). Los LTC tienen especificidad por los antígenos peptídicos que están presentes en asociación con las proteínas codificadas por el complejo de histocompatibilidad mayor (CHM) y que están expresadas sobre la superficie de las células. Los LTC ayudan a inducir y promover la destrucción de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con dichos microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica del antígeno por linfocitos T auxiliares. Los linfocitos T auxiliares actúan para ayudar a estimular la función, y centran la actividad de las células efectoras no específicas contra las células que presentan antígenos peptídicos en asociación con moléculas del CHM sobre su superficie. Una "respuesta inmune celular" se refiere también a la producción de citocinas, quimiocinas y otras de dichas moléculas producidas por linfocitos T activados y/u otros glóbulos blancos de la sangre, que incluyen los derivados de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+. Además, diversos glóbulos blancos o células endoteliales pueden inducir una respuesta de quimiocinas en respuesta a un antígeno administrado.

Una composición o vacuna que estimula una respuesta inmune celular puede servir para sensibilizar a un sujeto vertebrado mediante la presentación de un antígeno en asociación con moléculas del CHM en la superficie celular. La respuesta celular inmunomediada se dirige a, o cerca de, células que presentan antígeno en su superficie. Además, pueden generarse linfocitos T específicos de antígenos para permitir la futura protección de un hospedador inmunizado.

Se puede determinar mediante numerosos ensayos la capacidad de un antígeno particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células, tales como mediante ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de linfocitos LTC citotóxicos, o evaluando linfocitos T específicos del antígeno en un sujeto sensibilizado. Se conocen bien en la técnica dichos ensayos. Véanse, por ejemplo, Erickson y col., J. Immunol. (1993) 151: 4189-4199; Doe y col., Eur. J. Immunol. (1994) 24: 2369-2376. Los procedimientos recientes de medición de la respuesta inmune mediada por células incluye la medida de las citocinas intracelulares o de la secreción de citocinas por las poblaciones de linfocitos T (por ejemplo, mediante la técnica ELISPOT), o mediante la medida de los linfocitos T específicos de epítomos (por ejemplo, mediante la técnica de los tetrámeros) (revisada por McMichael, A.J., y O'Callaghan, C.A., J. Exp. Med. 187(9): 1367-1371, 1998; Mcheyzer-Williams, M.G., y col, Immunol. Rev. 150: 5-21, 1996; Lalvani, A., y col, J. Exp. Med. 186: 859-865, 1997).

De esta manera, una respuesta inmunológica tal como se usa en el presente documento puede ser una respuesta que estimule los LTC, y/o la producción o la activación de los linfocitos T auxiliares. Se puede estimular también la producción de quimiocinas y/o citocinas. El antígeno de interés puede estimular también una respuesta inmune mediada por anticuerpos. Por tanto, una respuesta inmunológica puede incluir uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos (por ejemplo, IgA o IgG) por linfocitos B; y/o la activación de los linfocitos supresores, citotóxicos, o linfocitos T auxiliares 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 infectividad, y/o mediar el complemento del anticuerpo, o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) para proporcionar protección a un hospedador inmunizado. Se pueden determinar dichas respuestas usando inmunoensayos normalizados y ensayos de neutralización, bien conocidos en la técnica.

5 Una “composición inmunógena” es una composición que comprende una molécula antigénica en la que la administración de la composición a un sujeto da como resultado el desarrollo en el sujeto de una respuesta inmune humoral y/o celular a la molécula antigénica de interés. La composición inmunógena se puede introducir directamente en un sujeto receptor, tal como mediante administración por inyección, inhalación, oral, intranasal o cualquier otra ruta de administración parenteral o por la mucosa (por ejemplo, por vía intrarectal o intravaginal).

10 Por “subunidad de la vacuna” se entiende una composición de vacuna que incluye uno o más antígenos seleccionados, pero no todo los antígenos, derivados de, u homólogos a, un antígeno procedente de un patógeno de interés tal como procedente de un virus, bacteria, parásito u hongo. Dichas composición está sustancialmente exenta de células patógenas o partículas patogénicas, o del lisado de dichas células o partículas. De esta manera, una “subunidad de la vacuna” se puede preparar procedente al menos de polipéptidos inmunógenos parcialmente purificados (preferiblemente sustancialmente purificados) a partir del patógeno, o de sus análogos. El procedimiento de obtener un antígeno incluido en la subunidad de la vacuna puede incluir de esta manera técnicas de purificación normalizadas, producción recombinante, o producción sintética.

20 Por “parenteral” se entiende introducción en el cuerpo fuera del tracto digestivo, tal como mediante administración subcutánea, intramuscular, transcutánea, intradérmica o intravenosa. Esto se contrastará con la administración a una superficie por la mucosa, tal como oral, intranasal, vaginal o rectal. De esta manera, se entiende que “por la mucosa” es la introducción en el cuerpo mediante cualquier superficie mucosal, tal como por vía intranasal, oral, vaginal, rectal o similar.

Por “administración simultánea” se entiende la introducción en un cuerpo o una célula diana de dos o más composiciones. El término incluye la administración en cualquier orden o de forma simultánea.

25 El término “micropartícula” tal como se usa en el presente documento, se refiere a una partícula de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$  de diámetro, más preferiblemente aproximadamente 200 nm a aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  de diámetro, y lo más preferible aproximadamente 500 nm a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. Preferiblemente, la micropartícula tendrá un diámetro que permita la administración parenteral sin ocluir las agujas y los capilares. El tamaño de la micropartícula se determina fácilmente mediante las técnicas bien conocidas en la materia, tal como la espectroscopía de correlación de fotones, difracción de luz y/o microscopio electrónico de barrido.

30 Las micropartículas para uso en el presente documento se formarán a partir de materiales que se puedan esterilizar, no tóxicos y biodegradables. Dichos materiales incluyen, sin limitación, poli( $\alpha$ -hidroxiácido), ácido polihidroxibutírico, policaprolactona, polioctoéster, polianhídrido. Preferiblemente, las micropartículas para uso con la presente invención se derivan de un poli( $\alpha$ -hidroxiácido), en particular, de un poli(láctido) (“PLA”) o un copolímero de D,L-láctido y glicólido o ácido glicólico, tal como un poli(D,L-láctido-co-glicólido) (“PLG” o “PLGA”), o un copolímero de D,L-láctido y caprolactona. Las micropartículas pueden derivarse 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 variedad de relaciones láctido:glicólido, la selección de las cuales será en gran parte, una materia de elección en parte sobre el antígeno administrado simultáneamente. Estos parámetros se describen más completamente a continuación.

40 Un “factor inmunomodulador” se refiere a una molécula, por ejemplo, una proteína que es capaz de modular (particularmente mejorar) una respuesta inmune. Los ejemplos no limitantes de factores inmunomoduladores incluyen linfocinas (conocidas también como citocinas), tales como IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1, IL-2, IL-3, etc.); y quimiocinas (por ejemplo, proteínas secretadas tales como el factor de inhibición de macrófagos). Determinadas citocinas, por ejemplo TRANCE, fit-3L, y una forma secretada de CD40L son capaces de potenciar la capacidad inmunoestimuladora de los APC.

45 Ejemplos no limitantes de citocinas que se pueden usar solas o en combinación en la práctica de la presente invención incluyen, interleucina-2 (IL-2), factor de citoblastos (SCT) interleucina 3 (IL-3), interleucina 6 (IL-6), interleucina 12 (IL-12), G-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), interleucina-1 alfa (IL-1 $\alpha$ ), interleucina-11 (IL-11), MIP-1 $\gamma$ , factor inhibidor de la leucemia (LIF), ligando c-kit, trombopoyetina (TPO), ligando CD40 (CD40L), citocina inducida por activación relacionada con el factor de necrosis tumoral (TRANCE) y ligando fit3 (fit3-L). Las citocinas están comercialmente disponibles de diversos vendedores tales como, por ejemplo, Genzyme (Framingham, MA), Amgen (Thousand Oaks, CA), R&D Systems and Immunex (Seattle, WA). Están también disponibles las secuencias de muchas de estas moléculas, por ejemplo, de la base de datos del GenBank. Se pretende, aunque no se establezca ya de forma explícita, que las moléculas que tienen una actividad biológica similar a la de las citocinas naturales o purificadas (por ejemplo, producidas de manera recombinante o sus mutantes) y el ácido nucleico que codifica estas moléculas que se utilicen comprendidos dentro del espíritu y el alcance de la invención. Se pueden incluir factores inmunomoduladores con una, alguna o todas las composiciones descritas en el presente documento o que se pueden emplear como formulaciones separadas.

Por “sujeto” se entiende cualquier miembro del subfilum cordata, incluyendo, sin limitación, seres humanos y otros

5 primates, incluyendo primates no humanos tales como chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja tales como ganado, ovejas, cerdos, cabras y caballos, animales domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores, tales como ratones, ratas y cobayas; aves, incluyendo aves domésticas, aves silvestres y de caza, tales como pollos, pavos y otras gallináceas, patos, gansos, y similares. El término no denota una edad particular. De esta manera, se pretenden que queden cubiertos los individuos adultos y las crías. Se pretende que el sistema descrito anteriormente sea para el uso de cualquiera de las especies de vertebrados descritas anteriormente, debido a que los sistemas inmunes de todos estos vertebrados funcionan de manera similar.

10 Por “sujeto vertebrado” se entiende cualquier miembro del subfilum cordata, incluyendo, sin limitación, mamíferos tales como ganado, ovejas, cerdos, cabras, caballos, y seres humanos; animales domésticos tales como perros y gatos; y aves, incluyendo aves domésticas, aves silvestres y de caza tales como gallos y gallinas, que incluyen pollos, pavos y otras gallináceas. El término no denota una edad particular. De esta manera, que pretenden que queden cubiertos los animales adultos y las crías.

15 Por “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable” se entiende un material que no es indeseable biológicamente o de otra forma, es decir, el material que se puede administrar a un individuo en una formulación o composición sin producir ningún efecto biológico indeseable o sin que interactúe de una manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

20 Los términos “cantidad eficaz” o “cantidad farmacéuticamente eficaz” de una macromolécula y/o una micropartícula, tal como se proporciona en el presente documento, se refieren a una cantidad suficiente, pero no tóxica de la macromolécula y/o la micropartícula para proporcionar la respuesta deseada, tal como una respuesta inmunológica, y el efecto terapéutico correspondiente, o en el caso de la administración de una proteína terapéutica, una cantidad suficiente para efectuar el tratamiento del sujeto, tal como se define a continuación. Como se apuntará a continuación, la cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad y estado general del sujeto, la gravedad de la dolencia que se está tratando, y la macromolécula particular de interés, el modo de administración, y similar. Una persona normalmente experta en la técnica puede determinar una cantidad “eficaz” adecuada en cualquier caso individual usando la experimentación rutinaria.

25 Por “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable” se entiende un material que no es indeseable biológicamente o de otra forma, es decir, el material se puede administrar a un individuo junto con la formulación de micropartículas sin producir ningún efecto biológico indeseable o sin que interactúe de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

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

35 Tal como se usa en el presente documento, “tratamiento” se refiere a cualquiera de (i) la prevención de la infección o la reinfección, como en una vacuna tradicional, (ii) la reducción o la eliminación de síntomas, y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o trastorno en cuestión. Se puede efectuar el tratamiento profiláctica (antes de la infección) o terapéuticamente (después de la infección).

## A. ANTÍGENOS

Los procedimientos de sensibilización parenteral-refuerzo de las mucosas descritos en el presente documento pueden implicar la administración parenteral y por la mucosa de uno o más antígenos. Los antígenos se derivan de Haemophilus influenzae de tipo B.

40 Se pueden usar antígenos solos o en cualquier combinación (Véase, por ejemplo, el documento WO 02/00249 que describe el uso de combinaciones de antígenos bacterianos). Las combinaciones pueden incluir múltiples antígenos procedentes del mismo patógeno. Se prefiere en general que las combinaciones de antígenos que se van a usar aumenten la respuesta inmune que se va a usar en las combinaciones. La inmunización frente a múltiples patógenos o antígenos es ventajosa, para la administración parenteral (en la que el número de administraciones es reducido) pero es menos importante en vacunas de la mucosa (por ejemplo, vacunas intranasales) y para la administración por la mucosa debido a que se mejora la adhesión al tratamiento del paciente y se facilita el transporte/almacenamiento de las medicinas. Además, la(s) inmunización(es) tal como se describe en el presente documento se pueden usar tanto profiláctica como terapéuticamente.

### 1. Antígenos derivados de bacterias

50 La invención descrita en el presente documento usa sacáridos capsulares procedentes de Haemophilus influenzae de tipo B (HIB) (véase, por ejemplo, Costantino y col. (1999) Vaccine 17: 1251-1263).

55 Se usaron uno o más antígenos derivados de un sacárido capsular de H. influenzae. Se describen antígenos del oligosacárido MenC conjugados a proteínas vehículo, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N° 6.251.401; Publicaciones Internacionales WO 00/71725 y WO 01/37863. Se conocen antígenos de sacáridos de estos y otros patógenos, como es la preparación de conjugados de polisacáridos en general. El resto sacárido del conjugado puede

5 ser un polisacárido (*por ejemplo*, polirribosilribitol fosfato de longitud completa (PRP)) o polisacáridos hidrolizados (*por ejemplo*, mediante hidrólisis ácida) con el fin de formar oligosacáridos (*por ejemplo*, PM desde ~ 1 a ~ 5 kDa). Si se lleva a cabo la hidrólisis, se puede acortar el tamaño del hidrolizado con el fin de eliminar oligosacáridos que son demasiado cortos para ser inmunogénicamente útiles. Los oligosacáridos dimensionalmente separados son antígenos de sacáridos preferidos. Se describe la conjugación de sacáridos con vehículos tales como CRM, por ejemplo, en Costantino y col. (1992) Vaccine 10: 691-698.

#### 4. Preparación del polipéptido

Los antígenos en las composiciones inmunógenas pueden incluir proteínas.

10 De esta manera, se pueden construir antígenos polipeptídicos mediante síntesis de proteínas en fase sólida. Si se desea, los polipéptidos pueden contener también otras secuencias de aminoácidos tales como enlazadores de aminoácidos o secuencias señal, así como ligandos útiles en la purificación de proteínas, tales como glutatión S transferasa y proteína A estafilocócica. De forma alternativa, los antígenos de interés se pueden adquirir de fuentes comerciales.

15 Se pueden producir también polipéptidos a partir de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido deseado. Se pueden generar secuencias que codifican el polipéptido de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mullis y col. (1987) Methods Enzymol. 155: 335-350; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innis y col (eds) Harcourt Brace Jovanovich Publishers, NY (1994)). Esta técnica usa ADN polimerasa, normalmente una ADN polimerasa termoestable, para replicar una región deseada de ADN. La región especificada del ADN que se va a replicar se identifica por oligonucleótidos de la secuencia especificada complementarios de los extremos opuestos y de las hebras opuestas del ADN deseado para cebar la reacción de replicación. Ciclos sucesivos repetidos de replicación dan como resultado la amplificación del fragmento de ADN delimitado por la pareja de cebadores usados. Numerosos parámetros influyen en el éxito de una reacción. Entre ellos están la temperatura y el tiempo de hibridación, el tiempo de extensión, la concentración de  $Mg^{2+}$  y ATP, el pH, y la concentración relativa de cebadores, moldes, y desoxirribonucleótidos.

25 Una vez que se han preparado o aislado las secuencias de codificación de las proteínas deseadas, se pueden clonar dichas secuencias en cualquier vector o replicón adecuado. Los expertos en la técnica conocen numerosos vectores de clonación, y la selección de un vector de clonación adecuado es una materia de elección. Las ligaduras con otras secuencias se llevaron a cabo usando procedimientos normalizados, conocidos en la técnica.

30 De forma similar, las secuencias de codificación seleccionadas se pueden clonar en un vector de expresión adecuado para la expresión. Se puede purificar opcionalmente el producto expresado antes de la administración a las mucosas. De manera breve, se puede introducir un polinucleótido que codifica estas proteínas en un vector de expresión que se puede expresar en un sistema de expresión adecuado. Están disponibles en la técnica una variedad de sistemas de expresión en bacterias, levaduras, mamíferos, insectos y vegetales y se puede usar cualquiera de dichos sistemas de expresión. De forma opcional, se puede traducir un polinucleótido que codifique estas proteínas en un sistema de traducción exento de células. Se conocen bien en la técnica dichos procedimientos.

#### 35 B. ADMINISTRACIÓN

Las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar usando cualquier medio adecuado (por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transcutánea para sensibilización parenteral y por vía oral, rectal, intraocular, o intranasal para refuerzo mucosal). La administración transcutánea puede incluir el uso de un potenciador de la penetración, un agente de perturbación de barrera o sus combinaciones. Véase, por ejemplo, el documento WO 99/43350. Además, la administración puede ser tanto mediante administración directa (*es decir, in vivo*) como a las células que se han retirado (*ex vivo*), y posteriormente devuelto.

45 La invención implica un procedimiento para incrementar una respuesta inmune en un mamífero administrando por vía parenteral al menos una primera composición inmunógena y administrando posteriormente al menos una segunda composición inmunógena por vía de la mucosa. En otras palabras, la invención incluye una sensibilización parenteral seguida por un refuerzo mucosal.

50 Son bien conocidos los procedimientos de administración parenteral e incluyen, por ejemplo, (inyección directa en el torrente sanguíneo (por ejemplo, administración intravenosa); (2) inyección directa en un tejido o tumor específico, (3) administración subcutánea, (4) administración epidérmica transcutánea; (5) administración intradérmica, (6) administración intraperitoneal; y/o (7) administración intramuscular. Otros modos de administración incluyen la administración pulmonar, supositorios, inyección sin aguja, aplicaciones transcutáneas y transdérmicas. El tratamiento de dosificación puede ser una pauta monodosis o una pauta de múltiples dosis.

55 De forma similar, son conocidos en la técnica los procedimientos de administración por la mucosa, por ejemplo, tal como se describe en *Remington's, más arriba* e incluye la administración nasal, rectal, oral y vaginal. La administración de las composiciones por vía rectal y vaginal se prefiere particularmente en el caso de patógenos transmitidos por vía sexual, ya que este modo de administración proporciona acceso a las células expuestas en primer lugar a los patógenos. De forma similar, se puede preferir la administración intranasal en enfermedades, de tipo rinovirus, que infectan a través de la

mucosa nasal. En algunos ejemplos, la administración intranasal puede inducir inmunidad en la mucosa vaginal y la inmunización oral puede inducir inmunidad en la mucosa rectal. Además, se pueden usar combinaciones de diversas rutas de administración por la mucosa y/o diversas rutas de administración sistémica con el fin de inducir inmunidad y protección óptimas (ambas, en el sitio por el que penetra el patógeno, así como en sitios sistémicos en los que se ha

5 diseminado un patógeno de la mucosa. De forma adicional, la administración por la mucosa elimina la necesidad de jeringuillas u otros dispositivos de administración. El tratamiento de dosificación puede ser una pauta monodosis o una pauta de múltiples dosis.

Las composiciones dadas a conocer en el presente documento se pueden administrar solas o se pueden administrar con una o más macromoléculas adicionales (*por ejemplo*, vehículos de administración génica, factores inmunomoduladores, adyuvantes, y/o una o más proteínas). En dichas realizaciones, se pueden administrar las múltiples composiciones en cualquier orden, por ejemplo, vehículo de administración génica seguido por proteína; múltiples vehículos de administración génica seguidos por múltiples administraciones de proteínas, administración de proteína(s) seguida por administración individual o múltiple del vehículo de administración génica, administración simultánea; y similar. De esta manera, se puede administrar una mezcla de proteína y ácido nucleico, usando vehículos iguales o diferentes y de

10 administración iguales o diferentes modos.

El intervalo entre la sensibilización y el refuerzo variará de acuerdo con factores tales como la edad del paciente y la naturaleza de la composición y estos factores se pueden evaluar por un médico. La administración de las primeras dosis de sensibilización y refuerzo se separa en general en al menos dos semanas, normalmente al menos 4 semanas. Los procedimientos de la invención pueden comprender más de una dosis de sensibilización parenteral y/o más de una dosis de refuerzo, por ejemplo, dos o más dosis de sensibilización seguidas por dos o más dosis de refuerzo de la mucosa. (véase, el siguiente Ejemplo 4, que describe un refuerzo del "recuerdo" 18 meses después del refuerzo de sensibilización inicial. El término de refuerzo del "recuerdo" se refiere a cualquier dosis de refuerzo proporcionada después del refuerzo inicial. El tiempo al cual el refuerzo del "recuerdo" se administra puede variar desde horas (*por ejemplo*, 1 a 72 horas o cualquier punto temporal entre las mismas) o días (*por ejemplo*, 1 a 90 días o cualquier punto temporal entre los mismos) a meses (*por ejemplo*, 1 a 36 meses o cualquier punto temporal entre los mismos) o incluso años después del refuerzo inicial. Se puede administrar uno o más refuerzos del recuerdo al mismo tiempo o a intervalos variables con respecto entre sí. Se pueden usar idénticas o diferentes composiciones inmunógenas para cada dosis de sensibilización. Pueden por tanto distinguirse las dosis de sensibilización y refuerzo mediante la ruta de administración, en lugar de su temporalización.

20

25

El mamífero al cual las composiciones se administran es normalmente un primate es normalmente un primate, tal como un ser humano, el ser humano puede ser un niño o un adulto, Los mamíferos inferiores adecuados pueden incluir ratones.

30

En determinadas realizaciones, la administración directa se llevará a cabo en general con o sin vectores víricos, tal como se ha descrito anteriormente, mediante inyección usando tanto una jeringuilla convencional como una pistola génica, tal como un sistema de administración génica Accell® (PowderJect Technologies, Inc., Oxford, Inglaterra).

35

### 1. Micropartículas

En determinadas realizaciones, uno o más de los antígenos seleccionados se atrapan en, o se adsorben en, una micropartícula para posterior administración. Polímeros biodegradables para la fabricación de micropartículas útiles en la presente invención está comercialmente disponibles de forma fácil procedentes por ejemplo de Boehringer Ingelheim, Alemania y Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL. por ejemplo, los polímeros útiles para formar las micropartículas en el presente documento incluyen los derivados de ácido polihidroxibutírico; policaprolactona; poliortoéster; polianhídrido; así como un poli( $\alpha$ -hidroxiácido), tal como poli(L-láctido), poli(D,L-láctido) (conocidos ambos como "PLA" en el presente documento), poli(hidroxibutirato), copolímeros de D,L-láctido y glicólido, tales como los poli(D,L-láctido-co-glicólido) (designado como "PLG" o "PLGA" en el presente documento) o un copolímero de D,L-láctido y caprolactona. Los polímeros particularmente preferidos para uso en el presente documento son los polímeros PLA y PLG. Estos polímeros están disponibles en una variedad de pesos moleculares, y el peso molecular adecuado para un antígeno dado lo determina fácilmente un experto en la técnica. De esta manera, por ejemplo, para el PLA, un peso molecular adecuado estará en el orden de aproximadamente 2000 a 250.000. Para el PLG, los pesos moleculares adecuados estarán en general entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 200.000, preferiblemente aproximadamente 15.000 a aproximadamente 150.000, y lo más preferible, aproximadamente 50.000 a aproximadamente 100.000.

40

45

50

Si se usa un copolímero tal como PLG para formar las micropartículas, una variedad de relaciones de láctido:glicólido encontrará uso en el presente documento y la relación es en gran parte una materia de elección, que depende en parte del antígeno administrado simultáneamente y de la velocidad de degradación deseada. Por ejemplo, un polímero PLG 50:50, que contiene 50 % de D,L-láctido y 50 % de glicólido proporcionará una rápida resorción del copolímero mientras que PLG 75:25 se degrada más lentamente, y 85:15 y 90:10, incluso más lentamente, debido al aumento del componente láctido. Es fácilmente evidente que un experto en la técnica puede determinar una relación adecuada de láctido:glicólido basándose en la naturaleza del antígeno y en el trastorno en cuestión. Además, las mezclas de micropartículas con relaciones variables de láctido:glicólido encontrarán uso en las formulaciones con el fin de conseguir la cinética de liberación deseada de un antígeno dado y para proporcionar una respuesta inmune primaria y secundaria.

55

Se puede controlar la velocidad de degradación de las micropartículas de la presente invención mediante dichos factores tales como el peso molecular del polímero y la cristalinidad del polímero. Copolímeros de PLG con relaciones de láctido:glucólido y pesos moleculares variables están disponibles comercialmente de numerosas fuentes que incluyen las procedentes de Boehringer Ingelheim, Alemania y Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL. Estos polímeros se pueden sintetizar también mediante policondensación simple del componente de ácido láctico usando técnicas bien conocidas en la materia, tales como las descritas en Tabata y col., J. Biomed. Mater. Res. (1988) 22: 837-858.

El antígeno/micropartículas se preparan usando cualquiera de los diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, técnicas de doble emulsión / evaporación de disolvente, tales como las descritas en la Patente de los Estados Unidos N° 3.523.907 y Ogawa y col., Chem. Pharm. Bull. (1988) 36: 1095-1103, se puede usar en el presente documento para formar las micropartículas. Estas técnicas implican la formación de una emulsión primaria que consiste en gotículas de disolución de polímero que contienen el antígeno (si se va a atrapar el antígeno en la micropartícula), que se mezclaron posteriormente con una fase acuosa continua que contenía un estabilizante / tensioactivo de partículas.

Más particularmente, se puede usar un sistema de evaporación del disolvente de agua en aceite en agua (a/ac/a) para formar las micropartículas, tal como se describe por O'Hagan y col., Vaccine (1993) 11: 965-969; Jeffery y col., Pharm. Res. (1993) 10: 362 y el documento PCT/US99/17308 (documento WO 00/06133). En esta técnica, el polímero particular se combina con un disolvente orgánico, tal como acetato de etilo, cloruro de dimetilo (denominado también cloruro de metileno y diclorometano), acetonitrilo, acetona, cloroformo, y similar. Se proporcionará el polímero en aproximadamente un 2-15 %, de forma más preferible aproximadamente un 4-10 %, y lo más preferible, una disolución al 6 %, en un disolvente orgánico. Se añade una cantidad aproximadamente igual de una disolución de antígeno, por ejemplo, en agua, y la disolución de polímero/antígeno se emulsiona usando, por ejemplo, un homogeneizador. A continuación, la emulsión se combina con un volumen más grande de una disolución acuosa de un estabilizante de la emulsión tal como alcohol polivinílico (PVA) o polivinil pirrolidona. El estabilizante de la emulsión se proporciona normalmente en aproximadamente una disolución al 2-15 %, de forma más normal en aproximadamente una disolución al 4-10 %. A continuación la mezcla se homogeneiza para producir una doble emulsión a/ac/a estable. A continuación se evaporan los disolventes orgánicos.

Se pueden manipular los parámetros de la formulación para permitir la preparación de micropartículas pequeñas (< 5 µm) y grandes (> 30 µm). Véanse, por ejemplo, Jeffery y col., Pharm. Res. (1993) 10: 362-368; McGee y col., J. Microencap. (1996). Por ejemplo, la agitación reducida da como resultado micropartículas más grandes, análogamente a un aumento en el volumen de la fase interna. Se produjeron partículas pequeñas en volúmenes pequeños de la fase acuosa con elevadas concentraciones de PVA.

Se pueden formar también micropartículas usando secado mediante pulverización y coacervación tal como se describe en, por ejemplo, Thomasin y col., J. Controlled Release (1996) 41:131; Patente de los Estados Unidos N° 2.800.457; Masters, K. (1976) Spray Drying 2ª Ed. Wiley, Nueva York; técnicas de revestimiento por suspensión en aire, tales como revestimiento en cesta y revestimiento Wurster, según se describe por Hall y col., (1980) The "Wurster Process" en Controlled Release Technologies: Methods, Theory, and Applications (A.F. Kydonieus, ed.), Vol. 2, pp. 133-154 CRC Press, Boca Raton, Florida y Deasy, P.B., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. (1988) S(2): 99-139; y gelación iónica tal como se describe por, por ejemplo., Lim y col., Science (1980) 210: 908-910.

Las técnicas anteriores son también aplicables a la producción de micropartículas con antígenos adsorbidos. En esta realización, las micropartículas se forman tal como se ha descrito anteriormente, sin embargo, los antígenos se mezclan con las micropartículas tras la formación.

Se puede determinar el tamaño de partícula 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 (por ejemplo, 5-10 veces) para dar como resultado un valor promedio del diámetro de partículas. El tamaño de partículas se determina fácilmente usando el microscopio electrónico de barrido (SEM).

Antes de usar las micropartículas, se determina en general el contenido en antígeno de forma que se pueda administrar la cantidad de micropartículas adecuada para despertar en un sujeto una respuesta inmune adecuada.

El contenido en antígeno de las micropartículas se determina de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica, tales como perturbando las micropartículas y extrayendo el antígeno atrapado. Por ejemplo, las micropartículas se pueden disolver en cloruro de dimetilo y extraerse la proteína en agua destilada, tal como se describe en, por ejemplo, Cohen y col., Pharm. Res. (1991) 8: 713; Eldridge y col., Infect. Immun. (1991) 59:2978; y Eldridge y col., J. Controlled Release (1990)11: 205. De forma alternativa, se pueden dispersar micropartículas en NaOH 0,1 M que contiene SDS al 5 % (p/v). Se agitó la muestra, se centrifugó, y se evaluó el sobrenadante para el antígeno de interés usando un ensayo adecuado. Véase, por ejemplo, O'Hagan y col., Int. J. Pharm. (1994) 103: 37-45.

Un procedimiento para adsorber macromoléculas sobre micropartículas preparadas es como sigue. Se rehidratan y dispersan las micropartículas en una suspensión de micropartículas esencialmente monomérica usando detergentes aniónicos o catiónicos dializables. Los detergentes útiles incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de las diversas N-

metilglucamidas (conocidas como MEGA), tales como heptanoil-N-metilglucamida (MEGA-7), octanoil-N-metilglucamida (MEGA-8), nonanoil-N-metilglucamida (MEGA-9), y decanoil-N-metilglucamida (MEGA-10); ácido cólico; colato de sodio; ácido desoxicólico; desoxicolato de sodio; ácido taurocólico; taurocolato de sodio; ácido taurodesoxicólico; taurodeoxicolato de sodio; 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS); 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato (CHAPSO); N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano-sulfonato (ZWITTERGENT 3-12); N,N-bis-(3-D-gluconoamidopropil)-desoxicolamida (DEOXY-BIGCHAP); N-octilglucósido; monolaurato de sacarosa; ácido glicocólico / glicocolato de sodio; laurosarcosina (sal de sodio); ácido glicodesoxicólico/glicodesoxicolato de sodio; dodecil sulfato de sodio (SDS); y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB); bromuro de dodeciltrimetilamonio; bromuro de hexadeciltrimetilamonio; bromuro de tetradeciltrimetilamonio; bromuro de bencil dimetildodecilamonio; cloruro de bencil dimetil-hexadecilamonio; bromuro de bencil dimetiltetradecilamonio. Los anteriores detergentes están comercialmente disponibles de, por ejemplo, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. Se pueden usar también diversos lípidos catiónicos conocidos en la técnica como detergentes. Véanse Balasubramaniam y col., 1996, *Gene Ther.*, 3: 163-72 y Gao, X., y L. Huang. 1995, *Gene Ther.*, 2: 7110-722.

La mezcla de micropartículas/detergente se muele físicamente a continuación, por ejemplo, usando un mortero de cerámica y una mano de almirez, hasta que se forma una suspensión ligera. Se añade a continuación un tampón acuoso adecuado, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución salina tamponada con Tris, y la mezcla resultante se sonicó u homogeneizó hasta que las micropartículas se suspendieron completamente. A continuación se añadió la macromolécula de interés a la suspensión de micropartículas y se dializó el sistema para eliminar el detergente. Las micropartículas poliméricas y el sistema detergente se escogen de forma preferible de tal manera que la macromolécula de interés adsorberá la superficie de la micropartícula manteniendo a la vez la actividad de la macromolécula. Las micropartículas resultantes que contienen la superficie adsorbida de la macromolécula pueden lavarse exentas de macromoléculas sin unir y almacenarse como una suspensión en una formulación de tampón adecuada, o liofilizarse con los excipientes adecuados, tal como se describe adicionalmente a continuación

## 2. Vehículos particulados adicionales

Además de las micropartículas, las composiciones pueden también encapsularse, adsorberse a, o asociarse con, vehículos particulados. Dichos vehículos presentan múltiples copias de un antígeno seleccionado para el sistema inmune y promueven la migración, el atrapamiento y la retención de antígenos en los ganglios linfáticos locales. Las partículas pueden capturarse por células que tengan el oficio de presentar antígenos tales como macrófagos y células dendríticas, y/o puedan potenciar la presentación del antígeno a través de otros mecanismos tales como la estimulación de la liberación de citocinas.

En determinadas realizaciones, las composiciones se administran usando vehículos particulados derivados de polímeros de polimetacrilato de metilo. Véanse, por ejemplo, Jeffery y col., *Pharm. Res.* (1993) 10: 362-368; McGee JP, y col., *J Microencapsul.* 14 (2): 197-210, 1997; O'Hagan DT, y col., *Vaccine* 11(2): 149-54, 1993.

Además, se pueden usar otros sistemas y polímeros particulados para la administración *in vivo* o *ex vivo* del gen de interés. Por ejemplo, polímeros tales como polilisina, poliarginina, poliornitina, espermina, espermidina, así como conjugados de estas moléculas, son útiles para transferir un ácido nucleico de interés. De forma similar, la transfección mediada por DEAE dextrano, la precipitación con fosfato de calcio o la precipitación usando otras sales inorgánicas insolubles, tales como fosfato de estroncio, silicatos de aluminio que incluyen bentonita y caolín, óxido crómico, silicato de magnesio, talco, y similares, encontrarán uso con los presentes procedimientos. Véase, por ejemplo, Felgner, P.L., *Advanced Drug Delivery Reviews* (1990) 5: 163-187, para una revisión de los sistemas de administración útiles para la transferencia génica. Peptoides (Zuckerman, R.N., y col., Patente de los Estados Unidos. 5.831.005, otorgada el 3 de noviembre de 1998) se puede usar también para la administración de una construcción de la presente invención.

De forma adicional, los sistemas de administración biolísticos que emplean vehículos particulados tales como oro y tungsteno, son especialmente útiles para administrar casetes de expresión sintéticos de la presente invención. Las partículas se revisten con el(los) casete(s) de expresión sintético(s) que se va(n) a administrar y acelerarse a elevada velocidad, en general a una atmósfera reducida, usando una descarga de pólvora de una "pistola de genes". Para una descripción de dichas técnicas, y aparatos útiles, véanse, por tanto, las Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 4.945.050; 5.036.006; 5.100.792; 5.179.022; 5.371.015; y 5.478.744. También, se pueden usar sistemas de inyección sin aguja (Davis, H.L., y col, *Vaccine* 12: 1503-1509, 1994; Bioject, Inc., Portland, OR).

## 3. Vehículos de administración de liposomas/lípidos

Los antígenos de interés (o los polinucleótidos que codifican estos antígenos, se pueden administrar también usando liposomas. Por ejemplo, envasándose como ADN o ARN en liposomas antes de la administración al sujeto o a las células derivadas del mismo. La encapsulación de lípidos se lleva a cabo en general usando liposomas que son capaces de unirse o de atraparse de manera estable y de retener el ácido nucleico. La relación de ADN condensado a preparación de lípidos pero en general será de alrededor de 1:1 (mg de ADN: micromoles de lípidos) o más de lípidos. Para una revisión del uso de liposomas como vehículos para la administración de ácidos nucleicos, véanse Hug y Sleight, *Biochim. Biophys. Acta.* (1991) 1097: 1-17; Straubinger y col., en *Methods of Enzymology* (1983), Vol. 101, pp. 512-527.

Las preparaciones de liposomas para uso en la presente invención incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y neutras, prefiriéndose particularmente los liposomas catiónicos. Los liposomas catiónicos han demostrado mediar en la administración intracelular de ADN plásmido (Felgner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84: 7413-7416); ARNm (Malone y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86: 6077-6081); y factores de transcripción purificados (Debs y col., J. Biol. Chem. (1990) 265: 10189-10192), en forma funcional.

Los liposomas catiónicos están fácilmente disponibles. Por ejemplo, liposomas de N[1-2,3-dioleiloxi]propil]-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) están disponibles con la marca comercial Lipofectin, de GIBCO BRL, Grand Island, NY. (Véase, también, Felgner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84: 7413-7416). Otros lípidos comercialmente disponibles incluyen (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boehringer). Se pueden preparar otros liposomas catiónicos a partir de materiales fácilmente disponibles usando técnicas bien conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, Szoka y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75: 4194-4198; Publicación PCT N° WO 90/11092 para una descripción de la síntesis de liposomas de DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio) propano). Se pueden preparar micropartículas catiónicas a partir de materiales fácilmente disponibles usando técnicas conocidas en la materia. Véase, por ejemplo el documento WO 01/136599 de propiedad compartida.

De forma similar, los liposomas aniónicos y neutros están fácilmente disponibles, tales como, de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), o se pueden preparar fácilmente usando materiales fácilmente disponibles. Dichos materiales incluyen fosfatidil colina, colesterol, fosfatidil etanolamina, dioleoilfosfatidil colina (DOPC), dioleoilfosfatidil glicerol (DOPG), dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales se pueden mezclar también con los materiales de partida de DOTMA y DOTAP en relaciones adecuadas. Son bien conocidos en la técnica los procedimientos para preparar liposomas usando estos materiales.

Los liposomas pueden comprender vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequeñas (SUV) o vesículas unilamelares grandes (LUV). Los diversos complejos de liposomas-ácidos nucleicos se preparan usando procedimientos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Straubinger y col., en METHODS OF IMMUNOLOGY (1983), Vol. 101, pp. 512-527; Szoka y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75: 4194-4198; Papahadjopoulos y col., Biochim. Biophys. Acta (1975) 394: 483; Wilson y col., Cell (1979) 17: 77; Deamer y Bangham, Biochim. Biophys. Acta (1976) 443: 629; Ostro y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1977) 76: 836; Fraley y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76: 3348; Enoch y Strittmatter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76: 145; Fraley y col., J. Biol. Chem. (1980) 255: 10431; Szoka y Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75: 145; y Schaefer-Ridder y col., Science (1982) 215: 166.

El ADN y/o el(los) antígeno(s) de la(s) proteína(s) se pueden administrar en composiciones químicas cocleadas similares a las descritas por Papahadjopoulos y col., Biochem. Biophys. Acta. (1975) 394: 483-491. Véase, también, las Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup>. 4.663.161 y 4.871.488.

#### D. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

La presente divulgación incluye también composiciones farmacéuticas que comprenden antígenos de polipéptidos o polinucleótidos en combinación con un vehículo, diluyente, o receptor farmacéuticamente aceptable. Además, pueden estar presentes otros ingredientes, tales como adyuvantes. Tal como se describe más completamente en la Patente de los Estados Unidos N° 6.015.694, en los países del Tercer Mundo en los que la refrigeración y/o los medios de administración tradicionales (jeringuillas, etc) no están fácilmente disponibles, se necesitan un almacenamiento estable y composiciones inmunógenas fácilmente administrables.

En determinadas realizaciones, las composiciones incluyen uno o más polipéptidos. Los expertos en la técnica conocen la preparación de compuestos inmunógenos que contienen polipéptido(s) inmunógenos como ingredientes activos. Normalmente, dichos compuestos inmunógenos se preparan como inyectables, tanto como disoluciones o suspensiones líquidas; se pueden preparar también formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. Se puede emulsionar también la preparación o encapsularse la proteína en liposomas.

Las composiciones de la invención comprenden preferiblemente un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales en el hospedador. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los vehículos adecuados son normalmente macromoléculas grandes que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados de lípidos (tales como gotículas o liposomas de aceite) y partículas de virus inactivos. Los ejemplos de vehículos particulados incluyen los derivados de polímeros de polimetacrilato de metilo, así como micropartículas derivadas de poli(láctidos) y poli(láctido-co-glicólidos), conocidas como PLG. Véanse, por ejemplo, Jeffery y col., Pharm. Res. (1993) 10: 362-368; McGee y col. (1997) J Microencapsul. 14(2): 197-210; O'Hagan y col. (1993) Vaccine 11(2): 149-54. Dichos vehículos son bien conocidos por las personas normalmente expertas en la técnica. Adicionalmente, estos vehículos pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes ("adyuvantes"). Además, el antígeno puede conjugarse con un toxoide bacteriano, tal como el toxoide de la difteria, el tétanos, el cólera, etc, así como las toxinas derivadas de *E. coli*.

Se pueden usar también sales farmacéuticamente aceptables en las composiciones de la invención, por ejemplo, sales minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, o sulfatos, así como sales de ácidos orgánicos tales como

acetatos, propionatos, malonatos, o benzoatos. Los sustratos de proteína especialmente útiles son albúminas de suero, hemocianina de lapa americana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide del tétanos, y otras proteínas bien conocidas por los expertos en la técnica. Las composiciones de la invención pueden contener también líquidos o excipientes, tales como agua, solución salina, glicerol, dextrosa, etanol, o similares, de forma individual o en combinación, así como sustancias tales como agentes humectantes, agentes emulsificantes, o agentes tamponantes del pH. Se pueden usar también liposomas como un vehículo para una composición de la invención, dichos liposomas se han descrito anteriormente.

Además, las composiciones descritas en el presente documento pueden incluir diversos excipientes, adyuvantes, vehículos, sustancias auxiliares, agentes de modulación, y similares. Preferiblemente, las composiciones incluirán una cantidad del antígeno suficiente para estimular una respuesta inmunológica. Un experto en la técnica puede determinar una cantidad eficaz adecuada. Dicha cantidad estará comprendida en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar a través de ensayos rutinarios y será en general una cantidad en el orden de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 1000 µg, de forma más preferible aproximadamente 1 µg a aproximadamente 300 µg, de partícula/antígeno.

Dichos adyuvantes incluyen, pero no se limitan a. (1) sales de aluminio (alum), tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes de inmunostimulación específicos tales como péptidos de muramilo (véase a continuación) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo (a) MF59 (Publicación Internacional N° WO 90/14837), que contiene Escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 %, y Span 85 al 0,5 % (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE (véase a continuación), aunque no se requiere, formulados en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, polímero L121 bloqueado con Pluronic al 5 %, y thr-MDP (véase a continuación) microfluidizado bien en una emulsión submicrométrica bien sometido a vortización para generar una emulsión de tamaño de partículas más grande, y (c) un sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 %, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana procedentes del grupo que consiste en monofosforolípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente, MPL + CWS (Detox™), (3) se pueden usar adyuvantes de la saponina, tales como Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) o generarse partículas a partir de los mismos tales como ISCOM (complejos de inmunostimulación) (véase, por ejemplo, Publicación Internacional WO 00/00249); (4) Adyuvante de Freund Completo (AFC) y Adyuvante de Freund Incompleto (AFI); (5) citocinas, tales como interleucinas (IL-1, IL-2, etc), factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (FNT), beta quimiocinas (MIP, 1-alfa, 1-beta Rantes, etc.); (6) mutantes detoxificados de una toxina de ribosilación del ADP bacteriano, tal como la toxina del cólera (TC), una toxina pertussis (TP), o una toxina termolábil de *E. coli* (TL), particularmente LT-K63 (en la que la lisina se sustituye por el aminoácido natural en la posición 63) LT-R72 (en la que la arginina se sustituye por el aminoácido natural en la posición 72), CT-S109 (en la que la serina se sustituye por el aminoácido natural en la posición 109), y PT-K9/G129 (en la que la lisina se sustituye por el aminoácido natural en la posición 9 y la glicina sustituida en la posición 129) (véase, por ejemplo las Publicaciones Internacionales N°s WO93/13202; WO92/19265; WO 95/17211; WO 98/18928 y WO 01/22993); (7) oligo que contiene CpG, polímeros bioadhesivos, véanse los documentos WO 99/62546 y WO 00/50078; y (8) otras sustancias que actúan como agentes de inmunostimulación para potenciar la eficacia de la composición.

Los péptidos de muramilo incluyen, pero no se limitan a, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamo (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

Cuando se usa un antígeno de sacárido o carbohidrato, se puede conjugar con una proteína portadora. (Véanse, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 5.306.492; el documento EP 0 477 508; el documento WO 98/42721; Ramsay y col. (2001) Lancet 357: 195-196; "Conjugate Vaccines" eds. Cruse y col., ISBN 3805549326). Las proteínas portadoras preferidas incluyen toxinas o toxoides bacterianos, tales como los toxoides de la difteria (*por ejemplo*, CRM<sub>197</sub>) o el tétanos. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen la proteína del miembro externo de *N. meningitidis* (documento EP 0372501); péptidos sintéticos (documentos EP 0378881 y EP 0427347); proteínas del choque térmico (documento WO 93/17712), citocinas, linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, proteínas de pertussis (documentos WO 98/58668; EP 0471177); Proteína D de *H. influenzae* (documento WO 00/56360); toxina A o B de *C. difficile* (documento WO 00/61761) y similares. Es posible usar mezclas de proteínas portadoras. Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares de los serogrupos A y C, se prefiere que la relación (p/p) del sacárido MenA:sacárido MenC sea mayor que 1 (*por ejemplo*, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o superior). Se pueden conjugar sacáridos de diferentes serogrupos de diferentes patógenos (*por ejemplo*, diferentes serogrupos de *N. meningitidis*) con las mismas o diferentes proteínas portadoras.

Las composiciones farmacéuticas pueden también liofilizarse o bien almacenarse de forma estable.

La administración de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento puede realizarse mediante cualquier ruta adecuada (véase, *por ejemplo*, anteriormente). Se prefiere particularmente una sensibilización parenteral (o múltiples sensibilizaciones) tras un refuerzo de la mucosa (o múltiples refuerzos de la mucosa). Además, la administración puede tomar la forma de múltiples administraciones de sensibilización-refuerzo. De esta manera, el

tratamiento de dosificación puede ser una única pauta de dosis de sensibilización/refuerzo o múltiples pautas de dosis de sensibilización/refuerzo. Una pauta de múltiple dosis es aquella en la que el curso primario de la vacunación puede ser con 1-10 dosis separadas, seguidas por otras dosis proporcionadas en intervalos de tiempo posteriores, escogidas para mantener y/o reforzar la respuesta inmune, por ejemplo a los 1-4 meses para una segunda, y si es necesario, una(s) dosis posterior(es) después de algunos meses. El régimen de dosificación se determinará, al menos en parte, por la potencia de la modalidad, la administración de la vacuna empleada, la necesidad del sujeto y dependerá del criterio del médico a cargo del tratamiento.

Se emplearon de forma ventajosa múltiples administraciones (por ejemplo, administración del tipo sensibilización-refuerzo). Se administraron, por ejemplo, partículas de alfavirus recombinante que expresaban el(los) antígeno(s) de interés (por ejemplo, IVAG o IR). Posteriormente, se administró(traron) el(los) antígeno(s), por ejemplo, en composiciones que comprenden el(los) antígeno(s) del polipéptido y un adyuvante adecuado. De forma alternativa, se administraron los antígenos antes de los vehículos de administración génica. Se pueden emplear también administraciones de múltiples polipéptidos y múltiples vehículos de administración génica (en cualquier orden).

Las composiciones pueden comprender preferiblemente una "cantidad terapéuticamente eficaz" de la macromolécula de interés. Esto es, se incluirá una cantidad de macromolécula/micropartícula en las composiciones, que dará lugar a que el sujeto produzca una respuesta suficiente, con el fin de evitar, reducir, eliminar o diagnosticar los síntomas. La cantidad exacta necesaria variará, dependiendo del sujeto que se está tratando; la edad y el estado general del sujeto que se va a tratar; la gravedad de la dolencia que se está tratando; en el caso de una respuesta inmunológica, la capacidad del sistema inmune del sujeto para sintetizar anticuerpos; el grado de protección deseado y el antígeno concreto seleccionado y su modo de administración, entre otros factores. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad eficaz adecuada. De esta manera, una "cantidad terapéuticamente eficaz" estará comprendida dentro de un intervalo relativamente amplio que se puede determinar a través de ensayo rutinario. Por ejemplo, para los fines de la presente invención, cuando la macromolécula es un polinucleótido, una dosis eficaz estará normalmente en el intervalo de aproximadamente 1 ng a aproximadamente 1 mg, de forma más preferible de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 1 µg, y lo más preferible aproximadamente 50 ng a aproximadamente 500 ng de la molécula administrada por dosis; cuando la macromolécula es un antígeno, una dosis eficaz variará normalmente de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 mg, de forma más preferible de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 1 mg, y lo más preferible aproximadamente 50 µg a aproximadamente 500 µg de la macromolécula administrada por dosis.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, y no como forma de limitación.

**EJEMPLO 1**

**TÍTULOS DE IGG EN SUERO E IGA EN LAVADO VAGINAL TRAS LA SENSIBILIZACIÓN PARENTERAL – REFUERZO DE LA MUCOSA CON ANTÍGENOS DE VIH**

Se sensibilizaron los ratones 2 veces por vía intramuscular con proteína gp 120 adsorbida sobre micropartículas aniónicas de DSS de PLG. Se administraron 10 microgramos de gp120/PLG en los días 0 y 14. Los animales se sometieron a refuerzo por vía de la mucosa 3 veces en intervalos de 10 días. El refuerzo de la mucosa se llevó a cabo por vía intravaginal, intrarectal o intranasal, con adyuvantes de ACP, un polímero bioadhesivo (Fidia), LTR72 (Chiron S.p.A.) u oligos que contenían CpG, 1826 H.C. Davis y col., J. Immunology (1998) 160: 870-876.

Se investigó el efecto del refuerzo de la mucosa tras la sensibilización parenteral y los resultados se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1**

| Grp | Ruta | Sensibilización    | Ruta   | Refuerzo                             | Título de IgA en lavado vaginal | Título de IgG en suero |
|-----|------|--------------------|--------|--------------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| 1   | IMx2 | 10 µg de gp120/PLG | -      | Sin refuerzo                         | 22 ± 11                         | 15790 ± 7578           |
| 2   | IMx2 | 10 µg de gp120/PLG | IVagx3 | 100 µg de gp120/ACP + 10 µg de LTR72 | 1055 ± 979                      | 38091 ± 18525          |
| 3   | IMx2 | 10 µg de gp120/PLG | IRx3   | 100 µg de gp120/ACP + 10 µg de LTR72 | 7716 ± 8175                     | 420134 ± 269530        |

(continuación)

| Grp   | Ruta | Sensibilización    | Ruta | refuerzo   | Título de IgA en lavado vaginal | Título de IgG en suero |
|---|------|--------------------|------|--|---------------------------------|------------------------|
| 4   | IMx2 | 10 µg de gp120/PLG | INx3 | 30 µg de gp120 +<br>10 µg de LTR72 +<br>50 µg de CPG | 12421 ± 10156                   | 136137 ± 92334         |
| IMx2 – dos administraciones intramusculares<br>IVagx3 – tres administraciones intravaginales<br>IRx3 – tres administraciones intrarectales<br>INx3 – tres administraciones intranasales |      |                    |      |  |                                 |                        |

5 Tal como se muestra en la Tabla 1 y la Figura 1, los títulos de IgA de la mucosa tal como se determinaron mediante un lavado vaginal, y los títulos de IgG en suero, aumentaron en los animales que se sometieron a refuerzo por vía de la mucosa en comparación con aquellos que no se sometieron a refuerzo por vía de la mucosa.

#### EJEMPLO 2

#### TÍTULOS EN SUERO TRAS LA SENSIBILIZACIÓN PARENTERAL Y EL REFUERZO DE LA MUCOSA CON ANTÍGENOS DE VIH

10 El siguiente ejemplo muestra el aumento de los títulos de IgG en suero tras el refuerzo de la mucosa después de la sensibilización IM.

Se inmunizaron los ratones por vía intramuscular con 10 microgramos de gp120/PLG, tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se administraron tres refuerzos de la mucosa (por vía intranasal o intrarectal) con los adyuvantes de la mucosa LTR72, ACP o CpG (1826), tal como se ha descrito anteriormente.

**Tabla 2**

| Proy. N° 99-01414   |      |                    |        |                                       |  |   |
|---|------|--------------------|--------|---------------------------------------|--|---|
| Grp   | Ruta | Sensibilización    | Ruta   | Refuerzo                              | Título de IgG en suero tras la sensibilización | Título de IgG en suero tras el refuerzo |
|   |      |                    |        |                                       | Promedio (± SD; N=5)                           | Promedio (± SD; N=5)                    |
| 1   | IMx2 | 10 µg de gp120/PLG | -      | Sin refuerzo                          | 913 (976)                                      | 400 (303)                               |
| 2   | IMx2 | 10 µg de gp120/PLG | IVagx3 | 100 µg de gp120/PLG + LTR72           | 505 (393)                                      | 1385 (816)                              |
| 3   | IMx2 | 10 µg de gp120/PLG | IRx3   | 100 µg de gp120 + LTR72               | 620 (238)                                      | 3475 (2322)                             |
| 5   | IMx2 | 10 µg de gp120/PLG | IRx3   | 100 µg de gp120/ACP + LTR72           | 555 (429)                                      | 6364 (4831)                             |
| 5   | IMx2 | 10 µg de gp120/PLG | INx3   | 30 µg de gp120 + LTR72 + 50 µg de CPG | 587 (565)                                      | 2662 (2382)                             |
| IMx2 – dos administraciones intramusculares, IVagx3 – tres administraciones intravaginales, IRx3 – tres administraciones intrarectales, INx3 – tres administraciones intranasales |      |                    |        |                                       |  |   |

15

La Tabla 2 muestra que el título promedio de IgG en suero aumentó en aquellos animales que recibieron el refuerzo de la mucosa.

**EJEMPLO 3**

**TÍTULOS DE IGA EN LAVADO VAGINAL TRAS LA SENSIBILIZACIÓN PARENTERAL Y EL REFUERZO DE LA MUCOSA**

5 El siguiente ejemplo muestra el aumento del título de la IgA de la mucosa (en lavado vaginal) tras el refuerzo de la mucosa después de la sensibilización IM: Se inmunizaron los ratones tal como se ha descrito en los Ejemplos 1 y 2. En la Tabla 3 se muestran los resultados.

**Tabla 3**

| Grp | Ruta  | Sensibilización    | Ruta   | Refuerzo                                       | Animal nº | Títulos normalizados |
|-----|-------|--------------------|--------|--|-----------|----------------------|
| 1   | IMx2  | 10 µg de gp120/PLG | -      | Sin refuerzo                                   | 1         | 27                   |
|     |       |                    |        |  | 2         | 10                   |
|     |       |                    |        |  | 3         | < 10                 |
|     |       |                    |        |  | 4         | 40                   |
|     |       |                    |        |  | 5         | 27                   |
|     |       |                    |        |  | 6         | 21                   |
|     |       |                    |        |  | 7         | 39                   |
|     |       |                    |        |  | 8         | < 10                 |
|     |       |                    |        |  | 9         | 21                   |
|     |       |                    |        |  | 10        | 25                   |
| 9   | IMx2  | 10 µg de gp120/PLG | IVagx3 | 100 µg de gp120/ACP + 10 µg de LTR72           | 81        | 2.128                |
|     |       |                    |        |  | 82        | 1.465                |
|     |       |                    |        |  | 83        | 1.939                |
|     |       |                    |        |  | 84        | 260                  |
|     |       |                    |        |  | 85        | 34                   |
|     |       |                    |        |  | 86        | 16                   |
|     |       |                    |        |  | 87        | 1.662                |
|     |       |                    |        |  | 88        | 2.716                |
|     |       |                    |        |  | 89        | 52                   |
|     |       |                    |        |  | 90        | 279                  |
| 10  | IMx2  | 10 µg de gp120/PLG | IRx3   | 100 µg de gp120/ACP + 10 µg de LTR72           | 91        | 3.068                |
|     |       |                    |        |  | 92        | H                    |
|     |       |                    |        |  | 93        | 2.976                |
|     |       |                    |        |  | 94        | 1.909                |
|     |       |                    |        |  | 95        | 5.260                |
|     |       |                    |        |  | 96        | 23.528               |
|     |       |                    |        |  | 97        | 19.137               |
|     |       |                    |        |  | 98        | 888                  |
|     |       |                    |        |  | 99        | 16.853               |
|     |       |                    |        |  | 100       | 473                  |
| 11  | IMx22 | 10 µg de gp120/PLG | INx3   | 30 µg de gp120 + 10 µg de LTR72 + 50 µg de CPG | 101       | 4.133                |
|     |       |                    |        |  | 102       | 7.929                |
|     |       |                    |        |  | 103       | 1.691                |

| Grp | Ruta | Sensibilización | Ruta | Refuerzo | Animal nº | Títulos normalizados |
|-----|------|-----------------|------|----------|-----------|----------------------|
|     |      |                 |      |          | 105       | 27.872               |
|     |      |                 |      |          | 106       | 2.517                |
|     |      |                 |      |          | 107       | 25.121               |
|     |      |                 |      |          | 108       | 6.825                |
|     |      |                 |      |          | 109       | 5.183                |
|     |      |                 |      |          | 110       | 15.070               |

Los resultados que se muestran en la Tabla 3 demuestran que los títulos para la mucosa tal como se midieron mediante los títulos de IgA en lavado vaginal, aumentaron tras la administración del polipéptido parenteral y del refuerzo de la mucosa.

#### 5 EJEMPLO 4

##### TÍTULOS EN SUERO TRAS UN REFUERZO DE RECUERDO

10 El siguiente ejemplo muestra un aumento en los títulos de la IgG en suero tras un refuerzo de la mucosa del recuerdo (intranasal) después de la sensibilización parenteral (intramuscular). Se inmunizaron los ratones esencialmente tal como se ha descrito anteriormente excepto que el refuerzo del recuerdo se llevó a cabo 18 meses después de la primera sensibilización. En la Tabla 4 y en la Figura 2 se muestran los resultados.

**Tabla 4**

| Grp   | Sensibilización/adyuvante              | Refuerzo/adyuvante                                    | Refuerzo recuerdo/adyuvante                         | Títulos de IgG en suero |
|---|--|---|---|-------------------------|
| 1   | IMx2<br>10 µg de Ogp140 soluble / MF59 | Ninguno   | IM<br>10 µg de Ogp140 soluble / MF59                | 2037 ± 1897             |
| 2   | IMx2<br>10 µg de Ogp140 soluble / MF59 | INx3<br>Ogp140/PLG                                    | IN<br>30 µg de Ogp140/10 µg de LTR72 + 50 µg de CpG | 4062 ± 2291             |
| 3   | IM<br>ADN de gyp140                    | INx3<br>30 µg de Ogp140/10 µg de LTR72 + 50 µg de CpG | IN<br>30 µg de Ogp140/10 µg de LTR72 + 50 µg de CpG | 7897 ± 4742             |
| IMx2 – dos administraciones intramusculares<br>IM – una administración intramuscular<br>IN – una administración intranasal<br>INx3 – tres administraciones intranasales |  |   |   |                         |

15 Estos resultados demuestran que los títulos en suero, tal como se midieron mediante ELISA, aumentaron tras el refuerzo del recuerdo de la mucosa en los 18 meses. Los títulos aumentaron también cuando la sensibilización parenteral es con ADN en comparación con la proteína.

#### EJEMPLO 5

##### TÍTULOS TRAS SENSIBILIZACIÓN PARENTERAL – REFUERZO DE LA MUCOSA CON PLG DE *NEISSERIA MENINGITIDIS B* (MENB)

20 Se sensibilizó y reforzó a los ratones con antígeno de MenB 287 (véase el documento WO 00/66791) tal como se ha descrito anteriormente. El antígeno de MenB287 se formuló con micropartículas de PLG y/o CpG. Se muestran los resultados en la Tabla 5 a continuación. “IM” se refiere a administración intramuscular, “IN” se refiere a administración intranasal. “Inm nº” se refiere al número de inmunizaciones. La inmunización 1 se administró en el día 0, la inmunización 2 se administró en el día 28; la inmunización 3 se administró en el día 84, y la inmunización 4 se administró en el día 84; y la inmunización 4 se administró en el día 98. “2wp2” se refiere a los títulos obtenidos de sangrados tomados 2 semanas después de la inmunización nº 2 (día 42), “2wp3” se refiere a los títulos después de la inmunización nº 3 (día 98), y “2wp4” se refiere a los títulos obtenidos de sangrados tomados 2 semanas después de la inmunización nº 4 (día 112).

Tabla 5

| Grupo | Formulación              | Ruta | Inm nº  | 2wp2   | 2wp3   | 2wp4   |
|-------|--------------------------|------|---------|--------|--------|--------|
| 1     | PLG/287 + PLG/CpG, 20 µg | IM   | 1, 2, 3 | 15.673 | 4.163  | NA     |
| 2     | PLG/287, 20 µg           | IM   | 1, 2, 3 | 10.279 | 2.853  | NA     |
| 3     | PLG/287 + PLG/CpG, 20 µg | IM   | 1, 2    | 34.891 | 15.167 | 16.556 |
|       | 287 + LTK63, 20 µg       | IN   | 3, 4    |        |        |        |
| 4     | PLG/287, 20 µg           | IM   | 1, 2    | 9.064  | 7.948  | 9.412  |
|       | 287 + LTK63, 20 µg       | IN   | 3, 4    |        |        |        |

5 Tal como se muestra en la Tabla 5, los títulos aumentaron significativamente cuando la 3ª inmunización es intranasal en comparación con la intramuscular. Los títulos siguen siendo también elevados (o están aumentados) tras un segundo refuerzo de la mucosa (inmunización nº 4).

EJEMPLO 6

TÍTULOS DE IGG EN SUERO E IGA EN LAVADO VAGINAL TRAS LA SENSIBILIZACIÓN PARENTERAL – REFUERZO DE LA MUCOSA CON ANTÍGENOS DE *NEISSERIA MENINGITIDIS* O *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* (HIB)

10 Se sensibilizaron y reforzaron ratones con antígenos de MenC o HIB de acuerdo con la siguiente pauta

Pauta de inmunización

| Grp | Día | Ruta | Vacuna     | Adyuvante  | Dosis de vacuna                     |
|-----|-----|------|------------|------------|-------------------------------------|
| 1   | 0   | IN   | MenC o HIB | LTK63 o 72 | una cuarta parte de la dosis humana |
|     | 14  | IN   | MenC o HIB | LTK63 o 72 | una cuarta parte de la dosis humana |
|     | 28  | SC   | MenC o HIB | alum       | una cuarta parte de la dosis humana |
| 2   | 0   | SC   | MenC o HIB | alum       | una cuarta parte de la dosis humana |
|     | 14  | IN   | MenC o HIB | LTK63 o 72 | una cuarta parte de la dosis humana |
|     | 28  | IN   | MenC o HIB | LTK63 o 72 | una cuarta parte de la dosis humana |
| 3   | 0   | IN   | MenC o HIB | LTK63 o 72 | una cuarta parte de la dosis humana |
|     | 14  | IN   | MenC o HIB | LTK63 o 72 | una cuarta parte de la dosis humana |
|     | 28  | IN   | MenC o HIB | LTK63 o 72 | una cuarta parte de la dosis humana |
| 4   | 0   | SC   | MenC o HIB | alum       | una cuarta parte de la dosis humana |
|     | 14  | SC   | MenC o HIB | alum       | una cuarta parte de la dosis humana |
|     | 28  | SC   | MenC o HIB | alum       | una cuarta parte de la dosis humana |

IN – administración intranasal  
SC – administración subcutánea

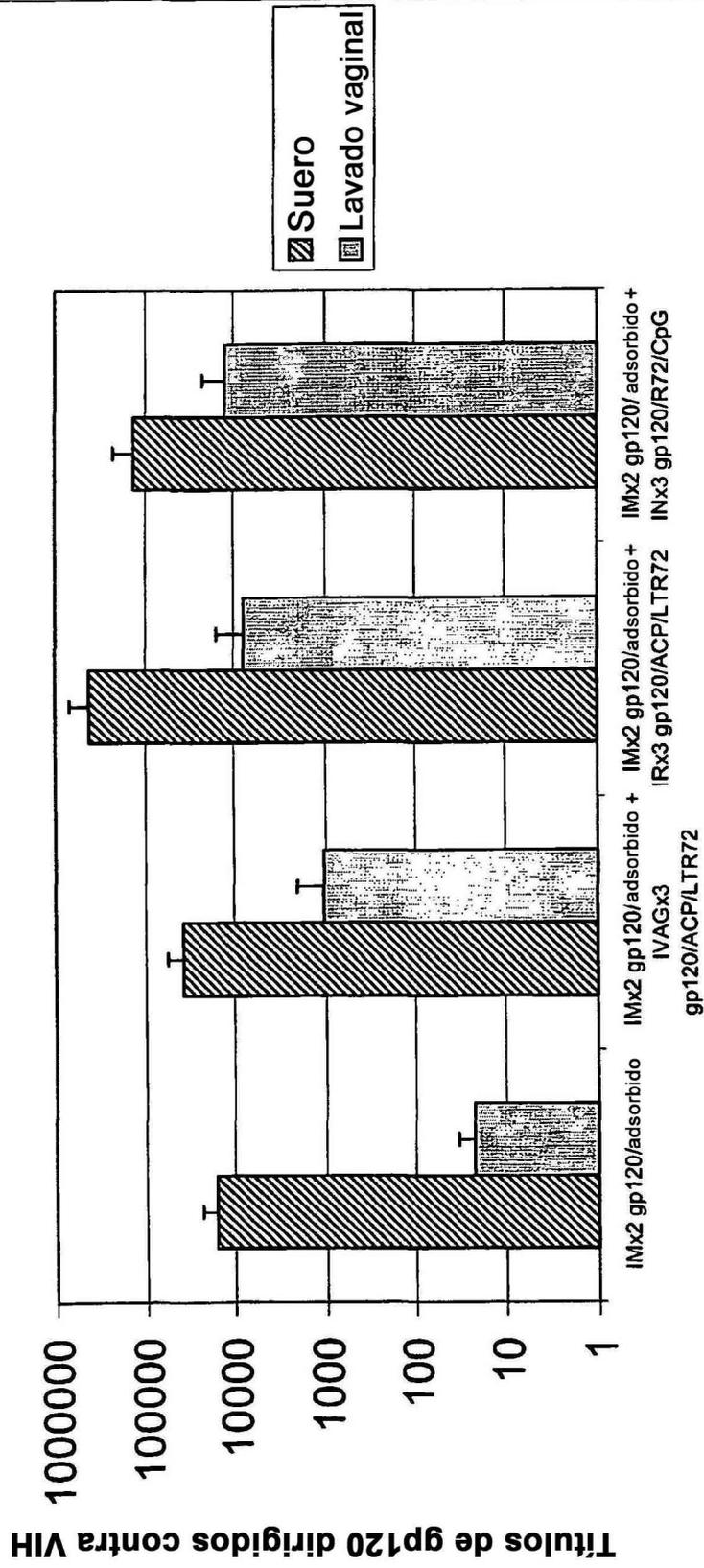
15 Para todos los grupos, se llevaron a cabo los ELISA de acuerdo con los procedimientos normalizados antes de la primera dosis (es decir, antes del día 0) y después de cada inmunización. Para MenC, se pueden usar también las evaluaciones de los títulos de anticuerpos bactericidas para evaluar la respuesta inmune. El grupo 2 presenta mayores respuestas inmunes sistémicas y/o de la mucosa en comparación con los otros grupos.

**REIVINDICACIONES**

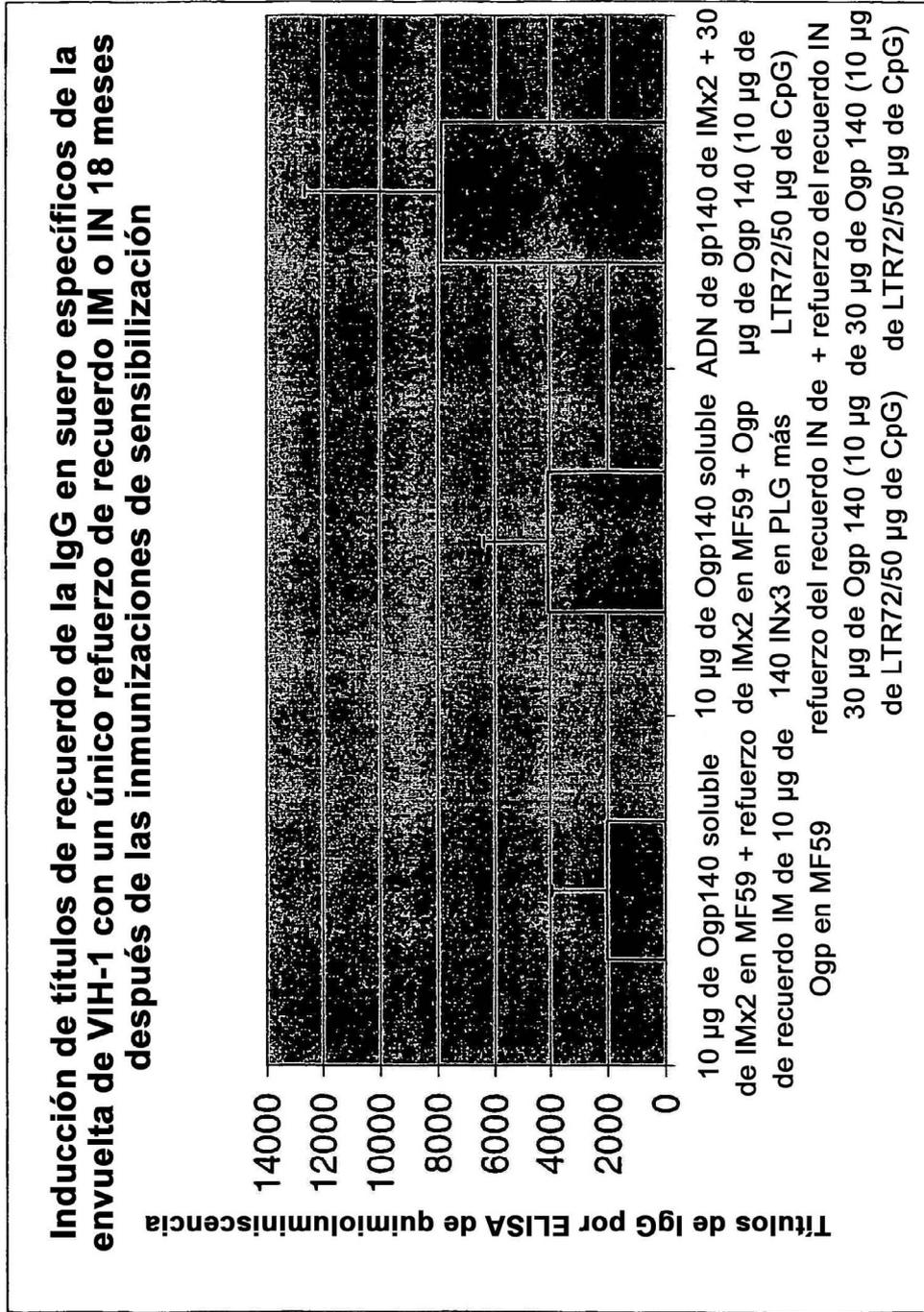
- 5 1.- Uso de una segunda composición inmunógena que comprende uno o más antígenos en la fabricación de un medicamento para la administración por la mucosa para generar una respuesta inmune en un sujeto en el que se ha administrado ya al sujeto por vía parenteral una primera composición inmunógena que comprende los mencionados uno o más antígenos, en el que dichos antígenos son sacáridos capsulares procedentes de *Haemophilus influenzae* de tipo B (Hib).
- 10 2.- Uso de una primera composición inmunógena que comprende uno o más antígenos y una segunda composición inmunógena que comprende uno o más antígenos en la fabricación de un medicamento para la administración parenteral de la primera composición inmunógena y la posterior administración por la mucosa de la segunda composición inmunógena para generar de esta forma una respuesta inmune en un sujeto, en el que los antígenos son sacáridos capsulares procedentes de *Haemophilus influenzae* de tipo B (Hib).
- 15 3.- El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la administración por la mucosa es intranasal, intrarrectal o intravaginal.
- 4.- El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la administración parenteral es transcutánea.
- 5.- El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la primera composición inmunógena comprende además una micropartícula.
- 6.- El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la segunda composición inmunógena se administra usando una micropartícula.
- 20 7.- El uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que la micropartícula comprende PLG.
- 8.- El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la respuesta inmune es una respuesta inmune sistémica.
- 9.- El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que la respuesta inmune es una respuesta inmune de la mucosa.
- 25 10.- El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera y la segunda composiciones inmunógenas son iguales.
- 11.- El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la primera composición inmunógena comprende uno o más antígenos polipeptídicos.
- 30 12.- El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que los antígenos de la segunda composición inmunógena comprenden polipéptidos.
- 13.- El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que se administra al sujeto la primera composición inmunógena dos o más veces.
- 14.- El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que se administra al sujeto la segunda composición inmunógena dos o más veces.

35

**Potenciación de respuestas de anticuerpos en suero y vaginales contra la envuelta de VIH-1 tras las inmunizaciones de sensibilización sistémica y refuerzo de la mucosa**



**FIGURA 1**



**FIGURA 2**